



The nucleotide vesicular transporter (VNUT). Relevance in neural and neuroendocrine tissues. New pharmacological perspectives

Title in Spanish: *El transportador vesicular de nucleótidos (VNUT). Relevancia en tejidos neurales y neuroendocrinos. Nuevas perspectivas farmacológicas*

Aida Menéndez Méndez¹, Juan Ignacio Díaz Hernández¹, Felipe Ortega¹, Rosa Gómez Villafuertes¹, Javier Gualix^{1,*}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria. Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica (IUN). Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC). Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.

ABSTRACT: Vesicular storage of neurotransmitters, which allows their subsequent exocytotic release, is essential for chemical transmission in neurons and endocrine cells. Neurotransmitter uptake to secretory vesicles is carried out by vesicular transporters, which use the electrochemical gradient of protons generated by a vacuolar proton-ATPase as transport driving force. ATP and other nucleotides and dinucleotides are relevant signaling molecules that participate in a variety of biological process. Although the active transport of nucleotides has been pharmacologically and biochemically characterized in a diversity of secretory vesicles, the protein responsible for such vesicular accumulation remained unidentified for some time. In 2008, *SLC17A9*, the last identified member of the SLC17 transporter family, was found to encode the vesicular nucleotide transporter (VNUT). VNUT is expressed in various ATP-secreting cells and is able to transport several nucleotides in a vesicular membrane potential- dependent fashion. *VNUT* knockout mice lack vesicular storage and release of ATP from neurons and neuroendocrine cells, resulting in blockage of the purinergic chemical transmission. This review summarizes the current studies on VNUT and analyzes the relevance of vesicular nucleotide transport in different cells types and tissues. The possible use of VNUT inhibitors and interference RNA to reduce *VNUT* gene expression for therapeutic purposes is also discussed.

RESUMEN: El almacenamiento vesicular de los neurotransmisores, que permite su subsecuente liberación exocitótica, es un proceso esencial para la transmisión química en neuronas y células endocrinas. La acumulación de los neurotransmisores en vesículas de secreción se lleva a cabo por medio de transportadores vesiculares, que utilizan el gradiente electroquímico de protones generado por una ATPasa vacuolar como fuerza impulsora del transporte. El ATP, así como otros nucleótidos y dinucleótidos, son importantes moléculas señalizadoras que intervienen en una gran variedad de procesos biológicos. Aunque el transporte activo de nucleótidos se ha caracterizado desde el punto de vista bioquímico y farmacológico en una variedad de vesículas de secreción, la proteína responsable de esta acumulación vesicular permaneció durante mucho tiempo desconocida. En 2008, se demostró que *SLC17A9*, el último miembro identificado de la familia de transportadores SLC17, codifica el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT). VNUT se expresa en una variedad de células que liberan ATP y ha mostrado ser capaz de transportar varios nucleótidos de manera dependiente del potencial de membrana vesicular. Ratones deficientes en VNUT pierden la capacidad de almacenar y liberar ATP de neuronas y células neuroendocrinas, lo que resulta en un bloqueo de la transmisión química purinérgica. En esta revisión se pretende resumir los estudios llevados a cabo hasta la fecha sobre VNUT y analizar la relevancia del transporte vesicular de nucleótidos en distintos tipos celulares y tejidos. Asimismo, se discute el posible uso de inhibidores de VNUT, así como de ARNs de interferencia que reduzcan su expresión, con fines terapéuticos.

*Corresponding Author: jgualix@ucm.es

Received: February 28, 2018 Accepted: March 5, 2018

Premio del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos en el Concurso Científico 2017 de la RANF.

An Real Acad Farm Vol. 84, N° 1 (2018), pp. 16-38

Language of Manuscript: Spanish

1. TRANSPORTADORES VESICULARES DE NEUROTRANSMISORES, VNTS

La transmisión química en la sinapsis juega un papel central en la comunicación celular en el sistema nervioso central y periférico. Este proceso requiere del almacenamiento previo de los neurotransmisores en vesículas sinápticas y su posterior liberación mediante un proceso de exocitosis dependiente de Ca^{2+} . Los neurotransmisores liberados se unen a receptores específicos en la membrana plasmática de las células diana, transmitiendo de este modo una señal. Ejemplos de moléculas que median este tipo de transmisión lo constituyen el glutamato, el aspartato, el ATP y otros nucleótidos, el ácido γ -aminobutírico (GABA), la glicina, la acetilcolina o las monoaminas (catecolaminas, serotonina e histamina). Los transportadores vesiculares de neurotransmisores (VNTs, del inglés *Vesicular Neurotransmitter Transporters*) son las proteínas responsables del almacenamiento de estos compuestos en las vesículas sinápticas, determinando así la cantidad de neurotransmisor disponible para ser liberado por exocitosis, y son, por tanto, componentes esenciales de la transmisión química en el sistema nervioso (1-3) (Figura

1).

Alteraciones en la actividad de estas proteínas pueden contribuir a la etiología de determinadas enfermedades neurodegenerativas. Este es el caso del transportador vesicular de monoaminas, que secuestrando la dopamina en el interior de vesículas de secreción, prevendría el efecto neurotóxico de esta sustancia en el citosol. La disfunción de esta proteína conduciría a la acumulación de un exceso de dopamina citoplasmática, que es metabolizada generando especies reactivas de oxígeno, las cuales causan un daño oxidativo que puede conducir finalmente a la muerte de la neurona dopaminérgica (4). Se ha sugerido que la pérdida de función de este transportador está relacionada con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (5, 6), que se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriales.

Además de su papel en las células neurales, los VNTs están presentes también en la membrana de vesículas de secreción en diversas células neuroendocrinas, como las células cromafines de la médula adrenal (7, 8), así como en otra gran variedad de células secretoras (9-12).

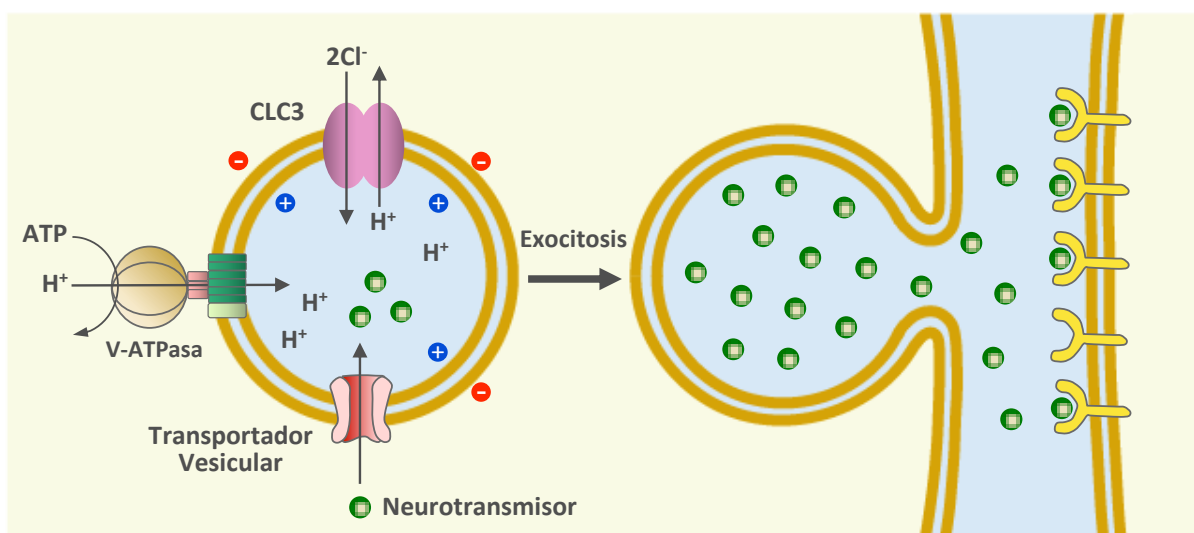


Figura 1. Papel de los transportadores vesiculares de neurotransmisores (VNTs) en la sinapsis. Los VNTs son sistemas de transporte activo que llevan a cabo el almacenamiento de los neurotransmisores en las vesículas sinápticas, para su posterior liberación exocitótica en la sinapsis. Adaptado y modificado de (3).

1.1. Clasificación y características generales de los VNTs

Hasta la fecha, se han identificado diez VNTs que se han clasificado en tres subclases en función de la similitud de sus secuencias aminoácidas y la especificidad de sustrato: las familias SLC17, SLC18 y SLC32, responsables de la acumulación de transmisores aniónicos, catiónicos y neutros, respectivamente (Figura 2). La familia SLC17 incluye las tres isoformas del transportador vesicular de glutamato (VGLUT, del inglés *Vesicular Glutamate Transporter*), el transportador vesicular de aminoácidos excitatorios/sialina (VEAT, del inglés *Vesicular Excitatory Amino Acid Transporter*) y el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT, del inglés

Vesicular Nucleotide Transporter) (13). Además de estos transportadores vesiculares de neurotransmisores, cuatro transportadores de fosfato dependientes de Na^+ (NPT1, NPT3, NPT4 y homólogo NPT) se incluyen también dentro de esta familia (Figura 2). Estas proteínas NPT están implicadas en la eliminación de aniones orgánicos tóxicos en el hígado y el riñón y no están relacionadas con la transmisión de señal. La familia SLC18 se compone del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT, del inglés *Vesicular Acetylcholine Transporter*), las dos isoformas del transportador vesicular de monoaminas (VMAT, del inglés *Vesicular Monoamine Transporter*) y el transportador vesicular de poliaminas (VPAT, del inglés

Vesicular Polyamine Transporter) (14, 15). Finalmente, el transportador vesicular de GABA/glicina (VGAT, del inglés *Vesicular GABA Transporter*), también denominado transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios

(VIAAT, del inglés *Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter*), es el único miembro de la familia SLC32 (16).

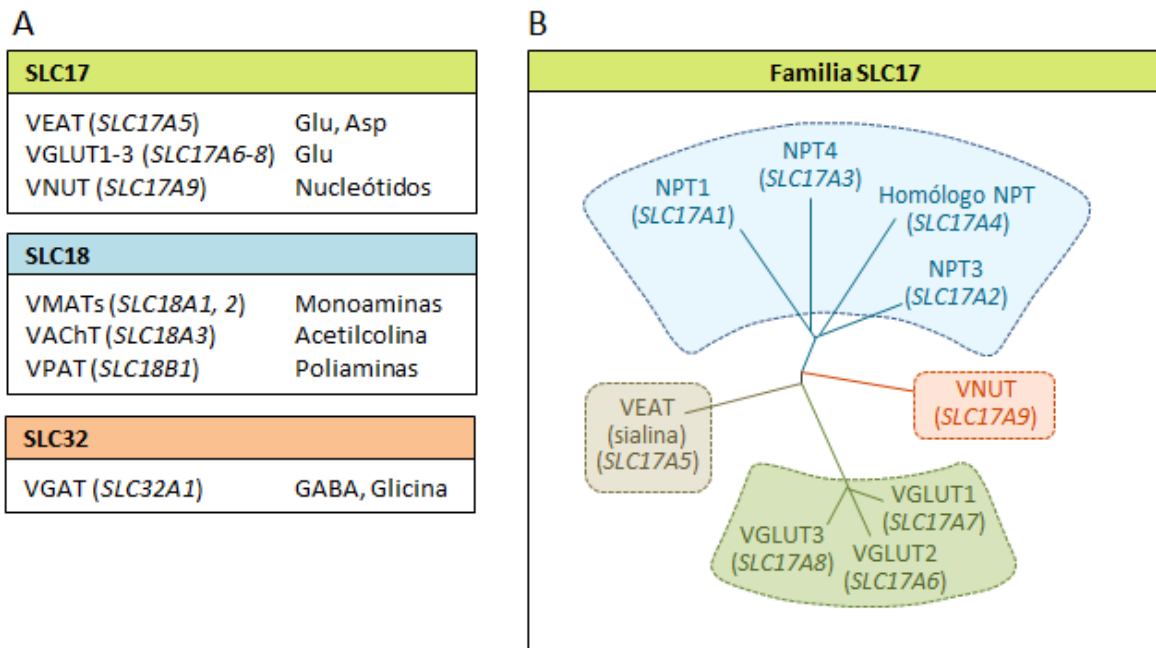


Figura 2. Clasificación de los VNTs. **(A)** En la figura se muestran las tres familias en las que se clasifican los transportadores vesiculares de neurotransmisores. El nombre de la proteína, del correspondiente gen (entre paréntesis), así como el sustrato del transporte, aparecen indicados en cada caso. **(B)** Árbol filogenético de la familia de transportadores SLC17. Adaptado y modificado de (2).

Los transportadores vesiculares son sistemas de transporte activo secundario que emplean el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$) generado por una H^+ -ATPasa vacuolar (V-ATPasa) para impulsar el transporte de neurotransmisores en contra de un gradiente de concentración (17, 18). Esta V-ATPasa es una bomba de protones estructuralmente y funcionalmente relacionada con la F_0F_1 -ATPasa mitocondrial, pero es incapaz de sintetizar ATP. En su lugar, la V-ATPasa usa la energía producida por la hidrólisis de ATP citosólico para introducir protones en el interior de las vesículas (19, 20). El flujo de protones hace que el interior de la vesícula sea más ácido, estableciendo un gradiente de pH (ΔpH) a través de la membrana vesicular. Al mismo tiempo, el interior de la vesícula se hace más positivo, estableciéndose el correspondiente potencial de membrana ($\Delta\psi$). La suma de estos dos efectos constituye el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$). El gradiente de protones (ΔpH) y el potencial de membrana ($\Delta\psi$) típico de las vesículas sinápticas es de 1,5 y 80 mV respectivamente, lo que proporciona la energía suficiente para el almacenamiento vesicular de los neurotransmisores (17, 18). La necesidad de una V-ATPasa para el transporte vesicular ha sido puesta de manifiesto mediante el uso de la bafilomicina A1, un inhibidor específico de esta proteína que impide la generación del gradiente electroquímico y, por tanto, el transporte de los

neurotransmisores (7, 21). No obstante, cada transportador vesicular depende mayoritariamente de uno de los componentes del $\Delta\mu_{H^+}$, bien ΔpH , referido a la concentración de protones, o bien $\Delta\psi$, dado por la carga iónica neta (22). Esto ha sido demostrado mediante el uso de ionóforos, como la valinomicina o la nigericina, que disipan selectivamente uno de los componentes del gradiente electroquímico de protones. Más recientemente, la reconstitución de los transportadores en vesículas artificiales, como liposomas, permite controlar separadamente las condiciones iónicas del medio luminal y externo para llevar a cabo estos estudios de la dependencia del transporte (3, 23, 24). Mientras que los transportadores VMAT y VAcHT utilizan principalmente el componente químico del gradiente, ΔpH (21), VGLUT depende casi exclusivamente del componente eléctrico, $\Delta\psi$ (25). De igual forma, tanto el VEAT como el VNUT utilizan la $\Delta\psi$ para llevar a cabo su actividad (26, 27). En el caso de VGAT, un reciente estudio con el transportador reconstituido en membranas artificiales sugiere que podría operar como un cotransportador de Cl^- , impulsado por $\Delta\psi$ sin la necesidad de ΔpH (24). Sin embargo, la mayoría de trabajos coinciden en señalar que el transporte es igualmente dependiente tanto de $\Delta\psi$ como de ΔpH (16, 28), lo que se cree que es el resultado de un concomitante intercambio de H^+ por el aminoácido neurotransmisor (29, 30) (Figura 3).

Otra de las diferencias que existen entre los distintos VNTs, es el tipo de transporte que realizan (Figura 3). Los miembros de la familia SLC17 que transportan neurotransmisores aniónicos, llevan a cabo un sistema de transporte de tipo uniporte (31). Sin embargo, en el caso de los VGLUTs, aunque se ha demostrado que $\Delta\psi$ es la fuerza impulsora primaria del transporte, existe cierta controversia sobre la contribución, si la hay, de ΔpH . Varios trabajos han mostrado una contribución significativa de este componente en el transporte de glutamato a vesículas (32-35), lo que plantea la posibilidad de que VGLUT opere como un antiportador glutamato/ H^+ . Por su parte, tanto el VMAT como el VACHT, así como el recientemente clonado VPAT, emplean un mecanismo de transporte de tipo antiporte, en el que intercambian los protones del lumen vesicular por el neurotransmisor

catiónico presente en el citosol. La estequiometría de los dos primeros transportadores es de dos protones por cada molécula de neurotransmisor almacenada (36, 37) lo que explica la mayor dependencia de ΔpH que de $\Delta\psi$ en este tipo de transporte. En el caso de VGAT, responsable del almacenamiento vesicular de neurotransmisores eléctricamente neutros, como se ha mencionado anteriormente, su mecanismo de transporte ha sido objeto de controversia, habiéndose propuesto tanto un cotransporte de GABA o glicina con Cl^- , mediante el que se introducirían en el interior de la vesícula dos Cl^- por molécula de neurotransmisor en cada ciclo de transporte (24), como, en estudios más recientes, un mecanismo de antiporte que conduciría al intercambio de protones lumbales por el aminoácido neurotransmisor (29, 30).

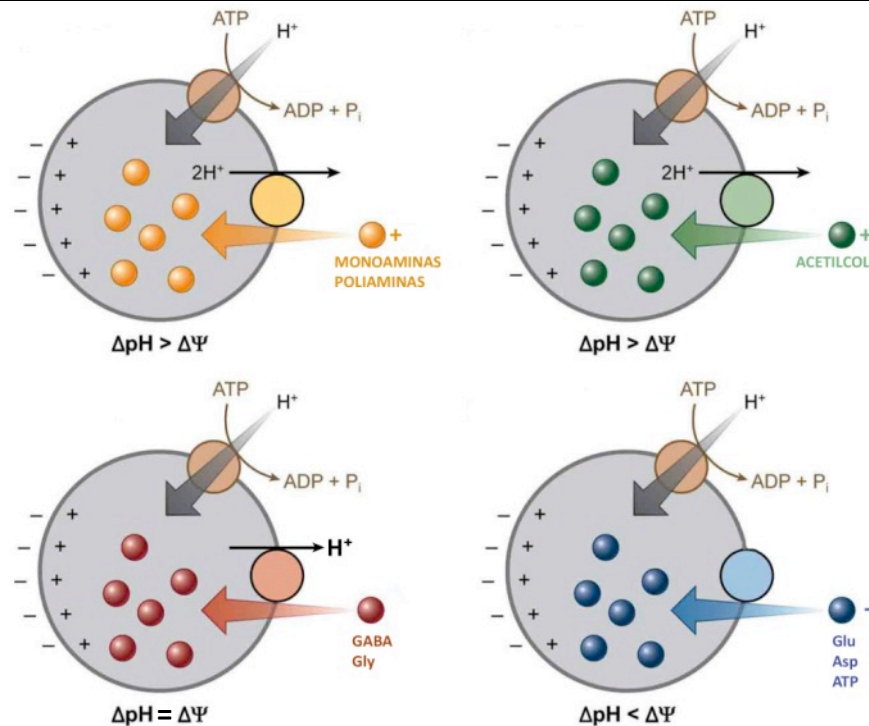


Figura 3. Los VNTs muestran distinta dependencia de los dos componentes del gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$). La V-ATPasa establece un $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ a través de la membrana vesicular que es utilizado como fuerza motriz por los VNTs. Los distintos VNTs utilizan mayoritariamente uno de los componentes de $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ (ΔpH o $\Delta\psi$). El transporte de aminas y acetilcolina, sustratos con carga positiva, depende de ΔpH en mayor medida que de $\Delta\psi$. GABA y glicina son transportados como zwitteriones eléctricamente neutros y su transporte depende igualmente del componente químico (ΔpH) y eléctrico ($\Delta\psi$) de $\Delta\mu_{\text{H}^+}$. El transporte de neurotransmisores aniónicos, como el glutamato, el aspartato o los nucleótidos, es impulsado principalmente por el componente eléctrico ($\Delta\psi$) del gradiente electroquímico de protones. Adaptado y modificado de (22).

Otros factores pueden afectar a la cantidad de neurotransmisor que se almacena en la vesícula, como la afinidad de sustrato, el volumen vesicular o las proteínas intraluminales. Así mismo, la presencia del ion Cl^- es necesaria para ciertos transportadores como los VGLUT. El transporte de glutamato a las vesículas muestra una dependencia bifásica con la concentración de este ion: bajas concentraciones de Cl^- (2-8 mM) estimulan el

transporte mientras que altas concentraciones (>20 mM) lo inhiben. Se ha sugerido que el Cl^- actúa como un activador alostérico de VGLUT que desencadena la captación de glutamato tras su unión al transportador (38), mientras que la inhibición por altas concentraciones de Cl^- podría estar relacionada con la disipación de $\Delta\psi$, el componente de $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ que impulsa el transporte de glutamato. Sin embargo, el mecanismo molecular subyacente a la regulación de

VGLUT por Cl⁻ está aún por aclararse. Esta fuerte dependencia de la actividad de transporte con la concentración de Cl⁻ es una característica compartida por otros miembros de la familia SLC17 como el VNUT (27).

En cuanto a la afinidad por el sustrato, también existen diferencias entre los distintos transportadores. Los VMATs son los que presentan mayor afinidad aparente de sustrato, con unos valores de K_m en el rango submicromolar o micromolar bajo, lo que presumiblemente permitiría a estos transportadores alcanzar la máxima actividad a bajas concentraciones citosólicas del neurotransmisor. El VACHT, aunque presenta una secuencia primaria similar al VMAT (39), muestra un valor de K_m mucho mayor (~0,4 mM) (21). En el caso de VGAT, éste reconoce tanto el GABA como la glicina, ambos neurotransmisores inhibitorios (40). Con la menor afinidad aparente de todos los transportadores vesiculares (K_m ~5 mM para GABA, K_m ~25 mM para glicina), probablemente requiera una elevada concentración citosólica del neurotransmisor, producida por la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD, del inglés *glutamic acid decarboxylase*), en el caso del GABA, o por el transportador de membrana de glicina, GLYT2, en el caso de este aminoácido. Por su parte, los VGLUTs (VGLUT1-3) también presentan un valor de K_m en el rango milimolar bajo, siendo la isoforma VGLUT3 la que muestra una ligera mayor afinidad aparente (K_m ~0,5 mM) (41).

A pesar de su importante papel en el relleno de las vesículas y la liberación de neurotransmisores, poco es lo que se conoce acerca de la regulación de la actividad de estos transportadores vesiculares. Esta regulación puede llevarse a cabo a nivel de la fuerza impulsora del transporte, mediante cambios en la magnitud de $\Delta\mu_{H^+}$, ΔpH o $\Delta\psi$. Además, alteraciones en el tráfico intracelular de estos transportadores de neurotransmisores tiene el potencial de influir en su número en las vesículas sinápticas. Curiosamente, psicoestimulantes como la cocaína o la metanfetamina han mostrado ser capaces de afectar a la localización y función de VMAT2 (42, 43). También, diversos trabajos han descrito la regulación del transporte de neurotransmisores a vesículas por proteínas G heterotriméricas, en particular la subunidad $G\alpha_2$ (44-46). Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo molecular de esta modulación, podría implicar la interacción directa de la proteína G con el transportador vesicular (44, 47).

2. EL TRANSPORTADOR VESICULAR DE NUCLEÓTIDOS, VNUT

El ATP es una molécula ampliamente conocida por su importante papel como “moneda energética” generada por la glicolisis, la respiración celular y otras reacciones, siendo utilizada para proporcionar energía en una multitud de procesos bioquímicos. Sin embargo, en las últimas décadas se ha hecho evidente que el ATP y otros nucleótidos actúan también como importantes moléculas señalizadoras que intervienen en una gran variedad de procesos biológicos a través de su interacción con

receptores de membrana, denominados receptores purinérgicos, de los cuales existen dos clases: receptores ionotrópicos P2X y metabotrópicos P2Y (48, 49). La degradación de los nucleótidos por ectonucleotidasas, enzimas localizados en la superficie celular, proporciona el necesario mecanismo para regular las acciones mediadas por receptor de estos compuestos (50). Como resultado de la hidrólisis ectoenzimática de los nucleótidos se genera, como producto final, la adenosina; la cual puede actuar sobre sus propios receptores, antes de ser recaptada por las células a través de sistemas de transporte específicos en la membrana plasmática (51). Por su parte, los diadenosina polifosfato (abreviadamente Ap_nA) constituyen un grupo de sustancias estructuralmente relacionadas con el ATP. Estos compuestos están constituidos por dos nucleósidos de adenina enlazados por un número variable de grupos fosfato. Estos dinucleótidos son sustancias ubicuas, presentes en el interior de las células de los diferentes organismos, desde bacterias a mamíferos, donde se ha sugerido que pueden ser sintetizados por acción de determinadas aminoacil-ARNt sintetetasas y otras enzimas que catalizan la transferencia de residuos adenililo (52-55). Al igual que ocurre con el ATP y otros nucleótidos, los diadenosina polifosfato pueden ser liberados por diversos tipos celulares, actuando como moléculas señalizadoras que inducen una gran variedad de respuestas biológicas (56, 57).

En consonancia con su papel como mensajeros, se ha descrito la acumulación de estas sustancias en diversas vesículas de secreción. El ATP y otros nucleótidos, así como los diadenosina polifosfato, se hallan almacenados junto a catecolaminas en los gránulos de las células cromafines (58-60). Estos compuestos coalmacenados son liberados conjuntamente al medio extracelular mediante un proceso de exocitosis (58, 61). El almacenamiento de ATP en vesículas sinápticas y su liberación de forma exocitótica y dependiente de Ca²⁺ ha sido ampliamente descrita tanto en nervios periféricos como en el sistema nervioso central (62-66). Este nucleótido actúa como un neurotransmisor excitatorio rápido o como un neuromodulador y ejerce potentes efectos a largo plazo en la diferenciación, proliferación y muerte celular, estando implicado en los procesos de desarrollo y regeneración, así como en varias patologías, del sistema nervioso (67, 68). Por su parte, los diadenosina polifosfato se hallan almacenados en vesículas sinápticas de las terminales colinérgicas aisladas del órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata*, así como en terminales de cerebro medio de rata (69, 70). También se ha descrito la liberación de los diadenosina polifosfato de las terminales de cerebro de rata, inducida por agentes despolarizantes, (70). Asimismo, los gránulos densos de las plaquetas, los gránulos secretores de insulina de las células β pancreáticas y los gránulos que contienen histamina de los mastocitos, son capaces de almacenar también ATP y otros nucleótidos (71-73).

Ya en los primeros estudios de la acumulación del ATP en vesículas de secreción se puso de manifiesto un problema inherente a este tipo de ensayos: el transporte

vesicular de ATP requiere el consumo de ATP por la V-ATPasa para generar el gradiente electroquímico de protones que impulse el transporte activo, pero si esto ocurre, el ATP, como sustrato para el transporte, disminuye, dificultando así la medida cuantitativa de dicho transporte. Rudnick se refirió a este dilema como “el demonio del transporte de ATP” (74). Sin embargo, a pesar de esta dificultad añadida, ha sido posible describir adecuadamente las características de este sistema de transporte.

2.1. Transporte de nucleótidos a gránulos cromafines

Las primeras evidencias del transporte de nucleótidos a gránulos cromafines fueron obtenidas en la década de 1970. Varios trabajos mostraron que es posible marcar el ATP presente en el interior de los gránulos perfundiendo las glándulas adrenales con [³H]-adenosina o [³²P]-fosfato (75-77). Más adelante, se demostró que dicho ATP no era generado en el interior de los gránulos, sino que era sintetizado en el exterior y posteriormente transportado al interior de estos orgánulos (78).

Para tratar de caracterizar el transporte de ATP, se llevaron a cabo una serie de experimentos en gránulos aislados. La existencia de un proceso de transporte dependiente de temperatura y bloqueado por atractilósido, un compuesto previamente descrito como inhibidor del intercambiador ADP/ATP de la mitocondria, llevó a pensar que se trataba de un mecanismo mediado por transportador en lugar de un mero proceso de difusión pasiva (79). El hecho de que el transporte de nucleótidos sea activado por Mg²⁺ e inhibido por EDTA (80), hizo pensar que el transporte de nucleótidos estaba ligado a la ATPasa dependiente de Mg²⁺ presente en la membrana de los gránulos, la cual actúa como una bomba de protones, originando un gradiente electroquímico necesario para el transporte. Empleando iones NH₄⁺, los cuales eliminan el gradiente de pH, o nigericina, que en presencia de K⁺ extragranular también suprime el gradiente de pH mediante el intercambio de K⁺ por H⁺, el transporte de nucleótidos continuaba activado (80). Por otro lado, empleando iones permeables, como tiocianato, los cuales neutralizan la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana, el transporte de nucleótidos quedaba fuertemente inhibido (81). Todo ello indicaba que este transporte depende de la parte eléctrica del gradiente ($\Delta\psi$).

El análisis cinético del transporte de ATP a los gránulos arroja un valor de K_m para el ATP en torno a 1 mM, en ausencia de Mg²⁺ (80, 81). Sin embargo, la K_m para el ATP en presencia de Mg²⁺ parece ser de 2,9 mM (81). El transportador no es específico, sino que es capaz de transportar otros nucleótidos de adenina como ADP y AMP, así como GTP y UTP (80, 81) (Figura 4). Cuando los gránulos fueron incubados con ADP marcado, aparecía dentro del gránulo, no sólo este compuesto, sino además cantidades significativas de ATP marcado (80). Este ATP no era generado en el medio de incubación y posteriormente captado por los gránulos, sino que el ADP era transformado en ATP tras su transporte al interior de los orgánulos, probablemente mediante una reacción de

transfosforilación con los nucleótidos ya presentes en el interior de las vesículas. Más adelante se demostró que las proteínas solubles de los gránulos cromafines contienen una enzima capaz de transferir el grupo fosfato terminal del ATP al ADP (82, 83).

Una nueva aproximación metodológica al estudio del transporte de nucleótidos a los gránulos cromafines, se llevó a cabo mediante el uso de derivados fluorescentes de los nucleótidos de adenina como sustratos del transporte y el análisis y medida de los nucleótidos internalizados, por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), tras la lisis de los orgánulos. Estos análogos fluorescentes de los nucleótidos contienen un puente eteno adicional en el anillo de purina y son conocidos como eteno-nucleótidos (ϵ -nucleótidos). Estos estudios permitieron establecer la incorporación de los derivados fluorescentes del ATP, ADP y AMP (ϵ -ATP, ϵ -ADP y ϵ -AMP) al interior de los gránulos cromafines (8), lo que es una prueba adicional de la falta de especificidad del transportador (Figura 4). Esta metodología también proporciona una aproximación útil al estudio del metabolismo de los nucleótidos tras su internalización en los gránulos. Estos estudios corroboraron la existencia de actividades enzimáticas que intercambian los grupos fosfato entre los nucleótidos internalizados, indicando que el contenido intragranular de nucleótidos puede no reflejar la distribución de estos compuestos en el citosol. En este sentido, se midieron elevados niveles de ϵ -ATP en el interior de los gránulos tras el transporte de ϵ -ADP (8). Además, se describió la presencia de ϵ -adenosina tetrafosfato (ϵ -Ap₄) en el interior de los orgánulos tras el transporte de ϵ -ATP (84). El adenosina tetrafosfato (Ap₄) es un constituyente natural de los gránulos cromafines (84, 85) que actúa como un potente agonista de determinados receptores purinérgicos (86). Una posible explicación a su presencia en el interior de los orgánulos, además de su transporte desde el exterior de las vesículas, dada la baja especificidad del transportador, podría ser su síntesis intragranular, mediante el intercambio de fosfato entre los nucleótidos granulares, de acuerdo a los resultados obtenidos tras el transporte de ϵ -ATP (84). El uso de estos derivados fluorescentes como sustrato del transporte, ha permitido también el estudio del almacenamiento de los nucleótidos en los gránulos cromafines mediante la técnica de citometría de flujo (87). Estos ensayos mostraron además un inesperado incremento en el tamaño de los gránulos, dependiente de la concentración de ϵ -ATP, que tenía lugar en paralelo con el incremento de fluorescencia debido a la acumulación de este nucleótido en las vesículas (87).

A pesar de la creciente relevancia fisiológica de los diadenosina polifosfato como señales extracelulares, no existían datos bibliográficos acerca de su mecanismo de almacenamiento en las vesículas secretoras. En 1997, mediante una combinación de técnicas radiométricas y ensayos fluorimétricos, basados en el uso de eteno-derivados, se describió por primera vez el transporte de los diadenosina polifosfato a gránulos secretores, los gránulos cromafines (88). El transporte de diadenosina pentafosfato

(Ap₅A) a los gránulos pudo ser inhibido por otros diadenosina polifosfato (como el diadenosina trifosfato, Ap₃A, o el diadenosina tetrafosfato, Ap₄A) así como por los análogos no hidrolizables de ATP y ADP, adenosina 5'-O-(3-tio-trifosfato) (ATPγS) y adenosina 5'-O-(2-tio-difosfato) (ADPβS). El patrón inhibitorio de estos

análogos de nucleótido en el transporte de los diadenosina polifosfato sugiere que ambos tipos de sustancias, mono- y dinucleótidos de adenina, comparten un transportador vesicular común (88) (Figura 4).

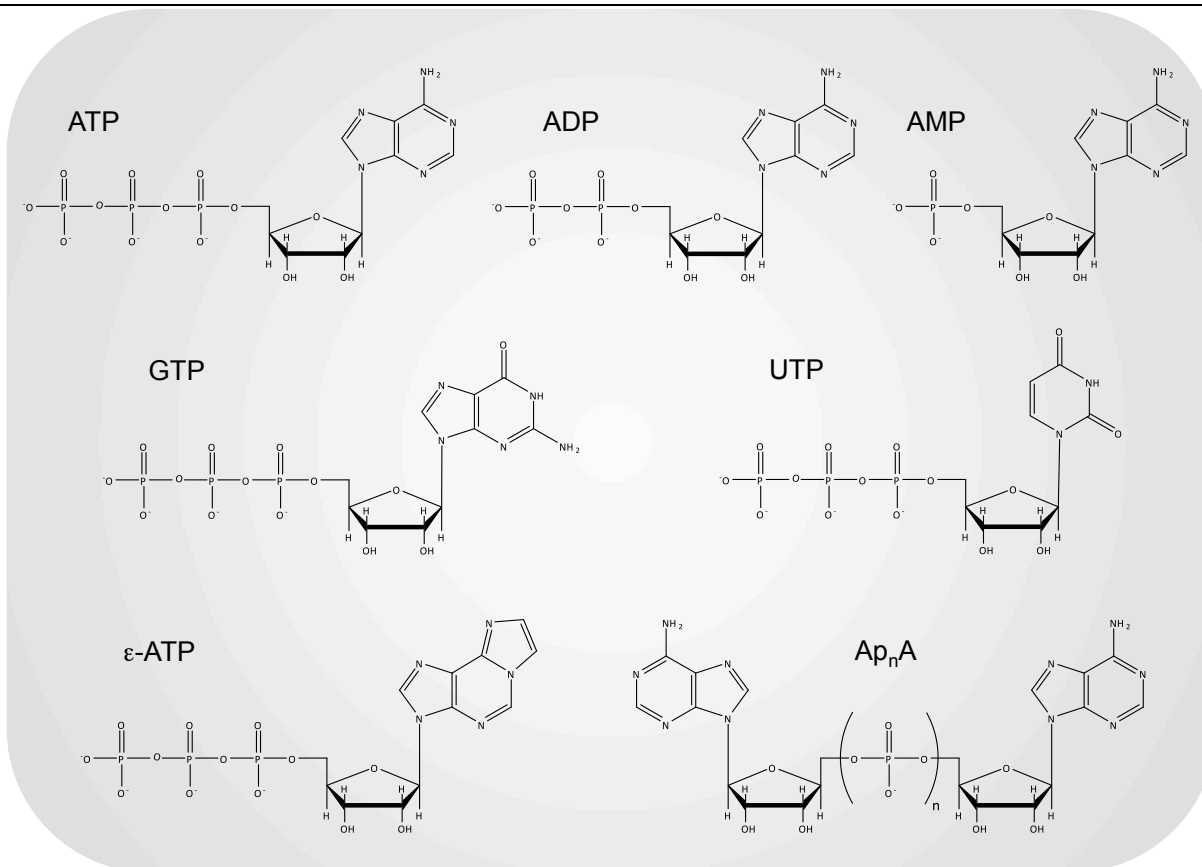


Figura 4. Estructura de los principales sustratos utilizados en la caracterización del transportador vesicular de nucleótidos.

También se han llevado a cabo ensayos del transporte de nucleótidos en gránulos cromafines “*ghosts*”. Estos “*ghosts*” son gránulos desprovistos de su contenido, por lisis osmótica, y después resellados. Se obtienen así vesículas con los mismos componentes de membrana que los gránulos pero sin su contenido soluble. Estas preparaciones presentan la desventaja de que solo una pequeña proporción de las membranas obtenidas por el choque osmótico se resellan correctamente (89). Sin embargo, permiten el control del medio intragranular requerido para algunos estudios de la biofísica del transporte y han sido ampliamente utilizados para la caracterización del transporte de catecolaminas a los gránulos cromafines (90). El empleo de estos “*ghosts*” permitiría el estudio del transporte vesicular de nucleótidos sin las posibles modificaciones introducidas por un hipotético intercambio de fosfato entre los nucleótidos intragranulares. En un primer estudio del transporte de nucleótidos empleando estas vesículas (91), se describió la existencia de un proceso de transporte por difusión, no saturable, independiente de Mg²⁺ y no inhibido por ADP. Posteriores trabajos incidieron en la existencia de un

proceso de difusión no saturable en estos gránulos “*ghosts*”, si bien la inhibición parcial del transporte de ATP por atractilósido y por sustancias que inhiben la ATPasa o disipan el gradiente de protones a través de la membrana, pondrían también de manifiesto la existencia, en estos gránulos “*ghosts*”, de un sistema de transporte activo. Sin embargo, la alta contribución de la difusión enmascararía la saturabilidad de este proceso (92). Estos resultados fueron puestos en entredicho tras la aparición de un trabajo que claramente describía la acumulación de ATP en estos orgánulos mediante un sistema de transporte dependiente de la actividad de la ATPasa granular (93). Al igual que ocurría con el transporte a gránulos intactos, el transporte a “*ghosts*” depende de la diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana, como pone de manifiesto el que el transporte sea inhibido por tiocianato pero no por el ion amonio. Otras características comunes con el mecanismo de transporte ya descrito en vesículas intactas serían la inhibición por atractilósido, así como la falta de especificidad, puesto que GTP y UTP pueden ser también transportados a los gránulos “*ghosts*”.

Los ensayos con gránulos “*ghosts*” aportaron datos

adicionales acerca del transporte vesicular de nucleótidos. El transporte de ATP es potenciado a bajas concentraciones de Cl^- , actuando este ion como un inhibidor a elevadas concentraciones. Asimismo, el transporte es inhibido por el ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS), un inhibidor del transporte de aniones (93). Ambas características son similares a las descritas para el

transporte vesicular de glutamato (3).

2.2. Transporte de nucleótidos a vesículas sinápticas

Al igual que ocurría en los gránulos cromafines, el ATP presente en las vesículas colinérgicas del órgano eléctrico de *Torpedo* puede ser marcado tras la perfusión del tejido con una solución que contiene [^3H]adenosina (94).

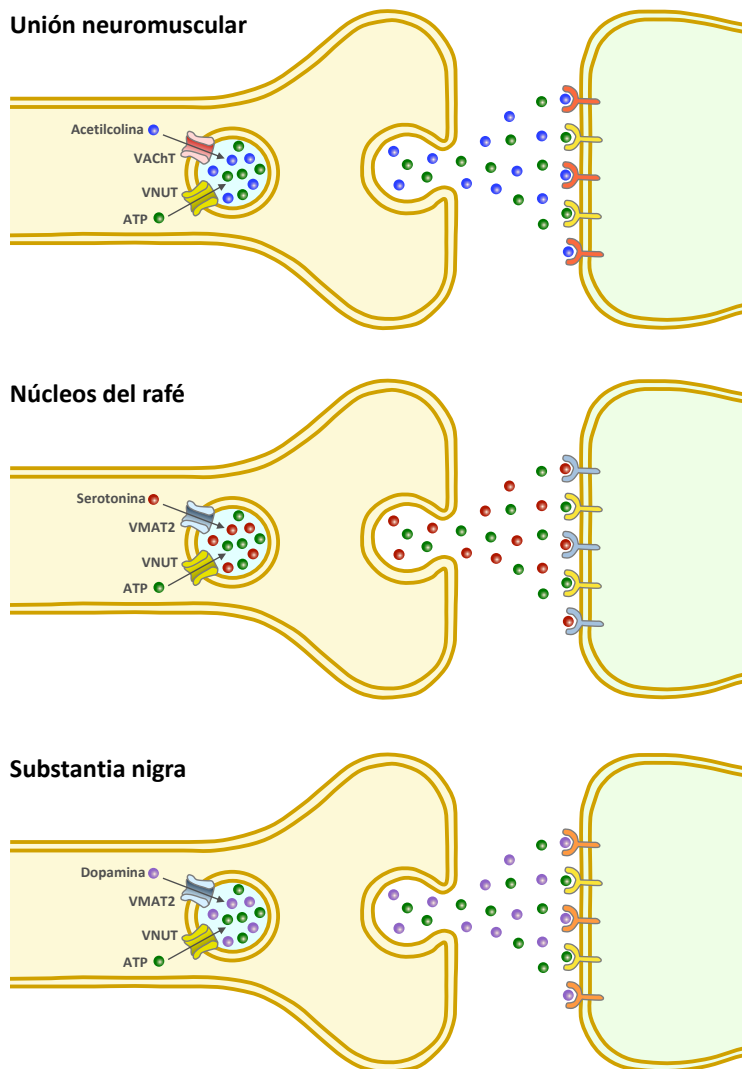


Figura 5. Transporte de nucleótidos a vesículas sinápticas. El ATP y otros nucleótidos son almacenados en vesículas sinápticas y son liberados conjuntamente con neurotransmisores clásicos, como la acetilcolina, la serotonina o la dopamina, en terminales nerviosas de la unión neuromuscular, los núcleos del raquí y la *substantia nigra*, respectivamente.

El estudio del transporte de nucleótidos a vesículas colinérgicas aisladas mostró un mecanismo de transporte saturable dependiente de la temperatura y el pH, características incompatibles con un proceso de difusión pasiva y que evidencian la existencia de un transportador. Además del ATP, también son buenos sustratos del transportador el ADP, AMP, GTP, GDP, GMP y UTP; sin embargo, la adenosina y la guanosina no son prácticamente transportadas al interior de las vesículas. El incremento en el valor de K_m y la disminución en la V_{max} al pasar de ATP a ADP y AMP, además de la

extremadamente pobre eficiencia en el transporte de adenosina, indican la importancia de los grupos fosfato para la actividad como sustrato. Por otro lado, la pérdida del grupo imidazolio (como ocurre con el UTP) también reduce el valor de V_{max} . No obstante, las modificaciones en la base nitrogenada del GTP, respecto del ATP, no parecen reducir la eficiencia del transporte. Al igual que ocurre en gránulos cromafines, el atracilósido actuó como un inhibidor del transporte de nucleótidos a vesículas sinápticas, sin afectar al transporte de acetilcolina (95).

En estudios más recientes, la misma aproximación

metodológica utilizada para caracterizar el transporte de nucleótidos a los gránulos cromafines, basada en el uso de eteno-derivados como sustratos del transporte (8, 88), fue aplicada al estudio del transportador presente en vesículas sinápticas aisladas de cerebro de rata (96). Este transportador mostró muchas similitudes con el descrito en los gránulos cromafines. Entre ellas, la inhibición del transporte por atractilósido y DIDS, si bien el inhibidor más efectivo del transporte de ϵ -ATP a las vesículas sinápticas fue el colorante azul de Evans (*Evans blue*) (96), un compuesto previamente descrito como un potente inhibidor del transportador vesicular de glutamato (97). Además, el transporte de ϵ -ATP a las vesículas es inhibido por los diadenosina polifosfato Ap₃A, Ap₄A, y Ap₅A, lo que sugiere que estos compuestos pudieran ser también sustratos del transportador, como se ha demostrado en el modelo de los gránulos cromafines (88). Finalmente, la presencia de ϵ -ATP en el interior de las vesículas tras el transporte de ϵ -ADP (96), indica la existencia de actividades enzimáticas intravesiculares de intercambio de grupos fosfato que equilibran los niveles de los distintos nucleótidos presentes en estos orgánulos, como se ha descrito también para los gránulos cromafines (8, 80, 82, 83).

2.3. Características cinéticas del transportador vesicular de nucleótidos. Comportamiento mnemónico

Cuando se analiza en un amplio rango de concentraciones de sustrato, el transporte de los eteno-nucleótidos (ϵ -ATP, ϵ -ADP y ϵ -AMP) a los gránulos cromafines no sigue una cinética de Michaelis-Menten. En

su lugar, se obtienen complejas curvas de saturación, no hiperbólicas, con varias etapas (8). La compleja dependencia de la velocidad de transporte con la concentración extragranular de los ϵ -nucleótidos, hizo necesario interpretar las curvas de saturación como la superposición de varias cinéticas sigmoides. Estos datos experimentales, por tanto, fueron procesados mediante la ecuación resultante de la suma de varias cinéticas tipo Hill (8):

$$V = \sum \frac{V_{\max} \cdot S^n}{K^n + S^n}$$

Los parámetros cinéticos de cada una de las curvas sigmoidales cuya adición da cuenta de las curvas de saturación experimentales para el transporte de los ϵ -nucleótidos a los gránulos cromafines, aparecen recogidos en la Tabla 1.

También el transporte de los diadenosina polifosfato a los gránulos cromafines muestra complejas curvas de saturación no hiperbólicas, cuando se estudia en un amplio rango de concentraciones de sustrato (88). La forma de estas curvas es similar a la observada para el transporte de ϵ -ATP, ϵ -ADP y ϵ -AMP, realizándose el análisis de los datos experimentales siguiendo el mismo criterio que para estos sustratos. Los parámetros cinéticos de las curvas sigmoides que son los constituyentes de las curvas de saturación experimentales para el transporte de los diadenosina polifosfato, aparecen también recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros cinéticos del transporte de nucleótidos y dinucleótidos a gránulos cromafines

	Curvas	ϵ -ATP	ϵ -ADP	ϵ -AMP	ϵ -Ap ₄ A	[³ H]Ap ₅ A
K (μ M)	1	250	150	200	16	16
	2	1000	900	1200	75	125
	3	3000	3600	3200	—	545
V_{\max} (pmol·min ⁻¹ ·mg prot. ⁻¹)	1	20	25	10	18	15
	2	40	35	40	13	8
	3	190	300	55	—	102
n_H	1	3	2	2	2	2
	2	4	4	3	4	4
	3	5	5	5	—	6

Parámetros cinéticos de las curvas cuya adición da cuenta de las curvas de saturación experimentales para el transporte de nucleótidos y dinucleótidos a los gránulos cromafines. K , V_{\max} y n_H representan, respectivamente, los valores de $S_{0,5}$, velocidad máxima parcial y número de Hill, para cada una de las curvas. Adaptado y modificado de (8, 88).

Estas complejas curvas cinéticas no pueden explicarse por la existencia de diferentes transportadores de nucleótidos en los gránulos cromafines. La superposición de distintos transportadores con sus respectivas afinidades es incompatible con la cooperatividad positiva mostrada

por las curvas de saturación. En enzimas alostéricas, la aparición de varias mesetas intermedias en las representaciones de V frente a $[S]_0$ ha sido explicada por la presencia de diferentes conformaciones del enzima, con distintas propiedades cinéticas, que se interconvierten

entre sí a través de isomerizaciones lentas inducidas por el sustrato. Las enzimas con este comportamiento cinético se denominan histeréticas o mnemónicas (98). En lo que se refiere a los transportadores, se ha descrito un comportamiento mnemónico en el caso del transportador equilibrativo de adenosina presente en la membrana plasmática de las células cromafines (99). La alta cooperatividad observada en el transporte de L-adenosina, con un coeficiente de Hill próximo a 5, solo podía ser explicada por la existencia de una forma multimérica del transportador, mínimo dimérica, con transiciones lentas entre distintos estados conformacionales de la proteína. El comportamiento cinético del transportador de nucleótidos de los gránulos cromafines ha sido explicado utilizando un modelo basado en el del transportador de adenosina (88). Sin embargo, se requiere un mayor grado de complejidad teniendo en cuenta la elevada cooperatividad, que puede alcanzar valores de número de Hill iguales a 6. Este hecho implica también la existencia de una forma dimérica del transportador, como requerimiento mínimo. Este modelo mnemónico para el transportador de nucleótidos de los gránulos cromafines ha sido confirmado mediante el uso de la técnica de citometría de flujo (87). Esta técnica ha sido adaptada al estudio del transporte vesicular mediante la medida del incremento en la fluorescencia asociada a los gránulos, debido a la internalización de los ϵ -nucleótidos en estas vesículas. El análisis por citometría de flujo del transporte de ϵ -ATP a los gránulos cromafines mostró también una compleja curva de saturación no hiperbólica (87), indicando que el peculiar comportamiento cinético descrito anteriormente no es debido a un artefacto experimental, sino que es una propiedad intrínseca del transportador granular. Por otro lado, el transporte de ϵ -ATP a vesículas sinápticas de cerebro muestra también una compleja cinética no hiperbólica con dos etapas (96). Este comportamiento cinético puede ser explicado basándose en un modelo mnemónico similar al descrito para el transporte de nucleótidos a los gránulos cromafines.

Respecto a la relevancia fisiológica que este mecanismo pueda tener, la existencia de este fenómeno mnemónico produce como resultado un mayor control de la capacidad de transporte por variaciones en la concentración de sustrato. Esta fina regulación de la actividad del transportador es esencial en el caso de un metabolito, como es el ATP, de tanta importancia en el metabolismo celular, y cuyos niveles citosólicos deben estar bajo estricto control para asegurar el correcto funcionamiento de la célula. El complejo comportamiento mnemónico del transportador vesicular permitiría el transporte de ATP al interior de las vesículas de manera altamente regulada (8). En el caso de los diadenosina polifosfato, no se conoce completamente su función en el interior de la célula. Sin embargo, sus niveles citosólicos se encuentran incrementados en células con una elevada actividad proliferativa o bajo ciertas condiciones, como el estrés ambiental, pudiendo estas sustancias actuar como señales en los procesos de decisión celular que conducen a proliferación, quiescencia, diferenciación o apoptosis

(100). El transporte de los diadenosina polifosfato a vesículas secretoras, además de regular la accesibilidad de estos compuestos al espacio extracelular, podría ser también un mecanismo para finalizar sus acciones citosólicas, lo que incrementa la relevancia fisiológica de este proceso de transporte.

2.4. Identificación del transportador vesicular de nucleótidos, VNUT. Propiedades bioquímicas.

La exploración de la base de datos del genoma humano permitió identificar un nuevo gen SLC17 (27). Este gen, *SLC17A9*, codifica una proteína de 430 aminoácidos con 12 hélices transmembrana. El análisis por *Northern blot* reveló que el gen *SLC17A9* se expresa en varios órganos pero es especialmente abundante en el cerebro, la glándula adrenal y la glándula tiroidea (27). Además, en la glándula adrenal, la proteína SLC17A9 es expresada específicamente en la médula y está asociada con los gránulos cromafines, como se reveló por ensayos de inmunohistoquímica, microscopía inmunoelectrónica y *Western blot* (27). Estos datos son consistentes con la hipótesis de que *SLC17A9* codifica el transportador de nucleótidos de los gránulos.

La proteína SLC17A9 humana fue expresada, purificada e incorporada en liposomas. Para ahuyentar al “demonio del transporte de ATP” se omitió la H^+ -ATPasa en los liposomas y se generó un $\Delta\psi$ (positivo en el interior), mediante la difusión de K^+ a los liposomas por la adición de valinomicina, con el fin de proporcionar la fuerza impulsora del transporte. Como se esperaba, la proteína SLC17A9 transporta activamente ATP a expensas de $\Delta\psi$ pero no de ΔpH . Esta proteína transporta varios nucleótidos, siendo el orden de eficacia $ATP > UTP > GTP > ITP, ADP \gg AMP$. La adenosina no es transportada por la proteína SLC17A9, mientras que el Ap_3A es un buen sustrato del transporte. La selectividad de sustrato de la proteína SLC17A9 coincide con el contenido de nucleótidos de los orgánulos que almacenan ATP (27). Además, SLC17A9 no transporta sustratos de otros miembros de la familia SLC17 como el glutamato, el aspartato o el ácido hipúrico, lo que apoya que la proteína SLC17A9 sea un transportador que específicamente reconoce un rango de nucleótidos como sustratos de transporte. El transporte mediado por SLC17A9 fue inhibido por DIDS y *Evans blue* (27) (Figura 6). El atracilósido es también un inhibidor parcial pero solo cuando el Mg^{2+} está presente en el medio de ensayo. Estas características son similares, si no idénticas, a las observadas en el transporte de nucleótidos a los gránulos cromafines y las vesículas sinápticas. Por otra parte, la proteína SLC17A9 se expresa de manera endógena en células de feocromocitoma PC12. La supresión de la expresión del gen *SLC17A9* mediante el uso de ARN de interferencia (ARNi) resulta en una disminución del almacenamiento y la liberación vesicular de ATP en estas células PC12. En conjunto, todos estos resultados demuestran que *SLC17A9* codifica un transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) (27).

Como se esperaba, VNUT requiere Cl^- para su actividad, no observándose el transporte de nucleótidos en ausencia de este ion (27). El Br^- también activa el transporte mientras que I^- , F^- , nitrato, sulfato o tiocianato fueron inefectivos. Además, los iones I^- , F^- , nitrato, sulfato y tiocianato inhiben el transporte de ATP dependiente de Cl^- . Este requerimiento de aniones es muy similar al de VGLUT2 (38). Aunque no se han llevado a cabo estudios cinéticos detallados, esto podría sugerir la existencia de sitios de unión de aniones y mecanismos de regulación similares en esta familia de transportadores SLC17. Otra característica remarcable de VNUT es que reconoce a los nucleótidos tanto en su forma libre como formando complejos con cationes divalentes, como se pone de manifiesto por el hecho de que el transporte de ATP no se ve afectado por la presencia o ausencia de Mg^{2+} o Ca^{2+} (27, 101). A diferencia de VNUT, otros transportadores de ATP, como el intercambiador ATP/ADP y el transportador Mg-ATP/Pi mitocondriales, son capaces de distinguir entre la forma libre y complejada del nucleótido (102, 103). Esto indica que VNUT posee unas propiedades cinéticas muy diferentes a las de otras proteínas que reconocen y unen ATP. Dado que la concentración citosólica de Mg^{2+} libre se encuentra aproximadamente en el rango milimolar, la mayoría del ATP transportado por VNUT debe ser ATP-Mg. Así en condiciones fisiológicas VNUT transporta concentraciones aproximadamente equimolares de ATP y Mg^{2+} a las vesículas secretoras. La supresión de la expresión del gen *VNUT* reduce el contenido vesicular de ATP y Mg^{2+} en una proporción similar. Estos resultados sugieren que VNUT está implicado en la acumulación de Mg^{2+} en los gránulos secretores (101). En el caso del Ca^{2+} , aunque el ATP también interacciona con este catión, la concentración libre de Ca^{2+} en condiciones fisiológicas (en el rango submicromolar) es muy inferior a la de Mg^{2+} (104, 105). Esto sugiere que el ATP citosólico formará complejo mayoritariamente con el Mg^{2+} , representando el complejo Ca-ATP menos de un 0,1% del total de las especies de ATP presentes en la célula. El transporte de esta pequeña fracción de Ca-ATP a través de VNUT no

puede dar cuenta de la relativamente elevada concentración de Ca^{2+} en el interior de las vesículas secretoras (101).

Se ha descrito que los cuerpos cetónicos, como el acetoacetato, compiten con el Cl^- por su unión a los VGLUTs y, por tanto, inhiben reversiblemente la actividad de transporte de estas proteínas (38). La inhibición por acetoacetato de estos transportadores lleva a una reducción del glutamato almacenado en las vesículas y a una disminución en la liberación exocitótica de este neurotransmisor (38), sugiriendo estos resultados que la neurotransmisión glutamatérgica se ve afectada por el estado metabólico del organismo. Una regulación similar por acetoacetato se observa también en otros miembros de la familia SLC17, como el VNUT (38) (Figura 6), lo que plantea la posibilidad de que la neurotransmisión purinérgica pueda ser también controlada por los cuerpos cetónicos. El efecto inhibitorio del acetoacetato sobre el VNUT se previene completamente por la incubación con una elevada concentración (100 mM) de Cl^- (38). El glioxilato, un metabolito de la glicina, se ha descrito recientemente como un inhibidor selectivo de VNUT (Figura 6). Este compuesto inhibe tanto a VNUT como a VGLUT2, pero la concentración de glioxilato requerida para el 50% de inhibición es de 620 μM , en el caso de VGLUT2, mientras que para VNUT esta concentración es de tan solo 4,1 μM (9). El glioxilato también inhibe el transportador vesicular de nucleótidos excitatorios, VEAT, otro miembro de la familia SLC17, en una extensión similar a VGLUT2, pero no ejerce ningún efecto sobre VMAT, VGAT o VACHT (38). VNUT también es inhibido selectivamente por el clodronato (Figura 6). Este bifosfonato actúa como un potente modulador alostérico que se une al sitio de regulación por Cl^- (106). Inhibidores de la liberación de ATP, como la glibenclamida, el ácido araquidónico, el ácido 18 α -glicirretínico, el ácido flufenámico y el A438079, también inhiben a VNUT (107).

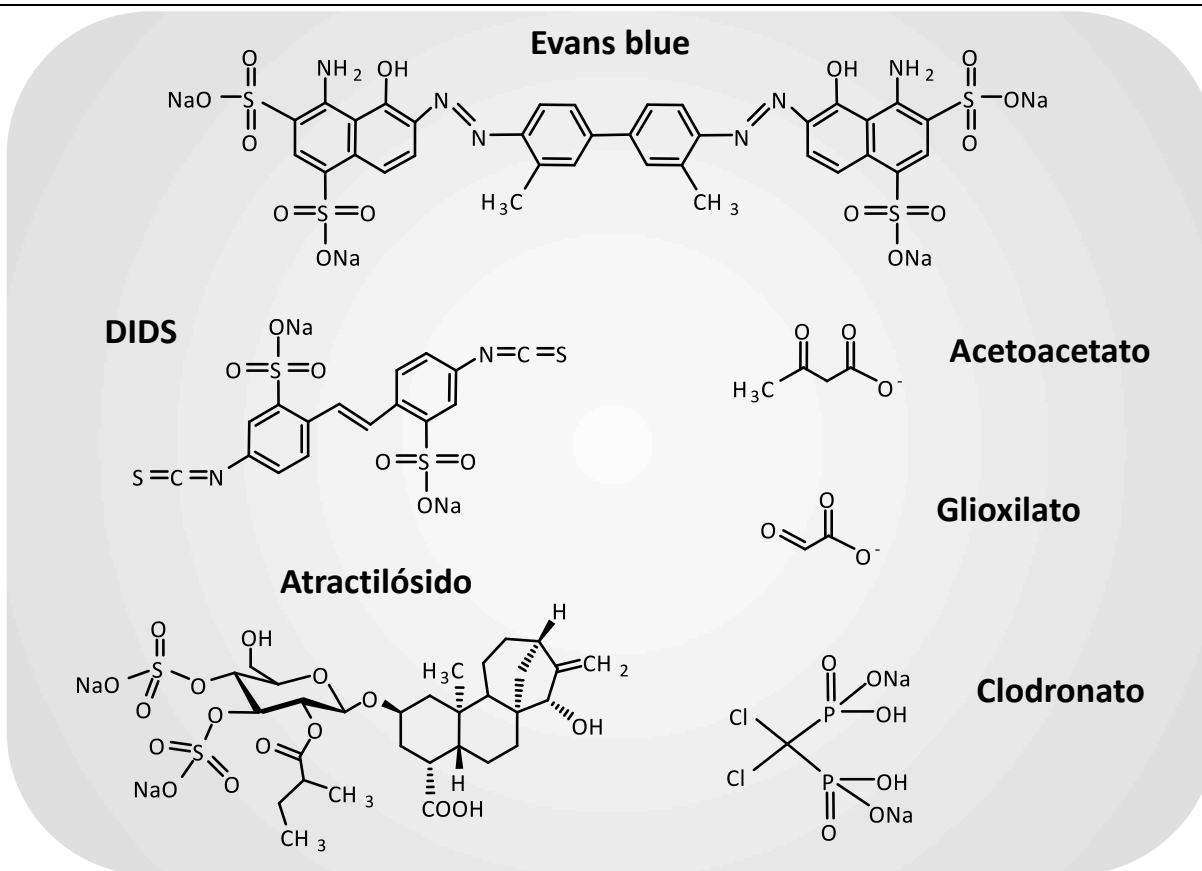


Figura 6. Estructura de los principales inhibidores del transportador vesicular de nucleótidos.

2.5. Localización y organización génica de *SLC17A9*. Ortólogos. Variantes de procesamiento alternativo.

El gen *SLC17A9* se localiza en el cromosoma 20 humano y contiene 14 exones y 13 intrones (27). La comparación de la secuencia de aminoácidos, mostró que la proteína *SLC17A9* presenta un 23-29% de identidad y un 41-48% de similitud con otros miembros de la familia *SLC17* (27). Secuencias ortólogas de este gen aparecen ampliamente distribuidas en el reino animal, incluyendo vertebrados, insectos, ascidias, hidras y nematodos (27). Otros eucariotas, como plantas, levaduras u hongos, no presentan el gen *SLC17A9*, aunque algunos de estos organismos sí tienen genes que codifican transportadores *SLC17*. A nivel de proteína, solo los VNUT de mamífero han sido caracterizados desde el punto de vista bioquímico y no hay información disponible de los homólogos VNUT en modelos experimentales como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* o el pez cebra, aunque los correspondientes genes han sido identificados (27, 108, 109). En los VNUT de mamífero, la mayor variabilidad se da en la secuencia de aminoácidos de la región amino terminal, mientras que las regiones restantes, en particular la región transmembrana, están más conservadas (83% de identidad) (27).

Se ha descrito una variante de la proteína VNUT humana que es el resultado del procesamiento alternativo en la región amino terminal (110). En consecuencia, existen dos VNUTs, de 436 y 430 aminoácidos de

longitud, que han sido denominados VNUT-1 (identificador UniProt Q9BYT1-1) y VNUT-2 (identificador UniProt Q9BYT1-2), respectivamente. Los 19 o 13 residuos que comprende el extremo amino terminal, son únicos para cada variante. Sin embargo ambas formas comparten un 100% de homología en los restantes 417 aminoácidos (110). A día de hoy no está claro si esta diferencia en el extremo amino terminal puede conferir especificidad de tejido o afectar a la localización subcelular de la proteína.

2.6. Topología y residuos aminoácido esenciales.

El perfil hidropático de VNUT sugiere la presencia de 12 dominios transmembrana (27). Se cree que tanto su extremo amino como su extremo carboxilo terminal estarían orientados hacia el citosol, sobre la base de un estudio previo de la topología de membrana de VGLUT2 mediante el uso de anticuerpos dirigidos específicamente contra diferentes regiones de esta proteína (111). Los VGLUTs presentan regiones amino y carboxilo terminal relativamente largas que contienen motivos dileucina esenciales para la localización vesicular (112). En contraste, los extremos amino y carboxilo terminal de VNUT son muy cortos, y la secuencia de aminoácidos de estas regiones no se encuentra conservada entre los VGLUTs y dicho transportador.

Mediante ensayos de mutagénesis dirigida en VGLUT2 se ha determinado que la His128, en la segunda región

transmembrana, y la Arg184 y el Glu191, en la cuarta región transmembrana, son esenciales para el transporte de glutamato impulsado por $\Delta\psi$ (113). Entre estos residuos, la Arg184 está completamente conservada en todos los miembros de la familia SLC17, lo que indica que este residuo lleva a cabo una importante función común en todas estas proteínas, participando probablemente en el reconocimiento del sustrato aniónico o la activación por Cl⁻. Por el contrario, la His128 y el Glu191 están conservados en los VGLUTs pero no en muchos miembros de la familia SLC17, indicando que estos residuos tienen un papel específico en el transporte de glutamato. En VNUT, la sustitución de la Arg119, que se correspondería con la Arg184 del VGLUT2, por Ala, conduce a la pérdida completa de la actividad de transporte de nucleótidos (101), en concordancia con lo que se observa en los ensayos de mutagénesis en VGLUT2 (113). Sin embargo, cuando la Gln126, que se correspondería con el Glu191 de VGLUT2, es reemplazada por Ala, la proteína VNUT mutante retiene todavía aproximadamente un 50% de actividad (101), lo que indica que la Gln126 no es esencial para el transporte de nucleótidos. La Arg35, que se correspondería con la Arg88 de VGLUT2, es otro residuo con carga bien conservado entre los miembros de la familia SLC17. Sin embargo, la sustitución de la Arg35 por Ala en VNUT solo tiene un efecto moderado sobre el transporte de ATP (101). En conclusión, VNUT comparte con otros miembros de la familia SLC17 la presencia de un residuo de Arg, esencial para el transporte, en la cuarta región transmembrana. Sin embargo, otros residuos funcionalmente importantes, difieren de los de VGLUT2. Un modelo estructural de VGLUT, basado en la estructura cristalina del transportador bacteriano de glicerol 3 fosfato, muestra que los residuos esenciales, cuya sustitución causa una drástica disminución en la actividad de transporte de glutamato, estarían localizados próximos al fondo de una cavidad central formada por las hélices transmembrana (113, 114) y algo similar ocurriría también con su contrapartida en otros miembros de la familia SLC17. El tamaño, la forma y la disposición de los residuos con carga en esta área pueden determinar su selectividad de sustrato.

Una característica remarcable de los VGLUTs es que poseen una actividad intrínseca de transporte de fosfato inorgánico (113). Las características del transporte de fosfato difieren de las del transporte de glutamato en lo que se refiere a la fuerza motriz, la sensibilidad a inhibidores y la dependencia de Cl⁻. El transporte de fosfato es impulsado por un gradiente de sodio, mientras que el de glutamato utiliza la $\Delta\psi$. Además, a diferencia del transporte del glutamato, el transporte de fosfato no se ve afectado por el inhibidor *Evans blue* y es completamente activo incluso en ausencia de Cl⁻. Por otra parte, un exceso de glutamato no inhibe el transporte de fosfato dependiente de sodio y, a la inversa, el transporte de glutamato no se ve afectado por un exceso de fosfato. Asimismo, ninguna de las mutaciones de los tres residuos esenciales para el transporte de glutamato (Arg184, His128 y Glu191) tiene efecto alguno sobre el transporte de fosfato, lo que implica

que en estos dos procesos participan, al menos en parte, diferentes residuos aminoácido (113). Hasta la fecha no se tiene información sobre los residuos aminoácidos que son esenciales para el transporte de fosfato. Estos resultados muestran, por tanto, que los mecanismos moleculares del transporte de fosfato y glutamato son diferentes. Los investigadores están interesados en determinar como una misma molécula puede contener dos maquinarias de transporte independientes. Esta multifuncionalidad es una característica compartida también por otros miembros de la familia SLC17. Por ejemplo, NPT1 exhibe tanto una actividad de transporte de iones orgánicos impulsada por $\Delta\psi$, como una actividad de transporte de fosfato inorgánico dependiente de un gradiente de sodio (115). Por su parte, la sialina/VEAT muestra una actividad de transporte de glutamato y aspartato impulsada por $\Delta\psi$ cuando está presente en las vesículas sinápticas. Sin embargo cuando VEAT está presente en lisosomas funciona como un cotransportador de H⁺/ácido siálico (26). Hasta la fecha, se desconoce si VNUT pudiera disponer también de una maquinaria de transporte diferente de la que permite la internalización de los nucleótidos en vesículas.

2.7. VNUT es esencial para la liberación del ATP vesicular.

Una cuestión clave es determinar en qué medida contribuye VNUT a la liberación del ATP vesicular. La generación de ratones deficientes en el gen VNUT (VNUT^{-/-}) ha proporcionado una respuesta a dicha pregunta. Se ha demostrado que tanto el almacenamiento vesicular de ATP, como la liberación de ATP inducida por despolarización, desaparecen completamente en neuronas aisladas de hipocampo de los ratones VNUT^{-/-} (116). Igualmente, la actividad de transporte vesicular de ATP está ausente en los gránulos cromafines aislados de la glándula adrenal de los ratones VNUT^{-/-}, de manera que las células cromafines de estos ratones pierden la capacidad de liberar ATP tras la estimulación con altas concentraciones de K⁺ (116). En los islotes de Langerhans, VNUT está asociado con los gránulos que contienen insulina de las células β y dichos islotes liberan cantidades apreciables de ATP tras la estimulación con altas concentraciones de glucosa. Sin embargo, no se observa la secreción de ATP estimulada por glucosa en los islotes aislados de los ratones VNUT^{-/-} (116). Asimismo, la liberación de ATP de las neuronas del asta dorsal de la médula espinal o del epitelio de la vejiga, también desaparece en los ratones VNUT^{-/-} (117, 118). Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que VNUT es responsable del almacenamiento vesicular de ATP y es un componente esencial para la liberación del ATP vesicular en un gran número de células, incluyendo neuronas y algunas células neuroendocrinas.

Inesperadamente, en ratón, la deficiencia de VNUT no es letal, y los animales son viables y no muestran alteraciones en términos de aumento de peso, tamaño corporal, morfología, ingesta de alimentos y agua, consumo de oxígeno, emisión de dióxido de carbono, tasa

de intercambio respiratorio, así como en actividad locomotora o comportamiento en los test de campo abierto y laberinto en cruz (116). El descubrimiento de este fenotipo contrarió a los expertos en el campo de la señalización purinérgica, pues revelaba que la liberación de ATP vesicular no es esencial para el mantenimiento de la vida, una pesadilla para casi todos los estudiosos de este área. Aunque quizás esta liberación dependiente de VNUT sea esencial, pero otros factores que son regulados al alza o a la baja podrían compensar, de alguna manera los efectos de la deficiencia del gen *VNUT*.

2.8. Expresión y función de *VNUT*.

El transportador vesicular de nucleótidos se ha identificado en distintos tejidos y tipos celulares, sugiriendo su implicación en diferentes funciones fisiológicas. Su expresión ha sido descrita mayoritariamente en el sistema nervioso, tanto central como periférico, y en el sistema neuroendocrino.

2.8.1. Neuronas, astrocitos y microglía

En cerebro, la distribución de VNUT es bastante amplia, observándose una elevada expresión en zonas como el hipocampo, el bulbo olfativo y el cerebelo (119) (Figura 7).

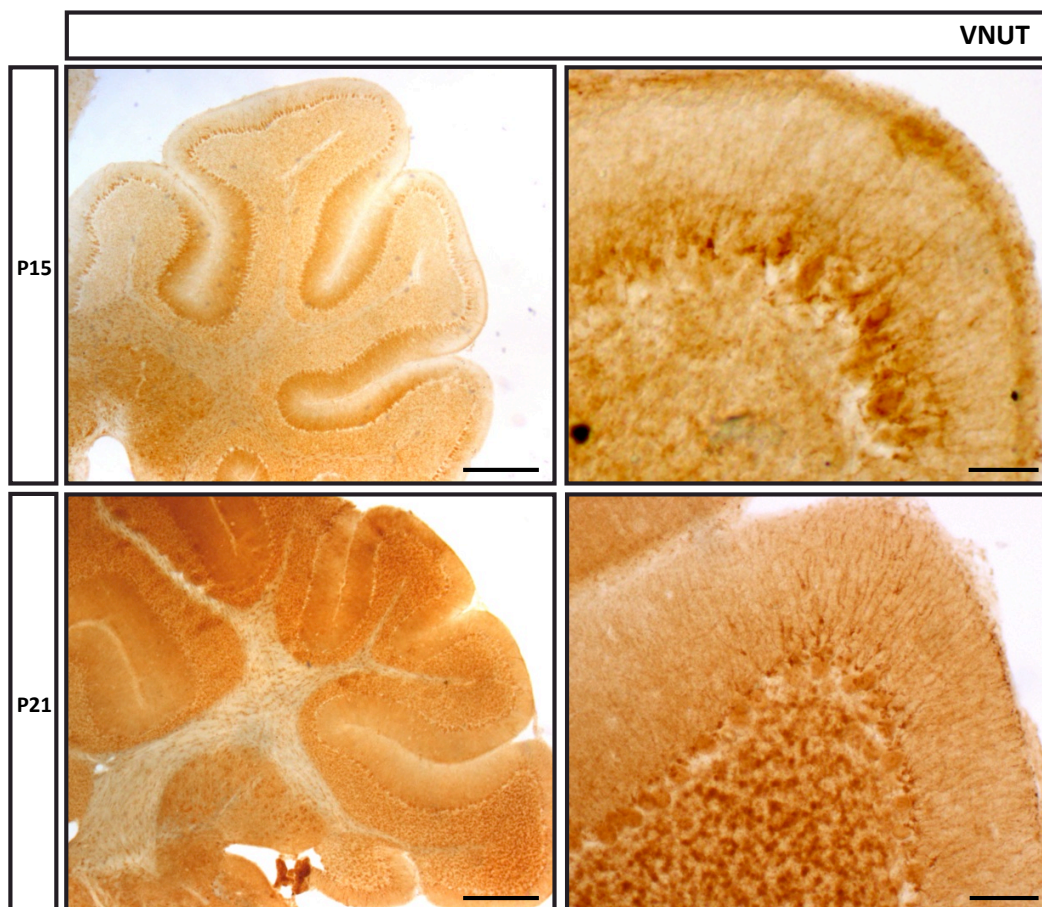


Figura 7. Distribución del transportador VNUT en etapas postnatales del desarrollo del cerebelo. Microfotografías representativas mostrando el marcaje con VNUT en los estadios P15 y P21. Escala 300 μm . En la columna derecha se muestra una región de cada etapa analizada a mayor aumento. Escala 50 μm .

En neuronas de hipocampo, VNUT está asociado con las vesículas sinápticas en terminales excitatorias e inhibitorias, además de estar presente en dendritas postsinápticas y axones pre-terminales (119). Así mismo, se ha observado la presencia de VNUT en una subpoblación de las vesículas sinápticas que contienen VGLUT1 (119), lo que indica que dichas vesículas almacenan ATP y glutamato, pudiendo darse una

liberación simultánea de ambos neurotransmisores por parte de ciertas poblaciones vesiculares. VNUT también se expresa en neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* y el área tegmental ventral, lo que sugiere que estas neuronas son una fuente de ATP extracelular, así como de sus productos de degradación, como el ADP o la adenosina (120). Dado que esta clase de neuronas modulan un amplio rango de comportamientos, como el control motor,

motivación o recompensa (121-124), la neurotransmisión purinérgica podría participar en estas vías. Así mismo, la transmisión purinérgica podría jugar un papel en

desórdenes neurológicos que implican la disregulación de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra*, como es la enfermedad de Parkinson (125).

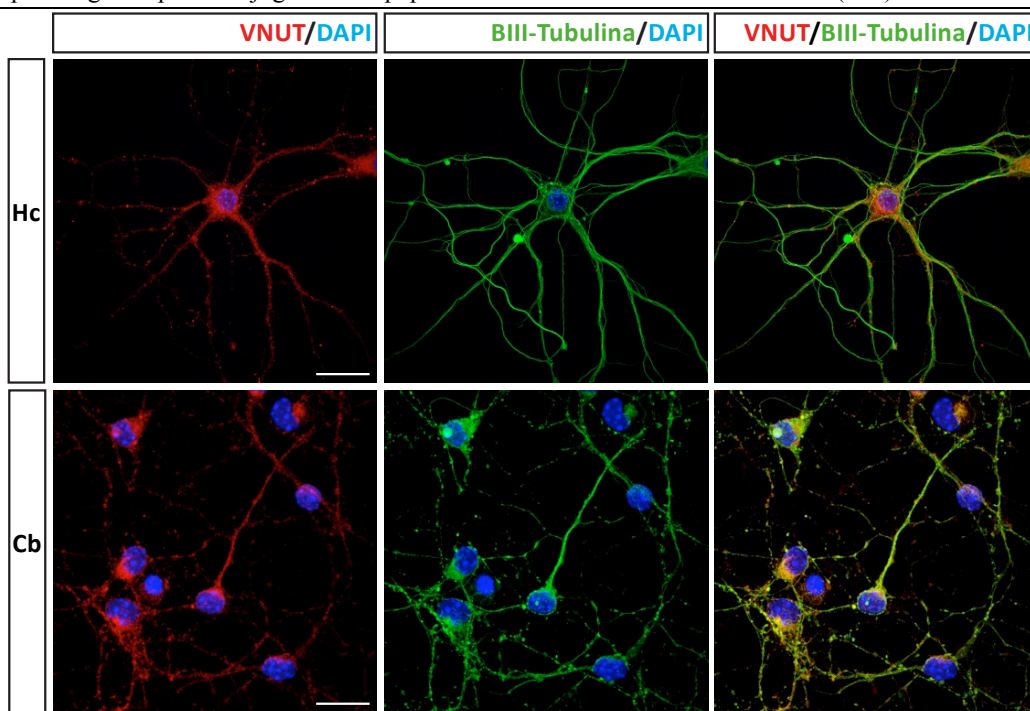


Figura 8. Identificación de VNUT en distintas poblaciones neuronales. Microfotografías representativas que muestran la presencia de VNUT (rojo) en cultivos de neuronas de hipocampo (Hc) y de neuronas granulares de cerebelo de ratón (Cb) a día 7 *in vitro*. Las neuronas se marcaron con la proteína citoesquelética β III-tubulina (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala 20 μ m.

VNUT también podría estar implicado en los procesos de diferenciación neural y elongación axonal. En neuronas de hipocampo embrionario, que presentan receptores P2X7 funcionales localizados principalmente en el cono de crecimiento axonal, la presencia de ATP extracelular, y su efecto sobre los receptores P2X7, reduce el crecimiento del axón. En contraste, tanto la degradación del ATP por acción de ectonucleotidasas, como el silenciamiento de la expresión del receptor P2X7 o su bloqueo farmacológico, incrementa la longitud axonal (126). La presencia de ATP extracelular está ligada a su almacenamiento vesicular y su disponibilidad para ser liberado, lo que sugiere un papel del transportador vesicular VNUT en los procesos de neuritogénesis y diferenciación neuronal. En este sentido, se ha analizado el efecto de la expresión o silenciamiento de VNUT en el proceso de neuritogénesis que ocurre en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras el tratamiento con ácido retinoico. La expresión de VNUT reduce el número y la longitud de las neuritas en estas células, un efecto que es revertido por el silenciamiento de la expresión de este transportador (127).

Los astrocitos y la microglía son otros tipos celulares que secretan ATP en el cerebro. La liberación de ATP por los astrocitos puede inducir la propagación de ondas de calcio en estas células gliales y modular la actividad de las neuronas (128-130). Sin embargo, los mecanismos que regulan la liberación de ATP por estas células no son bien

conocidos, habiéndose descrito en los astrocitos una liberación de ATP tanto dependiente como independiente de Ca^{2+} . La liberación de ATP dependiente de Ca^{2+} de los astrocitos podría utilizar un mecanismo similar a la exocitosis regulada por Ca^{2+} de las vesículas sinápticas. De hecho, la liberación de ATP es dependiente del incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} y los astrocitos poseen varios tipos de vesículas secretoras, incluyendo vesículas de tipo sináptico, vesículas de núcleo denso y lisosomas secretores (131). En astrocitos corticales, VNUT se localiza principalmente en los lisosomas secretores, llevando a cabo el almacenamiento de ATP en estos orgánulos. La inhibición de VNUT por *Evans blue*, así como la reducción de su expresión mediante el uso de ARN de interferencia, reduce la cantidad de ATP liberada de manera dependiente de Ca^{2+} por los astrocitos, mientras que la sobreexpresión de VNUT incrementa dicha liberación (132). En el caso de la microglía, la localización de VNUT difiere, ya que no se ha observado su presencia en los lisosomas (133). Además, en la línea celular microglial MG5, la expresión del transportador aumenta tras el tratamiento con el lipopolisacárido bacteriano (LPS), produciéndose una mayor liberación de ATP (133). Este hecho es de suma importancia, ya que en situaciones como daño cerebral traumático o infección, la microglía podría incrementar la liberación exocitótica de ATP mediante el aumento de la expresión de VNUT. Se ha

demostrado que el ATP y otros nucleótidos extracelulares llevan a cabo un importante papel en la regulación de la migración, la extensión de procesos y la fagocitosis en la microglía (134-136). El incremento en la liberación de ATP, actuando como una señal autocrina, podría acentuar estos comportamientos microgliales. Por otra parte, cuando se expone al compuesto neurotóxico metilmercurio, la microglía excita ATP, el cual, al activar a los receptores

P2Y₁ presentes en los astrocitos, produce la secreción de la citoquina neuroprotectora interleuquina-6 (IL-6). En ratones *VNUT*^{-/-}, la respuesta ante el metilmercurio no se produce, indicando el papel que desempeña este transportador en la comunicación celular entre microglía y astrocitos (137).

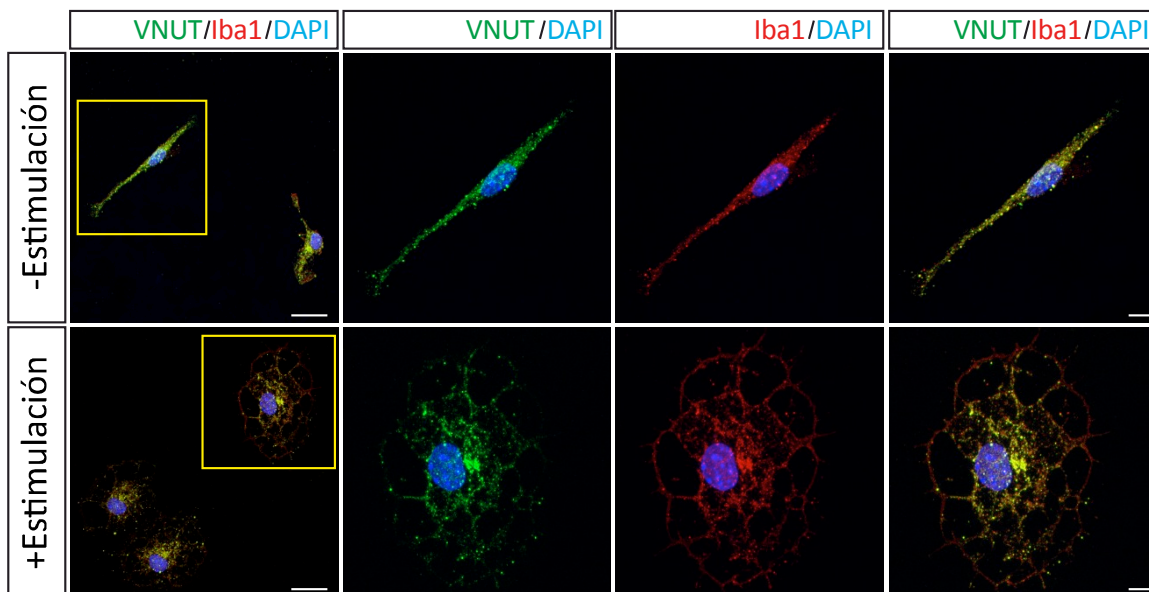


Figura 9. Identificación de VNUT en células de la microglía. Microfotografías representativas de células microgliales quiescentes (paneles superiores) y tratadas con un estímulo activador, el lipopolisacárido bacteriano (LPS), durante 24 horas (paneles inferiores). Las células se marcaron con VNUT (verde) e Iba-1 (rojo), mostrándose la superposición de ambos marcajes. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala 15 μ m. El recuadro muestra una célula ampliada. Escala 5 μ m.

En la médula espinal se ha relacionado a VNUT con el dolor neuropático, una hipersensibilidad al dolor que se produce tras el daño de un nervio periférico a consecuencia de una lesión traumática o como resultado de enfermedades como el cáncer, la diabetes mellitus o la esclerosis múltiple. Una serie de evidencias ponen de manifiesto el papel de las células de la microglía de la médula espinal en el desarrollo del dolor neuropático. Tras el daño de un nervio periférico, la microglía espinal cambia a un estado reactivo, a través de una secuencia de cambios celulares y moleculares, que incluyen el incremento en la expresión de genes que codifican receptores purinérgicos, como el P2X₄ o el P2Y₁₂. En respuesta a la estimulación de estos receptores, la microglía libera una serie de factores bioactivos que producen una alteración en la neurotransmisión en las vías nociceptivas del asta dorsal de la médula espinal. Estas alteraciones patológicas causan una hipersensibilidad que convierte estímulos inicialmente inocuos en señales nociceptivas (138, 139). Recientemente, Inoue y sus colaboradores han demostrado que VNUT y la liberación de ATP vesicular dependiente de VNUT están implicados en la generación y mantenimiento del dolor neuropático (118). En ratones *VNUT*^{-/-} no se observa un incremento en el ATP extracelular en la médula espinal tras el daño de un

nervio periférico, cosa que si ocurre en los ratones control, y la hipersensibilidad al dolor está atenuada. Este fenotipo se observa en ratones en los que se ha suprimido la expresión de VNUT específicamente en las neuronas del asta dorsal, pero no en animales que carecen de VNUT en neuronas sensoriales, astrocitos o microglía. Estos resultados indican que la liberación de ATP vesicular de las neuronas del asta dorsal es esencial para el dolor neuropático (118). En modelos de rata en los que se les produce una lesión de uno de los nervios espinales, se ha observado que hay un incremento de la expresión de VNUT en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (neuronas DRG) (140). Además, VNUT colocaliza con la proteína lisosomal LAMP1 en estas neuronas, lo que sugiere que el almacenamiento de ATP en los lisosomas está activado en estas células. El marcaje de los lisosomas con una proteína fluorescente ha permitido comprobar que los lisosomas son transportados a las terminales centrales de las células DRG. En este estudio, los autores sugieren que una fuente adicional de ATP, que conduzca a la activación de la microglía en el asta dorsal de la médula, tras una lesión nerviosa, podría ser la exocitosis de los lisosomas de las terminales nerviosas centrales de las neuronas DRG (140). De igual forma, VNUT podría tener un papel clave en el dolor neuropático del nervio

trigémico, dado que modula la comunicación purinérgica entre las células satélite gliales y las neuronas del ganglio del trigémico. En un modelo de hiperalgesia, se observó la mutua activación de ambos tipos celulares por un mecanismo dependiente de ATP (141). Todos estos resultados han llevado a proponer el uso de inhibidores de VNUT, con el fin de reducir la liberación de ATP vesicular, para el tratamiento del dolor neuropático (106).

En la retina de ratón, VNUT está presente en las células fotorreceptoras, en las neuronas bipolares y amacrinas, así como en los astrocitos y las células de Müller (142), indicando que la liberación de ATP es mediada por estas células para iniciar la transmisión química purinérgica. En el caso de las células amacrinas que expresan VNUT, éstas son de naturaleza dopaminérgica, lo que parece indicar que podrían coliberar ATP junto con el neurotransmisor dopamina (120). Los niveles de ATP extracelular y de expresión de VNUT se encuentran incrementados en retinas glaucomatosas (143), sugiriendo la implicación del transportador en la progresión de esta patología, así como el papel que juega el ATP en la disfunción de la retina, posiblemente a través de la activación del receptor P2X7.

En el sistema nervioso periférico, se ha visto que VNUT está presente en los lisosomas de las células de Schwann y que su expresión aumenta en el fenómeno conocido como degeneración Walleriana (144), la degeneración que se produce en la parte distal de un axón tras un daño que conduzca a una separación entre el axón y el cuerpo celular. En explantes de nervio ciático en los que se produce la lesión axonal, la liberación de ATP por parte de las células de Schwann parece ser a través de la exocitosis de los lisosomas, donde VNUT participaría en el almacenamiento previo del nucleótido en dichas vesículas.

2.8.2. Páncreas

En el tejido pancreático, VNUT se encuentra tanto en la zona exocrina como en la endocrina. En la primera, se le ha relacionado con el almacenamiento de ATP junto con las enzimas digestivas en los gránulos de zimógenos de los acinos pancreáticos (145), produciéndose su liberación tras un estímulo colinérgico (146). En el páncreas endocrino, VNUT está presente en los gránulos de insulina de las células β de los islotes de Langerhans. Estos orgánulos tienen, por tanto, la capacidad de almacenar el ATP y liberarlo tras la estimulación de los islotes con glucosa. Consecuentemente con estos resultados, la supresión en la expresión de VNUT en las células β reduce significativamente la liberación de ATP dependiente de glucosa (116, 147). Sin embargo, existe cierta controversia sobre el papel del ATP liberado en la regulación de la secreción de insulina. Geisler y colaboradores mostraron que la reducción en la expresión de VNUT, mediante el uso de ARN de interferencia, en células MIN6 (una línea celular derivada de insulinoma), o en islotes aislados de ratón, conduce a una disminución en la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS, de *glucose-stimulated insuline secretion*). Además, el bloqueo

farmacológico de VNUT, mediante el uso del inhibidor *Evans Blue*, también reduce la GSIS de manera dependiente de concentración. El tratamiento con ATP exógeno revierte de manera efectiva el déficit en la secreción de insulina inducido tanto por el silenciamiento de la expresión de VNUT como por su inhibición funcional (147). Estos resultados parecen indicar que la liberación de ATP mediada por VNUT es esencial para la secreción normal de insulina en los islotes pancreáticos. Por otra parte, la sobreexpresión de VNUT en las células β , que conduce a una mayor liberación de ATP, induce asimismo un aumento en la secreción de insulina (147). Estos resultados indican que el ATP liberado por los islotes actuaría como un mecanismo de retroalimentación, facilitando la liberación de insulina. En aparente contradicción con el trabajo anterior, un estudio llevado en ratones *VNUT*^{-/-} muestra que la liberación de insulina en respuesta a glucosa en islotes aislados de estos ratones es aproximadamente 1,5 veces mayor que la que se observa en los islotes de ratones control. Además, la adición de bajas concentraciones de ATP inhibe la liberación de insulina estimulada por glucosa en islotes tanto de los ratones *VNUT*^{-/-} como de los animales control. Estos resultados indicarían que la secreción de insulina en los islotes pancreáticos es regulada negativamente por ATP (116). Por otra parte, el ratón *VNUT*^{-/-} exhibe hipoglucemia, así como un aumento en la sensibilidad a la insulina. Un incremento en los niveles de fosforilación de la Akt hepática, una proteína clave en la cascada de señalización de la insulina, podría explicar la mayor sensibilidad a la insulina en los ratones *VNUT*^{-/-} (116). A pesar de la discrepancia entre estos estudios, que puede ser consecuencia de las diferentes aproximaciones metodológicas utilizadas, todos estos resultados ponen de manifiesto que VNUT desempeña una importante función en la homeostasis de la glucosa, a través de la regulación de los niveles de insulina y de la sensibilidad a la misma.

2.8.3. Botones gustativos

Las células gustativas son células epiteliales quimiosensoriales, responsables de la percepción del sabor, que se clasifican en tres grupos: células de tipo I, II y III. Las células de tipo II expresan receptores acoplados a proteínas G que responden a azúcares, compuestos amargos y aminoácidos y son responsables de la percepción de los sabores dulce, amargo y umami. Estas células transmiten la señal del sabor a los nervios gustativos que llevan esa información al sistema nervioso central. Una cuestión sin resolver en este sistema es cómo las células de tipo II transducen la señal del sabor a los nervios gustativos, ya que no forman sinapsis convencionales con las neuronas. Sin embargo se sabe que la señalización por ATP es esencial para esta comunicación celular (148). Un estudio reciente ha demostrado que las células de tipo II secretan ATP a través del modulador 1 de la homeostasis del calcio, CALHM1, un canal iónico de la membrana plasmática permeable a ATP. Ratones deficientes en esta proteína pierden tanto la capacidad de liberar ATP de las células de tipo II, como la

capacidad de percibir los sabores dulce, amargo y umami (149). Mediante técnicas de inmunofluorescencia, se ha observado que en los botones gustativos VNUT se expresa selectivamente en las células de tipo II. Además, cuando se analiza el desarrollo de la lengua tras el nacimiento, se observa que VNUT muestra un patrón de expresión temporal y espacial que se correlaciona con el de marcadores específicos de las células de tipo II (150). La supresión de la expresión de VNUT no afecta a la percepción de los sabores dulce, amargo y umami (151). Sin embargo, el análisis por microarray de la expresión de genes en botones gustativos de ratones *VNUT^{-/-}* indica que los niveles de expresión de algunos componentes de la señalización GABAérgica están marcadamente disminuidos. En particular, la expresión de *Gabrg1*, una subunidad de los receptores de GABA, disminuye a una centésima parte de la que se observa en los botones gustativos de los animales control. Además, la expresión de *Gad2*, un enzima que sintetiza GABA, disminuye a un tercio de la observada en los botones gustativos control.

2.8.4. Vejiga urinaria

La vejiga urinaria posee un mecanismo de transducción mecanosensorial purinérgico para regular el reflejo miccional. El urotelio de la vejiga secreta ATP durante la distensión de la vejiga y el uréter, y esto estimula los receptores P2X3 y P2X2/3 en las fibras nerviosas aferentes suburoteliales (152). Recientemente se ha encontrado que el epitelio de la vejiga expresa VNUT en vesículas fusiformes/discoidales. La liberación de ATP vesicular está implicada en la relajación de la vejiga promovida por el almacenamiento de la orina durante la fase temprana de llenado, mediante la estimulación de receptores P2 en los nervios sensoriales suburoteliales. En la vejiga de ratones *VNUT^{-/-}*, la liberación vesicular de ATP se encuentra alterada, observándose una reducción en la capacidad de acomodación de la vejiga desde la fase temprana de almacenamiento y mostrando estos animales una micción frecuente (117). Cabe señalar que la liberación de ATP vesicular ocurre cuando la estimulación es débil (distensión débil) en una fase temprana de llenado. Por otra parte, una fuerte estimulación, es decir, una fuerte distensión, provoca la liberación de ATP a través de múltiples mecanismos. Estos incluyen hemicanales de conexina en una fase tardía de llenado, estimulando receptores P2 en las células intersticiales, miofibroblastos o fibras nerviosas aferentes para facilitar la transmisión de las señales de llenado de la vejiga al sistema nervioso central. Por lo tanto, la vejiga utiliza sistemas de liberación de ATP dependientes de VNUT o mediados por hemicanales para el almacenamiento de la orina y el control de la micción.

2.9. Conclusiones

Está ampliamente aceptado que VNUT es el responsable del almacenamiento de ATP y otros nucleótidos en vesículas de diferentes células secretoras y, por tanto, juega un papel clave en la liberación de los nucleótidos vesiculares y el inicio de la transmisión

química purinérgica. Tanto la reducción de la expresión de VNUT, como la inhibición de su actividad, reducen la liberación de ATP vesicular y conducen a una disminución en la señalización química purinérgica. Sin embargo, la liberación neta de ATP de las células muestra unas características complejas, ya que tanto la liberación de ATP vesicular como la liberación a través de canales iónicos permeables a ATP en la membrana plasmática, parecen participar en este proceso. La regulación al alza de los canales permeables a ATP podría compensar en cierta medida los efectos de la supresión de la expresión de VNUT en los animales transgénicos deficientes en esta proteína. En conjunto, las evidencias obtenidas de los ratones *VNUT^{-/-}* indican que la liberación de ATP vesicular está implicada en la modulación de la neurotransmisión y la regulación de la función endocrina, el metabolismo y la percepción química. La deficiencia en la liberación vesicular de ATP podría tener un efecto beneficioso en ciertas condiciones patológicas. En particular, los ratones deficientes en VNUT muestran resistencia al dolor neuropático y se observa también un efecto terapéutico frente a la diabetes, a través del incremento en la sensibilidad a insulina. Por tanto, VNUT podría constituir una nueva diana molecular en la fisiopatología de la transmisión purinérgica. La disminución en la señalización purinérgica, mediante la inhibición de la actividad de VNUT o la reducción de la expresión del gen *VNUT*, podría ser utilizada con fines terapéuticos.

3. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la financiación de la Fundación Ramón Areces (PR2018/16-02), del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (BFU2014-53654-P) y de la Comunidad de Madrid (BRADECM S2013/ICE-2958). Felipe Ortega es investigador contratado a través del programa Ramón y Cajal (RYC-2013-13290).

4. REFERENCIAS

1. Blakely RD, Edwards RH. Vesicular and plasma membrane transporters for neurotransmitters. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4: a005595.
2. Omote H, Miyaji T, Hiasa M, *et al.* Structure, Function, and Drug Interactions of Neurotransmitter Transporters in the Postgenomic Era. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2016; 56: 385-402.
3. Omote H, Moriyama Y. Vesicular neurotransmitter transporters: an approach for studying transporters with purified proteins. *Physiology (Bethesda)* 2013; 28: 39-50.
4. Chen L, Ding Y, Cagniard B, *et al.* Unregulated cytosolic dopamine causes neurodegeneration associated with oxidative stress in mice. *J Neurosci* 2008; 28: 425-33.
5. Pifl C, Rajput A, Reither H, *et al.* Is Parkinson's disease a vesicular dopamine storage disorder? Evidence from a study in isolated synaptic vesicles of human and nonhuman primate striatum. *J Neurosci* 2014; 34: 8210-8.

6. Caudle WM, Colebrooke RE, Emson PC, *et al.* Altered vesicular dopamine storage in Parkinson's disease: a premature demise. *Trends Neurosci* 2008; 31: 303-8.
7. Johnson RG, Jr. Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev* 1988; 68: 232-307.
8. Gualix J, Abal M, Pintor J, *et al.* Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for a mnemonic regulation. *J Biol Chem* 1996; 271: 1957-65.
9. Hiasa M, Togawa N, Miyaji T, *et al.* Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets. *Physiol Rep* 2014; 2: e12034.
10. Anlauf M, Schafer MK, Depboylu C, *et al.* The vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) is expressed by normal and tumor cutaneous mast cells and Langerhans cells of the skin but is absent from Langerhans cell histiocytosis. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 779-88.
11. Thomas-Reetz A, Hell JW, During MJ, *et al.* A gamma-aminobutyric acid transporter driven by a proton pump is present in synaptic-like microvesicles of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 5317-21.
12. Morimoto R, Uehara S, Yatsushiro S, *et al.* Secretion of L-glutamate from osteoclasts through transcytosis. *EMBO J* 2006; 25: 4175-86.
13. Reimer RJ. SLC17: a functionally diverse family of organic anion transporters. *Mol Aspects Med* 2013; 34: 350-9.
14. Hiasa M, Miyaji T, Haruna Y, *et al.* Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter. *Sci Rep* 2014; 4: 6836.
15. Eiden LE, Schafer MK, Weihe E, *et al.* The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch* 2004; 447: 636-40.
16. Gasnier B. The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflugers Arch* 2004; 447: 756-9.
17. Njus D, Kelley PM, Harnadek GJ. Bioenergetics of secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1986; 853: 237-65.
18. Whittaker VP. Cholinergic synaptic vesicles from the electromotor nerve terminals of Torpedo. Composition and life cycle. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 493: 77-91.
19. Muench SP, Trinick J, Harrison MA. Structural divergence of the rotary ATPases. *Q Rev Biophys* 2011; 44: 311-56.
20. Toei M, Saum R, Forgac M. Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry* 2010; 49: 4715-23.
21. Parsons SM. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB J* 2000; 14: 2423-34.
22. Van Liefvering J, Massie A, Portelli J, *et al.* Are vesicular neurotransmitter transporters potential treatment targets for temporal lobe epilepsy? *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 139.
23. Preobraschenski J, Zander JF, Suzuki T, *et al.* Vesicular glutamate transporters use flexible anion and cation binding sites for efficient accumulation of neurotransmitter. *Neuron* 2014; 84: 1287-301.
24. Juge N, Muroyama A, Hiasa M, *et al.* Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl⁻/gamma-aminobutyrate Co-transporter. *J Biol Chem* 2009; 284: 35073-8.
25. Reimer RJ, Edwards RH. Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family. *Pflugers Arch* 2004; 447: 629-35.
26. Miyaji T, Echigo N, Hiasa M, *et al.* Identification of a vesicular aspartate transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 11720-4.
27. Sawada K, Echigo N, Juge N, *et al.* Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 5683-6.
28. McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, *et al.* Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 1997; 389: 870-6.
29. Farsi Z, Preobraschenski J, van den Bogaart G, *et al.* Single-vesicle imaging reveals different transport mechanisms between glutamatergic and GABAergic vesicles. *Science* 2016; 351: 981-4.
30. Egashira Y, Takase M, Watanabe S, *et al.* Unique pH dynamics in GABAergic synaptic vesicles illuminates the mechanism and kinetics of GABA loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: 10702-7.
31. Omote H, Miyaji T, Juge N, *et al.* Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry* 2011; 50: 5558-65.
32. Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremerey RT, Jr., *et al.* Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 2000; 289: 957-60.
33. Tabb JS, Kish PE, Van Dyke R, *et al.* Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem* 1992; 267: 15412-8.
34. Bai L, Xu H, Collins JF, *et al.* Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem* 2001; 276: 36764-9.
35. Naito S, Ueda T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem* 1985; 44: 99-109.
36. Knoth J, Zallakian M, Njus D. Stoichiometry of H⁺-linked dopamine transport in chromaffin granule ghosts. *Biochemistry* 1981; 20: 6625-9.
37. Nguyen ML, Cox GD, Parsons SM. Kinetic

- parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine. *Biochemistry* 1998; 37: 13400-10.
38. Juge N, Gray JA, Omote H, *et al.* Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* 2010; 68: 99-112.
 39. Alfonso A, Grundahl K, Duerr JS, *et al.* The *Caenorhabditis elegans* unc-17 gene: a putative vesicular acetylcholine transporter. *Science* 1993; 261: 617-9.
 40. Wojcik SM, Katsurabayashi S, Guillemin I, *et al.* A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. *Neuron* 2006; 50: 575-87.
 41. Gras C, Herzog E, Belenchi GC, *et al.* A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 5442-51.
 42. Farnsworth SJ, Volz TJ, Hanson GR, *et al.* Cocaine alters vesicular dopamine sequestration and potassium-stimulated dopamine release: the role of D2 receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 328: 807-12.
 43. Volz TJ, Fleckenstein AE, Hanson GR. Methamphetamine-induced alterations in monoamine transport: implications for neurotoxicity, neuroprotection and treatment. *Addiction* 2007; 102 Suppl 1: 44-8.
 44. Winter S, Brunk I, Walther DJ, *et al.* Galphao2 regulates vesicular glutamate transporter activity by changing its chloride dependence. *J Neurosci* 2005; 25: 4672-80.
 45. Holtje M, Winter S, Walther D, *et al.* The vesicular monoamine content regulates VMAT2 activity through Galphaq in mouse platelets. Evidence for autoregulation of vesicular transmitter uptake. *J Biol Chem* 2003; 278: 15850-8.
 46. Ahnert-Hilger G, Nurnberg B, Exner T, *et al.* The heterotrimeric G protein Go2 regulates catecholamine uptake by secretory vesicles. *EMBO J* 1998; 17: 406-13.
 47. Brunk I, Blex C, Rachakonda S, *et al.* The first luminal domain of vesicular monoamine transporters mediates G-protein-dependent regulation of transmitter uptake. *J Biol Chem* 2006; 281: 33373-85.
 48. Burnstock G, Kennedy C. P2X receptors in health and disease. *Adv Pharmacol* 2011; 61: 333-72.
 49. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, *et al.* International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 281-341.
 50. Gomez-Villafuertes R, Pintor J, Miras-Portugal MT, *et al.* Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase activity in Neuro-2a neuroblastoma cells: changes in expression associated with neuronal differentiation. *J Neurochem* 2014; 131: 290-302.
 51. Miras-Portugal MT, Torres M, Rotllan P, *et al.* Adenosine transport in bovine chromaffin cells in culture. *J Biol Chem* 1986; 261: 1712-9.
 52. Gunther Sillero MA, de Diego A, Silles E, *et al.* Synthesis of (di)nucleoside polyphosphates by the ubiquitin activating enzyme E1. *FEBS Lett* 2005; 579: 6223-9.
 53. Sillero MA, Guranowski A, Sillero A. Synthesis of dinucleoside polyphosphates catalyzed by firefly luciferase. *Eur J Biochem* 1991; 202: 507-13.
 54. Brevet A, Chen J, Leveque F, *et al.* In vivo synthesis of adenylylated bis(5'-nucleosidyl) tetraphosphates (Ap4N) by *Escherichia coli* aminoacyl-tRNA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 8275-9.
 55. Zamecnik PC, Stephenson ML, Janeway CM, *et al.* Enzymatic synthesis of diadenosine tetraphosphate and diadenosine triphosphate with a purified lysyl-sRNA synthetase. *Biochem Biophys Res Commun* 1966; 24: 91-7.
 56. Jankowski V, van der Giet M, Mischak H, *et al.* Dinucleoside polyphosphates: strong endogenous agonists of the purinergic system. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 1142-53.
 57. Pintor J, Diaz-Hernandez M, Gualix J, *et al.* Diadenosine polyphosphate receptors. from rat and guinea-pig brain to human nervous system. *Pharmacol Ther* 2000; 87: 103-15.
 58. Pintor J, Rotllan P, Torres M, *et al.* Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Anal Biochem* 1992; 200: 296-300.
 59. Rodriguez del Castillo A, Torres M, Delicado EG, *et al.* Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J Neurochem* 1988; 51: 1696-703.
 60. Winkler H. The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. *Neuroscience* 1976; 1: 65-80.
 61. Pintor J, Torres M, Miras-Portugal MT. Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells. *Life Sci* 1991; 48: 2317-24.
 62. Jo YH, Schlichter R. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci* 1999; 2: 241-5.
 63. Sawynok J, Downie JW, Reid AR, *et al.* ATP release from dorsal spinal cord synaptosomes: characterization and neuronal origin. *Brain Res* 1993; 610: 32-8.
 64. von Kugelgen I, Starke K. Release of noradrenaline and ATP by electrical stimulation and nicotine in guinea-pig vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1991; 344: 419-29.
 65. Richardson PJ, Brown SJ. ATP release from affinity-

- purified rat cholinergic nerve terminals. *J Neurochem* 1987; 48: 622-30.
66. Silinsky EM. On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J Physiol* 1975; 247: 145-62.
 67. Burnstock G, Krugel U, Abbracchio MP, *et al.* Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog Neurobiol* 2011; 95: 229-74.
 68. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007; 87: 659-797.
 69. Pintor J, Kowalewski HJ, Torres M, *et al.* Synaptic Vesicle Storage of Diadenosine Polyphosphates in the Torpedo Electric Organ. *Neuroscience Research Communications* 1992; 10: 9-15.
 70. Pintor J, Diaz-Rey MA, Torres M, *et al.* Presence of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in rat brain synaptic terminals. Ca²⁺ dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neurosci Lett* 1992; 136: 141-4.
 71. Dubyak GR, el-Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 1993; 265: C577-606.
 72. Hutton JC, Penn EJ, Peshavaria M. Low-molecular-weight constituents of isolated insulin-secretory granules. Bivalent cations, adenine nucleotides and inorganic phosphate. *Biochem J* 1983; 210: 297-305.
 73. Holmsen H, Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. *Annu Rev Med* 1979; 30: 119-34.
 74. Rudnick G. Vesicular ATP transport is a hard (V)NUT to crack. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 5949-50.
 75. Winkler H, Schopf JA, Hortnagl H. Bovine adrenal medulla: subcellular distribution of newly synthesised catecholamines, nucleotides and chromogranins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1972; 273: 43-61.
 76. Stevens P, Robinson RL, Van Dyke K, *et al.* Studies on the synthesis and release of adenosine triphosphate-8-³H in the isolated perfused cat adrenal gland. *J Pharmacol Exp Ther* 1972; 181: 463-71.
 77. Stjärne L, Hedqvist R, Lagercrantz H. Catecholamine and adenine nucleotide material in effluent from stimulated adrenal medulla and spleen: a study of the exocytosis hypothesis for hormone secretion and neurotransmitter release. *Biochem Pharmacol* 1970; 19: 1147-58.
 78. Peer LJ, Winkler H, Snider SR, *et al.* Synthesis of nucleotides in adrenal medulla and their uptake into chromaffin granules. *Biochem Pharmacol* 1976; 25: 311-5.
 79. Kostron H, Winkler H, Peer LJ, *et al.* Uptake of adenosine triphosphate by isolated adrenal chromaffin granules: a carrier-mediated transport. *Neuroscience* 1977; 2: 159-66.
 80. Aberer W, Kostron H, Huber E, *et al.* A characterization of the nucleotide uptake of chromaffin granules of bovine adrenal medulla. *Biochem J* 1978; 172: 353-60.
 81. Weber A, Winkler H. Specificity and mechanism of nucleotide uptake by adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* 1981; 6: 2269-76.
 82. Taugner G, Heym C, Kummer W, *et al.* Nucleosidetriphosphate-ADP-phosphotransferase: a new enzyme in chromaffin vesicles. *Biog Amines* 1988; 5: 409-42.
 83. Taugner G, Wunderlich I. Phosphoryl group transfer by a fraction of the soluble proteins of catecholamine storage vesicles. *J Neurochem* 1981; 36: 1879-92.
 84. Gualix J, Abal M, Pintor J, *et al.* Presence of epsilon-adenosine tetraphosphate in chromaffin granules after transport of epsilon-ATP. *FEBS Lett* 1996; 391: 195-8.
 85. Van Dyke K, Robinson R, Urquilla P, *et al.* An analysis of nucleotides and catecholamines in bovine medullary granules by anion exchange high pressure liquid chromatography and fluorescence. Evidence that most of the catecholamines in chromaffin granules are stored without associated ATP. *Pharmacology* 1977; 15: 377-91.
 86. Gomez-Villafuertes R, Gualix J, Miras-Portugal MT, *et al.* Adenosine 5'-tetraphosphate (Ap(4)), a new agonist on rat midbrain synaptic terminal P2 receptors. *Neuropharmacology* 2000; 39: 2381-90.
 87. Gualix J, Alvarez AM, Pintor J, *et al.* Studies of chromaffin granule functioning by flow cytometry: transport of fluorescent epsilon-ATP and granular size increase induced by ATP. *Receptors Channels* 1999; 6: 449-61.
 88. Gualix J, Fideu MD, Pintor J, *et al.* Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal medulla. *FASEB J* 1997; 11: 981-90.
 89. Gasnier B, Scherman D, Henry JP. Inactivation of the catecholamine transporter during the preparation of chromaffin granule membrane 'ghosts'. *FEBS Lett* 1987; 222: 215-9.
 90. Henry JP, Sagne C, Bedet C, *et al.* The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain. *Neurochem Int* 1998; 32: 227-46.
 91. Taugner G, Wunderlich I, John F. Distribution and metabolic fate of adenosine nucleotides in the membrane of storage vesicles from bovine adrenal medulla. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1979; 309: 29-43.
 92. Gruninger HA, Apps DK, Phillips JH. Adenine nucleotide and phosphoenolpyruvate transport by bovine chromaffin granule "ghosts". *Neuroscience* 1983; 9: 917-24.

93. Bankston LA, Guidotti G. Characterization of ATP transport into chromaffin granule ghosts. Synergy of ATP and serotonin accumulation in chromaffin granule ghosts. *J Biol Chem* 1996; 271: 17132-8.
94. Zimmermann H. Turnover of adenine nucleotides in cholinergic synaptic vesicles of the Torpedo electric organ. *Neuroscience* 1978; 3: 827-36.
95. Luqmani YA. Nucleotide uptake by isolated cholinergic synaptic vesicles: evidence for a carrier of adenosine 5'-triphosphate. *Neuroscience* 1981; 6: 1011-21.
96. Gualix J, Pintor J, Miras-Portugal MT. Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J Neurochem* 1999; 73: 1098-104.
97. Roseth S, Fykse EM, Fonnum F. Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *J Neurochem* 1995; 65: 96-103.
98. Neet KE, Ainslie GR, Jr. Hysteretic enzymes. *Methods Enzymol* 1980; 64: 192-226.
99. Casillas T, Delicado EG, Garcia-Carmona F, *et al.* Kinetic and allosteric cooperativity in L-adenosine transport in chromaffin cells. A mnemonical transporter. *Biochemistry* 1993; 32: 14203-9.
100. McLennan AG. Dinucleoside polyphosphates-friend or foe? *Pharmacol Ther* 2000; 87: 73-89.
101. Miyaji T, Sawada K, Omote H, *et al.* Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter. *J Biol Chem* 2011; 286: 42881-7.
102. Gropp T, Brustovetsky N, Klingenberg M, *et al.* Kinetics of electrogenic transport by the ADP/ATP carrier. *Biophys J* 1999; 77: 714-26.
103. Austin J, Aprille JR. Carboxyatractyloside-insensitive influx and efflux of adenine nucleotides in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1984; 259: 154-60.
104. Montezinho LP, Fonseca CP, Geraldés CF, *et al.* Quantification and localization of intracellular free mg in bovine chromaffin cells. *Met Based Drugs* 2002; 9: 69-80.
105. Gunther T. Concentration, compartmentation and metabolic function of intracellular free Mg²⁺. *Magnes Res* 2006; 19: 225-36.
106. Kato Y, Hiasa M, Ichikawa R, *et al.* Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017.
107. Kato Y, Omote H, Miyaji T. Inhibitors of ATP release inhibit vesicular nucleotide transporter. *Biol Pharm Bull* 2013; 36: 1688-91.
108. Martin CA, Krantz DE. *Drosophila melanogaster* as a genetic model system to study neurotransmitter transporters. *Neurochem Int* 2014; 73: 71-88.
109. Hobert O. The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* 2013: 1-106.
110. Sesma JI, Kreda SM, Okada SF, *et al.* Vesicular nucleotide transporter regulates the nucleotide content in airway epithelial mucin granules. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 304: C976-84.
111. Jung SK, Morimoto R, Otsuka M, *et al.* Transmembrane topology of vesicular glutamate transporter 2. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 547-9.
112. Foss SM, Li H, Santos MS, *et al.* Multiple dileucine-like motifs direct VGLUT1 trafficking. *J Neurosci* 2013; 33: 10647-60.
113. Juge N, Yoshida Y, Yatsushiro S, *et al.* Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries. *J Biol Chem* 2006; 281: 39499-506.
114. Almqvist J, Huang Y, Laaksonen A, *et al.* Docking and homology modeling explain inhibition of the human vesicular glutamate transporters. *Protein Sci* 2007; 16: 1819-29.
115. Iharada M, Miyaji T, Fujimoto T, *et al.* Type 1 sodium-dependent phosphate transporter (SLC17A1 Protein) is a Cl(-)-dependent urate exporter. *J Biol Chem* 2010; 285: 26107-13.
116. Sakamoto S, Miyaji T, Hiasa M, *et al.* Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Sci Rep* 2014; 4: 6689.
117. Nakagomi H, Yoshiyama M, Mochizuki T, *et al.* Urothelial ATP exocytosis: regulation of bladder compliance in the urine storage phase. *Sci Rep* 2016; 6: 29761.
118. Masuda T, Ozono Y, Mikuriya S, *et al.* Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. *Nat Commun* 2016; 7: 12529.
119. Larsson M, Sawada K, Morland C, *et al.* Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cereb Cortex* 2012; 22: 1203-14.
120. Ho T, Jobling AI, Greferath U, *et al.* Vesicular expression and release of ATP from dopaminergic neurons of the mouse retina and midbrain. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 389.
121. Wise RA. Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotox Res* 2008; 14: 169-83.
122. Joshua M, Adler A, Bergman H. The dynamics of dopamine in control of motor behavior. *Curr Opin Neurobiol* 2009; 19: 615-20.
123. Schultz W. Updating dopamine reward signals. *Curr Opin Neurobiol* 2013; 23: 229-38.
124. Cacheop R, Cheer JF. Local control of striatal dopamine release. *Front Behav Neurosci* 2014; 8: 188.
125. Benazzouz A, Mamad O, Abedi P, *et al.* Involvement of dopamine loss in extrastriatal basal ganglia nuclei in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* 2014; 6: 87.
126. Díez-Zaera M, Díaz-Hernández JI, Hernández-Alvarez E, *et al.* Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal

- neurons. *Mol Biol Cell* 2011; 22: 1014-24.
127. Menendez-Mendez A, Diaz-Hernandez JI, Miras-Portugal MT. The vesicular nucleotide transporter (VNUT) is involved in the extracellular ATP effect on neuronal differentiation. *Purinergic Signal* 2015; 11: 239-49.
 128. Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, *et al.* ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 2003; 40: 971-82.
 129. Newman EA. Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci* 2003; 23: 1659-66.
 130. Stout CE, Costantin JL, Naus CC, *et al.* Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 2002; 277: 10482-8.
 131. Parpura V, Zorec R. Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev* 2010; 63: 83-92.
 132. Oya M, Kitaguchi T, Yanagihara Y, *et al.* Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 438: 145-51.
 133. Imura Y, Morizawa Y, Komatsu R, *et al.* Microglia release ATP by exocytosis. *Glia* 2013; 61: 1320-30.
 134. Ohsawa K, Irino Y, Sanagi T, *et al.* P2Y12 receptor-mediated integrin-beta1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia* 2010; 58: 790-801.
 135. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, *et al.* UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 2007; 446: 1091-5.
 136. Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, *et al.* Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 2001; 21: 1975-82.
 137. Shinozaki Y, Nomura M, Iwatsuki K, *et al.* Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. *Sci Rep* 2014; 4: 4329.
 138. Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, *et al.* P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 2008; 28: 4949-56.
 139. Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, *et al.* P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 2003; 424: 778-83.
 140. Jung J, Uesugi N, Jeong NY, *et al.* Increase of transcription factor EB (TFEB) and lysosomes in rat DRG neurons and their transportation to the central nerve terminal in dorsal horn after nerve injury. *Neuroscience* 2016; 313: 10-22.
 141. Goto T, Oh SB, Takeda M, *et al.* Recent advances in basic research on the trigeminal ganglion. *J Physiol Sci* 2016; 66: 381-6.
 142. Moriyama S, Hiasa M. Expression of Vesicular Nucleotide Transporter in the Mouse Retina. *Biol Pharm Bull* 2016; 39: 564-9.
 143. Perez de Lara MJ, Guzman-Aranguiz A, de la Villa P, *et al.* Increased levels of extracellular ATP in glaucomatous retinas: Possible role of the vesicular nucleotide transporter during the development of the pathology. *Mol Vis* 2015; 21: 1060-70.
 144. Shin YH, Lee SJ, Jung J. Secretion of ATP from Schwann cells through lysosomal exocytosis during Wallerian degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 429: 163-7.
 145. Haanes KA, Novak I. ATP storage and uptake by isolated pancreatic zymogen granules. *Biochem J* 2010; 429: 303-11.
 146. Haanes KA, Kowal JM, Arpino G, *et al.* Role of vesicular nucleotide transporter VNUT (SLC17A9) in release of ATP from AR42J cells and mouse pancreatic acinar cells. *Purinergic Signal* 2014.
 147. Geisler JC, Corbin KL, Li Q, *et al.* Vesicular nucleotide transporter-mediated ATP release regulates insulin secretion. *Endocrinology* 2013; 154: 675-84.
 148. Finger TE, Danilova V, Barrows J, *et al.* ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 2005; 310: 1495-9.
 149. Taruno A, Vingtdoux V, Ohmoto M, *et al.* CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature* 2013; 495: 223-6.
 150. Iwatsuki K, Ichikawa R, Hiasa M, *et al.* Identification of the vesicular nucleotide transporter (VNUT) in taste cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388: 1-5.
 151. Ichikawa R, Nakamura E, Nomura M, *et al.* The role of VNUT gene on the taste responses. *The Journal of the Japanese Association for the Study of Taste and Smell* 2013; 20: 271-4.
 152. Burnstock G. Purinergic signalling in the urinary tract in health and disease. *Purinergic Signal* 2014; 10: 103-55.