



INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS UMH – CSIC

Instituto de Neurociencias
Universidad Miguel Hernández
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

“Implicación del citoesqueleto en el

transporte vesicular asociado a la secreción

en la célula cromafín”

Memoria de tesis doctoral presentada por
Patricia Ñeco Aladid
San Juan, Octubre de 2003

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que les tengo que agradecer esta tesis porque entre todos en conjunto han hecho que conozca este bonito mundo de la ciencia y que disfrute con ella. Sobre todo les debo las gracias a mis directores de tesis, al Dr. Luis Miguel Gutiérrez y al Dr. Salvador Viniegra, porque son el pilar de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por los que están y los que nos han dejado, Mar, Anabel y Dani, por los momentos que hemos pasado juntos aprendiendo, sobre todo por Mar porque además de una fantástica compañera es una buena amiga.

Al doctor Álvaro Villarroel, por abrirme los ojos al mundo de la biología molecular; y a todos sus becarios, Ainhoa, Eva, Irene, David y Alfonso, por su apoyo y porque me acogieron ese mes de Julio del 2001 de una forma inmejorable.

Al doctor Ricardo Borges, por ayudarme en mi pelea con las espigas y los virus, y por su aprecio. A todos sus becarios, José Francisco, David, Marcial, Mónica, Gabi, Miguel Ángel, con los que sigo manteniendo un lazo estrecho, porque han hecho por mí más de lo que se podrían imaginar. Ellos han sido para mí como compañeros y amigos de toda la tesis.

A Carlos, también de Tenerife por su ternura y por lo mucho que me ha hecho reír.

A Luismi y José Antonio, porque me han ayudado siempre, tanto científica como emocionalmente, a ellos les debo una gran parte de la tesis. Les tengo un grandísimo aprecio.

A Sonia y M^a Luisa porque son personas especiales, y me gusta disfrutar de su compañía.

A los compañeros de los cafés matutinos, Pepe, Luismi, José Antonio Ortiz, José Antonio Bernal, Mar Francés, Mar Castillo y Dani, porque hacéis que siempre tenga ganas de reírme de buena mañana.

A todos los compañeros con los que diariamente he comido y hemos mantenido buenas tertulias, algunos de los cuales se han ido: Flavia, Pili, Encarna, Isabel, Roberto, Laura, Mar Castillo, Carmen Carrasco, Eva, Cristina, José Antonio Bernal, Maribel, Joaquín, María y Miguelón.

A los compañeros de los cursos de doctorado, Dolo, Javi y Raquel, por su amistad, sobre todo por Javi por su ternura, por animarme a subir el Mulhacén, (nunca olvidaré la experiencia) y porque en estos meses de tanto trabajo echo de menos hablar contigo.

A mis amigos de La Vila, Tati, M^a Carmen, Pepe y Paqui, Mari y Javi, porque con ellos la amistad es para siempre.

A mis amigos del volley-ball de los veranos en la playa, Marta, Berna, Boris, Pepe Cerdá, Alex, Juan Marcos, Melchor, Isidro, Dani, David y Pedro porque os gusta disfrutar del deporte tanto como a mí.



A mis padres, por su apoyo constante.

*A mis hermanos y mi sobrino, porque me han
alegrado cada momento.*

“Afirma Charles Richet que en el hombre de genio se juntan los idealismos de Don Quijote al buen sentido de Sancho. Algo de esta feliz conjunción de atributos debe poseer el investigador, temperamento artístico que le lleve a buscar y contemplar el número, la belleza y la armonía de las cosas, y sano sentido crítico capaz de refrenar los arranques temerarios de la fantasía y de hacer que prevalezcan en esa lucha por la vida entablada en nuestra mente por las ideas, los pensamientos que más fielmente traducen la realidad objetiva.”

Santiago Ramón y Cajal (1852 – 1934)

“La ciencia puede descubrir lo que es cierto, pero no lo que es bueno, justo y humano”.

Marcus Jacobson,
neurocientífico estadounidense

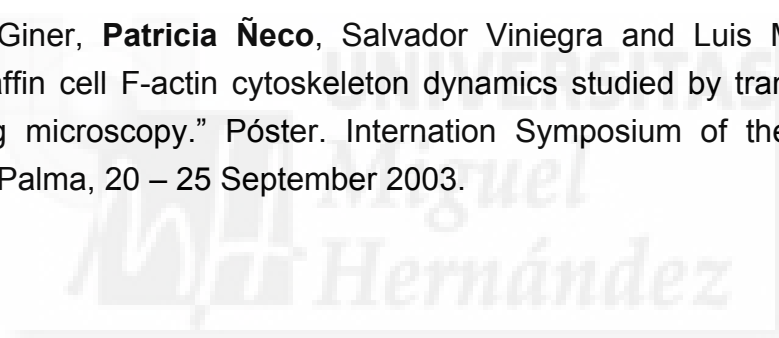
PUBLICACIONES

- Folch E, Closa D, **Ñeco P**, Sole S, Planas A, Gelpi E, Rosello-Catafau J. "Pancreatitis induces HSP72 in the lung: role of neurotrophils and xanthine oxidase". Biochemical and Biophysical Research Communications 273, 1078 – 1083 (2000).
- Gil A, Viniegra S, **Ñeco P**, Gutierrez LM. "Co-localization of vesicles and P/Q Ca^{2+} -channels explains the preferential distribution of exocytotic active zones in neurites emitted by bovine chromaffin cells". European Journal of Cell Biology 80, 358 – 365 (2001, May).
- **Ñeco P**, Gil A, Del Mar Frances M, Viniegra S, Gutierrez LM. "The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion". Biochem J. 2002 Dec 1;368(Pt 2):405-13.
- **Ñeco P**, Rossetto O, Gil A, Montecucco C, Gutierrez LM. "Taipoxin induces F-actin fragmentation and enhances release of catecholamines in bovine chromaffin cells". J Neurochem. 2003 Apr;85(2):329-37.
- **Ñeco P**, Giner D, Del Mar Frances M, Viniegra S, Gutierrez LM. "Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells". Eur J Neurosci. 2003 Aug;18(4):733-42.
- **Patricia Ñeco**, Daniel Giner, Salvador Viniegra, Ricardo Borges, Álvaro Villarroel, Luis M. Gutiérrez. "New roles of myosin II during the vesicle transport and fusion in chromaffin cells." Enviado a publicación.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- Planas A.M., Justicia C., Gabriel C., Friguls B., **Ñeco P.** “Vías de transducción de señal en el infarto cerebral: neuroprotección mediada por factores de crecimiento”. Comunicación oral. VIII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia, Murcia, 25 - 29 de Septiembre de 1999.
- **Ñeco P.**, Hoogduijn M., Sanfeliu C., Planas A.M. “Efectos del TGF- α en el neuroblastoma humano SH-SY5Y”. Póster. VIII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencias, Murcia, 25 - 29 de Septiembre de 1999.
- **Patricia Ñeco**, Anabel Gil, Salvador Viniegra, José Luis Vicedo, Francisco Llorca, Juan-Alfonso García-Romeu y Luis M. Gutiérrez. “Mecanismos citosquelatales de transporte vesicular y neurosecreción en la célula cromafín”. Comunicación oral. XXI Congreso del Grupo Español de Neurotransmisión, Molina de Segura, Murcia 13 – 16 de Diciembre de 2000.
- **Patricia Ñeco**, Anabel Gil, José Luis Vicedo, Francisco Llorca, Juan-Alfonso García-Romeu, Luis M. Gutiérrez y Salvador Viniegra. “La función de motores moleculares de transporte granular en la neurosecreción en la célula cromafín”. Póster. IX Congreso de la Española de Neurociencias, Santiago de Compostela, 8 - 11 de Septiembre de 2001.
- **Patricia Ñeco**, Anabel Gil, F. Llorca, J. A. Garcia-Romeu, S. Viniegra y L. M. Gutierrez . “La función de miosina y tubulina durante la secreción en las células cromafines bovinas”. Comunicación oral. XXII Congreso del Grupo Español de Neurotransmisión, Vielha, 11 – 13 de Diciembre de 2001.
- **Ñeco P**, Gil A, Viniegra S, Gutiérrez LM. “Cytoskeletal mechanisms of vesicle transport in neurosecretory chromaffin cells. “ Póster p214. 3rd Forum of European Neuroscience, Paris, France.13 – 17 July 2002.
- **Patricia Ñeco**, Daniel Giner, María del Mar Francés, José Luis Vicedo, Salvador Viniegra y Luis M. Gutiérrez. “Participación de subtipos de miosina en la función secretora de células cromafines bovinas.” Comunicación oral. XXIII Congreso del Grupo Español de Neurotransmisión, Montserrat, Barcelona. 11 – 14 de Diciembre de 2002.

- **Patricia Neco**, Daniel Giner, María del Mar Francés, Salvador Viniegra and Luis M. Gutiérrez. “Actin and tubulin-based vesicle transport systems co-operated during secretion in chromaffin cells.” Póster. 4th Junior Academics Meeting, Molecular mechanisms of exocytosis and endocytosis, Edinburgh, United Kindom. 23 – 25 March 2003.
- **Patricia Neco**, Daniel Giner, Salvador Viniegra, Ricardo Borges, Alvaro Villarroel and Luis M. Gutiérrez. “Myosin II role in vesicle transport and fusion studied by GFP-RLC expression in chromaffin cells” Póster y presentación oral. XXII International Symposium of the Chromaffin Cell Biology, La Palma, 20 – 25 September 2003.
- **Patricia Neco**, Ornella Rosetto, Daniel Giner, Cesare Montecucco and Luis M. Gutiérrez. “Taipoxin affects cortical f-actin and enhances secretion in chromaffin cells.” Póster. Internation Symposium of the Chromaffin Cell, La Palma, 20 – 25 September 2003.
- Daniel Giner, **Patricia Neco**, Salvador Viniegra and Luis M. Gutiérrez. “Chromaffin cell F-actin cytoskeleton dynamics studied by transmitted light scanning microscopy.” Póster. Internation Symposium of the Chromaffin Cell, La Palma, 20 – 25 September 2003.



ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	Adrenalina.
Ach	Acetilcolina.
ADP	Difosfato de adenosina.
ATP	Trifosfato de adenosina.
BH ₄	(6R)-5,6,7,8-tetra-L-hidrobiopterina.
[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio intracelular.
CA	Catecolaminas.
CaMK II	Proteína quinasa de tipo II dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina.
D	Coefficiente de difusión.
DBH	Dopamina-b-hidroxilasa.
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium.</i>
BoNT A	Neurotoxina botulínica A.
CaM	Calmodulina
L-Dopa	3,4-dihidroxifenilalanina.
ELC	Cadena ligera esencial de miosina.
GFP	Proteína verde fluorescente.
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50 %.
I _{max}	Amplitud de máxima corriente.
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato.
LAAD	L-aminoácido aromático descarboxilasa.
m	Pendiente (velocidad entre el 25-75% de la amplitud).
MHC	Cadena pesada de miosina
MLC	Cadena ligera de miosina.
MLCK	Proteína quinasa de la cadena ligera de miosina.
MSD	desplazamiento cuadrático medio.
NA	Noradrenalina.
NSF	Proteína <i>N-ethylmaleimide-sensitive-factor.</i>
PA	Ácido fosfatídico.
PACAP	Polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria.
PKA	Proteína quinasa A.
PKC	Proteína quinasa C.

PLD	Fosfolipasa D.
PNMT	Fenil-etanolamina-N-metil transferasa.
Q	Carga de una espiga amperométrica (integral de la corriente).
RLC	Cadena ligera reguladora de miosina.
ROCK	Proteína quinasa dependiente de Rho-A.
RyRs	Receptores de rianodina.
SERCA	Transportador de calcio del retículo endoplásmico.
SNAP-25	Proteína de 25 KDa asociada al sinaptosoma.
$t_{1/2}$	Tiempo a la mitad de la amplitud de corriente.
TH	Tirosina hidroxilasa.
TIRFM	Microscopía de fluorescencia de reflexión interna total.
t_p	Tiempo en alcanzar la máxima amplitud de corriente.
VAMP	Sinaptobrevina.
VIP	Péptido inhibidor vasoactivo.
Δt	Intervalo de tiempo





ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	19
1. Evolución en el estudio de la exocitosis y el transporte vesicular.....	21
2. La célula cromafín como modelo de estudio de la neurosecreción.....	24
2.1. Generalidades de la célula cromafín: origen, localización, tipos y función.....	24
2.2. Generalidades de la vesícula cromafín: tamaño, composición y contenido de la matriz intravesicular.....	25
2.3. Síntesis y almacenamiento de las catecolaminas.....	26
3. La exocitosis.....	29
3.1. Acoplamiento estímulo-secreción en la célula cromafín.....	29
3.2. El calcio en la célula cromafín.....	31
3.3. El ciclo secretor.....	33
4. Introducción general del citosqueleto.....	36
4.1. El citosqueleto de F-actina.....	37
4.1.1. Descripción de proteínas que interaccionan con el citosqueleto de F-actina	39
4.1.2. Proteínas motoras: descripción de las miosinas no convencionales.....	42
4.1.3. La estructura y la función de la miosina	45
4.2. El sistema de microtúbulos y sus motores moleculares.....	52
4.2.1. Implicación del sistema de microtúbulos en el transporte vesicular y en la secreción.....	54
4.2.2. Los microtúbulos y el citosqueleto de actina cooperan en el transporte de organelas.....	55
OBJETIVOS.....	57

RESULTADOS	61
1. El papel de la miosina en el transporte vesicular durante la secreción de la célula cromafín bovina.....	63
2. Participación diferencial de los sistemas de transporte vesicular basados en la actina y la tubulina durante la secreción en las células cromafines bovinas.....	67
3. La miosina II durante el transporte vesicular y la fusión en células cromafines...	71
DISCUSIÓN	75
1. Participación del binomio actina-miosina en la secreción y en el transporte citosólico.....	77
2. El transporte de los gránulos cromafines está mediado por los filamentos de actina-miosina y el sistema de microtúbulos en etapas secuenciales.....	80
3. ¿Qué subtipo o subtipos de miosina son responsables del transporte durante la secreción?	87
4. Participación de la miosina II en el transporte vesicular y en el mecanismo de fusión exocitótica.....	89
CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFÍA	101
ANEXOS	123
Anexo I	125
Anexo II	137
Anexo III	149
APÉNDICE	193



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.- Evolución en el estudio de la exocitosis y el transporte vesicular

El transporte vesicular y los pasos de maduración vesicular que preceden a la fusión de membranas y liberación de neurotransmisores u hormonas juegan un papel importante en la regulación de la velocidad de la secreción. Hasta el advenimiento de la técnica de microscopía de reflexión total (TIRFM) (Steyer et al., 1997; Oheim et al., 1998) no fueron posibles los estudios directos de la translocación intracelular, el anclaje y las transiciones que conducen a la exocitosis. Pero sí fueron posibles las observaciones indirectas a través del estudio de la depleción de la respuesta secretora por estimulación repetitiva o sostenida (Elmqvist y Quastel, 1965; Betz et al, 1970). Así es como en los años 80 tuvo lugar el desarrollo de la técnica de medición de la capacidad (Hamill et al., 1981; Fenwick et al., 1982a,b; Neher y Marty, 1982) que previa estimulación estimaba el curso temporal de la depleción y el recambio de la población de vesículas listas para la liberación de la capa subyacente a la membrana plasmática. La técnica de medición de la capacidad se basa en el comportamiento físico de la membrana celular como un aislante dieléctrico de un condensador, y mide el aumento de capacidad en la superficie celular debido a la adición de membrana por la fusión de vesículas secretoras. Pero hay un problema asociado a esta técnica, y es que la medida de capacitancia es una medida neta y solamente puede estimar con seguridad la velocidad de secreción si los procesos de exo- y endocitosis están claramente separados. Otra técnica de gran trascendencia actual es la amperometría (detección electroquímica de los productos secretados) desarrollada en los años noventa y que estableció que la secreción de las catecolaminas de una única vesícula podía ser detectada (Leszczyszyn et al., 1990; Wightman et al., 1991; Chow et al., 1992). La corriente de oxidación es una medida directa de la secreción y, a diferencia de la capacitancia, no es susceptible de ser interferida por la endocitosis. La estimulación celular conduce a la producción de gran número de transitorios de corriente oxidativa (espigas de oxidación), muchas veces precedidos de un pequeño pie indicativo de una salida leve de neurotransmisor

por el poro de fusión (canal que inicia la conexión entre la matriz intragranular y el medio extracelular) (Almers y Tse, 1990). Son muchas las sustancias susceptibles de ser detectadas con esta técnica (dopamina en las células PC12, histamina y serotonina en mastocitos, insulina en células β -pancreáticas, etc.) El estudio de un único evento excitotico ha sido logrado recientemente usando un electrodo electroquímico dentro de una pipeta registrando simultáneamente en una porción de membrana aislada la fusión de la vesícula y la liberación de neurotransmisor. Esta técnica se conoce como amperometría en parche de membrana (Albillos et al. 1997).

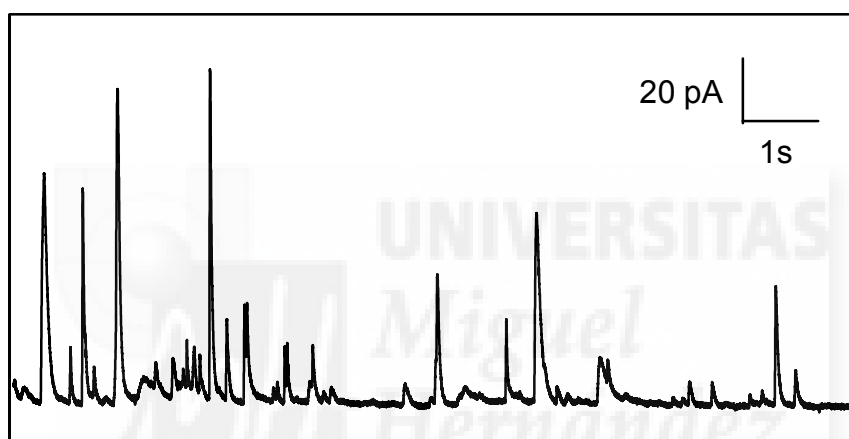


Figura 1. Ejemplo de registro amperométrico en célula única mostrando diferentes excitosis. Cada uno de estos transitorios de corriente son resultado de la oxidación electroquímica de los productos liberados por vesículas individuales, tras la aplicación de un estímulo secretor.

En estos años también tuvo lugar el desarrollo de modelos celulares permeabilizados, inicialmente mediante la aplicación de descargas eléctricas de alto voltaje (Baker y Knight, 1978; Knight y Baker, 1982) que permitieron acceder a los compartimentos intracelulares y conocer los requerimientos iónicos mínimos para que se lleve a cabo la excitosis, demostrándose que es el calcio, junto el ATP, el único elemento cuya presencia es necesaria y suficiente para que el proceso tenga lugar. No obstante, el empleo de detergentes (o-estreptolisina o digitonina) y toxinas permeabilizadoras de células cromafines cultivadas nos han evidenciado en la actualidad de la existencia de proteínas citosólicas solubles esenciales para la excitosis (Sarafian et al., 1987).

Aunque muchos estudios han intentado caracterizar las proteínas solubles y de membrana que participan en la exocitosis, existían impedimentos técnicos difíciles de solventar. En este sentido el mayor avance en esta dirección fue llevado a cabo por el estudio de levaduras genéticamente deficientes (Ferro-Novick y Janh, 1994).

Las técnicas ópticas también han aportado datos relevantes en el estudio de las etapas previas a la exocitosis. Tienen inicio también a principios de los años noventa con la microscopía de contraste de interferencia diferencial de alta resolución (DIC), que permitía visualizar eventos exocitóticos únicos en células cromafines (Terakawa et al., 1991). Pero la resolución espacial de esta técnica junto con la microscopía de fluorescencia es limitada (Betz y Bewick 1992; Smith y Betz, 1996).

Recientemente han surgido dos avances técnicos que han permitido ampliar el estudio sobre la movilidad granular en células vivas: a) el uso de construcciones de proteína verde fluorescente (GFP) y otras sondas como marcadores granulares, y b) el uso de la microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRFM) para visualizar los gránulos secretores en un plano de 300 nm de la membrana plasmática, técnica ampliamente desarrollada por los grupos de Oheim y Stühmer y de Steyer y Almers en las células cromafines y las células PC12. Esta técnica es particularmente importante puesto que permite estudiar la movilidad de los gránulos secretores al aproximarse a la membrana plasmática, en el anclaje y en la fusión.

En nuestro laboratorio hemos adaptado la técnica de microscopía confocal dinámica de fluorescencia al estudio de la localización espacio-temporal de las vesículas. Esta técnica, combinada con el programa informático apropiado, nos ofrece la ventaja de hacer un seguimiento de las vesículas que se localizan en el interior citosólico y poder determinar sus trayectorias temporales. Indicamos en este caso que es una ventaja respecto a las técnicas mencionadas anteriormente porque se puede tomar imágenes de cualquier zona de la célula con una elevada resolución.

2.- La célula cromafín como modelo de estudio de la neurosecreción

La célula cromafín ha mostrado ser uno de los sistemas más útiles para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares de la liberación de los neurotransmisores.

La ruta seguida por las proteínas secretoras en la célula fue delineada en estudios clásicos por George Palade a partir del estudio de células exocrinas pancreáticas. En años más recientes, los tipos celulares más estudiados en la neurosecreción han sido: la célula cromafín adrenal (y su equivalente tumoral la línea celular PC12), la célula β -pancreática y las células hematopoyéticas (los mastocitos, las plaquetas y los neutrófilos).

No obstante la célula cromafín tiene un gran interés por sí misma por formar parte del sistema neuroendocrino que controla funciones vitales a través de los receptores presentes en gran parte del organismo.

2.1.- Generalidades de la célula cromafín: origen, localización, tipos y función.

Las células cromafines presentan un origen común con las neuronas puesto que derivan embriológicamente de la cresta neural, de tejido ectodérmico. Durante el desarrollo ontogénico parte de estas células migran ventralmente, dando lugar a las células cromafines, siendo los glucocorticoides de la corteza de la glándula adrenal esenciales para que se realice esta transformación.

Estas células se ubican en el tejido parenquimatoso de la médula suprarrenal o adrenal, organizándose en forma de racimo, que se encuentran dispuestas en torno a una red vascular con el fin de desencadenar una respuesta humoral rápida.

El tejido parenquimático de la médula suprarrenal está formado por dos tipos celulares mayoritarios: las células adrenérgicas, localizadas en la periferia, y las células noradrenérgicas en zonas centrales de la médula (Livett et al., 1982).

Estas células reciben inervación simpática, mayoritariamente procedente del nervio esplácnico, que presentan naturaleza colinérgica, aunque algunos terminales secretan también encefalinas (Pelto-Huikko et al., 1985), la sustancia P (Zhou y Livett, 1990) y el péptido inhibidor vasoactivo (VIP).

La función primaria de las células cromafines es la liberación exocitótica al torrente sanguíneo de catecolaminas, la adrenalina (A) y la noradrenalina (NA) y, en menor proporción la dopamina y otras sustancias como péptidos opioides, que se sugiere que se comportan como hormonas con acciones a larga distancia, aunque también podrían estar participando en la regulación de la exocitosis a de una forma autocrina/paracrina, a través de la facilitación de canales de Ca^{2+} (Gandía et al., 1998).

Todo esto, como parte de una respuesta adaptativa e involuntaria al estrés, tanto físico (hemorragia, estado de hipoxia o de glucemia, etc.) como emocional (Bronner-Fraser et al., 1991).

Esta función la realiza a través de sus receptores α - y β -adrenérgicos y dopaminérgicos presentes en diferentes órganos como el corazón, el riñón, en el aparato respiratorio y en los sistemas circulatorio y muscular esquelético. De esta manera, las catecolaminas liberadas por las células cromafines tienen el desempeño de asegurar la homeostasis del organismo en todo momento y a situar al individuo en actitud de alerta y de rendimiento máximo. Por esta razón participan en una serie de reacciones metabólicas y fisiológicas como son: la elevación de la glucemia, la movilización de los depósitos de hidratos de carbono del hígado, el promover la conversión del glucógeno muscular en ácido láctico (a partir del cual el hígado puede sintetizar nuevos hidratos de carbono) y el provocar la liberación hipofisaria de ACTH con el fin de estimular la secreción de glucocorticoides de la corteza suprarrenal.

2.2.- Generalidades de la vesícula cromafín: tamaño, composición y contenido de la matriz intravesicular.

La célula cromafín posee una gran cantidad de gránulos (vesículas) densos repartidos por todo su citoplasma que son llamados gránulos cromafines, y son organelas en las cuales se almacenan los productos de secreción.

El tamaño de las vesículas cromafines puede oscilar, con un diámetro entre los 65 y los 590 nm (Ornberg et al., 1995). Esta diferencia se debe a que en la misma célula coexisten al menos tres tipos de vesículas: a) las vesículas grandes de núcleo denso a los electrones (observado por microscopía electrónica) b) las pequeñas y claras, encargadas de la exo/endocitosis constitutiva y c) las microvesículas con un tamaño aproximado de 50 nm de diámetro, parecidas a las sinápticas (*synaptic-like microvesicles*, SLMVs) cuya

función en las células cromafines se desconoce, pero que en las neuronas son las mayoritarias y almacenan los neurotransmisores para la exocitosis rápida.

La membrana de las vesículas cromafines está compuesta por lípidos, el más abundante es la fosfatidiletanolamina aunque también contiene mucho colesterol, y posee más de cuarenta proteínas diferentes, lo que la convierte en una organela de función altamente regulada.

De entre las proteínas cabe destacar la dopamina- β -hidroxilasa (DBH) que es la más abundante, la H⁺-ATPasa que posibilita la recaptación de las CA desde el citoplasma al interior de la vesícula a través de la generación de un potencial electroquímico, los transportadores de iones Ca²⁺ y de nucleótidos.

Por tanto la matriz granular contiene catecolaminas en una concentración muy elevada (0.5-1 M) (Jankowski et al., 1993), nucleótidos entre los cuales el más abundante es el ATP (1.5 M) (Kostron et al., 1977), ácido ascórbico, iones Ca²⁺ (16 mM), y otra serie de proteínas como las cromograninas y la secretogranina II. Las cromograninas son el grupo de proteínas predominantes que constituyen una familia de proteínas ácidas localizadas en variedad de tejidos neuroendocrinos (Fischer-Colbrie et al., 1985). Se clasifican en tres grupos: A, B y C (Fischer-Colbrie y Frischenschlager, 1985; Fischer-Colbrie et al., 1986), y participan en el empaquetamiento y quelado de las catecolaminas y del ATP con el fin de reducir el gradiente osmótico (Helle et al., 1985). También se encuentran péptidos opiáceos como encefalinas, dinorfinas (Viveros et al., 1979; Wilson et al., 1980) aunque en menor proporción.

2.3.- Síntesis y almacenamiento de las catecolaminas.

La adrenalina, noradrenalina y dopamina son catecolaminas que como su nombre indica guardan en común la presencia de un anillo aromático catecol o 3,4-dihidroxifenilo y una cadena etilamina en posición meta.

El proceso de síntesis enzimática tiene lugar a través de una vía multiseccional que parte del aminoácido L-tirosina, que es un aminoácido aromático esencial (ver figura 2).

La primera etapa de esta síntesis consiste en la hidroxilación de L-tirosina para dar la 3,4-dihidroxifenilamina (L-Dopa), la reacción está catalizada por la enzima tirosina-hidroxilasa (TH) y constituye el paso limitante de la síntesis de catecolaminas. Esta enzima que está presente en el citoplasma posee una actividad de 100 a 1.000 veces menos que las otras enzimas de la vía, y por

tanto está sujeta a influencias de activación e inhibición. Por ejemplo está el hecho de que durante la estimulación prolongada del nervio esplácnico se produce un rápido incremento en la actividad de TH a través de mecanismos de fosforilación (Joh et al., 1978, Vulliet et al., 1980). Por otra parte esta enzima posee un mecanismo de retroalimentación negativo, ya que las propias catecolaminas compiten con el cofactor de la reacción, la (6R)-5,6,7,8-tetra-L-hidrobiopterina (BH₄) regulando la vía.

La segunda etapa de la vía es catalizada por una enzima también citosólica presente en otros tipos celulares, es la L-aminoácido aromático descarboxilasa (LAAD). Cataliza la reacción de descarboxilación de la L-dopa para dar dopamina.

La siguiente reacción es catalizada por la dopamina-β-hidroxilasa (DBH) que da como resultado la NA, pero esta enzima está unida a la membrana vesicular y para que la hidroxilación tenga lugar es necesario que la dopamina sea captada por la vesícula. Esta reacción catalítica necesita de la presencia de O₂ y ácido ascórbico como cofactores .

En las células cromafines adrenérgicas, la NA es exportada al citoplasma, donde la feniletanolamina-N-metil transferasa (PNMT) cataliza la reacción de metilación para dar A, que posteriormente entra en el gránulo para su almacenamiento.

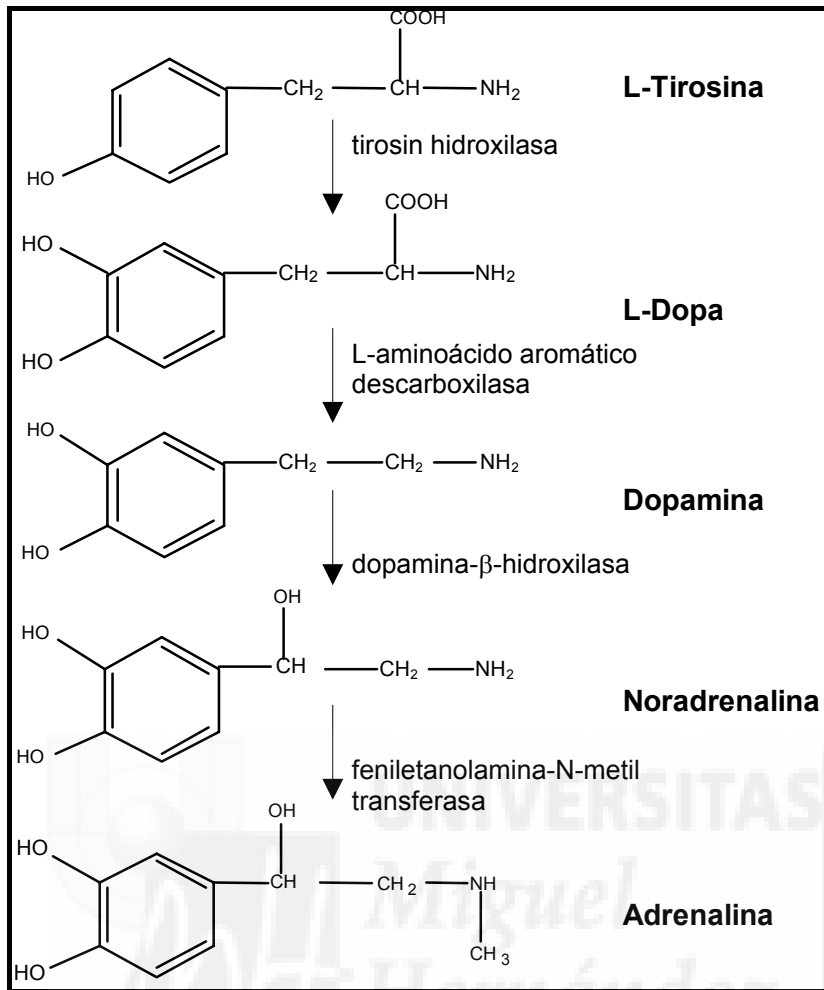


Figura 2. Ruta biosintética de las catecolaminas en las células cromafines.

3.- La exocitosis

La exocitosis consiste en la fusión de la membrana de las vesículas que contienen sustancias activas con la membrana plasmática, con la finalidad de liberar al espacio extracelular las sustancias almacenadas en el interior de la vesícula. Es un proceso celular universal y la manera más común de secretar mensajeros químicos y renovar componentes celulares. Sin embargo también es el procedimiento mediante el cual las neuronas y células neuroendocrinas liberan de forma cuántica los neurotransmisores.

Existen dos tipos de exocitosis en células eucariotas: la regulada y la constitutiva. En la exocitosis constitutiva, las vesículas sintetizadas son liberadas por fusión espontánea de las membranas. Este tipo de secreción está presente en todos los tipos celulares.

Sin embargo, la exocitosis regulada, es una especialización de la ruta de la secreción constitutiva, las vesículas se acumulan cerca de los sitios de liberación bajo el control de mecanismos que impiden la fusión de membranas descontrolada. Durante el estímulo este control inhibitorio queda inactivado mientras que otros mecanismos activadores disparan el proceso de fusión, por lo que las sustancias almacenadas en la vesícula se liberan al espacio extracelular. Este tipo de exocitosis se encuentra en tipos celulares específicos como las neuronas y los sistemas endocrinos y neuroendocrinos.

3.1.- Acoplamiento estímulo-secreción en la célula cromafín.

El principal estímulo fisiológico que provoca la exocitosis de catecolaminas es la acetilcolina (ACh) liberada por las terminaciones nerviosas del nervio esplácnico que hacen sinapsis con las células cromafines.

La ACh se une a sus receptores nicotínico (ionotrópico) y muscarínico (metabotrópico) situados en la membrana plasmática de las células cromafines. El receptor nicotínico puede ser de dos tipos: a) sensible al bloqueo con α -bungarotoxina (toxina producida por la serpiente *Bungarus multicinctus*) y b) insensible al bloqueo con esta toxina. Ambos receptores nicotínicos están presentes en la célula cromafín.

Durante la estimulación nicotínica, la acetilcolina produce la apertura del canal iónico del receptor permitiendo la entrada de Na^+ . Junto al Na^+ también entran iones Ca^{2+} , aunque en menor proporción (Douglas et al., 1967a,b), produciendo una ligera despolarización de la membrana, que es suficiente para

activar los canales rápidos de Na^+ dependientes de voltaje y sensibles a tetrodotoxina (Ceña et al., 1983). La entrada de Na^+ por estos canales selectivos aumenta la despolarización celular activando la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y sensibles a las dihidropiridinas (García et al., 1984) con lo que los iones de Ca^{2+} fluyen hacia el interior celular aumentando la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Esta elevación transitoria de los niveles de Ca^{2+} , la señal que activa la secreción.

En algunas especies, como en la rata y en el pollo, el aumento del Ca^{2+} citosólico que sigue a la estimulación no procede de la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje sino que es liberado de los reservorios intracelulares por el inositol trifosfato (IP_3).

Además de los receptores colinérgicos, existen evidencias que soportan la existencia en las células cromafines de receptores de histamina, bradiquinina y angiotensina II. En los tres tipos de receptores la estimulación no implica la participación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Para la histamina y la angiotensina II la entrada de Ca^{2+} se produce mediante la activación de la vía del IP_3 (Stauderman y Pruss, 1990; Stauderman y Murawsky, 1991). En el caso de bradiquinina parece que están implicados canales de Ca^{2+} operados por receptor o por segundos mensajeros, que hasta el momento no han sido identificados.

La secreción de catecolaminas también puede ser disparada con concentraciones elevadas de K^+ extracelular que activa los canales dependientes de voltaje sin requerir la activación del receptor nicotínico.

Otros cationes divalentes como el estroncio y el bario, que también permean por los canales de Ca^{2+} , inducen secreción y se han empleado como herramientas experimentales (Hubbard et al., 1968).

3.2.- El calcio en la célula cromafín.

El calcio es necesario para la transmisión nerviosa y juega un papel esencial en la exocitosis. Así lo demostraron Katz y Miledi (1965) en un trabajo realizado en la unión neuromuscular de rana; que más adelante fue extendido por Douglas (1968) a las células cromafines.

Sea cual sea el secretagogo que se utilice, el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ es claramente el elemento clave: el origen del calcio movilizado, sea del exterior o de compartimentos intracelulares, determina la localización de la exocitosis en la célula, la cinética de liberación y la extensión de la secreción.

El mecanismo por el cual, el Ca^{2+} dispara la secreción no se conoce bien todavía, se han realizado numerosos trabajos en la célula cromafín con el fin de caracterizar el papel del calcio como inductor de la exocitosis.

En los tipos celulares donde el Ca^{2+} es el principal disparador de la exocitosis regulada, el Ca^{2+} procede de dos fuentes: a) del espacio extracelular y b) de los reservorios intracelulares como el retículo endoplásmico. En la célula cromafín tiene más importancia el Ca^{2+} extracelular (Cheek et al., 1989), el cual logra alcanzar por sí mismo la respuesta máxima.

La $[Ca^{2+}]$ extracelular es aproximadamente 2 mM. En condiciones basales la $[Ca^{2+}]_i$ es del orden de 100 nM o inferior. En las células nerviosas, por lo general, la apertura de los canales dependientes de voltaje que ocurre tras la despolarización produce un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, la cual alcanza en microsegundos unos 100 μ M. En este sistema, los canales de calcio forman complejos proteicos multiméricos donde las vesículas sinápticas se encuentran a pocos nanómetros de distancia de la membrana plasmática y la exocitosis tiene lugar en un milisegundo. En cambio, en las células cromafines la liberación es más lenta y se ha pensado que los sitios de liberación de las vesículas no se encuentran en íntima asociación con la localización de los canales de calcio y que la $[Ca^{2+}]_i$, entre 0,5 a 10 μ M (Kao y Schneider, 1986), dispara la exocitosis. Aunque en células cromafines cultivadas que emiten neuritas se ha visto correlación espacial entre los canales P/Q y la secreción (Gil et al., 2001b).

Esta diferencia entre las neuronas y las células cromafines se debe a que los sistemas de regulación de la exocitosis difieren en uno y otro modelo celular. Sin duda esta diferencia responde a las funciones fisiológicas que desempeñan tanto las neuronas como las células cromafines. En las neuronas la liberación tiene que ser muy rápida, para que la transmisión nerviosa siga su

ritmo. Por el contrario, en las células cromafines la liberación rápida no es necesaria, las catecolaminas y demás sustancias se liberan a la sangre y el paso limitante no es la velocidad de secreción sino el tiempo que están circulando hasta llegar al órgano diana.

Tres son los tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje presentes en la célula cromafín bovina: los canales de tipo L (*Long lasting*), producen una corriente de entrada de larga duración y son sensibles a dihidropiridinas; los de tipo N son abundantes aunque parece que no están implicados en secreción; y los de tipo P/Q, sí que participan en secreción y son sensibles a ω -agatoxina y a algunas ω -conotoxinas.

La difusión del Ca^{2+} hacia el citosol está obstaculizada a consecuencia de las proteínas que lo tamponan y los procesos celulares que retiran el ión

Los mecanismos por los que el Ca^{2+} es retirado del citosol son por transporte a las organelas intracelulares como el retículo endoplásmico y la mitocondria, y por la acción del intercambio $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ en la membrana plasmática.

El retículo participa tanto en los procesos de retirada del ión como en los de liberación del mismo. La membrana del retículo posee una bomba de Ca^{2+} (una ATPasa de tipo SERCA, *Sarco(end)plasmic Reticulum (Ca²⁺)-ATPase*) que participa en la retirada de Ca^{2+} y dos receptores que participan en la liberación de Ca^{2+} desde el lumen reticular: el receptor de ryanodina (RyR) y el receptor del inositol trifosfato (IP_3R). El RyR se activa por el aumento del Ca^{2+} en el entorno próximo, liberando más Ca^{2+} desde el retículo y propagando así la señal por el citosol; es lo que se conoce como la liberación de Ca^{2+} inducida por el Ca^{2+} (Alonso et al., 1999). Este proceso es importante por la generación de microdominios de Ca^{2+} (diferente distribución espacio-temporal del Ca^{2+} intracelular), los cuales son responsables de que se lleven a cabo en la célula una serie de procesos que dependen de este ión. Tales son el movimiento de vesículas recién formadas, el reclutamiento de vesículas de las capas internas hacia la periferia celular, la activación de enzimas que participan en el metabolismo de las catecolaminas, la reorganización del citosqueleto de F-actina, y otros procesos dependientes de Ca^{2+} .

El IP_3R se activa por el IP_3 (un segundo mensajero que procede de la actividad de la fosfolipasa de tipo C (PLC) y también induce la liberación de Ca^{2+}).

La mitocondria también es importante en la homeostasis del calcio y lo hace a través de un uniportador dependiente del potencial. Se ha propuesto que el papel de las mitocondrias es clave para la generación de los microdominios de Ca^{2+} por su localización cercana a la membrana plasmática (Montero et al., 2000).

3.3.- El ciclo secretor

La exocitosis es el último estadio de un proceso amplio que es el tráfico general de membranas y que incluye el transporte de membranas en el retículo endoplásmico/aparato de Golgi, la formación de endosomas, la endocitosis y la secreción de vesículas al espacio extracelular (ver figura 3). Cada estadio requiere la fusión de membranas y la maquinaria proteica que participa está muy conservada.

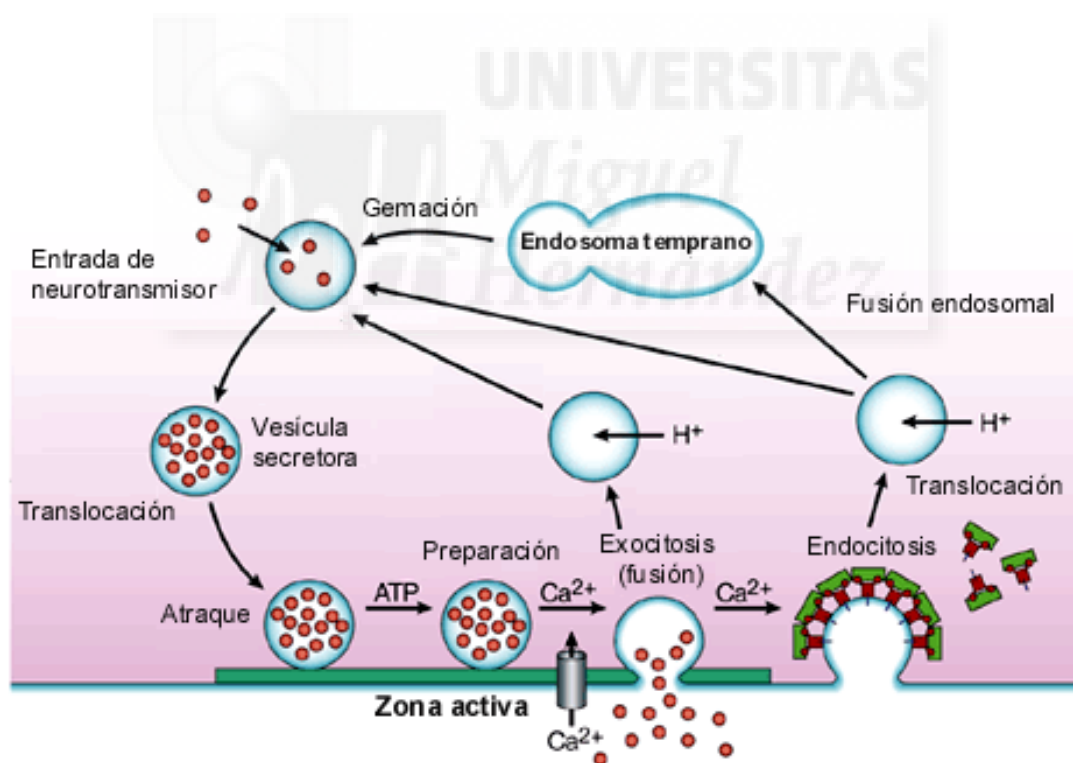


Figura 3. Representación de las etapas que componen el ciclo vesicular excitotóxico que se desarrolla en el terminal nervioso presináptico.

Las vesículas cromafines, una vez formadas en la red de *trans*-Golgi (TGN), sufren un proceso de maduración en el que participan las H⁺-ATPasas (que generan un pH de 5,6 en el interior del gránulo), y los transportadores de aminos y nucleótidos. Durante este proceso se translocan a la región cercana de la membrana plasmática donde interaccionan con los filamentos del citoesqueleto (como se comentará más adelante) y dan lugar al compartimento de vesículas de reserva. Las vesículas que morfológicamente han superado este estadio e interaccionan físicamente con proteínas de la membrana plasmática dan lugar al compartimento de vesículas listas para exocitar.

La interacción de las vesículas con la membrana plasmática se hace a través de la formación de un complejo de fusión formado por proteínas solubles y proteínas de membrana llamadas SNARE. Entre las solubles están el NSF (*N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*) y proteínas SNAPs (*soluble NSF-attachment protein*). En las neuronas y células neuroendocrinas se han identificado tres proteínas SNARE (*soluble NSF-attachment receptor*) dos en la membrana plasmática y una en la membrana vesicular (ver figura 5). La proteína de membrana asociada a la vesícula se llama VAMP o sinaptobrevina y las proteínas que se encuentran inmersas en la membrana plasmática son sintaxina y SNAP25 (*synaptosomal associated protein of 25 KDa*) (Llona, 1995). Este complejo fue propuesto originariamente por Söllner y colaboradores como la maquinaria exocitótica en lo que ellos denominaron “hipótesis SNARE” (Söllner et al., 1993).

Existen otra serie de proteínas que actúan regulando la función de las anteriores. La proteína munc-18 es una proteína de la membrana plasmática (Südhof et al., 1993), interacciona con sintaxina impidiendo su unión con la VAMP y la SNAP-25 (Pevsner et al., 1994). La sinaptofisina ejerce un papel similar pero con VAMP (Calakos y Scheller, 1994; Edelman et al., 1995). Y por último, la sinaptotagmina es una proteína de la membrana vesicular que actúa inhibiendo la fusión, y únicamente en presencia de Ca²⁺ su efecto bloqueante se anula (Bommert et al., 1993; Popov y Poo, 1993).

La importancia de las proteínas SNARE en la secreción fue establecida por el uso de toxinas clostridiales que afectan a elementos específicos de la maquinaria SNARE en los terminales nerviosos (Montecucco y Schiavo, 1993).

Las vesículas en el compartimento de vesículas listo para exocitar pueden estar en dos estados de liberación:

a) vesículas no preparadas (*docked*) que incluye a las vesículas que una vez atracadas a la membrana plasmática no han sufrido el proceso de maduración. El proceso de atraque (*docking*) requiere el movimiento de las vesículas hacia la membrana plasmática previa reorganización del citoesqueleto, sucediendo la primera interacción física de las proteínas de la membrana vesicular (v-SNARE) con las proteínas de la membrana plasmática (t-SNARE) y la formación de un complejo multiproteico 20s.

b) vesículas preparadas (*primed*), que incluye las vesículas competentes para la fusión. El proceso de preparación (*priming*) depende de ATP-Mg²⁺ para que tenga lugar (Parsons et al., 1995) y se ha sugerido que podría iniciar la exocitosis llevando a cabo, un proceso de semifusión, y en este punto, las vesículas se detendrían esperando una señal de Ca²⁺ (Südhof, 1995).

El paso final de la fusión es dependiente del Ca²⁺ y del pH pero no del ATP y trae consigo la formación de un poro entre el interior de la vesícula y el medio extracelular, su expansión, y finalmente la liberación de los contenidos vesiculares al espacio extracelular. En algunos casos, el poro de fusión, que toma forma en omega, puede expandirse de forma irreversible o volverse a cerrar (Lindau y Almers, 1995).

Se han realizado estudios con el fin de conocer la relación entre la concentración libre de Ca²⁺ y la velocidad inicial de la exocitosis de este compartimento de vesículas listas para exocitar. Para ello se emplearon compuestos quelantes de calcio fotolizables (DM-nitrofen o NP-EGTA) que se introducían en la célula a través de una pipeta. Tras la aplicación de un haz de luz intenso se producía la liberación de Ca²⁺ instantánea y homogénea en todo el citosol. En las células cromafines el grupo de Erwin Neher mostró, mediante el registro de la exocitosis por medida de la capacidad en combinación con esta técnica (Heinemann et al., 1993; Neher y Zucker, 1993; Heinemann et al., 1994), la existencia del compartimento de vesículas listo para exocitar, que se secretaba entre los 20 – 50 ms tras el estímulo. En las vesículas sinápticas esta velocidad es todavía mayor, alrededor de los 60 μs en sinapsis centrales (Sabatini y Regehr, 1996).

4.- Introducción general del citosqueleto

En su mayor parte, la movilidad de las organelas está mediada por los microtúbulos y los filamentos de actina a través de proteínas motoras. Estas proteínas convierten la energía química liberada por la hidrólisis de nucleótidos en energía mecánica capaz de producir movimiento. Estos movimientos producen efectos que pueden cambiar la morfología celular, como por ejemplo, en la contracción muscular, en la elongación del huso mitótico, en la citoquinesis, o en la migración celular. Por otro lado, estos motores también participan en el transporte intracelular, en procesos como la separación de los cromosomas durante la división, el movimiento del centrosoma, el transporte del ARNm, y el tráfico de organelas compuestas por sistemas de membranas.

El citosqueleto de la célula cromafín es una estructura dinámica que cambia de acuerdo con los diferentes estadios de la función celular que desempeña.

En la célula cromafín, la secreción regulada es disparada por un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Douglas y Rubin, 1961). Sin embargo, a pesar de que el papel del Ca^{2+} en la neurosecreción ha sido estudiado durante muchos años, los mecanismos por los cuales el Ca^{2+} participa en este proceso no se han aclarado todavía. Una hipótesis atractiva es que uno de los sitios de acción del Ca^{2+} en la secreción sea el control del citosqueleto. La red citosquelal interacciona no sólo con la membrana plasmática sino también con diferentes organelas, entre las que destacan las vesículas secretoras.

4.1.- El citoesqueleto de F-actina

En las células cromafines la red de F-actina está dispuesta de manera periférica subyacente a la membrana plasmática, dando lugar a lo que de forma común se denomina una red cortical de F-actina o actina filamentosa. La F-actina es la forma polimerizada que está en continuo equilibrio con la G-actina que es el monómero que la forma (ver la figura 4). Por tanto, el dinamismo existente en la red cortical es originado por el continuo ensamblaje y desensamblaje de la G y la F-actina, respectivamente.

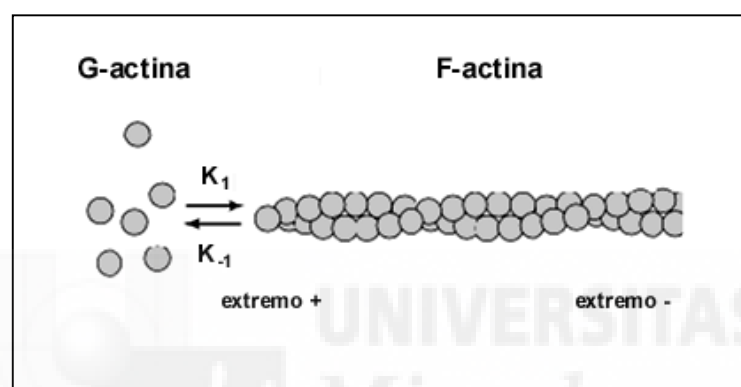


Figura 4. Esquema representativo de los procesos celulares de reorganización entre la actina monomérica (G-actina) y la actina filamentosa (F-actina). La polimerización de la actina es un proceso reversible, en el cual los monómeros se asocian y disocian a partir de los extremos positivos y negativos, respectivamente. La velocidad de disociación K_{-1} es independiente de la concentración de monómero, mientras que la velocidad de asociación K_1 sí es proporcional a la concentración de monómero libre.

Este balance entre la actina globular y la actina filamentosa puede ser modificado de forma fisiológica o bien por diversas sustancias (las latrunculinas, las citocalasinas, etc.) que a lo largo de todos estos años de estudio del citoesqueleto nos han ayudado a conocer más a fondo su estructura y función.

Como se ha mencionado anteriormente, las vesículas se encuentran presentes en estas células en al menos dos compartimentos: a) el compartimento de vesículas listo para exocitar y, b) el compartimento de vesículas de reserva. El tráfico de vesículas entre estos dos compartimentos está sujeto a una regulación muy fina puesto que existen evidencias experimentales que han sugerido que la red de microfilamentos de F-actina

juega un papel importante en esta regulación (Vitale et al., 1995). Y debido a que la mayoría de las vesículas aparecen distanciadas de la membrana plasmática por la presencia de dicha red de actina, se ha relacionado numerosas veces el papel de la F-actina como una barrera que impide el acceso de las vesículas secretoras a los sitios de exocitosis de la membrana plasmática (Aunis et al., 1987; Burgoyne y Cheek, 1987; Aunis y Bader, 1988; Vitale et al., 1991).

Se han realizado estudios de microscopía de fluorescencia con anticuerpos contra actina o con faloidina¹ conjugada con rodamina en las células cromafines, que mostraron que en condiciones basales la red cortical de actina es densa y continua. Sin embargo bajo la estimulación de la secreción de catecolaminas, bien por despolarización de la membrana como por estimulación del receptor nicotínico, se observa una alteración de la continuidad local y transitoria de la red cortical (Cheek y Burgoyne, 1986; Lelkes et al., 1986) dando lugar a la formación de zonas claras de actina (Nakata y Hirokawa, 1992), a través de las cuales las vesículas podrían ser conducidas a la membrana plasmática. Este desensamblaje de la F-actina también tiene lugar en sinaptosomas estimulados por despolarización (Bernstein y Bamburg, 1985). Unos minutos después de que el estímulo secretor haya cesado la red de F-actina recupera su estructura en la región cortical de la célula cromafín. Por tanto la disgregación de la red cortical de F-actina y su reconstitución responde a un fenómeno dinámico y cíclico que se dispara durante la estimulación celular.

Los activadores de la proteína quinasa C (PKC), como los ésteres de forbol, producen un efecto similar al de la estimulación, cuando esto ocurre los filamentos de actina se reorganizan formando parches densos en la zona cortical de la célula (Grant y Aunis, 1990). Este efecto viene acompañado por un incremento en la respuesta secretora estimulada por Ca^{2+} en células permeabilizadas (Bader y et al., 1986) y en células intactas (Vitale et al., 1992; Gillis et al., 1996). A nivel ultraestructural esta activación de la PKC por los ésteres de forbol produce un incremento de la población de vesículas del compartimento listo para secretar (Vitale et al., 1995) y la velocidad inicial de la secreción estimulada de forma continua o mediante pulsos despolarizantes con 59 mM de KCl (Gil et al., 2001a).

¹ La faloidina es una toxina producida por el hongo *Amanita phalloides*. Se une específicamente a los filamentos de actina estabilizándolos de dos maneras: previniendo la disociación de los monómeros y enlenteciendo su asociación.

4.1.1.- Descripción de las proteínas que interaccionan con el citoesqueleto de F-actina

A) Proteínas de vinculación del citoesqueleto con las vesículas

La interacción de las vesículas cromafines con los filamentos de actina se realiza a través de una proteína de anclaje llamada α -actinina (Fowler y Pollard, 1982; Bader y Aunis, 1983) presente en la membrana de los gránulos cromafines (Jockusch et al., 1977). Su función en estas células no es clara pero existen evidencias de que interacciona con rabfilina-3A, una proteína dependiente de GTP (Kato et al., 1996) que es efectora de la GTPasa Rab3A. La sobreexpresión de rabfilina-3A en estas células aumenta la secreción actuando por tanto como un regulador positivo (Chung et al., 1995). Se ha postulado por ello que el complejo Rab3/rabfilina-3A podría estar participando en funciones relacionadas con la organización del citoesqueleto y el tráfico vesicular en las etapas anteriores al atraque.

En neuronas, la interacción vesícula-citoesqueleto o vesícula-vesícula se realiza a través de pequeñas hebras proteicas de unos 30 nm de longitud llamadas sinapsinas. La sinapsina es una fosfoproteína anclada en la membrana de la vesícula sináptica (Huttner et al., 1983), que rompe sus anclajes de forma dependiente de calcio por procesos de fosforilación proteica.

B) Proteínas que regulan el desensamblaje y la dinámica de los filamentos de actina

El proceso por el cual se produce la disgregación parcial de la red cortical de actina está promovido por el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. En las células cromafines se han descrito tres proteínas que poseen propiedades comunes y es que en presencia de un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ son capaces de defragmentar la forma polimerizada de actina, éstas son: la cofilina, la gelsolina y la escinderina. Sin embargo, la escinderina es la proteína que se ha estudiado más en profundidad y de la que hay una mayor evidencia de implicación en la exocitosis (Vitale et al., 1991).

La escinderina se encuentra presente en un gran número de tejidos con actividad secretora: las células cromafines, las células de la glándula pituitaria anterior y posterior, las plaquetas, el cerebro, etc. Existen estudios de inmunocitoquímica que indican que en condiciones basales la escinderina (marcada con anticuerpos específicos) co-localiza con el anillo de la red cortical

de actina (marcada con faloidina conjugada con rodamina). Adicionalmente, cuando la célula es estimulada por despolarización con K^+ o con agonistas del receptor nicotínico se produce una ruptura de la continuidad de los anillos de F-actina y escinderina, lo cual sugiere que se produce una redistribución de la escinderina y una fragmentación de la F-actina (Vitale et al., 1991). Este proceso está regulado positivamente por el Ca^{2+} (Rodríguez del Castillo et al., 1990) y negativamente por el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (Zhang et al., 1996) y la fosfatidilserina. Sin embargo, cabe destacar que la escinderina también posee un sitio de unión de G-actina y presenta una actividad de polimerización de la actina dependiente de Ca^{2+} (Marcu et al., 1998).

C) Proteínas G unidas a la vesícula secretora

La posible implicación de las proteínas G en la regulación de la exocitosis surgió a partir de observaciones realizadas con toxina pertúsica que ribosilaban de forma dependiente de ADP algunas proteínas asociadas a la membrana granular de las células cromafines. La identidad de estas proteínas granulares fue establecida por inmunodetección a partir de anticuerpos específicos.

De entre estas proteínas la familia de las proteínas Rho se ha relacionado con la organización del citosqueleto. Rho procede de una superfamilia de proteínas entre las que están Ras, Rho, Rab y ARF. La familia de las proteínas GTPasas Rho forman un subgrupo que comprende la Rho-A, Rho-B, Rho-C, Rac1 y Rac2, entre otras (Symons, 1996). De todas ellas la proteína Rho-A es la mejor caracterizada.

En la célula cromafín, mientras la vesícula está vinculada al citosqueleto de actina y antes de que se produzca el ataque a la membrana plasmática, el movimiento de la vesícula depende de la participación conjunta de varias de estas proteínas dependientes de GTP: G_o trimérica, Rho-A y ARF6, (ver figura 5) que controlan la actividad de las proteínas diana claves para que se produzca el ataque.

Existen evidencias de que la proteína G_o ejerce un papel de control negativo de la exocitosis, y actúa regulando el desensamblaje parcial de la red cortical de actina a través de una vía efectora que envuelve la participación secuencial de las proteínas Rho-A y fosfatidilinositol 4-quinasa (PtdIns 4-quinasa). La proteína PtdIns 4-quinasa produce PtdIns-4-fosfato y a continuación éste es fosforilado por la proteína citosólica PtdIns 5-quinasa para dar PtdIns-4,5-bisfosfato, que es un conocido regulador del citosqueleto de

actina. En las células cromafines, el PtdIns-4,5-bisfosfato disminuye la actividad de la escinderina. Por tanto, altos niveles de PtdIns-4,5-bisfosfato podrían contribuir a la estabilización de la red cortical de actina y prevenir el atraque de las vesículas secretoras a los sitios activos de exocitosis situados en la membrana plasmática.

Durante la estimulación, y la posterior elevación de la $[Ca^{2+}]_i$, se debería de requerir la inactivación transitoria de G_o /Rho-A para que se produzca la secreción. Sin embargo, la inactivación de Rho-A por la toxina C3 de *Clostridium botulinum* no modifica la secreción estimulada por los agonistas del receptor nicotínico o la elevada concentración de KCl (Gasman et al., 1999).

Otros estudios evidencian que la inactivación transitoria de G_o que sucede durante la estimulación desencadena la participación de otra proteína dependiente de GTP, el ARF6 (que procede de la familia ARF, factor de ribosilación dependiente de ADP) (Galas et al., 1997).

El ARF6 en condiciones basales se encuentra asociada a la membrana de las vesículas a través de su interacción con subunidades $G\beta$. La inactivación de G_o conlleva la reasociación de las subunidades α_o con $G\beta$ que dejan de ser capaces de fijar el ARF6 a la membrana vesicular, por la que se transloca a la membrana plasmática de forma transitoria, evento que sería necesario para que la exocitosis tenga lugar. Desde la membrana plasmática, el ARF6 activa la proteína lipasa D (PLD) asociada a la membrana plasmática (Caumont et al., 1998) que cataliza la hidrólisis de la fosfatidilcolina para dar lugar al ácido fosfatídico (PA) y a la colina soluble. La función del PA, que determina un paso clave en la exocitosis, no se conoce todavía, pero entre otras funciones podría estar variando la composición lipídica de la membrana plasmática, alterando por tanto las propiedades físico-químicas de la bicapa lipídica y favoreciendo la fusión entre las capas que la forman como último estadio en la exocitosis .

Existen evidencias de que el papel de las proteínas G sobre la exocitosis propiamente dicha es llevado a cabo por otro miembro de la familia de las proteínas Rho, el Cdc42. Existen estudios llevados a cabo en células cromafines que emplean la toxina B de *Clostridium difficile*. Esta toxina inactiva la proteína Cdc42 entre otras GTPasas y, en consonancia con estudios realizados en otros modelos secretores, sugieren la participación activa del Cdc42 en la modificación de la red cortical de actina para la exocitosis (Gasman et al., 1999). El mecanismo por el cual actúa esta proteína no se conoce todavía.

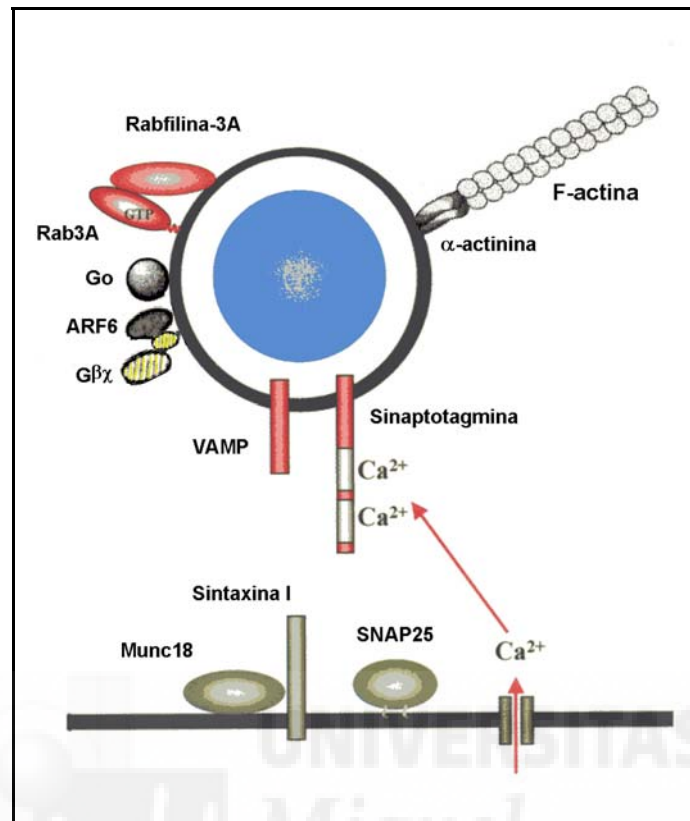


Figura 5. Representación esquemática de las proteínas de la membrana vesicular y de la membrana plasmática involucradas en la exocitosis regulada en las células cromafines.

4.1.2.- Proteínas motoras: descripción de las miosinas no convencionales

La superfamilia de las miosinas está compuesta por 15 clases distintas de moléculas. Una primera clasificación las agrupa en miosinas convencionales y miosinas no convencionales.

La miosina II es la primera miosina convencional identificada en el músculo, aunque también está presente en células no musculares. Su estructura y función se explicarán más detalladamente a continuación.

En los últimos años ha habido un gran progreso en el estudio de las miosinas no convencionales I, V y VI. En este sentido se han hallado evidencias sobre la vinculación de algunas miosinas no convencionales con organelas que previamente se había encontrado que se desplazaban a través del sistema de microtúbulos.

La miosina I se ha encontrado relacionada con el proceso de endocitosis en hepatocitos de ratón (Raposo et al., 1999). No obstante existen isoformas de miosina tipo I que se han localizado en las extensiones celulares ricas en F-actina, como los pseudopodios, coronas macropinocíticas y fagocíticas y sitios de contacto intercelulares (Coluccio et al., 1997) y a este nivel se ha encontrado que podría participar en el mantenimiento de la tensión cortical. En levaduras se ha visto que mutantes dobles de miosina I presentan una disminución notable de la tensión cortical en las extensiones ricas en actina, mientras que en células que sobre-expresan ligeramente una de las isoformas produce un aumento de la tensión cortical; lo cual podría ser debido, al menos en parte, a la alteración de la tensión contráctil generada por la miosina I en la zona cortical (Dia et al., 1999).

La miosina III se ha estudiado hasta el momento en células de la retina de *Drosophila melanogaster*, y es una proteína unida a la calmodulina que participa en la señalización de la fototransducción.

La miosina V es la miosina sobre la cual se han hallado más evidencias en cuanto al transporte de organelas y vesículas. Las primeras evidencias de la implicación de los motores de miosina en células secretoras vinieron de estudios realizados con mutantes de levadura para la Myo2p, una clase de miosina V (Johnson et al., 1991; Govindan et al., 1995). En un principio se estudió en la formación de vesículas por gemación en levaduras y en el transporte de ARNm de largo recorrido (Pruyne et al., 1998; Bertrand et al., 1998). Años después fueron Wu y colaboradores quienes pusieron de manifiesto la participación de la miosina Va en el transporte de los melanosomas (gránulos que contienen los pigmentos melanóforos) en los melanocitos de ratón. Por medio de la microscopía de luz transmitida, estos autores emplearon una miosina Va silvestre y una variedad truncada llamada *dilute* para estudiar este transporte. Esta miosina Va truncada recibe este nombre debido a que los melanosomas no se distribuyen en la periferia celular como ocurre en el animal silvestre, sino que lo hacen en la zona central de la célula. Mediante esta técnica identificaron un movimiento lento y periférico de los gránulos en la célula, independiente de microtúbulos, que resultó estar ausente en los melanocitos con la construcción truncada de miosina Va. Lo cual sugirió que los melanosomas eran transportados en la periferia celular por esta proteína contráctil (Wu et al., 1998). Otro hallazgo importante para la elucidación de la función de la miosina V en el transporte vesicular lo aportó el grupo de Langford en el modelo del axón del calamar gigante. Su estudio se

inició en el año 1992 en el cual realizaron experimentos de movilidad vesicular in vitro describiendo por primera vez el transporte vesicular a través de los filamentos de actina (Kuznetsov et al., 1992). A este trabajo le siguió otro en el que emplearon anticuerpos específicos anti-miosina V con los que inhibieron el movimiento de vesículas del retículo endoplásmico (Tabb et al., 1998).

No obstante se han hallado pruebas que muestran la asociación de miosina V con dos proteínas de la membrana vesicular como son la sinaptobrevina II y sinaptofisina en neuronas de rata (Prekeris y Terrian, 1997). Sin embargo aunque este trabajo no aporta pruebas funcionales que involucren a la miosina V en el transporte vesicular, constituyó una base de gran interés para trabajos que surgieron con posterioridad como el de Rüdinger y colaboradores. Ellos aportaron pruebas de co-localización de la miosina Va con gránulos secretores en las células PC12 pero además realizaron ensayos funcionales. Estudiaron la movilidad vesicular en células PC12 que sobre-expresaban el fragmento C-terminal de la miosina Va truncada MCLT, que actúa como un potente inhibidor de la actividad de miosina Va (Wu et al., 1998), donde encuentran una notable restricción del movimiento de las vesículas hacia la zona subapical de la célula (Rüdinger et al., 2003).

En cuanto a la miosina VI se la ha encontrado asociada a vesículas procedentes de aparato de Golgi (Buss et al., 1998); además de en la placa cuticular asociada a los estereocilios de las células ciliares del oído interno, donde podría tener un papel en el anclaje de la membrana plasmática a la base de cada estereocilio (Self et al., 1999). No obstante, se ha visto presente también en el cinturón pericuticular de estas células, donde podría tener funciones en las etapas endocitóticas, secretoras y/o en el reciclaje de membranas (Hasson et al., 1997). Las mutaciones en esta miosina causa la pérdida hereditaria de audición. Pero la miosina VI no es la única que tiene importancia en la transducción de la señal mecanoeléctrica en el oído interno, también están las miosinas 1 β , miosina VIIa y la miosina XV.

La miosina VIIa tiene un papel de conexión de los estereocilios adyacentes entre sí (Hasson et al., 1997; Metcalf, 1998). Así mismo, mutaciones en esta miosina causa la pérdida hereditaria de audición, y también la pérdida de visión puesto que participa en el transporte de opsina (que es la molécula que da lugar a la rodopsina, el pigmento fotosensible involucrado en la visión) produciendo el síndrome de Usher tipo 1B (Liu et al., 1999).

La miosina XV, la más novedosa entre las miosinas no convencionales, también parece presentar una función importante en la formación y mantenimiento de la estructura estereociliar. Las mutaciones en el gen que la codifica están asociadas con la formación de unos estereocilios anormalmente cortos y una sordera congénita profunda.

Para el estudio de la actividad de la miosina se puede emplear un compuesto orgánico conocido como 2,3-butanodiona monoxima (BDM), que es un inhibidor relativamente selectivo que bloquea la actividad ATPasa de las miosinas tanto convencionales como no convencionales (Herrmann et al., 1992).

4.1.3.- La estructura y la función de la miosina II

La miosina II está formada por dos cadenas pesadas de 200 kDa las cuales dimerizan y se asocian covalentemente con cuatro cadenas ligeras: dos cadenas ligeras esenciales (ELC, *essential light chain*) de 17 kDa y dos cadenas ligeras reguladoras (RLC, *regulatory light chain*) de 20 kDa. Cada cadena pesada posee un dominio globular que contiene los sitios de unión a la actina y al ATP, requeridos para su actividad ATPasa activada por actina (figura 6B). Además posee un dominio intermedio que forma una hélice α responsable de la dimerización de las cadenas pesadas, y un dominio carboxilo terminal no helicoidal de aproximadamente 34 - 44 aminoácidos (figura 6A). Las ELCs y RLCs, que son estructuralmente relacionadas con la proteína calmodulina, se unen al dominio motor de la cadena pesada.

Bajo condiciones fisiológicas la miosina II puede adquirir dos conformaciones relativamente estables. En la forma inactiva de la miosina II las cadenas RLC de cada cadena pesada interacciona con la otra cadena manteniendo a la proteína en una conformación plegada muy estable. En la conformación extendida la miosina II es activa y puede combinarse con otras moléculas de miosina, formar pequeños filamentos bipolares y tener una función contráctil.

El papel de la miosina II como una proteína generadora de fuerza motriz en la contracción muscular se conoce bien (figura 6C). En las células no musculares también se ha hallado una miosina II que se conoce por el nombre de no-muscular. Mucho de lo que se conoce acerca de esta miosina no-

muscular es a través de estudios realizados en la miosina II de la musculatura lisa, con la cual guarda mucha analogía. Esta similitud se basa en que ambas se activan por la fosforilación en los sitios conservados de ambas RLCs, y en que presentan actividades enzimáticas similares en numerosos tejidos estudiados.

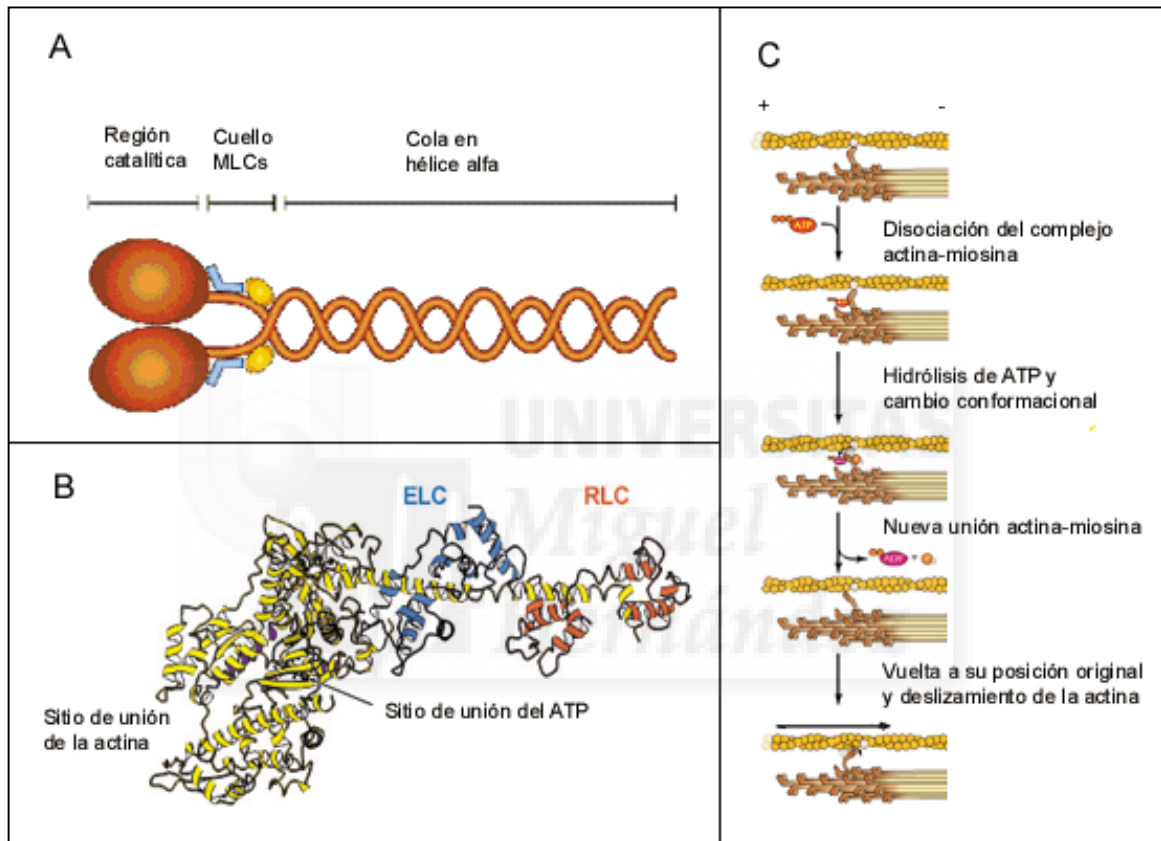


Figura 6. La estructura y el ciclo contráctil de la miosina II. **A.** Esquema simplificado de la miosina II completa. **B.** Estructura 2^{da} y 3^{ra} de la región catalítica y el cuello (incluyendo las cadenas ligeras ELC y RLC). **C.** Ciclo contráctil de asociación-disociación y deslizamiento del complejo formado por actina y los filamentos cruzados de miosina en la musculatura lisa. En primer lugar, se produce la captación de una molécula de ATP por la miosina, lo cual conlleva a la disociación del complejo formado por actina y miosina. En segundo lugar, la hidrólisis de ATP produce un cambio conformacional en la miosina. En esta nueva conformación la miosina presenta una gran afinidad por la actina, por lo que se forma una nueva unión actina-miosina. Finalmente, esta unión hace que la miosina regrese a su conformación original produciendo el deslizamiento de la actina. La energía que activa este deslizamiento es la que se hallaba en miosina gracias a la hidrólisis de la molécula de ATP. Con el deslizamiento se liberan los productos de esta hidrólisis que son ADP y fosfato intracelular.

La secuencia de aminoácidos de la subunidad RLC de la miosina II de la musculatura lisa perteneciente a la especie *Gallus gallus* es la siguiente:

“MSSKRAKAKTTKKRPQRATSNVFAMFDQSQIQEFKEAFNMIDQNRDGF
IDKEDLHDMLASMGKNPTDEYLEGMMSEAPGPINFMTMFLTMFGEKLNQTDPE
DVIRNAFACFDEEASGFIHEDHLRELLTTMGDRFTDEEVDEMYREAPIDKKG
FNHYVEFTRILKHGAKDKDD” (Zavodny et al., 1988).

Los vertebrados expresan al menos dos isoformas de las cadenas pesadas de miosina II no-muscular, que son la miosina IIA y la miosina IIB. La mayor parte de los tejidos expresan las dos isoformas en proporciones muy variables (Katsuragawa et al., 1989) y también depende del organismo. Por ejemplo, las células del epitelio intestinal de pollo y las plaquetas de rata expresan exclusivamente miosina IIA, en cambio en las neuronas la isoforma más abundante es la isoforma IIB (Takahashi et al., 1992). En cuanto a la localización intracelular, se sabe que ambas isoformas co-localizan con las fibras de estrés perinucleares y corticales. En este último caso, se acumulan en los lamelipodios donde su función está asociada fundamentalmente a la migración celular y a la formación de los conos de crecimiento.

En las células cromafines existen algunas evidencias que implican a la miosina II en la secreción. En este modelo neuroendocrino, el papel de la quinasa que la activa (MLCK, *myosin light chain kinase*) es esencial en la secreción. Se han empleado varios agentes como la wortmanina², y unos compuestos derivados de las naftalen sulfonamidas, el ML-7 y el ML-9, que inhiben esta MLCK por competir con el sitio de unión del ATP (Saitoh et al., 1987). Estos compuestos redujeron notablemente la secreción de las catecolaminas en ensayos bioquímicos realizados en poblaciones de células cromafines (Nakanishi et al., 1989; Reig et al., 1993; Ohara-Imaizumi et al., 1992). Pero la selectividad de estos compuestos está puesta en duda. La wortmanina inhibe también la proteína fosfoinositol 3-quinasa, cuya participación en la secreción de las células cromafines ha sido evidenciada

² La wortmanina es un compuesto de origen natural que se obtiene del hongo *Penicillium fumiculosum*.

(Chasserot-Golaz et al., 1998). Por otro lado el ML-9 inhibe los canales de calcio de tipo L con una IC_{50} de 50 μ M (Reig et al., 1993), valor cercano a la concentración de inhibición de la actividad de la MLCK con este inhibidor. No obstante, existe otro compuesto, de origen peptídico llamado péptido P-18³, que posee una afinidad elevada por la MLCK y la bloquea de manera muy selectiva (Lukas et al., 1999).

En algunos sistemas neuronales existen evidencias sobre la función de la miosina II. En células de las raíces dorsales de la médula espinal se ha encontrado que la wortmanina produce la inhibición de la liberación de la sustancia P (neurotransmisor que se almacena en vesículas grandes y densas) pero no del GABA o del glutamato (neurotransmisor que se almacena en pequeñas vesículas y de baja densidad) (Suzuki et al., 1998). Adicionalmente, en cultivos primarios de neuronas colinérgicas de los ganglios cervicales, la liberación de acetilcolina se inhibe completamente con anticuerpos antimiosina II y con la wortmanina (Mochida et al., 1994).

A) La activación de la miosina II mediada por el calcio

Tanto la miosina II de la musculatura lisa como la miosina II no muscular están reguladas principalmente por la fosforilación/defosforilación de sus cadenas ligeras reguladoras (ver las revisiones Sellers, 1991 y Tan et al., 1992). Las subunidades RLC son fosforiladas por varios sitios. Los residuos treonina 18 y serina 19 de la RLC son los sitios responsables para la activación de la actividad motora de la miosina II (Hartshorne, 1987; Adelstein y Sellers, 1987; Kamm y Stull, 1989).

La proteína quinasa que fosforila principalmente la subunidad RLC es la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK).

El primer paso en la transducción de la señal estimuladora a la función contráctil de la miosina II es la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$. El calcio se une a la proteína calmodulina y el complejo formado por Ca^{2+} /calmodulina activa la proteína quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK, *myosin light chain kinase*). Esta quinasa fosforila los residuos treonina 18 y serina 19 activando la actividad Mg^{2+} - ATPasa activada por actina (Sellers et al., 1981; Ikebe y Hartshorne, 1985; Ikebe et al., 1986) y en las células de la musculatura lisa es la que controla mayoritariamente los niveles de miosina II fosforilada. Sin

³ El péptido P-18 inhibe la actividad de la MLCK con una IC_{50} de 50 nM, que es 4000 veces inferior a la encontrada para la inhibición de la CaMK-II (Lukas et al., 1999)

embargo en las células no musculares, aunque la proteína MLCK es importante para la fosforilación de la miosina existen otras proteínas que regulan su fosforilación (Edelman et al., 1990; Amano et al., 1996; Komatsu y Hosoya, 1996).

La fosfatasa MLCP (*myosin light chain phosphatase*) conocida también como SMPP-1M en células de la musculatura lisa y PP1 en ciertos modelos secretores, como los mastocitos (Holst et al., 2002) actúa defosforilando la subunidad RLC en los aminoácidos treonina 18 y serina 19.

La proteína quinasa de tipo II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMK II) tiene un papel en la secreción modulando la actividad de diversas enzimas, como son: la tirosina hidroxilasa (que se encarga de catalizar la síntesis de L-Dopa a partir de tirosina, y se activa por fosforilación), el transportador SERCA (Sumi et al., 1991) y la MLCK, que actúa disminuyendo la sensibilidad por el calcio en células musculares (Tansey et al., 1994).

La subunidad RLC se ha empleado como herramienta molecular para estudiar la miosina II en la mitosis y en la citoquinesis en un trabajo realizado por Komatsu y colaboradores (2000) en las líneas celulares no musculares COS-7 y NRK. En este trabajo obtuvieron una miosina II no activa a partir de una subunidad RLC de la musculatura lisa no fosforilable, la T18A/S19A RLC-GFP. Para obtener esta quimera los autores sustituyeron los residuos de treonina 18 y serina 19 de la RLC silvestre de la miosina II de la musculatura lisa por dos residuos de alanina, y a la región del terminal amino de la construcción le añadieron la GFP.

B) La activación de la miosina II independiente del calcio

No obstante existen mecanismos que regulan la actividad de la miosina II de la musculatura lisa y de la miosina II no muscular que no dependen de la señal de calcio (Somlyo y Somlyo, 1994). Las proteínas G unidas a la membrana vesicular, entre ellas la proteína Rho-A y su diana la proteína Rho-quinasa (ROCK, es una serina/treonina quinasa), están implicadas en funciones fisiológicas asociadas a los filamentos formados por el complejo actina-miosina como el cambio en la morfología celular, la motilidad celular, la secreción o la contracción muscular.

Parte de esta activación no mediada por el Ca^{2+} reside en la fosfatasa MLCP. La MLCP es una proteína heterotrimérica, y está presente tanto en

células de la musculatura lisa como en células no musculares. Posee tres subunidades: una con la propiedad de unirse a la miosina (llamada MBS), una subunidad catalítica (llamada PP1c δ) y una subunidad reguladora cuya función se desconoce. La subunidad MBS es crítica para que la subunidad catalítica pueda funcionar. La actividad MBS está regulada por fosforilación por varias proteínas quinasas, entre ellas la proteína quinasa de tipo A (PKA) y la proteína ROCK (Ichikawa et al. 1996b; Ito et al. 1997; Totsukawa et al. 1999). La fosforilación de la MBS por estas quinasas produce una disminución de la actividad fosfatasa de la MLCP y por tanto aumenta el nivel de fosforilación de la miosina II (Noda et al., 1995).

No obstante, existen evidencias muy recientes de que la quinasa ROCK también actúa fosforilando la subunidad RLC de la miosina II en células 3T3 de fibroblasto (Totsukawa et al., 2000) y en las células de la musculatura lisa (Amano et al., 1996). En cuanto a las células secretoras existen evidencias contradictorias. En plaquetas se ha descrito que la vía Rho-A/ROCK participa en la liberación de serotonina (Morii et al., 1992), mientras que en las células cromafines esta vía no participa en la secreción estimulada de las catecolaminas (Gasman et al., 1999)

Pero la subunidad RLC también puede ser fosforilada en otros residuos aminoacídicos. La proteína quinasa C (PKC) fosforila los aminoácidos serina 1, serina 2 y treonina 9 de la RLC disminuyendo la actividad Mg²⁺-ATPasa activada por la MLCK (Ikebe et al., 1986; Nishikawa et al., 1984; Bengur et al., 1987). Además, la fosforilación de la RLC por la PKC también disminuye la velocidad con que la RLC es fosforilada por la MLCK (Nishikawa et al., 1984), por lo que se ha sugerido que estas fosforilaciones catalizadas por la PKC son para contrarrestar la activación producida por la MLCK. No obstante, en plaquetas se ha visto que el fragmento catáptico de la PKC, llamado PKM es capaz de fosforilar la subunidad RLC por los sitios fosforilables por la PKC y la MLCK (Naka et al., 1988) con una estequiometría mayor que la encontrada para estas enzimas (Nakabayashi et al., 1991).

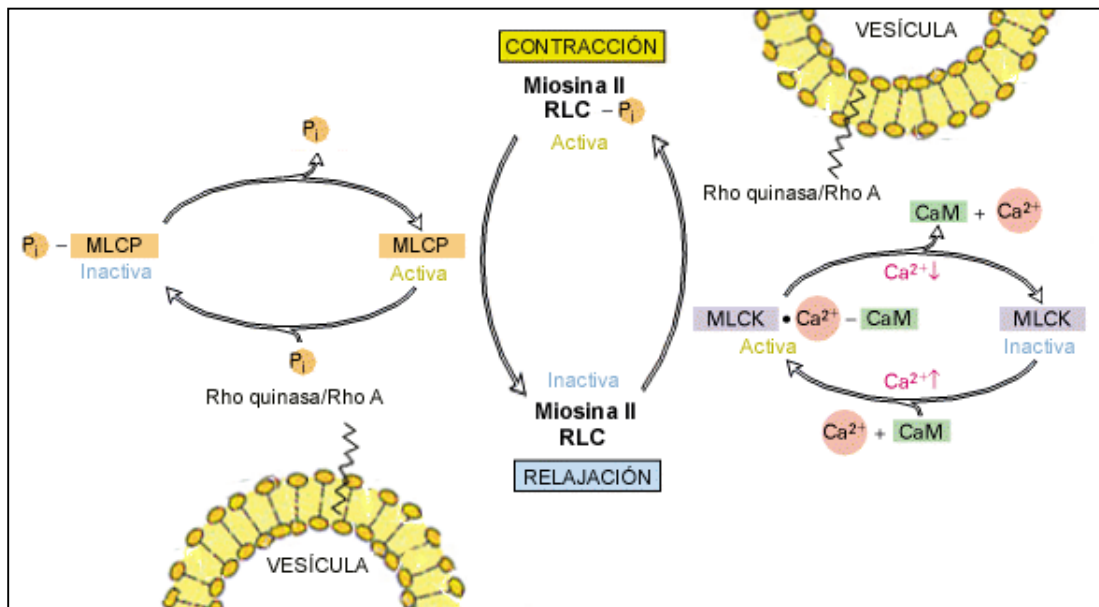


Figura 7. Modelo de la vía de activación de la miosina II a través de la cascada de procesos dependientes e independientes de calcio. El proceso dependiente del calcio implica que con el aumento de la concentración de este ión se forme el complejo Ca^{2+} /calmodulina (indicado como Ca^{2+} -CaM) que activa la MLCK. Esta quinasa, a su vez activa la miosina II fosforilando su cadena ligera regulatoria (RLC). El proceso independiente del calcio afecta a la defosforilación de la RLC. La proteína Rho-quinasa (activada a través de la GTPasa Rho-A de la membrana vesicular), favorece la activación de la miosina II y la contracción por dos vías: inactivando por fosforilación la fosfatasa MLCP, y fosforilando la RLC.

Las evidencias encontradas en relación con la subunidad RLC de la miosina II hacen que sea la proteína candidata para regular la función de la miosina II en los sistemas no musculares. Por esta razón, nos propusimos estudiar más a fondo su implicación en una hipotética participación en la secreción y en el transporte vesicular en la zona cortical de la célula cromafín, abundante en actina filamentosa.

4.2.- El sistema de microtúbulos y sus motores moleculares

El sistema de los microtúbulos en la mayoría de las células es responsable del transporte intracelular de vesículas y organelas, la separación de los cromosomas en la mitosis y el movimiento de batido de los cilios y los flagelos.

Un microtúbulo es un polímero lineal resultado del ensamblaje polar de heterodímeros formados por las subunidades α y β -tubulina (ver la figura 8). Su morfología es tubular debido al ensamblaje de 13 heterodímeros que forman una pared cilíndrica, y es polar debido a la asociación “cabeza-cola” de los heterodímeros. De esta manera, se ha descrito que el extremo donde se ensamblan las subunidades de tubulina es el positivo y el extremo opuesto es el negativo.

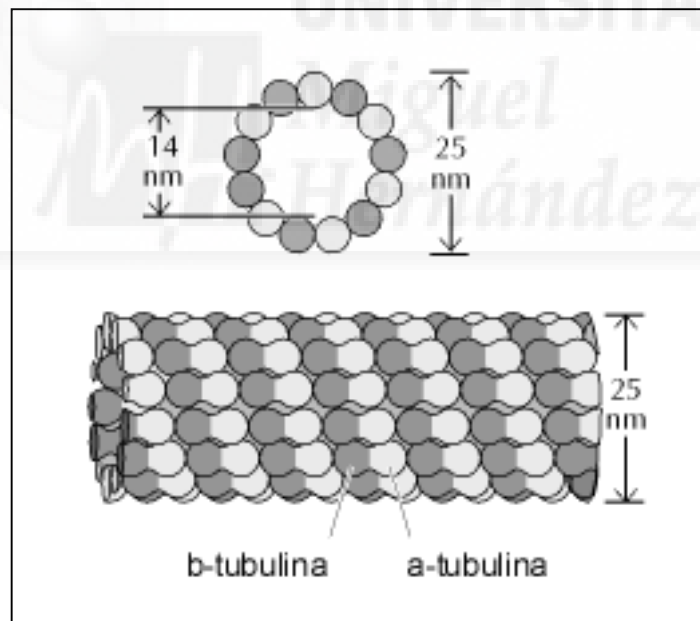


Figura 8. Estructura de los filamentos que forman el sistema de microtúbulos.

Existen una serie de sustancias, la mayoría procedentes de plantas, capaces de interaccionar con los microtúbulos y actuar como estabilizantes o favorecer su despolimerización. Un ejemplo de agente estabilizante es el taxol, también conocido como paclitaxel, que procede del árbol *Taxus baccata*. Entre los agentes despolimerizantes encontramos la vinblastina, la vincamina y la vincristina, alcaloides que se extraen de plantas del género *Vinca* (Jordan et al., 1991, Jordan et al., 1998), y la colchicina, que se obtiene de la corteza del *Colchicum autumnale*.

Los microtúbulos sirven de raíles para el transporte de organelas y se encuentran organizados de una forma particular en el caso de células polarizadas como las células neuronales y las células epiteliales. En el resto de células los microtúbulos se organizan de forma radial desde el centro de la célula con los extremos positivos orientados hacia la periferia.

Las proteínas motoras vinculadas a este sistema citosquelético son la kinesina (Brady et al., 1985; Vale et al., 1985; Kuznetsov y Gelfand, 1986) y la dineína citoplasmática (Lye et al., 1987; Paschal et al., 1987). Ambas son ATPasas que transforman la energía del ATP para generar una fuerza motriz a lo largo de los microtúbulos. Pero existen diferencias entre estas dos proteínas motoras y es que mientras que la kinesina genera su fuerza motriz hacia el extremo positivo, la dineína citoplasmática lo hace hacia el extremo negativo.

Las kinesinas constituyen una gran familia de proteínas motoras bioquímica y funcionalmente muy heterogénea. Algunas de estas kinesinas se encuentran presentes en múltiples tejidos participando en el ensamblaje del huso mitótico (Roof et al., 1992). En cambio otras kinesinas se han localizado mayoritariamente en ciertos tejidos donde podrían desempeñar otras acciones más específicas. En este sentido algunas familias de kinesinas se han descrito en el tejido nervioso (Brady et al., 1985; Vale et al., 1985a), en células pigmentarias (Rodionov et al., 1991), pero también en sistemas secretores como las células embrionarias de erizo de mar (Bi et al., 1997), las células β -pancreáticas (Meng et al., 1997) y las células cromafines (Murofushi et al., 1988).

4.2.1.- Implicación del sistema de microtúbulos en el transporte vesicular y en la secreción

En los últimos años han surgido gran variedad de estudios que implican al sistema de microtúbulos y a su motor molecular kinesina como los responsables del transporte axonal rápido de organelas entre las cuales se encuentran precursores y vesículas sinápticas (Brady et al., 1982; Vale et al., 1985).

Las células cromafines poseen un sistema de microtúbulos bien desarrollado (Kotani et al., 1986), y se ha descrito que los gránulos cromafines aislados pueden moverse a lo largo de estos microtúbulos en presencia de kinesina exógena (Urrutia et al., 1991).

En las células β -pancreáticas la participación de los microtúbulos sobre el transporte y el reclutamiento de poblaciones de vesículas que contienen insulina se ha estudiado más en profundidad (Montague et al., 1975). De tal forma, existen evidencias de que las kinesinas podrían estar interviniendo directamente en este transporte. Por ejemplo, la supresión de la kinesina convencional KIF5b con oligonucleótidos antisentido redujo la liberación de insulina estimulada por glucosa en las células β -pancreáticas cultivadas (Meng et al., 1997). En este mismo sentido se ha investigado recientemente el efecto de una kinesina convencional en células β -pancreáticas clonales (Varadi et al., 2002). Estos autores emplearon una construcción mutada nula de una kinesina convencional y encontraron afectadas tanto la movilidad intracelular de los gránulos de insulina como la secreción.

4.2.2.- Los microtúbulos y el citosqueleto de actina cooperan en el transporte de organelas

Durante muchos años se ha asumido que el sistema de microtúbulos y el citosqueleto de actina transportaban grupos distintos de vesículas y organelas. En cambio, surgieron ciertas evidencias que hicieron que esta idea empezara a ser reemplazada por otra que contemplaba la posibilidad de que las mismas organelas pudieran desplazarse a lo largo de ambos sistemas citosqueletales, como si de una colaboración se tratara.

Un ejemplo representativo de este tipo de colaboración es el estudio del transporte de los melanosomas en células pigmentarias dérmicas. Los melanóforos, que son células presentes en la piel de ranas y peces, poseen pigmentos almacenados en unos gránulos llamados melanosomas que se movilizan en el interior de la célula (agregación o dispersión) en respuesta a un estímulo hormonal. El transporte que guía su movimiento es producido por la dineína y la kinesina II (una kinesina convencional) específicamente, y que ocurre de forma bidireccional a lo largo del citosqueleto de microtúbulos de estas células (Nilsson et al., 1997; Tuma et al., 1998). Poco tiempo después se encontró que estos melanosomas también eran transportados a lo largo de los filamentos de actina por la miosina V (Rodionov et al., 1998; Rogers y Gelfand, 1998). Pero este hecho no ocurre únicamente en los vertebrados inferiores. En un trabajo realizado por Wu y colaboradores (1998) en melanocitos de ratón se describió que los melanosomas se desplazaban de forma bidireccional a través de microtúbulos, y que en ausencia de la actividad de miosina V los melanosomas eran incapaces de dispersarse o alcanzar la periferia celular. Recientemente, en un estudio complementario Rogers y Gelfand (1998) encontraron que los melanosomas podían moverse direccionalmente sobre microtúbulos y filamentos de actina, en ensayos realizados in vitro.

Otro trabajo interesante es el realizado por Bi y colaboradores (1997) en células embrionarias de erizo de mar. Estos investigadores evidenciaron, mediante el empleo del BDM (un inhibidor de la actividad de miosina) y de anticuerpos contra la kinesina, que el transporte granular estaba sostenido por dos etapas temporales secuenciales. Una primera etapa gobernada por el sistema de microtúbulos y una segunda etapa, más cercana al proceso de la exocitosis, guiada por filamentos de actina.

Tras estos trabajos, se propuso que de forma general el sistema de microtúbulos podía estar involucrado en un transporte de recorrido largo,

mientras que los filamentos de actina participarían en un transporte de recorrido corto.

Pero, ¿cómo es posible llevar a cabo el relevo en el transporte granular desde un sistema de filamentos a otro independiente y de distinta naturaleza?

Para responder a esta pregunta Huang y colaboradores (1999) demostraron, por las técnicas del doble híbrido en levadura y la inmunoprecipitación, que la miosina V y la kinesina convencional interactúan directamente. Lo cual sugiere la posibilidad de que los motores moleculares del sistema de microtúbulos y de la actina formen complejos motores multifuncionales para el transporte de organelas a lo largo de ambos sistemas citosqueléticos.





OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Tratar de demostrar la influencia del citosqueleto celular en los mecanismos de transporte vesicular y en la secreción de catecolaminas en el modelo neuroendocrino de la célula cromafín bovina. Para ello emplearemos diferentes agentes inhibidores de la dinámica de los sistemas citosquelatales de actina y de microtúbulos, así como herramientas basadas en técnicas de biología molecular. Este objetivo general se desarrollará cubriendo una serie de objetivos más específicos:

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el efecto de los inhibidores de miosina en la secreción de células individuales permeabilizadas y en la movilidad vesicular de células cromafines bovinas.
2. Identificar los subtipos de miosina responsables del transporte vesicular asociado a la secreción en este modelo.
3. Comparar el efecto de los inhibidores de la dinámica de microtúbulos con los inhibidores de los filamentos de actina en la movilidad vesicular y en la secreción de células individuales intactas.

4. Proponer un modelo de participación de ambos tipos de sistemas citosqueletales en el transporte vesicular en este modelo neuroendocrino.

5. Una vez identificado el subtipo de miosina responsable de la secreción, emplear la sobre-expresión de una isoforma no activa para estudiar su participación en el transporte vesicular y en la secreción en las células cromafines bovinas.





RESULTADOS

RESULTADOS

1. EL PAPEL DE LA MIOSINA EN EL TRANSPORTE VESICULAR DURANTE LA SECRECIÓN DE LA CÉLULA CROMAFÍN BOVINA

Anexo I

[The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion. Patricia Ñeco, Anabel Gil, María Del Mar Francés, Salvador Viniegra, Luis M. Gutiérrez. *Biochem. J.* (2002) 368, 405-413.]

En un trabajo publicado recientemente por nuestro laboratorio se mostró que agentes activadores de la secreción como el PMA (un éster de forbol), la caliculina-A (un inhibidor de fosfatasas) y la latrunculina-A (agente desensamblante de la actina filamentosa) alteraban el citoesqueleto de F-actina (Gil et al., 2000). Sugiriéndose así que podría ser éste su mecanismo de acción, nos planteamos la hipótesis de que el citoesqueleto podría modular el tamaño de las poblaciones vesiculares del ciclo secretor y por lo tanto la cinética de la exocitosis.

Tras este trabajo nuestro interés por el estudio del citoesqueleto creció, y nos propusimos estudiar más en detalle las bases del funcionamiento de los filamentos de actina-miosina en relación con la secreción en nuestro modelo neuroendocrino.

El primer objetivo que nos propusimos fue el de estudiar el motor molecular vinculado a los filamentos de actina, que es la miosina, mediante dos técnicas de alta resolución como son la amperometría y la microscopía confocal dinámica de fluorescencia. Para ello empleamos 3 μM de wortmanina, 20 mM de BDM y 1 μM de péptido P-18, agentes que inhiben la actividad de miosina por diferentes mecanismos de acción, en células permeabilizadas previamente con 1 μM de digitonina (un detergente que origina poros en la

membrana). En células estimuladas por superfusión continua con una solución que contenía $[Ca^{2+}]$ libre 0,1 mM, estos reactivos redujeron el número de fusiones exocitóticas a partir de los 5 - 10 s como se observa en los ejemplos amperométricos (Fig. 1A). El comportamiento secretor promedio proporcionado por las integrales acumuladas de experimentos realizados en numerosas células (entre 15 y 65) nos informa acerca de la afectación de los componentes cinéticos en cada condición experimental (Fig. 1B). Claramente se observa que estos inhibidores afectaron la secreción en un 55 -70 % con respecto a la respuesta máxima.

Estas observaciones se reafirmaron al estudiar la capacidad de reclutamiento vesicular por aplicación de una estimulación con pulsos múltiples. Esto ocurre así puesto que con el primer pulso se merman las poblaciones listas para secretar (es lo que se conoce como el componente inicial) y durante los siguientes se van reclutando las vesículas de liberación intermedia y tardía (que son reservorios intracelulares). El grado de inhibición fue más acusado a partir del 3^{er} pulso (Fig. 2) afectando a ambos componentes, el intermedio y el tardío.

A continuación se estudió el comportamiento *in vivo* de los gránulos cromafines en presencia de estos agentes. En el momento del ensayo marcamos los gránulos incubando las células con 4 μ M de quinacrina durante 10 min (condiciones suficientes para que los gránulos se visualicen por emisión de fluorescencia en el espectro del verde), y examinamos el marcaje por microscopía confocal dinámica de fluorescencia en condiciones de no estimulación. Las imágenes confocales de 500 nm de grosor fueron tomadas de secciones citoplásmicas centrales de las células, a una velocidad de 1 imagen/s. Algunos ejemplos de estas series temporales se pueden visualizar para células controles, células tratadas con 3 μ M de wortmanina y 20 mM de BDM en los videos de la Diapositiva 1, Apéndice. En las figuras 3A y C se muestran 6 imágenes, tomadas cada 10 s, que ejemplarizan la movilidad de los gránulos en las células controles y en las tratadas con un inhibidor de miosina. En el caso control, los gránulos se mueven a una velocidad alta, y esto se traduce en que existe una gran probabilidad de que nuevos gránulos visiten el plano confocal. Este hecho es todavía más notable cuando lo comparamos con células tratadas con wortmanina, donde los gránulos permanecen prácticamente inmóviles y esta probabilidad queda muy reducida. Una manera sencilla de cuantificar estas observaciones es midiendo la intensidad de la fluorescencia en una zona de estudio (señalada con un rectángulo). La

intensidad de la fluorescencia del rectángulo se determinó durante el minuto de registro (Fig. 3E). Para el caso control (línea continua) aparecen oscilaciones con una frecuencia de 0,13 Hz y una amplitud media de 200 unidades arbitrarias, que se correspondería con la frecuencia de “visita” de la zona de estudio por parte de uno o más gránulos. Esta variación de la fluorescencia es altamente superior a la observada tras el tratamiento con wortmanina (línea discontinua) correspondiéndose con una escasa oscilación de apenas 40 unidades de amplitud. Los resultados obtenidos son extensibles a otros inhibidores de miosina como el BDM, ya que realizamos ensayos obteniendo resultados similares. Dicho esto cabe resaltar que sorprendentemente entre las células controles y las estimuladas con 59 mM de KCl no observamos diferencias en cuanto a la movilidad vesicular, en concordancia con los resultados expuestos por otros autores (Oheim y Stühmer, 2000).

Las observaciones anteriores también quedan patentes en gránulos de la periferia cortical, como se muestra en los ejemplos de la figura 4. Estas imágenes se han adquirido en el plano confocal cortical superior para células controles (Fig. 4A y B) y células tratadas con wortmanina (Fig. 4C y D) y BDM (Fig. 4E y F). Las figuras 4A, C y E muestran los gránulos al inicio de la serie temporal, mientras que las figuras 4B, D y F muestran el promedio de las imágenes que componen la serie. Como se puede observar, el número de gránulos “visitantes” es notablemente menor tras el tratamiento de wortmanina y de BDM. Estos resultados reafirman la idea de que los inhibidores de miosina no sólo inhiben la secreción sino que disminuyen la movilidad de los gránulos citosólicos y corticales.

Los resultados presentados nos muestran que la miosina está involucrada en el ciclo secretor de la célula cromafín como se discutirá más adelante. Sin embargo, llegado a este punto nos preguntamos de qué subtipo o subtipos de miosina estamos hablando. Las imágenes de microscopía confocal que obtuvimos tras marcar con anticuerpos específicos contra la miosina II y contra la miosina V nos muestran que ambos subtipos de miosina están presentes (Fig. 5). Además estas miosinas presentan una distribución particular. La miosina II (en verde) se localiza preferentemente en la periferia (plano confocal central de la célula, Fig. 5A), posiblemente asociada a la F-actina⁴ cortical, (plano confocal cortical superior, Fig. 5B), mientras que la miosina V (en verde) abunda en el interior citosólico (Fig.5C). No obstante, secciones confocales de

⁴ La actina filamentosa la hemos marcado con faloidina conjugada con rodamina, que emite fluorescencia en el espectro del color rojo.

la periferia celular muestran que la miosina V también puede encontrarse asociada a la F-actina cortical (Fig. 5D).

Para conocer cuál de estos dos subtipos participa más activamente en la secreción realizamos ensayos de cuantificación de noradrenalina tritiada en poblaciones celulares en presencia de los anticuerpos específicos. La respuesta secretora neta se ha calculado de la siguiente manera:

$$(NA \text{ estimulada} - NA \text{ basal}) \times 100 / NA \text{ basal}$$

El anticuerpo contra miosina II redujo la respuesta secretora neta en un 64 % con respecto al control (Fig. 6). Este efecto fue similar al producido por la incubación del BDM. El anticuerpo contra miosina V también obtuvo una respuesta inhibitoria con respecto al control, pero este resultado no es estadísticamente significativo. Estos resultados indican por tanto que la miosina II tiene un papel preferencial en la regulación de la secreción posiblemente en las proximidades de la membrana plasmática, donde es especialmente abundante.

Con estos resultados concluimos, que la miosina, el motor molecular de los filamentos de actina-miosina, es una proteína cuya función es fundamental en el transporte y reclutamiento de vesículas para la secreción regulada, y que su subtipo II aparece como especialmente involucrado en dichos procesos.

2. PARTICIPACIÓN DIFERENCIAL DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE VESICULAR BASADOS EN LA ACTINA Y LA TUBULINA DURANTE LA SECRECIÓN EN LAS CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS

Anexo II

[Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells. Patricia Ñeco, Daniel Giner, María Del Mar Francés, Salvador Viniegra, Luis M. Gutiérrez. Eur. J. Neurosc. (2003) 18(4):733-42.]

Una vez caracterizado el papel de la miosina, componente del sistema citosquelético de actina, en la secreción de las células cromafines bovinas, nos propusimos estudiar comparativamente dicho sistema con el constituido por los microtúbulos.

En primer lugar empleamos la técnica de amperometría para determinar la secreción de catecolaminas en presencia de varios inhibidores de la dinámica de los filamentos de actina-miosina y de los microtúbulos en células intactas estimuladas por despolarización con 59 mM de KCl.

Los inhibidores de la F-actina y la miosina, faloidina y BDM afectaron la secreción de manera similar a como ocurrió en el modelo de célula permeabilizada (Fig. 1, Anexo I). En cambio los inhibidores de microtúbulos, vinblastina y taxol, produjeron una disminución de la secreción más leve, entre un 25 – 30 % como muestran las integrales de la corriente amperométrica de numerosas células (entre 15 – 65) (Fig. 1B). Pero los efectos fueron más relevantes en cuanto a la alteración de la cinética de secreción. En este sentido 1 μ M de faloidina y 20 mM de BDM disminuyeron las fusiones a partir de los 5 s tras el estímulo secretor, alterando la liberación de vesículas del componente inicial; en cambio 10 μ M de vinblastina y 1 μ M de taxol, lo hicieron a partir de 20 – 25 s (Fig. 1A y B), afectando solamente al componente secretor tardío, y dejando íntegra la secreción de las poblaciones vesiculares de liberación rápida e intermedia.

Estos efectos son reafirmados al estimular las células mediante pulsos múltiples despolarizantes con el fin de estudiar mejor estas diferencias. El tratamiento con 10 μ M de vinblastina en combinación con 20 mM de BDM

afectó al tren de estímulos en un 25 % en el 2º pulso, que fue incrementando en los posteriores. En cambio, el efecto de 10 μM de vinblastina apareció a partir del 5º pulso, donde el nivel de secreción alcanzó al obtenido con la combinación de los dos agentes. Claramente, este experimento demuestra que el BDM afecta a las vesículas de liberación intermedia y rápida, a diferencia de la vinblastina que impide la liberación de las vesículas procedentes de los reservorios intracelulares de reclutamiento tardío.

Para determinar las posibles causas de este patrón diferencial de respuesta secretora, investigamos la movilidad vesicular en diferentes regiones de la célula por medio de la microscopía confocal dinámica de fluorescencia. Para visualizar los gránulos utilizamos 4 μM de quinacrina (verde) durante 10 min. Se tomaron series temporales de 60 imágenes adquiridas a 1 Hz, para células controles y células tratadas con 1 μM de faloidina (de las cuales se presentan sendos ejemplos en la Diapositiva 2, Apéndice). Las células tratadas con faloidina presentaron una movilidad vesicular muy baja, en comparación con los controles, sobre todo en relación con los gránulos mejor observados, que son los más brillantes y los que presentan menor oscilación puesto que están inmersos en el plano confocal estudiado. Esta movilidad la hemos cuantificado de dos maneras. En primer lugar, por medición de la intensidad de la fluorescencia en una zona de estudio (Fig. 3E) de las células representadas en las figuras 3B y D, que como se puede observar es muy oscilante para el control y poco para la faloidina. En segundo lugar, midiendo el desplazamiento en el plano x-y de numerosas vesículas (86 – 135, en varias células) durante un periodo de 20 s. De aquí obtuvimos que los gránulos controles presentaban un desplazamiento medio de $3,75 \pm 0,50 \mu\text{m}/20 \text{ s}$ mientras que en faloidina sólo $1,18 \pm 0,10 \mu\text{m}/20 \text{ s}$, o sea 1/3 parte de la movilidad vesicular observada en los controles (Fig. 3F). También se han realizado para las células tratadas con 20 mM de BDM y obtuvimos $1,35 \pm 0,20 \mu\text{m}/20 \text{ s}$ para 108 gránulos.

Una vez establecida la movilidad vesicular dependiente de la dinámica de la miosina-actina, nos centramos en los microtúbulos. Para ello empleamos taxol conjugado con un fluoróforo que emite en el espectro de la rodamina. En los videos de la Diapositiva 3, Apéndice se muestran ejemplos de células tratadas con 1 μM de taxol y 10 μM de vinblastina. La mayoría de las células presentaron un marcaje denso cerca del núcleo y casi ausente en la periferia (Fig. 4). Este hecho explica por qué al medir la intensidad de fluorescencia y el desplazamiento vesicular de las células tratadas con taxol (Fig. 4B y C) obtuvimos diferentes resultados según se tratara de la zona densa interna

(región 1) o de la periférica (región 2). En la zona del marcaje denso con taxol (el valor del desplazamiento x-y fue $1,6 \pm 0,2 \mu\text{m}/20 \text{ s}$, para 67 gránulos) encontramos una restricción del movimiento semejante al obtenido con la faloidina y el BDM, mientras que en la zona periférica ($3,9 \pm 0,2 \mu\text{m}/20 \text{ s}$, para 97 gránulos) el comportamiento de los gránulos fue semejante al hallado en los controles.

A continuación, estudiamos por separado estas dos zonas que interpretamos que son claves para el entendimiento de la función diferencial de los microtúbulos y el citosqueleto de actina. En primer lugar, examinamos el interior citosólico en presencia de faloidina (Fig. 5A) y de taxol (Fig. 5B) conjugados con sondas fluorescentes (en rojo), para señalar los filamentos de actina y microtúbulos, respectivamente. Encontramos unas estructuras filamentosas, formando redes poligonales, revestidas de numerosos gránulos inmobilizados (en verde) como se muestra en la figura 5 (las series temporales se presentan en los videos de la Dipositiva 4, Apéndice). En segundo lugar, investigamos la zona cortical tomando series temporales de secciones confocales de la periferia superior celular con los mismos agentes no marcados (Fig. 6 y Diapositiva 5, Apéndice). En la mayoría de los casos existían algunos gránulos inmóviles, que probablemente sean gránulos atracados a la membrana plasmática. Analizamos las imágenes estimando las vesículas “visitantes” de la sección de estudio, que fue del 40 % para los controles y del 42 % para el taxol. El tratamiento con faloidina produjo una restricción de la movilidad vesicular (8 % de gránulos “visitantes”).

Este comportamiento tan particular de la faloidina sobre la movilidad de los gránulos corticales tiene una causa estructural. En la figura 7 se muestran imágenes confocales tomadas desde la zona más periférica hasta el interior, con un intervalo de 200 nm entre secciones. En rojo vemos marcada la red citosquelal con $1 \mu\text{M}$ de faloidina conjugada con rodamina. Como se puede observar la red posee una arquitectura muy compleja, de nuevo se observan estructuras cerradas, en este caso anulares que dan a entender ser tubos orientados hacia la membrana plasmática. En íntima asociación a estas estructuras tubulares se observan numerosos gránulos (en verde), que aparecen inmobilizados. Este ensayo lo hemos repetido para el taxol conjugado con Bodipy 564/570, pero en este caso observamos una arquitectura cortical muy diferente. En las secciones más periféricas observamos un marcaje más bien punteado y poco denso donde las vesículas ocupan los espacios vacíos (Fig. 8A). En cambio, en las zonas del interior (Fig. 8C y D) forman estructuras

poligonales mayores y más densas, sobre las cuales aparecen unidos algunos gránulos.

En conjunto estos estudios indican que en el interior del citosol de las células cromafines, los sistemas de transporte basados en F-actina y microtúbulos cooperan favoreciendo el desplazamiento vesicular. En cambio, en la periferia celular el citosqueleto denso de F-actina domina el transporte vesicular más íntimamente asociado a la liberación de los componentes rápidos por exocitosis.



3. LA MIOSINA II DURANTE EL TRANSPORTE VESICULAR Y LA FUSIÓN EN CÉLULAS CROMAFINES

Anexo III

[New roles of myosin II during the vesicle transport and fusion in chromaffin cells. Patricia Ñeco, Daniel Giner, Salvador Viniegra, Ricardo Borges, Alvaro Villarroel and Luis M. Gutiérrez. Enviado a publicación.]

De los resultados anteriores concluimos que el sistema de microtúbulos participaba en el transporte de las vesículas en el citosol, mientras que los filamentos de actina-miosina se encargaban del transporte en el citosol y en la zona cortical, cuya función es esencial para la secreción regulada. También hemos resuelto que entre los dos subtipos de miosina, hasta ahora descritos en las células cromafines, la miosina II tiene un papel preferencial en la secreción con respecto a la miosina V. Igualmente, la distribución preferencial de la miosina II en la periferia celular hace de ésta la proteína candidata para definir los efectos encontrados con los inhibidores de la actividad de miosina en la secreción de las vesículas procedentes de etapas cercanas a la fusión.

Por todo ello nos propusimos estudiar más a fondo la implicación de la miosina II en el ciclo secretor. En primer lugar preparamos construcciones fluorescentes basadas en la subunidad reguladora de la miosina II (RLC) unidas en su terminal amino a una proteína emisora de fluorescencia verde (GFP). De esta manera obtuvimos una construcción RLC-GFP silvestre, y otra basada en una RLC con una doble mutación que afectó a los residuos de treonina 18 y serina 19. Estos residuos fueron sustituidos por dos residuos de alanina, dando lugar a una RLC no fosforilable (T18A-S19A RLC-GFP, Komatsu et al., 2000). Las construcciones fueron expresadas en las células cromafines por medio de un sistema de infección viral, a través del cual obtuvimos un porcentaje bastante aceptable de expresión (10 – 15 % de las células cultivadas). El estudio del marcaje celular por microscopía confocal mostró que ambas construcciones presentaban un patrón de distribución similar, el cual era muy abundante en el núcleo y en la periferia celular, y en cuanto al citoplasma presentaba una morfología filamentosa (Fig. 1A y B). Este marcaje co-localizó perfectamente con el marcaje procedente de la miosina II no muscular cuando se trataron las células previamente fijadas y

permeabilizadas con anticuerpos específicos (Fig. 1C - E). En cuanto a la intensidad de la expresión de ambas construcciones, en las células infectadas obtuvimos valores muy similares al medir la intensidad de fluorescencia en el citosol celular (103 ± 12 u.a. en 5 células que expresaban RLC-GFP silvestre, y 101 ± 10 u.a. en 7 células que expresaban T18A/S19A RLC-GFP).

Ante la pregunta de si la sobre-expresión de estas proteínas quimeras afectarán o no al transporte vesicular y a la secreción, realizamos diferentes experimentos empleando las técnicas conocidas en nuestro laboratorio y ya comentadas en los trabajos anteriores.

Por microscopía confocal dinámica tomamos series temporales del movimiento vesicular (gránulos marcados con quinacrina) a 1 Hz durante 1 min. La expresión de T18A/S19A RLC-GFP produjo restricción de la movilidad vesicular mientras que con las vesículas procedentes de las células que expresaban la RLC-GFP silvestre tenían un movimiento semejante a los controles no infectados (videos de la Diapositiva 6, Apéndice). Las figuras 2A y C muestran imágenes tomadas con intervalos de 10 s, y en las figuras 2B y D aparece el promedio de las 60 imágenes de la serie temporal, para la construcción silvestre y la no fosforilable, respectivamente. La fluctuación de la fluorescencia en una zona de medición establecida fue muy elevada para la construcción silvestre (similar a la obtenida en controles no infectados en el Anexo I, Fig. 3A y E) y mucho menor para la construcción no fosforilable. La cuantificación de este movimiento la obtuvimos mediante el cálculo del desplazamiento cuadrático medio (MSD) para cada intervalo de tiempo, tras la obtención de las coordenadas x-y de las vesículas que permanecieron en el plano confocal durante más de 10 s con ambas construcciones (ejemplos mostrados en las Fig. 3A y B). La ventaja de este cálculo es que si suponemos que las partículas se desplazan con un coeficiente de difusión simple entonces la representación del MSD frente al intervalo de tiempo (Δt) es lineal y la pendiente procedente del ajuste equivale a $4 \times D$ (siendo D el coeficiente de difusión). Nosotros hemos asumido esa condición y con la finalidad de hallar el valor de D, en la figura 3C hemos representado el promedio del MSD frente al Δt para cada condición y lo hemos ajustado linealmente. El coeficiente de difusión correspondiente a 48 vesículas de células que expresaban RLC-GFP silvestre fue de $10,1 \pm 1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (similar a los controles no infectados que fue $8,68 \pm 0,99 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$) frente al coeficiente de 44 vesículas de células que expresaban T18A/S19A RLC-GFP que fue $0,32 \pm 0,02 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (treinta veces menor). Este valor fue similar al obtenido en células tratadas con $1 \mu\text{M}$

de faloidina ($0,24 \pm 0,01 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$) e incluso inferior que con el tratamiento del inhibidor de la ATPasa de la miosina BDM a 20 mM de concentración, que fue de $1,23 \pm 0,03 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$.

A continuación procedimos a estudiar la secreción estimulada por distintos secretagogos mediante la detección de las catecolaminas por amperometría. Tanto en la estimulación con 59 mM de KCl como con 5 mM de BaCl_2 , las células cromafines que expresaban la RLC no fosforilable redujeron de manera significativa el número de vesículas secretadas durante el minuto de registro en un 40 % y un 55 %, respectivamente. El efecto de esta construcción sobre la secreción de las catecolaminas durante los primeros 10 s fue también muy claro, lo cual nos indica una posible afectación de no sólo de las fases tardías, sino también de los componentes más rápidos.

Estos experimentos los observamos más claramente al medir la secreción estimulada por el aumento rápido del calcio intracelular. Las células fueron tratadas con un compuesto liberador de Ca^{2+} por fotólisis, el orto-nitrofenil EGTA-AM, y luego fueron sometidas a un haz de luz ultravioleta de elevada intensidad durante 5 ms. En este tiempo conseguimos un rápido incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, equivalente a $0,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$ (valores obtenidos empleando Fura 2-AM). Este efecto produjo a su vez la exocitosis rápida de vesículas en las células que expresaban RLC-GFP (ver ejemplos de la Fig. 6A). En el caso de la RLC no fosforilable, se evidenció una notable inhibición de esta secreción rápida (ver ejemplo de la Fig. 6A y la corriente integrada de la Fig. 6B) llegando a ser del orden del 50 – 55 %. Adicionalmente, hemos medido la pendiente durante los 5 primeros segundos tras el estímulo, encontrando que la velocidad de secreción disminuyó del $8,54 \pm 0,12 \text{ pC/s}$ en presencia de la RLC-GFP, al $3,91 \pm 0,13 \text{ pC/s}$ en presencia del T18A/S19A RLC-GFP.

Las características cinéticas de las fusiones exocitóticas fueron estudiadas en detalle a través del análisis de los picos o espigas de secreción amperométrica en células infectadas estimuladas con BaCl_2 . Este secretagogo tiene la propiedad de producir una secreción lenta de las catecolaminas, lo que permite obtener espigas aisladas fáciles de estudiar. Los parámetros que hemos determinado son la amplitud máxima (I_{max}), la carga (Q), el tiempo medio ($t_{1/2}$) y el tiempo al pico (t_p), (Segura et al., 2000). Las células no infectadas y las células que sobre-expresaban la RLC-GFP silvestre presentaron un patrón cinético de las espigas amperométricas muy similar, (ver Fig. 7 y Tabla I). Por el contrario, los picos de las células que sobre-expresaron la construcción no fosforilable de RLC presentaron una cinética enlentecida.

Comparando los valores con los de los controles arriba mencionados, las espigas fueron menores de tamaño, pero más anchas y tardaron más tiempo en alcanzar la amplitud máxima (Fig. 7A, C y D, respectivamente). Sin embargo, la carga o el contenido de las catecolaminas secretado fue equivalente (Fig. 7B). Estos datos fueron obtenidos tomando como controles las células no infectadas y las células que sobre-expresaron la subunidad silvestre de RLC-GFP, la cual nos sirvió para validar nuestros resultados. Tras el tratamiento de células controles con 20 mM de BDM obtuvimos valores similares (Tabla I), lo cual aporta un dato adicional sobre el enlentecimiento de la cinética de fusión de las vesículas ante la falta de actividad de la miosina.

Este conjunto de resultados indica que la forma no fosforilable de la miosina II además de afectar al transporte de vesículas, altera las propiedades de la fusión de vesículas individuales y ello sugiere la participación de la miosina II en el proceso final de la fusión vesicular.





DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Participación del binomio actina-miosina en la secreción y en el transporte citosólico

Durante la década de los ochenta se encontraron evidencias de que la red cortical de F-actina, en las células cromafines, constituía una barrera de exclusión de las vesículas hasta su lugar de anclaje en la membrana plasmática (Perrin y Aunis, 1985). Tras la llegada del estímulo a estas células, el calcio que entra por los canales de calcio dependientes de voltaje produce una fragmentación transitoria de esta red de F-actina (Cheek y Burgoyne, 1986) permitiendo el acceso de las vesículas a las inmediaciones de la membrana plasmática. Se defiende, por tanto que la barrera cortical de actina ejerce un papel totalmente pasivo evitando el acercamiento de las vesículas a las inmediaciones de la membrana plasmática.

Sin embargo, en un sistema tan organizado y regulado como es la maquinaria exocitótica celular nos hacemos la siguiente pregunta: ¿los gránulos difunden a través del citosol hasta que son capturados cerca del sitio de liberación, o por el contrario existe un sistema de transporte activo que los dirige hacia esos sitios?

El conjunto del trabajo que se recoge en esta tesis se ha diseñado para responder a esta pregunta y evaluar la relevancia de los componentes citosqueléticos en el transporte vesicular y en la actividad secretora de la célula cromafín bovina.

El estudio de la miosina, proteína motora del citosqueleto de actina, en la secreción de este modelo neuroendocrino no es nuevo. En primer lugar, algunos trabajos muestran que la actividad de la miosina aparece regulada por un mecanismo de fosforilación-defosforilación proteica que ocurre de forma paralela a la secreción (Côté et al., 1986; Gutiérrez et al., 1989). En segundo lugar, existen trabajos realizados, sobre principios de la década de los noventa, en poblaciones de células cromafines permeabilizadas que mostraron que la

miosina estaba involucrada en la secreción (Nakanishi et al., 1989; Ohara-Imaizumi et al., 1992; Reig et al., 1993). En estos trabajos se emplearon inhibidores de la MLCK (la quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina que regula las interacciones miosina-actina), como la wortmanina y el ML-9, es una naftalensulfonamida.

Lo que sí permanece desconocido es la participación específica de la miosina en las distintas etapas del ciclo secretor. En este trabajo hemos evaluado la respuesta secretora y la movilidad vesicular en diferentes condiciones de ensayo a nivel de célula única y mediante dos técnicas vanguardistas, la amperometría y la microscopía confocal dinámica de fluorescencia.

El empleo de inhibidores de la actividad de miosina tales como wortmanina, BDM (Herrmann et al., 1992) y el péptido P-18, un péptido sintético que inhibe con mayor selectividad la actividad de MLCK (Lukas et al., 1999), afectó notablemente la secreción de células cromafines permeabilizadas a partir de los 10 – 15 s de estimulación continua con calcio (Fig. 1, Anexo I). Estos resultados fueron concordantes con los obtenidos por estimulación mediante pulsos de calcio, cuyo objetivo fue el depletar las vesículas maduras y promover a la vez el reclutamiento de nuevas vesículas procedentes de estadios anteriores en el ciclo secretor (Fig. 2, Anexo I).

En las células cromafines, la población de vesículas listas para exocitar se reponen con una constante de tiempo de sólo 10 s (Moser y Neher, 1997), las vesículas atracadas no preparadas (etapa que depende del ATP) lo hacen entre los 10 y los 30 s (Gil et al., 1999; Parsons et al., 1995) y la movilización de las vesículas que constituyen la población de reserva ocurre a partir de los 30 - 40 s. Por tanto estos resultados sostienen firmemente la participación de la miosina en la secreción de las vesículas que se liberan desde las etapas intermedias y las tardías de la secreción, afectando sobre todo a la movilización a partir de los reservorios intracelulares. Como la MLCK es regulada por la Ca^{2+} /calmodulina, esta enzima proporciona un vínculo crítico entre la elevación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que promueve la fusión de las vesículas, y el reemplazo de éstas por las vesículas que constituyen los reservorios intracelulares. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en neuronas respecto al posible papel de la miosina en secreción (Ryan, 1999).

Dentro del tema de estudio de la movilidad vesicular, en modelos secretores existen trabajos realizados por grupos prestigiosos en el campo de la exocitosis (Steyer y Almers, 1999; Lang et al., 2000; Oheim y Stühmer, 2000; Johns et al., 2001). Estos grupos emplearon la técnica de microscopía de reflexión total de fluorescencia (TIRFM) que crea una luz evanescente de excitación en el citosol de la célula situada sobre la superficie reflectante. Esta técnica permite hacer un seguimiento en tiempo real en las tres dimensiones del espacio de los gránulos marcados con sondas fluorescentes. Estas sondas pueden ser la quinacrina, la naranja de acridina, y la sobre-expresión de quimeras de proteínas de la membrana granular con proteínas GFP. La posición axial de los gránulos se obtiene debido a que la intensidad de la luz evanescente disminuye hacia el interior de la célula llegando a ser crítica a partir de los 140 ó 600 nm desde la membrana plasmática adherida al portaobjetos reflectante (Steyer y Almers, 1999; Oheim y Stühmer, 2000). Lógicamente la desventaja que se presenta es ésta, el seguimiento del gránulo debe limitarse a esta dimensión. Pero sin duda esta técnica permite visualizar los procesos que ocurren en la cercanía de la membrana plasmática tales como el atraque y la fusión.

Nosotros hemos empleado la técnica de microscopía confocal dinámica de fluorescencia para obtener una visión global de la movilidad vesicular en el citoplasma, desde las zonas más internas, donde las vesículas son sintetizadas, hasta las zonas más periféricas, donde las vesículas se acumulan formando reservorios para la secreción. La forma de los gránulos marcados con quinacrina es esférica y su tamaño aparente se encuentra en el rango de los 200 a los 350 nm de diámetro, datos que se corresponden, con los tamaños de los gránulos cromafines (Ornberg et al., 1995). El estudio de la movilidad granular se realizó a partir de células controles sin tratamiento o tratadas con los agentes de estudio en condiciones de no estimulación. En este sentido hemos de decir que en consonancia con otros autores de forma sorprendente no hemos encontrado diferencias en la movilidad vesicular en presencia y ausencia de estimulación (Oheim y Stühmer, 2000).

Las células controles sin tratamiento presentaron una gran movilidad vesicular, equivalente a una elevada oscilación en la intensidad de fluorescencia en la zona de medición (Fig. 3, Anexo I). Algunos de estos gránulos desaparecieron del plano confocal z (estimado en 500 nm) al cabo de varios segundos, entre 3 - 4 segundos de promedio. Por el contrario, las células tratadas con wortmanina y BDM presentaron un comportamiento dinámico de

sus gránulos muy inferior, caracterizándose por una elevada restricción del movimiento, que fue observada en todo el citoplasma celular. Este comportamiento particular tiene lugar además en la periferia celular, cerca de la membrana plasmática (Fig. 4, Anexo I), donde los inhibidores de miosina también redujeron la movilidad vesicular y con ello el número de gránulos que “visitaron” esta zona posiblemente para atracarse. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos mediante la técnica de TIRFM en células cromafines y en células PC12 (Lang et al., 2000; Oheim y Stühmer, 2000).

Esta baja movilidad sugiere que el sistema de transporte dependiente de miosina sostiene el dinamismo intrínseco de los gránulos en las células cromafines bovinas, lo cual podría explicar el notable efecto de estos inhibidores en la secreción amperométrica descrita anteriormente.

2. El transporte de los gránulos cromafines está mediado por los filamentos de actina-miosina y el sistema de microtúbulos en etapas secuenciales

Los resultados discutidos anteriormente fueron obtenidos en células cromafines permeabilizadas. Este modelo de trabajo presenta una gran ventaja en relación al control que se tiene sobre la concentración del calcio intracelular durante el periodo de registro. De esta manera nos permite estudiar las etapas del ciclo secretor en sí, eliminando toda participación de canales o receptores de membranas, cuya actividad pudiera estar afectada por los agentes de estudio. Pero este modelo presenta dos desventajas que son suplidas con el trabajo en células intactas. La primera de ellas, es que la secreción en promedio es inferior debido a que se diluyen algunos factores intracelulares solubles necesarios para la exocitosis y el transporte, como el ATP (la propia miosina necesita del ATP para su actividad). Otra desventaja es que es un modelo de trabajo más alejado del fisiológico que el que constituirían las células cultivadas intactas.

En este trabajo aportamos evidencias que, en adición a las anteriores, demuestran la participación del sistema citosquelético constituido por actina-miosina en la secreción y en el transporte vesicular. Así lo indican los resultados obtenidos con el empleo de faloidina y BDM sobre la secreción amperométrica estimulada por despolarización y sobre la movilidad vesicular.

Las etapas que son afectadas de forma más notable con estos agentes son las rápidas. Este efecto se observa muy claro, sobre todo cuando es comparado con el producido por los agentes que inhiben la dinámica de los microtúbulos, en los experimentos de secreción por estimulación continua o en los de múltiples pulsos (Fig. 1 y 2, Anexo II). Estos resultados confirman la hipótesis sobre el papel fundamental del citosqueleto de actina-miosina de proporcionar, mediante el transporte, vesículas desde los compartimentos de reserva, de forma similar a como ocurre en modelos neuronales (Mochida et al., 1994; Ryan, 1999).

Con objeto de estudiar la implicación de la miosina en las etapas rápidas de la cascada exocitótica, realizamos un experimento adicional en el que combinamos la actividad proteolítica de la neurotoxina botulínica A (BoNT A) con el BDM. Un trabajo publicado recientemente por nuestro grupo con esta toxina en células cromafines sugirió que la acción proteolítica del BoNT A a 1 nM de concentración afecta al atraque vesicular en las células cromafines (Gil et al., 1999). Tanto la BoNT A, como la combinación de esta toxina con el BDM (20 mM) redujeron el número de espigas amperométricas desde los 5 s de estímulo por despolarización en las células cromafines bovinas (Fig. 1A).

Sin embargo, como se muestra en la gráfica de los promedios de las corrientes acumulativas de secreción de 13 a 18 células, la combinación de los dos agentes produjo una afectación de la secreción superior a la de la toxina BoNT A sola, afectando sobre todo a la etapa rápida (Fig.1B). Estos resultados muestran la participación del BDM bloqueando parte de la corriente secretora resistente a la toxina BoNT A. Puesto que se ha sugerido que la toxina BoNT A a la concentración empleada afecta a la formación del complejo SNARE que tiene lugar durante la fase de atraque, la diana del BDM que es la miosina, podría estar afectando a las etapas del ciclo secretor posteriores al atraque. Estos resultados aportan, claramente, una prueba más de la participación de la miosina en las etapas rápidas de la secreción, que sin duda sería muy interesante estudiar con detenimiento.

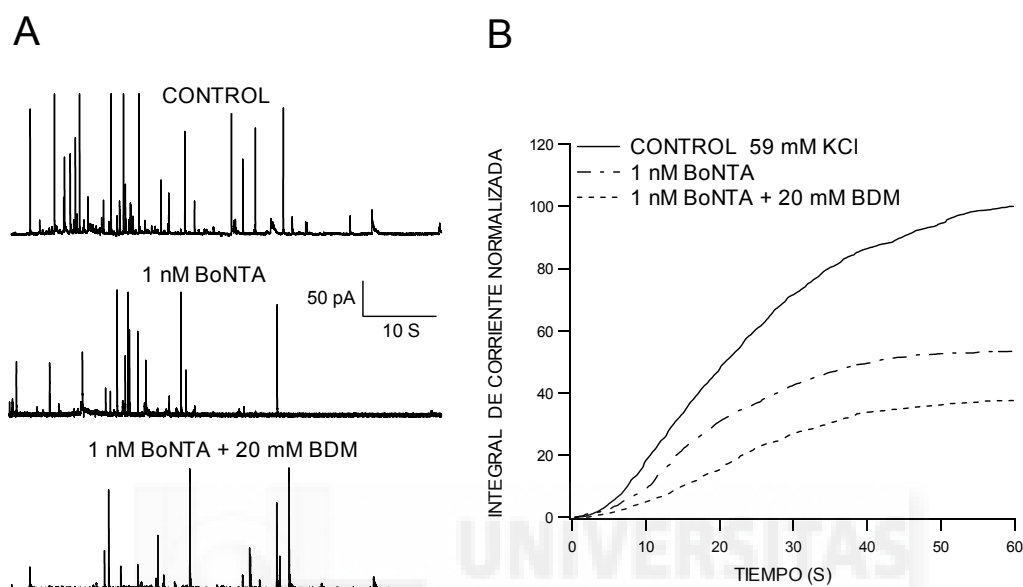


Figura 1. El BDM inhibe parte de la corriente resistente a la neurotoxina BoNT A. Los experimentos de amperometría de fibra de carbono se realizaron en células controles, células tratadas con 1 nM de BoNT A y células tratadas con 1 nM de BoNT A y 20 mM de BDM de concentración. La BoNT A se incubó durante 24 h en medio de baja fuerza iónica, constituido por (en mM): NaCl, 5; KCl, 4.8; CaCl₂, 2.2; MgSO₄, 1.2, hepes, 20; glucosa, 5.6; sacarosa, 220; KH₂PO₄, 1.2; y 0.5 % de BSA, ajustado a pH 7.4; al igual que los controles pero en ausencia de la neurotoxina. El medio fue reemplazado por DMEM enriquecido con 10 % de BSA, 10 μM de arabinósido de citosina, 10 μM de 5-fluoro-2'-deoxiuridina, 50 IU/ml de penicilina y 50 μg/ml de estreptomina durante 24 h más para la recuperación de las células. El BDM se incubó durante 15 min en medio DMEM enriquecido fresco. **A) Ejemplos amperométricos de secreción.** Ejemplos de registros amperométricos obtenidos a partir de células controles sin tratamiento, células tratadas con BoNT A y células tratadas con BoNT A y BDM, estimuladas durante 60 s por despolarización con una solución que contenía 59 mM de KCl (procedimientos de estimulación y registro descritos en el apartado “Materials and Methods”, Anexo II) **B) Integrales acumulativas.** Las corrientes amperométricas fueron integradas, promediadas y normalizadas a partir de células controles (n=18, línea continua), células tratadas con 1 nM de BoNT A (n=14, línea discontinua mixta), tratadas con 1 nM de BoNT A y 20 mM de BDM (n=13, línea punteada). Los valores absolutos de corriente (media ± ESM) obtenidos al minuto de iniciarse el estímulo fueron 154 ± 19 (control), 82 ± 13 (1 nM de BoNT A) y 58 ± 9 (1 nM de BoNT A y 20mM de BDM). La estadística mostró diferencias significativas entre tratados y controles con un p<0.01 para 1 nM de BoNT A y p<0.0005 para 1 nM de BoNT A con 20 mM de BDM.

Por el contrario, el empleo de inhibidores de la dinámica de microtúbulos, que actúan por mecanismos de acción diferentes, tales como vinblastina y taxol, lejos de afectar las etapas rápidas redujeron más bien la secreción tardía. Estos compuestos redujeron el número de fusiones de forma notable a partir de los 25 – 30 s de comenzar el estímulo continuo (Fig. 1, Anexo II), y en los últimos pulsos en la estimulación repetitiva (Fig. 2, Anexo II). Esto indica que las vesículas, cuyo reclutamiento se encuentra impedido por estos agentes, proceden de poblaciones vesiculares de secreción tardía y en todo caso pertenecientes a las etapas anteriores al atraque vesicular. Como es de esperar, la combinación de ambos tipos de agentes, tales como el empleo de la vinblastina y el BDM, produjo un efecto inhibitorio mayor de la secreción evocada en presencia sólo de vinblastina, lo cual es consistente con la existencia de dos patrones temporales distintos de inhibición de la exocitosis.

Adicionalmente y en consonancia con los resultados funcionales, el empleo de los agentes inhibidores de la dinámica de ambos sistemas citosqueletales produjo efectos diferenciales sobre la movilidad vesicular. El agente estabilizador de la actina filamentosa, faloidina, produjo una restricción del movimiento en todo el citosol celular y afectó incluso a la movilidad de las vesículas que se encontraban en la zona cortical (Fig. 3 y 6, Anexo II). Estos resultados están en consonancia con los observados con los inhibidores de la actividad de miosina. Lo cual sugiere que el sistema transportador formado por actina-miosina participa en el desplazamiento vesicular en todo el citoplasma, explicando así el notable efecto obtenido con estos agentes en la cinética de secreción. Con la visualización de la red de F-actina marcada con faloidina conjugada con rodamina se observa una elevada densidad del marcaje en zonas internas del citosol y en la periferia, formando la barrera cortical. En la zona interna este marcaje adquiere una apariencia filamentosa formando estructuras poligonales (Fig. 5A, Anexo II), entre 1 y 1,5 μm de diámetro. Los gránulos cromafines parecen estar anclados a estas estructuras, posiblemente debido a que éstos no son capaces de “caminar” por la superficie de la actina decorada por la faloidina. Estos resultados apoyan la idea sugerida para una fracción de vesículas de las células PC12, acerca de que dichas vesículas se desplazan a través de raíles formados por actina filamentosa (Lang et al., 2000). Adicionalmente, estas estructuras poligonales de gran tamaño son lo suficientemente grandes como para permitir un transporte organizado de los gránulos a través de sus raíles, pero también pueden permitir el movimiento

difusional amplio, en correspondencia con lo observado para gránulos alejados de la membrana plasmática (Johns et al., 2001).

En segundo lugar, el taxol y la vinblastina, produjeron una restricción de la movilidad vesicular en las zonas internas del citosol, cercanas al núcleo, donde se halla una mayor densidad de filamentos microtubulares (Fig. 4, Anexo II). De nuevo el estudio en detalle del marcaje del taxol conjugado con Bodipy 564/570 mostró la existencia de estructuras poligonales de tamaño similar a las encontradas para la actina, y algunos gránulos parecieron de nuevo estar asociados a ella (Fig. 5B, Anexo II). Por tanto, ocurre el mismo fenómeno pero aplicado a las vesículas más internas, que pueden desplazarse utilizando también como raíles los filamentos microtubulares.

La mayoría de los gránulos que tras el tratamiento con el taxol o con la vinblastina se encontraban en la periferia celular, presentaron una movilidad vesicular semejante a los controles sin tratamiento. En cualquier caso, aunque el movimiento de los gránulos de las zonas corticales no se encuentre, por lo general, afectado por estos agentes, encontramos gránulos inmovilizados a 400 – 600 nm del límite celular. Esto nos ha sugerido que las estructuras poligonales microtubulares podrían cooperar proporcionando vesículas desde los reservorios intracelulares hacia las inmediaciones de la membrana plasmática.

Estas diferencias encontradas en la movilidad de los gránulos corticales podría ser explicada en base a las características estructurales de estos elementos citosqueléticos en esta región cortical, crítica para la secreción.

A la actina filamentosa cortical aparecen asociadas estructuras anulares que son de menor tamaño que las descritas para la actina citosólica interna y se encuentran rodeando, en la mayoría de los casos, a gránulos periféricos, posiblemente atracados o en fase de atraque (Fig. 7, Anexo II). En estudios realizados mediante la técnica de TIRFM, los gránulos que se acercan a la membrana plasmática, probablemente durante la etapa de atraque, reducen su movilidad alrededor de 5 veces (Steyer et al., 1997). La movilidad lateral de estos gránulos se encuentra restringida en 75 nm (Steyer y Almers, 1999) en jaulas estimadas de 400 nm de diámetro (Oheim y Stühmer, 2000). En nuestro sistema el tamaño de estas estructuras anulares lo hemos estimado en alrededor de 500 nm de diámetro. Teniendo en cuenta que el tamaño medio de los gránulos es de 200 a 300 nm, estos gránulos podrían desplazarse dentro de estas estructuras anulares en un radio de 100 a 150 nm. Por tanto, estas

observaciones proporcionan la primera evidencia visual de la existencia de estas jaulas de restricción de la movilidad durante la fase de ataque en este modelo neuroendocrino.

Tras estas observaciones, nos planteamos la siguiente pregunta, ¿es el citosqueleto el que arrastra los gránulos hacia la membrana plasmática o son los gránulos los que determinan por dónde deben ir los raíles? Nosotros nos inclinamos por la primera opción. En cada uno de los planos confocales mostrados, el espacio interior de estas estructuras anulares se encuentra ocupado por una sola vesícula, y a su alrededor existen otras (visualizadas en amarillo en la Fig. 7, Anexo II) que parecen también estar asociadas con el citosqueleto. Esto parece mostrar que existe una cierta organización en el transporte y que la posición de los gránulos no es meramente aleatoria. Sucediendo esto, es más probable que sean los raíles de actina los que gobiernen la organización y sean los que dirijan o arrastren estas vesículas hacia la zona de ataque. Además, es posible que durante la estimulación secretora, los gránulos más cercanos a la membrana plasmática, y preparados para la fusión, abandonen su posición dejando libre el paso para los gránulos que les siguen desde atrás por los mismos raíles de actina.

Estos resultados sugieren en su globalidad que existen dos etapas secuenciales de reclutamiento vesicular gobernadas, en primer lugar por el sistema de microtúbulos, seguido de los filamentos cortos de actina-miosina (ver figura 4). Esta afirmación es consistente con el hecho de que los microtúbulos, en estas células, se organizan de forma radial, extendiéndose desde el centro de la célula a la periferia, y los filamentos de actina forman una red cerca de la membrana plasmática (ver figura 2A). En todo caso cabe la posibilidad de que esta cooperación funcional lleve consigo consecuencias morfológicas, como la coexistencia en el gránulo cromafín de sistemas de motores moleculares de microtúbulos-kinesina y actina-miosina. Estos motores moleculares formarían complejos multifuncionales para el transporte de los gránulos a lo largo de ambos sistemas citosqueletales, como se ha postulado en otros modelos celulares (Gelfand y Rogers, 1998; Huang et al, 1999).

No obstante, los datos presentados que muestran que el BDM inhibe parte de la secreción resistente a la toxina botulínica A, indican también que este inhibidor de la miosina podría estar afectando la fase de atraque vesicular e incluso la movilización de vesículas en etapas posteriores al atraque. Este hecho nos lleva claramente a afirmar que la actividad de la miosina es indudablemente importante para el reclutamiento de vesículas en la zona cortical de la célula.

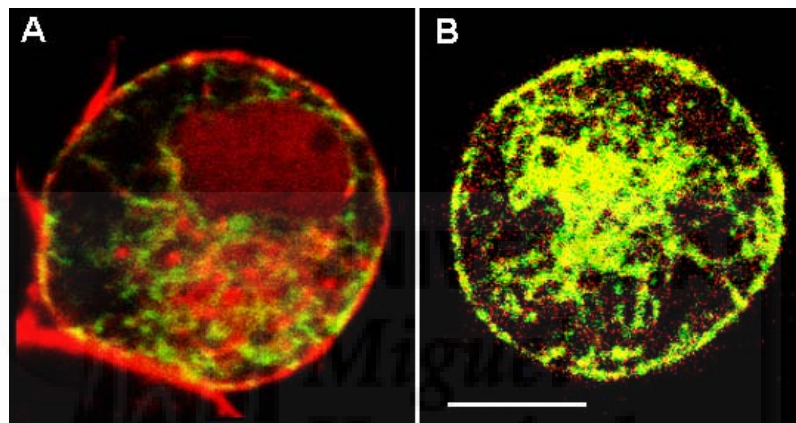


Figura 2. Distribución del sistema de microtúbulos y los filamentos de actina en las células cromafines bovinas. Las células fueron fijadas y permeabilizadas con una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PBS) que contenía (en mM): 170 NaCl, 170; KCl, 3.35; Na₂HPO₄, 1; KH₂PO₄, 1.84, ajustado a pH 7.2, durante 20 min, seguida de una permeabilización con Triton X-100 al 0.2% en formaldehído al 3.6% en PBS durante 10 min y finalmente de una solución de BSA al 10%. Con el fin de extraer los lípidos de la membrana celular y favorecer la permeabilización de los anticuerpos y demás agentes, las células se incubaron con acetona al 50 %, al 100 % y de nuevo al 50 % durante 3, 5 y 3 min, respectivamente. Para el marcaje de la tubulina, las células se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal contra α -tubulina (Sigma-Aldrich, Madrid) a la dilución de 1/250 durante 12 h a 4°C. Tras lavarse las células extensivamente con PBS se incubó el anticuerpo secundario contra ratón conjugado con FITC (Amersham, Little Chalfont, Bucks, U.K.) producido en cabra (en verde), durante 2 h. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS durante 10 min y se montaron con un cubre de vidrio en glicerol al 80% en PBS. La fluorescencia fue examinada con un microscopio confocal de fluorescencia TCS Leica. **A. Marcaje de los filamentos de actina y del sistema de microtúbulos.** Los microtúbulos se marcaron empleando anticuerpos específicos contra α -tubulina como se ha descrito anteriormente (en verde). Los filamentos de F-actina se marcaron utilizando una solución de 0.5 μ g/ml de faloidina conjugada con rodamina (Sigma-Aldrich, Madrid) en PBS durante 15 min. en céls. previamente fijadas y delipidadas (en rojo). **B. Co-localización entre el marcaje de los microtúbulos con anticuerpos específicos y el paclitaxel.** Las células sometidas al protocolo de marcaje de microtúbulos descrito anteriormente (en verde) fueron tratadas con 1 μ M de taxol conjugado con BODIPY 564/570 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) durante 30 min (en rojo). La escala se corresponde con 5 μ m.

3. ¿Qué subtipo o subtipos de miosina son responsables del transporte durante la secreción?

El estudio anterior nos da una idea de la importancia de la miosina en la secreción en las células cromafines, sin pormenorizar en el subtipo o subtipos de miosina implicados.

Hasta el momento existen descritos 15 subtipos de miosina. Aunque existen pocos trabajos acerca de la presencia de ellos en las células cromafines, algunos de estos trabajos han mostrado la presencia de la miosina cerca de la membrana plasmática en las células cromafines (Gutiérrez et al., 1989, Kumakura et al., 1994), la cual se ha identificado como el subtipo II de miosina convencional, asociada a la red cortical de actina filamentosa. Junto a este subtipo de miosina convencional hemos hallado también la presencia de la miosina no convencional de tipo V, evidencia que ha sido corroborada por Rosé y colaboradores (2003). El esclarecimiento de cuál de estos dos subtipos de miosina está implicado en la secreción en las células cromafines es difícil ya que existen evidencias que relacionan ambos subtipos con la secreción y/o con las vesículas secretoras.

La miosina II está presente en las terminales nerviosas, sobre todo la isoforma IIB es muy abundante (Takahashi et al., 1992) y el empleo de anticuerpos específicos contra miosina II inhibe la liberación de neurotransmisores (Mochida et al., 1994). Por lo que se ha sugerido que este subtipo de miosina está involucrado en el tráfico de vesículas sinápticas. En las células cromafines, la miosina II se localiza abundantemente en la zona periférica, donde podría estar asociada a los filamentos de actina que conforman la barrera cortical (Fig. 5A y B, Anexo I). Estos resultados fueron confirmados en un trabajo publicado con posterioridad por Rosé y colaboradores (2003). Pero en cuanto a su posible vinculación con las vesículas secretoras, hasta el momento no se ha descrito que la miosina II pudiera estar asociada a ellas, a excepción de varios trabajos. En varios modelos celulares no musculares se ha evidenciado que la miosina II se encuentra asociada a la membrana y a las vesículas del *trans*-Golgi (Ikonen et al., 1997; Müsch et al., 1997), lo cual sugiere que la miosina II podría estar participando en el tráfico de membranas en el interior citosólico.

En cuanto a la miosina V, es muy abundante en el cerebro y en el sistema nervioso periférico. En las neuronas se ha encontrado en todos los

compartimentos intracelulares (Espreafico et al., 1992), donde se ha asociado con varios tipos de organelas incluyendo las vesículas sinápticas (Prekeris y Terrian, 1997) y el retículo endoplásmico (Evans et al., 1998; Langford y Molyneaux, 1998). El empleo de anticuerpos específicos contra la miosina V inhibió el transporte de vesículas del retículo endoplásmico y vesículas sinápticas a lo largo de los filamentos de actina (Evans et al. 1998; Tabb et al., 1998), y más recientemente se ha mostrado que una construcción truncada de miosina V disminuye el número de vesículas sinápticas cerca de las zonas activas de exocitosis (Bridgman et al., 1999). Es por todo esto que se ha postulado que la miosina V es la proteína motora de las vesículas sinápticas. En los modelos secretores se ha empezado a estudiar más recientemente. Algunos autores han mostrado mediante el uso de anticuerpos específicos que co-localiza con los gránulos secretores de las células PC12 y de las células cromafines (Rudolf et al., 2003; Rosé et al., 2003).

Complementando estos resultados presentes en la bibliografía, hemos empleado anticuerpos específicos contra miosina V de cerebro de calamar (Molyneaux y Langford, 1997) en las células cromafines. Estos anticuerpos presentaron distribución preferencial de la miosina V en zonas internas del citosol (Fig. 5C, Anexo I), resultados que concuerdan con los obtenidos en neuronas (Espreafico et al., 1992) y posteriormente en las células cromafines (Rosé et al., 2003). No obstante, no podemos descartar que se encuentre también en la periferia celular, puesto que la hemos hallado presente en secciones de la periferia cortical de las células cromafines (Fig. 5D, Anexo I).

Sin embargo, para responder a la pregunta de qué subtipo de miosina estaría mayormente implicado en la secreción en nuestro sistema, consideramos decisivos los resultados obtenidos a partir de células permeabilizadas (Fig. 6, Anexo I). El efecto inhibitorio de la secreción estimulada con calcio en presencia de los anticuerpos contra la miosina II predomina frente al obtenido para los anticuerpos contra la miosina V. Estos resultados en principio no nos sorprendieron, dado que la miosina II se localiza preferentemente en la periferia, es de pensar que su inactivación debería afectar a la secreción de un número de poblaciones vesiculares mayor y producir un efecto inhibitorio más notable. Por tanto, a raíz de estos resultados, el subtipo II de miosina es el que participa mayormente, posiblemente modulando el transporte vesicular en los procesos que tienen lugar durante la exocitosis de catecolaminas en este modelo celular neuroendocrino.

No obstante los anticuerpos contra miosina V también afectaron a la secreción, y la suma de ambas inhibiciones podría dar lugar a la producida por el BDM, que es más acusada. Esta reflexión, que aparentemente está en concordancia con los resultados de las diferentes localizaciones intracelulares de ambos subtipos, nos hace pensar sobre una posible cooperación entre estas proteínas. Por esta razón, proponemos que tanto la miosina II como la miosina V cooperan en el transporte de las vesículas secretoras en la célula cromafín. De esta manera es posible que la miosina V, abundante en zonas internas del citosol, fuera responsable del tráfico de membranas a este nivel, desde el retículo endoplásmico hasta la periferia celular, y a continuación ser ambos subtipos de miosina, pero sobre todo la miosina II, los responsables del transporte en la periferia celular. Claramente estos resultados abren una línea de investigación que deja las puertas abiertas para el empleo de herramientas más precisas que sirvan para estudiar a fondo la implicación de la miosina II en la secreción.

4. Participación de la miosina II en el transporte vesicular y en el mecanismo de fusión exocitótica

El empleo de herramientas basadas en técnicas de biología molecular han sido utilizadas por nuestro grupo para estudiar la proteína SNAP-25 en la secreción (Criado et al., 1999; Gil et al., 2002). Debido a la dificultad de la transfección de las células cromafines con diferentes vectores de sobre-expresión, en el último de los trabajos mencionados se ha empleado un sistema de infección viral basado en el virus herpes simplex tipo I (HSV-1).

La miosina II es una proteína de 220 kD de peso molecular, demasiado grande para ser sobre-expresada a través de este sistema de infección. Sin embargo sus cadenas ligeras regulatorias RLC, que son las responsables de la activación de la ATPasa dependiente de actina y de su actividad motora (Adelstein y Sellers, 1987; Kamm y Stull, 1989), poseen un peso molecular de 20 kD, tamaño muy apropiado para permitir la inserción de su gen en este vector de expresión.

En las células cromafines, a través de este sistema de expresión vírico, hemos expresado una forma no fosforilable de RLC fusionada con GFP empleada con éxito como herramienta molecular para estudiar la función de

miosina II en la mitosis y en la citoquinesis en las líneas celulares no musculares COS-7 y NRK (Komatsu et al., 2000).

Tanto la RLC-GFP silvestre como la RLC-GFP no fosforilable se ensamblan con el resto de subunidades de la miosina II no muscular, como indica la coincidencia del marcaje GFP procedente de las construcciones expresadas y el obtenido con anticuerpos contra la miosina II no muscular (Fig. 1C - E, Anexo III). Estos resultados son apoyados por los descritos por Komatsu y colaboradores (2000) en ensayos realizados *in vitro*, en los que observaron que la quimera RLC-GFP se unió estequiométricamente con la miosina II de la musculatura lisa deficiente en RLC. Adicionalmente, el defecto de la actividad ATPasa de la RLC-GFP con la doble mutación en presencia de MLCK y calmodulina fue testada en experimentos *in vitro* tomando como control la RLC-GFP silvestre (Komatsu et al., 2000).

Las células cromafines que expresaban la RLC-GFP silvestre presentaron una movilidad de las vesículas marcadas con quinacrina semejante a las células controles no infectadas (Fig. 2, Anexo III) cuyo desplazamiento en el plano x-y fue aproximadamente 4 $\mu\text{m}/20\text{s}$ semejante al obtenido para la población de gránulos “móviles” cercanos a la membrana utilizando la microscopía de TIRF (Oheim y Stühmer, 2000).

No obstante el cálculo del desplazamiento cuadrático medio (MSD) de la trayectoria que sigue la vesícula nos ofrece una mayor información acerca de la movilidad de las mismas. Y se define como (Qian et al., 1991; Saxton y Jacobson, 1997):

$$\text{MSD}(n\delta t) = \frac{1}{(N-n)} \sum_{j=1}^{N-n} \{ [x(j\delta t + n\delta t) - x(j\delta t)]^2 + [y(j\delta t + n\delta t) - y(j\delta t)]^2 \} \quad (1)$$

donde N es el número total de imágenes en la secuencia temporal y n y j son números positivos con valores $n= 1,2,\dots,(N-1)$. Las coordenadas de los gránulos para el instante $j\delta t$ son $(x(j\delta t), y(j\delta t))$, y las correspondientes al intervalo de tiempo $n\delta t$ posterior son $(x(j\delta t + n\delta t), y(j\delta t + n\delta t))$.

El sentido físico del MSD para un intervalo de tiempo dado es el promedio de todos los desplazamientos que tienen lugar con ese intervalo de tiempo. Según esta definición ocurre que cuanto mayor sea el intervalo de tiempo mayor imprecisión existe en el cálculo, y ello trae consigo un mayor error. La

ventaja de este cálculo es que si suponemos que las partículas se desplazan con un coeficiente de difusión simple entonces la representación del MSD frente al intervalo de tiempo es lineal, y la pendiente procedente del ajuste equivale a $4 \times D$ (siendo D el coeficiente de difusión).

Para diferentes condiciones experimentales hemos representado los valores del MSD frente al intervalo de tiempo, calculados según la ecuación (1), y los hemos ajustado de forma lineal (Fig. 3, Anexo III). De esta manera, a partir de las pendientes hemos calculado los coeficientes de difusión. En gránulos controles y gránulos pertenecientes a células que expresaban la construcción silvestre los coeficientes de difusión oscilaron entre $8,5 - 10 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$, valores similares a los obtenidos en células cromafines y PC12 mediante TIRFM (Oheim y Stühmer, 2000; Lang et al., 2000) y en PC12 por microscopía confocal (Burke et al., 1997). En cambio, la expresión de la construcción no fosforilable disminuyó la movilidad vesicular de estas células, recordándonos a la que obtuvimos con los inhibidores de miosina tales como wortmanina y BDM, así como al empleo de faloidina (Lang et al., 2000). El coeficiente de difusión fue en este caso de $0,32 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$, o sea 30 veces inferior al obtenido para la RLC-GFP silvestre.

Este cálculo del coeficiente de difusión se obtiene de asumir que las vesículas se desplazan por difusión simple. No obstante, existen teorías acerca del movimiento confinado resultante de la formación de jaulas de proteínas citosqueléticas cerca de la membrana plasmática (Saxton y Jacobson, 1997; Kusumi et al., 1996; Sheetz, 1983). Este movimiento confinado se rige por la siguiente ecuación (Saxton y Jacobson, 1997):

$$\text{MSD}(\Delta t) = r_c^2 [1 - A_1 \exp(-4 A_2 D \Delta t / r_c^2)] \quad (2)$$

donde $\text{MSD}(\Delta t)$ es el desplazamiento cuadrático medio en función del intervalo de tiempo, r_c^2 equivale al tamaño de la jaula (el cuadrado del radio de la jaula), A_1 y A_2 son constantes que dependen de la geometría de la jaula y D es el coeficiente de la difusión confinada. El sentido matemático de esta ecuación es que en el movimiento difusional confinado el valor del MSD para un intervalo de tiempo muy elevado ($\Delta t \rightarrow \infty$) es igual a r_c^2 , a través del cual podemos hallar el diámetro de la jaula. Por tanto ocurre que en el movimiento confinado, el

desplazamiento difusional no es libre sino que está limitado y esta limitación la impone el tamaño de la jaula.

En la figura 3 mostramos la representación del MSD frente al Δt para un máximo de 10 s. Hemos ajustado los valores a una curva cuya ecuación es regida por la descrita arriba (2), obteniendo que el diámetro de la jaula que determina el movimiento vesicular en el citosol de una célula sin tratamiento es de 1,3 μm , valor que se corresponde adecuadamente con el observado a partir de la figura 5A del Anexo II.

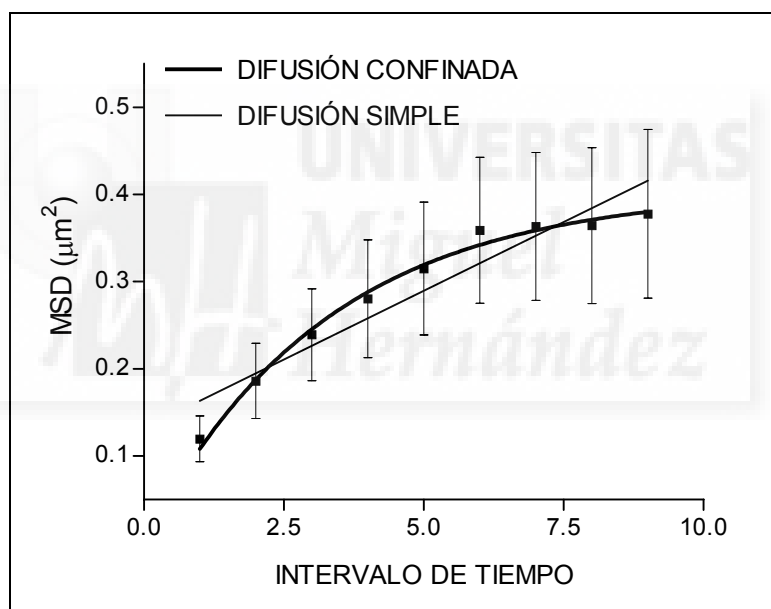


Figura 3. Representaciones del movimiento difusional de vesículas en células cromafines cultivadas. Se ha representado el desplazamiento cuadrático medio (MSD) frente al intervalo de tiempo, al cual se le ha realizado dos tipos de ajuste, el lineal (—) y el no lineal (—) de acuerdo con que las vesículas sigan un comportamiento difusional simple o confinado, respectivamente. La ecuación que rige el ajuste no lineal es (Saxton y Jacobson, 1997): $MSD(\Delta t) = r_c^2 [1 - A_1 \exp(-4 A_2 D \Delta t / r_c^2)]$, donde $MSD(\Delta t)$ es el desplazamiento cuadrático medio en función del intervalo de tiempo, r_c^2 equivale al tamaño de la jaula (el cuadrado del radio de la jaula), A_1 y A_2 son constantes que dependen de la geometría de la jaula y D es el coeficiente de la difusión confinada. El valor de r_c^2 obtenido fue de 0,404 μm^2 , y el diámetro de la jaula fue de 1,3 μm . Los coeficientes de correlación lineal y no lineal fueron de 0,915 y 0,991, respectivamente.

Pero la expresión de la subunidad T18A/S19A RLC-GFP no fosforilable, y por lo tanto deficiente en proporcionar la actividad ATPasa dependiente de actina a la miosina II endógena, no sólo afectó a la movilidad vesicular sino también a otros aspectos de la fisiología de las células cromafines.

En nuestro estudio encontramos que esta subunidad de la miosina II no fosforilable indujo una notable afectación de la capacidad secretora de las células cromafines bovinas cultivadas. En concordancia con los resultados obtenidos con el empleo de la toxina BoNT A y el BDM, la forma no fosforilable de RLC (T18A/S19A RLC-GFP) afectó a la secreción de la etapa rápida, estimulada por los secretagogos KCl y BaCl₂ (Figs. 4 y 5, del Anexo III, respectivamente), los cuales se ha evidenciado que reclutan poblaciones de gránulos de diferentes estados de maduración (Duncan et al., 2003). En adición, la secreción estimulada por el calcio liberado a partir de compuestos quelantes fotolizables fue reducida en células que expresaban la construcción no fosforilable (Fig. 6, Anexo III). Se tiene conocimiento de que la elevación rápida y homogénea del calcio estimula la liberación de la población de vesículas definida como listas para exocitar (Neher y Zucker, 1993). Por tanto, al inhibirse esta secreción en presencia de la construcción no fosforilable en estas células se está alterando la liberación de la población de vesículas listas para exocitar. Estos resultados concuerdan con datos previos acerca de la afectación por parte de la wortmanina de la etapa ATP-independiente en células cromafines permeabilizadas (Ohara-Imaizumi et al., 1992; Kumakura et al., 1994). En consecuencia, ocurre que llamativamente etapas tan cercanas a la propia fusión podrían estar siendo moduladas por esta proteína.

Aunque no sólo la cinética de la secreción se ve modulada por esta proteína sino también la cinética de fusión de vesículas individuales analizadas por amperometría. Se ha demostrado que el análisis estadístico de los parámetros que definen la forma de las espigas amperométricas reflejan la cinética de la fusión de vesículas individuales (Schroeder et al., 1996). Para un mismo valor de carga de las espigas, las células que expresaban la construcción de RLC-GFP no fosforilable presentaron, una menor amplitud y, un $t_{1/2}$ y un tiempo al pico (t_p) promedios mayores (Fig. 7, Anexo III), lo cual demuestra que la cinética de la exocitosis está enlentecida; este fue un efecto que se observó también en las células tratadas con BDM.

Pero, ¿cómo podría una proteína citosquelética como miosina II influir en las etapas finales de la fusión exocitótica?

Existen, a nuestro entender dos posibles explicaciones que podrían responder a esta pregunta. Por una parte, podría ocurrir que la actividad de la miosina II influya en el grado de disociación del neurotransmisor desde el interior de la matriz intragranular, y en segundo lugar, que la miosina II participe en la regulación de la expansión del poro de fusión. Nosotros nos inclinamos más por la segunda posibilidad (ver figura 4).

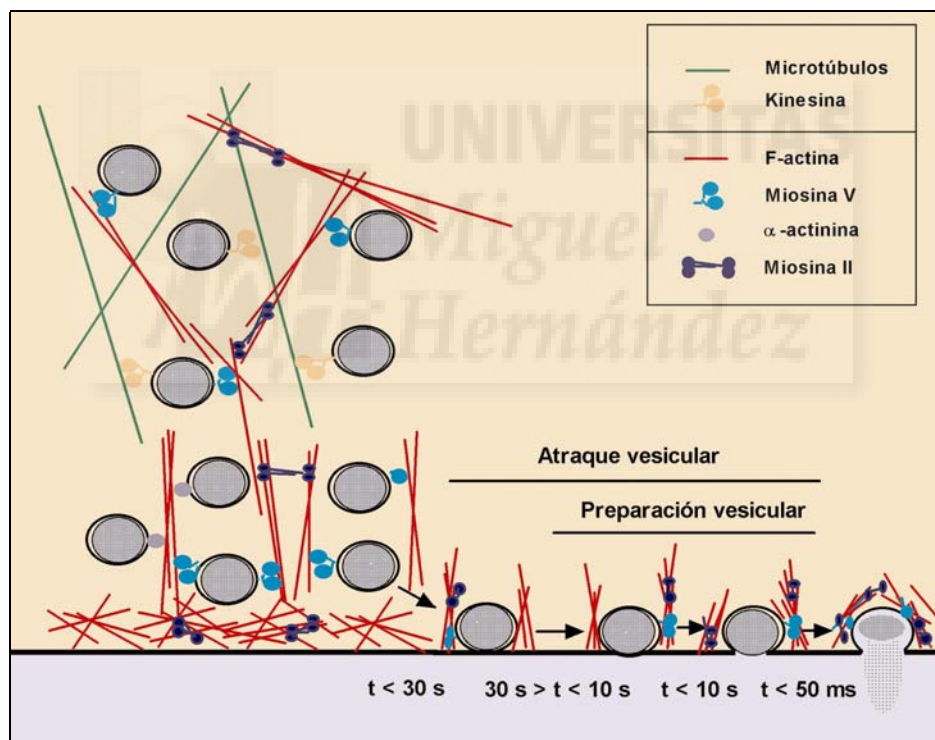


Figura 4. Modelo mostrando la participación del citoesqueleto de F-actina y microtúbulos en el transpote vesicular antes y durante la secreción. El sistema de microtúbulos y el de los filamentos de actina participarían en el transporte denominado de largo recorrido. Las vesículas cercanas a la membrana plasmática serían transportadas sólo por los filamentos de actina. Por último, durante los etapas que tienen lugar durante la secreción (ataque, preparación y fusión), las vesículas estarían vinculadas a los filamentos de F-actina, que a través de miosina II y miosina V, modularían dichos procesos.

En este trabajo hemos mostrado que las vesículas cromafines se encuentran asociadas a los sistemas citosqueletales de F-actina y microtúbulos en muchas de las etapas de maduración. Incluso hemos mostrado que las vesículas más externas, probablemente las atracadas a la membrana plasmática, permanecen asociadas a los filamentos de actina de la red cortical. Por tanto, es posible una relación entre las vesículas cercanas al proceso de fusión y la miosina II. En este sentido, la dinámica de la red cortical de F-actina, modulada por la miosina II, podría crear una fuerza tensional que influyera en la en los requisitos espaciales necesarios para que tengan lugar el atraque (con la formación del complejo SNARE), y más adelante favoreciera la extrusión de los contenidos intragranulares con la exocitosis.

En un trabajo reciente se ha demostrado la asociación entre la cadena pesada de miosina V y la sinaptobrevina formando parte del complejo exocitótico de fusión de vesículas sinápticas (Prekeris y Terrian, 1997). En las células cromafines la miosina V la hemos hallado también asociada a la F-actina cortical. Además existen trabajos que la asocian interaccionando con los gránulos en las células PC12 y en las células cromafines (Rudolf et al., 2003; Rosé et al., 2003). Por tanto las miosinas son proteínas involucradas en el transporte que podrían tener funciones adicionales en cuanto a modular, a través de la sinaptobrevina, las transiciones que conllevan a la formación del complejo de la fusión exocitótica.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los inhibidores de la actividad de miosina tales como la wortmanina, el BDM y el péptido P-18 afectaron a la liberación de los componentes intermedios y tardíos de la secreción estimulada por calcio en las células cromafines bovinas permeabilizadas.
2. El empleo de anticuerpos contra los subtipos de miosina II y V en poblaciones de células cromafines, sugirió que la miosina II se distribuye principalmente en la periferia celular y está especialmente involucrada en la secreción.
3. Los inhibidores de la dinámica de los microtúbulos tales como el taxol y la vinblastina afectaron a la secreción tardía, mientras que los de actina, el BDM y la faloidina afectaron preferentemente a la secreción en las fases iniciales.
4. Tanto los inhibidores de la dinámica de los filamentos de actina como de los microtúbulos produjeron una restricción de la movilidad vesicular en el interior citosólico.
5. Únicamente los inhibidores de la actividad de actina y miosina afectaron a la movilidad vesicular en la periferia celular, lo cual podría explicar los resultados obtenidos en secreción.
6. La elevada densidad de la estructura de F-actina en la periferia celular frente a la baja de los microtúbulos explica la predominancia del sistema de actina en el transporte cortical.

7. El empleo de la sobre-expresión de una construcción no activa de la miosina II redujo el movimiento de los gránulos, disminuyendo su coeficiente de difusión en 30 veces con respecto a la construcción silvestre.

8. La sobre-expresión de la construcción no activa de miosina II disminuyó el número de fusiones exocitóticas en los primeros segundos de estimularse la secreción con KCl, BaCl₂ y calcio liberado a partir de compuestos fotolizables.

9. La construcción no activa de miosina II enlenteció notablemente la cinética individual de fusión exocitótica, lo cual demuestra que la miosina II no sólo participa en funciones inherentes a su naturaleza transportadora sino que además modula las últimas etapas de la exocitosis.





BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Adelstein RS, Sellers JR. (1987) Effects of calcium on vascular smooth muscle contraction. *Am J Cardiol.* Jan 30;59(3):4B-10B.

Almers W, Tse FW Transmitter release from synapses: does a preassembled fusion pore initiate exocytosis. (1990) *Neuron* Jun;4(6):813-818.

Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, Alvarez de Toledo G, Lindau M. (1997) The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* Oct 2;389(6650):509-512.

Alonso, M.T., Barrero, M.J., Michelena, P., Carnicero, E., Cuchillo, I., Garcia, A.G., Garcia-Sancho, J., Montero, M. and Álvarez, J. (1999) Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J. Cell Biol.* 144: 241-254.

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996) Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase) *J. Biol. Chem.* 271, 20246-20249.

Aunis D, Bader MF, Langley OK, Perrin D. (1987) Tubulin- and actin-binding proteins in chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci* 493:435-447.

Aunis D, Bader MF. (1988) The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *J Exp Biol.* Sep;139:253-266.

Bader MF, Aunis D. (1983) The 97-kD alpha-actinin-like protein in chromaffin granule membranes from adrenal medulla: evidence for localization on the cytoplasmic surface and for binding to actin filaments. *Neuroscience* Jan;8(1):165-181.

Bader MF, Trifaro JM, Langley OK, Thierse D, Aunis D. (1986) Secretory cell actin-binding proteins: identification of a gelsolin-like protein in chromaffin cells. *J Cell Biol.* Feb;102(2):636-646.

Baker, P.F. and Knight, D.E. (1978) Calcium dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes. *Nature* 276: 620-622.

Bengur AR, Robinson EA, Appella E, Sellers JR. (1987) Sequence of the sites phosphorylated by protein kinase C in the smooth muscle myosin light chain. *J. Biol. Chem.* Jun 5;262(16):7613-7617.

Bernstein FW, Bamberg JR, Reorganization of actin in depolarized synaptosomes. (1985) *J. Neurosci.* Oct;5(10):2565-9.:2565–2569.

Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM, (1998) Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell* Oct;2(4):437-445.

Betz WJ. (1970) Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol.* Mar;206(3):629-644.

Betz WJ, Bewick GS. (1992) Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* Jan 10;255(5041):200-203.

Bi GQ, Morris RL, Liao G, Alderton JM, Scholey JM, Steinhardt RA. (1997) Kinesin- and myosin-driven steps of vesicle recruitment for Ca²⁺-regulated exocytosis. *J Cell Biol.* Sep 8;138(5):999-1008.

Bommert K, Charlton MP, DeBello WM, Chin GJ, Betz H, Augustine GJ. (1993) Inhibition of neurotransmitter release by C 2-domain peptides implicates synaptotagmin in exocytosis. *Nature* May 13; 363(6425): 163-165.

Brady ST, Lasek RJ, Allen RD. (1982) Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axon. *Science* Dec 10;218(4577):1129-1131.

Brady ST. (1985) A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature* Sep 5-11;317(6032):73-75.

Bridgman P.C. (1999) Myosin Va movements in normal and dilute-lethal axons provide support for a dual filament motor complex. *J. Cell Biol.* 146, pp. 1045–1060.

Burgoyne RD, Cheek TR. (1987) Cytoskeleton: role of fodrin in secretion. *Nature* Apr 2-8;326(6112):448.

Burke NV, Han W, Li D, Takimoto K, Watkins SC, Levitan ES. (1997) Neuronal peptide release is limited by secretory granule mobility. *Neuron* Nov;19(5):1095-1102.

Buss F, Kendrick-Jones J, Lionne C, Knight AE, Cote GP, Paul Luzio J. (1998) The localization of myosin VI at the golgi complex and leading edge of fibroblasts and its phosphorylation and recruitment into membrane ruffles of A431 cells after growth factor stimulation. *J Cell Biol.* Dec 14;143(6):1535-1545.

Calakos N, Scheller RH. (1994) Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. *J Biol Chem.* Oct 7;269(40):24534-24537.

Caumont AS, Galas MC, Vitale N, Aunis D, Bader MF. (1998) Regulated exocytosis in chromaffin cells. Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D. *J Biol Chem.* Jan 16;273(3):1373-1379.

Ceña V, Nicolas GP, Sanchez-Garcia P, Kirpekar SM, Garcia AG. (1983) Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. *Neuroscience* Dec;10(4):1455-1462.

Chasserot-Golaz S, Hubert P, Thierse D, Vlahos CJ, Aunis D, Bader MF. (1998) Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in regulated exocytosis: studies in chromaffin cells with inhibitor LY294002. *J Neurochem.* 70, 2347-2356.

Cheek TR, Burgoyne RD. (1986) Nicotine-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.* Oct 20;207(1):110-114.

Cheek TR, Morgan A, O'Sullivan AJ, Moreton RB, Berridge MJ, Burgoyne RD. (1989) Spatial localization of agonist-induced Ca^{2+} entry in bovine adrenal chromaffin cells. Different patterns induced by histamine and angiotensin II, and relationship to catecholamine release. *J Cell Sci.* 105, 913-921.

Chow RH, von Ruden L, Neher E. (1992) Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* Mar 5;356(6364):60-63.

Chung SH, Takai Y, Holz RW. (1995) Evidence that the Rab3a-binding protein, rabphilin3a, enhances regulated secretion. Studies in adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem.* Jul 14;270(28):16714-16718.

Coluccio LM. (1997) Myosin I. *Am J Physiol.* Aug;273(2 Pt 1):C347-359.

Côté A, Doucet JP, Trifaro JM. (1986) Phosphorylation and dephosphorylation of chromaffin cell proteins in response to stimulation. *Neuroscience* Oct;19(2):629-645.

Criado M, Gil A, Viniegra S, Gutierrez LM. (1999) A single amino acid near the C terminus of the synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) is

essential for exocytosis in chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 22;96(13):7256-7261.

Dai J, Ting-Beall HP, Hochmuth RM, Sheetz MP, Titus MA. (1999) Myosin I contributes to the generation of resting cortical tension. *Biophys J*. Aug;77(2):1168-1176.

Douglas WW, Kanno T, Sampson SR. (1967) Influence of the ionic environment on the membrane potential of adrenal chromaffin cells and on the depolarizing effect of acetylcholine. *J Physiol*. Jul;191(1):107-121.

Douglas WW, Rubin RP. (1961) The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol. (Paris)* Nov;159:40-57.

Douglas WW, Kanno T, Sampson SR. (1967) Effects of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture. *J Physiol*. Jan;188(1):107-120.

Douglas WW. (1968) Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol*. 34; 451-474.

Duncan RR, Greaves J, Wiegand UK, Matskevich I, Bodammer G, Apps DK, Shipston MJ, Chow RH. (2003) Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature* Mar 13;422(6928):176-180.

Edelmann L, Hanson PI, Chapman ER, Jahn R. (1995) Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J*. Jan 16;14(2):2242-31.

Elmqvist D, Quastel DM. (1965) Presynaptic action of hemicholinium at the neuromuscular junction. *J Physiol*. Apr;177:463-482.

Espreafico EM, Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AA, De Camilli PV, Larson RE, Mooseker MS. (1992) Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol*. 2 Dec;119(6):1541-1557.

Evans LL, Lee AJ, Bridgman PC, Mooseker MS. (1998) Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *J Cell Sci*. 1998 Jul 30;111 (Pt 14):2055-2066.

Fenwick EM, Marty A, Neher E. (1982) Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol*. Oct;331:599-635.

Fenwick EM, Marty A, Neher E. (1982) A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol.* Oct;331:577-597.

Ferro-Novick S, Jahn R. (1994) Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* Jul 21;370(6486):191-193.

Fischer-Colbrie R, Lassmann H, Hagn C, Winkler H. (1985) Immunological studies on the distribution of chromogranin A and B in endocrine and nervous tissues. *Neuroscience* Nov;16(3):547-555.

Fischer-Colbrie R, Frischenschlager I. (1985) Immunological characterization of secretory proteins of chromaffin granules: chromogranins A, chromogranins B, and enkephalin-containing peptides. *J Neurochem.* Jun;44(6):1854-1861.

Fischer-Colbrie R, Hagn C, Kilpatrick L, Winkler H. (1986) Chromogranin C: a third component of the acidic proteins in chromaffin granules. *J Neurochem.* Jul;47(1):318-321.

Fowler VM, Pollard HB. (1982) Chromaffin granule membrane-F-actin interactions are calcium sensitive. *Nature* Jan 28;295(5847):336-339.

Galas MC, Helms JB, Vitale N, Thierse D, Aunis D, Bader MF (1997) Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. *J Biol Chem.* Jan 31;272(5):2788-2793.

Gandia L, Mayorgas I, Michelena P, Cuchillo I, de Pascual R, Abad F, Novalbos JM, Larranaga E, Garcia AG. (1998) Human adrenal chromaffin cell calcium channels: drastic current facilitation in cell clusters, but not in isolated cells. *Pflugers Arch.* Oct;436(5):696-704.

Garcia AG, Sala F, Reig JA, Viniegra S, Frias J, Fonteriz R, Gandia L. (1984) Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature* May 3-9;309(5963):69-71.

Gasman S, Chasserot-Golaz S, Popoff MR, Aunis D, Bader MF. (1999) Involvement of Rho GTPases in calcium-regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J. Cell Sci.* Dec;112 (Pt 24):4763-4771.

Gil A, Rueda J, Viniegra S, Gutierrez LM. (2000) The F-actin cytoskeleton modulates slow secretory components rather than readily releasable vesicle pools in bovine chromaffin cells. *Neuroscience* 98(3):605-614.

Gil A, Viniegra S, Gutierrez LM. (2001) Temperature and PMA affect different phases of exocytosis in bovine chromaffin cells. *Eur J Neurosci.* Apr;13(7):1380-1386.

Gil A, Viniegra S, Ñeco P, Gutierrez LM. (2001) Co-localization of vesicles and P/Q Ca²⁺-channels explains the preferential distribution of exocytotic active zones in neurites emitted by bovine chromaffin cells. *Eur J Cell Biol.* May;80(5):358-365.

Gil A, Viniegra S, Gutierrez LM. (1999) Dual effects of botulinum neurotoxin A on the secretory stages of chromaffin cells. *Eur J Neurosci.* Nov;10(11):3369-78.

Gillis KD, Mossner R, Neher E. (1996) Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neuron* Jun;16(6):1209-1220.

Govindan B, Bowser R, Novick P. (1995) The role of myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J Cell Biol* Mar;128(6):1055-68.

Grant NJ, Aunis D. (1990) Effects of phorbol esters on cytoskeletal proteins in cultured bovine chromaffin cells: induction of neurofilament phosphorylation and reorganization of actin. *Eur J Cell Biol.* Jun;52(1):36-46.

Gutierrez LM, Hidalgo MJ, Palmero M, Ballesta JJ, Reig JA, Garcia AG, Viniegra S. (1989) Phosphorylation of myosin light chain from adrenomedullary chromaffin cells in culture. *Biochem J.* Dec 1;264(2):589-96.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* Aug;391(2):85-100.

Harada A, Takei Y, Kanai Y, Tanaka Y, Nonaka S, Hirokawa N., (1998) Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J Cell Biol.* Apr 6;141(1):51-9.

Hasson T, Gillespie PG, Garcia JA, MacDonald RB, Zhao Y, Yee AG, Mooseker MS, Corey DP., (1997) Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J Cell Biol.* Jun 16;137(6):1287-1307.

Heinemann C, von Ruden L, Chow RH, Neher E. (1993) A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflugers Arch.* Jul;424(2):105-112.

Heinemann C, Chow RH, Neher E, Zucker RS. (1994) Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca²⁺. *Biophys J.* Dec;67(6):2546-2557.

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

Herrmann C, Wray J, Travers F, Barman T. (1992) Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPases. An example of an uncompetitive inhibitor. *Biochemistry* Dec 8;31(48):12227-12232.

Holst J, Sim AT, Ludowyke RI., (2002) Protein phosphatases 1 and 2A transiently associate with myosin during the peak rate of secretion from mast cells. *Mol Biol Cell.* Mar;13(3):1083-1098.

Huang JD, Brady ST, Richards BW, Stenolen D, Resau JH, Copeland NG, Jenkins NA, (1999) Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. *Nature* Jan 21;397(6716):267-270.

Hubbard, J.I., Jones, S.F. and Landan, E.M. (1968) On the mechanism by which calcium and magnesium affect the release of transmitter by nerve impulses. *J. Physiol.* 196: 75-86.

Huttner WB, Schiebler W, Greengard P, De Camilli P. (1993) Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J. Cell Biol.* May;96(5):1374-1388.

Ichikawa K, Hirano K, Ito M, Tanaka J, Nakano T, Hartshorne DJ. (1996) Interactions and properties of smooth muscle myosin phosphatase. *Biochemistry* May 21;35(20):6313-20.

Iida Y, Senda T, Matsukawa Y, Onoda K, Miyazaki JI, Sakaguchi H, Nimura Y, Hidaka H, Niki I. (1997) Myosin light-chain phosphorylation controls insulin secretion at a proximal step in the secretory cascade. *Am J Physiol.* Oct;273(4 Pt 1):E782-789.

Ikebe M, Hartshorne DJ.(1985) Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.* Aug 25;260(18):10027-10031.

Ikebe M, Hartshorne DJ, Elzinga M. (1986) Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.* Jan 5;261(1):36-39.

Ikonen E, de Almeida JB, Fath KR, Burgess DR, Ashman K, Simons K, Stow JL. (1997) Myosin II is associated with Golgi membranes: identification of p200 as nonmuscle myosin II on Golgi-derived vesicles. *J Cell Sci.* Sep;110 (Pt 18):2155-2164.

Ishihara, H., B. L. Martin, D. L. Brautigan, H. Karaki, H. Ozaki, Y. Kato, N. Fusetani, S. Watabe, K. Hashimoto, D. Uemura, and D. J. Hartshorne. (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 871-877.

Ito M, Feng J, Tsujino S, Inagaki N, Inagaki M, Tanaka J, Ichikawa K, Hartshorne DJ, Nakano T. (1997) Interaction of smooth muscle myosin phosphatase with phospholipids. *Biochemistry* Jun 17;36(24):7607-7614.

Jankowski, J.A., Schroeder, T.J., Ciolkowsky, E.L. and Wightman, R.M. (1993) Temporal characteristics of quantal secretion of catecholamines from adrenal medullary cells. *J. Biol. Chem.* 267: 14694-14700.

Jockusch BM, Burger MM, DaPrada M, Richards JG, Chaponnier C, Gabbiani G. (1977) alpha-Actinin attached to membranes of secretory vesicles. *Nature* Dec 15;270(5638):628-629.

Joh TH, Park DH, Reis DJ. (1978) Direct phosphorylation of brain tyrosine hydroxylase by cyclic AMP-dependent protein kinase: mechanism of enzyme activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct;75(10):4744-4748.

Johns LM, Levitan ES, Shelden EA, Holz RW, Axelrod D. (2001) Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin cells. *J Cell Biol.* Apr 2;153(1):177-190.

Johnson WC Jr, Bivin DB, Ue K, Morales MF. (1991) A search for protein structural changes accompanying the contractile interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 1;88(21):9748-50. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Dec 15;88(24):11588.

Jordan MA, Thrower D and Wilson L (1991) Mechanism of inhibition of cell proliferation by *Vinca* alkaloids. *Cancer Res.* 51: 2212-2222.

Jordan MA and Wilson L (1998) Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol* 10: 123-130.

Kamm KE, Stull JT. (1989) Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Annu Rev Physiol.* 51:299-313.

Kao LS, Schneider AS. (1986) Calcium mobilization and catecholamine secretion in adrenal chromaffin cells. A Quin-2 fluorescence study. *J Biol Chem.* Apr 15;261(11):4881-4888.

Kato M, Sasaki T, Ohya T, Nakanishi H, Nishioka H, Imamura M, Takai Y. (1996) Physical and functional interaction of rabphilin-3A with alpha-actinin. *J Biol Chem.* Dec 13;271(50):31775-31778.

Katsuragawa Y, Yanagisawa M, Inoue A, Masaki T. (1989) Two distinct nonmuscle myosin-heavy-chain mRNAs are differentially expressed in various chicken tissues. Identification of a novel gene family of vertebrate non-sarcomeric myosin heavy chains. *Eur J Biochem.* Oct 1;184(3):611-616.

Katz B, Miledi R. (1965) The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* Feb 16;161:496-503.

Knight DE, Baker PF. (1982) Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. *J Membr Biol.* 68(2):107-40.

Komatsu S, Yano T, Shibata M, Tuft RA, Ikebe M. (2000) Effects of the regulatory light chain phosphorylation of myosin II on mitosis and cytokinesis of mammalian cells. *J Biol Chem.* Nov 3;275(44):34512-34520.

Kostron H, Winkler H, Peer LJ, Konig P. (1977) Uptake of adenosine triphosphate by isolated adrenal chromaffin granules: a carrier-mediated transport. *Neuroscience* 2(1):159-166.

Kotani S, Murofushi H, Maekawa S, Sato C, Sakai H. (1986) Characterization of microtubule-associated proteins isolated from bovine adrenal gland. *Eur J Biochem.* Apr 1;156(1):23-29.

Kumakura K, Sasaki K, Sakurai T, Ohara-Imaizumi M, Misonou H, Nakamura S, Matsuda Y, Nonomura Y. (1994) Essential role of myosin light chain kinase in the mechanism for MgATP-dependent priming of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci.* 1994 Dec;14(12):7695-7703.

Kusumi A, Sako Y. (1996) Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol.* Aug;8(4):566-574.

Kuznetsov SA, Gelfand VI. (1986) Bovine brain kinesin is a microtubule-activated ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov;83(22):8530-8534.

Kuznetsov SA, Langford GM, Weiss DG, (1992) Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. *Nature* Apr 23;356(6371):722-725.

Lang T, Wacker I, Wunderlich I, Rohrbach A, Giese G, Soldati T, Almers W. (2000) Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys J.* 2000 Jun;78(6):2863-2877.

Langford GM, Molyneaux BJ. (1998) Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects. *Brain Res Brain Res Rev.* Nov;28(1-2):1-8.

Lelkes PI, Friedman JE, Rosenheck K, Oplatka A. (1986) Destabilization of actin filaments as a requirement for the secretion of catecholamines from permeabilized chromaffin cells. *FEBS Lett.* Nov 24;208(2):357-363.

Leszczyszyn, D.J., Jankowski, J.A., Viveros, O.H., Diliberto, E.J., Near, J.A. and Wightman, R.M. (1990) Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells: chemical evidence for exocytosis. *J. Biol. Chem.* 265: 14736-14737.

Lindau, M. and Almers, W. (1995) Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 509-517.

Liu X, Udovichenko IP, Brown SD, Steel KP, Williams DS. (1999) Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium. *J Neurosci.* Aug 1;19(15):6267-6274.

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

Lukas TJ, Mirzoeva S, Slomczynska U, Watterson DM. (1999) Identification of novel classes of protein kinase inhibitors using combinatorial peptide chemistry based on functional genomics knowledge. *J Med Chem.* Mar 11;42(5):910-919.

Lye RJ, Porter ME, Scholey JM, McIntosh JR. (1987) Identification of a microtubule-based cytoplasmic motor in the nematode *C. elegans*. *Cell* Oct 23;51(2):309-318.

Llona, I. (1995) "Synaptic like microvesicles: Do they participate in regulated exocytosis?". *Neurochem. Int.* 3: 219-226.

Marcu MG, Zhang L, Elzagallaai A, Trifaro JM. (1998) Localization by segmental deletion analysis and functional characterization of a third actin-binding site in domain 5 of scinderin. *J. Biol. Chem.* Feb 6;273(6):3661-3668.

Meng YX, Wilson GW, Avery MC, Varden CH, Balczon R. (1997) Suppression of the expression of a pancreatic beta-cell form of the kinesin heavy chain by antisense oligonucleotides inhibits insulin secretion from primary cultures of mouse beta-cells. *Endocrinology* May;138(5):1979-1987.

Metcalf AB. (1998) Immunolocalization of myosin Ibeta in the hair cell's hair bundle. *Cell Motil Cytoskeleton.* 39(2):159-165.

Mochida S, Kobayashi H, Matsuda Y, Yuda Y, Muramoto K, Nonomura Y. (1994) Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed between rat sympathetic neurons in culture. *Neuron* Nov;13(5):1131-1142.

Molyneaux BJ, Langford GM. (1997) Characterization of antibodies to the head and tail domains of squid brain myosin V. *Biol Bull.* 1997 Oct;193(2):222-3.

Montague W, Howell SL, Green IC. (1975) Insulin release and the microtubular system of the islets of Langerhans. Identification and characterization of tubulin-like protein. *Biochem J.* May;148(2):237-243.

Montecuccio C, Schiavo G. (1993) Tetanus and botulism neurotoxins: a new group of zinc proteases. *Trends Biochem Sci.* Sep;18(9):324-327.

Montero, M., Alonso, M.T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibáñez, I., Albillos, A., García, A.G., García-Sancho, J. and Álvarez, J. (2000) Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat. Cell Biol.* 2: 57-61.

Morii N, Teru-uchi T, Tominaga T, Kumagai N, Kozaki S, Ushikubi F, Narumiya S. (1992) Effects of the ADP-ribosylation by botulinum C3 ADP-ribosyltransferase on platelet aggregation. *J Biol Chem.* Oct 15;267(29):20921-20926.

Moser T, Neher E. (1997) Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices. *J Neurosci.* Apr 1; 17(7):2314-2323.

Murofushi H, Ikai A, Okuhara K, Kotani S, Aizawa H, Kumakura K, Sakai H. (1988) Purification and characterization of kinesin from bovine adrenal medulla. *J Biol Chem.* Sep 5;263(25):12744-12750.

Musch A, Cohen D, Rodriguez-Boulan E. (1997) Myosin II is involved in the production of constitutive transport vesicles from the TGN. *J Cell Biol.* Jul 28;138(2):291-306.

Nakanishi A, Yoshizumi M, Hamano S, Morita K, Oka M. (1989) Myosin light-chain kinase inhibitor, 1-(5-chloronaphthalene-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine (ML-9), inhibits catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells by inhibiting Ca²⁺ uptake into the cells. *Biochem Pharmacol.* Aug 15;38(16):2615-2619.

Naka M, Saitoh M, Hidaka H. (1988) Two phosphorylated forms of myosin in thrombin-stimulated platelets. *Arch. Biochem. Biophys.* Mar;261(2):235-40.

Nakabayashi H, Sellers JR, Huang KP. (1991) Catalytic fragment of protein kinase C exhibits altered substrate specificity toward smooth muscle myosin light chain. *FEBS Lett.* Dec 2;294(1-2):144-148.

Nakata T, Hirokawa N. (1992) Organization of cortical cytoskeleton of cultured chromaffin cells and involvement in secretion as revealed by quick-freeze, deep-etching, and double-label immunoelectron microscopy. *J Neurosci.* Jun;12(6):2186-2197.

Neher E, Marty A. (1982) Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov;79(21):6712-6716.

Neher E, Zucker RS. (1993) Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* Jan;10(1):21-30.

Nilsson H, Wallin M. (1997) Evidence for several roles of dynein in pigment transport in melanophores. *Cell Motil Cytoskeleton.* 38(4):397-409.

Nishikawa M, Sellers JR, Adelstein RS, Hidaka H. (1984) Protein kinase C modulates in vitro phosphorylation of the smooth muscle heavy meromyosin by myosin light chain kinase. *J Biol Chem.* Jul 25;259(14):8808-8814.

Noda, M., Yasuda-Fukazawa, C., Moriishi, K., Kato, T., Okuda, T., Kurokawa, K., and Takuwa, Y. (1995) Involvement of rho in GTP gamma S-induced

enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS Lett.* 367, 246-250.

Ohara-Imaizumi M, Sakurai T, Nakamura S, Nakanishi S, Matsuda Y, Muramatsu S, Nonomura Y, Kumakura K. (1992) Inhibition of Ca²⁺-dependent catecholamine release by myosin light chain kinase inhibitor, wortmannin, in adrenal chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 30;185(3):1016-1021.

Oheim M, Loerke D, Stühmer W, Chow RH. (1998) The last few milliseconds in the life of a secretory granule. Docking, dynamics and fusion visualized by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *Eur Biophys J.* 27(2):83-98.

Oheim M, Stühmer W. (2000) Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur Biophys J.* 29(2):67-89.

Ornberg, R.L., Furuya, S., Goping, G. and Kuijpers, G.A.J. (1995) Granule swelling in stimulated bovine adrenal chromaffin cells: regulation by internal granule pH. *Cell Tissue Res.* 279: 85-92.

Parsons TD, Coorssen JR, Horstmann H, Almers W. (1995) Docked granules, the exocytotic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron* Nov;15(5):1085-1096.

Paschal BM, Vallee RB. (1987) Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature* Nov 12-18;330(6144):181-183.

Pelto-Huikko, M., Salminen, T. and Hervoén, A. (1985) Localization of enkephalins in adrenaline cells and in nerves innervating adrenaline cells in rat adrenal medulla. *Histochemistry* 82: 377-383.

Perrin D, Aunis D. (1985) Reorganization of alpha-fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature* Jun 13-19;315(6020):589-592.

Pevsner J, Hsu SC, Scheller RH. (1994) n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 15;91(4):1445-1449.

Popov SV, Poo MM. Synaptotagmin: a calcium-sensitive inhibitor of exocytosis?. *Cell* Jul 2;73(7):1247-1249.

Prekeris R, Terrian DM. (1997) Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca^{2+} -dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *J. Cell. Biol.* 137: 1589-1601.

Pruyne DW, Schott DH, Bretscher A. (1998) Tropomyosin-containing actin cables direct the myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast. *J Cell Biol.* Dec 28;143(7):1931-1945.

Qian H, Sheetz MP, Elson EL. (1991) Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys J.* Oct;60(4):910-921.

Raposo G, Cordonnier MN, Tenza D, Menichi B, Durrbach A, Louvard D, Coudrier E. (1999) Association of myosin I alpha with endosomes and lysosomes in mammalian cells. *Mol Biol Cell.* May;10(5):1477-1494.

Reig JA, Viniestra S, Ballesta JJ, Palmero M, Guitierrez LM. (1993) Naphthalenesulfonamide derivatives ML9 and W7 inhibit catecholamine secretion in intact and permeabilized chromaffin cells. *Neurochem Res.* Mar;18(3):317-323.

Rodionov VI, Hope AJ, Svitkina TM, Borisy GG. (1998) Functional coordination of microtubule-based and actin-based motility in melanophores. *Curr Biol.* Jan 29;8(3):165-168.

Rodionov VI, Gyoeva FK, Gelfand VI. (1991) Kinesin is responsible for centrifugal movement of pigment granules in melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 1;88(11):4956-4960.

Rodriguez Del Castillo A, Lemaire S, Tchakarov L, Jeyapragasan M, Doucet JP, Vitale ML, Trifaro JM. (1990) Chromaffin cell scinderin: a novel calcium-dependent actin-filament severing protein. *EMBO J.* Jan;9(1):43-52.

Rogers SL, Gelfand VI. (1998) Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Curr Biol.* Jan 29;8(3):161-164.

Roof DM, Meluh PB, Rose MD. (1992) Kinesin-related proteins required for assembly of the mitotic spindle. *J Cell Biol.* Jul;118(1):95-108.

Rose SD, Lejen T, Casaletti L, Larson RE, Pene TD, Trifaro JM. (2003) Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. *J Neurochem.* Apr;85(2):287-298.

Rowinsky EK (1997) The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu Rev Med.* 48: 353-374.

Rudolf R, Kogel T, Kuznetsov SA, Salm T, Schlicker O, Hellwig A, Hammer JA 3rd, Gerdes HH. (2003) Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells. *J Cell Sci.* Apr 1;116 (Pt 7):1339-1348.

Ryan TA (1999) Inhibitors of myosin light chain kinase block synaptic vesicle pool mobilization during action potential firing. *J Neurosci.* 19, 1317-1323.

Sabatini BL, Regehr WG. (1996) Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. *Nature* Nov 14;384(6605):170-172.

Saitoh M, Ishikawa T, Matsushima S, Naka M, Hidaka H. (1987) Selective inhibition of catalytic activity of smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem.* Jun 5;262(16):7796-7801.

Sarafian T, Aunis D, Bader MF. (1987) Loss of proteins from digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells essential for exocytosis. *J Biol Chem* Dec 5;262(34):16671-16676.

Saxton MJ, Jacobson K. (1997) Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 26:373-399.

Schroeder TJ, Borges R, Finnegan JM, Pihel K, Amatore C, Wightman RM. (1996) Temporally resolved, independent stages of individual exocytotic secretion events. *Biophys J.* Feb;70(2):1061-1068.

Segura F, Brioso MA, Gomez JF, Machado JD, Borges R. (2000) Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis. *J Neurosci Methods* Nov 30;103(2):151-156.

Self T, Sobe T, Copeland NG, Jenkins NA, Avraham KB, Steel KP. (1999) Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells. *Dev Biol.* Oct 15;214(2):331-341.

Sellers JR, Pato MD, Adelstein RS. (1981) Reversible phosphorylation of smooth muscle myosin, heavy meromyosin, and platelet myosin. *J Biol Chem.* Dec 25;256(24):13137-13142.

Sellers JR. (1991) Regulation of cytoplasmic and smooth muscle myosin. *Curr Opin Cell Biol.* Feb;3(1):98-104.

Sheetz MP. (1983) Membrane skeletal dynamics: role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins, and shape. *Semin Hematol.* Jul;20(3):1751-88.

Smith CB, Betz WJ. (1996) Simultaneous independent measurement of endocytosis and exocytosis. *Nature* Apr 11;380(6574):531-534.

Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* Mar 25;362(6418):318-324.

Somlyo AP, Somlyo AV. (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* Nov 17;372(6503):231-6. Review. Erratum in: *Nature* 1994 Dec 22-29; 372(6508): 812.

Stauderman KA, Murawsky MM. (1991) The inositol 1,4,5-trisphosphate-forming agonist histamine activates a ryanodine-sensitive Ca²⁺ release mechanism in bovine adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem.* Oct 15;266(29):19150-19153.

Stauderman KA, Pruss RM. (1990) Different patterns of agonist-stimulated increases of 3H-inositol phosphate isomers and cytosolic Ca²⁺ in bovine adrenal chromaffin cells: comparison of the effects of histamine and angiotensin II. *J Neurochem.* Mar;54(3):946-953.

Sarafian T, Aunis D, Bader MF. (1987) Loss of proteins from digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells essential for exocytosis. *J Biol Chem.* Dec 5;262(34):16671-16676.

Steyer JA, Horstmann H, Almers W. (1997) Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* 388: 474-478.

Steyer JA, Almers W. (1999) Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys J.* Apr;76(4):2262-71.

Sudhof TC, De Camilli P, Niemann H, Jahn R. (1993) Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins. *Cell* Oct 8;75(1):1-4.

Südhof TC. (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645-653.

Suzuki H, Yoshioka K, Maehara T, Guo JZ, Nonomura Y, Otsuka M. (1998) Differential effects of wortmannin on the release of substance P and amino acids from the isolated spinal cord of the neonatal rat. *Br J Pharmacol.* 1998 Dec;125(8):1661-1668.

Sumi M, Kiuchi K, Ishikawa T, Ishii A, Higihara M, Nagatsu T, Hidaka H. (1991) The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 968–975.

Symons M. (1996) Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. *Trends Biochem Sci.* May;21(5):178-181.

Tabb JS, Molyneaux BJ, Cohen DL, Kuznetsov SA, Langford GM. (1998) Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *J Cell Sci.* 111, 3221–3234.

Takahashi M, Kawamoto S, Adelstein RS. (1992) Evidence for inserted sequences in the head region of nonmuscle myosin specific to the nervous system. Cloning of the cDNA encoding the myosin heavy chain-B isoform of vertebrate nonmuscle myosin. *J Biol Chem.* Sep 5;267(25):17864-17871.

Tanaka Y, Kanai Y, Okada Y, Nonaka S, Takeda S, Harada A, Hirokawa N. (1998) Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* 93, 1147–1158.

Tansey MG, Luby-Phelps K, Kamm KE, Stull JT. (1994) Ca²⁺-dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca²⁺ sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 269: 9912-9920.

Terakawa S, Fan JH, Kumakura K, Ohara-Imaizumi M. (1991) Quantitative analysis of exocytosis directly visualized in living chromaffin cells. *Neurosci Lett.* Feb 11;123(1):82-86.

Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hosoya H, Hartshorne DJ, Matsumura F. (1999) Activation of myosin phosphatase targeting subunit by mitosis-specific phosphorylation. *J Cell Biol.* Feb 22;144(4):735-744.

Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hartshorne DJ, Sasaki Y, Matsumura F. (2000) Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* Aug 21;150(4):797-806.

Tuma MC, Zill A, Le Bot N, Vernos I, Gelfand V. (1998) Heterotrimeric kinesin II is the microtubule motor protein responsible for pigment dispersion in *Xenopus melanophores*. *J Cell Biol.* 143, 1547–1558.

Urrutia R, McNiven MA, Albanesi JP, Murphy DB, Kachar B. (1991) Purified kinesin promotes vesicle motility and induces active sliding between microtubules in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 1;88(15):6701-6705.

Vale RD, Reese TS, Sheetz MP. (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* Aug;42(1):39-50.

Varadi A, Ainscow EK, Allan VJ, Rutter GA. (2002) Involvement of conventional kinesin in glucose-stimulated secretory granule movements and exocytosis in clonal pancreatic beta-cells. *J Cell Sci.* Nov 1;115(Pt 21):4177-4189.

Vitale ML, Seward EP, Trifaró JM. (1995) Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* 14, 353–363.

Vitale ML, Rodríguez Del Castillo A, Tchakarov L, Trifaró JM. (1991) Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin. *J. Cell Biol.* 113, 1057–1067.

Vitale ML, Rodríguez Del Castillo A, Trifaró JM. (1992) Protein kinase C activation by phorbol esters induces chromaffin cell cortical filamentous actin disassembly and increases the initial rate of exocytosis in response to nicotinic receptor stimulation. *Neuroscience* Nov;51(2):463-474.

Viveros OH, Diliberto EJ, Hazum E, Chan G. (1979) Opiate-like materials in the adrenal medulla: evidence for storage and secretion with catecholamine. *Mol. Pharmacol.* 16: 1101-1108.

Vulliet PR, Langan TA, Weiner N. (1980) Tyrosine hydroxylase: a substrate of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan;77(1):92-96.

Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ Jr, Viveros OH. (1991) Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1;88(23):10754-10758.

Wilson, S.P., Klein, R.L., Chang, K.J., Gasparis, M.S., Viveros, O.H. and Yang, W.H. (1980) Are opioid peptides cotransmitters in noradrenergic vesicles of sympathetic nerves? *Nature* 288: 707-709.

Wu X, Bowers B, Rao K, Wei Q, Hammer Jr. JA, (1998) Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function in vivo. *J Cell Biol.* 143, 1899–1918.

Yonekawa Y, Harada A, Okada Y, Funakoshi T, Kanai Y, Takei Y, Terada S, Noda T, Hirokawa N. (1998) Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice. *J Cell Biol.* 141, 431–441.

Zhang L, Marcu MG, Nau-Staudt K, Trifaro JM. (1996) Recombinant scinderin enhances exocytosis, an effect blocked by two scinderin-derived actin binding peptides and PIP2. *Neuron* Aug;17(2):287-296.

Zavodny PJ, Petro ME, Kumar CC, Dailey SH, Lonial HK, Narula SK, Leibowitz PJ. (1988) The nucleotide sequence of chicken smooth muscle myosin light chain two. *Nucleic Acids Res.* 16 (3), 1214.

Zhou XF, Livett BG. (1990) Substance P increases catecholamine secretion from perfused rat adrenal glands evoked by prolonged field stimulation. *J Physiol.* Jun;425:321-334.



ANEXOS



ANEXO I

The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion

Patricia ÑECO, Anabel GIL, María DEL MAR FRANCÉS, Salvador VINIEGRA and Luis M. GUTIÉRREZ¹

Instituto de Neurociencias, Centro Mixto CSIC-Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan, 03550 Alicante, Spain

Bovine adrenomedullary cells in culture have been used to study the role of myosin in vesicle transport during exocytosis. Amperometric determination of calcium-dependent catecholamine release from individual digitonin-permeabilized cells treated with 3 μ M wortmannin or 20 mM 2,3-butanedione monoxime (BDM) and stimulated by continuous as well as repetitive calcium pulses showed alteration of slow phases of secretion when compared with control untreated cells. The specificity of these drugs for myosin inhibition was further supported by the use of peptide-18, a potent peptide affecting myosin light-chain kinase activity. These results were supported also by studying the impact of these myosin inhibitors on chromaffin granule mobility using direct visualization by dynamic confocal microscopy. Wortmannin and

BDM affect drastically vesicle transport throughout the cell cytoplasm, including the region beneath the plasma membrane. Immunocytochemical studies demonstrate the presence of myosin types II and V in the cell periphery. The capability of antibodies to myosin II in abrogating the secretory response from populations of digitonin-permeabilized cells compared with the modest effect caused by anti-myosin V suggests that myosin II plays a fundamental role in the active transport of vesicles occurring in the sub-plasmalemmal area during chromaffin cell secretory activity.

Key words: amperometry, bovine adrenomedullary cell, cytoskeleton, exocytosis.

INTRODUCTION

Adrenomedullary chromaffin cells have been widely used as a model to study exocytosis in neuroendocrine systems. In these cells, catecholamines are stored in specialized vesicles called chromaffin granules [1], and released in a calcium-dependent process involving granule translocation from the cytosol, vesicle docking and maturation, and finally the extrusion of granule soluble content by exocytosis [2]. Although much has been learned of the final molecular events involved in docking and membrane fusion since the proposition of the SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor) hypothesis [3,4], the nature of the molecular mechanisms underlying vesicle transport and recruitment is much less understood. In this sense, the cytoskeleton has been shown to play a function in exocytosis in both neurons [5] and neuroendocrine cells [6,7]. More precisely, in chromaffin cells, it has been demonstrated that an F-actin network layer beneath the plasma membrane constitutes a cortical barrier that excludes vesicles from accessing their docking sites [7]. After stimulation, and calcium influx through voltage-dependent channels, a local and transient disruption of this network occurs [8], allowing vesicle access to the immediate sub-plasmalemmal area. In contrast with these studies demonstrating a cytoskeletal role as a passive barrier, there is little evidence for the participation of active-transport systems in neuroendocrine vesicle translocation. During chromaffin cell stimulation, by direct depolarization or physiological agonists, the regulatory subunit of myosin light chain is phosphorylated in a calcium-dependent manner proportional to the magnitude of the stimulus [9–11], and as such constitutes the basic mechanism in changing the interaction of this motor protein with actin in non-muscular systems. In addition, phosphorylation of non-muscle myosins by the specific enzyme myosin light-chain kinase (MLCK) may be essential for

the role of such a protein in secretion, since inhibition of MLCK by a variety of chemicals, such as naphthalenesulphonamides (ML-9) [12,13] and wortmannin [14,15], abrogates MgATP-dependent and -independent catecholamine secretion in biochemical assays performed on populations of permeabilized chromaffin cells.

The present study has been undertaken to evaluate the function of myosin as a motor for vesicle transport in neuroendocrine cells, by using different types of agent to inhibit myosin activity: wortmannin, a potent but relatively unspecific inhibitor of MLCK [16], 2,3-butanedione monoxime (BDM), a chemical inhibiting conventional and unconventional myosin ATPase activity [17], and peptide-18, a high-affinity peptide that selectively blocks MLCK activity [18]. Our results, obtained by combining single-cell amperometrical exocytotic measurements in permeabilized chromaffin cells and the use of confocal immunofluorescence microscopy, demonstrate the involvement of this motor protein in the active transport of chromaffin granules in the immediate sub-plasmalemmal area as an early event needed for the docking and posterior exocytotic release of biogenic amines. Furthermore, the use of different antibodies against myosin forms suggests that type II myosin is especially abundant in the cell periphery and might be involved in such early exocytotic events, as has been suggested for neurons [19].

MATERIALS AND METHODS

Chromaffin cell isolation and culture

Chromaffin cells were prepared from bovine adrenal glands by collagenase digestion, and further separated from debris and erythrocytes by centrifugation on Percoll gradients as described in [20,21]. Cells were maintained in monolayer cultures using Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10 %

Abbreviations used: BDM, 2,3-butanedione monoxime; MLCK, myosin light-chain kinase; PI 3-kinase, phosphoinositide 3-kinase; ROI, region of interest.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail Luisguti@umh.es).

fetal calf serum, 10 μ M cytosine arabinoside, 10 μ M 5-fluoro-2'-deoxyuridine, 50 i.u./ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin. Cells were harvested at a density of 150 000 cells/cm² in 35 mm Petri dishes (Corning, Corning, NY, U.S.A.) and used between the second and fifth days after plating. All experiments were performed at room temperature (21–22 °C).

Amperometric determination of exocytosis from cultured chromaffin cells

To study secretory activity in individual cells, culture medium was replaced by Krebs/Hepes basal solution with the following composition: 134 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, 11 mM glucose, 0.56 mM ascorbic acid and 15 mM Hepes. pH was adjusted to 7.4 using NaOH. Carbon-fibre electrodes insulated with polypropylene and with 11 μ m-diameter tips were employed to monitor the release of the catecholamine content from individual chromaffin granules in cells under superfusion, as described elsewhere [21,22]. Electrodes were positioned in close apposition to the surface of the cells using high-precision hydraulic micromanipulation assessing cell membrane deformation using an Axiovert 135 inverted-stage microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) mounting Hoffman optics (Modulation Optics, Greenvale, NY, U.S.A.). Electrical connection was accomplished with mercury, and an amperometric potential of +650 mV versus an Ag/AgCl bath reference electrode was applied using an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, U.S.A.). Electrochemical current due to catecholamine oxidation was digitized with an A/D converter (ITC-16, Instrutech Corp., Great Neck, NY, U.S.A.) and recorded at 200 μ s/point using the program PulseControl [23] running on top of the graphical software Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, U.S.A.) on a PowerMac 7100 computer. Experiments were performed in cells stimulated by superfusion with a depolarizing high-potassium (59 mM) solution (obtained by iso-osmotically replacing NaCl with KCl), applied through a valve-controlled puffer tip commanded by the acquisition software and deposited near the studied cells. Cell treatment with wortmannin and BDM (both from Sigma, Madrid, Spain) was performed using 3 μ M and 20 mM concentrations, respectively, in basal medium with 15–30 min exposures prior to cell secretion measurements.

Cell permeabilization with digitonin was performed using a 10 μ M concentration superfused during 10 s in Krebs/Hepes basal medium lacking CaCl₂ and in the presence of 0.1 mM EGTA. Calcium-dependent secretion was evoked in permeabilized cells by cell superfusion with the same medium described for permeabilization with the addition of 0.2 mM CaCl₂ (0.1 mM free calcium). Cell incubations with the specific myosin inhibitor peptide-18 [18] were performed by superfusion of the cells for 30 s with 1 μ M peptide-18 after cell permeabilization and prior to challenge by calcium-evoked secretion. For these experiments controls were carried out using the same protocol but in the absence of peptide.

Determination of catecholamine release from populations of detergent-permeabilized chromaffin cells

Secreted [³H]noradrenaline was determined in digitonin-permeabilized cells as described previously [24]. Briefly, cells were incubated with [³H]noradrenaline (1 μ Ci/ml) in Dulbecco's modified Eagle's medium during 4 h. Thereafter, monolayers were washed four times with Krebs/Hepes basal solution (see above). Cell permeabilization was accomplished with 10 μ M digitonin in 20 mM Pipes, pH 6.8, with 140 mM monosodium glutamate, 2 mM MgCl₂, 2 mM MgATP and 5 mM EGTA. This

incubation was carried out in the absence or presence of the different immunoglobulins. Following permeabilization, media were discarded and cells were incubated for an additional 10 min in digitonin-free medium in the presence or absence of the different antibodies or compounds assayed. Basal secretion was measured in 5 mM EGTA, whereas stimulated secretion was measured in medium containing 10 μ M buffered Ca²⁺ solution. Media were collected and released catecholamines as well as the total cell content were determined by liquid scintillation counting.

Confocal microscopy studies of the cellular distribution of F-actin, and myosins II and V

Analysis of the distribution of the cytoskeletal barrier of F-actin was performed using rhodamine coupled with phalloidin as described previously [25]. Cells were fixed and permeabilized using a modification [26] of the method described by Lazarides [27]. Briefly, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min. Then cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in 3.6% formaldehyde for 10 min. After washing with PBS, lipids were extracted using a series of incubations at 4 °C; 50% acetone in water for 3 min, 100% acetone for 5 min and finally 50% acetone for 3 min. After extensive rinsing with PBS, cells were incubated for 15 min with a solution of 0.5 μ g/ml rhodamine-phalloidin in PBS. After a 30 min wash the samples were mounted using a 80% glycerol solution in PBS.

Labelling of myosin II and V in permeabilized and delipidated cells was performed overnight by incubating with a mouse monoclonal antiserum to non-muscular myosin II (1:200 dilution; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA, U.S.A.) or polyclonal antibodies against squid myosin V [28] in 3% BSA/PBS medium. After extensive washes, secondary goat anti-mouse or anti-rabbit antibodies coupled to FITC (Amersham, Little Chalfont, Bucks, U.K.) were incubated for 2 h, followed by three washes, and finally mounted as indicated above.

Fluorescence was investigated using a laser scanning confocal TCS Leica microscope. Usually eight confocal layers covering the total cell volume were obtained (1.25 μ m thickness, *z* axis) and individual layers or projections were used to study fluorescence distribution as described elsewhere [25].

Dynamic confocal microscopic studies of chromaffin granule mobility

Cells were loaded with 4 μ M quinacrine in culture medium for 10 min. After that, fluorescence emission by quinacrine trapped in the acidic vesicles was investigated using an Olympus Fluoview FV300 confocal laser system mounted in a BX-50 WI up-right microscope incorporating a 100 \times LUMPlan FI water-immersion objective. This system allows for *z* axis reconstruction (0.1 μ m spatial resolution, 0.5 μ m *z* slice) and time-lapse dynamic studies with time resolutions ranging from 0.1 s for acquisition of images of 200 pixels \times 150 pixels (adequate for studying regions of a cell) to about 0.6 s for images of 400 pixels \times 300 pixels (for visualization of the entire cell). Analysis of frames was performed using the public-domain program ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) with plugins for region-of-interest (ROI) measurement, image averaging and comparison.

The Student's *t* test for unpaired samples or two-way ANOVA was used to establish statistical significance among experimental data. Samples were considered significantly different when $P < 0.05$. All data were expressed as means \pm S.E.M. from experiments performed in a number (*n*) of individual cells or wells. The data presented represent experiments performed with cells from at least three different cultures.

RESULTS

Different inhibitors of myosin activity affect catecholamine secretion from individual permeabilized chromaffin cells

To study the possible role of myosin in modulating the secretory components of chromaffin cells, we decided to use two different inhibitors of myosin function: wortmannin, which has been used extensively as a potent inhibitor of MLCK [16], an enzyme that induces Ca^{2+} -dependent phosphorylation of myosin during catecholamine release [9–11], and BDM, a chemical inhibiting myosin ATPase activity [17]. Concentrations of $3\ \mu\text{M}$ wortmannin and $20\ \text{mM}$ BDM, with incubations of 30 and 15 min, respectively, affect the vesicular release of individual cells permeabilized with $10\ \mu\text{M}$ digitonin and stimulated by superfusion with a solution containing $100\ \mu\text{M}$ free calcium, as can be observed in the amperometric examples of Figure 1. Both agents decrease the number of vesicles fusing 5 s and more after cell depolarization, whereas the initial secretory burst remains relatively unaffected. These observations were confirmed by the integration and averaging of experiments conducted on numerous cells (15–56) in each experimental condition (Figure 1B). The characteristics of these cumulative curves representing single-cell secretory kinetics were clearly affected by these chemicals. Both wortmannin and BDM altered catecholamine release kinetics in early periods after stimulation, and produced inhibitions ranging from 55 to 70% of the maximal response obtained in non-treated cells.

We have used these agents at concentrations similar to those employed in other cell systems [29–31], and which are thought to be relatively specific. Nevertheless, low concentrations of wort-

mannin have been shown to also inhibit the activity of phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) [16,31]. Peptide-18, a very potent (IC_{50} , 50 nM) and selective inhibitor of MLCK (it affects calmodulin kinase II at a 4000-fold higher concentration) has been described recently [18]. We incubated superfused permeabilized cells for short periods (30 s) with $1\ \mu\text{M}$ peptide-18 before stimulation with $100\ \mu\text{M}$ free calcium. In Figure 1 it can be observed that this peptide was able to inhibit the initial rate and extent of catecholamine secretion in a fashion similar to that of wortmannin, giving support to the notion of relative specificity for wortmannin and BDM when inhibiting secretion via myosin function.

These observations were further supported by experiments performed on permeabilized cells treated with these chemicals and repetitively stimulated with brief 10 s exposures to $100\ \mu\text{M}$ free calcium. The initial pulse was inhibited by 20% with wortmannin and 38% in cells treated with BDM. The degree of inhibition was further enhanced in the subsequent pulses, as can be observed from the examples and average integral values shown in Figure 2, indicating that these chemicals affecting myosin function preferentially block slow phases of secretion and as a consequence affect vesicle recruitment from reserve pools [25].

Dynamic confocal microscopy demonstrates the impact of myosin inhibitors on vesicle mobility

To understand the possible causes of the different effects of myosin inhibitors on the secretory behaviour of chromaffin cells, we decided to study the mobility of chromaffin granules using

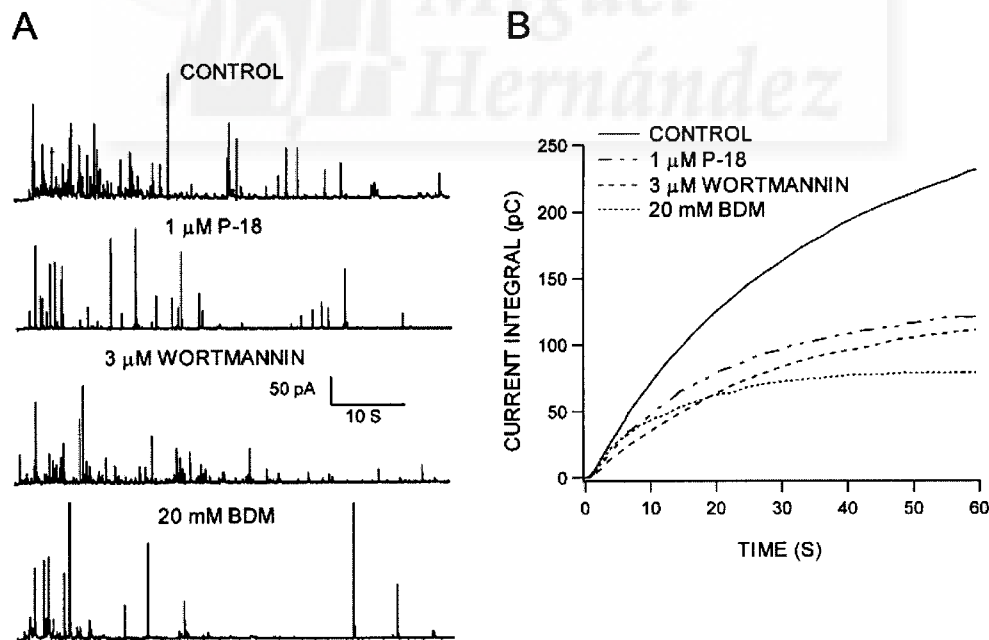


Figure 1 Secretory kinetics of individual permeabilized cells treated with myosin-activity inhibitors

In these experiments, after treatment with $3\ \mu\text{M}$ wortmannin and $20\ \text{mM}$ BDM for 30 and 15 min, respectively, secretion was elicited by cell permeabilization using a 10 s pulse of $10\ \mu\text{M}$ digitonin followed by cell perfusion with Krebs/Hepes basal medium containing $100\ \mu\text{M}$ free calcium. Peptide 18 (P-18) was superfused at $1\ \mu\text{M}$ for 30 s in the absence of calcium prior to eliciting catecholamine release. Secretion was monitored by amperometry using $11\ \mu\text{m}$ -diameter carbon-fibre electrodes in close apposition with the cell surface. (A) Amperometric current traces representative of experiments performed under various conditions. Traces were obtained from permeabilized control non-treated cells and wortmannin-, BDM- and peptide-18-treated cells stimulated by superfusion for 60 s with $100\ \mu\text{M}$ free calcium medium. (B) Cumulative integrals representing averaged secretory behaviour. Conditions were as described for (A); after individual response integration the average curve was obtained for control ($n = 56$) and $3\ \mu\text{M}$ wortmannin ($n = 37$), $20\ \text{mM}$ BDM ($n = 15$) and $1\ \mu\text{M}$ peptide-18 ($n = 16$)-treated cells. Current integral values (pC; means \pm S.E.M.) at 1 min were 235 ± 22 (control), 111 ± 12 (wortmannin), 78 ± 12 (BDM) and 121 ± 14 (peptide-18).

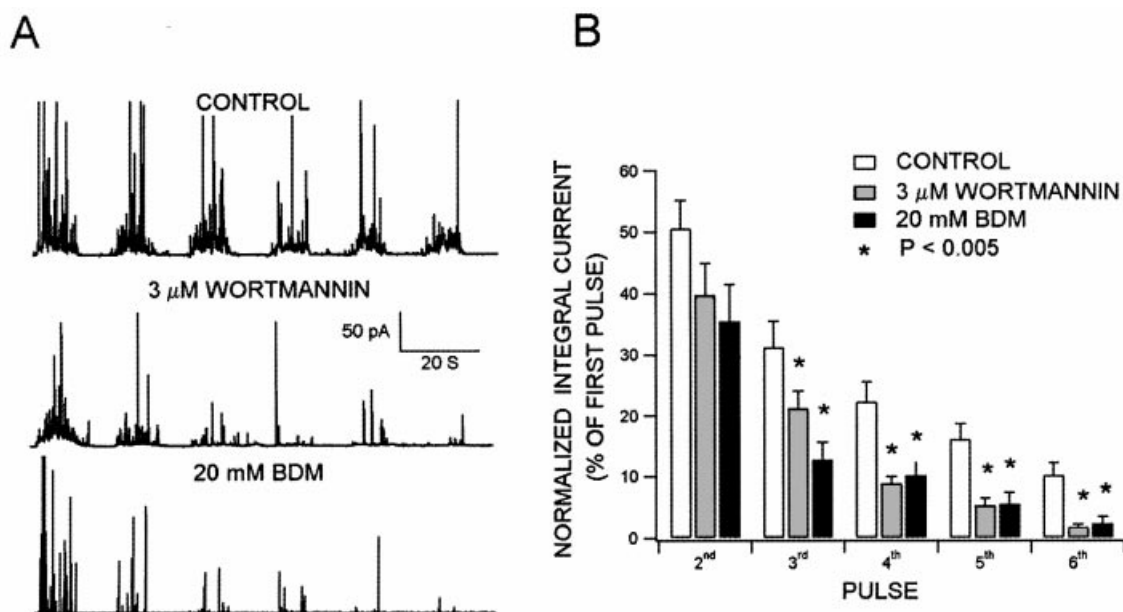


Figure 2 Wortmannin and BDM affect granule recruitment by repetitive stimulation

The capability of permeabilized cells to recruit fast or slow secretory 'pools' was studied by using six successive stimulations with $100 \mu\text{M}$ free calcium for 10 s. (A) Typical traces obtained from permeabilized control, $3 \mu\text{M}$ wortmannin- and 20 mM BDM-treated cells. (B) Rate of vesicle recruitment. The cumulative integrals were averaged for individual pulses in each experimental condition assayed and represented as a percentage of the initial pulse. Data are means \pm S.E.M. from experiments performed in 38 (control non-treated), 21 (wortmannin) and 21 (BDM) cells.

laser confocal microscopy. Our aim was not to study granule trajectory throughout the cell cytoplasm [32], rather our objective was to detect clear changes in vesicle mobility after cell treatment with the conditions used in our secretory experiments and to localize the cellular zones affected by such changes in chromaffin granule motility. Chromaffin granules were labelled with $4 \mu\text{M}$ quinacrine for 10 min at 37°C before acquiring confocal images of vesicles in the equatorial cytoplasmic sections of about 500 nm ($4 \mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m}$ area acquired at 10 images/s). Figure 3(A) depicts images of granules in control non-treated cells using this technique (see also compressed images in video 1, accelerated by six times; see <http://www.BiochemJ.org/bj/368/bj3680405.htm>). Granule movement was very noticeable, with vesicles maintaining their position in the confocal plane for no more than 2–5 s. As a consequence of this, the confocal images changed drastically over a sequence of six frames, separated by 10 s intervals (Figure 3A). This high degree of vesicle movement can also be seen in the averaged image of 60 frames taken over 1 min in which a blurry and dense representation of the multiple positions adopted by mobile granules can be observed (Figure 3B).

A further study using quinacrine fluorescence in a ROI covering the movements of 1–2 vesicles was carried out. The variation in fluorescence indicated that the granules were entering and leaving the studied ROI at intervals of 2–4 s (Figure 3E, control). These observations were made in more than 30 cells from different cultures for periods ranging from a few minutes to more than 2 h, at room temperature. These results from resting non-stimulating conditions were similar to those found in several cells exposed to a 59 mM KCl depolarizing solution, indicating that differences in vesicle motility under both sets of conditions were undetectable using this methodology. Therefore, further experiments were performed in basal medium. Our first experiments analysing the participation myosin motors for vesicle transport

were performed using $3 \mu\text{M}$ wortmannin for 15 min before acquiring confocal images of the granules labelled with quinacrine. Cell treatment clearly resulted in a dramatic change in vesicle motion; confocal imaging showed that there was a marked restriction in granule movement which seemed to affect the majority of vesicles 15–20 min after initiation of the observations (see the six-times accelerated compressed images in video 2; see <http://www.BiochemJ.org/bj/368/bj3680405.htm>). Figure 3(C) shows a typical cytoplasmic area under these conditions; there is no noticeable change in images taken at 10 s intervals, and the averaged image of 60 confocal frames taken over 1 min is well defined and shows the position maintained by each granule during the period of observation (Figure 3D). Measurements of fluorescence intensity in ROIs containing two or three granules also indicated a marked stability, as can be seen in Figure 3(E). These results also show that there was little bleaching of the fluorescent dye at the laser intensities used. Similar results were obtained in more than 15 cells pretreated for 15 min with either $3 \mu\text{M}$ wortmannin or 20 mM BDM. These observations suggest the involvement of myosin motors in the motility of vesicles throughout the chromaffin cell cytoplasm and are consistent with studies of the immediate plasma-membrane area using total reflection microscopy [33,34].

Cortical granules are immobilized by myosin inhibitors

Although vesicle motility in the interior of the cytosol might be essential for the supply of granules to peripheral areas and therefore for the capacity of chromaffin cells to sustain the secretory response for prolonged periods of continuous or episodic stimulation, the study of granule movement in the cortical sub-plasmalemmal area is fundamental to the understanding of the effects of myosin-affecting drugs on catecholamine secretion. Confocal microscopy of this cellular area was used to

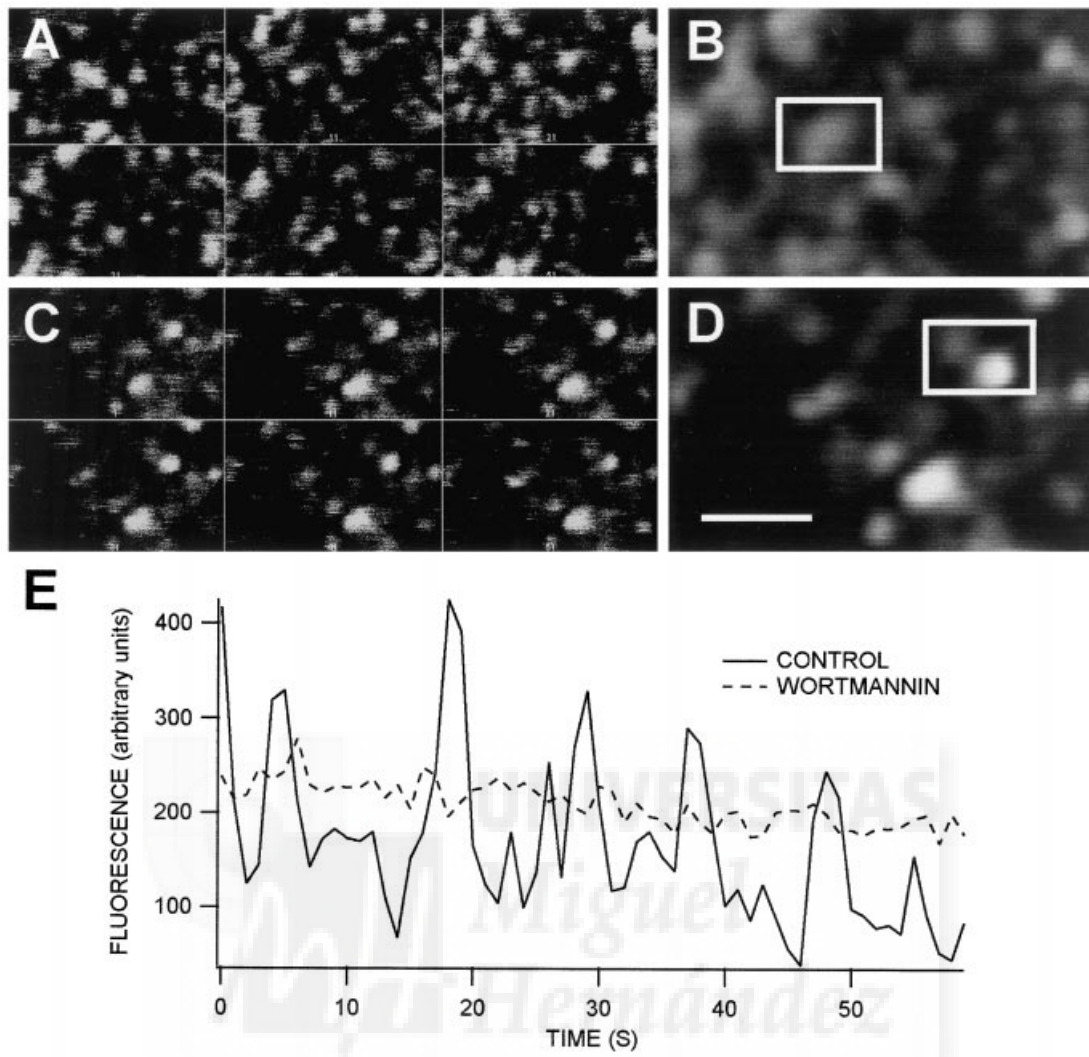


Figure 3 Vesicle mobility observed by dynamic confocal microscopy in control untreated and chromaffin cells treated with wortmannin

Chromaffin cells were incubated with 4 μM quinacrine for 10 min and granules visualized by dynamic confocal microscopy as indicated in the Materials and methods section. (A) Time series of confocal images taken at 10 s intervals from cytosolic vesicles in control non-treated cells. (B) Averaged image from 60 frames taken at 1 s intervals of granules in the control cell depicted in (A). (C) Frames obtained as in (A) from a cell treated with 3 μM wortmannin for 15 min. (D) Averaged image of vesicles in a wortmannin-treated cell. (E) Fluorescence changes of ROI selected in a control cell (indicated by a box in B) and a wortmannin-treated cell (indicated by a box in D). Scale bar, 1 μm .

visualize the upper portion of the cell and z axis objective movement was controlled with a precision of 0.1 μm intervals until the first image of the cell showing the most peripheral granules appeared. Chromaffin granules corresponding to control non-treated cells were then recorded at different time intervals in 17 cells from several cultures. It was observed that most of the brilliant granules (the most external and therefore immersed in the confocal plane) remained relatively immobile, suggesting a restriction of mobility by vesicle docking, whereas during the 1 min period studied other granules approached and left the confocal plane, indicating their elevated motility in the cortical zone. Most of these vesicles appeared to be moving in the direction of the z axis. A simple yet clear way to observe this behaviour is to compare the first frame of an image sequence (Figure 4A) with the averaged image of the entire period (Figure 4B), since relatively static granules are seen as brilliant and well-defined images, in contrast with the lower-intensity and blurry fluorescence characteristic of moving granules, occasional

'visitors' to the confocal plane. Upon treatment with wortmannin under the conditions described above, images of the cortical zone were remarkably static, as can be observed in the initial frame and averaged image in Figures 4(C) and 4(D). Similar images taken in 13 cells demonstrate that wortmannin treatment results in the immobilization of cortical vesicles. These results could be extended to BDM ($n = 11$), which clearly affected the movement of cortical vesicles, as seen in Figures 4(E) and 4(F).

Myosin II and V are present in the sub-plasmalemmal area of bovine chromaffin cells

What subtype of myosin could be involved in such vesicle transport? Conventional myosin II and unconventional type V have been localized in presynaptic terminals [35], and we used antibodies against these subtypes to test for their presence in fixed and permeabilized chromaffin cells. Observation under the confocal microscope revealed the specific labelling of these types

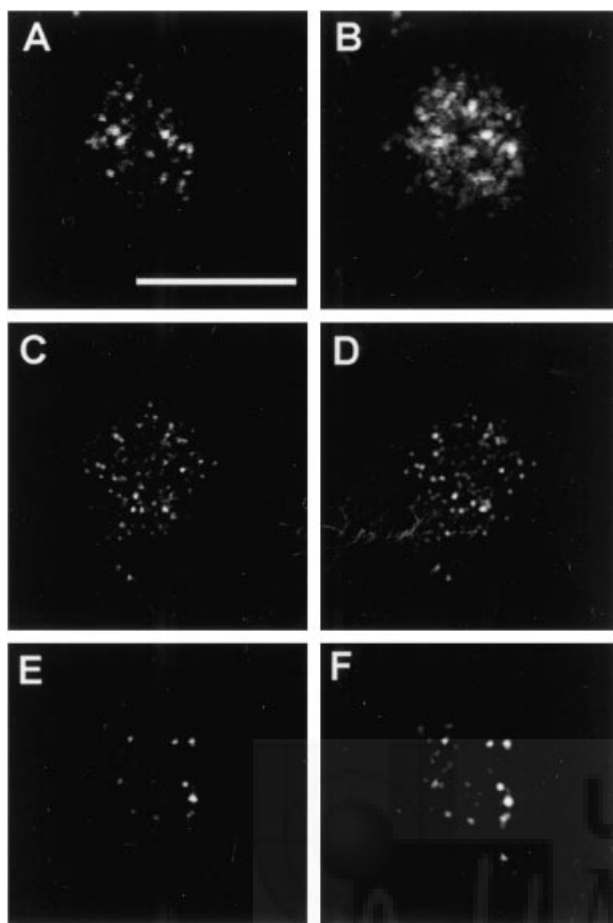


Figure 4 Mobility of cortical vesicles is affected by wortmannin and BDM

Initial frames (**A**, **C** and **E**) and average images (**B**, **D** and **F**) from time series of confocal images visualizing cortical vesicles obtained from control non-treated (**A** and **B**), 3 μ M wortmannin- (15 min incubation; **C** and **D**) and BDM-treated cells (15 min incubation; **D** and **E**). Blurred average images indicated high mobility, whereas those that are well defined indicate reduced mobility. Scale bar, 10 μ m.

of myosin in these neuroendocrine cells. Both forms are characterized by a punctate pattern that co-localized with F-actin filaments labelled with rhodamine-phalloidin, as observed in Figure 5. A close inspection of equatorial confocal images revealed marked differences in the distribution of these myosin classes. Myosin II was abundant in the cell periphery, where it associated clearly with the sub-plasmalemmal F-actin barrier (Figure 5A). In contrast, myosin V was concentrated in cytosolic areas, often present in a region surrounding one side of the nuclear membrane (Figure 5C), and was especially abundant in a diffuse F-actin network extending from deep zones of the cytosol to the vicinity of the peripheral F-actin barrier. Observation of the upper confocal layers corresponding to the cell periphery showed that even though myosin II is preferentially present in the sub-plasmalemmal F-actin lattice (Figure 5B), myosin V is also present (Figure 5D) in variable amounts, depending on the cell observed. Consequently, we cannot discard the possibility that both myosin types II and V could co-operate to transport vesicles in the area where the vesicles accumulate after the abrogation of secretion by myosin inhibitors.

Antibodies to myosin II and V affect secretion from permeabilized cells

To understand the possible role of these two types of myosin in sustaining the secretory response in chromaffin cells, we used the antibodies described above to test their ability in abrogating the Ca^{2+} -dependent secretory response from populations of cultured chromaffin cells, as described in previous studies [24]. The antibodies were present at a 1:200 dilution (1–2 μ g/ml) in both the permeabilization buffer (incubation for 10 min) and the stimulating media in the presence or absence of 10 μ M free Ca^{2+} (stimulated and basal media, respectively). Interestingly, both antibodies showed very different capabilities in inhibiting net secretion (stimulated minus basal secretion; see Figure 6), since antibodies to myosin V were inefficient at modifying the secretory response, causing only a very modest inhibition (20% inhibition compared with the control). This effect is not statistically significant when compared with net secretion obtained in the absence of antibody treatment or in the presence of pre-immune immunoglobulins. Instead, cells treated with immunoglobulins against myosin II were clearly affected in their Ca^{2+} -dependent secretory response, since net secretion was inhibited by 64% when compared with controls. This effect was very similar to that produced by the incubation of the cells with 20 mM BDM (Figure 6); although these values were both very different from control secretion in non-treated cells, they were not statistically different from each other. Taken together, these results indicated very different roles for both types of myosin in supporting catecholamine secretion, suggesting a preferential role for myosin II in governing the movement of vesicles in the proximity of the plasma membrane, where this form is especially abundant.

DISCUSSION

This study has been designed to evaluate the relevance of myosin activity in controlling the transport of vesicles from reserve pools needed to sustain the secretory response during prolonged or repetitive cell stimulation in bovine chromaffin cells [25]. Previous biochemical studies have demonstrated the regulation of myosin function by calcium-dependent phosphorylation of myosin light chain in parallel with secretion [9–11]. MLCK regulation by Ca^{2+} /calmodulin may play a central role in linking intracellular calcium elevation with both vesicle fusion and mobilization. Use of a variety of chemicals, such as naphthalenesulphonamides [12,13] and wortmannin [14,15], has implicated MLCK in the chromaffin cell secretory process. Our present work provides new insights into the function of myosin in secretion. We demonstrate its effect on slow secretory components, using high-resolution kinetic studies in permeabilized individual cells through the use of wortmannin, BDM and peptide-18, the latter possibly being the most specific inhibitor of MLCK activity yet synthesized [18]. Since wortmannin has been proven to affect PI 3-kinase activity, which could influence catecholamine secretion [36], the use of BDM and peptide-18 has been relevant in implicating myosin in the secretory process in chromaffin cells. In addition, we have observed that 100 nM wortmannin, which may inhibit PI 3-kinase activity, influenced neither secretion in permeabilized cells nor granule mobility in our measurements.

Our functional data show the preferential inhibition of retarded phases of secretion when continuous stimulation or multiple pulses were used to deplete mature granules. These results strengthen the notion of a fundamental role for myosin in the cargo of vesicles from reserve pools in neuroendocrine models, in agreement with results obtained in neurons [37].

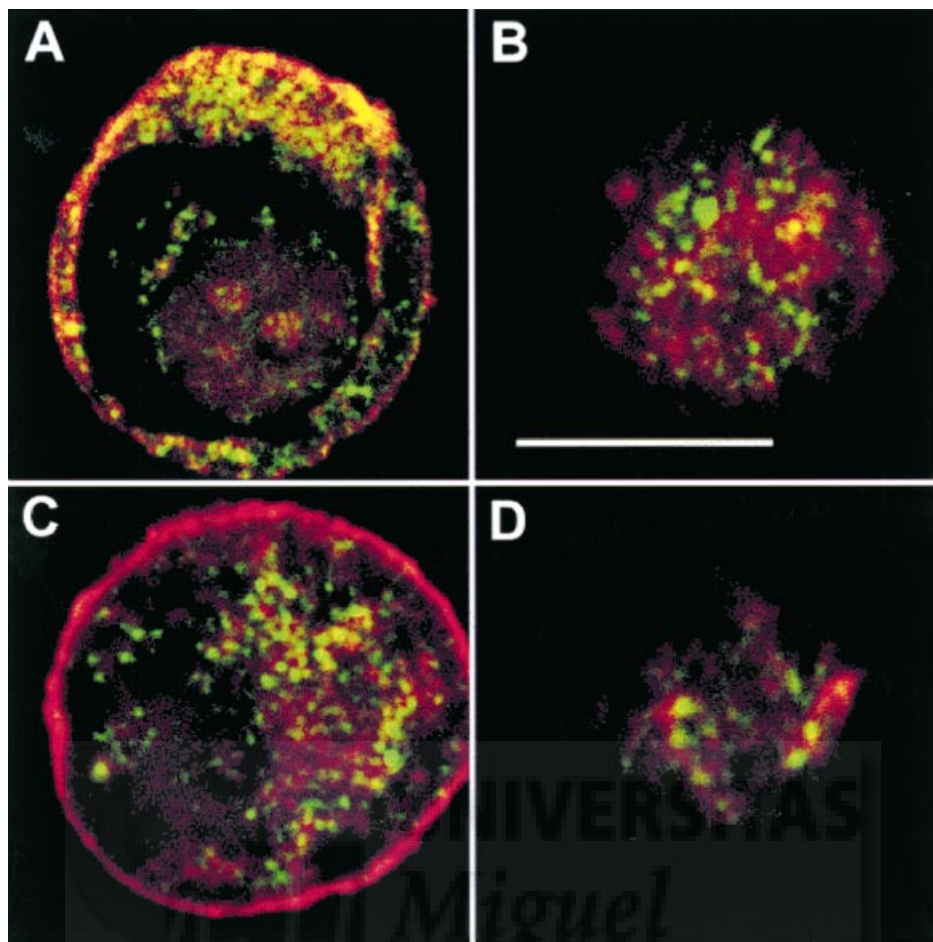


Figure 5 Distribution of myosin types II and V in bovine chromaffin cells

Fixed and permeabilized cells were incubated with antibodies against cardiac myosin II (**A** and **B**) and squid brain myosin V (**C** and **D**) at 1:200 dilutions. After incubation and washing of secondary antibodies labelled with FITC, the F-actin cytoskeleton was visualized using rhodamine coupled with phalloidin. Fluorescence distribution in equatorial sections (**A** and **C**) and upper layers was investigated using confocal microscopy. Scale bar, 10 μm .

In recent years a number of studies using total internal reflection microscopy have provided us with a detailed description of granule motion in the proximity of the plasma membrane [33,34,38,39]. These groups used either weak bases that accumulate in the interior of acidic vesicles (such as Acridine Orange or quinacrine, used here) or green fluorescent protein constructs with vesicular proteins to reach similar conclusions regarding the restriction of vesicle movement linked to vesicle tethering or docking. Here the use of confocal microscopy provides a global vision of this aspect of vesicle mobility throughout the cytoplasm, from deep regions where granules are being synthesized to peripheral areas where they accumulate to constitute reserve pools for sustaining secretion. The vast majority of particles labelled were spherical, with diameters varying from 150 to 400 nm (about 300 nm on average, in agreement with granule size), and in the control, non-treated cells rarely stayed within the confocal plane (estimated in 500 nm) for more than a few seconds (ROI analysis of individual granules showed average periods of 3–4 s). This dynamic behaviour changed upon treatment of the cells with myosin inhibitors, which drastically reduce vesicle motility, causing the majority of granules to remain in the confocal plane throughout the period of study (in the order of minutes). This reduction in granule

motility throughout the whole cytoplasm suggests that myosin-dependent transport systems play a role in catecholamine secretion and would explain the marked effect of these agents in the functional amperometrical studies presented here. This analysis is in agreement with studies of the sub-plasmalemmal region using total internal reflection microscopy [33,34].

What might be the myosin class involved in such a function? Previous studies have shown labelling of abundant myosin beneath the plasma membrane of chromaffin cells [11,15], which has been recognized here as type II conventional myosin associated with the F-actin network. In addition, specific labelling of chromaffin cells with an antibody against myosin V from squid brain cytosol [28] shows that this subtype is present and abundant in deeper areas of the cytosol; the situation is similar in neurons, where both myosin II and myosin V have been localized in the synaptic terminals [19,35]. Clearly, distribution and labelling aspects suggest the involvement of myosin V in transport of vesicles or other organelles from the limits of the endoplasmic reticulum to the cell periphery (see Figure 5C), and the co-operation of both types of myosin in accomplishing vesicle transport through the exocytic pathway could not be ruled out. Nevertheless, the preferential abrogation of Ca^{2+} -dependent catecholamine release in permeabilized cells using

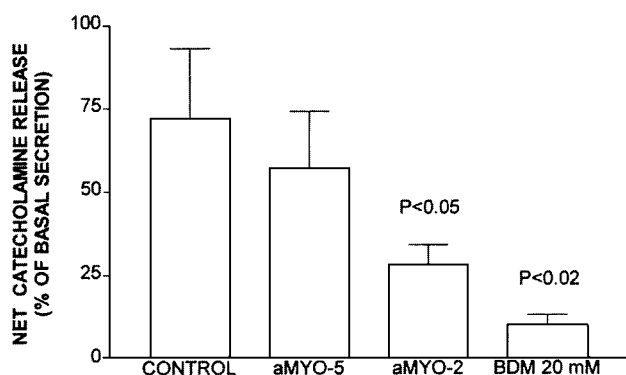


Figure 6 Anti-myosin II antibodies affect the release of catecholamines from populations of digitonin-permeabilized chromaffin cells

Cultured chromaffin cells (200 000 cells/1 cm-diameter well) were first incubated for 3 h with [3 H]noradrenaline and then washed extensively as described in the Materials and methods section. Cells were permeabilized with 10 μ M digitonin for 10 min in the presence or absence of 1:200 dilutions of antibodies against myosin II (aMYO-2) and V (aMYO-5). Secretion was then elicited for 10 min in a medium lacking or containing 10 μ M free Ca^{2+} , again in the presence or absence of the antibodies assayed. In addition, some wells were treated with 20 mM BDM for 15 min prior to cell permeabilization. Net catecholamine secretion was calculated as the difference between the presence and absence of Ca^{2+} for every experimental condition. Secretion is expressed as a percentage of catecholamine released in the absence of added calcium in non-treated cells (basal secretion). Incubation with pre-immune antibodies did not affect the control response. *P* values were calculated using the Student's *t* test for paired samples (12 wells for experimental condition).

antibodies against myosin II and the relatively minor effects displayed by anti-myosin V suggest the pivotal role of the type II form in participating in or controlling some of the molecular events taking place during exocytosis of catecholamines in neuroendocrine chromaffin cells. Further research using molecular tools designed to interfere specifically with myosin classes is clearly needed to establish the precise nature of myosin molecules involved in different stages of vesicle transport and exocytosis in this neuroendocrine cellular model.

We thank S. Ingham for artwork and style corrections. The kind supply of Igor-based programs to perform single-event analysis by Dr Ricardo Borges and Dr Fernando Segura (Universidad de la Laguna, Tenerife, Spain) is greatly acknowledged. Peptide-18 was a kind gift of Dr Alvaro Villarreal (Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain). This work was supported by grants from the Spanish Direcci3n General de Investigaci3n Científica y Técnica to S.V. (PM98-0101) and Direcci3n General de Enseñanzas Universitarias e Investigaci3n de la Generalitat Valenciana to L.M.G. (GV01-6). P.Ñ. and A.G. are recipients of Generalitat Valenciana and GlaxoWellcome-CSIC fellowships, respectively.

REFERENCES

- Johnson, R. G. (1988) Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol. Rev.* **68**, 232–306
- Viveros, O. H. (1974) Mechanism of secretion of catecholamines from the adrenal medulla. In *Handbook of Endocrinology* (Blasko, H., Sayers, G. and Smith, A. D., eds.), pp. 389–426. American Physiology Society, Baltimore, MD
- Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J. E. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature (London)* **362**, 318–324
- Südhof, T. C. (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature (London)* **375**, 645–653
- Llinas, R., McGuinness, T. L., Leonard, C. S., Sugimori, M. and Greengard, P. (1985) Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 3035–3039
- Trifaró, J.-M., Kenigsberg, R. L., Coté, A., Lee, R. W. and Hikita, T. (1984) Adrenal paraneurone contractile proteins and stimulus-secretion coupling. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **62**, 493–501

- Perrin, D. and Aunis, D. (1985) Reorganization of fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature (London)* **315**, 589–591
- Cheek, T. R. and Burgoyne, R. D. (1986) Nicotin-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.* **207**, 110–114
- Coté, A., Doucet, J.-P. and Trifaró, J.-M. (1986) Phosphorylation and dephosphorylation of chromaffin cell proteins in response to stimulation. *Neuroscience* **19**, 629–645
- Gutiérrez, L. M., Ballesta, J. J., Hidalgo, M. J., Gandia, L., Garcia, A. G. and Reig, J. A. (1988) A two-dimensional electrophoresis study of phosphorylation and dephosphorylation of Chromaffin cell proteins in response to a secretory stimulus. *J. Neurochem.* **51**, 1023–1030
- Gutiérrez, L. M., Hidalgo, M.-J., Palmero, M., Ballesta, J. J., Reig, J. A., Garcia, A. G. and Viniegra, S. (1989) Phosphorylation of myosin light chain from adrenomedullary chromaffin cells in culture. *Biochem. J.* **264**, 589–596
- Nakanishi, A., Yoshizumi, M., Hamano, S., Morita, K. and Oka, M. (1989) Myosin light-chain kinase inhibitor, 1-(5-chloronaphthalene-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine (ML-9), inhibits catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells by inhibiting Ca^{2+} uptake into the cells. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 2615–2619
- Reig, J. A., Viniegra, S., Ballesta, J. J., Palmero, M. and Gutiérrez, L. M. (1993) Naphthalene-sulfonamide derivatives ML-9 and W7 inhibit catecholamine secretion on intact and permeabilized chromaffin cells. *Neurochem. Res.* **18**, 317–323
- Ohara-Imaizumi, M., Sakurai, T., Nakamura, S., Nakanishi, S., Matsuda, Y., Muramatsu, S., Nomura, Y. and Kumakura, K. (1992) Inhibition of Ca^{2+} -dependent catecholamine release by myosin light chain kinase inhibitor, wortmannin, in adrenal chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 1016–1021
- Kumakura, K., Sasaki, K., Sakurai, T., Ohara-Imaizumi, M., Misonou, H., Nakamura, S., Matsuda, Y. and Nonomura, Y. (1994) Essential role of myosin light chain kinase in the mechanism for MgATP-dependent priming of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.* **14**, 7695–7703
- Nakanishi, S., Kakita, S., Takahashi, I., Kawahara, K., Tsukuda, E., Sano, T., Yamada, K., Yoshida, M., Kase, H., Matsuda, Y. et al. (1992) Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 2157–2163
- Herrmann, C., Wray, J., Travers, F. and Barman, T. (1992) Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPases. An example of an uncompetitive inhibitor. *Biochemistry* **31**, 12227–12232
- Lukas, T. J., Mirzoeva, S., Slomczynska, U. and Watterson, D. M. (1999) Identification of novel classes of protein kinase inhibitors using combinatorial peptide chemistry based on functional genomics knowledge. *J. Med. Chem.* **42**, 910–919
- Mochida, S., Kobayashi, H., Matsuda, Y., Yuda, Y., Muramoto, K. and Nonomura, Y. (1994) Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed between rat sympathetic neurons in culture. *Neuron* **13**, 1131–1142
- Almazan, G., Aunis, D., Garcia, A. G., Montiel, C., Nicolas, G. P. and Sanchez-Garcia, P. (1984) Effect of collagenase on the release of [3 H]-noradrenaline from bovine cultured adrenal chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.* **81**, 599–610
- Gil, A., Viniegra, S. and Gutiérrez, L. M. (1998) Dual effects of botulinum neurotoxin A on the secretory stages of chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 3369–3378
- Criado, M., Gil, A., Viniegra, S. and Gutiérrez, L. M. (1999) A single amino acid near the C terminus of the synaptosome-associated protein 25 is essential for exocytosis in chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7256–7261
- Herrington, J. and Bookman, R. J. (1994) Pulse Control V4.3: IGOR XOPs for patch clamp data acquisition and capacitance measurements, University of Miami Press, Miami, FL
- Gutiérrez, L. M., Canavés, J. M., Ferrer-Montiel, A.-V., Reig, J. A., Montal, M. and Viniegra, S. (1995) A peptide that mimics the carboxy-terminal domain of SNAP-25 blocks Ca -dependent exocytosis in chromaffin cells. *FEBS Lett.* **372**, 39–43
- Gil, A., Rueda, J., Viniegra, S. and Gutiérrez, L. M. (2000) The cytoskeleton modulates slow secretory components rather than readily releasable vesicle pools in bovine chromaffin cells. *Neuroscience* **98**, 605–614
- Aunis, D., Guerold, B., Bader, M.-F. and Ciesielski-Treska, J. (1980) Immunochemical and biochemical demonstration of contractile proteins in chromaffin cells in culture. *Neuroscience* **5**, 2261–2277
- Lazarides, E. (1976) Actin, α -actinin and tropomyosin interaction in the structural organization of actin filaments in nonmuscle cells. *J. Cell. Biol.* **68**, 202–219
- Molyneux, B. J. and Langford, G. M. (1997) Characterization of antibodies to the head and tail domains of squid brain myosin V. *Biol. Bull.* **193**, 222–223
- Sullivan, R., Burnham, M., Torok, K. and Koffer, A. (2000) Calmodulin regulates the disassembly of cortical F-actin in mast cells but is not required for secretion. *Cell Calcium* **28**, 33–46
- Torgerson, R. R. and McNiven, M. A. (2000) Agonist-induced changes in cell shape during regulated secretion in rat pancreatic acini. *J. Cell Physiol.* **182**, 438–447
- Kitani, S., Teshima, R., Morita, Y., Ito, K., Matsuda, Y. and Nonomura, Y. (1992) Inhibition of IgE-mediated histamine release by myosin light chain kinase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 48–54

- 32 Burke, N. V., Han, W., Li, D., Takimoto, K., Wackins, S. C. and Levitan, E. S. (1997) Neuronal peptide release is limited by secretory granule mobility. *Neuron* **19**, 1095–1102
- 33 Lang, T., Wacker, I., Wunderlic, I., Rohrbach, A., Giese, G., Soldati, T. and Almers, W. (2000) Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys. J.* **78**, 2863–2877
- 34 Oheim, M. and Stühmer, W. (2000) Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur. Biophys. J.* **29**, 67–89
- 35 Espreafico, E. M., Cheney, R. E., Matteoli, M., Nascimento, A. A., De Camilli, P. V., Larson, R. E. and Mooseker, M. S. (1992) Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell Biol.* **119**, 1541–1557
- 36 Chasserot-Golaz, S., Hubert, P., Thierse, D., Dirrig, S., Vlahos, C. J., Aunis, D. and Bader, M. F. (1998) Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in regulated exocytosis: studies in chromaffin cells with inhibitor LY294002. *J. Neurochem.* **70**, 2347–2356
- 37 Ryan, T. A. (1999) Inhibitors of myosin light chain kinase block synaptic vesicle pool mobilization during action potential firing. *J. Neurosci.* **19**, 1317–1323
- 38 Steller, J. A. and Almers, W. (1999) Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **76**, 2262–2271
- 39 Johns, L. M., Levitan, E. S., Shelden, E. A., Holz, R. W. and Axelrod, D. (2001) Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin cells. *J. Cell Biol.* **153**, 177–190

Received 10 July 2002/28 August 2002; accepted 12 September 2002

Published as BJ Immediate Publication 12 September 2002, DOI 10.1042/BJ20021090





ANEXO II

Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells

Patricia Ñeco, Daniel Giner, María del Mar Francés, Salvador Viniegra, and Luis M. Gutiérrez

Instituto de Neurociencias, Centro Mixto CSIC-Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan, 03550 Alicante, Spain

Keywords: adrenomedullary cells, amperometry, confocal microscopy, cytoskeleton, exocytosis, vesicle transport

Abstract

The role of cytoskeletal elements in vesicle transport occurring during exocytosis was examined in adrenal medullary bovine chromaffin cells maintained in culture. Amperometric determination of depolarization-dependent catecholamine release from individual intact cells treated with actin or myosin inhibitors showed alterations in the fast and slow phases of secretion when compared with untreated cells. In contrast, microtubule disassemblers or stabilizers have a moderate effect on secretion, only affecting the release of slow secretory components. In experiments using confocal dynamic microscopy we have observed the drastic effect of actin and myosin inhibitors in abolishing vesicle movement throughout the cytoplasm, and the inhibition of granule mobility in deep perinuclear regions caused by the microtubule stabilizers. Following loss of mobility, vesicles were associated with filaments of F-actin or microtubules. In addition, the mobility of cortical vesicles was affected by actin–myosin inhibitors but not by microtubule inhibitors. The study of cortical cytoskeleton in living cells showed vesicles associated with dense tubular F-actin structures, with microtubules appearing as low density networks. These findings suggest that the distribution and density of both cytoskeletal elements in the cortical region may influence the recruitment of vesicle pools during secretion.

Introduction

Neuroendocrine chromaffin cells release their secretory materials, stored in specialized granules, by exocytotic fusion of the vesicle and plasmalemmal membranes (Viveros, 1974). Exocytosis is initiated by Ca^{2+} entry through voltage-dependent channels and it is sustained for minutes. Since most chromaffin granules are excluded from the subplasmalemmal region (Burgoyne *et al.*, 1982; Plattner *et al.*, 1997), granule transport is required to refill the exhausted releasable vesicle pools. Protein motors associated with cytoskeleton such myosin–actin- and kinesin–tubulin-based systems might cooperate to provide such organelle transport toward the sites of exocytosis (for a review see Brown, 1999). The participation of both systems in vesicle transport has been demonstrated in a variety of cells, including neurons (Llinas *et al.*, 1985), where axonal transport is clearly dependent on microtubules (Heidemann *et al.*, 1981), whereas synaptic vesicle movements are dependent on myosin–actin interactions (Bernstein & Bamberg, 1989; Mochida *et al.*, 1994; Ryan, 1999). However, the relative roles of these two transport systems is still uncertain in neuroendocrine cells. Traditionally it has been assumed that the F-actin network beneath the plasma membrane acts as a cortical barrier preventing vesicle access to docking sites (Trifaró *et al.*, 1984; Perrin & Aunis, 1985); this physical clamp is removed by network disruption after cell stimulation (Cheek & Burgoyne, 1986). More recently, several studies using direct visualization of cortical vesicles (within 300–400 nm of the cell membrane) through evanescent-wave microscopy in living PC12 cells (Lang *et al.*,

2000) and in chromaffin cells (Oheim & Stühmer, 2000; Johns *et al.*, 2001), have suggested an active role for an actin–myosin transport system in vesicle translocation. In addition, myosin plays an important role in the transport of vesicles in deeper regions of the cytoplasm, as has been shown recently by dynamic confocal microscopy (Ñeco *et al.*, 2002). In contrast, the function of microtubule-based motors such as kinesin is less understood, although there is some evidence that microtubule inhibitors and stabilizers influence the release of catecholamines studied in populations of cultured chromaffin cells (McKay & Schneider, 1984; Thuret-Carnahan *et al.*, 1985).

The present study has been undertaken to provide a detailed description of the function of actin–myosin and microtubule-associated motors in chromaffin cell vesicle transport, by using different inhibitory and stabilizing agents for these cytoskeletal elements. We have combined the high temporal resolution of amperometric measurements of exocytosis in single intact chromaffin cells with dynamic confocal microscopy to visualize granule mobility in both internal and peripheral cytoplasmic areas of living single cells. The results suggest that both systems are implicated but play different roles in chromaffin cell granule transport in the proximity of the exocytotic sites, which may account for the difference between myosin–actin- and microtubule-affecting drugs when altering secretory components.

Materials and methods

Isolation and culture of bovine chromaffin cells

Chromaffin cells were prepared from bovine adrenal glands by collagenase digestion and further separated from debris and erythrocytes by centrifugation on Percoll gradients as described elsewhere

Correspondence: Dr Luis M. Gutiérrez, as above.
E-mail: luisguti@umh.es

Received 8 May 2003, revised 28 May 2003, accepted 29 May 2003

(Almazan *et al.*, 1984; Gil *et al.*, 1998). Cells were maintained in monolayer cultures using Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 10 μ M cytosine arabinoside, 10 μ M 5-fluoro-2'-deoxyuridine, 50 IU/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin, and maintained in 35-mm Petri dishes (500 000 cells/dish; Corning Inc., Corning, NY, USA). Cells were used between the second and fourth day after plating. All experiments were performed at room temperature (21–22 °C). Chemicals were from Sigma (Sigma Co, Madrid, Spain).

Measurement of catecholamine secretion from individual cultured chromaffin cells by amperometry

Carbon-fibre electrodes of 11- μ m-diameter tips and insulated with polypropylene were employed to monitor the release of the catecholamine content from individual chromaffin granules in cells under superfusion with a Krebs/HEPES basal solution (composition in mM: NaCl, 134; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.2; MgCl₂, 1.2; CaCl₂, 2.5; glucose, 11; ascorbic acid, 0.56; and Hepes, 15; pH adjusted to 7.4 using a NaOH solution) as described elsewhere (Gil *et al.*, 1998; Criado *et al.*, 1999). Electrodes were positioned in close apposition to the surface of the cells using high precision hydraulic micromanipulation assessing cell membrane deformation using an Axiovert 135 inverted-stage microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) mounting Hoffman optics (Modulation Optics, Greenvale, NY, USA). Electrical connection was accomplished with mercury and a potential of +650 mV vs. an Ag/AgCl bath reference electrode was applied using an Axopatch 200 A amplifier (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA). Electrochemical current due to catecholamine oxidation was digitized with an A/D converter (ITC-16, Instrutech Corp., Great Neck, NY, USA) and recorded at 200 μ s/point using the program PulseControl (Herrington & Bookman, 1994) running on top of the graphical software Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) in a PowerMac 7100 computer. Cells were stimulated by superfusion with depolarizing 59-mM high potassium solution, obtained by replacing isosmotically NaCl by KCl. This solution was applied through a valve-controlled puffer tip commanded by the acquisition software and disposed near the cell under study. Intact cell treatment with 2,3-butanodione monoxime was performed by using a 20-mM concentration in basal medium and during 15 min exposure prior to cell secretion measurements. Treatment of intact cells with the F-actin stabilizing drug phalloidin was performed overnight with a 1- μ M concentration. To study the influence of microtubule-associated activity on secretion, cells were treated with the destabilizing agent vinblastine at a 10- μ M concentration or with 1 μ M of the microtubule stabilizing chemical taxol during 15 min prior to depolarization-induced secretion.

Chromaffin granule mobility and distribution of F-actin and microtubules, using dynamic confocal microscopy

Cells were loaded with quinacrine using a 4- μ M concentration in culture medium for a 10-min period. After that, fluorescent emission from quinacrine trapped in the acidic vesicles was investigated using an Olympus Fluoview FV300 confocal laser system mounted in a BX-50 WI upright microscope incorporating a 100 \times LUMPlan FI water-immersion objective. This system allows for z axis reconstruction (theoretical z slice of \approx 0.5 μ m thick) and time-lapse dynamic studies with time resolutions ranging from 0.1 s for 200 \times 150-pixel image acquisition (adequate for region studies) to \approx 0.6 s for images of 400 \times 300 pixels (for visualization of the entire cell). Analysis of frames was performed using the public domain program ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) with Plugins for region of interest (ROI) measurement, image average, vesicle tracking and comparison of multiple channel images. Distribution of the F-actin network was

studied using rhodamine coupled to phalloidin in intact cells. Since this chemical has low permeability throughout the plasmalemma, intact cells in culture media were incubated with 1 μ M for 30 min at 37 °C; in this way a low percentage (5–10%) of the cells were labelled at the fluorescence level enabling z -axis confocal reconstructions. Microtubules were visualized in intact cells using 1 μ M taxol conjugated with Bodipy 564/570 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Incubation of this compound for 15–20 min at 37 °C allowed the efficient labelling of the total population of cultured chromaffin cells.

Student's t -test for paired samples or two-way ANOVA were used to establish statistical significance among the different experimental data (samples were considered significantly different when $P < 0.05$). Non-Gaussian data distributions were analysed using the nonparametric Mann–Whitney U -test. Data were expressed as mean \pm SEM from experiments performed in a number (n) of individual cells from at least three different cultures.

Results

Actin–myosin and microtubule inhibitors had a differential effect on early and late catecholamine release responses from single chromaffin cells

The function of actin–myosin molecular motors in modulating the secretory components of intact chromaffin cells was studied by using phalloidin as an actin-stabilizing agent as well as by treating the cells with 2,3-butanodione monoxime (BDM), a chemical inhibiting myosin ATPase activity (Herrmann *et al.*, 1992). Phalloidin, 1 μ M, incubated for 12 h and 20 mM BDM incubated for 15 min altered the vesicular release evoked by 59 mM KCl depolarizing solution, as can be observed in the amperometric traces of Fig. 1. These agents decreased the number of vesicles fusing at times >5 s after cell depolarization; they also produced a more prominent decrease of secretory activity during the initial spike burst. These observations were confirmed by the integration and averaging of experiments conducted with numerous cells (15–65) per experimental condition, as shown in Fig. 1B. The characteristics of these cumulative curves representing single-cell secretory kinetics were clearly affected by these chemicals. Phalloidin and BDM altered catecholamine release kinetics soon after stimulation, and produced inhibitions ranging from 45 to 60% of the maximal response obtained in control cells.

In contrast, microtubule inhibitors such as vinblastine and the stabilizing agent taxol had a modest impact on secretion. Incubations of 15 min with 10 μ M vinblastine, or 1 μ M taxol, known to affect microtubule organization and secretion from cell populations (Mckay & Schneider, 1985; Thuret-Carnahan *et al.*, 1985), produced a 25–30% inhibition of the secretory response (Fig. 1B). More interesting, the slow secretory components, released 20–25 s after initiation of cell depolarization, were the most affected, with little or no effect seen in the initial burst of secretion (Fig. 1A and B). All the reported alterations of secretion were statistically significant (Student's t -test): $P < 0.05$ for vinblastine- or taxol-treated cells and <0.01 for BDM- or phalloidin-incubated cells when compared with controls.

Myosin inhibitors altered the release of fast releasable secretory vesicle pools and differed from tubulin-affecting drugs in their kinetic effect

The results presented above suggest a different effect of tubulin and actin–myosin inhibitors on secretory vesicle pools recruited in chromaffin cells stimulated by continuous depolarization. To further study these differences, we designed experiments combining both types of cytoskeletal-affecting chemicals and using short repetitive stimulation of the cells for a better appreciation of such effects in vesicle

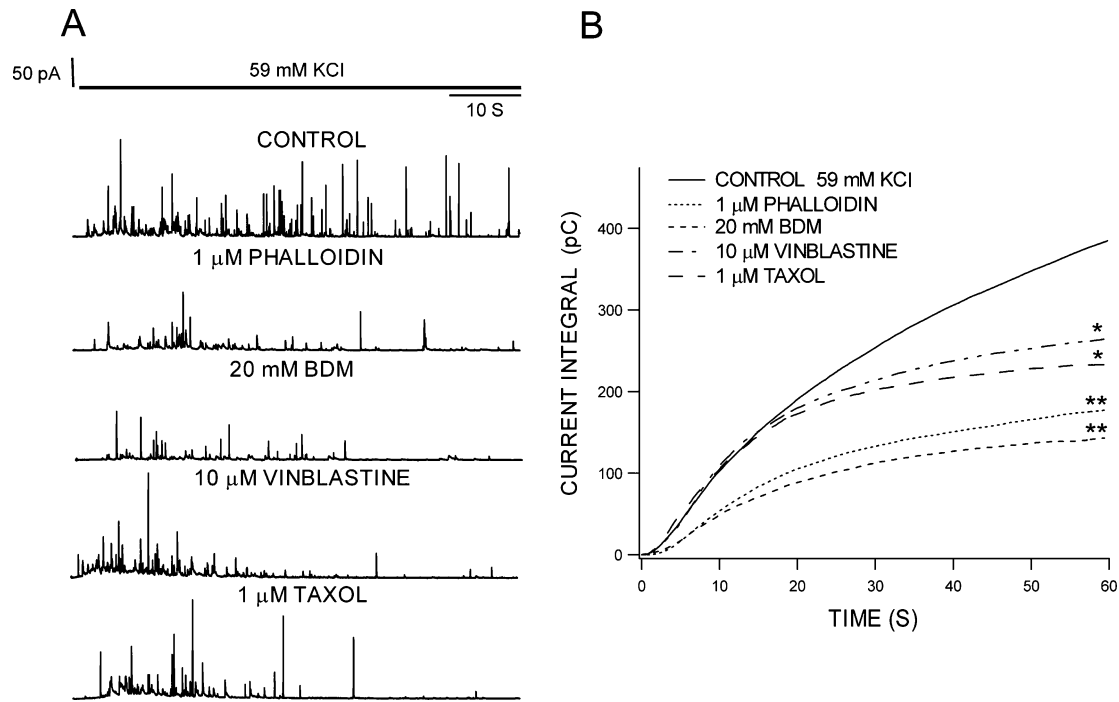


FIG. 1. Secretory kinetics of individual intact chromaffin cells treated with actin-myosin or microtubule activity inhibitors. After cell treatment with 20 mM BDM, 10 μM vinblastine or 1 μM taxol for 15 min, secretion was elicited by cell depolarization using a Krebs/HEPES-based 59-mM KCl solution for 1 min. Cells were incubated in 1 μM phalloidin for 12 h. Secretion was monitored by amperometry. (A) Amperometric current traces representative of experiments performed under varying conditions. (B) Cumulative integrals representing averaged secretion. After integration of individual traces, the average curve was obtained for control ($n = 65$), 20 mM BDM- ($n = 15$), 1 μM phalloidin- ($n = 27$), 10 μM vinblastine- ($n = 32$) and 1 μM taxol-treated cells ($n = 19$). Current integral values (mean ± SEM, pC) at 1 min were 352 ± 29 (Control), 143 ± 22 (BDM), 177 ± 29 (phalloidin), 265 ± 29 (vinblastine) and 233 ± 30 (taxol). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ using Student's *t*-test when compared with control cells.

recruitment. The preferential inhibition of fast releasable components manifested in the presence of BDM could be studied using short and repetitive stimulations of chromaffin cells, in which the presence of BDM produced a 25% inhibition of secretion by the second pulse following the initial test whereas this effect was absent in cells incubated with vinblastine alone (Fig. 2). Furthermore, the preferential inhibition of slow secretory components by tubulin inhibitors was evident when after only five short depolarizations the level of secretion reached that obtained with the combination of the two chemicals. The functional experiments with these drugs, which affect actin, myosin and tubulin, clearly suggest the different role for tubulin in controlling the secretion of slow components whereas actin-myosin function affected the release of both slow and fast releasable vesicle pools. This effects on fast components agrees well with that reported using alternative myosin inhibitors such as wortmannin or the specific MLCK inhibitor Peptide-18 on the calcium-evoked response of permeabilized chromaffin cells (Ñeco *et al.*, 2002).

Phalloidin abrogated vesicle mobility in regions of the cytoplasm of chromaffin cells visualized by dynamic confocal microscopy

In order to determine the possible causes of the different effect caused by actin-myosin and tubulin inhibitors on catecholamine secretion, we studied the mobility of chromaffin granules in different regions of the cell cytoplasm using laser confocal microscopy. Chromaffin granules were labelled with 4 μM quinacrine for 10 min at 37 °C before confocal images were acquired, of central sections of ≈500 nm, of the total area of the cell (20 × 20 μm area acquired at 1 Hz). Figure 3A shows time-lapse images of control nontreated cells using dynamic confocal microscopy. Vesicle movement was evident with granules maintaining

their position in the confocal plane for periods ranging from 2 to 7 s; in consequence, confocal images of an equatorial cellular plane changed continuously in a sequence of six frames separated by 10-s intervals (Fig. 3A). Furthermore, vesicle movement was very noticeable when observing the averaged image of 60 frames taken over 1 min, in which a blurry and dense representation of moving granules can be seen (Fig. 3B). A further confirmation of such vesicle mobility can be obtained studying quinacrine fluorescence in a region of interest (ROI) covering the movements of 2–3 vesicles (area of ≈2 × 2 μm). The variation in fluorescence indicated that the granules were entering and leaving the studied ROI at intervals of 3–7 s (Fig. 3E, control). Furthermore, a number of granules staying in the confocal plane for >10–20 s ($n = 135$, corresponding to 11 cells) were tracked at higher magnification (regions of 4 × 4 μm) and their displacement in the *x-y* plane calculated and represented in the distribution shown in Fig. 3F, obtaining an average displacement of $3.75 \pm 0.50 \mu\text{m}/20 \text{ s}$. These data demonstrate that the elevated mobility of cytoplasmic granules in control cells was unrelated to plane flickering or changes in the signal-to-noise ratio. This behaviour was observed in an elevated number of cells in resting basal or stimulated conditions and for periods ranging from a few minutes to >2 h at room temperature. Therefore, we decided to perform further experiments in basal non-depolarizing medium. Initial experiments analysing the participation of actin-myosin motors for vesicle transport were performed using 1 μM phalloidin for 10 min before acquiring confocal images of the granules labelled with quinacrine. Cell treatment clearly resulted in a drastic change in vesicle motion; confocal imaging showed there was a marked restriction in granule movement which affected the majority of vesicles 10–15 min after initiation of the observations. Figure 3C

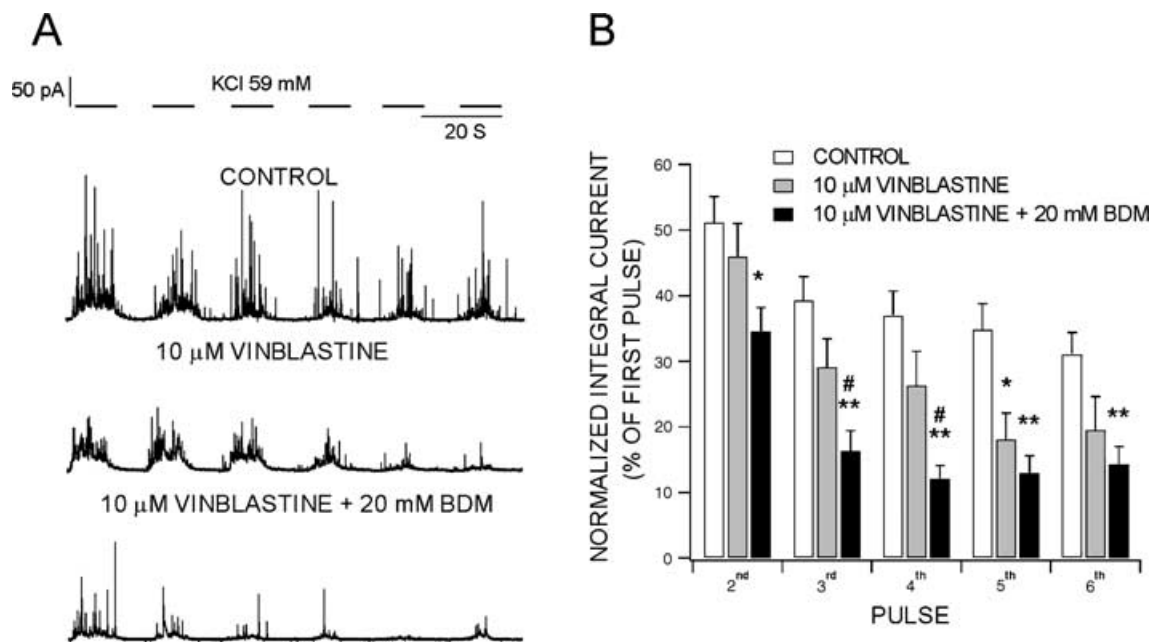


FIG. 2. Myosin and microtubule inhibitors affect different secretory components in intact chromaffin cells. The capability of intact depolarized cells to recruit fast or slow secretory 'pools' was studied by using six successive 10-s depolarizations. Cells were treated with 10 μ M vinblastine or 10 μ M vinblastine in addition to 20 mM BDM for 15 min. (A) Effect of these chemicals on secretion stimulated by continuous depolarization. (B) Rate of vesicle recruitment. The cumulative integrals were averaged for individual pulses in each experimental condition, assayed and represented as a percentage of the initial pulse. Data are means \pm SEM from experiments performed in 38 (Control nontreated), 21 (10 μ M vinblastine) and 21 (10 μ M vinblastine and 20 mM BDM) cells. * P < 0.05, ** P < 0.01 using Student's *t*-test when compared with control cells, # P < 0.05 when compared with vinblastine-treated cells.

shows a typical cell under these conditions; there is no evident change in images taken at 10-s intervals, and the averaged image of 60 confocal frames taken over 1 min is well defined and shows the position maintained by each granule during the period of observation (Fig. 3D). Measurements of fluorescence intensity in ROIs containing 3–4 granules also indicated a marked stability as can be seen in Fig. 3E. These results also show that there was no detectable bleaching of the fluorescent dye in our conditions. Finally, vesicle tracking for granules (86 granules of nine different cells) indicated a clear reduction in vesicle mobility detected in the *x-y* plane, obtaining on average 1.18 \pm 0.1 μ m/20 s, 1/3 of the mobility found in control cells (Fig. 3F). These differences were statistically significant (P < 0.0001) when compared with control mobility using the nonparametric Mann–Whitney *U*-test. If, instead of pooled data, the analysis was performed for individual cells, mobility in control cells ranged from 2.7 to 4.8 μ m/20 s with an average value of 3.9 \pm 0.4 μ m/20 s (n = 11 cells), and values of 0.7–2.0 μ m/20 s (mean of 1.0 \pm 0.1 μ m/20 s, for n = 9 cells) were obtained in phalloidin-treated cells. Again in an individual cell analysis, these differences were statistically significant (P < 0.001 using the Mann–Whitney *U*-test). These observations suggest the involvement of actin-dependent motors in the motility of vesicles throughout the chromaffin cell cytoplasm and agree well with results obtained for the subplasmalemmal area using total reflection microscopy (Lang *et al.*, 2000; Oheim & Stühmer, 2000). In addition, myosin involvement has been proven in similar experiments performed with cells treated with 20 mM BDM, obtaining an average displacement of 1.35 \pm 0.2 μ m (n = 108 granules in 12 cells).

The effect of taxol on the mobility of granules was most predominant in deep regions of the cytoplasm

We next studied the involvement of tubulin-based vesicle transport in our cells with the aim of explaining the differences found in the

functional experiments in single cells. Taxol conjugated with Bodipy 564/570 was used to visualize microtubules and also affect vesicle transport linked to this cytoskeletal network. The confocal images of microtubule and vesicle distribution from a typical experiment using 1 μ M labelled taxol for 15–20 min are shown in Fig. 4A. Interestingly, taxol labelled a dense perinuclear network that was almost absent at the cell periphery leaving extended areas of the cytosol near the plasma membrane without labelling. This distribution was in contrast to the characteristic dense cortical network of F-actin found using confocal microscopy (Vitale *et al.*, 1995; Gíl *et al.*, 2000), and it matches perfectly with microtubules labelled with antibodies against tubulin (data not shown). The confocal time series showed a marked difference in the mobility of granules present in areas presenting abundant microtubules when compared with zones devoid of them. Most of the vesicles located in areas presenting higher levels of taxol labelling (red) as indicated by arrow 1 in Fig. 4A were immobilized; as a result, they presented minor variations in fluorescence in the ROI selected from this region (Fig. 4B). In contrast, vesicles present in regions where microtubules were absent presented mobility indiscernible from granules in control nontreated cells, as can be observed in both the 10-s interval images and the variations of fluorescence in a ROI selected from region 2 (Fig. 4). An analysis of the trajectories observed in these granules resulted in averaged values of 1.6 \pm 0.2 μ m/20 s for the granules present in regions with dense taxol staining and 3.9 \pm 0.2 μ m/20 s for the more peripheral vesicles (Fig. 4E). These differences were statistically significant obtaining a P < 0.0002 value in the Mann–Whitney *U*-test. A statistical analysis for the *x-y* mobility data obtained in individual cells gave mean values of 1.6 \pm 0.2 and 3.6 \pm 0.3 μ m/20 s for central and peripheral vesicles, respectively (P < 0.002, n = 8 cells). In agreement with these experiments, treatment of the cell with 10 μ M vinblastine for 15 min in experiments conducted in 11 cells from different cultures produced the preferential

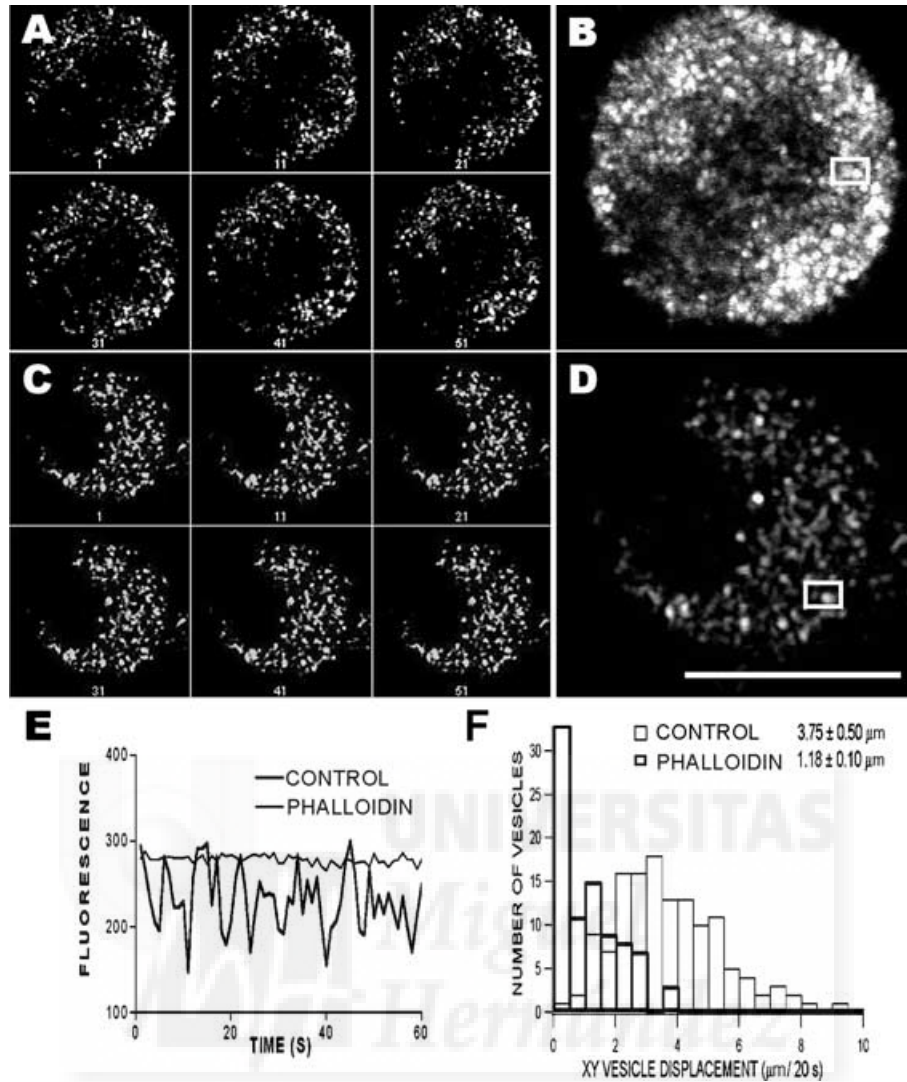


FIG. 3. Vesicle mobility observed by dynamic confocal microscopy in control untreated and chromaffin cells treated with phalloidin. Chromaffin cells were incubated with 4 μM quinacrine for 10 min and granules visualized by dynamic confocal microscopy as indicated in Methods. (A) Time series of confocal images taken at 10-s intervals from control cells. (B) Averaged image from 60 frames taken at 1 Hz. (C) Frames obtained as in panel A from a cell treated with 1 μM phalloidin for 15 min. (D) Averaged image of phalloidin-treated cell. (E) Fluorescence changes of ROI selected in a control (indicated in panel B) and a phalloidin-treated cell (indicated in panel D). (F) Distribution of total displacement over 20 s calculated by measurement of the x - y coordinates for the centroid corresponding to tracked granules in control ($n = 135$) and phalloidin-treated cells ($n = 86$). Scale bar, 10 μm .

immobilization of vesicles in cytoplasmic regions adjacent to the nucleus (data not shown) whereas in peripheral regions there were regions where high vesicle mobility was observed.

Vesicles were immobilized in both actin- and tubulin-stained filaments in the interior of the cytoplasm

Treatment of chromaffin cells with inhibitors of actin–myosin and microtubule function affected vesicle mobility in internal regions of the cytoplasm where networks of F-actin and polymerized tubulin are present forming an intricate cage system. We analysed the movement of these vesicles in relation to the cytoskeletal network to discern whether this lack of movement was caused by restriction inside narrow structural cages or by immobilization upon binding to F-actin or microtubules, which may indicate the active role of these cytoskeletal elements in directing vesicle transport. Firstly, we labelled intact cells with rhodamine–phalloidin as mentioned above, and we used high magnification confocal images from internal regions where there was dense F-actin network. These images of $\approx 5 \times 3 \mu\text{m}$ could be sampled

at 10 Hz and clearly depicted the movement of vesicles in relation to F-actin cages of ≈ 1 – $3 \mu\text{m}$ wide. As can be observed in the example of frame sequence depicted in Fig. 5A, vesicles were strictly immobilized in association with the F-actin filaments; literally every vesicle seemed to be linked with this cytoskeletal network during 1-min period of recording. In experiments performed with cells from different cultures and varying the period of time between initiation of incubation with phalloidin and the observation time it was noticed that, in many cells where the rhodamine–phalloidin labelling was apparent a few min after incubation, there were initially vesicles already bound to F-actin as well as others moving inside the cytoskeletal cages. As time passed, however, the vast majority of the vesicles were trapped in the F-actin filament and after 20–25 min most of the vesicles were immobilized and were associated with decorated F-actin filaments (54 granules of a total of 59 were immobilized in images obtained in seven cells treated with rhodamine–phalloidin).

This type of experiment was also performed for cells labelled with taxol, in the conditions described above; again, a close examination of

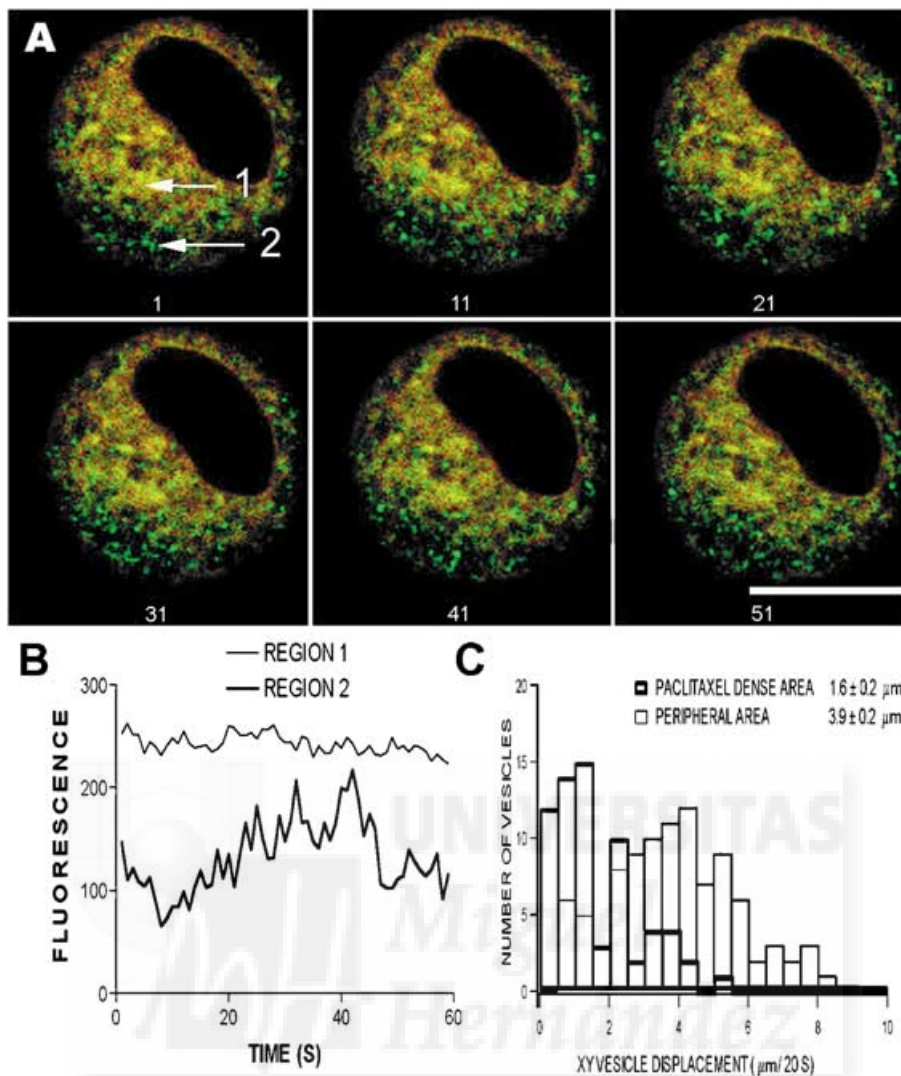


FIG. 4. Dynamic confocal microscopy of chromaffin granule mobility in cells treated with taxol conjugated with a fluorophore. Cells were treated with 1 μM taxol conjugated with Bodipy 564/570 for 30 min (red) and quinacrine (green) as described in the previous figure before confocal images were acquired at 1-s intervals. (A) Time-series. Frames visualizing chromaffin granules and microtubules at 10-s intervals. (B) Quinacrine fluorescence changes in ROIs with dense presence of microtubules (arrow 1) and devoid of them (arrow 2). (C) Distribution of total displacement during 20 s calculated by measurement of the x - y coordinates for the centroid corresponding to tracked granules in areas of dense taxol labelling ($n = 67$) and peripheral areas devoid of dense label ($n = 97$). Scale bar, 10 μm .

the labelled structure showed cages of variable size from 2 to 4 μm distance between adjacent microtubules. As occurred with phalloidin treatment, it seems apparent that some vesicles were immobilized in clear association with the microtubule network, as can be observed in Fig. 5B; however, in this time sequence there was also evidence of vesicles moving inside the cages. Even after 30 min of incubation with 1 μM taxol some vesicles moved inside the cytoskeletal network whilst most of the vesicles found in deep cytosolic areas were relatively static (56% of the 71 vesicles observed in nine cells). Taking together, these experiments demonstrating the association of immobilized vesicles with both F-actin filaments and microtubules strongly suggest the cooperative role of these cytoskeletal proteins in the active transport of vesicles inside the cytoplasm.

Cortical granules were immobilized by phalloidin but not by microtubule affecting chemicals

To understand the effect of actin and tubulin inhibitors on secretion it was essential to study granule movement in the cortical subplasma-

lemmal area where releasable vesicles are located. Confocal microscopy was used to visualize the upper portion of the cells, and z -axis objective movement was controlled with a 0.1- μm interval precision until the first image of the cell showing the most peripheral granules appeared. Time-lapse images of control cells were then recorded at different time intervals (from 0.1 to 1 s per frame) for 1 min in >25 cells from several cultures. Brilliant granules, being the most external ones and therefore immersed in the confocal plane, remained relatively static showing a restriction of mobility after vesicle docking whereas during the 1-min period studied other granules visited and quit the confocal plane indicating their elevated mobility in the cortical zone. This behaviour was analysed comparing the first frame of time-lapse sequences (Fig. 6A) with the averaged image of the entire period (Fig. 6B). Relatively static granules are seen as brilliant and well defined images contrasting to the lower intensity and blurry fluorescence characteristic of moving granules, transient visitors to the confocal plane. After treatment with phalloidin under conditions described in the previous section, movement of cortical vesicles

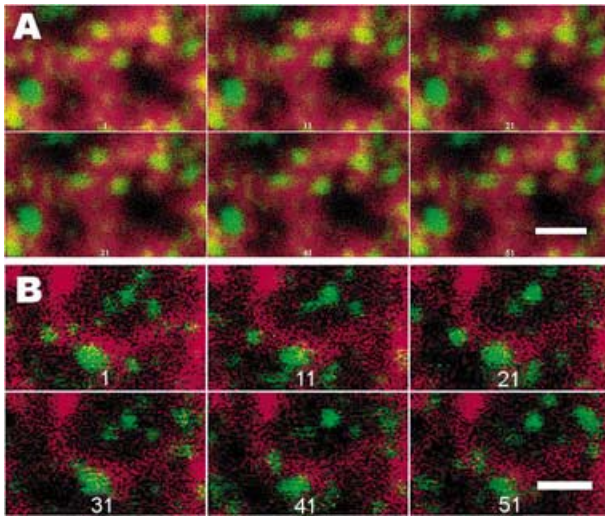


Fig. 5. Vesicles immobilized in the decorated filaments of actin and microtubules. Time-series of confocal images obtained in cells treated with (A) 1 μ M phalloidin–rhodamine or (B) 1 μ M taxol conjugated with Bodipy 564/570 for 30 min, before granules were labelled with quinacrine. Each frame is separated by 10-s intervals. Scale bars, 1 μ m.

was heavily restricted as observed in the initial frame and averaged image in Fig. 6C and D. Experiments performed in 15 cells from three different cultures demonstrated that phalloidin treatment resulted in the immobilization of cortical vesicles, paralyzing the activity of visiting vesicles, which were reduced from being 40% in controls to 8% of the vesicles in phalloidin-treated cells (Fig. 6G). This change in cortical vesicle mobility was also noticeable upon treatment with myosin inhibitors, as recently shown using wortmannin (Neco *et al.*, 2002). Interestingly, chromaffin cell treatment with taxol did not seem to affect cortical mobility in an obvious way (42% of ‘visitors’, $n = 14$). Image sequences recorded from these cells resembled those of control nontreated cells, indicating the presence of relatively immobile docked granules as well as multiple moving ‘visitors’ as seen in panels E (initial frame) and F (averaged image) of Fig. 6. Again, cells preincubated with 10 μ M vinblastine ($n = 7$) showed no changes in cortical granule mobility (data not shown).

Structure of F-actin and polymerized tubulin cortical networks in living chromaffin cells

The above results indicate the capacity of F-actin and microtubule networks to immobilize vesicles in the presence of specific drugs and therefore constitutes transport systems in different cytoplasmic cellular areas. Nevertheless the distinct behaviour of vesicles in the cortical zone when treated with phalloidin and taxol strongly suggests a different organization of these cytoskeletal elements in the sub-plasmalemmal area. To study the cytoskeletal topology in the cell periphery we incubated intact chromaffin cells with these drugs for 30 min or more, ensuring an intense labelling to allow the reconstruction of the network with confocal images obtained with a closed pinhole every 200 nm from the upper membrane layer of the cells. The numerous images captured from phalloidin-treated cells revealed a complex and dense network of F-actin shown in the example of Fig. 7. The upper layer shows few chromaffin granules (Fig. 7A), which are most probably docked or tethered, and literally surrounded by rings of F-actin. The presence of these rings was maintained along the z -axis (see panels B–D), appearing as narrow tubular structures leaving a barely open space to conduct granules one by one. The F-actin network has a maximum density between 200 and 400 nm from the cell limit. At

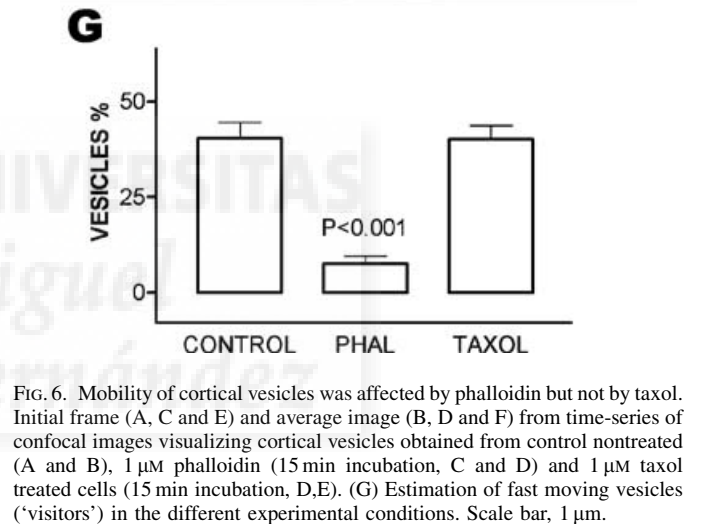
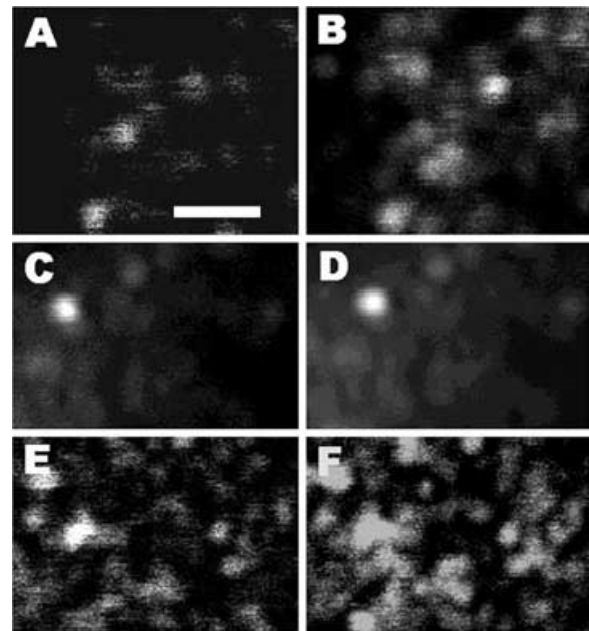


Fig. 6. Mobility of cortical vesicles was affected by phalloidin but not by taxol. Initial frame (A, C and E) and average image (B, D and F) from time-series of confocal images visualizing cortical vesicles obtained from control nontreated (A and B), 1 μ M phalloidin (15 min incubation, C and D) and 1 μ M taxol treated cells (15 min incubation, D,E). (G) Estimation of fast moving vesicles (‘visitors’) in the different experimental conditions. Scale bar, 1 μ m.

large distances this cytoskeletal structure had more open spaces, of at least $2 \times 2 \mu$ m, and forming polygonal cytoplasmic cages (see Fig. 7D). The complexity and the close association with cortical vesicles of this tubular structure may explain its capability of immobilizing them in the presence of rhodamine–phalloidin and the ability of actin and myosin inhibitors to affect fast secretory components. These structures were observed in reconstructions from nine cells of three different preparations.

In contrast, chromaffin cells labelled with taxol presented a very different cortical structure, as seen in Fig. 8. The upper confocal layer was characterized by a low density structure of microtubules in the form of wide honeycombs with the vesicles located in the empty spaces (Fig. 8A). Deeper into the cells, this structure became more irregular in size and form. Even after a prolonged period of incubation with taxol, some vesicles could be observed in association with these structures while others appeared moving inside these cages (see Fig. 8A panels C and D). Similar structures were observed in 11 cells from three different preparations. From these reconstructions it could be inferred that, in the proximity of the plasmalemma, vesicles are associated with a dense network of F-actin forming tubular structures orientated toward the plasma membrane, and polymerized tubulin is also present

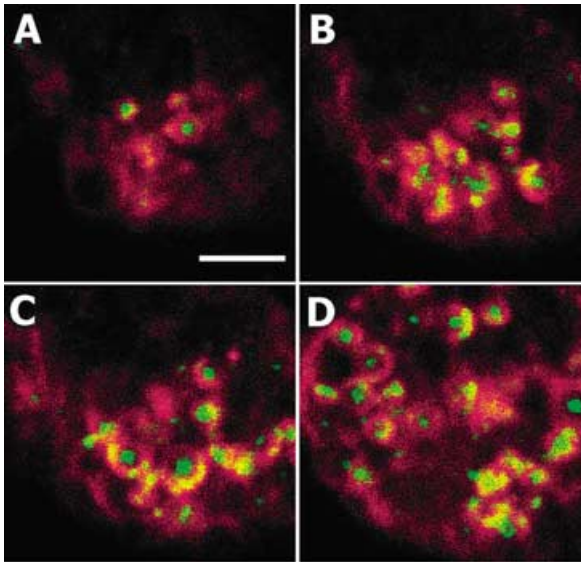


FIG. 7. Cortical structure of F-actin. Incubation of intact cells with $1\ \mu\text{M}$ phalloidin coupled to rhodamine for 30 min to label F-actin in intact cells and vesicles were visualized with quinacrine as mentioned in previous Figs. Confocal images were taken every 200 nm in the z -position starting from (A) the upper limit of cells, and (B–D) progressing towards the cell interior (400 nm, B; 600 nm, C; and 800 nm, D). Scale bar, $2\ \mu\text{m}$.

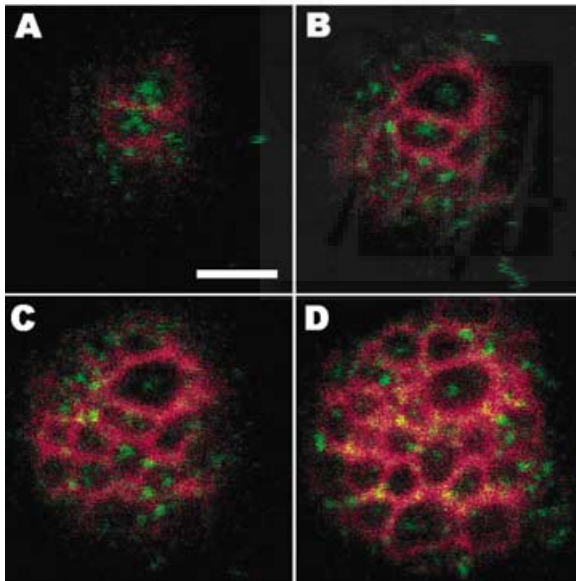


FIG. 8. Microtubular cortical structure. Confocal series of multiple z -positions of cells labelled for 30 min with $1\ \mu\text{M}$ of taxol coupled to Bodipy 564/570. Images were taken as described in Fig. 8. Scale bar, $2\ \mu\text{m}$.

forming a low density network. Inside the cytoplasm, however, both F-actin and microtubules form cage structures of similar density and chromaffin granules seem to attach to both of them.

Discussion

Differential effect of myosin–actin and microtubules inhibitors in the secretory phases of chromaffin cells in culture

In this study we have defined the differential role of actin–myosin and microtubules in sustaining the secretory response during prolonged or

repetitive stimulation of single bovine chromaffin cells. The results obtained here with phalloidin and the myosin inhibitor BDM have demonstrated the participation of an actin–myosin transport and is consistent with experiments performed in permeabilized chromaffin cells using wortmannin and peptide-18 (Lukas *et al.*, 1999) as alternative myosin-affecting chemicals (Neco *et al.*, 2002). Furthermore, we have also demonstrated the effect of these chemicals affecting actin–myosin-based function in the release of fast secretory components, an effect which was clearly manifested when compared with the inhibition of secretion caused with microtubule-affecting drugs. Since we have shown that the initial secretory burst is insensitive to low concentrations of botulinum neurotoxin A, affecting predocked vesicle pools (Gil *et al.*, 1998), we suggest that myosin inhibitors may influence postdocking events of the secretory cascade. Nevertheless, the results obtained using myosin inhibitors when repetitive stimulations were used to deplete rapidly releasable secretory components strongly support the fundamental role of myosin–actin transport systems in the supply of granules from reserve pools in neuroendocrine cells, in a manner similar to their role in neuronal models (Mochida *et al.*, 1994; Ryan, 1999).

In contrast with the results obtained for myosin inhibitors, tubulin-affecting chemicals inhibited the release of slow phases of secretion in continuous stimulation and late pulses in repetitive depolarization. Since these phases are ATP-dependent and sensitive to low concentrations of botulinum neurotoxin A (Gutiérrez *et al.*, 1997), it might be composed of reserve vesicles in predocking phases of secretion (Gil *et al.*, 1998; 2000).

Dynamic confocal microscopy studies suggest two types of cytoskeletal-mediated transport operating inside the chromaffin cell cytoplasm

In order to understand the causes of the differential effect produced by actin–myosin and microtubule inhibitors in secretion it appeared essential to examine vesicle mobility under the experimental conditions assayed. Dynamic confocal microscopy shows that most of the vesicles are located in a cytoplasmic area extending from 0.5 to $2\ \mu\text{m}$ of the cell limits and offers a complementary view of the studies performed using total internal reflection microscopy describing granule motion in the immediate vicinity ($0.3\ \mu\text{m}$) of the plasma membrane (Steyer & Almers, 1999; Oheim & Stühmer, 2000; Johns *et al.*, 2001). The high mobility characteristic of chromaffin granules changed drastically after treatment with phalloidin and myosin inhibitors, such that most of the observed granules remained in the confocal plane during the time period studied, suggesting that myosin–actin transport systems play a pivotal role in granule mobility throughout the entire cell cytoplasm and explaining the marked effect of these agents in the kinetics of secretion. Interestingly, inhibitors or stabilizers of microtubules affect the mobility of a reduced population of granules mostly present in internal cytoplasmic regions adjacent to the nucleus.

Our studies using simultaneous labelling of vesicles and polymerized actin and tubulin showed that, upon labelling of these structures with phalloidin and taxol, many chromaffin granules appeared immobilized in association with the cytoskeleton. Indeed, if granules move along actin bundles as has been suggested for a fraction of vesicles in PC12 cells (Lang *et al.*, 2000), this would explain why a vesicle bound through myosin to F-actin would not be able to step forward in the decorated surface of its actin rail, and the same principle would be applied to kinesin movement over taxol-labelled microtubules. This directed vesicle movement would be active in zones with a dense filamentous network such as the internal regions of microtubules and the cortical zone of F-actin and may coexist with a random diffusion movement of vesicles inside structural cages. Vesicle transport seems

to be optimal in resting conditions as stimuli did not increase vesicle mobility; therefore, stimulation might provide cytoskeletal reorganizations allowing granule access to active sites. In any case, the alteration of vesicle transport, studied here in resting conditions, would in addition be expected to affect granule mobility during secretion.

Different cortical structures of F-actin and polymerized tubulin may explain their influence on granule mobility in the subplasmalemmal area

As shown in Results, myosin–actin inhibitors drastically affect the movement of vesicles in the subplasmalemmal area whereas tubulin-affecting drugs do not manifested any effect on the mobility of cortical vesicles. These differing influences on cortical vesicle mobility could be explained on the basis of the structural characteristics of these two cytoskeletal elements in those critical regions for secretion. The intimate association of F-actin structures with appearance of rings surrounding vesicles and orientated in the *z*-axis direction (toward the membrane) was evident; these structures may be dynamic in nature because they appear only in association with granules. A narrow empty space of $\approx 1/4$ – $1/5$ of the vesicle diameter (see Fig. 8) can be observed separating the granule perimeter from the more distal walls of these F-actin structures, allowing a narrow but well defined *x*-*y* movement of the imprisoned granule. The observation of these structures explains why, in total internal reflection microscopy studies, granule positions are restrained in areas permitting 75 nm of movement (Steyer & Almers, 1999) in cages estimated at 400 nm in diameter (Oheim & Stühmer, 2000). Interestingly, deeper in the cytoplasm the F-actin network is organized in polygonal cages which are not closely associated with granules (see Fig. 7D); although they may allow guided vesicle transport in F-actin rails they give open space for granule diffusion providing a structural base for the wider movement observed in granules distant from the plasma membrane (Johns *et al.*, 2001).

Our results with *in vivo* labelling of microtubules constitute the first direct evidence for a possible role in granule transport for these structures in this neuroendocrine cell model. Nevertheless, this transport does not seem to affect cortical granules to the same extent as the myosin–actin based system. In any case, the polygonal structures of microtubules could cooperate to some degree in the supply of vesicles from reserve pools to the immediate vicinity of the plasmalemma, and at distances of 400–600 nm immobilized granules could be seen in decorated microtubules.

A model for cytoskeletal-mediated transport of chromaffin granules

Taken together our data provide evidence for the participation of myosin–actin- and microtubule-mediated transport of vesicles in the cytosol of chromaffin cells. In the cell interior both systems cooperate to actively transport granules and may coexist with random diffusion in the spaces left by polygonal structures of a few micrometres in size. The viscosity of F-actin in the cortical area may prevent granule access to the plasmalemma and accumulate reserve vesicles at 300–800 nm of the membrane, providing the basis for the barrier concept for secretion (Trifaró *et al.*, 1984; Perrin & Aunis, 1985). Dynamic changes in F-actin may propel granules through the cortex forming tubular structures where ATP-dependent myosin activity will provide the energy to direct vesicle transport to specific active sites (Lang *et al.*, 2000; Oheim & Stühmer, 2000). Our functional data also suggests that, upon tethering or docking, granules could still be associated with the cytoskeleton and in this way myosin inhibitors influence secretion of fast releasable components. Further experiments to study the dynamic behaviour of F-actin and its regulation in the cortical zone

will be needed to provide us with a detailed description of how the cytoskeleton could influence vesicles from different secretory pools.

Acknowledgements

We thank Stuart Ingham for style corrections and Dr Antonio Garcia (Universidad Autonoma de Madrid, Madrid, Spain) and Ricardo Borges (Universidad de la Laguna, Tenerife, Spain) for the critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Spanish Dirección General de Investigación Científica y Técnica (BMC2002-00845) and Dirección General de Enseñanzas Universitarias e Investigación de la Generalitat Valenciana (GV01-6). P.N. and D.G. are recipients of a Generalitat Valenciana and Ministerio de Ciencia y Tecnología fellowships, respectively.

Abbreviations

BDM, 2,3-butanodione monoxime; ROI, region of interest.

References

- Almazan, G., Aunis, D., Garcia, A.G., Montiel, C., Nicolas, G.P. & Sanchez-Garcia, P. (1984) Effect of collagenase on the release of [³H]-noradrenaline from bovine cultured adrenal chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.*, **81**, 599–610.
- Bernstein, B.W. & Bamberg, J.R. (1989) Cycling of actin assembly in synaptosomes and neurotransmitter release. *Neuron*, **3**, 257–265.
- Brown, S.S. (1999) Cooperation between microtubule and actin-based motor proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 63–80.
- Burgoyne, R.D., Geisow, M.J. & Barrow, J. (1982) Dissection of stages in exocytosis in the adrenal chromaffin with the use of trifluoroperazine. *Proc. R. Soc. Lond.*, **216**, 111–115.
- Cheek, T.R. & Burgoyne, R.D. (1986) Nicotin-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.*, **207**, 110–114.
- Criado, M., Gil, A., Viniestra, S. & Gutiérrez, L.M. (1999) A single amino acid near the C terminus of the synaptosome-associated protein 25 is essential for exocytosis in chromaffin cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 7256–7261.
- Gil, A., Rueda, J., Viniestra, S. & Gutiérrez, L.M. (2000) The cytoskeleton modulates slow secretory components rather than readily releasable vesicle pools in bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, **98**, 605–614.
- Gil, A., Viniestra, S. & Gutiérrez, L.M. (1998) Dual effects of botulinum neurotoxin A on the secretory stages of chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 3369–3378.
- Gutiérrez, L.M., Viniestra, S., Rueda, J., Ferrer-Montiel, A.-V., Canaves, J. & Montal, M. (1997) A peptide that mimics the C-terminal sequence of SNAP-25 inhibits secretory vesicle docking in chromaffin cells. *J. Biol. Chem.*, **272**, 2634–2639.
- Heidemann, S.R., Landers, J.M. & Hamborg, M.A. (1981) Polarity orientation of axonal microtubules. *J. Cell Biol.*, **91**, 661–665.
- Herrington, J. & Bookman, R.J. (1994) *Pulse Control. V4.3: IGOR Xops for Patch Clamp Data Acquisition and Capacitance Measurements*. University of Miami Press, Miami.
- Herrmann, C., Wray, J., Travers, F. & Barman, T. (1992) Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPases. An example of an uncompetitive inhibitor. *Biochemistry*, **31**, 12227–12232.
- Johns, L.M., Levitan, E.S., Shelden, E.A., Holz, R.W. & Axelrod, D. (2001) Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin cells. *J. Cell Biol.*, **153**, 177–190.
- Lang, T., Wacker, I., Wunderlic, I., Rohrbach, A., Giese, G., Soldati, T. & Almers, W. (2000) Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys. J.*, **78**, 2863–2877.
- Llinas, R., McGuinness, T.L., Leonard, C.S., Sugimori, M. & Greengard, P. (1985) Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **82**, 3035–3039.
- Lukas, T.J., Mirzoeva, S., Slomczynska, U. & Watterson, D.M. (1999) Identification of novel classes of protein kinase inhibitors using combinatorial peptide chemistry based on functional genomics knowledge. *J. Med. Chem.*, **142**, 910–919.
- McKay, D.B. & Schneider, A.S. (1984) Selective inhibition of cholinergic receptor-mediated ⁴⁵Ca²⁺ uptake and catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells by taxol and vinblastine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **231**, 102–108.

- Mochida, S., Kobayashi, H., Matsuda, Y., Yuda, Y., Muramoto, K. & Nonomura, Y. (1994) Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed between rat sympathetic neurons in culture. *Neuron*, **13**, 1131–1142.
- Neco, P., Gil, A., Frances, M.M., Viniegra, S. & Gutiérrez, L.M. (2002) The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion. *Biochem. J.*, **368**, 405–413.
- Oheim, M. & Stühmer, W. (2000) Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur. Biophys. J.*, **29**, 67–89.
- Perrin, D. & Aunis, D. (1985) Reorganization of fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature*, **315**, 589–591.
- Plattner, H., Artalejo, A.R. & Neher, E. (1997) Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex—Analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *J. Cell. Biol.*, **139**, 1709–1717.
- Ryan, T.A. (1999) Inhibitors of myosin light chain kinase block synaptic vesicle pool mobilization during action potential firing. *J. Neurosci.*, **19**, 1317–1323.
- Steyer, J.A. & Almers, W. (1999) Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys. J.*, **76**, 2262–2271.
- Thuret-Carnahan, J., Bossu, J.-L., Feltz, A., Langley, K. & Aunis, D. (1985) Effect of taxol on secretory cells: functional, morphological, and electrophysiological correlates. *J. Cell Biol.*, **100**, 1863–1874.
- Trifaró, J.-M., Kenigsberg, R.L., Coté, A., Lee, R.W. & Hikita, T. (1984) Adrenal paraneurone contractile proteins and stimulus-secretion coupling. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **62**, 493–501.
- Vitale, M.L., Seward, E.P. & Trifaró, J.-M. (1995) Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron*, **14**, 353–363.
- Viveros, O.H. (1974) Mechanism of secretion of catecholamines from the adrenal medulla. In Blasko, H., Sayers, G. & Smith, A.D. (Eds), *Handbook of Endocrinology*. American Physiology Society, Baltimore, pp. 389–426.





ANEXO III

Luis M. Gutiérrez, PhD
Instituto de Neurociencias
CSIC-Universidad Miguel Hernández
Campus de San Juan
03550 Alicante
Spain
Tfn: 34-965-919563; Fax: 34-965-919484
E-mail: luisguti@umh.es

-----Mensaje original-----

De: jbc@asbmb.faseb.org [mailto:jbc@asbmb.faseb.org]
Enviado el: lunes, 20 de octubre de 2003 14:27
Para: luisguti@umh.es
Asunto: Your JBC submission has been received

This is an automatic notification from the Journal of Biological Chemistry.

Please do not reply to this e-mail -- if you have any questions, please go to the following web site to send feedback:
<http://osrs.jbc.org/asbmbosrs.nsf/Feedback?OpenForm&src=sub>

Thank you for submitting your article, "New Roles of Myosin II during the Vesicle Transport and Fusion in Chromaffin Cells.", to JBC. Since you submitted a single PDF, your submission will go straight into review. No further action on your part is necessary.

Note:

For New Manuscripts: If you do not receive an email acknowledgment notice containing your manuscript number and Associate Editor's name within one week of submission, please send us a message through the feedback web site above.

For Revised Manuscripts: You will not receive a second acknowledgment notice.

New Roles of Myosin II During the Vesicle Transport and Fusion in Chromaffin Cells.

Patricia Ñeco¹, Daniel Giner¹, Salvador Viniegra¹, Ricardo Borges², Alvaro Villarroel³ and Luis M. Gutiérrez¹

1. Instituto de Neurociencias, Centro Mixto CSIC-Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain.
2. Unidad de Farmacología, Facultad de Medicina Universidad de la Laguna, Tenerife, Spain.
3. Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain.

Abbreviated title: Myosin II activity during exocytosis.

Ms Statistics:

42399 characters

7 Figures and 1 Table

Corresponding author: Luis M. Gutiérrez. Instituto de Neurociencias, Centro Mixto CSIC-Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan., 03550 Alicante, Spain

Phone: +34-96-5919563

Fax: +34-96-5919484

E-mail: luisguti@umh.es

Key words: exocytosis, amperometry, bovine adrenomedullary cells, cytoskeleton, vesicle transport

Abstract.- Modified Herpes Virus (amplicons) were used to express Myosin Regulatory Light Chain (RLC) chimeras with GFP in cultured bovine chromaffin cells to study myosin II implication in secretion. After infection, RLC-GFP constructs were clearly identified in the nucleus and in the cytoplasm, co-localising with myosin II. Cells expressing wild type RLC-GFP maintained normal vesicle mobility, while cells expressing an unphosphorylatable form T18A/S19A RLC-GFP presented severe restrictions in granule movement as measured by dynamic confocal microscopy. Interestingly, the overexpression of this mutant form of RLC also affected the initial secretory burst elicited by either high K^+ or $BaCl_2$ as well as and by fast release of calcium from cage compounds. Moreover, T18A/S19A RLC-GFP infected cells presented slower kinetics of fusion of individual granules compared with controls. Taken together, our results demonstrate the implication of myosin II in the transport of vesicles, and, surprisingly, in the final phases of exocytosis, uncovering a new role for this cytoskeletal element.

Introduction

Neuroendocrine chromaffin cells have been widely used as a model to study exocytosis of dense vesicles. These cells release catecholamines in a calcium-dependent process involving granule transport, translocation, docking to the active sites and, finally, membrane fusion with extrusion of soluble contents by exocytosis (Viveros, 1974). Cytoskeletal proteins play an essential role among the cytosolic elements organizing the transport of vesicles from the internal regions where chromaffin granule biogenesis takes place towards the subcortical region where they are stored to form a reserve pool to sustain continuous stimulation (Ñeco et al., 2003). In this sense, peripheral F-actin forming a network layer beneath the plasma membrane, constitutes a barrier that exclude vesicles from accessing releasing sites (Perrin and Aunis, 1985). Upon stimulation and calcium influx, a local and transient disruption of this network occurs (Cheek and Burgoyne, 1986), allowing vesicle access to the immediate subplasmalemmal area. Therefore, molecular motors associated with F-actin trails would be necessary to conduct vesicles throughout regions with different F-actin organization. A number of observations suggest that conventional myosin II activity influences catecholamine secretion. For example, chromaffin cell stimulation induces the calcium-dependent phosphorylation of the regulatory subunit of myosin light chain (RLC, Côté et al., 1986; Gutiérrez et al., 1988; Gutiérrez et al., 1989), and, as such, constitutes the basic mechanism governing the interaction of non-muscular myosin II with actin (for a review see Kamm and Stull, 1989). In addition, phosphorylation of non-muscle myosins by the specific enzyme myosin light chain kinase (MLCK), may be essential for the role of such protein in secretion, since inhibition of MLCK by a variety of

chemicals abrogates secretion in permeabilized (Lee et al., 1987; Nakanishi et al., 1989; Reig et al., 1991; Ohara-Imaizumi et al., 1992; Ñeco et al., 2002) or intact chromaffin cells (Ñeco et al., 2003). Nevertheless, the relatively low specificity of most of the myosin inhibitors employed, and furthermore, the demonstration that other myosin forms, such as unconventional myosin V, may also participate in vesicle transport and secretion in chromaffin (Rosé et al., 2003) or in PC 12 cells (Rudolf et al., 2003), makes desirable the use of alternative experimental strategies to further support the specific implication of myosin II in secretion. The expression of RLC and its unphosphorylatable double mutant, were used to demonstrate the participation of myosin II in mitosis and cytokinesis (Komatsu et al., 2000). In this work, we used this strategy in combination with dynamic confocal microscopy and single cell amperometry to demonstrate myosin II participation in different steps of the secretory cascade. Our data suggest that, in addition to the traditional role of myosin II in vesicle transport, this motor protein influences the very final events of membrane fusion, therefore unmasking a new role previously ignored.

Results

Expression of myosin regulatory light chain constructs with GFP in bovine chromaffin cells.

In order to study myosin II implication during chromaffin cell secretion, we expressed wild type and unphosphorylatable myosin regulatory light chain (RLC, Komatsu et al., 2000). An amplicon viral infection system was employed to express RLC linked by its N-terminus to enhanced green fluorescent protein (RLC-GFP) in chromaffin

cells following a strategy that has been successful for other proteins (Criado et al., 1999; Gíl et al., 2002). Under these conditions, infection of cultured bovine chromaffin cells resulted in the expression of the RLC-GFP constructs in 10-15 % of the cells. Confocal microscopy of cells over-expressing wild type or the unphosphorylatable T18A/S19A RLC-GFP revealed a similar cellular distribution in the nucleus, in the cytoplasm and in the cell periphery (Figure 1 A). Interestingly, RLC-GFP constructs in the cytoplasm formed a network that extended from perinuclear to subplasmalemmal regions, where the protein was also concentrated (Figure 1 B). Furthermore, RLC-GFP expression was clearly linked to myosin II since immunocytochemistry with anti-myosin II demonstrated a clear co-localization of RLC-GFP (Figure 1 C) and anti-myosin II (Figure 1 D), as observed by the intense yellow color indicating superposition of both channels sequentially detected in a confocal image of a cell expressing the T18A/S19A construct (Figure 1 E).

Expression of unphosphorylatable forms of RLC affected vesicle transport in the cytoplasm of chromaffin cells.

Would the expression of RLC-GFP constructs affect the granule transport properties in the cytoplasm of chromaffin cells? To answer this question the dynamics of quinacrine loaded dense granules was studied by confocal microscopy (Ñeco et al 2002; Ñeco et al., 2003). Brilliant fluorescence intensity of moving granules can be easily visualized and tracked in the cytoplasm of the cells expressing wild type RLC-GFP (Figure 2 A). A clear indication of the elevated mobility of granules in these time-lapse

images taken at 1 Hz during 1 min is the calculation of the average frame that produced blurry images of the granule trajectories adopted during the observation time as depicted in Figure 2 B. Another simple approach to assess the high mobility of these vesicles is to draw a region of interest box (ROI) and measure fluorescence variations due to the presence of a granule, as the indicated with the arrow in Figure 2 A. The fluctuations in fluorescence reflected vesicle tendency to enter and leave the confocal plane in periods lasting 3-7 s, in a way that was similar to the mobility of vesicles in control uninfected cells (Ñeco et al., 2003). Conversely, relatively static granules were observed in the time-lapse images of cells expressing the unphosphorylatable T18A/S19A RLC-GFP construct (Figure 2 C). In this figure showing frames separated by 10 s, granules were observed adopting the same positions during the recording time. In consequence, the average frame depicted unchanged granule positions that localized over the network of static RLC-GFP fluorescence as could be clearly observed in Figure 2 D, and the ROI analysis of a vesicle shows minor fluorescence fluctuations compared to mobile granules (Figure 2 E).

Further quantification of this reduction in vesicle mobility was obtained by tracking vesicles and studying their XY positions. Figure 3 A depicts an example of vesicle displacement in wild type RLC-GFP expressing cells. Using this type of data corresponding to 48 vesicles staying in the confocal plane for more than 10 s and from 9 different cells, we obtained the mean square displacement (MSD) at different time intervals and these values were averaged to generate the MSD vs time plot. Assuming that movement is governed by a single coefficient of diffusion, its value can be derived

from the fitted slope (slope=4xD, Qian et al., 1991). The diffusion coefficient was calculated to be $10.1 \pm 1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ for RLC-GFP moving granules, that was similar to the calculated for granules corresponding to uninfected control cells ($8.68 \pm 0.99 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$, n=27 vesicles from 10 cells). As showed before, the over-expression of T18A/S19A RLC-GFP construct resulted in a drastic change in vesicle mobility and an example granule moved in a restricted way (Figure 3 B). MSD calculations and representation for the different intervals resulted in a severe reduction of the slope and the theoretical coefficient of diffusion that was estimated to be $0.32 \pm 0.02 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (n=44 vesicles from 10 cells), twenty times lower that the characteristic for granules in cells expressing the wild type form of myosin RLC. This reduction in vesicle mobility was similar to that caused by incubation of the control cells with $1 \mu\text{M}$ of the F-actin stabilizing agent phalloidin during 30 min (Figure 3 B). Phalloidin treatment dropped the apparent coefficient of diffusion to $0.24 \pm 0.01 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (n=29 vesicles from 6 cells). We also tested the effect the incubation of control cells with the inhibitor of the ATPase of myosin, BDM (20 mM, 15 min, Herrmann et al., 1992), which resulted in a slight higher vesicle activity with a diffusion coefficient of $1.23 \pm 0.03 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (n=24 vesicles, from 11 cells, Figure 3 B).

Secretion induced by different secretagogues decreased in cells expressing unphosphorylatable GFP-RLC.

What would be the impact on secretion produced by this drastic reduction in vesicle motion? Chromaffin cells expressing these constructs were tested in their ability

to secrete catecholamines in response to different stimuli. Continuous cell depolarization by superfusion with a 59 mM KCl solution resulted in the release of individual vesicles as assessed by single cell amperometry. Secretion in control-non fluorescent cells was characterized by an initial burst of secretion lasting for 20 s followed by a sustained phase of slower secretion after that period (Figure 4 A). Using cumulative histograms of amperometric events corresponding to individual responses, we could obtain the average profile of secretion for 25 cells corresponding to 4 different cultures, as observed in Figure 4 B (29 ± 4 vesicles fused at 60 s after initiating depolarization). Expression of the wild type RLC-GFP construct resulted in very similar profiles of depolarizing-evoked responses, that in average were not reduced in a statistically significant manner when compared to control cells (Figure 4 B, 28 ± 5 vesicles fused during 60 s, n=30 cells). Instead, chromaffin cells expressing the T18A/S19A RLC-GFP construct presented a clear reduction in the capability of secrete catecholamines by direct depolarization as shown in the example depicted in Figure 4 A. The averaged profile of secretion corresponding to 40 individual responses indicate a 40 % reduction in the total number of vesicles fused along the first minute (17 ± 2 vesicles) of continuous depolarization. Interestingly, this reduction in the number of fused vesicles affects both the initial burst and the late phase of release. Hence, the initial rate of release changed from 0.68 ± 0.02 vesicles fused/s in cells expressing wild type RLC-GFP to 0.27 ± 0.02 vesicles fused/s in T18A/S19A RLC-GFP expressing cells ($p < 0.0001$ using Student *t* test , slope calculated using data gathered during the initial 10 seconds). This result was somewhat surprising since myosin II is expected to only alter the transport of

vesicles and, therefore, the slow phases of secretion leaving unaffected the release of fast secretory components of docked vesicles.

Furthermore, the use of an alternative secretagogue, such as BaCl_2 , produced similar results, as the expression of the T18A/S19A RLC-GFP construct reduced the capability of secretion that was half of the response obtained in cells expressing the wild type RLC-GFP construct as shown in Figure 5 (21 ± 3 vesicles fused at 1 min, $n=33$ cells). Again, the profile of secretion obtained with this secretory agent was affected by the expression of the unphosphorylatable form of myosin II RLC, and both initial and slow phases of secretion presented a statistically significant reduction in the number of vesicle fusions forming part of these kinetically distinct secretory components (9 ± 1 vesicles released at 1 min, $n=22$ cells). Again, the initial rate of release was reduced from 0.61 ± 0.02 (wild type RLC-GFP) to 0.19 ± 0.01 vesicles fused/s (T18A/S19A RLC-GFP), being highly significant at the statistical level ($p < 0.0001$).

Unphosphorylatable RLC over-expression affects the fast release produced by uncaged calcium.

In order to further assess the alteration of the initial phases of secretion in cells expressing the mutated form of RLC-GFP, we conceived experiments using fast release of caged calcium. Cells were incubated with a $5 \mu\text{M}$ concentration of o-nitrophenyl EGTA-AM (NP-EGTA, Ellis-Davies and Kaplan, 1994) during 30 min. After an intense 5 ms flash, uncaged calcium produced a rapid elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimated in 900 ± 400 nM ($n=24$ cells) from the basal levels of 80-140 nM as assessed by using

Fura 2-AM. This elevation caused a rapid release of vesicles in control and in wild type RLC-GFP expressing cells as detected by amperometry (Figure 6 A, example trace). A second flash (post-flash) was given to assess total release of cage calcium in the first trial, and no further secretion was detected as observed in the example depicted in Figure 6. This second post-flash recording was subtracted to eliminate the flash artifact from the first recording leaving the net amperometric response (Figure 6 A). The averaged cumulative response was obtained after integration of these responses for several cells that was similar in magnitude for control uninfected and cells expressing wild type RLC-GFP (Figure 6 B). The number of vesicle fusions using flash stimulation were clearly reduced in cells expressing the T18A/S19A RLC-GFP, as evidenced in the example depicted in Figure 6 A. After integration of responses corresponding to 16 cells, the averaged secretion profile characterised by a 50-55 % reduction in the level of secretion and a clear alteration of the initial rate of release that changed from 8.54 ± 0.12 in wild type RLC-GFP expressing cells to 3.91 ± 0.13 pC/s in cells expressing the T18A/S19A RLC-GFP construct ($p < 0.0001$, slope calculated using the initial 5 s).

Expression T18A/S19A RLC-GFP construct slows the single vesicle fusion kinetics

The study of the individual fusion kinetics could be potentially useful to elucidate the mechanisms underlying the differential effects of RLC-GFP constructs. This is possible by analyzing the shape of single amperometric events (Schroeder et al., 1996) using carbon fiber electrodes. The analysis was performed in BaCl₂ stimulated cells, in

order to searching for well-separated spikes with amplitudes over 2.5 pA. We measured their amplitude (I_{max}), event charge (Q), half-width ($t_{1/2}$) and time-to-the-peak (T_p), (Segura et al. 2000). Non-infected cells or cells expressing wild-type RLC-GFP were characterized by a very similar pattern of distribution, showing mean amplitudes of 68 and 73 pA (Figure 7 A and Table I), respectively. However, the mean amplitude obtained with mutants T18A/S19A RLC-GFP (Figure 7 A and Table I) was clearly reduced to half of the control value (32 ± 5 pA). Moreover, amplitude values over 70 pA, which were relatively abundant in control cells were absent in this case. On the other hand, the observed alteration in the mean amplitude did not represent a subsequent change in the amount of catecholamines released per event, since charge remained relatively unaltered in control, wild type RLC-GFP and the double mutant T18A/S19A RLC-GFP, ranging from average values of 1.3 to 1.5 pC (Figure 7 B and Table I). In contrast, significant differences in the kinetics of exocytosis were observed in T18A/S19A RLC-GFP expressing cells when compared with control or wild type RLC construct (Figure 7 C and Table I). Thus, the $t_{1/2}$ for control was characterized by mean values of around 17-19 ms whereas the T18A/S19A RLC-GFP constructs presented mean value of 28.4 ± 2.0 ms (Figure 7 C). Similarly, the time-to-the-peak distributions were characterized by larger values in the RLC non-phosphorylatable mutant (mean of 19.5 ms) compared to the mean values of 8.5 and 9.4 ms for the controls and wild type RLC-GFP construct, respectively. Taken together all the modifications in the single vesicle fusion parameters, it is clearly demonstrated that the secretory events found in cells expressing the T18A/S19A RLC-GFP construct were considerably slower than

control or wild type RLC-GFP expressing cells, maintaining the charge released per event (Figure 7 E). These data demonstrates that myosin II activity influences the very final events linked to the exocytotic fusion of membranes and the release of catecholamines in this neuroendocrine cell model. In agreement with this conclusion, we have observed than control cells incubated with 20 mM BDM during 2 min secreted catecholamines with significant slower kinetics of individual granule fusion (Table I), thus mimicking the effect caused by the expression of the non-phosphorylatable form of RLC-GFP.

DISCUSSION

In this study, we have found that the expression of an unphosphorylatable form of myosin II RLC-GFP induced a severe modification of the vesicle mobility properties and the secretory capability of bovine chromaffin cells in culture. Interestingly, the alteration of the initial phase of secretion in cells stimulated by different secretagogues, and, moreover, in the fast components of secretion after calcium released from cage compounds demonstrates that myosin II modulates the fusion of ready-releasable vesicles. This unexpected result is further supported by the finding that the expression of this double mutant also modified the kinetics of exocytosis of individual vesicles analyzed by amperometry.

An important aspect of our study is the assessment that the expression of wild-type RLC-GFP support both the normal vesicle transport activity and the characteristics of secretion in bovine chromaffin cells in culture, therefore validating the use of this

construct as a template to study the effect of specific mutations over the secretory cycle. In effect, the mobility of vesicles visualized by dynamic confocal microscopy of quinacrine-loaded granules, matched closely that found in control-uninfected cells. This high mobility was characteristic of cytosolic granules in intact chromaffin cells (Ñeco et al., 2003) and produced an average displacement in the XY plane of about 3-4 $\mu\text{m}/20\text{ s}$ with a diffusion coefficient estimated in $7\text{-}10 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$, very similar to the estimated for the “mobile” population of vesicles using TIRFM (Lang et al., 2000; Oheim and Stuhmer, 2000). In addition, the expressed wild-type RLC-GFP construct sustained the exocytotic properties of bovine chromaffin cells, since the secretory capability and its kinetic profiles during single cell stimulation were similar to the control cells not expressing such constructs. It was also coincident with the average secretory capability and single fusion kinetics described for amplicon infected chromaffin cells in previous works (Gíl et al., 2002). These results support the idea that the expressed RLC interacted with endogenous myosin II heavy chain and therefore co-localized with anti-myosin II labeling as reported here. In addition, it has been described the capability of the RLC-GFP chimeric protein in binding stoichiometrically to smooth muscle RLC-deficient myosin II and support the actin-activated ATPase activity of myosin modulated by MLCK phosphorylation (Komatsu et al., 2000).

In contrast, expression of the double mutant chimera T18A/S19A RLC-GFP, yielding a unphosphorylatable form of myosin II by MLCK and precluding activation of its motor activity (Kamm and Stull, 1989), affected the physiology of chromaffin cells in various ways. First, granule transport in the cytosol was clearly diminished reaching a

degree of restriction in mobility that was similar to that obtained by incubation of the cells with the F-actin stabilizer phalloidin and even higher than that reached in the presence of the myosin inhibitor BDM (Lang et al., 2000; Ñeco et al., 2002; Ñeco et al., 2003). This suggest clearly, that expression of this construct yields an static network of F-actin incapable of sustain the normal transport of vesicles and therefore that the mechanism of myosin II regulation by RLC phosphorylation by MLCK appear essential to support F-actin dynamics in this neuroendocrine model. Secondly, cells expressing this construct also manifested altered secretory properties when individual cells are challenged by KCl depolarization or in the presence of BaCl_2 , two secretagogues that appeared to recruit populations of granules in different stages of maturation (Duncan et al., 2003). Unexpectedly, inhibition of secretion was affecting the initial rate of release as observed in Figures 4 and 5, whereas the alteration of a protein merely implicated in vesicle transport was expected to influence preferentially slow phases of secretion leaving almost unaffected the initial secretory burst. This secretory pattern was observed, for example, when low concentrations of BoNT A affected selectively the release of undocked vesicles (Gíl et al., 1998). This observation was further supported when the initial rate of vesicle fusions after uncaging Ca^{2+} was also affected in cells expressing the unphosphorylatable form of RLC-GFP. In this case, the fast and homogeneous rise in calcium ensured the release of the ready releasable granules. These results, demonstrating an alteration of the initial rate of release, agreed with previous data showing an alteration of ATP-independent secretion with wortmannin in permeabilized chromaffin cells (Ohara-Imaizumi et al., 1992; Kumakura et al., 1994) or

BDM affected the rate of release of permeabilized and intact cells (Ñeco et al., 2002; Ñeco et al., 2003). Other piece of information contributing to demonstrate that the alteration of myosin II activity by expression of an unphosphorylatable form affected the release of matured docked vesicles was provided by the analysis of individual fusion kinetics from amperometric recordings. It has been show that the statistical analysis of the parameters defining the shape of amperometric spikes reflected the single fusion kinetics (Schroeder et al., 1996). The average characteristics of lower amplitude, increased $t_{1/2}$, and equal charge released per amperometric event found in T18A/S19A RLC-GFP expressing cells proved slower kinetics of single granule fusion in the presence of the unphosphorylatable form of myosin II, an effect that has been found also when control cells were treated with BDM. This might imply that myosin II activity influenced either the kinetics of exocytotic pore expansion or the degree of neurotransmitter dissociation from the vesicular matrix. It is unlikely that myosin II could influence processes taking place in the interior of the vesicular matrix, therefore we favor the first possibility. How, myosin II could influence the very final phases of membrane fusion? It has been shown that this cytoskeletal protein is associated with the F-actin network (Kumakura et al., 1994; Ñeco et al., 2002), and that even the most external docked granules remained associated with filaments of this meshwork (Ñeco et al., 2003), therefore the requirements for an appropriated spatial coincidence between matured vesicles and myosin II seems to be possible. In that way, the dynamics of the network of F-actin and myosin II could create a tensional pressure influencing the extrusion of vesicular contents. Alternatively, myosin II might be able of influence the activity of the

molecular machinery of exocytosis. In this sense, an association has been demonstrated between the tail of the heavy chain of unconventional myosin V and synaptobrevin II forming part of the exocytotic fusion complex in synaptic vesicles (Prekeris and Terrian, 1997). It is tempting to suggest that myosins, through an interaction with synaptobrevin, could be modulating the series of transitions occurring in the exocytotic fusion complex and could be modulating priming or maturation membrane-bound steps of secretory vesicles (Südhof, 1995).

In addition, our experiments cannot completely discard that myosin II could be involving in the sorting of chromaffin granules towards their exocytotic places, thus favoring the access of a subpopulation of granules whereas impaled the access of others. This latter hypothesis would be supported by the recent discovery that new formed granules gained preferential access to the exocytotic places over the older vesicles (Duncan et al, 2003). If myosin II abolish the access of these young vesicles, it could be also possible that the older yielded a less efficient exocytotic kinetics.

In conclusion, the present work demonstrates that cytoskeletal elements such as conventional myosin II affect different stages of the exocytotic process and not merely the transport of vesicles. Orienting research toward the new proposed interactions may clarify aspects helping to unravel the complexity of the exocytotic cycle.

Materials and Methods

Materials

Oligonucleotides were synthesized by Genotech. TaqDNA polimerase was obtained from BioTools, Madrid. Ligase and restriction endonucleases were purchased from Fermentas, St.Leon-Rot, Germany. All of other reagents were purchased from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain.

Production of Wild Type and mutant forms of RLC-GFP constructs

A plasmid encoding Chicken-gizzard-smooth muscle RLC (a gift of Dr Kendrick-Jones, MRC, Cambridge, UK) was used for site-directed PCR cassette mutagenesis. The modifications were confirmed by sequencing in both directions.

pRLC-wt-GFP and pRLC-T18A/S19A-GFP was generated using pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA). The final construct was obtained by NheI/MunI digestion and inserted into a XbaI/EcoRI-digested pHSVpuc amplicon, upstream the IE 4/5 promoter. Packaging and amplification of this vector were performed using standard procedures (Lim et al., 1996).

Chromaffin Cell preparation and Infection

Chromaffin cells were prepared from bovine adrenal glands by collagenase digestion and further separated from debris and erythrocytes by centrifugation on Percoll gradients as described (Almazan et al., 1984; Ñeco et al. 2002). Cells were suspended in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 10 μ M cytosine arabinoside, 10 μ M fluorodeoxyuridine, 50 IU/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin. For flash-photolysis

and amperometrical experiments, cells were plated on 28 and 12 mm-diameter glass coverslips, respectively, at a density of 5×10^5 cells/well and for confocal microscopy studies, cells were plated in 35 mm diameter Petri dishes (Corning Inc., Corning, NY, USA) at the same density.

Primary cultures of chromaffin cells were infected with a Herpes Simplex virus (HSV-1) amplicon containing the constructs described above. Efficiency of virus infection was determined by fluorescent microscopy, using serial dilutions of purified virus. The dilution chosen for further experiments (20-30 μ l virus per 1 ml of medium) produced 10-15% infection efficiency. GFP fluorescence was observed one day after infection and persisted, at least, along the two following days. Amperometric measurements were carried out during this time.

Amperometric detection of secretion in individual chromaffin cells

Secretory activity in non-infected and infected single chromaffin cells was studied at room temperature (21-22 °C) and stimulating the cells by superfusion with depolarizing 59 mM high potassium as described (Gíl et al., 1998, Criado et al., 1999, Gíl et al., 2000). Briefly, we prepared microelectrodes by insulating 10 μ m-diameter carbon fibers with polypropylene. Electrochemical recordings were performed using an Axopatch 200A and 200B (Axon Instruments, Foster City, CA, U.S.A.). Oxidized current was filtered at a corner frequency of 400 Hz using a 8-poles low-pass Bessel filter and acquired at 5 KHz. Electrodes were backfilled with mercury to connect to the headstage. Carbon electrodes are gently placed onto the cell membrane using high precision hydraulic micromanipulation and assessing cell membrane deformation with an Axiovert

135 inverted-stage microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) mounting Hoffman optics (Modulation Optics, Greenvale, NY). Cells were bathed in a Krebs-HEPES solution containing (in mmol/L): NaCl (140); KCl (5); MgCl₂ (1.2); CaCl₂ (2); HEPES (10); Glucose (11), and pH adjusted to 7.4 using a NaOH solution. Cells were stimulated by superfusion with depolarizing (59 mM high potassium solution obtained by replacing isosmotically NaCl by KCl) or BaCl₂ 5 mM solutions and applied through a valve-controlled puffer tip commanded by the acquisition software and disposed near the studied cells.

Microelectrodes employed in experiments to study individual events, were prepared with 10 µm-diameter carbon fiber in glass as previously described (Kawagoe et al., 1991), and polished at a 45° angle on a diamond dust-embedded micropipette beveling wheel. These electrodes were calibrated using a flow-injection system with a 50 µM norepinephrine. Secretion is elicited by 5 s pulse of a secretagogue (5 mM BaCl) from a glass micropipette located 40 µm from the cell. Individual spike analysis was performed using macros for IGOR (Wavemetrics, Lake Oswego, OR. USA), allowing for peak detection, integration and kinetic parameter calculations (Segura et al. 2000). Electrode variations were alleviated by using the same electrode for measurements in control (non-infected) and infected cells.

Flash-photolysis experiments

Photorelease of calcium from cage compounds was done using a 5 µM concentration of o-nitrophenyl EGTA-AM (NP-EGTA, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in Krebs-HEPES buffer and incubated during 30 min., after 3 washes, the glass coverslip

containing the cells was mounted in the stage of a Zeiss Axiovert 100 S inverted microscope using a 100x Plan-Neofluar objective. In this system a dual-port condenser allowed excitation of the specimen with a monochromator Polychrome IV (8 % incoming light, Till-Photonics, Munich, Germany) and simultaneous application of a 5 ms UV flash using a pulsed Xenon arc lamp system (92 % incoming light, UV Flash II, Till-Photonics), therefore allowing $[Ca^{2+}]_i$ measurements using Fura 2 excitation at 340/380 nm (for this purpose 4 μ M Fura 2-AM was incubated simultaneously with the NP-EGTA). Fluorescence emission from a 20x20 μ m restricted area (Viewfinder III, Till-Photonics) was detected in a photomultiplier tube (Hamamatsu Inc., Hamamatsu, Japan). Control of excitation light and acquisition were performed through PClamp 8.0 software (Axon Instruments, Foster City, CA, U.S.A) in a PC computer. Calculation of $[Ca^{2+}]_i$ was performed using a dissociation constant of 224 nM for Fura-2 (Grynkiewicz et al., 1985), with minor corrections after application of the flash (Haller et al., 1999). In all the experiments, a second flash was given to assess that no further calcium was released and the trace obtained was subtracted from the first flash to eliminate the flash artifact (see significance of this procedure in Figure 6). Calcium elevation causes a rapid release of vesicles in control or wild type RLC-GFP expressing cells as detected by amperometry (Figure 6 A, example trace).

Dynamic confocal microscopy studies of chromaffin granule mobility and RLC-GFP expression.

Infected cells expressing the RLC-GFP constructs were labeled with 4 μ M quinacrine for 10 min and vesicle movements studied by dynamic confocal microscopy as described elsewhere (Ñeco et al., 2002; Ñeco et al., 2003). Briefly, fluorescent emission from quinacrine trapped in the acidic vesicles was investigated using an Olympus Fluoview FV300 confocal laser system and with a BX-50 WI up-right microscope incorporating a 100X LUMPlan FI water-immersion objective. This system allows for z axis reconstruction (0.5 μ m z slice) and time lapse dynamic studies with time resolutions ranging from 0.1 s for 200x150 pixels image acquisition (adequate for region studies) to about 0.6 s for images of 400x300 pixels (for visualization of the entire cell). Analysis of frames was performed using the public domain program ImageJ with Plugins for X/Y displacement calculations of particle centroid, ROI measurement and image average and comparison. MSD and diffusion coefficient calculations were performed using the equations described by Qian et al. (1991).

In some experiments, labeling of myosin II in permeabilized and delipided cells was performed as described before (Lazarides, 1976; Ñeco et al., 2002). Briefly, after fixation, cells were incubated overnight with 1:200 dilution of a mouse monoclonal antiserum to non-muscular myosin II (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA, USA) in PBS containing 3 % bovine serum albumin. After extensive washes, secondary goat anti-mouse coupled to rhodamine (Amersham Inc., Buckinghamshire, U.K.) was incubated during 2 h, followed by 3 washes previous to the visualization in the confocal microscope.

The Student's t-test for unpaired samples, the Mann-Whitney non-parametric test, or the two-way ANOVA tests were used to establish statistical significance among the different experimental data (samples were considered significantly different when $p < 0.05$). All data were expressed as mean \pm SEM from experiments performed in a number (n) of individual cells or wells. Presented data represents experiments performed with cells from at least three different cultures.

Acknowledgements.

This work was supported by a Grants from The Spanish Ministry of Science and Technology BMC2002-00845, P.Ñ. and D.G. are recipients of fellowships from the Generalitat Valenciana and Spanish MST, respectively.

Abbreviations: BDM, 2,3-butanedione monoxime; MLC, myosin light chain; MLCK, myosin light chain kinase; NP-EGTA, o-nitrophenyl EGTA-AM; RLC, regulatory light chain.

References

- Almazán G., D. Aunis, A.G. García, C. Montiel, G.P. Nicolás and P. Sanchez-García. 1984. Effect of collagenase on the release of [3H]-noradrenaline from bovine cultured adrenal chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.* 81: 599-610.
- Cheek, T.R. and R.D. Burgoyne. 1986. Nicotin-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.* 207: 110-114.

- Coté, A., J-P Doucet, and J-M. Trifaró. 1986. Phosphorylation and dephosphorylation of chromaffin cell proteins in response to stimulation. *Neuroscience*. 19: 629-645.
- Criado, M., A. Gil, S. Viniegra, and L.M. Gutiérrez. 1999. A single amino acid near the C terminus of the synaptosome-associated protein 25 is essential for exocytosis in chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 7256-7261.
- Duncan, R.R., J. Greaves, U.K. Wiegand, I. Matskevich, G. Bodammer, D.K. Apps, M.J Shipston, and R.H. Chow. 2003. Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature*. 422: 176-80.
- Ellis-Davies, G.C., and J.H. Kaplan. 1994. Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator that selectively binds Ca^{2+} with high affinity and releases it rapidly upon photolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 187-191.
- Gíl, A., J. Rueda, S. Viniegra, and L.M. Gutiérrez. 2000. The cytoskeleton modulates slow secretory components rather than readily releasable vesicle pools in bovine chromaffin cells. *Neuroscience*. 98: 605-614.
- Gíl, A., S. Viniegra, and L.M. Gutiérrez. 1998. Dual effects of botulinum neurotoxin A on the secretory stages of chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci*. 10: 3369-3378.
- Gíl, A., L.M. Gutiérrez, C. Carrasco-Serrano, T. Alonso, S. Viniegra, and M. Criado. 2002. Modifications in the C-terminus of the synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) and in the complementary region of synaptobrevin affect the final steps of exocytosis. *J. Biol. Chem*. 277: 9904-9910.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem*. 260: 3440-50.

Gutiérrez, L. M., J.J. Ballesta, M.J. Hidalgo, L. Gandía, A.G. García, and J.A. Reig. 1988.

A two-dimensional electrophoresis study of phosphorylation and dephosphorylation of chromaffin cell proteins in response to a secretory stimulus. *J. Neurochem.* 51: 1023-1030.

Gutiérrez, L.M., M.J. Hidalgo, M. Palmero, J.J. Ballesta, J.A. Reig, A.G. García, and S.

Viniegra. 1989. Phosphorylation of myosin light chain from adrenomedullary chromaffin cells in culture. *Biochem. J.* 264: 589-596.

Haller, T., K. Auktor, M. Frick, N. Mair, and P. Dietl. (1999) Threshold calcium levels for

lamellar body exocytosis in type II pneumocytes. *Am. J. Physiol.* 277: L893-900.

Herrmann, C., J. Wray, F. Travers, and T. Barman. 1992. Effect of 2,3-butanedione

monoxime on myosin and myofibrillar ATPases. An example of an uncompetitive inhibitor. *Biochemistry.* 31: 12227-12232.

Kamm, K. E., and J.T. Stull. 1989. Regulation of smooth muscle contractile elements by

second messengers. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 299-313.

Kawagoe, K.T., J.B. Zimmerman, and R.M. Wightman. 1993. Principles of voltammetry

and microelectrode surface states. *J. Neurosci. Meth.* 48: 225-240.

Komatsu, S., T. Yano, M. Shibata, R.A. Tuft, and M. Ikebe. 2000. Effects of the

regulatory light chain phosphorylation of myosin II on mitosis and cytokinesis of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 275: 34512-20.

Kumakura, K., K. Sasaki, T. Sakurai, M. Ohara-Imaizumi, H. Misonou, S. Nakamura, Y.

Matsuda, and Y. Nonomura. 1994. Essential role of myosin light chain kinase in the

- mechanism for MgATP-dependent priming of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.* 14: 7695-703.
- Lang, T., I. Wacker, I. Wunderlic, A. Rohrbach, G. Giese, T. Soldati, and W. Almers. 2000. Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys. J.* 78: 2863-77.
- Lazarides, E. 1976. Actin, α -actinin and tropomyosin interaction in the structural organization of actin filaments in nonmuscle cells. *J. Cell. Biol.* 68: 202-219.
- Lee, S.A., R.W. Holz, and D.R. Hathaway. 1987. Effects of purified myosin light chain kinase on myosin light chain phosphorylation and catecholamine secretion in digitonin-permeabilized chromaffin cells. *Biosci. Rep.* 7: 323-332.
- Lim, F., D. Hartley, P. Starr, P. Lang, S. Song, L. Yu, Y. Wang and A.I. Geller. 1996. Generation of high-titer defective HSV-1 vectors using an IE2 deletion mutant and quantitative study of expression in cultured cortical cells. *Biotechniques* 20: 460-469.
- Nakanishi, A., M. Yoshizumi, S. Hamano, K. Morita, and M. Oka. 1989. Myosin light-chain kinase inhibitor, 1-(5-chloronaphthalene-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine (ML-9), inhibits catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells by inhibiting Ca^{2+} uptake into the cells. *Biochem. Pharmacol.* 38: 2615-2619.
- Ñeco, P., A. Gil, M.M. Francés, S. Viniegra, and L.M. Gutiérrez. 2002. The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion. *Biochem. J.* 368: 405-413.

- Ñeco, P., D. Giner, M.M. Francés, S. Viniegra, and L.M. Gutiérrez. 2003. Differential participation of actin and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci.* (In press).
- Ohara-Imaizumi, M., T. Sakurai, S. Nakamura, S. Nakanishi, Y. Matsuda, S. Muramatsu, Y. Nomura, and K. Kumakura. 1992. Inhibition of Ca^{2+} -dependent catecholamine release by myosin light chain kinase inhibitor, wortmannin, in adrenal chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 1016-1021.
- Oheim, M., and W. Stühmer. 2000. Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur. Biophys. J.* 29: 67-89.
- Perrin, D., and D. Aunis. 1985. Reorganization of fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature* 315: 589-591.
- Prekeris, R., and D.M. Terrian. 1997. Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca^{2+} -dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *J. Cell Biol.* 137: 1589-1601.
- Qian, H., M.P. Sheetz, and E.L. Elson. 1991. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys. J.* 60: 910-21.
- Reig, J.A., S. Viniegra, J.J. Ballesta, M. Palmero, and L.M. Gutiérrez, L.M. 1993. Naphtalene-sulfonamide Derivatives ML-9 and W7 inhibit catecholamine secretion on intact and permeabilized chromaffin cells. *Neurochemical Res.* 18: 317-323.
- Rosé, S. D., T. Lejen, L. Casaletti, R.E. Larson and T.D. Pene and J.M. Trifaró. 2003. Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. *J. Neurochem.* 85: 287-98.

- Rudolf, R., T. Kogel, S.S. Kuznetsov, T. Salm, O. Schlicker, A. Hellwig, J.A. 3rd Hammer, and H.H. Gerdes. (2003). Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells. *J. Cell Sci.* 116: 1339-48.
- Segura F, M.A. Brioso, J.F. Gómez, J.D. Machado, and R. Borges. 2000. Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis. *J. Neurosci. Meth.* 103: 151-156.
- Schroeder, T.J., R. Borges, J.M. Finnegan, C. Amatore, K. Pihel, and R.M. Wightman. 1996. Secretion of catecholamines in single exocytotic events occurs in three distinct kinetic steps. *Biophys. J.* 70: 1061-1068.
- Südhof, T.C. 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645-653.
- Viveros, O.H. 1974. Mechanism of secretion of catecholamines from the adrenal medulla. *In Handbook of endocrinology.* Blasko, H., Sayers, G. Smith, A.D. Eds. American Physiology Society. Baltimore. 389-426.

Figure legends

Figure 1. Cellular distribution of RLC-GFP constructs in chromaffin cells infected with amplicons. Cells over-expressing wild type RLC-GFP and the double mutant T18A/S19A RLC-GFP were studied by laser confocal microscopy. Depicted are cells expressing the wild type chimera (panel A), and an enhanced detail of a cytoplasmic zone (panel B). Panel C shows a cell expressing T18A/S19A RLC-GFP. This cell was immunolabeled with anti-myosin II using a secondary antibody coupled to rhodamine (panel D), and panel E depicts the overlapped images of both channels acquired sequentially. These images are representative of experiments performed with dozens of cells from 3 different cultures. Bars represents 1 μm .

Figure 2. Vesicle mobility observed by dynamic confocal microscopy in chromaffin cells expressing RLC-GFP constructs. Chromaffin cells were incubated with 4 μM quinacrine for 10 min and granules visualized by dynamic confocal microscopy as indicated in Methods. **A.** Time series of confocal images taken at 10 s intervals from a cell expressing wild type RLC-GFP. **B.** Averaged image from 60 frames taken at 1 Hz of the same cell depicted in panel A. The blurry image demonstrate vesicle movement during image acquisition. **C.** Frames obtained as in panel A from a cell expressing T18A/S19A RLC-GFP. **D.** Averaged image of the cell expressing the T18A/S19A RLC-GFP construct. The crispy image is an indication of the restriction of movement of vesicles in this experiment. **E.** Fluorescence changes of a ROI measuring the presence of the vesicles indicated by arrows in the cells expressing the wild type

(indicated in panel A) and the unphosphorylatable form T18A/S19A RLC-GFP (indicated in panel C). Scale bars represent 1 μm .

Figure 3. Tracking granule movements and calculation of diffusion coefficients in cells expressing RLC-GFP constructs. Vesicles movements in the XY plane were tracked using specialised software determining particle centroid. **A.** Depicted were typical examples of determined XY positions vs time for vesicles moving in wild type RLC-GFP expressing cells and also in cells expressing the T18A/S19A RLC-GFP construct. **B.** Average of square of the mean distance moved (MSD) during the time intervals expressed in the abscissa, for 27 vesicles in 10 control uninfected cells, 48 vesicles corresponding to 9 wild type RLC-GFP expressing cells, 44 granules from 10 cells expressing T18A/S19A RLC-GFP. In addition, were given MSD vs time plots for control cells treated with 1 μM phalloidin during 30 min (29 granules from 6 cells), or 20 mM BDM during 15 min (24 vesicles from 11 cells). Also plotted were the best linear fits for the different curves, used to estimate the diffusion coefficient according to Qian et al., 1991.

Figure 4. Secretory activity of chromaffin cells infected with amplicons containing myosin II RLC-GFP constructs. Secretion was monitored by amperometry using 10 μm carbon-fibre electrodes in close apposition to the cell surface. **A.** Amperometric traces representative from experiments performed in uninfected and amplicons infected cells. Traces obtained from uninfected cells (upper trace), cells expressing wild type RLC-GFP (middle trace) and cells expressing T18A/S19A RLC-GFP (lower trace).

Stimulation was performed by rapid superfusion during 1 min with a 59 mM KCl solution.

B. Cumulative event analysis. Conditions were as described in *panel A*, after building of event cumulative curves for individual cells. The average secretion was obtained from control uninfected (n=25 cells), wild type RLC-GFP (n=30 cells) and cells expressing T18A/S19A RLC-GFP GFP (n=40 cells).

Figure. 5. Barium-induced secretion from cells expressing RLC-GFP constructs.

Secretion was elicited by superfusion with 5 mM BaCl₂ in K/H basal buffer and studied by single cell amperometry as indicated in the previous figure. **A.** Examples of amperometric traces obtained from cells expressing wild type RLC-GFP and the unphosphorylatable double mutant T18A/S19A RLC-GFP. **B.** Cumulative secretory responses were obtained from individual cell responses and averaged for cells expressing constructs of wild type RLC-GFP (n=33 cells), and T18A/S19A RLC-GFP GFP (n=22 cells).

Figure 6. Secretory response to fast release of calcium from cage compounds in RLC-GFP expressing cells.

Secretion was monitored by amperometry as described in previous figures and exocytosis was elicited by a 5 ms flash light from a pulsatil Xe lamp in cells pre-incubated with 5 μM NP-EGTA. **A.** Amperometric traces representative of initial flash (upper trace) and post-flash responses in wild type RLC-GFP expressing cells. Net secretory trace obtained by subtraction of the post-flash from the initial flash. Net secretory trace representative of cells expressing T18A/S19A RLC-GFP. **B.** After building of event cumulative curves for individual cells, the average secretion was

obtained from control uninfected (n=42 cells), wild type RLC-GFP (n=22 cells) and T18A/S19A RLC-GFP expressing cells (n=16).

Figure 7. Effect of the expression of RLC-GFP constructs on single event characteristics. Individual “*spikes*” were analysed from BaCl₂-evoked responses of uninfected (718 events from 15 cells), wild type RLC-GFP expressing (858 events from 33 cells) and T18A/S19A RLC-GFP expressing cells (277 events from 22 cells). Analysis included spikes with amplitude larger than 2.5 pA and half-width shorter than 90 ms, to ensure that the vesicle fusions analysed were produced in the electrode proximity. Box plots present 10 and 90 percentiles (errors bars), 25 and 75 percentiles (box limits) and the medians (Means are given in Table I) for the amplitude values (panel A), event charge calculated by trapezoidal integration (Q, panel B), half-width time distributions measured by subtraction of the $t_{1/2}$ corresponding to the rising and falling portions of each “*spike*” ($t_{1/2}$, panel C) and time to the peak values (T_p , panel D). **E.** This panel shows spikes representing the average properties of events in cells expressing wild type RLC-GFP and T18A/S19A RLC-GFP constructs, in addition to describe the parameters analysed.

TABLES

Table I. **Averaged parameters obtained from the analysis of individual amperometrical spikes from controls and cells expressing RLC-GFP constructs.**

The values were expressed as the *mean ± SEM* from experiments performed in a number (n) of cells * p<0.0001, **p<0.001 using the non-parametric Mann-Whitney test compared with the wild type RLC-GFP values for a given number of cells.

	I_{max} (pA)	Q (pC)	T_{1/2} (ms)	T_p (ms)
CONTROL (n=15 cells, 718 spikes)	68 ± 14	1,4 ± 0,1	19,7 ± 1,7	8,6 ± 0,7
WT RLC-GFP (n=33 cells, 858 spikes)	73 ± 7	1,5 ± 0,1	16,7 ± 1,1	9,4 ± 1,4
T18A/S19A RLC-GFP (n=22 cells, 277 spikes)	32 ± 5*	1,3 ± 0,2	28,4 ± 2,0*	19,5 ± 1,9*
CONTROL, 20 mM BDM (n=19 cells, 240 spikes)	40 ± 6*	1,1 ± 0,4	25,2 ± 2,7**	21,0 ± 2,0*

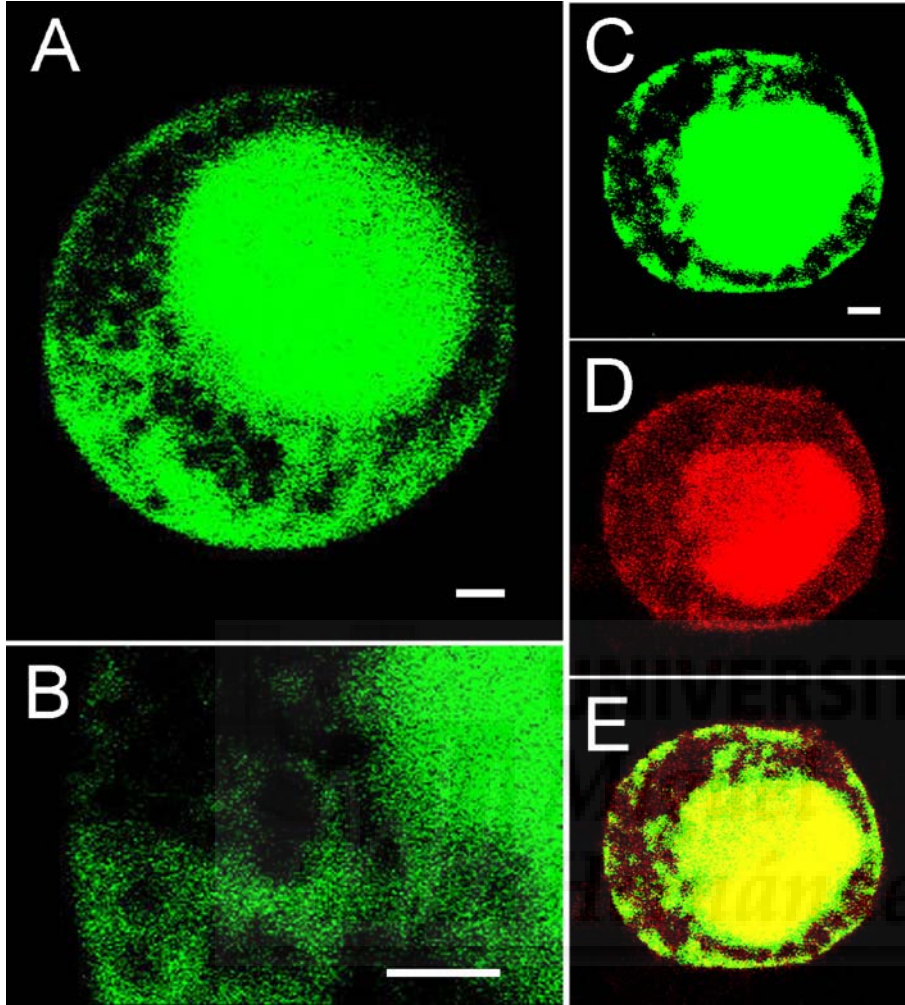


Figure 1. Ñeco et al.

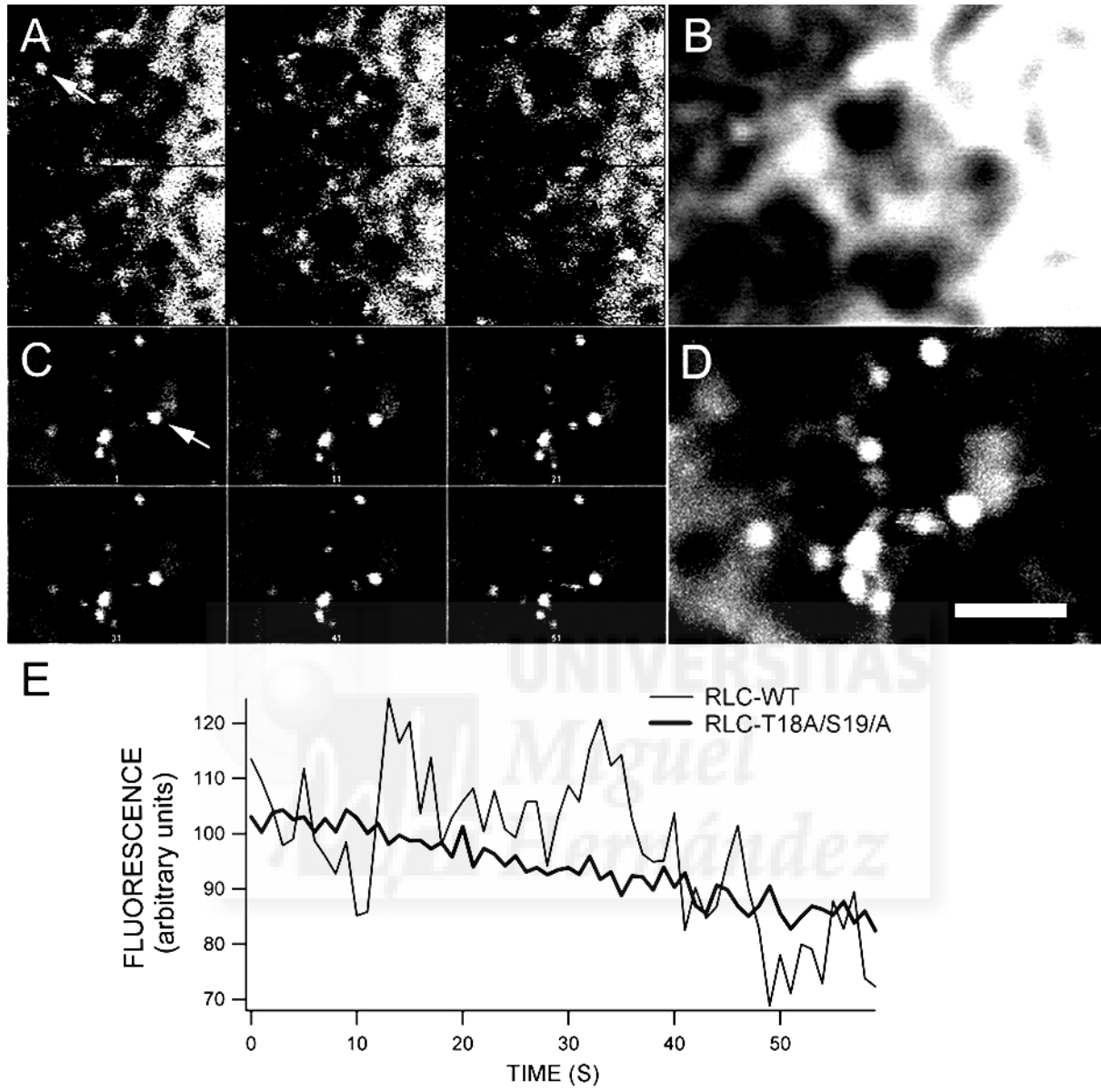


Figure 2. Ñeco et al.

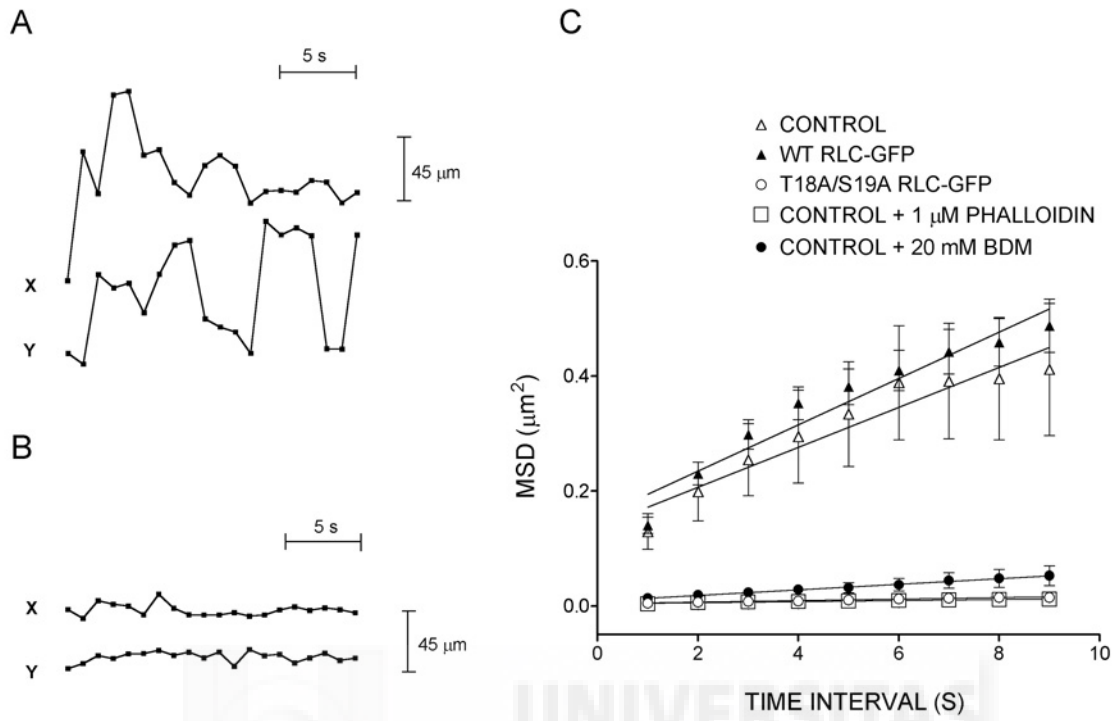


Figure 3. Ñeco et al.



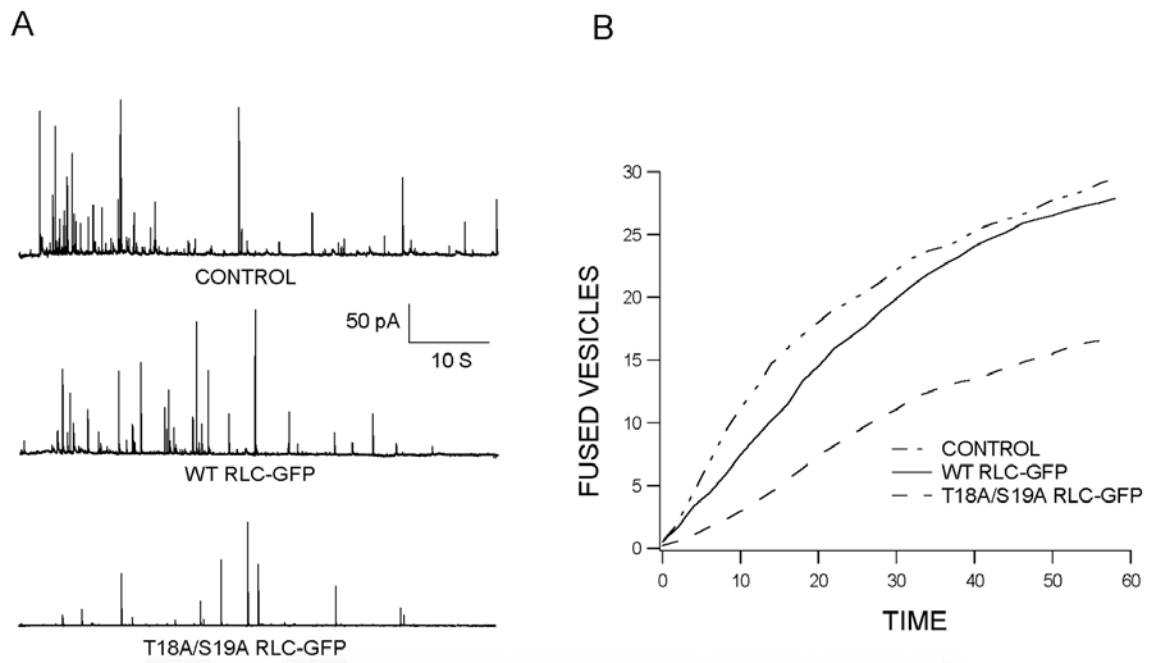


Figure 4. Ñeco et al.



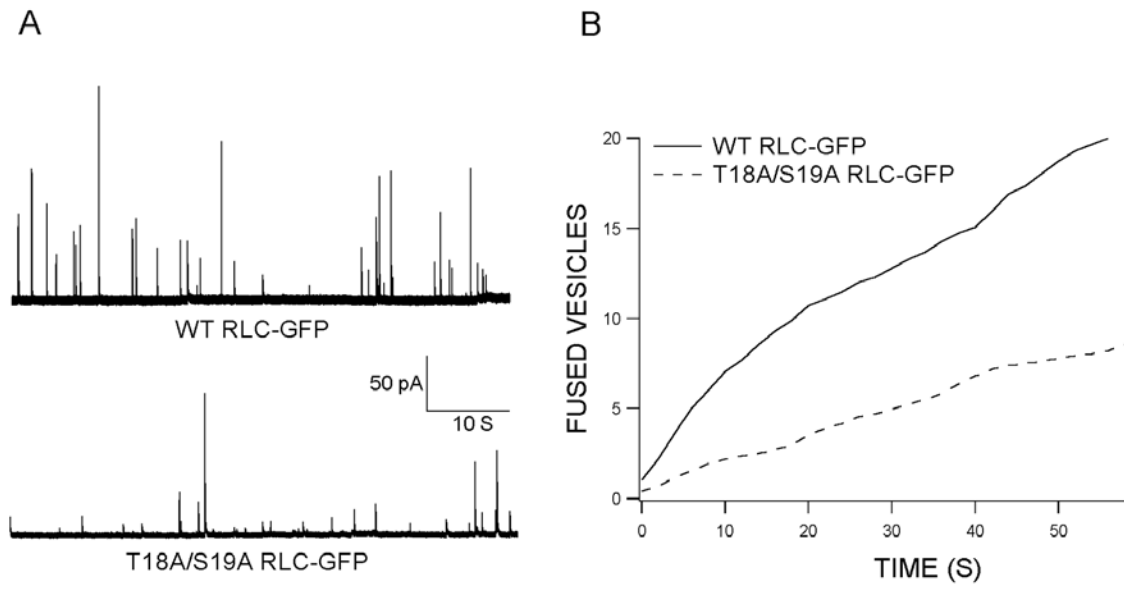


Figure 5. Ñeco et al.



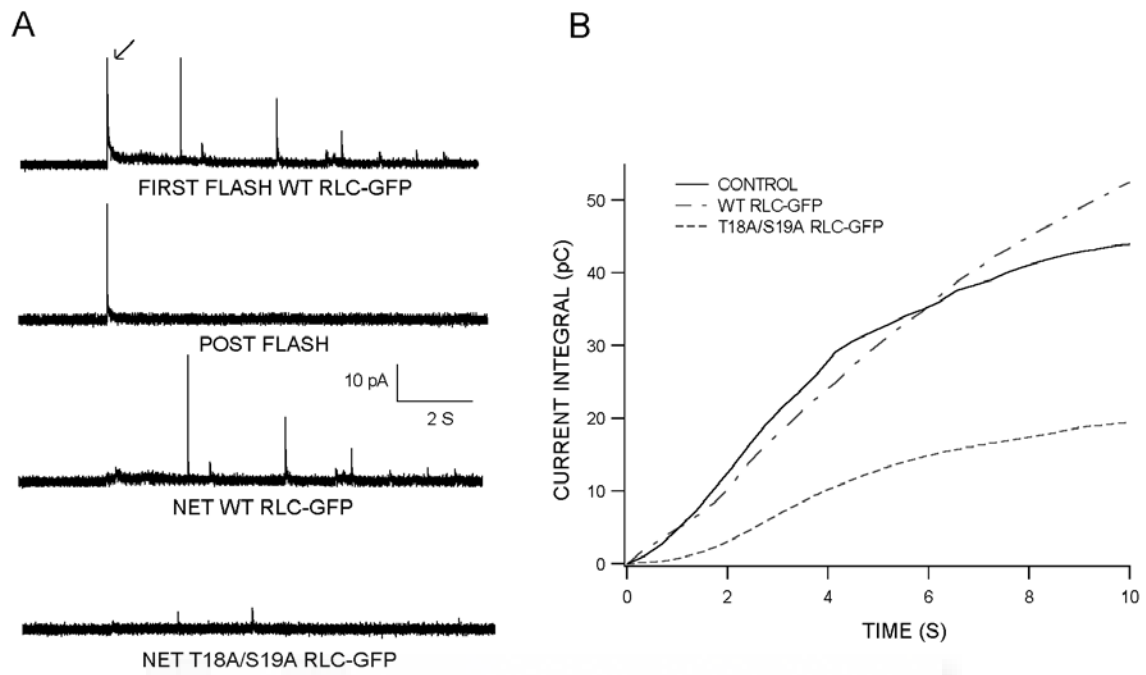


Figure 6. Ñeco et al.



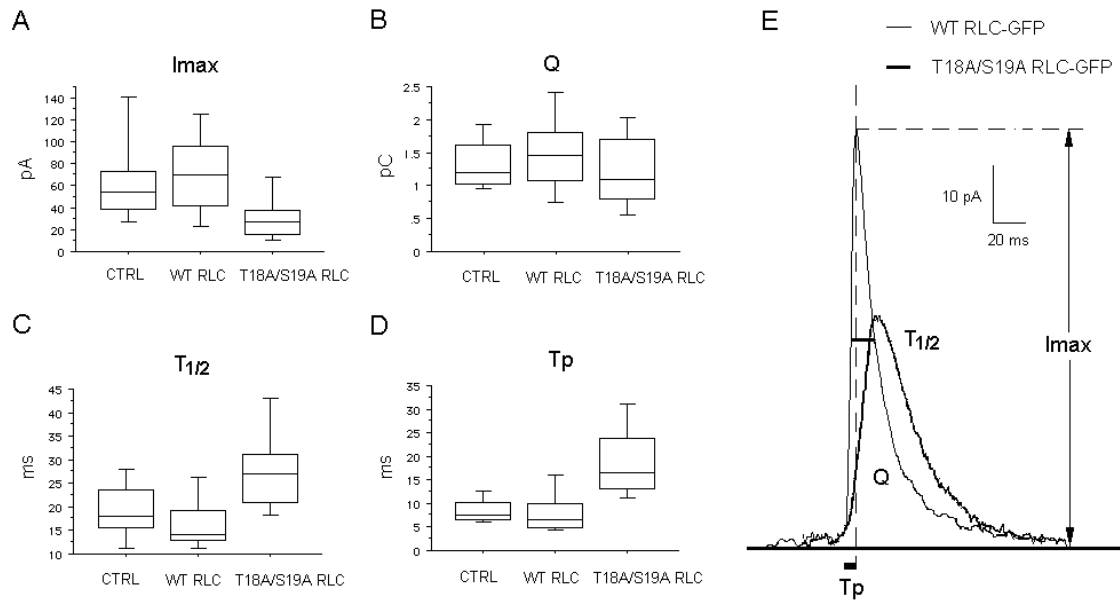


Figure 7. Ñeco et al.





APÉNDICE

APÉNDICE

Este apéndice se corresponde con un CD-ROM que se encuentra adjunto a la primera tapa de esta tesis doctoral.

En este CD-ROM se presenta un archivo de PowerPoint llamado Apéndice, configurado en diapositivas con videos que muestran el movimiento vesicular en diferentes condiciones de ensayo.

Para ejecutar cada video hay picar dos veces sobre la imagen.

