

Proteínas y enzimas como posibles mensajeros en la comunicación química interneuronal. Parte I

Philippe Leff*
Benito Anton*

Summary

A vast number of information has been accumulated in the past 30 years concerning the release of different set and subset of protein molecules and enzymes, initially reported to be evokedly released from non neuronal tissue such as the chromaffin cells of the adrenal gland. Extensive studies concerning molecular cloning and *in situ* hybridization techniques have revealed the cell origin, localization and expression of enzymes, such as acetylcholinesterase, and dopamine beta hydroxylase, in the brain tissue of different mammalian and non mammalian species. Moreover, non adrenergic or cholinergic functions have been reported for such high molecular species, including trophic functions. Similar approaches have been undertaken to elucidate the neuronal and non neuronal expression of protein molecules such as chromogranin polipeptides, whose cell synthesis, posttranslational modifications, packaging, trafficking and cell exocytosis, in neuronal and in neuroendocrine tissues has been extensively documented. Moreover, such protein molecules appear to be precursors of several biological active peptides whose autocrine, paracrine and endocrine functions, at neuronal and non neuronal level have been reported. In addition, a large family of neurotrophic factors, including the well known and extensively documented, Nerve Growth Factor (NGF), recently isolated, identified and molecularly and functionally characterized *in vivo* and *in vitro* are known to exert and maintain the survival of different sets of neuronal cells by activating a subset of brain membrane receptors.

Key words: Proteins, enzymes, neurotrophins, release, depolarization, neuron transmission, basal ganglia.

Resumen

En los últimos 30 años un extenso cúmulo de información ha sido reportada sobre la identificación y caracterización fisiológica y molecular de las proteínas y las enzimas; cuya liberación espontánea e inducida a partir del tejido neuronal y de los tejidos extraneuronales, como las células cromafines de la glándula suprarrenal, han permitido no sólo la subsecuente clonación y aislamiento molecular de estas moléculas protéicas, sino que, además, mediante la aplicación de métodos de hibridación *in situ*, de la generación de anticuerpos selectivos, conjuntamente con el apoyo de técnicas inmunohistoquímicas, se ha podido detectar el origen, localización y

* Laboratorio de Neurobiología Molecular. División de Investigaciones Clínicas. Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calz. México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, 14370 Mexico DF.

expresión celular de enzimas como la acetilcolinesterasa específica (AChE), y la dopamina-beta-hidroxilasa (DBH), en diversas regiones del cerebro de distintas especies mamíferas, de donde se ha encontrado su capacidad para ejercer funciones neurotróficas. Asimismo, se han abordado similares planteamientos experimentales para identificar y localizar la expresión celular y subcelular de proteínas como las de la familia de los polipéptidos, representados por las cromograninas y las secretoneurinas, que son polipéptidos, cuya síntesis celular, modificaciones postraduccionales, almacenamiento y segregación vesicular, como su exocitosis celular en el tejido neuronal y en los tejidos neuroendocrinos, han sido estudiadas *in vivo* e *in vitro* a partir de diferentes preparaciones biológicas, cuyos resultados han sido motivo de múltiples publicaciones. Más aún, estas proteínas parecen ser precursoras de varios péptidos bioactivos, en los que se han observado diversas funciones de tipo autocrino, paracrino o endocrino, en el tejido neuronal y en los tejidos extraneuronales. Asimismo, una extensa familia de factores tróficos, conocidos como neurotrofinas, incluyendo el Factor de Crecimiento Neuronal (NGF), recientemente se aislaron, identificaron, y caracterizaron molecular y funcionalmente, *in vivo* e *in vitro*, con lo que se demostró su capacidad para regular y mantener la supervivencia de diferentes poblaciones de células neuronales en el sistema nervioso central y periférico de múltiples especies de vertebrados e invertebrados, lo que parece mediarse por la activación de diversos subgrupos de receptores membranales, recientemente identificados y localizados en discretas poblaciones neuronales.

Palabras clave: Proteínas, enzimas, neurotrofinas, transmisión, liberación, despolarización, neurona, ganglios basales.

1. Generalidades

La estimulación del tejido nervioso, además de inducir la liberación de neurotransmisores de naturaleza peptídica (Bayón y col., 1985, 1986; Olive y Maidment, 1998) y de aminoácidos no peptídicos (aminoácidos y aminos biogénicas), induce la liberación de sustancias protéicas de alto peso molecular, y aunque algunas de ellas han sido bien caracterizadas (AChE; DBH, factores tróficos o neurotrofinas) desde el punto de vista bioquímico, fisiológico y molecular, se han encontrado moléculas que por sus características de liberación fisiológica, presentan un potencial enorme de estudio para identificar, caracterizar y aislar nuevas moléculas químicas con posibles funciones regulatorias en la neurotransmisión del SNC de los mamíferos (Bayón y

cols., 1985, 1986; Greenfield y cols., 1984; Greenfield, 1991). Se han utilizado diversos enfoques experimentales para estudiar y analizar los mecanismos y eventos químico-moleculares que regulan la secreción de las diversas moléculas neuroactivas en el sistema nervioso central, en particular aquellos que han permitido identificar, aislar, clonar y caracterizar la funcionalidad de diferentes proteínas relacionadas con las vesículas exocíticas que intervienen en el transporte intracelular de las vesículas sinápticas, la fusión de éstas a la terminal presináptica (membrana vesicular/membrana plasmática), el reciclaje y endocitosis de las vesículas exocíticas, y los eventos fisiológicos que determinan el acoplamiento estímulo-secreción, que determinan el fenómeno de la neurosecreción en el SNC y en las glándulas de secreción interna (sistema APUD o de neurosecreción) tanto en las especies de vertebrados como en las de invertebrados (De Camilli y Reinhard, 1990; Bajjalieh y Scheller, 1995; Volkandt, 1995; Matthews, 1996) (figura 1).

2. Rutas de secreción en las células eucarióticas

Las células eucarióticas se caracterizan por poseer dos rutas diferentes de secreción exocítica, mediante la cual

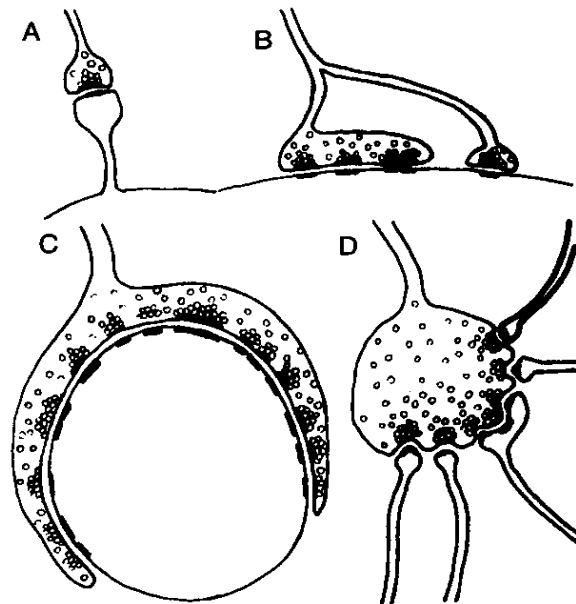


Figura 1. Ilustración esquemática de los diferentes tipos de sinápsis que establecen las neuronas del SNC de los mamíferos.

- Representación esquemática de un botón sináptico en contacto con una espina dendrítica en la que se observa una especialización pre y posináptica a nivel membranar.
- Se muestra un axón que hace múltiples contactos sinápticos en el soma o tallo dendrítico en una neurona posináptica.
- Ejemplo de un contacto sináptico de tipo "Calix" en el que se establecen millares de especializaciones sinápticas.
- Contacto sináptico tipo glomerular entre una terminal axónica y múltiples dendritas (Walmsley y cols., 1998).

se depositan diversos productos de secreción en el espacio extracelular. La secreción de tipo *constitutiva*, que es la ruta de secreción básica operante en todas las células de los organismos vivos, se caracteriza por el transporte constante de vesículas pequeñas (50 nm) provenientes del aparato de Golgi (*Trans-Golgi*), a la superficie celular, donde se lleva a cabo el proceso de exocitosis del contenido vesicular, mismo que no requiere del almacenamiento intermedio ni del procesamiento del contenido vesicular, y es responsable del intercambio de componentes membranales de la membrana de superficie (De Camilli y Reinhard, 1990). Asimismo, múltiples células diferenciadas (v.g., neuronas, células endocrinas y neuroendocrinas, etc.) responden secretando o liberando sus contenidos vesiculares a través de una ruta de secreción *regulada*, que interviene en la segregación, transporte, almacenamiento, concentración, procesamiento enzimático y exocitosis del material vesicular exportado (v.g., proteínas, prepro péptidos, y mensajeros químicos peptídicos y no peptídicos, etc.) en respuesta a un estímulo apropiado (químico, farmacológico, eléctrico, etc.), por ejemplo, el ion Ca^{++} (De Camilli y Reinhard, 1990). La coexistencia de ambas rutas de secreción en una misma célula permite esclarecer con mayor precisión los eventos moleculares que determinan las rutas de secreción celular (De Camilli y Reinhard, 1990; Volkandt, 1994).

3. Aspectos moleculares de la secreción neuronal. (Interacción de las proteínas vesiculares y de las proteínas membranales)

La neurotransmisión representa la forma de comunicación primordial en el sistema nervioso central. Los cambios que regulan o determinan la efectividad de este proceso definen la plasticidad cerebral y las estructuras que conforman y determinan la funcionalidad entre las múltiples conexiones sinápticas (Bajjalieh y Scheller, 1995; Matthews, 1996; Bennett, 1998). La neurosecreción se distingue de la secreción constitutiva por estar regulada por Ca^{++} , aunque comparte rasgos similares en el transporte, segregación, y fusión de las vesículas, utilizando filamentos de actina (componentes del citoesqueleto celular) y fosfolípidos ácidos para la fusión membrana (De Camilli y Reinhard, 1990; O'Connor y cols., 1994; Volkandt, 1994; Bajjalieh y Scheller, 1995). Mediante la clonación y caracterización molecular de diversas proteínas constitutivas de vesículas sinápticas se han podido evaluar múltiples funciones relacionadas con los eventos fisiológicos y moleculares que intervienen en la secreción inducida de las moléculas bioactivas (neurotransmisores peptídicos y no peptídicos) (Volkandt, 1995; Matthews, 1996). Estas moléculas proteicas, integradas o asociadas a la membrana vesicular, han sido localizadas en distintas vesículas sinápticas (SSV y SDCV) y vesículas secretorias (v.g., gránulos cromafines), que son componentes del tejido neuronal y de los tejidos de secreción neuroendocrina (v.g., glándula adrenal) en múltiples especies de vertebrados (v.g., rata, bovino) e invertebrados (v.g., moluscos marinos), (Volkandt, 1995; Avery y cols., 1997). Estas proteínas incluyen transportadores de moléculas pequeñas, como el com-

plejo protéico-hetero-oligomérico que conforma la bomba protónica vacuolar; la V-ATPasa (Mr; 750 Kd); el transportador intravesicular de moléculas pequeñas (calcio, ATP, nucleótidos, cloro); la proteína neuronal SV-2A y SV-2B (P.M., 80-150 kDa); las proteínas transportadoras de aminas biogénicas (ACh); la VMAT-1 y la VMAT-2 (P.M.; 50-65 kDa); las proteínas integrales de las vesículas, sensoras de Ca^{++} intracelular, relacionadas con el proceso de secreción, como la sinaptogamina-p65; la sinaptogamina I, la sinaptogamina III, la frecuencia y la neuronal NCS-1 (Lang y cols., 1997; Thomas y Elferink, 1997; Mizuta y cols., 1997, Baram y cols., 1998; McFerran y cols., 1998); las proteínas relacionadas con la fusión de vesículas con la membrana plasmática en relación con el citoesqueleto celular (Valentijn y cols., 1998), como las moléculas *sinaptobrevinas/VAMPs*, las *sinaptofisinas*, las *sintaxinas*, la *rabphilina-3a (rab-3a)* y la *Proteína Noc2*, así como las proteínas relacionadas con la formación de poros membranales, las sinaptoporinas (Bauerfeind y cols., 1995; Avery y cols., 1997; Tasaka y cols., 1998); las proteínas relacionadas con el transporte y movilización de las vesículas a los sitios activos en las terminales sinápticas, como las proteínas asociadas a GTP (*GTP-binding proteins*, *Proteína Rho*) (Jena y cols., 1992; Gasman y cols., 1997; Zhang y cols., 1998); las proteínas que intervienen en la activación y regulación funcional de las proteínas sinápticas por fosforilación, como la *calmodulina-proteína cinasa II (Ca/CaM-K II)* (ver esquema de configuración membranas de vesícula sináptica colinérgica (figura 5). Asimismo, diversos estudios han encontrado un grupo de proteínas solubles denominadas proteínas SNARE, así como de proteínas vesiculares denominadas SNAPs (*synaptosomal-associated proteins*) (v.g., SNAP23, SNAP-25) (Hohn-Zell y cols., 1997; Linial y cols., 1997; Sadoul y cols., 1997a y b; Huang y cols., 1998; Neimoz-Gaillard y cols.,

1998; Gou y cols., 1998); un grupo de proteínas denominadas CSPs (*cystein string proteins*) (Brown y cols., 1998); proteínas citosólicas dependientes Ca^{++} y ATP, definidas como CAPs (Ann y cols., 1997); la proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida, NSF (Burgoyne y Morgan, 1998), la cual parece regular el proceso de exocitosis de diversas vesículas endocíticas, mediante la fusión membranal de éstas a la membrana celular en forma dependiente de la concentración interna y externa del ion Ca^{++} (O'Connor y cols., 1994; Bajjaliah y Scheller, 1995; De Bello y cols., 1995; Matthews, 1996; English y cols., 1997; Davletov y cols., 1998; Koizumi y Inoue, 1998). Así, también se ha demostrado la presencia de diversas proteínas cinasas dependientes e independientes de la actividad de AMPc (Naor y cols., 1989; Billiard y col., 1997; Clegg y col., 1998, Scott y cols., 1998; Shefler y cols., 1998); que determinan la liberación de moléculas neurotransmisoras y/o hormonas peptídicas. Indistintamente, diversos estudios de inmunohistoquímica (IHQ), utilizando anticuerpos selectivos inmunoreactivos a diferentes marcadores protéicos vesiculares, han confirmado la existencia de múltiples vesículas neurosecretorias, incluyendo un subtipo de vesículas híbridas (SDCV) resultantes de la fusión de vesículas sinápticas pequeñas (SSV) y gránulos neurosecretorios (LDCV) que almacenan el mismo material protéico liberable (DBH, Cromograninas, AChE, péptidos neuroactivos y aminas biogénicas, etc.) (Bauerfeind y cols., 1995; Goodall y cols., 1997) (figuras 2 y 3).

4. Liberación de proteínas en el sistema nervioso central y periférico de los mamíferos

a) *Liberación in vivo de proteínas al LCR y al EEC.* Diversos estudios experimentales han mostrado la liberación fisiológica continua de las proteínas hacia

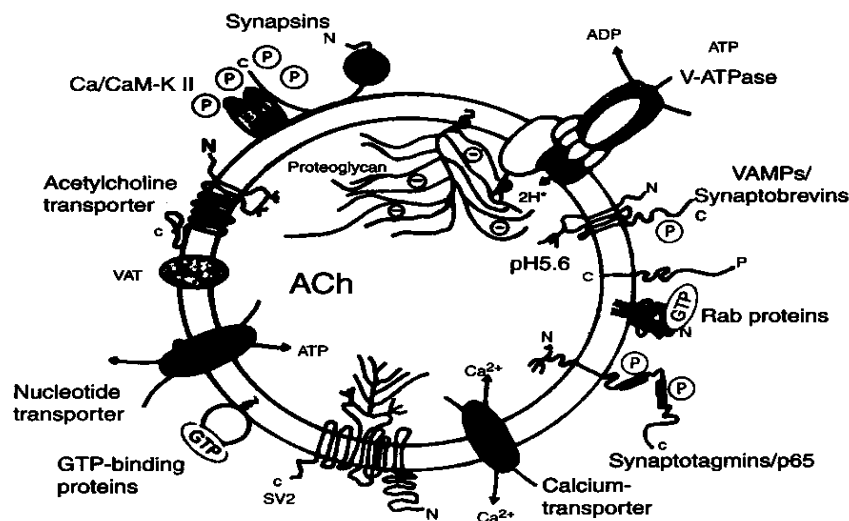


Figura 2. Representación esquemática de los constituyentes moleculares de una vesícula sináptica colinérgica (Volkandt, 1994).

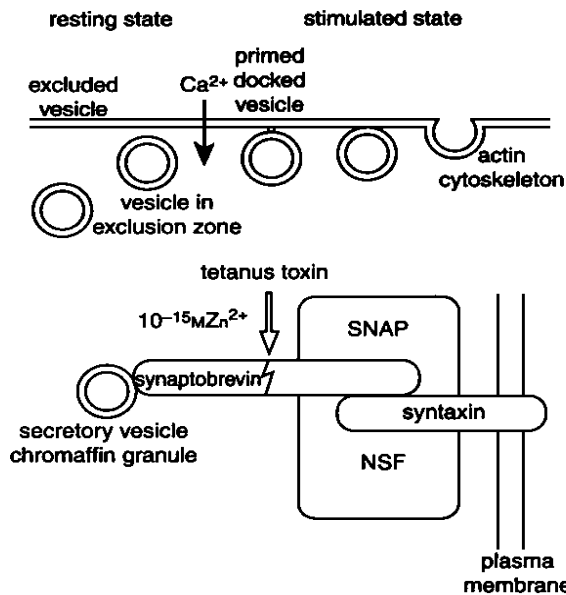


Figura 3. Los componentes moleculares que intervienen en fusión de las vesículas secretorias con la membrana smática. En este esquema se puede apreciar la red de molculas que intervienen en el proceso de fusión, formando tículas submembranales que determinan el sitio de acamiento vesícula-membrana plasmática (Livett, 1993).

el líquido cefaloraquídeo en el cerebro de los mamíferos (v.g., conejos, gatos), conjuntamente con la liberación inducida de neurotransmisores (v.g., S-HT) por medio de la perfusión ventriculo-cisternal (Barkai y cols., 1978; Barkai, 1979; Drucker-Colin y Spanis, 1975). Estos estudios demostraron, por un lado, que la concentración promedio detectada en el material reactivo a Lowry (MRL) en los perfusados colectados, variaba ($650 \pm 86/780 \pm 97 \mu\text{g/ml}$) dependiendo de las condiciones experimentales a las que estaban sujetos los animales de experimentación, observándose que el material mayor de 50 kDa (85 % del material protéico total estimado), secretado al LCR a una velocidad promedio de $4.5 \mu\text{g/min}$, se reducía significativamente (60-75 %) con el efecto anestésico del pentobarbital ($266 \pm 65 \mu\text{g/ml}$) o con el tratamiento con antagonistas dopaminérgicos (haloperidol) ($166 \pm 38 \mu\text{g/ml}$) (Barkai, 1979), en tanto que los niveles del material protéico de menor peso molecular ($< 50 \text{ kDa}$) en el LCR (concentración promedio, $82 \pm 18 \mu\text{g/ml}$), se reducían en un 50 % con el mismo tratamiento farmacológico, al igual que la secreción ventricular de ambas fracciones protéicas ($1.75\text{-}2.14 \mu\text{g/min.}$) con el tratamiento farmacológico (Barkai, 1979). Además de estos resultados experimentales, Kaczmarek y Adey observaron a través de la perfusión *in vivo* de la corteza cerebral de los gatos, la liberación de glucoproteínas marcadas con precursores metabólicos radioactivos, cuya liberación se incrementa considerablemente con la aplicación de soluciones que contienen una alta concentración de K^+ (40 mM) (Kaczmarek y Adey, 1975).

Además, Friedel y cols., identificaron un grupo de proteínas liberadas después de la propagación de un potencial de acción. Esta liberación era inducida por la corriente entrante de Ca^{++} a consecuencia de la despolarización neuronal del sistema neurosecretor fotocerebral de la langosta (Friedel y cols., 1981).

Asimismo, mientras que las diferentes líneas de investigación que emplean técnicas inmunológicas y métodos de doble marcaje de proteínas con aminoácidos radioactivos, reportan la liberación neuronal de glucoproteínas al espacio extracelular (EEC) (Benowitz y Shashoua, 1979) durante los entrenamientos conductuales específicos de los vertebrados marinos, como el pez carpa, cuyo recambio se incrementa después de adquirir un aprendizaje establecido y de consolidar una memoria a largo plazo (Shashoua, 1985), otros grupos de investigación demuestran, mediante la perfusión de la formación reticular del cerebro de los gatos y empleando cánulas de perfusión *push-pull*, la correlación entre la liberación espontánea de material protéico con el desarrollo de estados conductuales (sueño) (Drucker-Colin y Spanis, 1975), cuya liberación sigue un curso diurno de oscilación, incrementándose sustancialmente durante la fase profunda del sueño REM (MOR).

- b) *Liberación in vitro de proteínas al LCR y al EEC.* En relación con la determinación de proteínas en diversos tejidos neuronales, el tejido neuronal representativo de la unión neuromuscular ha sido quizá la preparación *in vitro* más estudiada en el campo de la liberación de proteínas de origen neuronal. Los trabajos iniciales de Musick y Hubbard, y posteriormente de otros, mostraron que la estimulación del nervio frénico produce una liberación significativa y prolongada de material reactivo a Lowry (MRL) en conjunto con la liberación de ACh, en forma dependiente del Ca^{++} extracelular, misma que se incrementa con la exposición de antagonistas colinérgicos (d-tubocuramina) o con la exposición de altas concentraciones del ion K^+ (Musick y Hubbard, 1972; Bray y Harris, 1975; Musick, 1979), que es un efecto antagonizado por iones Mg^{++} . En este contexto, diversos estudios experimentales muestran que el material protéico recién sintetizado, incluyendo la actividad de las colinesterasas (Younkin, 1978), no sólo es transportado axonalmente por los nervios periféricos a diferentes velocidades (Hines y Garwood, 1977), y liberado al medio extracelular durante la estimulación eléctrica de éstos (7 Hz/30-60 seg) (Musick, 1979), sino que este material sintetizado a partir de diferentes precursores metabólicos, es capaz de ser translocado transinápticamente al tejido muscular en cuatro pulsos u "ondas protéicas" diferentes (Korr y cols., 1967; Appletauer y Korr, 1975), liberándose una proporción estimada de MRL de $75\text{-}125 \mu\text{g}/20\text{-}25 \text{ hrs}$ (Hines y Garwood, 1977), que es una concentración equivalente $< 1 \%$ del contenido total de proteína tisular, representativa del 10-40 % de la incorporación tisular del trazador (Leu-C^{14}). Los estudios posteriores que utilizaron las mismas preparaciones biológicas indican que una por-

ción del material protéico (> 50 %) era sintetizado por células gliales satélites (en el ganglio dorsal) o células de Schwamm, y translocada al nervio posterior para su difusión por el EEC (Lasek, 1970; Tedechi y cols., 1981).

Bajo este lineamiento, Sweadner indica la liberación espontánea e inducida de un grupo de glucoproteínas solubles provenientes del cultivo de neuronas simpáticas del ganglio cervical superior de la rata. Sus observaciones muestran que el 2-3 % del material protéico total sintetizado *in vitro*, estables a lo largo de 9 hrs ($t_{1/2}$ de 9 hrs), es liberado al medio extracelular y no son producto de degradación proteolítica (el patrón electroforético de las proteínas sintetizadas de novo no varía cuando se expone el material en contacto con inhibidores de proteasas) (Sweadner, 1981). Tanto la liberación espontánea como la inducida de este grupo variable de proteínas provienen de terminales axónicas, dendritas o cuerpos neuronales, y parecen ser dependientes del grado y estado de diferenciación neuronal (Patterson, 1978; Sweadner, 1981), lo que modifica el tipo y número de proteínas secretadas (Sweadner, 1981; Heydorn y cols., 1985). Además de estas observaciones experimentales, Sweadner muestra que la modificación postraduccional de proteínas precursoras (P1-210 kDa, P3-185 kDa) origina la expresión e inserción membranar de proteínas de menor peso molecular (B2-215 kDa y B4-185 kDa), ricas en manosa y no en ácido siálico, originando proteínas solubles (S1, S4) cuya liberación es dependiente del Ca^{++} externo, y de la posible presencia de proteasas específicas dependientes de este ion (Rodeman y cols., 1982) cuando el medio se condiciona para incrementar la liberación de neurotransmisores (NA, ACh) (Sweadner, 1983 a y b). Estas proteínas liberadas parecen corresponder o derivarse de una proteína integral de membrana previamente caracterizada, llamada glucoproteína, NILE (McGuire y cols., 1978). Asimismo, diversos grupos de investigación, utilizando rebanadas de tejido cerebral, indican la liberación tónica (no estimulada) de glucoproteínas marcadas con diferentes radioisótopos en explantes del lóbulo intermedio de la hipófisis (Thorton, 1982), la liberación *in vitro* de material protéico al EEC, posterior a la estimulación eléctrica del hipocampo de la rata (Duffy y cols., 1981; Hesse y cols., 1984) o la liberación *in vitro* de material protéico posterior a la despolarización química del tejido hipocampal con alta concentración de K^+ , en presencia de la concentración EC del ión Ca^{++} (Thorton, 1982). Además de estos resultados, los estudios posteriores muestran que los tejidos endocrinos, como las células alfa y beta del páncreas de rata y de los seres humanos, secretoras de glucágon e insulina, expresan en la superficie membrana una inmunoreactividad específica a antígenos peptídicos correspondientes a insulina: el péptido C, el glucágon y las cromograninas, en los sitios donde se produce el fenómeno de fusión y exocitosis de gránulos secretorios (Lars-Inge y cols., 1989).

Además de los estudios de liberación neuronal de macromoléculas, diversos estudios efectuados a partir de preparaciones de cultivo de diferentes líneas

tumorales de glia (v.g., glioma-C6, astrocitoma) y de líneas celulares híbridas (v.g., neuroblastoma) demuestran que la presencia de un extenso grupo de fracciones protéicas liberado al medio extracelular, en su mayoría glucoproteínas, incluyendo el factor de crecimiento neural, NGF (Arenander y De Vellis, 1980, 1981 a y b) poseen la capacidad de promover el crecimiento y diferenciación de las neuronas sensoriales (Truding y cols., 1975; Schubert 1978; Salton y cols., 1983; Yavin y cols., 1986).

5. Cromograninas

El estudio de la liberación de proteínas se originó en la década de los años 60, cuando diversos grupos de investigación reportaron la liberación de componentes protéicos en células cromafines de la médula adrenal, que en forma simultánea con la liberación de catecolaminas, éstas eran almacenadas en los gránulos cromafines y liberados por exocitosis, mediante la aplicación de acetilcolina (Banks y cols., 1965; Kirshner y cols., 1967). Estas proteínas de alto peso molecular se denominaron cromograninas (Blaschko y cols., 1967; Winkler y Fischer-Colbrie, 1992), representadas por un grupo heterogéneo de moléculas de alto peso molecular, en las que la cromogranina A (De Potter y cols., 1969, 1970) y la dopamina beta-hidroxilasa, DBH (Viveros y cols., 1968) parecían conformar el paquete protéico intravesicular de mayor abundancia. Subsecuentemente, diversos estudios confirmaron la coliberación inducida (por estimulación eléctrica del tejido) de catecolaminas en terminales adrenérgicas, conjuntamente con cromograninas y DBH, en forma dependiente de calcio en el medio de incubación (De Potter y cols., 1969). Estas moléculas son almacenadas en vesículas "grandes" (LDCV) conjuntamente con la norepinefrina (NE), y representan el 87 % de las proteínas ácidas solubles intravesiculares conjuntamente con la DBH (representando el 4 % del contenido vesicular) y los fragmentos peptídicos (v.g., encefalinas protéicas, NPY), derivados de sus precursores protéicos específicos (1 % del contenido soluble vesicular) (Fischer-Colbrie y cols., 1989; Geffen y cols., 1974). Las cromograninas no solamente han sido localizadas en diversos tejidos neuroendocrinos (v.g., sistema de neurosecreción interna) (Simon y cols., 1989), en las

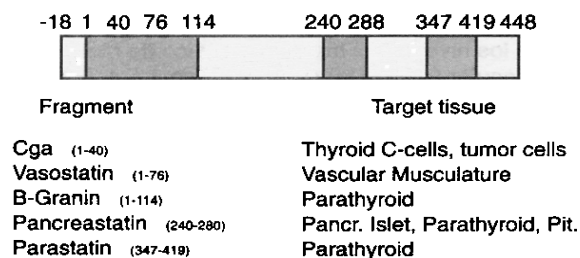


Figura 4. Caracterización molecular de la cromogranina A. Representación esquemática del fragmento polipeptídico de la cromogranina A, y de los péptidos caracterizados que se derivan del procesamiento enzimático intravesicular de esta prohormona en las células neuroendocrinas y en las células neuronales (Kirschmair y cols., 1995).

células neuronales del SNC de mamíferos (Weiler y cols., 1990; Muñoz y cols., 1990; Mahata y cols., 1993; Kirschmair y cols., 1995; Majdoubi y cols., 1996) y en el LCR (O'Connor y cols., 1993; Elder y cols., 1998). Estas moléculas han sido empleadas como marcadores selectivos de diversos neoplasmas malignos de tejidos endocrinos y neuroendocrinos (v.g., cromogranina A, cromogranina B y secretogranina II/cromogranina C), y son asimismo excelentes marcadores intracelulares de gránulos de secreción, por lo tanto, de la ruta de secreción exocítica (Simon y cols., 1989; Fischer-Colbrie y cols., 1995), en donde se ha demostrado que la fusión de proteínas recombinantes, como la cromogranina B (hCgB) y la proteína fluorescente-GFP (hCgB-GFP) en las células transfectadas (S65T, EGFP) son capaces de segregar la cromogranina B en las vesículas endocíticas asociadas con el marcador protéico vesicular (sinaptogamina I). Este contenido vesicular

es liberado bajo la estimulación química de las células con 50 mM de K⁺ (v.g. feocromocitoma, línea celular PC12) en presencia de Ca²⁺, neuroendócrinas y sus derivados tumorales (Kaether y cols., 1997). Las cromograninas representan una familia de precursores protéicos, cuya regulación de su transcripción a nivel molecular ha sido recientemente descrita en los tejidos neuroendocrinos (Canaff y cols., 1998) y en el tejido nervioso (Shen y Gundlach, 1998), de donde se ha aislado, identificado y caracterizado una gran familia de neuropéptidos bioactivos como la secretoneurina (Kirschmair y cols., 1993), el péptido PE-11 (derivados de la cromogranina B) (Kroesen y cols., 1996) y diferentes péptidos bioactivos derivados de la cromogranina A (vasostatina, β-granina, pancreastatina, el péptido GE-25) (Kirschmair y cols., 1995; Cohn y cols., 1995) (figura 4).

- ANN K, KOWALCHYK JA, LOYET KM, MARTIN TF: Novel Ca²⁺-binding protein (CAPS) related to UNC-31 required for Ca²⁺-activated exocytosis. *JBC*, 272(33): 19637-19640, 1997.
- APPLETAUER GSL, KORR IM: Axonal delivery of soluble, insoluble and electrophoretic fractions of neuronal proteins to muscles. *Exp Neurol*, 46:132-146, 1975.
- ARENANDER AT, DE VELLIS J: Glial release proteins in cloned cultures and their modulation by hidrocortisone. *Brain Res*, 200:401-409, 1980.
- ARENANDER AT, DE VELLIS J: Glial release proteins: Two dimensional electrophoretic identification of proteins regulated by hidrocortisone. *Brain Res*, 224:105-116, 1981a.
- ARENANDER AT, DE VELLIS J: Glial release proteins: Influences on neuronal morphological differentiation. *Brain Res*, 224:117-127, 1981b.
- AVERY J, HODELA, WHITAKER M: In vitro exocytosis in sea urchin eggs requires a synaptobrevin-related protein. *J Cell Sc*, 110(Pt 14):1555-1556, 1997.
- BAJJALIEH MS, SCHELLER RH: The biochemistry of neurotransmitter secretion. *JBC*, 270(5):1971-1974, 1995.
- BANKS P, HELLES K: The release of protein from the stimulated adrenal medula. *Biochem J*, 97:40-41, 1965.
- BARAM D, LINIAL M, MEKORI YA, SAGI-EISENBERG R: Ca²⁺ dependen exocytosis in mast cells is stimulated by the Ca²⁺ sensor, synaptogamin 1. *J Immunol*, 161(10):5120-5123, 1998.
- BARKAI A, BUDEK M, BROWN DL, FIEVE RR: Application of an improved cerebroventricular perfusion technique in the rabbit: Effects of pentobarbital or haloperidol on monoamine metabolites and proteins in the perfusates. *Neuropharmacol*, 17:409-414, 1978.
- BARKAI A: Serotonin turnover in the intact rabbit brain: Relation ship to extracellular proteins and modification by pentobarbital or haloperidol. *J Pharmacol Exp Therap*, 208:44-48, 1979.
- BAUERFIEND R, JELINEK R, HELLWIG A, HUTTNER WB: Neurosecretory vesicles can be hybrids of synaptic vesicles and secretory granules. *Proct Natl Acad Sci USA*, 92(16):7342-7346, 1995.
- BAYON A, DRUCKER-COLIN RR: Methodological alternatives and experimental strategies for studying the in vivo perfusion and release of neuroactive substances in the central nervous system. En: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances, Methods and Strategies*. Bayón A, Drucker-Colin R (eds.). 1-7, Academic Press, Orlando, 1985.
- BAYON A, ANTON B, LEFF P, SOLANO S: Release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides, enkephalins, from the striatum of the freely moving rat. *Ann NY Acad Sci*, 473:401-417, 1986.
- BAYON A, SOLANO S, ANTON B, CASTAÑO I, DIAZ-PONTONE: Push-pull perfusion studies on the in vivo release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides-enkephalins from the rat brain. En: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances*. Bayón A, Drucker-Colin R (eds). Academic Press, 69-93, Orlando, 1985.
- BENNETT MR: Neurotransmitter release at individual sympathetic varicosities, boutons. *Adv Pharmacol*, 42:98-101, 1998.
- BENOWITZ DB, SHASHOUA VE: Rapid labeled and secreted proteins of the chick brain. *J Neurochem*, 32:797-809, 1979.
- BILLARD J, KOH DS, BADCOCK DF, HILLE B: Protein Kinase C as a signal for exocytosis. *Proct Natl Acad Sci USA*, 94(22):12192-12197, 1997.
- BLASCHKO H, COMLINE RS, SCHNEIDER FH, SILVER M, SMITH AD: Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splachnic stimulation. *Nature*, 215:48-49, 1967.
- BRAY JJ, HARRISAJ: Dissociation between nervemuscle transmission and nerve trophic effects on rat diaphragm using type D-botulinum-toxin. *J Physiol (Lond)*, 234:53-77, 1975.
- BROWN H, BRANSTROM R, YANG SN, LEIBIGER I, FRIED G, MOEDE T, DEENEY JT, MEISTER B: Cystein string ring (CSR) is an insulin secretory granule-associated protein regulating beta-cell exocytosis. *EMBO J*, 17(17):5048-5058, 1998.
- BURGOYNE RD: Secretory vesicle-associated proteins and their role in exocytosis. *Ann Rev Physiol*, 52:647-659, 1990.
- BURGOYNE RD, MORGAN A: Analysis of regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells insights into NSF/SNAP/SNARE function. *Bioessays*, 20(4):328-335, 1998.
- CANNAFF L, BEVAN S, WHEELER DG, MOULAND AJ, REHFUSS RP, WHITE JH, HENDY GN: Analysis of molecular mechanisms controlling neuroendocrine cell specific transcription of the chromogranin A gene. *Endocrinol*, 139(3):1184-1196, 1998.
- CLEGG RA, GARDNER RA, LAVIALLE F, BOISGARD R, OLLIVIER-BOUSQUET M: Casein secretion in mammary tissue: tonic regulation of basal secretion by protein kinase. *A Mol Cell Endocrinol*, 141(1-2):163-177, 1998.
- COHN DV, FASCIOTTO BH, REESE BK, ZHANG JX: Chromogranin A: A novel regulator of parathyroid gland secretion. *J Nutr*, 125:201S-209S, 1995.

27. DAVLETOV BA, MEUNIER FA, ASHTON AC, MATSU S, HITA H, HIRST WD, LELIANOVA VG, WILKIN GP, DOLLY JO, USHKARIOV YA: Vesicle exocytosis stimulated by alphalatrotoxin is mediated by latrophilin and requires both external and internal Ca^{2+} . *EMBO J*, 17(4):3909-3920, 1998.
28. DE BELLO WM, O'CONNOR V, DREABACH T, WHITE HEART SW, WANG SH, SCHWELTZER F, BETZ H, ROTHMAN JE, AUGUSTINE GJ: SNAP-mediated protein-protein interactions essential for neurotransmitter release. *Nature*, 373:626-630, 1995.
29. DE CAMILLI P, REINHARD J: Pathways to regulated exocytosis in neurons. *Ann Rev Physiol*, 52:625-645, 1990.
30. DE POTTER WP, DE SCHAEPPDRYVER AF, MOERMAN EJ, SMITH AD: Evidence of the release of vesicle-proteins together with adrenaline upon stimulation of the splenic nerve. *J Physiol (Lond)*, 204:102-104, 1969.
31. DE POTTER WP, SMITH AD, DE SCHAEPPDRYVER AF: Subcellular fractionation of the splenic nerve: ATP, chromogranin A and dopamine-beta-hydroxylase in noradrenergic vesicles. *Tissue and Cell*, 2:529-546, 1970.
32. DRUCKER-COLIN RR, SPANIS CW: Neurohumoral correlates of sleep; increase of proteins during rapid eye movement sleep. *Separatum Experimentia*, 31:551-552, 1975.
33. DUFFY C, TEYLER TJ, SHASHOUA VE: Long term potentiation in hippocampal slice: evidence for stimulated secretion of newly synthesized protein. *Science*, 212:1148-1151, 1981.
34. ELDER U, KIRSCHMAIR R, POHL P, JOBST KA, SMITH AD, MALLY J, RIEDERER P, REICHMANN H, WINKLER H: Levels and proteolytic processing of chromogranin A and B and secretogranin II in cerebrospinal fluid in neurological diseases. *J Neural Transm*, 105(1):39-51, 1998.
35. ENGLISH KL, CHERNEVSKAYA NI, NOWICKY MC: Short-term changes in the Ca^{2+} -exocytosis relationship during repetitive pulse protocols in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurosci*, 17(23):9010-9025, 1997.
36. FISCHER-COLBRIE R, HAGAN C, SCHOBER M: Chromogranins A, B, and C: Widespread constituents of secretory vesicles. *Ann NY Acad Sci*, 493:120-134, 1987.
37. FISCHER-COLBRIE R, LASLOP A, KIRSCHMAIR R: Secretogranin II: Molecular properties, regulation of biosynthesis and processing to the neuropeptide secretoneurin. *Prog in Neurobiol*, 46:49-70, 1995.
38. FRIEDEL T, ORCHARD I, LOUGHTON BG: Release of neurosecretory protein from insect neurohemal tissue following electrical stimulation. *Brain Res*, 208:451-455, 1981.
39. GASMAN S, CHASSEROT-GOLAZ S, POPOFF MR, AUNIS D, BADER MF: Trimeric G proteins control exocytosis in chromaffin cells. Go regulates the peripheral actin network and catecholamine secretion by a mechanism involving the small GTP-binding protein Rho. *JBC*, 272(33):20564-20571, 1997.
40. GEFFEN L, LIVETT BG, RUSH L: Immunohistochemical localization of chromogranins in sheep sympathetic neurons and their release by nerve impulses. En: *New Aspects of Storage and Release Mechanisms of Catecholamines*. Kronenberg HG, Schuman HJ (eds.). Springer Verlag, 58-72, Nueva York, 1970.
41. GOODALL AR, DANKS K, WALKER JH, BALL SG, VAUGHAN PF: Occurrence of two types of secretory vesicles in the human neuroblastoma SH-SY5Y. *J Neurochem*, 68(4):1542-1552, 1997.
42. GOU Z, TURNER C, CASTLE D: Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. *Cell*, 94(4):537-548, 1998.
43. GREENFIELD SA: A noncholinergic function of acetylcholinesterase in the brain: From neuronal secretion to generation of movement. *Cel Mol Neurobiol*, 11(1):55-77, 1991.
44. GREENFIELD SA, CHUBB IW, GRUNEWALD RA, HENDERSON Z, MAY J, PORTNEY S, WESTON J, WRIGHT RC: A noncholinergic function of acetylcholinesterase in the substantia nigra: behavioral evidence. *Exp Br Res*, 54(39):83-88, 1984.
45. HESSE GW, HOFSTEINER R, SHASHOUA VE: Protein release from hippocampus in vitro. *Brain Res*, 305:61-66, 1984.
46. HEYDORN WE, NGUYEN KQ, CREED G, JACOBOWITZ DM: Effect of reduction cholinergic input on the concentration of specific proteins in different cortical regions of the rat brain. *Brain Res*, 320:209-218, 1985.
47. HINES JF, GARWOOD MM: Release of protein from axon during rapid axonal transport: An in vitro preparation. *Brain Res*, 125:141-148, 1977.
48. HOHNE-ZELL B, GALLER A, SCHEPP W, GRATZL M, PRINZ C: Functional importance of synaptobrevin and SNAP-25 during exocytosis of histamine by rat gastric enterochromaffinlike-cells. *Endocrinol*, 138(12):5518-5526, 1997.
49. HUANG X, WHEELER MB, KANG YH, SHEU L, LUCKAKS GL, TRIMBLE WS, GAISANO HY: Truncated SNAP-25 (1197) like botulinum neurotoxin A, can inhibit insulin secretion from HIT-T15 insulinoma cells. *Mol Endocrinol*, 12(7):1060-1070, 1998.
50. JENA BP, GUMKOWSKI FD, KONIECZKO EM, FISCHER VON MOLLARD G, REINHARD J, JAMIESON JD: Redistribution of a Rab 3 like-GTP-binding protein from secretory granules to the Golgi complex in pancreatic acinar cells during regulated exocytosis. *JBC*, 124(1-2):43-53, 1994.
51. KACZMAREK LK, ADEY WR: Extracellular release of cerebral macromolecules during potassium and low calcium induced seizures. *Epilepsia*, 16:41-47, 1975.
52. KAETHER C, SALM T, GLOMBIK M, ALMERS W, GERDES HH: Targeting of green fluorescent protein to neuroendocrine secretory granules: a new tool for real time studies of regulated protein secretion. *JBC*, 230:1525-1532, 1998.
53. KIRSCHMAIR R, HOGUE-ANGELETTI R, GUTIERREZ J, FISCHERCOLBRIE R, WINKLER H: Secretoneurin- a neuropeptide generated in brain, adrenal medulla and other neuroendocrine tissue by proteolytic processing of secretogranin II (chromogranin C). *Neuroscience*, 53:359-365, 1993.
54. KIRSCHMAIR R, LETTNER B, FISCHER-COLBRIE R, MARKSTEINER J, HOGUE-ANGUELETTI R, WINKLER H: Large variations in the proteolytic formation of chromogranin A derived peptide (GE-25) in neuroendocrine tissues. *Biochem J*, 310:331-336, 1995.
55. KISCHNER N, SAGE JJ, SMITH WJ: Mechanism of secretion from the adrenal medulla: Release of catecholamines and storage vesicle secretion of protein in response to chemical stimulation. *Mol Pharmacol*, 3:254-265, 1967.
56. KROESEN S, MARKSTEINER J, LEITNER B, HOGUE-ANGUELETTI R, FISCHER-COLBRIE R, WINKLER H: Rat brain: distribution of immunoreactivity of PE-11, a peptide derived from chromogranin B. *Eur J Neurosci*, 8(12):2679-2689, 1996.
57. LANG J, FUKUDA M, ZHANG H, MIKOSHIBA K, WOLLHEIM CB: The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic beta cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium. *EMBO J*, 16(7):5837-5846, 1997.
58. LARS-INGE L, NIELSEN JH, HUTTON JC, MADSEN OD: Pancreatic hormones are expressed on the surface of human and rat islet cells through exocytic sites. *Eur J Cell Biol*, 48:45-51, 1989.
59. LASEK RJ: Protein transport in neurons. *Int Rev Neurobiol*, 13:289-324, 1970.
60. LEVITT BG: Chromaffin cells: roles for vesicle proteins and Ca^{2+} in hormone secretion and exocytosis. *Trends in Pharmacol*, 14:346-348, 1993.
61. LINIAL M, ILOUZ N, PARNAZ H: Voltage-dependent interaction between the muscarinic ACh receptor and proteins of the exocytotic machinery. *J Physiol (Lond)*, 504(Pt 2):251-258, 1997.
62. MADJOUBI ME, METZ-BOUTIGUE MH, GARCIA-SABLONE P, THEODOSIS DT, AUNIS D: Immunocytochemical localization of chromogranin A in the normal and stimulated hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. *J Neurocytol*, 25(7):405-416, 1996.

63. MAHATA M, MAHATA S, FISCHER-COLBRIE R, WINKLER H: Ontogenic development and distribution of mRNAs of chromogranin A and B, secretogranin II p65 and synaptin/synaptophysin in rat brain. *Develop. Brain Res*, 76:43-58, 1993.
64. MATTHEWS G: Neurotransmitter release. *Ann Rev Neurosci*, 19:219-233, 1996.
65. MCFERRAN BW, GRAHAM ME, BURGOYNE RD: Neuronal Ca²⁺ sensor 1, the mammalian homologue of frequenin, is expressed in chromaffin and PC12 cells and regulates neurosecretion from dense-core granules. *JBC*, 273(353):22768-22772, 1998.
66. MCGUIRE JC, GREEN LA, FURANO AV: NGF stimulates incorporation of fucose or glucosamine into external glycoprotein in cultured rat PC12 pheochromocytoma cells. *Cell*, 15:357-365, 1978.
67. MIZUTA M, KUROSE T, MIKI T, SHOJI-KSAI Y, TAKAHASHI M, SEINO S, MATSUKURA S: Localization and functional role of synaptogamin III in insulin secretory vesicles in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 46(12):2002-2006, 1997.
68. MUÑOZ DG, KOBYLINSKI L, HENRI DD, GEORGE DH: Chromogranin A-like immunoreactivity in the human brain: distribution in bulbar and cerebral cortex. *Neuroscience*, 34(3):533-543, 1990.
69. MUSICK JR: Correlated release of acetylcholine and proteins from the neuromuscular junction. *Am J Physiol*, 236:C255-C262, 1979.
70. MUSICK JR, HUBBARD JI: Release of protein from mouse motor nerve terminals. *Nature*, 237:279-281, 1972.
71. NAOR Z, DAN-COHEN H, HERMON J, LIMOR R: Induction of exocytosis in permeabilized pituitary by α - and β -type protein Kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:4501-4504, 1989.
72. NEIMOZ-GAILLARD E, BOSSHARD A, REGAZZI R, CUBER CJ, TAKAHASHI M, CATAICAS S, ABELLO J: Expression of SNARE proteins in enteroendocrine cell lines and functional role of tetanus toxin-sensitive proteins inolecystokinin release. *FEBS Lett*, 425(1):66-70, 1998.
73. O'CONNOR DT, CERVENKA JH, STONE RA, PARMER RJ, FRANCO-BOURLAND RE, MADRAZO I, LANGLAIS PG: Chromogranin A immunoreactivity in human cerebrospinal fluid: properties, relationship to noradrenergic neuronal activity, and variation in neurologic disease. *Neuroscience*, 56(4):999-1007, 1993.
74. O'CONNOR V, AUGUSTINE GJ, BETZ H: Synaptic vesicle exocytosis: Molecules and models. *Cell*, 76:785-787, 1994.
75. OLIVE MF, MAIDMENT NT: Opioid regulation of pallidal enkephalin release: bimodal effects of locally administered mu and delta opioid agonists in freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 285(3):1310-1316, 1998.
76. PATTERSON PH: Environmental determination of autonomic neurotransmitter functions. *Ann Rev Neurosci*, 1:1-17, 1978.
77. RODEMAN HP, WAXMAN L, GOLDBERG AL: The stimulation of protein degradation in muscle by Ca⁺⁺ is mediated by Prostaglandin E2 and does require the Ca⁺⁺ activated release. *JBC*, 257:8716-8723, 1982.
78. SADOUL K, BERGER A, NIEMANN H, REGAZZI R, CATSICAS S, HALBAN PA: SNAP-25 can self-associate to form a disulfide-linked complex. *Biol Chem*, 378(10):1171-1176, 1997a.
79. SADOUL K, BERGER A, NIEMANN H, WELLWE U, ROCHE PA, TRIMBLE WS, REGAZZI R, CATSICAS S, HALBAN PA: SNAP-23 is not cleaved by botulinum neurotoxin E and replace SNAP-25 in the process of insulin secretion can self-associate to form a disulfide-linked complex. *J Biol Chem*, 272(52):33023-33027, 1997b.
80. SALTON SR, MARGOLIS RG, MARGOLIS RK: Release of chromaffin granule by glycoproteins and proteoglycans from potassium-stimulated PC12 pheochromocytome cells. *J Neurochem*, 41:1165-1170, 1983.
81. SCOTT CE, ABDULLAH LH, DAVIA CV: Ca²⁺ and protein kinase C activation of mucin granule exocytosis impermeabilized SPOC1 cells. *Am J Physiol*, 275(1 Pt-1):C285-C292, 1998.
82. SCHUBERT D: NGF induced alterations in protein secretion and substrate attached material of a clone nerve cell line. *Brain Res*, 155:196-201, 1978.
83. SHASHOUA VE: The role of brain extracellular protein in neuroplasticity and learning. *Cell Molec Neurobiol*, 5(1-2):183-207, 1985.
84. SHEFLER I, TAUBE Z, MEDALIA O, SAGI-EISENBERG R: Basic secretagogues activate protein tyrosine phosphorylation and release of arachidonic acid in mast cells via a novel protein Kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Eur J Immunol*, 28(11):3468-3478, 1998.
85. SHEN PJ, GUNDLACH AL: Differential increases in chromogranins, but not synapsin I, in cortical neurons following spreading depression: implications for functional roles and transmitter peptide release. *Eur J Neurosci*, 10(7):2217-2230, 1998.
86. SIMON JP, BADER MF, AUNIS D: Effect of secretagogues on chromogranin A synthesis in bovine cultured chromaffin cells. *Biochem J*, 260:915-922, 1989.
87. SWEADNER KJ: Environmentally regulated expression of soluble extracellular proteins of sympathetic neurons. *JBC*, 258:4063-4070, 1981.
88. SWEADNER KJ: Post-translational modifications and evoked release of two large surface proteins of sympathetic neurons. *J Neurosci*, 3:2504-2517, 1983a.
89. SWEADNER KJ: Size, shape, and solubility of a class of releasable cell surface proteins from sympathetic neurons. *J Neurosci*, 3: 2518-2524, 1983b.
90. TASAKA K, MASUMOTO N, MIZUKI J, IKEBUCHI Y, OHMACHI M, KURACHI H, MIYAKE A, MURATA Y: Rab 3B is essential for GnRH-induced gonadotrophin release from anterior pituitary cells. *J Endocrinol*, 157(2):267-274, 1998.
91. TEDESCHI B, WILSON DL, ZIMMERMANA, PERRY GW: An axonally transported proteins released from sciatic nerve. *Brain Res*, 211:175-178, 1981.
92. THOMAS DM, ELFERINK LA: Functional analysis of the C2A domain of synaptogamin I: implications for calcium-regulates secretion. *J Neurosci*, 18(10):3511-3520, 1998.
93. THORTON VF: Stimulation of calcium-dependent release of labelled protein from pulse-labelled mouse pituitary intermediate lobe tissue. *J Physiol*, 329:425-437, 1982.
94. TRUDING R, SHELANSKI ML, MORELL P: Glycoproteins released into cultured medium of differentiating murine neuroblastoma cell. *JBC*, 250:9348-9354, 1975.
95. VALENTJIN KM, GUMKOWSKI FD, JAMIESON JD: The subapical actin cytoskeleton regulates secretion and retrieval in pancreatic acinar cells. *J Cell Sci*, 1112(Pt-1):81-96, 1998.
96. VIVEROS OH, ARQUEROS L, KIRSHNER N: Release of catecholamines and Dopamine- β -Hydroxylase from the adrenal medulla. *Life Sci*, 7:609-618, 1968.
97. VOLKANDT W: The synaptic vesicle and its targets. *Neuroscience*, 64(2):227-300, 1995.
98. WALMSLEY B, ALVAREZ FJ, FYFFE REW: Diversity of structures and function at the mammalian central synapses. *Trends in Neurosci*, 21(2):81-88, 1998.
99. WINKLER H, FISCHER-COLBRIE R: The Chromogranins A and B: The first 25 years and future perspectives. *Neuroscience*, 49:497-528, 1992.
100. YAVIN E, HANA T, GIL S, GUROFF G: Nerve Growth Factor and gangliosides stimulated the release of glycoproteins from PC12 pheochromocytoma cells. *J Neurochem*, 46:794-803, 1986.
101. YOUNKIN SG, BRETT RS, DAVEY B, YOUNJIN LH: Substances moved by axonal transport and release by nerve stimulation have a innervation-like effect on muscle. *Science*, 200:1292-1295, 1978.
102. ZHANG H, YASREBI-NEJAD H, LANG J: The G-protein betagamma-binding domains regulate insulin exocytosis in clonal pancreatic beta cells. *FEBS Lett*, 424(3):202-206, 1998.