



Sinapsis: maquinarias moleculares para la comunicación neuronal

Rafael Fernández-Chacón y Josep Rizo

Entender la comunicación neuronal no es entender el funcionamiento del cerebro, pero no puede aspirarse a comprender el cerebro sin conocer los mecanismos moleculares que subyacen al funcionamiento de las sinapsis. En los últimos años hemos aprendido mucho sobre el mecanismo de liberación de los neurotransmisores, pero hay aún aspectos clave por resolver.

Uno de los retos científicos más desafiantes, actuales y no tan actuales, es comprender el funcionamiento del cerebro humano. Parte de la complejidad del problema radica en el elevadísimo número de neuronas que constituyen el cerebro y el astronómico número de conexiones que forman entre sí. Por hacer las magnitudes comprensibles, puede estimarse que el número de neuronas que alberga el cráneo humano es similar a 10 veces el número de habitantes del planeta Tierra y el número de conexiones que forman sería 10 000 veces mayor. En las conexiones neuronales, denominadas *sinapsis*, se lleva a cabo la transformación de señales eléctricas en señales químicas: el evento fundamental de la comunicación neuronal. Las señales eléctricas son cambios en el potencial de la membrana neuronal que recorren largas distancias a través de los axones hasta llegar al terminal nervioso. Los

cambios en el potencial de membrana se deben al trasiego selectivo de iones a través de los canales iónicos de la membrana. Las señales químicas son los neurotransmisores que se almacenan en las vesículas sinápticas de los terminales nerviosos presinápticos.¹ La comunicación neuronal tiene lugar en el momento

«Las sinapsis tienen un elemento de fascinación añadido: son plásticas. Pueden cambiar sus propiedades con el uso, o el desuso, y transformar la comunicación neuronal en recuerdos, memoria y aprendizaje.»

en que los neurotransmisores se liberan desde el terminal, difunden unos pocos nanómetros en el medio extracelular, se unen fielmente a los receptores del vecino terminal postsináptico y transforman la señal química en una nueva señal eléctrica. Dependiendo del tipo de neurotransmisor, las sinapsis pueden ser excitadoras

(por ejemplo las que liberan glutamato) o inhibitoras (como las que liberan ácido gamma-aminobutírico o GABA). La activación de una sinapsis excitadora hace más positivo el potencial de la neurona postsináptica, mientras que la sinapsis inhibitora lo torna más negativo. Uno de los elementos más relevantes de este fenómeno es la rapidez con que acontece. La llegada de un impulso nervioso a un terminal presináptico induce la entrada de iones calcio a través de canales iónicos que disparan la exocitosis de las vesículas sinápticas en decenas de microsegundos. Las sinapsis tienen un elemento de fascinación –y complejidad– añadido: son plásticas. Pueden cambiar sus propiedades con el uso, o el desuso, y transformar la comunicación neuronal en recuerdos, memoria y aprendizaje.

Entender la comunicación neuronal no es entender el funcionamiento del cerebro, pero no puede aspirarse a comprender el cerebro sin conocer los mecanismos moleculares que subyacen al funciona-

miento de las sinapsis. En los últimos 25 años se ha avanzado enormemente en el desciframiento de la composición bioquímica de los terminales nerviosos, la estructura y propiedades funcionales de moléculas clave, las cascadas de interacciones entre proteínas y la función *in vivo* de estas proteínas en modelos animales genéticamente modificados. El premio Nobel de Fisiología o Medicina se otorgó en el año 2013 a James Rothman, Randy Schekman y Thomas C. Südhof por sus descubrimientos sobre la maquinaria molecular responsable de la liberación de neurotransmisores y el tráfico de vesículas en general.^{2,3}

► Proteínas SNARE y la fusión de membranas

Las toxinas botulínica y tetánica son potentes neurotoxinas con actividad metaloproteasa derivadas de gérmenes anaerobios (clostridios) que pueden conducir a la muerte. Curiosamente, la toxina botulínica, con el nombre de Botox, se ha popularizado en cosmética por su efecto eliminador de arrugas faciales. No en vano, se le ha llamado *wonder-*

drug. Lo más interesante (al menos para los que todavía no nos preocupan las arrugas) es que el mecanismo de acción de estas toxinas radica en el bloqueo que ejercen sobre la liberación de neurotransmisores.

A principios de los años noventa, estas toxinas fueron instrumentales para descubrir que sus dianas eran un grupo de proteínas clave para la exocitosis de las vesículas sinápticas en los terminales nerviosos.⁴⁻⁶ Estas proteínas, denominadas *proteínas SNARE* (fig. 1a), interaccionan entre sí formando el complejo SNARE clave para la fusión de membranas.⁷ El complejo SNARE está formado por tres proteínas diferentes: una en la membrana de la vesícula sináptica (sinaptobrevina/VAMP) y otras dos en la membrana del terminal (sintaxina y SNAP25 [de *synaptosome associated protein of 25KDa*]). Estas tres proteínas disponen de dominios específicos (dominios SNARE) que interaccionan entre sí a modo de una cremallera (*zippering*) que se cierra desde los extremos N-terminales en dirección a los extremos C-terminales.⁸ Así se forma un complejo de cuatro hélices extremadamente estable que aproxima la

membrana vesicular a la membrana plasmática y que precede a la fusión de las membranas (fig. 1a). La disociación del complejo requiere aporte energético en forma de ATP y la mediación de las proteínas NSF (*n-ethylmaleimide-sensitive factor*) y SNAP (*NSF associated proteins*).⁹

► Munc18 y Munc13... ¡también cuentan en la fusión de membranas!

Experimentos de reconstitución con proteoliposomas sugirieron que las proteínas SNARE constituyen un maquinaria mínima de fusión de membranas¹⁰ y este modelo ha sido aceptado por muchos investigadores, apareciendo incluso en libros de texto. Sin embargo, las proteínas SNARE no pueden fusionar liposomas en presencia de NSF y SNAP porque estas proteínas disocian los complejos SNARE y complejos intermediarios como el que se forma entre las proteínas sintaxina y SNAP-25.¹¹ Además, la liberación de neurotransmisores requiere no solamente las proteínas SNARE, sino también otros factores críticos como las proteínas Munc18 y Munc13. Estas pro-

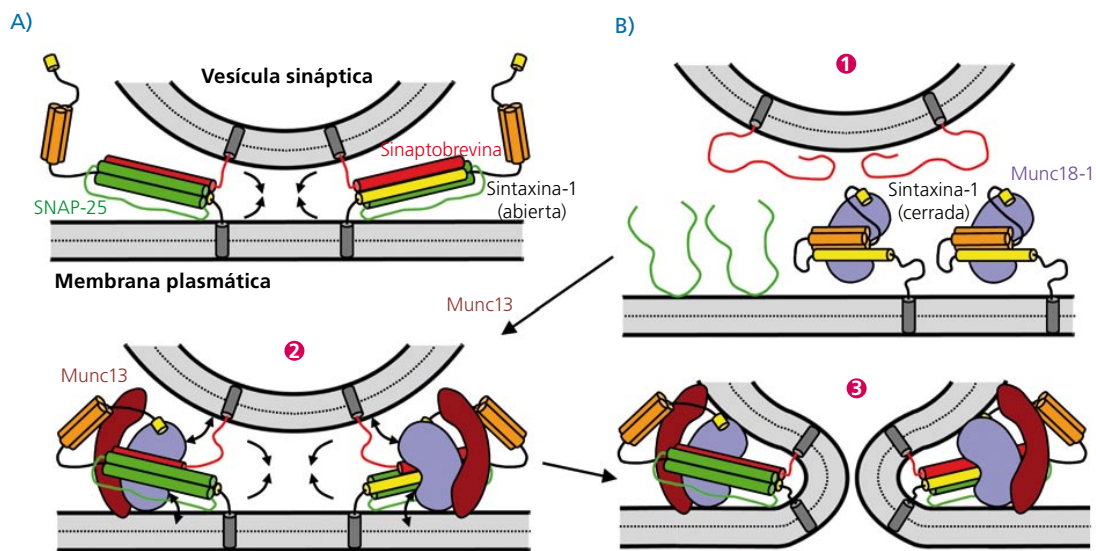


Figura 1. Modelos de fusión de membrana mediada por las proteínas SNARE, Munc18 y Munc13

A) La formación del complejo SNARE (sinaptobrevina en rojo; SNAP-25 en verde; sintaxina en amarillo y el dominio N-terminal en naranja) acerca la vesícula sináptica a la membrana plasmática.

B) Modelo secuencial de tres estados. *Estado 1:* la sintaxina está inicialmente cerrada y ligada a Munc18 (violeta). *Estado 2:* Munc13 (marrón) abre la sintaxina y orquesta la formación del complejo SNARE junto con Munc18. *Estado 3:* fusión. El modelo postula que, mientras Munc18 y Munc13 impiden que las membranas se acerquen demasiado, la finalización de la formación del complejo SNARE atrae a las dos membranas en el centro; esta combinación de fuerzas (ilustrada por las flechas en el estado 2) ayuda a que las membranas se deformen para fusionarlas (estado 3).

teínas son las isoformas en mamífero (M) de proteínas originalmente identificadas en el nematodo *C. elegans* y que toman su nombre de los mutantes *unc* (de *uncoordinated*) identificados por Sydney Brenner en la década de los años setenta.

La proteína Munc18 interacciona con la proteína syntaxina de un modo dual muy interesante. La proteína syntaxina tiene dos conformaciones: una conformación *cerrada* (autoinhibida) y una conformación *abierta*. La conformación cerrada se forma por el plegamiento de un dominio N-terminal (el dominio Habc) sobre el dominio SNARE, impidiendo la interacción con los dominios SNARE de las proteínas SNAP-25 y sinaptobrevina¹² (fig. 1b, estado 1). Uno de los modos de interacción de la proteína Munc18 se produce con la syntaxina en la conformación cerrada a modo de capuchón impidiendo que la syntaxina pase a la conformación abierta. Esta interac-

ción podría estar indicando que Munc18 es un inhibidor de la fusión. Paradójicamente, en modelos animales carentes de Munc18, el fenotipo resultante resultó ser una completa supresión de la liberación de neurotransmisor,¹³ identificando así a Munc18 como una proteína esencial en la fusión de las vesículas sinápticas. Esta aparente contradicción ha podido explicarse en parte por el posterior descubrimiento de otro modo de interacción: Munc18 se une también al complejo SNARE que contiene syntaxina en conformación abierta¹⁴ (fig. 1b, estados 2 y 3).

La transición del complejo de Munc18 con syntaxina cerrada al complejo SNARE, donde Munc18 también se liga, requiere Munc13, una proteína de 200 kDa con varios dominios (fig. 1b). Al igual que Munc18, Munc13 también es esencial para la liberación de neurotransmisores¹⁵ y además participa en múltiples

funciones de regulación de la fusión de vesículas sinápticas que están relacionadas con distintas formas de procesamiento de información en el cerebro. La función esencial de Munc13 es ejecutada por un amplio dominio llamado *MUN*, que cataliza la apertura de la conformación cerrada de la syntaxina.¹⁶ Experimentos de reconstitución con proteoliposomas han demostrado que, de esta manera, Munc18 y Munc13 orquestan la formación del complejo SNARE evitando que el complejo sea disociado por NSF y SNAP.¹¹ Además, es posible que Munc18 y Munc13 también ayuden en la fusión de las dos membranas porque, debido a su gran tamaño, impiden que las dos membranas se aproximen demasiado entre sí a la vez que el complejo SNARE las intenta acercar. Esta combinación de fuerzas opuestas podría ser crítica para la deformación de las membranas que se requiere para iniciar su fusión¹⁷ (fig. 1b, estado 2).

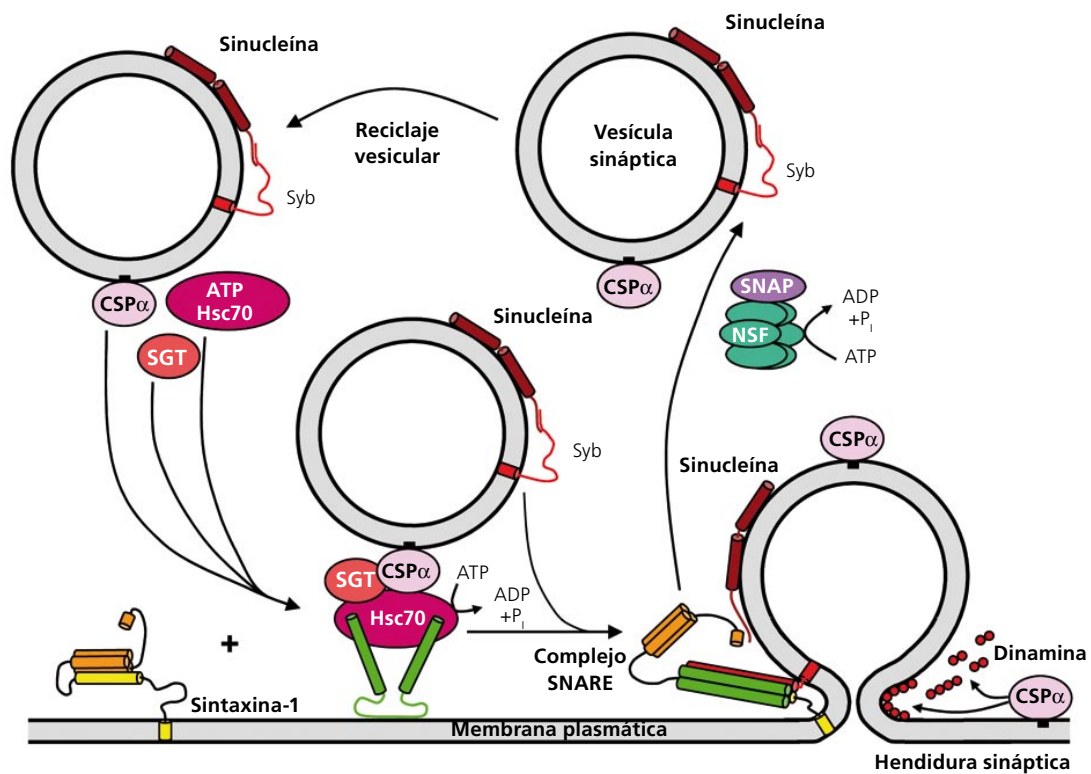


Figura 2. CSPα y α-sinucleína: chaperonas en el ciclo de las vesículas sinápticas

Gracias a la interacción con Hsc70 y sus cochaperonas CSPα y SGT, la proteína SNAP-25 (verde) se mantiene funcionalmente estable para formar el complejo SNARE con la syntaxina (amarilla y naranja) y con la sinaptobrevina (roja). La sinaptobrevina (roja) se muestra sobre las vesículas sinápticas como una proteína desestructurada que se une a la α-sinucleína. La proteína α-sinucleína funciona como chaperón del complejo SNARE por mecanismos todavía no bien conocidos y puede llegar a suplir la función de CSPα. Por otro lado, la proteína CSPα también actúa como chaperón uniéndose a la dinamina y promoviendo su oligomerización en la endocitosis.

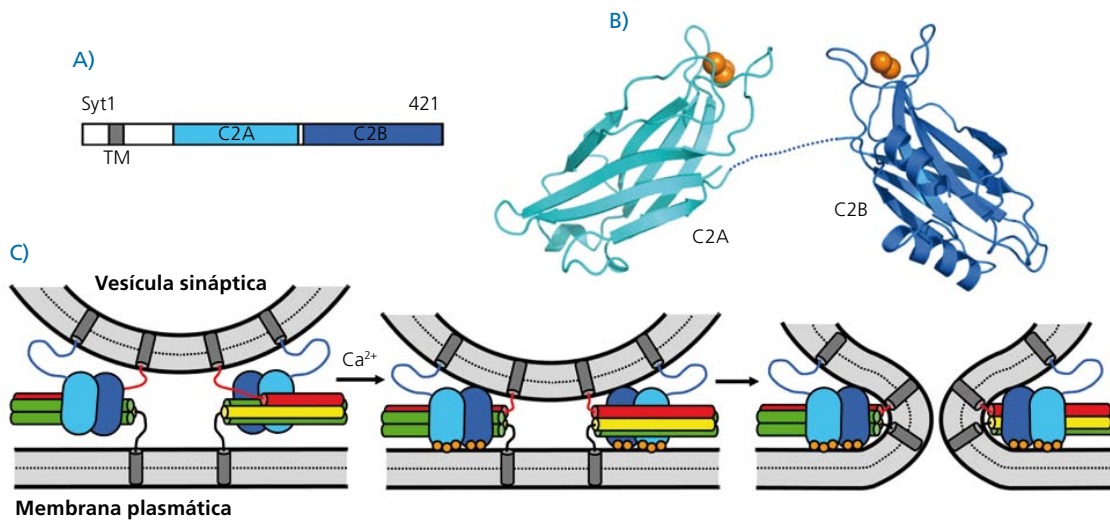


Figura 3. Modelo del mecanismo de acción de la sinaptotagmina

A) Diagrama de dominios de la sinaptotagmina 1.

B) Estructuras de los dominios C2A y C2B de la sinaptotagmina 1 (en azul claro y oscuro, respectivamente) ligados a iones de calcio (esferas de color naranja).

C) Modelo que ilustra que la ligación de iones de calcio a la sinaptotagmina induce su unión a la vesícula sináptica y a la membrana plasmática simultáneamente, lo cual podría cooperar con el complejo SNARE a fusionar las membranas.

► CSP α y α -sinucleína: chaperones del complejo SNARE y neurodegeneración

El ciclo continuo de ensamblaje y desensamblaje del complejo SNARE es esencial para asegurar la liberación de neurotransmisor con la llegada de un impulso nervioso. Este ciclo implica constantes cambios conformacionales de las proteínas SNARE, una fuente de potenciales especies proteicas reactivas en caso de que no vuelvan a plegarse correctamente. Este fenómeno se hace particularmente relevante si se tiene en cuenta que hay terminales nerviosos que reciben al día cientos de miles de impulsos nerviosos. No es de extrañar que las vesículas sinápticas estén dotadas de un cochaperón molecular: *Cysteine String Protein- α* (CSP α). La proteína CSP α tiene un dominio DnaJ típico de los cochaperones de la familia Hsp40 y forma un complejo con la Hsc70 y la proteína con repeticiones de tetratrico-péptidos SGTA.¹⁸ Este complejo actúa como chaperón de la proteína SNAP-25 y es necesario para la estabilidad del complejo SNARE^{19,20} (fig. 2). Funcionalmente, las motoneuronas de estos ratones presentan déficits en la exocitosis y en el reciclaje de vesículas sinápticas²¹ y se ha propuesto que CSP α facilita la oligomerización de la dinamina en la endocitosis.²² Curiosamente, los ratones carentes de CSP α desarrollan una degeneración

presináptica dependiente de la actividad neuronal, poco después del nacimiento.^{23,24} Esta alteración conduce a un fenotipo neurológico grave que les lleva a una muerte temprana en los primeros meses de vida. Otra proteína que también se asocia a las vesículas sinápticas, la proteína α -sinucleína, viene siendo desde hace años objeto de múltiples estudios porque hay mutaciones en el gen humano que causan formas familiares de la enfermedad de Parkinson. Inesperadamente, el fenotipo provocado por la ausencia de la proteína CSP α se revertía al inducir en ratones la sobreexpresión de α -sinucleína.¹⁹ Estos estudios han demostrado que las proteínas CSP α y α -sinucleína comparten funcionalmente la misión de chaperón para asegurar la estabilidad del complejo SNARE (fig. 2). Una pregunta de gran interés es comprender los mecanismos que, en ausencia de la actividad chaperona de CSP α , conducen a la neurodegeneración.

► Sinaptotagmina: el sensor de calcio

Desde los trabajos de Katz, Del Castillo y Miledi a mediados del siglo XX, una de las preguntas fundamentales del funcionamiento de la sinapsis ha sido el mecanismo y la naturaleza del sensor del ión calcio que dispara la exocitosis de las

vesículas sinápticas. Hace más de 20 años se propuso que la proteína de la vesícula sináptica sinaptotagmina 1 podría ser este sensor.²⁵ La proteína sinaptotagmina 1 tiene dos dominios C2 que se caracterizan por ligar dos o tres iones de calcio (fig. 3a,b), lo cual induce la unión a fosfolípidos. La eliminación genética de la sinaptotagmina en ratones conduce a muerte perinatal y a la supresión de la liberación rápida de neurotransmisor que está sincrónicamente acoplada con la llegada de un impulso nervioso.²⁶

Estas observaciones resultaron ser compatibles con el papel de sensor de calcio de la sinaptotagmina, aunque no totalmente concluyentes. La combinación de experimentos de biología estructural y bioquímica identificó aminoácidos clave en la unión del calcio y los fosfolípidos al dominio C2A de la sinaptotagmina.²⁷ En particular, el residuo R233 resultó ser muy importante para la dependencia de calcio de la unión de fosfolípidos a la sinaptotagmina. Se observó que la eliminación de carga positiva mediante la mutación R233Q reduce a la mitad la afinidad de unión a fosfolípidos en presencia de calcio *in vitro*. La demostración de que la sinaptotagmina es el sensor de calcio se obtuvo al introducir esas mutaciones en ratones y analizar con técnicas electrofisiológicas la transmisión sináptica. Se observó que, en los mutantes

R233Q, la liberación de neurotransmisor ocurre con una afinidad aparente por el calcio extracelular que, consistentemente con las mediciones bioquímicas, es la mitad de la afinidad que se detecta en sinapsis centrales²⁷ y en células cromafines²⁸ de ratones controles. Los detalles finos del mecanismo de acción de la sinaptotagmina siguen siendo motivo de intenso estudio, particularmente los relativos a la interacción con el complejo SNARE.

Una idea atractiva es que la sinaptotagmina colabora con las proteínas SNARE en la fusión de membranas: 1) antes de la llegada del calcio la sinaptotagmina estaría laxamente unida al complejo SNARE y habría cargas negativas no apantalladas en la membrana y en la sinaptotagmina que supondrían un freno para la fusión de las membranas y 2) tras la entrada del calcio al terminal, la ligación de varios iones a la sinaptotagmina favorecería la unión simultánea de la sinaptotagmina a dos membranas, la membrana vesicular y la membrana plasmática, un evento crítico para disparar rápidamente la formación de un poro por fusión de membranas²⁹ (fig. 3c).

► Perspectivas futuras

Además de las proteínas que forman el centro de la maquinaria de fusión, hay muchas más proteínas que proporcionan a la liberación de neurotransmisores una regulación exquisita. Entre ellas se encuentra, por ejemplo, la complexina, una pequeña proteína que como su nombre indica, se liga fuertemente a los complejos SNARE. La complexina tiene una doble función: inhibe y activa la fusión por medio de dominios distintos en una delicada interacción funcional con las proteínas SNARE y la sinaptotagmina. Aunque se han propuesto algunos modelos para esta doble función, estos modelos todavía no están bien demostrados. De manera similar, algunas de las ideas sobre las funciones coordinadas entre las proteínas SNARE, Munc18, Munc13 y la sinaptotagmina que hemos mencionado necesitan ser demostradas y refinadas en detalle. Ello sirve como ejemplo ilustrativo de que las investigaciones sobre el mecanismo de liberación de los neurotransmisores están en un momento muy excitante porque se ha aprendido muchísimo en los últimos años pero, a la vez, hay aspectos fundamentales que todavía hay que resolver, aunque esperamos que

no se tardará mucho en responder a estas preguntas. #

Rafael Fernández-Chacón

INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE SEVILLA (IBiS, HUVR/CSIC/UNIVERSIDAD DE SEVILLA), DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA MÉDICA Y BIOFÍSICA Y CIBERNED, SEVILLA

Josep Rizo

DEPARTAMENTOS DE BIOFÍSICA, BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA, U.T. SOUTHWESTERN MEDICAL CENTER, DALLAS, TEXAS, EE.UU.

► Bibliografía

- Fernández-Chacón R., Südhof T.C.: «Genetics of synaptic vesicle function: toward the complete functional anatomy of an organelle». *Annu Rev Physiol* 1999; 61: 753-76.
- Südhof T.C.: «The molecular machinery of neurotransmitter release (Nobel lecture)». *Angew Chem Int Ed Engl* 2014; 53 (47): 12696-717.
- Rothman J.E.: «The principle of membrane fusion in the cell (Nobel lecture)». *Angew Chem Int Ed Engl* 2014; 53 (47): 12676-94.
- Link E. et al.: «Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis». *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189 (2): 1017-23.
- Schiavo G. et al.: «Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc». *EMBO J* 1992; 11 (10): 3577-83.
- Binz T. et al.: «Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins». *J Biol Chem* 1994; 269 (3): 1617-20.
- Söllner T. et al.: «A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion». *Cell* 1993; 75 (3): 409-18.
- Hanson P.I. et al.: «Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy». *Cell* 1997; 90 (3): 523-35.
- Mayer A., Wickner W., Haas A.: «Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles». *Cell* 1996; 85 (1): 83-94.
- Weber T. et al.: «SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion». *Cell* 1998; 92 (6): 759-72.
- Ma C. et al.: «Reconstitution of the vital functions of Munc18 and Munc13 in neurotransmitter release». *Science* 2013; 339 (6118): 421-5.
- Dulubova I. et al.: «A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18». *EMBO J* 1999; 18 (16): 4372-82.
- Verhage M. et al.: «Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion». *Science* 2000; 287 (5454): 864-9.
- Dulubova I. et al.: «Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex». *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104 (8): 2697-702.
- Varoqueaux F. et al.: «Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming». *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (13): 9037-42.
- Ma C. et al.: «Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex». *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18 (5): 542-9.
- Rizo J., Südhof T.C.: «The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices—guilty as charged?». *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012; 28: 279-308.
- Tobaben S. et al.: «A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine». *Neuron* 2001; 31 (6): 987-99.
- Chandra S. et al.: «Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration». *Cell* 2005; 123 (3): 383-96.
- Sharma M., Burre J., Südhof T.C.: «CSPalpha promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity». *Nat Cell Biol* 2011; 13 (1): 30-9.
- Rozas J.L. et al.: «Motorneurons require cysteine string protein-alpha to maintain the readily releasable vesicular pool and synaptic vesicle recycling». *Neuron* 2012; 74 (1): 151-65.
- Zhang Y.Q. et al.: «Identification of CSPalpha clients reveals a role in dynamin 1 regulation». *Neuron* 2012; 74 (1): 136-50.
- Fernández-Chacón R. et al.: «The synaptic vesicle protein CSPalpha prevents presynaptic degeneration». *Neuron* 2004; 42 (2): 237-51.
- García-Junco-Clemente P. et al.: «Cysteine string protein-alpha prevents activity-dependent degeneration in GABAergic synapses». *J Neurosci* 2010; 30 (21): 7377-91.
- Brose N. et al.: «Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface». *Science* 1992; 256 (5059): 1021-5.
- Geppert M. et al.: «Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse». *Cell* 1994; 79 (4): 717-27.
- Fernández-Chacón R. et al.: «Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability». *Nature* 2001; 410 (6824): 41-9.
- Sorensen J.B. et al.: «Examining synaptotagmin 1 function in dense core vesicle exocytosis under direct control of Ca²⁺». *J Gen Physiol* 2003; 122 (3): 265-76.
- Arac D. et al.: «Close membrane-membrane proximity induced by Ca(2+)-dependent multivalent binding of synaptotagmin-1 to phospholipids». *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13 (3): 209-17.