

3. La maquinaria molecular de la exocitosis: ¿un nuevo marcador en las enfermedades neurodegenerativas?

DIEGO BUSTILLO MERINO, YOLANDA GUTIÉRREZ MARTÍN
Y
ANTONIO RODRÍGUEZ ARTALEJO

RESUMEN

Entre los procesos de tráfico intracelular de membranas destaca la exocitosis como mecanismo fundamental de la liberación de mediadores celulares. La exocitosis implica la fusión de la membrana de una vesícula secretora con la membrana plasmática y el establecimiento de una solución de continuidad entre el interior vesicular y el medio externo que posibilita la liberación del mediador. La exocitosis de neurotransmisores es parte esencial de la transmisión sináptica y, por extensión, del funcionamiento del sistema nervioso. El descubrimiento de las proteínas SNARE («soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor —NSF— attachment protein receptor») constituyó un hito fundamental en la investigación de los mecanismos del tráfico de membranas, disponiéndose en la actualidad de un conocimiento detallado de las isoformas responsables de la exocitosis. La liberación de neurotransmisores es un proceso altamente regulado en el tiempo y en el espacio que se desencadena en respuesta a un incremento fugaz y localizado de la concentración citosólica de calcio. Ello implica la existencia de una maquinaria proteica propia de la exocitosis neuronal que posibilite la extraordinaria rapidez, segregación espacial y fiabilidad necesarias para la transmisión sináptica. En este trabajo se revisan los aspectos moleculares y funcionales de las principales proteínas de la maquinaria exocitótica neuronal y se mencionan algunos hallazgos recientes que vinculan dichas proteínas con determinadas enfermedades neurodegenerativas.

Palabras clave: Exocitosis. Proteínas SNARE. Vesícula sináptica. Enfermedad neurodegenerativa. Tráfico de membrana.

ABSTRACT

The exocytotic molecular machinery: a new marker for neurodegenerative diseases?

Exocytosis constitutes one of the most fascinating and thoroughly studied steps within the intracellular membrane traffic. By fusing the membrane of a transport vesicle with the plasma membrane, cells may extrude substances stored in the vesicle and, thus, send a message to either neighbour or distantly located cells. The exocytotic release of neurotransmitter molecules is an essential part of synaptic transmission, a process that underlies the functioning of the nervous system. The discovery of the SNAREs («soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor —NSF— attachment protein receptor») was a milestone in the investigation of the mechanisms involved in membrane traffic that paved the way for our current knowledge of the isoforms involved in the exocytotic step. The release of neurotransmitters is a tightly regulated process that is triggered by short-living and very much localized rises in the cytosolic concentration of calcium. This implies the existence of a set of specific proteins that allows for the velocity, spatial confinement and reliability characteristic of synaptic transmission. In this work, we review the molecular and functional aspects of the main components of the neuronal exocytotic machinery and pay attention to recent findings that relate some of those proteins with certain neurodegenerative diseases.

Keywords: Exocytosis. SNARE proteins. Synaptic vesicle. Neurodegenerative disease. Membrane traffic.

INTRODUCCIÓN

Procesos aparentemente tan dispares como el crecimiento y movimiento celulares, la reparación de membranas o la transmisión sináptica en las células eucarióticas se producen gracias a la existencia de un tráfico de membranas. El tráfico de membranas implica la formación de vesículas desde un compartimento membranoso de origen, el transporte de la mismas y, en último término, su fusión con un compartimento de destino. Con independencia de la enorme diversidad en el tamaño y forma de dichos compartimentos u organelas membranosas, las reacciones principales —fisión y fusión de membranas— están a cargo de complejos supramoleculares formados por proteínas ampliamente conservadas a lo largo de la escala evolutiva. Fue en la década de los años

ochenta del pasado siglo cuando con el descubrimiento de las proteínas SNARE (acrónimo de «soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor —NSF— attachment protein receptor») se inició una productivísima línea de investigación que ha llevado a la comprensión a nivel molecular de los procesos de fusión de membranas y al reconocimiento de estas proteínas como efectoras principales de los mismos (con la excepción de la fusión de membranas extracelulares, de las de las mitocondrias y los peroxisomas) (1). Las proteínas SNARE se localizan en las membranas destinadas a fusionarse e interactúan entre sí constituyendo complejos (complejo SNARE o complejo de fusión) que consiguen aproximar ambas membranas. Es precisamente la energía liberada durante la formación de dichos complejos la que se emplea en la fusión de membranas, mientras que la disociación del complejo —y el consiguiente reciclado de sus componentes— tiene lugar tras la fusión vesicular y requiere del concurso del NSF, una ATPasa que a través de la hidrólisis de ATP provee la energía necesaria para todo el proceso.

La exocitosis constituye un caso particular de tráfico de membranas en virtud de la cual la membrana de una vesícula se fusiona con la membrana plasmática posibilitando la liberación del contenido vesicular —neurotransmisores, hormonas y otros mediadores celulares— al exterior celular. La liberación de neurotransmisores ocurre en las terminaciones nerviosas mediante la exocitosis de las vesículas sinápticas (neuroexocitosis). La neuroexocitosis presenta características propias como la de tener lugar en regiones especializadas de la membrana neuronal denominadas zonas activas y producirse con extraordinaria rapidez en respuesta a un incremento local (microdominio) de la concentración citosólica de calcio. En la neuroexocitosis cabe distinguir tres etapas que se producen secuencialmente: a) interacción de la vesícula sináptica con la membrana plasmática («docking» o ataque vesicular); b) maduración vesicular para alcanzar competencia secretora («priming»), y c) fusión de membranas desencadenada por la entrada de calcio inducida por un potencial de acción (2). En este proceso se emplean las proteínas de la maquinaria general de fusión de membranas (proteínas SNARE, NSF, α -SNAP, proteínas SM y Rab) pero precisa también de componentes proteicos específicos como las complexinas, sinaptotagmina y munc13 (3). Cabe finalmente apuntar que una vez que se produce la exocitosis, el tráfico de membranas discurre en sentido contrario, desde la membrana plasmática hacia el interior celular, empleando el mecanismo de la endocitosis (fusión de membranas) mediante el que las células recuperan y, frecuentemente, reciclan las membranas vesiculares que son utilizadas en nuevos eventos exocitóticos (Figura 1).

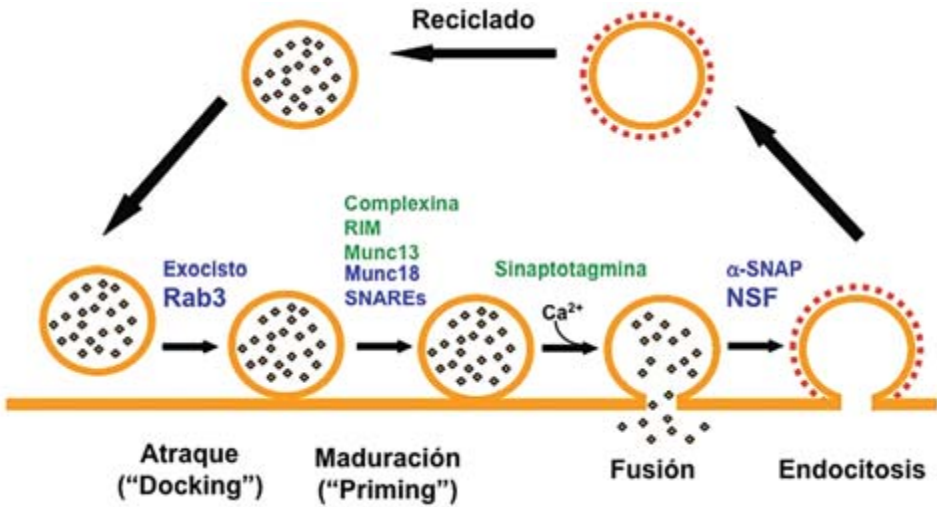


FIGURA 1. *Etapas fundamentales del ciclo de las vesículas sinápticas y componentes proteicos de la maquinaria general de la exocitosis (en color azul) y de la exocitosis regulada de las vesículas sinápticas (en color verde). Antes de liberar su contenido al exterior celular mediante el mecanismo de la exocitosis (fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática), las vesículas sinápticas deben entrar en contacto con la membrana plasmática (atraque o «docking») y adquirir competencia secretora (maduración o «priming»). Una vez que se ha producido la fusión de membranas, la membrana vesicular es recuperada mediante la endocitosis y posteriormente reciclada formándose nuevas vesículas.*

LAS PROTEÍNAS SNARE

Las proteínas SNARE forman una superfamilia que en los humanos cuenta con 36 miembros (4). Presentan una estructura sencilla, con un motivo SNARE característico formado por 60-70 aminoácidos agrupados en septeos repetidos (5). Así mismo, suelen disponer de un único dominio transmembrana unido mediante un pequeño péptido conector al extremo carboxilo del motivo SNARE, mientras que al extremo amino de dicho motivo pueden añadirse diversos dominios que constituyen la principal fuente de variabilidad entre las proteínas SNARE. Existen, no obstante, algunas excepciones a este patrón estructural. Es el caso de las brevinas, que carecen de dominio aminoterminal, o de SNAP-25 («25-kDa synaptosome-associated protein»), una SNARE neuronal que carece de dominio transmembrana pero que posee dos motivos SNARE unidos por un región conectora palmitoilada que posibilita su anclaje a las membranas celulares (Figura 2A).

Motivos SNARE

La formación del complejo de fusión entre las proteínas SNARE de las membranas que van a fusionarse está mediada por los motivos SNARE. Los motivos SNARE carecen de una estructura definida en los monómeros de las proteínas; sin embargo, cuando las proteínas SNARE entran en contacto, sus motivos SNARE adoptan espontáneamente la conformación de hélice alfa formando complejos de extraordinaria estabilidad constituidos por 4 hélices alfa entrelazadas —superhélices—, en los que cada hélice corresponde a un motivo SNARE diferente (Figura 2B) (6, 7). En el interior del haz formado por estas 4 hélices alfa se sitúan 16 capas o anillos (numerados desde -7 hasta +8, comenzando por el extremo amino) integrados por las cadenas laterales de aminoácidos pertenecientes a los distintos motivos SNARE. Estos anillos son de carácter hidrofóbico con la excepción del anillo en posición media (capa «0») que contiene tres residuos de glutamina (Q) y uno de arginina (R) (Figura 2C) (8). Atendiendo a la presencia de estos aminoácidos, las proteínas SNARE se clasifican en Q y en R. A su vez, dependiendo de la posición del motivo SNARE en seno de la proteína, las SNARE Q se subdividen en Qa, Qb y Qc —y Qbc— (3), debiendo asociarse siempre en combinaciones heteroméricas plenas (QaQbQcR o QaQbcR) y disponerse de forma paralela para poder constituir complejos productivos, capaces de inducir la fusión de membranas (1, 9). Como se ha mencionado, el dominio aminoterminal de la proteína SNARE constituye la región de mayor variabilidad, cumpliendo funciones diversas entre las que se encuentran la de plegarse sobre el motivo SNARE, forzando una conformación «cerrada» de la proteína que impide su participación en los complejos de fusión, y la de mediar la interacción con proteínas como las SM (véase más adelante) (10, 11). La formación del complejo de fusión probablemente tiene lugar en dos etapas, consistentes en la formación de un complejo intermediario QaQbQc en la membrana plasmática y la posterior asociación con una SNARE R vesicular (12, 13). Este ensamblaje secuencial se vería favorecido por el hecho de que las proteínas SNARE Q no se distribuyen uniformemente en la membrana plasmática sino que se agrupan en regiones ricas en colesterol sobre las que las vesículas (SNARE R) tenderían a fijarse, lográndose, en consecuencia, una mayor eficiencia en los procesos de fusión de membranas (Figura 3) (14, 15).

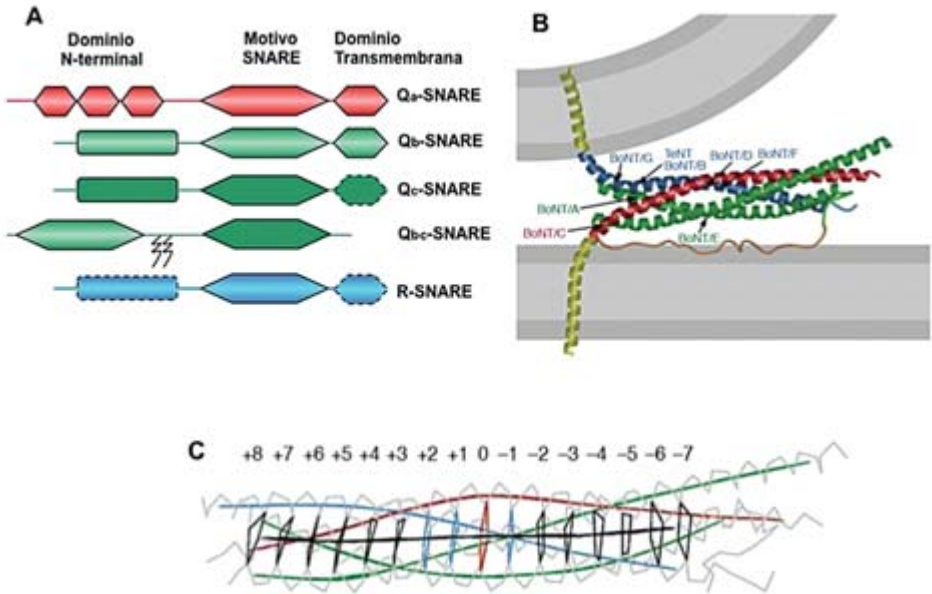


FIGURA 2. **Estructura de las proteínas SNARE («soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor — NSF— attachment protein receptor») y del complejo de fusión.** **A.** Organización de los dominios en las distintas familias o tipos de proteínas SNARE (Qa, Qb, Qc, Qbc y R). Aquellas regiones limitadas por líneas discontinuas representan dominios cuya presencia no es constante en todos los miembros de la familia. **B.** Estructura tridimensional del complejo de fusión neuronal en configuración trans obtenida mediante análisis de difracción de rayos X. El complejo adopta la forma de un cilindro de 120 Å de longitud y diámetro transversal variable formada por los motivos SNARE de la sinaptobrevina 2 (azul), la syntaxina 1 (rojo) y SNAP-25 (verde). Se muestran también los lugares de actuación de las toxinas clostridiales: tetánica (TeNT) y botulínicas (BoNT/A, B, C, D, E, F y G). Tomado de la ref. 6. **C.** Esquema de la porción central del complejo de fusión mostrando las 16 «capas» formadas por las cadenas laterales de los aminoácidos de los motivos SNARE dispuestas a ambos lados de una capa central «0». En negro se muestra el eje de la superhélice y en azul, rojo y verde las hélices de la sinaptobrevina, la syntaxina 1 y SNAP-25, respectivamente. Tomado de la ref. 8.

EL CICLO DE LAS PROTEÍNAS SNARE Y LA FUSIÓN DE MEMBRANAS

Aunque inicialmente se postuló que el NSF actuaba sobre el complejo SNARE induciendo la fusión de membranas, actualmente se cree que es el ensamblaje del complejo y no su disociación el desencadenante del proceso de fusión. Por su parte, el NSF se encargaría de garantizar la generación de formas monoméricas de las proteínas SNARE y, por tanto, su disponibilidad para promover repetidamente reacciones de fusión.

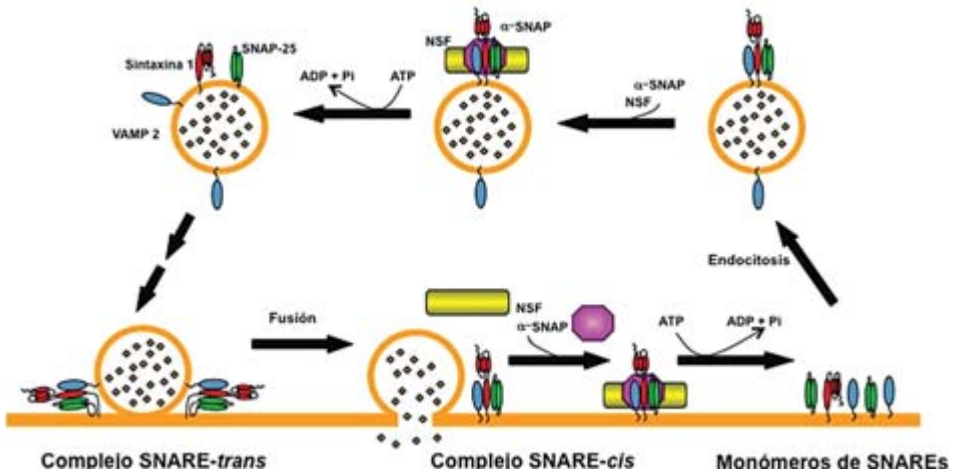


FIGURA 3. **El ciclo de las proteínas SNARE.** Las proteínas SNARE adoptan dos configuraciones extremas: formas monoméricas y complejos SNARE cis. Las proteínas SNARE situadas en las membranas destinadas a fusionarse forman inicialmente complejos en configuración trans, con la consiguiente aproximación de las dos membranas. Durante la exocitosis, los complejos adoptan la configuración cis en la que las proteínas SNARE se encuentran ancladas a la misma membrana. NSF y α -SNAP actúan después de la exocitosis disociando los complejos cis situados en la membrana plasmática y en las vesículas endocíticas generando monómeros de SNAREs.

Un aspecto clave en el ensamblaje productivo del complejo de fusión es la adopción de una configuración *trans* en la que al menos una proteína SNARE se encuentra en cada una de las membranas destinadas a fusionarse. Esta circunstancia determina que el ensamblaje del complejo mediante el entrecruzamiento de los motivos SNARE se produzca, como si de una cremallera se tratase, desde el extremo amino hacia el carboxilo al tiempo que se genera la fuerza suficiente para aproximar las dos membranas y vencer las barreras energéticas para su fusión (6, 16, 17). Hoy día se piensa que el mecanismo molecular por el que las vesículas adquieren competencia secretora («priming») es precisamente el ensamblaje del complejo SNARE (18, 19).

Es de destacar que durante la fusión de membranas los complejos SNARE *trans* adoptan la configuración *cis*, en la que todas las proteínas SNARE se encuentran ancladas a la misma membrana. Dichos complejos son biológicamente inactivos hasta que son disociados mediante la acción de NSF, con el consiguiente gasto energético (20). NSF es un hexámero perteneciente a la familia de las proteínas AAA+ («ATPasas associated with various cellular activities»), caracterizadas por presentar dos dominios de unión a nucleótidos —uno de ellos con actividad catalítica y el otro responsable de la hexamerización— y actuar como

chaperonas (21). Por ello, NSF no actúa directamente sobre el complejo SNARE sino que lo hace a través de cofactores conocidos como SNAPs («soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor —NSF— attachment proteins»), que incluyen tres isoformas denominadas α , β y γ . Es necesaria la unión de tres moléculas de SNAP al complejo SNARE para poder reclutar y, subsiguientemente, activar al NSF (22, 23). Se cree que son necesarios varios ciclos catalíticos con hidrólisis de otras tantas moléculas de ATP para disociar un complejo SNARE en configuración *cis*. El desensamblaje de los complejos SNARE resulta crucial para el mantenimiento de las reacciones de fusión en cualquier vía secretora (Figura 3).

LAS PROTEÍNAS SM

Otro componente esencial de la maquinaria molecular de la fusión de membranas son las proteínas SM (24, 25). Se trata un grupo de 7 proteínas solubles de pequeño tamaño molecular (650-700 aminoácidos) relacionadas con Sec1/Munc18. Munc18-1 ha sido implicada en procesos tan diversos como los de estabilizar la conformación cerrada de la syntaxina 1 (Figura 4) (11, 26), favorecer la constitución de complejos entre proteínas SNARE de tipo Q que servirían de aceptores de proteínas R durante el ensamblaje del complejo de fusión o la formación de complejos estables con proteínas solubles como Mint (27, 28). Esta variedad de funciones ha motivado que se le hayan asignado papeles diversos y a veces contradictorios en la regulación de la exocitosis, facilitando o inhibiendo la formación del complejo SNARE («priming») (29-31), promoviendo el atraque vesicular («docking») (32) e incluso acelerando la expansión del poro de fusión (fusión de membranas) (33).

LAS PROTEÍNAS RAB

Las proteínas Rab forman parte de la superfamilia Ras de GTPasas (proteínas G) de pequeño tamaño molecular (monoméricas) e intervienen en múltiples etapas del tráfico intracelular de membranas (34-36). En el ser humano se han descrito más 60 proteínas Rab distintas, entre las que destaca Rab3 por su implicación en la exocitosis regulada de hormonas y neurotransmisores (37). Rab3 presenta 4 isoformas, Rab3A, B, C y D, que poseen una distribución diferencial en neuronas y células endocrinas. Rab3A es la isoforma más abundante en el cerebro, encontrándose en la práctica totalidad de las sinapsis (38). Como el resto de las GTPasas de pequeño tamaño, las proteínas Rab transitan entre el citosol

y la membrana vesicular (Figura 4 y 5). Este tránsito —ciclo de las proteínas Rab— es posible gracias a los cambios conformacionales que experimenta la proteína en función del nucleótido de guanina (GTP o GDP) al que esté unida. Esta dualidad conformacional provee a las proteínas Rab de la capacidad de actuar como interruptores moleculares, de manera que la forma unida a GTP se encuentra activada y asociada a membranas (posición «on» del interruptor), y la forma unida a GDP se encuentra inactiva y localizada en el citosol (posición «off») (Figura 4 y 5). En cada sistema celular el balance entre ambas formas está regulado por proteínas activadoras de GTPasas («Rab GTPase activating proteins»; RabGAP), que favorecen la conversión de la forma activa de Rab en la inactiva, y por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina («Rab guanine nucleotide exchange factors»; RabGEF) que desplazan el equilibrio conformacional en sentido contrario. Rab3A experimenta un ciclo de asociación y disociación de las vesículas sinápticas durante la estimulación de la exocitosis dependiente de calcio. Al igual que las demás proteínas Rab, la forma de Rab3A unida a GTP está anclada a la membrana a través de un grupo geranilgeranilo unido covalentemente a la proteína Rab mediante una reacción catalizada por una geranilgeraniltransferasa (RabGGT) y la asistencia de diversas proteínas acompañantes («Rab escort proteins»; REP). Cuando se estimula la exocitosis, el GTP unido a Rab3A es hidrolizado a GDP y el complejo resultante Rab3A-GDP se disocia de la membrana vesicular con el concurso del inhibidor de la disociación de GDP («GDP dissociation inhibitor»; RabGDI) (39). El estricto acoplamiento entre la exocitosis y el ciclo de Rab3A ha llevado a sugerir que esta proteína —y también sus isoformas— regularían la direccionalidad del tráfico vesicular (39, 40). En concreto, se ha propuesto que Rab3A intervendría en el proceso de reclutamiento y en el atraque de las vesículas en las zonas activas durante la estimulación nerviosa (Figura 4A) (41). Así mismo, se ha atribuido a Rab3A la capacidad de incrementar la eficacia transductora de los potenciales de acción por la maquinaria secretora y de acoplar la actividad exocitósica con la endocitósica (42-44). Esta variedad de papeles es posible gracias a la interacción de la forma activa de Rab3A con proteínas como la rabfilina, RIM, Noc2, PRA1 o la calmodulina, que actuarían como las verdaderas efectoras de las acciones de Rab3A. La rabfilina es una proteína soluble que es reclutada por Rab3A para la membrana de las vesículas sinápticas y que a través de la interacción con SNAP-25 podría, en parte, mediar los efectos de Rab3A sobre el atraque vesicular en células neuroendocrinas y el acoplamiento entre la exocitosis y la endocitosis en neuronas (44, 45). Por su parte, Noc2 parece intervenir fundamentalmente en los efectos de Rab3A sobre la exocitosis de las células neuroendocrinas (46), mientras que PRA1 («prenilated Rab acceptor 1») es una proteína ampliamente conserva-

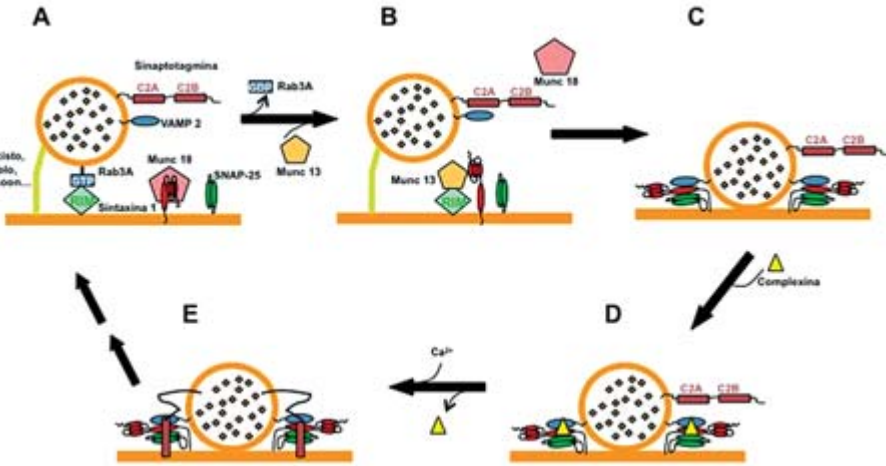


FIGURA 4. **Modelo molecular de la exocitosis de las vesículas sinápticas.** **A.** Vesícula sináptica atracada a la membrana mediante las proteínas del exocisto y la interacción entre RIM y Rab3A unida a GTP. En esta etapa, Munc18 estabiliza la conformación cerrada de sintaxina 1. **B.** La hidrólisis del GTP determina la disociación de Rab3A de la membrana de la vesícula sináptica y de RIM, que puede entonces interactuar con Munc 13 para que compita con Munc18 por unirse a la sintaxina 1. La unión de Munc13 a la sintaxina 1 facilita que ésta adopte la configuración abierta necesaria para formar parte del complejo SNARE. **C.** Ensamblaje del complejo SNARE —sintaxina 1, sinaptobrevina y SNAP-25— en la configuración trans con la aproximación de las membranas destinadas a fusionarse. **D.** La complexina se une al complejo SNARE estabilizándolo en un estado metaestable. **E.** El incremento de la concentración citosólica de calcio promueve la unión de la sinaptotagmina a los fosfolípidos de la membrana celular y al complejo SNARE, desplazando a la complexina y desencadenando la exocitosis.

da a lo largo de la escala evolutiva que se une a distintas proteínas G de pequeño tamaño preniladas —unidas covalentemente a grupos geranylgeranilo—, incluyendo a Rab3A (47, 48). PRA1 se encuentra en el complejo de Golgi donde participaría en procesos de génesis vesicular y en la incorporación de la sinaptobrevina 2 a las vesículas recién formadas (47, 49). Además, se ha descrito que PRA1 puede asociarse a las vesículas sinápticas e interactuar con piccolo, una proteína constituyente de las zonas activas, lo que sugiere que PRA1 podría también mediar los efectos de Rab3A sobre el atraque vesicular (50). La calmodulina es también capaz de unirse a Rab3A y facilitar su disociación de la membrana vesicular de forma dependiente de la elevación citosólica de calcio (51). Se ha propuesto que esta interacción estaría implicada en alguno de los efectos de Rab3A en la exocitosis regulada de las células endocrinas (52). RIM («Rab3A-interacting molecule») se localiza específicamente en las zonas activas y a su función en la exocitosis neuronal dedicaremos un apartado más adelante.

EL EXOCISTO O COMPLEJO DE ATRAQUE VESICULAR

El reconocimiento de la membrana de destino constituye un mecanismo fundamental de la especificidad de los procesos de fusión de membranas (53). El contacto inicial entre las membranas se realiza mediante complejos multiproteicos de gran tamaño localizados en la membrana celular y que reciben el nombre de exocisto. En los mamíferos, el exocisto (también conocido como el complejo Sec/8) está formado por 8 proteínas: sec3p, sec5p, sec6p, sec8p, sec10p, sec15p, exo70p y exo84p (54, 55). Se han demostrado interacciones directas entre muchas de ellas y con las membranas vesicular y plasmática (56). Exo70p parece ser la proteína proximal a la membrana celular mientras que el complejo entraría en contacto con la membrana vesicular a través de sec5p. En esta última membrana se ha identificado a Ra1, una proteína G de pequeño tamaño que vía sec5p conectaría la membrana vesicular con el exocisto (57). Existen dos isoformas de Ra1, Ra1A y Ra1B, siendo la primera la que presenta una ma-

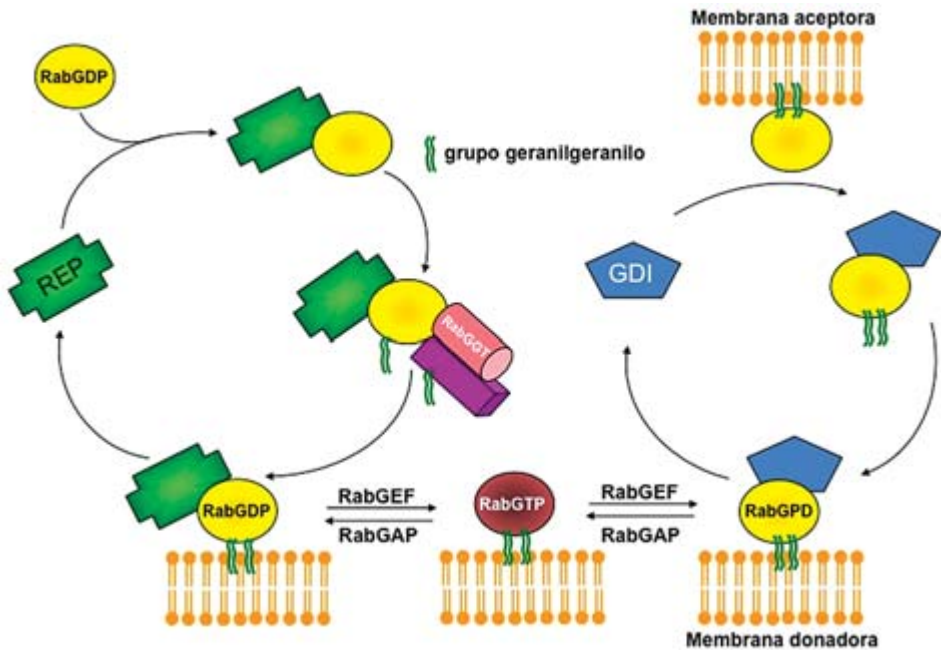


FIGURA 5. *El ciclo de la GTPasa de la familia Rab.* RabGDP: proteína Rab unida a GDP; RabGTP: proteína Rab unida a GTP; RabGGT: geranilgeraniltransferasa de proteínas Rab; REP: proteína acompañante de Rab; GDI: inhibidor de la disociación de GDP de la proteína Rab; RabGEF: factor intercambiador de nucleótidos de guanina; RabGAP: proteína activadora de la GTPasa. Véase el texto para obtener una explicación detallada.

yor abundancia en el cerebro. La interacción entre Ra1A y sec5p parece también ser necesaria para el ensamblaje del exocisto, que vendría a actuar como un efector de Ra1A (58). El exocisto resulta necesario para el reclutamiento de las vesículas hacia los lugares de exocitosis en las terminaciones de las neuronas maduras (59), y parece también jugar un papel en el crecimiento de las neuritas y la sinaptogénesis en las neuronas en desarrollo al especificar las regiones de la membrana plasmática en la que se producirá la exocitosis (60). Conviene señalar, no obstante, que el exocisto sería responsable de la fase inicial del anclaje vesicular mientras que otras proteínas como piccolo, bassoon y RIM intervendrían en las fases posteriores de este proceso.

LA NEUROEXOCITOSIS

Las vesícula sinápticas y las SNARES neuronales

Como se indicó en la Introducción, la neuroexocitosis presenta características únicas entre los procesos de fusión de membranas. En particular, destaca por una estrecha regulación en el tiempo —extraordinaria rapidez— y en el espacio —sólo ocurre en las zonas activas de las terminaciones nerviosas— y la notable capacidad de adaptarse —plasticidad— en función de la actividad sináptica. Estas propiedades especiales justifican la existencia de elementos proteicos específicos en la maquinaria de fusión así como de proteínas reguladoras que dotan a la neuroexocitosis de niveles de control propios.

La vesícula sináptica es la organela membranosa mejor conocida desde el punto de vista bioquímico y biofísico y la única de la que se dispone de un modelo a escala atómica (61). Su extraordinaria abundancia en el tejido cerebral —si cada vesícula se contabilizara como una sola molécula, la concentración de vesículas en el cerebro estaría en el rango micromolar— y el hecho presentar un tamaño bastante uniforme, permitió en los años setenta del pasado siglo el desarrollo de protocolos de centrifugación diferencial para su aislamiento y purificación (62). Más recientemente, la aplicación de técnicas de espectroscopía de correlación de fluorescencia, espectrometría de masas, cristalografía de rayos X y modelización molecular ha permitido identificar el conjunto de las proteínas asociadas a las vesículas sinápticas, determinar el número de copias de cada una ellas por vesícula (Tabla I y II) e, incluso, elaborar un modelo tridimensional de esta organela (60, 62). A día de hoy, se han detectado 400 proteínas distintas asociadas a las vesículas sinápticas de las que aproximadamente 40 se consideran residentes en las mismas, si bien apenas 6 de ellas (sinaptofisina, si-

sinaptobrevina 2, el transportador de glutamato —VGLUT 1 o 2— sinaptotagmina 1, sinapsina 1 y Rab3A) dan cuenta del 40% del contenido proteico ($17.1 \pm 0.19 \times 10^{-18}$ g/vesícula) de las vesículas (Tabla II). A partir del peso molecular, el número de Avogadro y el contenido proteico medio de las vesículas, es posible estimar, como promedio, el número de moléculas de cada proteína presente en una vesícula. De acuerdo con estos cálculos, una vesícula sináptica típica contendría 70 moléculas de sinaptobrevina 2, 30 de sinaptofisina, entre 9 y 14 del transportador de glutamato, 10 de Rab3A, 8 de sinapsina y 15 de sinaptotagmina 1. Ello implica que una vesícula sináptica dispondría de un elevado número de copias de las proteínas que actualmente se consideran esenciales tanto para la exocitosis como para el transporte del neurotransmisor. La única excepción a esta regla sería la bomba de protones vesicular, responsable de crear el gradiente electroquímico de protones necesario para el almacenamiento del neurotransmisor, de la que habría un único ejemplar por vesícula. Conviene señalar que este peculiar reparto proteico posibilitaría la utilización repetida de las vesículas en procesos de fusión consecutivos sin que se garantizase la carga del transmisor (vesículas silentes). Otra característica llamativa de las vesículas sinápticas es su alto contenido relativo de proteínas (Tabla I). Las proteínas son responsables de aproximadamente dos tercios de la masa de las vesículas y ocuparían el 20% de su superficie. Entre los lípidos vesiculares destacan los fosfolípidos (7000 moléculas por vesícula) y el colesterol (5000 moléculas por vesícula). Si consideramos que en cada vesícula existirían 600 dominios proteicos transmembrana y que cada uno de ellos se encontrase rodeado por un anillo de fosfolípidos, cabe concluir que la mayoría de los fosfolípidos no se halla en forma libre, lo que determinaría que la membrana vesicular presentase una rigidez mayor que la del resto de las organelas membranosas.

La exocitosis de las vesículas sinápticas requiere de tres proteínas SNARE neuronales: syntaxina 1A —Qa— y SNAP-25 —Qbc—, presentes en la membrana plasmática, y la sinaptobrevina 2 —R— o VAMP 2 («vesicle-associated membrane protein»), una proteína integral de la membrana vesicular (38, 64, 65). La syntaxina 1A está formada por 288 aminoácidos (las cifras corresponden a las proteínas de la rata) y contiene un motivo SNARE flanqueado por un dominio aminoterminal complejo y un único dominio transmembrana en el extremo carboxilo. El dominio aminoterminal está formado por tres hélices alfa ordenadas de forma antiparalela y conectadas al motivo SNARE por una región extensa y dotada de elevada flexibilidad. Esta circunstancia permite que el dominio aminoterminal pueda interactuar con el motivo SNARE y dar lugar a la conformación cerrada de la syntaxina. La sinaptobrevina 2 es una proteína de solo 118 aminoácidos que, al igual que la syntaxina 1, posee un único dominio

<i>Tabla I. Parámetros físicos y composición de las vesículas sinápticas</i>	
Densidad (g/ml)	1.10
Diametro externo (nm)	41.6
Volumen acuoso interno (I)	19.86 x 10⁻²¹
Nº de moléculas de neurotransmisor (a una concentración de 150 mM)	1790
Masa (g)	29.6 x 10⁻¹⁸
Proteína: Fosfolípidos (p:p)	1.94
Fosfolípidos: Colesterol (mol:mol)	1:0.8
Dominios transmembrana (nº/% de superficie vesicular)	600/20

transmembrana en posición carboxilterminal al motivo SNARE. A diferencia de la sintaxina 1, la sinaptobrevina 2 carece prácticamente de dominio aminoterminal. Por su parte, SNAP-25 posee 208 aminoácidos, contiene dos motivos SNARE unidos por una región flexible y carece de dominio transmembrana. La región conectora de los dos motivos SNARE alberga 4 cisteínas palmitoiladas mediante las que la proteína se ancla a la membrana plasmática.

La existencia en las neuronas de componentes proteicos específicos de la maquinaria de fusión determina que se produzcan mecanismos o interacciones moleculares particulares. Así, la secuencia de ensamblaje del complejo SNARE en estas células diferiría del propuesto con carácter general, ya que SNAP-25 y la sinaptobrevina 2 se asociarían en la membrana neuronal antes unirse a la sintaxina (18, 66). Otro ejemplo de interacción proteica característica de la neuroexocitosis —y también de la exocitosis regulada en las células neuroendocrinas— está protagonizado por la tomosina (67). La tomosina es una proteína soluble de 130 kDa con un motivo SNARE R en posición carboxilo terminal que le permitiría sustituir a la sinaptobrevina en el complejo de fusión. En consecuencia, la tomosina podría inhibir la maduración vesicular compitiendo con la sinaptobrevina 2 durante el ensamblaje del complejo de fusión (68, 69). Por otra parte, las toxinas clostridiales (tetánica y botulínicas A, B, C1, D, E, F y G) son proteasas que actúan específicamente sobre las proteínas SNARE neuronales e inhiben la exocitosis de neurotransmisores al interferir con la forma-

Tabla II. Composición proteica de las vesículas sinápticas.

	<i>% proteínas totales</i>	<i>Nº de copias/ vesícula</i>
Sinaptofisina	10.20 ± 1.54	31.5
Sinaptobrevina 2	8.60 ± 1.55	69.8
Sintaxina 1	2.00 ± 0.27	6.2
SNAP-25	0.40 ± 0.06	1.8
Sinapsina	6	8.3
Rab3A	2.5	10.3
Sinaptotagmina 1	7	15.2
Sinaptogirina 1	0.5	2.0
SV2	1.4	1.7
SCAMP	0.3	0.8
CSP	0.6	2.8
VGLUT1	5.36 ± 1.11	9.0
VGLUT2	9.01 ± 2.31	14.4
Subunidad V-ATPasa V1-B	1.15 ± 0.21	1.4

ción del complejo de fusión (Figura 2B) (70). En el marco del modelo en tres etapas de la exocitosis expuesto en la Introducción, las toxinas clostridiales impedirían la adquisición de competencia secretora («priming») sin afectar el anclaje de las vesículas a la membrana plasmática («docking») o el proceso de fusión de membranas, ya que, una vez formados, los complejos SNARE son resistentes a la acción de las toxinas.

La sinaptogamina: el sensor de calcio de la neuroexocitosis

Las sinaptotagminas forman una pequeña familia —se han identificado 16 miembros en los vertebrados— de proteínas integrales de membrana que se expresan en neuronas y células neuroendocrinas. En el extremo amino se sitúa el dominio transmembrana que se encuentra unido mediante una región

conectora de longitud variable a dos dominios C2 («conserved region-2», C), denominados C2A y C2B, capaces de interactuar con los fosfolípidos de la membrana celular de forma dependiente de calcio. De hecho, los dominios C2A y C2B pueden combinarse con 3 y 2 iones calcio, respectivamente. Las sinaptotagminas se encuentran tanto en la membrana vesicular (isoformas 1, 2 y 9) como en la plasmática (isoformas 3 y 7) (71). Entre todas ellas, las sinaptotagminas 1 y 2 son las más firmes candidatas a actuar como sensor(es) de calcio en la neuroexocitosis (72). Es de destacar que la afinidad por el calcio de algunas de las isoformas presentes en la membrana plasmática es diez veces mayor que la de las sinaptotagminas 1 y 2. Este hecho junto con el hallazgo de que la sinaptotagmina 7 actúa como sensor de calcio en la exocitosis de las células cromafines de la médula adrenal pero no en la neuronal (73) ha llevado a proponer que las sinaptotagminas con baja afinidad por el calcio (1 y 2) mediarían la exocitosis rápida —la inmediatamente acoplada a la entrada de calcio— de neurotransmisores en las neuronas mientras que las sinaptotagminas asociadas a la membrana plasmática actuarían en la exocitosis de las células neuroendocrinas. Son múltiples las evidencias que apoyan el papel de la sinaptotagmina 1 como nexo esencial entre la entrada de calcio durante los potenciales de acción y la fusión de membranas. Entre ellas, sobresalen las que relacionan la eliminación del gen de la sinaptotagmina 1 de ratón con la desaparición de la fase rápida de la liberación de neurotransmisores, y la expresión de variantes de la proteína con distinta afinidad por el calcio con cambios en paralelo en la dependencia de calcio de la neurosecreción. Así mismo, se ha observado que la unión al calcio induce la incorporación de los dominios C2 de la sinaptotagmina a la membrana plasmática con una cinética compatible con la de la exocitosis regulada en las neuronas (74). La sinaptotagmina interactúa también con proteínas como la syntaxina 1, SNAP-25, el complejo SNARE, RIM, SV2 o los canales de calcio de tipo N. La interacción con el complejo SNARE resulta particularmente relevante ya que ha facilitado una explicación mecanística de la actuación de la sinaptotagmina en la fusión de membranas regulada por calcio (Figura 4). Así, se ha postulado que la sinaptotagmina contribuiría a estabilizar los complejos SNARE *trans* impidiendo la fusión espontánea de las membranas, mientras que la entrada de calcio promovería tanto la incorporación de la sinaptotagmina a la membrana plasmática como el desplazamiento de la complejina de la superficie del complejo SNARE *trans*, posibilitando la exocitosis (75, 76).

Complexinas

Las complexinas son cuatro proteínas citosólicas con expresión específica en el cerebro y capacidad para unirse a los complejos SNARE (77). Existe un amplio acuerdo en que las complexinas regulan la fusión de membranas dependiente de calcio en etapas posteriores a la maduración vesicular, si bien su mecanismo de acción es todavía objeto de controversia. La hipótesis que cuenta con mayor refrendo experimental es la de que las complexinas se unen al complejo SNARE *trans* estabilizándolo en un estado metaestable. El aumento del calcio intracelular permitiría a la sinaptotagmina 1 desplazar a la complexina del complejo y, así, disparar la exocitosis (Figura 4) (78, 79).

Munc13

Mediante el proceso conocido como maduración («priming») las vesículas adquieren competencia secretora pasando a integrar el llamado contingente de vesículas disponibles («release-ready») para ser liberadas (3). Las respuestas sinápticas dependen, por tanto, del tamaño de dicho contingente y de la probabilidad que cada vesícula integrante del mismo tiene de ser liberada. En apartados previos de este trabajo hemos relacionado la maduración vesicular con el ensamblaje del complejo SNARE, un proceso regulado no solo por la disponibilidad de monómeros de SNAREs sino también por proteínas como Munc18 y, en el caso de la neuroexocitosis, por Munc13 (Figura 4) (80). Bajo la denominación de Munc13 se engloban tres proteínas distintas, Munc13-1, Munc13-2 y Munc13-3, que se localizan en las zonas activas y muestran una expresión diferencial en distintas regiones del cerebro (81). Así, Munc13-1 se concentra en las sinapsis glutamatérgicas, Munc13-1 y Munc13-2 son las formas predominantes en las sinapsis gabérgicas, mientras que Munc13-3 sería la isoforma específica del cerebelo. Todas las isoformas contienen un dominio de unión al diacilglicerol, lo que les permite mediar el efecto modulador de la liberación de neurotransmisores ejercido por los ésteres de forbol y muchos otros compuestos —incluyendo una gran variedad de neurotransmisores— que se sirven de proteínas G heteroméricas y del diacilglicerol en sus vías de señalización celular (82). Tanto estos compuestos como la propia actividad neuronal estimularían a Munc13 a promover la maduración vesicular con el consiguiente aumento del contingente de vesículas disponibles para ser liberadas (83). Es de destacar que Munc13 está implicada en formas de plasticidad sináptica rápidas como la «augmentation» mediante la cual las neuronas modifican la liberación de neurotransmisores en función de la frecuencia de descarga de potenciales de acción (84). Munc13 es capaz de interactuar con el ex-

tremo amino de la syntaxina 1 y también con Munc18, con la que competiría por unirse a la primera (85). Estos datos sugieren que Munc13 promovería la maduración vesicular favoreciendo un cambio de la syntaxina 1 desde la configuración cerrada a la abierta, de manera que pueda participar en la formación del complejo SNARE. No obstante, en la actualidad todavía no puede descartarse que otras interacciones de Munc13 con proteínas como la calmodulina o RIM puedan también mediar las acciones sinápticas de Munc13 (Figura 4) (86, 87).

RIM

RIM —más propiamente conocida como RIM1 para diferenciarla de RIM2, que es una proteína similar presente en el cerebro y las glándulas endocrinas de los mamíferos— es una proteína de la zona activa de las terminaciones nerviosas que interactúa específicamente con la forma de Rab3A unida a GTP y con Munc13-1 (no así, con Munc13-2) (86, 88). Conviene señalar, además, que Rab3A y Munc13-1 se unen al mismo sitio de RIM y que estas asociaciones son mutuamente excluyentes (86). La interacción de RIM con ambas proteínas permite plantear la hipótesis de que RIM podría coordinar el atraque y la maduración de las vesículas mediante el reconocimiento de Rab3A presente en la membrana vesicular y que la hidrólisis del GTP permitiría activar la maduración vesicular mediante la subsiguiente interacción con Munc13 (Figura 4). Esta hipótesis alcanza verosimilitud a partir de los datos obtenidos en neuronas procedentes de ratones deficientes en el gen que codifica RIM y que indican una disminución del contingente de vesículas disponibles para ser liberadas así como la pérdida de distintas formas de plasticidad sináptica rápida (facilitación y depresión por pulsos pareados, potenciación postsináptica, etc.) (89). Debe mencionarse también que RIM puede interactuar con muchas otras proteínas como SNAP-25 (90), sinaptotagmina, canales de calcio, RIM-BPs («RIM binding proteins»), cAMP-GEFII y las liprinas. Las RIM-BPs son proteínas que se unen a RIM y que también se asocian a los canales de calcio (91); cAMP-GEFII, también conocido como Epac, es una proteína de unión a AMPc que parece mediar algunos de los efectos de ese nucleótido sobre la exocitosis (92); las liprinas son una familia de proteínas necesaria para la formación de las zonas activas durante la sinaptogénesis y que podrían mediar el anclaje de RIM a las zonas activas (93). En conjunto, todas estas interacciones sugieren que RIM pudiera actuar como organizador del esqueleto proteico de las zonas activas y, en consecuencia, coordinar los procesos de anclaje, maduración y exocitosis de las vesículas sinápticas al objeto de posibilitar la rapidez y seguridad características de la transmisión sináptica.

TRÁFICO DE MEMBRANAS Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

La práctica totalidad de las funciones vitales depende de la correcta distribución de las proteínas a destinos celulares específicos. Tradicionalmente se ha considerado que las alteraciones en la localización subcelular de las proteínas y las manifestaciones clínicas asociadas eran primariamente debidas a mutaciones que afectaban a la estructura y plegamiento de las proteínas o a su procesamiento postraduccional —p. ej. glicosilación— con la consiguiente alteración en su transporte. Más recientemente, se ha tomado conciencia de que mutaciones en los genes directamente implicados en el tráfico de membranas pueden ser también responsables de anomalías en la localización de las proteínas (94). En la actualidad se han descrito más de un treintena de enfermedades hereditarias relacionadas con alteraciones en el tráfico de membranas y vinculadas a defectos en la biogénesis de las vesículas, las proteínas Rab y otras GTPasas, las proteínas del citoesqueleto, el atraque vesicular o la fusión de membranas (95). Aunque los fenotipos observados en los pacientes son muy diversos, frecuentemente incluyen hipopigmentación, alteraciones en la respuesta inmune de base celular y anomalías neurológicas. Se trata de enfermedades de muy baja incidencia (enfermedades raras), lo que no debe ser obstáculo para su estudio ya que, como veremos más adelante, su mejor conocimiento reportará un beneficio no sólo a los pacientes afectados de ellas sino también a los que padecen enfermedades de carácter multifactorial y considerable prevalencia en la población. La revisión de todos estas enfermedades o síndromes queda fuera de los objetivos de este trabajo, por lo que nos limitaremos a reseñar aquellas en la que se han identificado alteraciones en las proteínas Rab o en los procesos de atraque vesicular y fusión de membranas, y que cursan con manifestaciones neurológicas.

Alteraciones de las proteínas Rab

La importancia de las proteínas Rab en el desarrollo cerebral ha sido puesta de manifiesto tras la observación de enfermedades tanto humanas como animales debidas a la mutación de los genes relacionados con Rab23 y Rab3A.

Rab23 se localiza en los endosomas tempranos, organelas encargadas del reciclaje de las membranas vesiculares tras la endocitosis, y se expresa abundantemente en el cerebro y médula espinal de embriones de ratón durante la segunda mitad de la gestación. Esta proteína parece estar implicada en las alte-

raciones —falta de cierre del tubo neural, polidactilia, insuficiente desarrollo ocular— que se registran en ratones con defectos en la vía de señalización del gen «hedgehog» (96).

Como ya se ha mencionado, Rab3A es la proteína Rab con mayor expresión en el sistema nervioso. Se han descrito alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso ligadas a mutaciones en dos genes implicados en la regulación de Rab3A: el gen que codifica RabGDI (Figura 5), cuya mutación da lugar a retraso mental, y el gen que codifica RabGAP, cuyas alteraciones se traducen en la aparición de los síndromes de Warburg y de Martsolf (97, 98). El síndrome de Warburg es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la existencia de microftalmia, cataratas, microcefalia y microgenitalia. Los pacientes afectados del síndrome de Martsolf presentan un fenotipo similar a los de Warburg, si bien más leve. RabGAP cataliza la conversión de Rab3AGTP en Rab3AGDP y, por tanto, podría determinar el ritmo de disociación de Rab3A de las vesículas sinápticas. A tenor de las alteraciones en la liberación exocitósica de glutamato detectadas en ratones KO para el gen de RabGAP, se ha hipotetizado que los defectos cerebrales y genitales propios de estos síndromes serían debidos a una secreción anormal por el eje hipotálamo-hipofisario de neurotransmisores y hormonas con efectos moduladores del desarrollo de dichos órganos (99).

Alteraciones del atraque vesicular y de la fusión de membranas

Las proteínas SNARE son mediadores generales de los procesos fusión de membranas. Ello determina que desempeñen un papel esencial en la biología celular, por lo que son muy escasas las enfermedades en las que se han identificado mutaciones en los genes que codifican proteínas SNARE. Solo dos enfermedades humanas, la linfocitosis hemofagocítica familiar (retraso psicomotor, pancitopenia, alteraciones de la coagulación, fallo hepático, etc.) y el síndrome CEDNIK (disgenesia cerebral, neuropatía, ictiosis y queratodermia palmoplantar) se han relacionado con mutaciones en proteínas SNARE, respectivamente la syntaxina 11 y SANAP29, que participarían en el tráfico intracelular de membranas (100, 101). Esta escasez de cuadros clínicos se vuelve ausencia casi absoluta cuando se consideran las SNAREs implicadas en la exocitosis, ya que solo muy recientemente se ha descrito la existencia de un ratón con una mutación espontánea del gen de SNAP25 que lograra la supervivencia necesaria para poder ser estudiado (102). Este animal presenta ataxia y alteraciones sensorimotoras, que se han relacionado con una reducción de la exocitosis y de la amplitud de los potenciales corticales postsinápticos excitatorios.

Las SNAREs también podrían intervenir en la fisiopatología, servir como marcadores o dar pie a nuevas estrategias terapéuticas de algunas enfermedades neurodegenerativas. Es el caso de la sintaxina 5, que interactúa específicamente con la presenilina 1, una de las una enzimas encargadas de procesar la proteína precursora de la beta amiloide. Curiosamente, una variante de la presenilina 1, la $\Delta E9$, que caracteriza a determinados sujetos afectados de formas familiares de la enfermedad de Alzheimer, presenta una menor capacidad de unión a la sintaxina 5. Además, la sobreexpresión de la sintaxina 5 en células NG108-15 determina una menor secreción del péptido beta amiloide, lo que confirmaría la participación de esta SNARE en la fisiopatología de ciertos tipos de la enfermedad de Alzheimer de carácter familiar (103). Otro ejemplo de la participación de proteínas SNARE en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas vendría dado por la enfermedad de Parkinson familiar, en la que han sido implicadas diversas mutaciones del gen de la alfa-sinucleína. La alfa-sinucleína es el principal constituyente de los cuerpos de Lewy, que caracterizan histopatológicamente la enfermedad de Parkinson. El mecanismo por el que dicha proteína podría inducir la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriada, que subyace a la sintomatología de la enfermedad, es todavía desconocido. Resultados recientes indican que la sobreexpresión de la alfa-sinucleína inhibe el tráfico de membranas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi y que, además, podría afectar al adecuado plegamiento de las SNAREs neuronales. Más relevante, por su potencial interés terapéutico, es la observación de que la sobreexpresión de Rab1 consigue revertir el daño neuronal en modelos animales de la enfermedad de Parkinson (104). Finalmente, cabe apuntar también que diversos polimorfismos en el gen de SNAP-25 han sido relacionados con la susceptibilidad para padecer el trastorno de hiperactividad y déficit de atención (105), y que se ha detectado una disminución de dicha SNARE en la corteza frontal de sujetos fallecidos de la enfermedad de Huntington. Hay que destacar que se trata de una disminución selectiva de SNAP-25 y rabfilina 3A, sin que se haya observado en el caso de la sinaptobrevina 2, la sintaxina 1, rab3A o la sinaptofisina (106). Este hallazgo podría contribuir a explicar algunos de los síntomas de la enfermedad de Huntington al tiempo que abre una línea de investigación orientada a la identificación de marcadores biológicos de la progresión de la enfermedad.

No nos resistimos a hacer una consideración final sobre la evolución del interés médico de la maquinaria exocitótica y, más concretamente, de las proteínas SNARE. Las proteínas SNARE han servido como dianas moleculares de las toxinas tetánica y botulínicas mucho antes de que se conociera su existencia. Una vez descubiertas y constatado su papel de sustratos de dichas to-

xinas, pudo asignárseles una función esencial en la exocitosis de neurotransmisores. Más recientemente, se han vinculado con la etiología y la fisiopatología de diversas enfermedades en el ámbito neurológico. Por eso, nos parece previsible que, a medio plazo, puedan servir como herramientas en el diagnóstico o para el desarrollo de terapias génicas útiles en el manejo de algunas de esas enfermedades.

AGRADECIMIENTOS

Diego Bustillo Merino es becario predoctoral del Gobierno Vasco; la Dra. Yolanda Gutiérrez Martín es investigadora contratada con cargo al consorcio NEUROTRANS-CM de la Comunidad de Madrid. Este trabajo ha sido financiado con ayudas del Ministerio de Investigación Científica e Innovación (BFU2005-06034) y de la Comunidad de Madrid (S2006/SAL-02453).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) JAHN, R. Y SCHELLER, R.J. (2006) SNAREs-engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 631-643.
- (2) SÜDHOF, T.C. (2000) The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28: 317-320.
- (3) ARTALEJO, A.R. (2005). La maquinaria molecular de la exocitosis en las células cromafines de la médula adrenal. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 71: 127-151.
- (4) BOCK, J.B.; MATERN, H.T.; PEDEN, A.A. Y SCHELLER, R.H. (2001) A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature*. 409: 839-841.
- (5) BRUNGER, A.T. (2005) Structure and function of SNARE and SANARE-interacting proteins. *Q. Rev. Biophys.* 38: 1-47.
- (6) SUTTON, R.B.; FASSHAUER, D.; JAHN, R. Y BRUNGER, A.T. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*. 395: 347-353.
- (7) FASSHAUER, D. (2003) Structural insights into the SNARE mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1641: 87-97.
- (8) FASSHAUER, D.; SUTTON, R.B.; BRUNGER, A.T. Y JAHN, R. (1998) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 15781-15786.
- (9) HONG, W. (2005) SNAREs and traffic. *Biochim. Biophys. Acta.* 1744: 493-517.

- (10) CALAKOS, N.; BENNETT, M.K.; PETERSON, K.E. Y SCHELLER, R.H. (1994) Protein-protein interactions contributing to specificity of intracellular vesicle trafficking. *Science*. 263: 1146-1149.
- (11) DULUBOVA, I.; SUGITA, S.; HILL, S. ET AL. (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of mucn18. *EMBO J*. 18: 4372-4382.
- (12) FIEBIG, K.; RICE, L.M.; POLLOCK, E. Y BRUNGER, A.T. (1999) Folding intermediates of SNARE complex assembly. *Nature Struct. Biol*. 6: 117-123.
- (13) FASSHAUER, D. Y MARGITTAI, M.A. (2004) A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly. *J. Biol. Chem*. 279: 7613-7621.
- (14) LANG, T. (2007) SNAREs and membrane rafts. *J. Physiol*. 585: 693-698.
- (15) CHAMBERLAIN, L.H.; BURGOYNE, R.D. Y GOULD, G.W. (2001) SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts. In PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 5619-5624.
- (16) HANSON, P.I.; ROTH, R.; MORISAKI, H. ET AL. (1997) Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*. 90: 523-535.
- (17) LIN, R.C. Y SCHELLER, R.H. (1997) Structural organization of synaptic exocytosis core complex. *Neuron*. 19: 1087-1094.
- (18) CHEN, Y.A.; SCALES, S.J. Y SCHELLER, R.H. (2001) Sequential SNARE assembly underlies priming and triggering of exocytosis. *Neuron*. 30: 161-170.
- (19) SORENSEN, J.B. (2003) Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of vesicles. *Pflügers Arch*. 448: 347-362.
- (20) SÖLLNER, T.; BENNETT, M.K.; WHITEHEART, S.M. ET AL. (1993) A protein assembly-disassembly pathway *in vitro* that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. 75: 409-418.
- (21) HANSON, P.I. Y WHITEHEART, S.W. (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 6: 519-529.
- (22) MARZ, K.E.; LAUER, J.M. Y HANSON, P.I. (2003) Defining the SNARE complex binding surface of β -SNAP: implications for SNARE complex disassembly. *J. Biol. Chem*. 278: 27000-27008.
- (23) McMAHON, H.T. Y SÜDHOF, T.C. (1995) Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 forms high affinity β -SNAP binding site. *J. Biol. Chem*. 270: 2213-2217.
- (24) HALACHMI, N. Y LEV, Z. (1996) The Sec family. A novel family of proteins involved in synaptic transmission and general secretion. *J. Neurochem*. 66: 889-897.

- (25) TOONEN, R.F. Y VERHAGE, M. (2003) Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. *Trends Cell Biol.* 13: 177-186.
- (26) DULUBOVA, I.; KHVOTCHEV, M.; LIU, S. ET AL. (2007) Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 2697-2702.
- (27) ZILLY, F.E.; SORENSEN, J.B.; JAHN, R. Y LANG, T. (2006) Munc18-bound syntaxin readily forms SNARE complexes with synaptobrevin in native plasma membranes. *PLoS Biol.* 4: e330.
- (28) OKAMOTO, M. Y SÜDHOF, T.C. (1997) Mints, Munc18-interacting proteins in synaptic vesicle exocytosis. *J. Biol. Chem.* 272: 31459-31464.
- (29) GALLWITZ, D. Y JAHN, R. (2003) The riddle of Sec1/Munc-18 proteins —new twists added to their interactions with SNAREs. *Trends Biochem. Sci.* 28: 113-116.
- (30) RIZO, J. Y SÜDHOF, T.C. (2002) Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 641-653.
- (31) SCHÜTZ, D.; ZILLY, F.; LANG, T. ET AL. (2005). A dual function for Munc-18 in exocytosis of PC12 cells. *Eur. J. Neurosci.* 21: 2419-2432.
- (32) VOETS, T.; TOONEN, R.F.; BRIAN, E.C. ET AL. (2001) Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron.* 31: 581-589.
- (33) FISHER, R.J.; PEVSNER, J. Y BURGOYNE, R.D. (2001) Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc 18. *Science.* 291: 875-878.
- (34) SCHULTZ, J.; DOERKS, T.; PONTING, C.P. ET AL. (2000) More than 1,000 putative new human signalling proteins revealed by EST data mining. *Nat. Genet.* 25: 201-204.
- (35) ZERIAL, M. Y MCBRIDE, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 107-117.
- (36) PFEFFER, S. Y ALVAZIAN, D. (2004) Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 886-896.
- (37) FISHER VON MOLLARD, G.; MIGNERY, G.A.; BAUMERT, M. ET AL. (1990) rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 1988-1992.
- (38) SÜDHOF, T.C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 27: 509-547.
- (39) SEGEV, N. (2001) Ypt and Rab GTPases: insights into functions through novel interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 500-511.
- (40) SCHLÜTER, O.M.; SCHMITZ, F.; JAHN, R. ET AL. (2003) A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function. *J. Neurosci.* 24: 6629-6637.

- (41) LEENDERS, A.G.; LOPES DA SILVA, F.H.; GHJEN, W.E. Y VERHAGE, M. (2001) Rab3a is involved in transport of synaptic vesicles to the active zone in mouse brain nerve terminals. *Mol. Biol. Cell.* 12: 3095-3102.
- (42) GEPPERT, M.; GODA, Y.; STEVENS, C.F. Y SÜDHOF, T.C. (1997) The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature.* 387: 810-814.
- (43) DOUSSAU, F.; CLABECQ, A.; HENRY, J.P. ET AL. (1998) Calcium-dependent regulation of rab3 in short-term plasticity. *J. Neurosci.* 18: 3147-3157.
- (44) COPPOLA, T.; HIRLING, H.; PERRET-MENOUD, V. ET AL. (2001) Rabphilin dissociated from Rab3 promotes endocytosis through interaction with Babaptin-5. *J. Cell Sci.* 114: 243-255.
- (45) BURNS, M.E.; SASAKI, T.; TAKAI, Y. Y AUGUSTINE, G.J. (1998) Rabphilin-3A: a multifunctional regulator of synaptic traffic. *J. Gen. Physiol.* 111: 243-255.
- (46) HAYNES, L.P.; EVANS, G.J.; MORGAN, A. Y BURGOYNE, R.D. (2001) A direct inhibitory role for Rab3-specific effector, Noc2, in Ca²⁺-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *J. Biol. Chem.* 276: 9726-9732.
- (47) MARTINCIC, I.; PERALTA, M.E. Y NGSEE, J.K. (1997) Isolation and characterization of a dual Rab and VAMP2 receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 26991-26998.
- (48) FIGUEROA, C.; TAYLOR, J. Y VOJTEK, A.B. (2001) Prenilated Rab acceptor protein is a receptor or prenylated small GTPases. *J. Biol. Chem.* 276: 28219-28225.
- (49) GOUGEON, P.Y.; PROSSER, D.C., DA-SILVA, L.F. Y NGSEE, J.K. (2002) Disruption of Golgi morphology and trafficking in cells expressing mutant prenylated Rab acceptor-1. *J. Biol. Chem.* 277: 36408-36414.
- (50) FENSTER, S.D.; CHUNG, W.J.; ZHAI, R. ET AL. (2000) Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron.* 25: 203-214.
- (51) PARK, J.B.; FARNSWORTH, C.C. Y GLOMSET, J.A. (1997) Ca²⁺/calmodulin causes Rab3A to dissociate from synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* 272: 20857-20865.
- (52) COPPOLA, T.; PERRET-MENOUD, V.; LUTHI, S. ET AL. (1999) Disruption of Rab3-calmodulin interaction, but not other effector interactions, prevents Rab3 inhibition of exocytosis. *EMBO J.* 18: 5885-5891.
- (53) PFEFFER, S.R. (1999) Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat. Cell Biol.* 1:E17-E22.
- (54) HSU, S.C.; TING, A.E.; HAZUKA, C.D. ET AL. (1996) The mammalian brain rsec/8 complex. *Neuron.* 17: 1209-1219.
- (55) HSU, S.C.; HAZUKA, C.D.; FOLETTI, D. Y SCHELLER, R.H. (1999) Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends Cell Biol.* 9: 150-153.

- (56) MATERN, H.T.; YEAMAN, C.; NELSON, W.J. Y SCHELLER, R.H. (2001) The Sec6/8 complex in mammalian cells: characterization of mammalian Sec3, subunit interactions, and expression of subunits in polarized cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 9648-9653.
- (57) BRYMORA, A.; VALOVA, V.A.; LARSEN, M.R. ET AL. (2001) The brain exocyst complex interacts with Ra1A in a GTP-dependent manner: identification of a novel mammalian Sec3 gene and a second Sec15 gene. *J. Biol. Chem.* 276: 29792-29797.
- (58) MOSKALENKO, S.; HENRY, D.O.; ROSSE, C. ET AL. (2002) The exocyst is a Ra1 effector complex. *Nat. Cell Biol.* 4: 66-72.
- (59) POLZIN, A.; SHIPITSIN, M.; GOI, T. ET AL. (2001) Ra1-GTPase influences the regulation of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Mol. Cell. Biol.* 22: 1714-1722.
- (60) HAZUKA, C.D.; FOLETTI, D.L.; HSU, S. ET AL. (1999) The Sec/8 complex is located at neurite outgrowth and axonal synapse-assembly domains. *J. Neurosci.* 21:3839-3848.
- (61) TAKAMORI, S.; HOLT, M.; STENIUS, K. ET AL. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell.* 127: 831-846.
- (62) NAGY, A.; BAKER, R.R.; MORRIS, S.J. Y WHITTAKER, V.P. (1976) The preparation and characterization of synaptic vesicles of high purity. *Brain Res.* 109: 285-309.
- (63) BURRÉ, J. Y VOLKNANDT, W. (2007) The synaptic vesicle proteome. *J. Neurochem.* 101: 1448-1462.
- (64) TRIMBLE, W.S.; COWAN, D.M. Y SCHELLER, R.H. (1988) VAMP-1: a synaptic vesicle associated integral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85. 4538-4542.
- (65) BENNET, M.K.; CALAKOS, N. Y SCHELLER, R.H. (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science.* 257: 255-259.
- (66) AN, S.J. Y ALMERS, W. (2004) Tracking SNARE complex formation in live endocrine cells. *Science.* 306: 1042-1046.
- (67) FUJITA, Y.; SHIRATAKI, H.; SAKISATA, T. ET AL. (1998) Tomosyn: a syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process. *Neuron.* 20: 905-915.
- (68) HATSUZAWA, K.; LANG, T.; BRUNS, D. ET AL. (2003) The R-SNARE motif of tomosyn forms SNARE core complexes with syntaxin 1 and SNAP-25 and down-regulates exocytosis. *J. Biol. Chem.* 278: 31159-31166.
- (69) McEWEN, J.M.; MADISON, J.M.; DYBBS, M. Y KAPLAN, J.M. (2006) Antagonistic regulation of synaptic vesicle priming by Tomosyn and UNC-13. *Neuron.* 51: 303-315.

- (70) SCHIAVO, G.; MATTEOLI, M. Y MONTECUCCO, C. (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* 80: 717-766.
- (71) SÜDHOT, T.C. (2002) Synaptotagmins: why so many? *J. Biol. Chem.* 277: 7629-7632.
- (72) CHAPMAN, E.R. (2002) Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 498-508.
- (73) SCHONN, J.S.; MAXIMOV, A.; LAO, Y. ET AL. (2008) Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping Ca²⁺ sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 3998-4003.
- (74) CHAPMAN, E.R. (2008) How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu. Rev. Biochem.* 77: 615-641.
- (75) RIZO, J.; CHEN, X. Y ARAC, D. (2006) Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release. *Trends Cell. Biol.* 16: 339-50.
- (76) CHICKA, M.C.; HUI, E.; LIU, H. Y CHAPMAN, E.R. (2008) Synaptotagmin arrests the SNARE complex before triggering fast, efficient membrane fusion in response to Ca²⁺. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 827-835.
- (77) CHEN, X.; TOMCHICK, D.R.; KOVRIGIN, E. ET AL. (2002) Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron.* 33: 397-409.
- (78) REIM, K.; MANSOUR, M.; VAROQUEAUX, F. ET AL. (2001) Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell.* 104: 71-81.
- (79) TANG, J.; MAXIMOV, A.; SHIN, O.H. ET AL. (2006) A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell.* 126: 1175-1187.
- (80) BROSE, N.; HOFMANN, H.; KATA, Y. Y SÜDHOF, T.C. (1998) Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define a novel family of C2-domain proteins. *J. Biol. Chem.* 270: 25273-25280.
- (81) AUGUSTIN, I.; ROSENEMUND, C.; SÜDHOF, T.C. Y BROSE, N. (1999) Differential expression of two novel Munc13 proteins in rat brain. *Biochem. J.* 337: 363-371.
- (82) BETZ, A.; ASHERY, U.; RICKMANN, M. ET AL. (1998) Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron.* 21: 123-136.
- (83) ASHERY, U.; VAROQUEAUX, F.; VOETS, T. ET AL. (2000) Munc13-1 acts as a priming factor for large-dense core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J.* 19: 3586-3596.
- (84) ROSENEMUND, C.; SIGLER, A.; AUGUSTIN, I. ET AL. (2002) Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc 13 isoforms. *Neuron.* 33: 411-424.

- (85) SASSA, T.; HARADA, S.; OGAWA, H. ET AL. (1999) Regulation of the UNC-18-*Caenorhabditis elegans* syntaxin complex by UNC-13. *J. Neurosci.* 19: 4772-4777.
- (86) BETZ, A.; THAKUR, P.; JUNGE, H. ET AL. (2001) Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. *Neuron.* 30: 183-196.
- (87) XU, X.Z.; WESS, P.D.; CHEN, H. ET AL. (1998) Retinal targets for calmodulin include proteins implicated in synaptic transmission. *J. Biol. Chem.* 273: 31297-31307.
- (88) WANG, Y.; OKAMOTO, M.; SCHMITZ, F. ET AL. (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature.* 388: 593-598.
- (89) SCHOCH, S.; CASTILLO, P.E.; JO, T. ET AL. (2002) RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature.* 415: 321-326.
- (90) COPPOLA, T.; MAGNIN-LUTHI, S.; PERRET-MENOUD, V. ET AL. (2001) Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca²⁺ channels, SNAP-25, and synaptotagmin. *J. Biol. Chem.* 276: 32756-32762.
- (91) HIBINO, H.; PIRONKOVA, R.; ONWUMERE, O. ET AL. (2002) RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca(2+) channels. *Neuron.* 34: 411-423.
- (92) OZAKI, N.; SHIBASAKI, T.; KASHIMA, Y. ET AL. (2000) cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 2: 805-811.
- (93) ZHEN, M. Y JIN, Y. (1999) The liprin protein SUD-2 regulates the differentiation of presynaptic termini in *C. elegans*. *Nature.* 401: 371-375.
- (94) OLKKONEN, V.M. Y IKONEN, E. (2000) Genetic defects of intracellular-membrane transport. *N. Eng. J. Med.* 343: 1059-1104.
- (95) GISSEN, P. Y MAHER, E.R. (2007) Cargos and genes: insights into vesicular transport from inherited human disease. *J. Med. Genet.* 44: 545-555.
- (96) EGGENSWILER, J.T.; ESPINOZA, E. Y ANDERSON, K.V. (2001) Rab23 is an essential negative regulator of the mouse sonic hedgehog signalling pathway. *Nature.* 412: 194-198.
- (97) ALIGIANIS, J.A.; JOHANSON, C.A.; GISSEN, P. ET AL. (2005) Mutation of the catalytic subunit of RAB3GAP causes Warburg micro syndrome. *Nat. Genet.* 37: 221-223.
- (98) ALIGIANIS, J.A.; MORGAN, N.V.; MIONE, M. ET AL. (2006) Mutation in Rab3 GTPase-activating protein (RAB3GAP) noncatalytic subunit in a kindred with Martsolf syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 78: 702-707.

- (99) SAKANE, A.; MANABE, S.; ISHIZAKI, H. ET AL. (2006) Rab3 GTPase-activating protein regulates synaptic transmission and plasticity through the inactivation of Rab3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103: 10029-10034.
- (100) SPREACHER, E.; ISHIDA-YAMAMOTO, A.; MIZRAHI-KOREN, M. ET AL. (2005) A mutation in SNAP29, coding for a SNARE protein involved in intracellular trafficking, causes a novel neurocutaneous síndrome characterized by cerebral dysgenesis, neuropathy, ictiosis and palmoplantar keratoderma. *Am. J. Hum. Genet.* 77: 242-251.
- (101) ZUR STADT, U.; SCHMIDT, S.; KASPER, B. ET AL. (2005) Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum. Mol. Genet.* 14: 827-834.
- (102) JEANS, A.F.; OLIVER, P.L.; JOHNSON, R. ET AL. (2007) A dominant mutation in Snap25 causes impaired vesicle trafficking, sensorimotor gating, and ataxia in the blind-drunk mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104: 2431-2436.
- (103) SUGA, K.; SAITO, A.; TOMIYAMA, T. ET AL. (2005) Syntaxin 5 interacts specifically with presenilin holoproteins and affects processing of betaAPP in neuronal cells. *J. Neurochem.* 94: 425-439.
- (104) CHUA, C.E. Y TANG, B.L. (2006) Alpha-synuclein and Parkinson's disease: the first roadblock. *J. Cell. Mol. Med.* 10: 837-846.
- (105) FENG, Y.; CROSBIE, J.; WIGG, K. ET AL. (2005) The SNAP25 gene as a susceptibility gene contributing to attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry.* 10: 998-1005.
- (106) SMITH, R.; KLEIN, P.; KOC-SCHMITZ, Y. ET AL. (2007) Loss of SNAP-25 and rabfillin 3A in sensory-motor cortex in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 103: 115-123.