



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta.

Carolina Blanca Paz González Silva

“ESTUDIO DE LA FAMILIA DE CANALES DE CLORURO ACTIVADOS POR CALCIO CICa EN NEURONAS OLFATORIAS DE RATAS”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Juan Bacigalupo Vicuña
Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Christian Gonzalez-Billaud
Presidente Comisión

Dr. Alejandro Roth Metcalse
Evaluador



Santiago de Chile, _____

Biografía

Nací en la ciudad de Copiapó ubicada en el desierto más árido del mundo. Desde pequeña mis padres potenciaron mi lado artístico e intelectual. Fue así como por 5 años estudié en la Escuela de Música de Copiapó, donde aprendí y desarrollé el arte de la música clásica, mi principal pasión en ese momento fue tocar Corno Francés. Luego en la enseñanza media seguí desarrollando mi lado artístico aprendiendo los bailes típicos de la zona en mi querido grupo de baile folklórico de la Escuela Técnico Profesional de Copiapó ETP. Terminada la enseñanza media, y con el incentivo de mis padres, viajé a Santiago en busca de una educación superior de calidad, capaz de potenciar mi intelecto y creatividad. Como no tenía claro lo que habría de estudiar ingresé al programa de Bachillerato de la Universidad de Chile con mención en ciencias exactas. Al ingresar a este programa se abrió ante mí un mundo de posibilidades encontrando al fin la carrera que llenaría todos mis requerimientos “Ingeniería en Biotecnología Molecular”. Fue aquí donde supe que mi verdadera vocación estaba en desarrollar y hacer ciencia en mi país.





Dedicatoria:

A mis padres, quienes incondicionalmente me apoyaron, creyeron y confiaron en mí. Gracias por su infinito amor.

Agradecimientos:

Esta es la ocasión oportuna en que me puedo manifestar para agradecer infinitamente a quienes me han apoyado tanto en mi proceso de crecimiento personal como en mi formación profesional; apoyo incondicional de quienes han compartido conmigo por momentos de arduo estudio, dedicación y esfuerzo; momentos de preocupación y éxitos.

Es reconfortante mirar hacia atrás y ver los tantos caminos recorridos para llegar por fin a este momento en que culmina una nueva etapa en mi formación, caminos en los cuales nunca estuve sola, siempre hubo alguien prestándome atención, observándome, guiándome y aconsejándome cuando fue necesario. Siempre me sentí acompañada por ese gran amigo que nunca falla, el “Resucitado” como le llamamos las personas de fe.

Eternamente agradecida de mis padres, quienes han dado todo por mi formación y bienestar; a mis profesoras y profesores que con su sabiduría y entendimiento han sabido guiarme como buenos educadores. Agradezco especialmente al laboratorio de Fisiología Celular en el cual desarrolle mi seminario de título, a mi tutor Dr. Juan Bacigalupo y a todos los miembros del laboratorio: profesores, estudiantes y técnicos, con quienes construimos un

ambiente muy agradable de confianza y apoyo para el desarrollo de nuestro trabajo.

A mis amigas y amigos como no agradecerles, siempre ahí presentes en momentos de angustias y alegrías, apoyándonos unos a otros, cada uno desde su realidad. No dejo de mencionar a aquellos que me ayudaron en la elaboración de mi tesis, especialmente a los miembros de los laboratorios de los profesores Miguel Allende, Verónica Palma y Christian González, sin su ayuda y paciencia mi seminario no se hubiese llevado a cabo exitosamente.

Siento una enorme satisfacción al haber cumplido mi meta y de no haber traicionado la confianza de los que de alguna manera manifestaron su apoyo y creyeron en mi.

Por último agradezco a los proyectos que hicieron posible la ejecución de mi seminario de título:

- Beca Tesista Proyecto Mideplan ICM P05-001-F.
- Proyecto anillo de Ciencia y Tecnología ACT 45, Programa Bicentenario, Conicyt.



2.1.5 índice de contenido.

	Pág.
1 Resumen	10
2 Abstract	11
3 Introducción	12
4 Objetivos	18
4.1 Objetivo General.....	18
4.2 Objetivos Específicos.....	18
4.3 Hipótesis.....	18
5 Materiales y Métodos	19
5.1 Muestreo de ClCa.....	19
5.2 Búsqueda de partidores específicos para ClCa.....	19
5.3 Extracción de RNA.....	26
5.4 Retrotranscripción.....	26
5.5 Reacción de PCR anidado.....	29
5.6 Extracción de DNA a partir de geles.....	33
5.7 Secuenciación de DNA purificado a partir de gel de agarosa.....	34
5.8 Análisis del amplicón secuenciado.....	34
6. Resultados	35
6.1 PCR anidado.....	35

	Pág.
6.1.1 PanClCa se expresa en EO de rata.....	35
6.1.2 Expresión de PanClCa en tejidos de rata	37
6.1.3 Expresión de PanClCa y mBest2 en EO de rata y ratón	39
6.2 Secuenciación y análisis del amplicón ClCa.....	41
7. Discusión.....	44
8. Conclusión.....	50
9. Referencia.....	51





2.1.6 Índice de tablas

	Página
Tabla 1 Información de partidores específicos para los canales PanClCa.....	23
Tabla 2 Información de partidores utilizados para amplificar cDNA de CNGA2 mediante RT-PCR anidado.....	24
Tabla 3 Información de partidores utilizados para amplificar cDNA de mBest2 mediante RT-PCR anidado	25
Tabla 4 Protocolo de retrotranscripción.....	27
Tabla 5 Absorbancias de cDNA a 260 y 280 nm.....	28
Tabla 6 Concentraciones de cDNA de los tejidos en estudio.....	30
Tabla 7 Protocolo primera ronda de PCR.....	31
Tabla 8 Protocolo segunda ronda de PCR.....	32
Tabla 9 Condiciones de PCR para la amplificación de ClCa, CNGA2 y mBest2.....	33



2.1.7 Índice de figuras

	Página
Fig. 1 Neuroepitelio Olfatorio.....	13
Fig. 2 Cascada de transducción olfatoria.....	14
Fig. 3 Registro de voltage-clamp en NSO aislada de salamandra.....	15
Fig. 4 Cladograma de canales de Cl ⁻ activados por Ca ²⁺ en rata.....	17
Fig. 5 Alineamientos múltiples entre los canales PanClCa.....	20
Fig. 6 Diseño de partidores específicos para PanClCa.....	22
Fig. 7 Diseño de partidores específicos para CNGA2.....	24
Fig. 8 Diseño de partidores específicos para mBest2.....	25
Fig. 9 PanClCa se expresa EO de rata.....	36
Fig. 10 Expresión de canales PanClCa en sistema nervioso y en órganos periféricos de rata.....	38
Fig. 11 Expresión de PanClCa y mBest2 en EO de rata y ratón.....	40
Fig. 12 Secuenciación y alineamientos nucleotídicos entre el amplicón ClCa obtenido y las secuencias PanClCa.....	42
Fig. 13 Alineamientos aminoacídicos entre el amplicón ClCa obtenido y las secuencias PanClCa.....	43
Fig. 14 Cladograma de canales de Cl ⁻ activados por Ca ²⁺ expresados en rata y ratón.....	49

2.1.8 Lista de abreviaturas.

Bestrofina: Familia de canales de Cl^- activados por Ca^{2+} .

cAMP: AMP cíclico.

cDNA: DNA complementario.

ClCa: Familia de canales de Cl^- activados por Ca^{2+} .

CNG: Canal gatillado por nucleótidos cíclicos.

EO: Epitelio Olfatorio.

G_{olf}: Proteína G específica de epitelio olfatorio.

Kb: Kilo bases.

mBest2: Canal bestrofina 2 expresado en ratón.

mClCa4: ClCa4 expresado en ratón

mRNA: RNA mensajero.

NSO: Neurona Sensorial Olfatoria.

Pb: Pares de bases.

rbClCa1: Canal de Cl^- activado por Ca^{2+} 1 perteneciente a la familia ClCa expresado en cerebro de rata.

rbClCa2: Canal de Cl^- activado por Ca^{2+} 2 perteneciente a la familia ClCa expresado en cerebro de rata.

rClCa1: Canal de Cl^- activado por Ca^{2+} 1 perteneciente a la familia ClCa expresado en rata.

1. RESUMEN

Los canales de Cl^- activados por Ca^{2+} son un importante componente de la transducción olfatoria en vertebrados (Lowe and Gold, 1993). El odorante se une a un receptor ubicado en los cilios de las neuronas sensoriales olfatorias (NSOs), que forman parte del epitelio olfatorio (EO). Esta unión conlleva al incremento de iones Ca^{2+} en el espacio intraciliar, los cuales ingresan a través de canales gatillados por nucleótidos cíclicos (CNG). Los iones Ca^{2+} activan canales de Cl^- a través de los cuales sale este ión, contribuyendo a la amplificación de la despolarización en las NSOs (Kleene and Gesteland, 1991). Sin embargo, la identidad molecular de este canal de Cl^- activado por Ca^{2+} aún no ha sido elucidada. Con miras a la identificación molecular de este canal, en el presente trabajo analizamos la expresión, en epitelio olfatorio de rata, de 3 tipos de canales de Cl^- activados por Ca^{2+} , los que llamamos en su conjunto PanClCa (rClCa1, rbClCa1 y rbClCa2), todos pertenecientes a la familia ClCa. Utilizando la técnica de RT-PCR anidado y a través de un análisis de secuenciación, encontramos que el canal que se expresa en epitelio olfatorio de rata corresponde a rbClCa2. Por otro lado, encontramos que el canal Cl^- activado por Ca^{2+} perteneciente a la familia de las bestrofinas, mBest2, expresado en EO y en NSO de ratón (Pifferi et al., 2006), no se expresa en EO de rata y que el canal rbClCa2 expresado en EO de rata no se expresa en EO de ratón. Estos resultados nos sugieren que la expresión de canales de Cl^- activados por Ca^{2+} en EO de rata y ratón es especie específica.

2. ABSTRACT

The Ca^{2+} -activated Cl^- channel is an important component of olfactory transduction (Lowe and Gold, 1993). Odor binding to olfactory receptor in the cilia of OSNs leads to an increase of intraciliary Ca^{2+} concentration by CNG channels. Ca^{2+} -activated Cl^- channel allow the efflux of Cl^- ion from the cilia, contributing to the OSNs depolarization (Kleene and Gesteland, 1991; Reisert et al., 2003). However, the molecular identity of this channel has not been established. Here we analyzed the expression, in rat olfactory epithelium, of 3 Cl^- channels belonging to the “ClCa” family: rClCa1, rbClCa1 y rbClCa2 (PanClCa). Using Nested RT-PCR and sequencing techniques, we found that the Ca^{2+} -activated Cl^- channel expressed in OE of rat corresponds to rbClCa2. In contrast and surprisingly, the Ca^{2+} -activated Cl^- channel “Bestrophin-2”, proposed to be present in mouse OSNs (Pifferi et al., 2006), is absent in rat; and PanClCa present in OE of rat is absent in mouse, as indicated by nested RT-PCR rat olfactory epithelium. This result indicates that the expression of Ca^{2+} activated Cl^- channels is species-specific in rat and mouse OE.

3. INTRODUCCION

Las neuronas sensoriales olfatorias (NSOs) en vertebrados responden a estímulos odoríferos a través de la generación de una corriente de entrada (Trotier, 1986; Firestein and Werblin, 1989; Kurahashi, 1989) que se genera en los cilios de estas neuronas (NSOs) (Lowe and Gold, 1991), las que junto con otras células conforman el neuroepitelio olfatorio (EO) localizado en la cavidad nasal. Las NSOs son las responsables de la detección de moléculas de odorantes presentes en el ambiente, en respuesta a las cuales generan la señal eléctrica que se transmite al cerebro. Estas neuronas bipolares dirigen su única dendrita hacia la superficie externa del EO, terminando en un botón dendrítico del cual se proyectan 5 a 20 cilios inmersos en una delgada capa de moco (Morrison and Costanzo, 1990). Los axones de las NSOs alcanzan el bulbo olfatorio, donde interactúan con células postsinápticas (células mitrales), encargadas de transmitir la señal a la corteza olfatoria (Fig. 1).

La mayoría de las NSOs en el EO presentan la misma cascada de transducción (Ronnelt and Moon, 2002): los odorantes activan a los receptores, ubicados en los cilios de las NSOs, los que a su vez pueden activar un número indeterminado de proteínas G_{olf} (Jones and Reed, 1989). Cada una de estas proteínas G activan a una molécula de adenilato ciclasa tipo III, capaz de producir miles de moléculas de cAMP por segundo (Bakalyar and Reed, 1990). El cAMP (Jaworsky et al., 1995) se enlaza a la cara intraciliar del canal iónico activado por nucleótidos cíclicos CNG, permitiendo el paso de cationes

como Na^+ y Ca^{2+} , que producen la despolarización de la membrana (Nakamura and Gold, 1987).

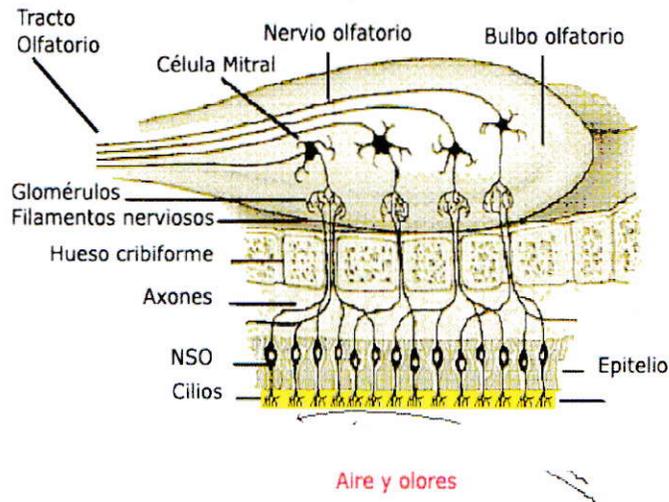


Fig. 1: Neuroepitelio Olfatorio. Distribución y organización de las neuronas sensoriales olfatorias en epitelio olfatorio y su posterior conexión en el bulbo olfatorio con células de segundo orden encargadas de llevar la señal hacia la corteza olfatoria (Leffingwell, 2001).

Unida a esta ruta, existe un mecanismo de amplificación adicional en las NSO: Los iones Ca^{2+} (Matthews and Reisert, 2003) pueden activar otro canal iónico permeable a iones Cl^- (Kleene and Gesteland, 1991; Reisert et al., 2003). Estos iones comúnmente median respuestas inhibitorias, ya que en la mayoría de las células se encuentran más concentrados en el espacio extra que en el intracelular. Pero en las NSOs ocurre lo contrario, ya que estas células presentan una concentración intraciliar de iones Cl^- mayor a la del medio

externo. La salida de estos iones despolariza aún más a las NSOs, aumentando considerablemente la magnitud de la respuesta excitatoria (Fig. 2).

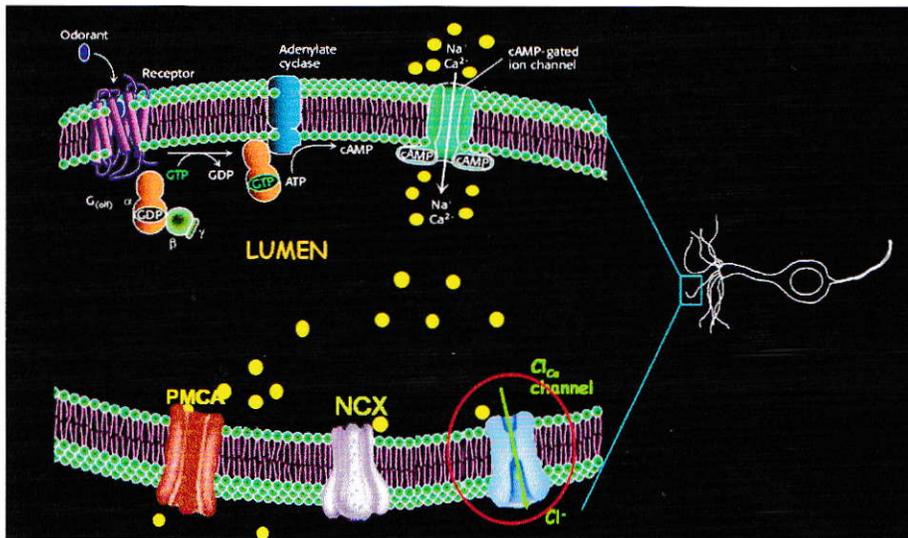


Fig. 2: Cascada de transducción olfatoria. En este esquema se puede observar la participación del canal de Cl^- activado por Ca^{2+} (ClCa Channel) en la cascada de transducción olfatoria la cual se desarrolla en los cilios de las neuronas olfatorias ubicados en la cavidad nasal.

La conductancia de Cl^- hace una importante contribución a la respuesta producida por los odorantes, tal como se puede observar en el registro de la figura 3 donde se utilizó la técnica de Voltage-Clamp en una NSO de salamandra estimulada con una mezcla de odorantes (Kurahashi and Yau, 1993). La respuesta "Control" corresponde a la corriente total registrada desde la célula (corriente producida por la entrada de iones Ca^{2+} y Na^+ a través del canal CNG y corriente producida por la salida de iones Cl^- a través de los canales de Cl^- activados por Ca^{2+}), por otro lado, la corriente en presencia del

bloqueador de canales de Cl^- "SITS" corresponde a la corriente que no es bloqueada por esta droga, es decir, a la corriente catiónica. Por lo tanto, la fracción de corriente eliminada por SITS corresponde a aquella portada por canales de Cl^- activados por Ca^{2+} .

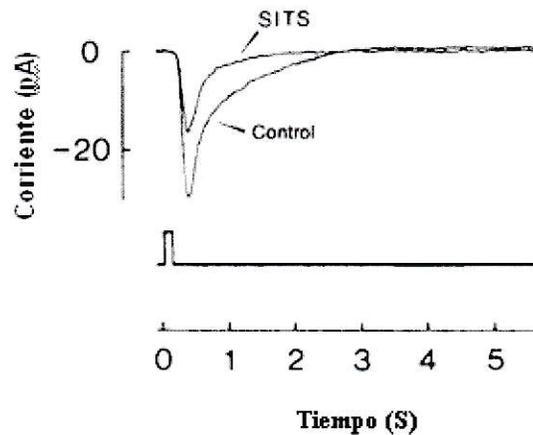


Fig. 3: Registro de voltage-clamp en NSO aislada de salamandra: La estimulación con una mezcla de odorantes produce una corriente de entrada (control), pero aproximadamente la mitad de ésta es bloqueada por el bloqueador de canales de Cl^- SITS (Kurahashi and Yau, 1993).

Hasta el momento se han descrito tres familias de canales de Cl^- activados por Ca^{2+} , familia ClCa (Eggermont, 2004; Jentsch et al., 2002), Bestrofina (Sun et al., 2002) y el recientemente encontrado TMEM16A (Caputo et al., 2008; Schroeder et al., 2008), miembro de la familia de proteínas transmembrana TMEM16. Estas familias se diferencian por su sensibilidad a Ca^{2+} y a voltaje.

Recientemente se propuso que el canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ perteneciente a la familia de las bestrofinasas “mBest2”, que está presente en NSOs de ratón (Pifferi et al., 2006), correspondería al canal involucrado en la transducción olfatoria. Por otro lado, los canales de Cl⁻ activado por Ca²⁺ pertenecientes a la familia ClCa, rbClCa1 (Jeong et al., 2005) y su isoforma rbClCa2 (Yoon et al., 2006), se expresan en sistema nervioso central y en órganos periféricos de rata, y presentan un 85,2% de identidad entre sí. Análisis utilizando la técnica de RT-PCR demuestran que en rata ambos canales se expresan tanto en cerebro como en cerebelo, así como en estómago, riñón e intestino delgado, pero están ausentes en corazón, hígado, bazo e intestino grueso. Un tercer canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ denominado rClCa1, también perteneciente a la familia ClCa, (Yamazaki et al., 2005), presenta un gran porcentaje de identidad (85-90%) con los canales rbClCa1 y rbClCa2. Su expresión se ha demostrado en células ductales, glándulas salivales, y en órganos periféricos como íleon, estómago, pulmón, hígado y bazo, mientras que está ausente en ventrículo derecho y en aorta de rata.

La corriente de Cl⁻ a través de canales mBest2, rbClCa1 y rbClCa2 presenta inhibición por ácido niflúmico (bloqueador genérico de canales de Cl⁻) en células HEK 293 transfectadas con los cDNA codificantes para cada uno de estos canales.

A pesar de la importancia de los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ en la transducción olfatoria, y de los innumerables esfuerzos para avanzar en este

problema, no se ha establecido la identidad molecular de estos canales en NSO de ratas.

Los canales PanClCa (rClCa1, rbClCa1 y rbClCa2) se escogieron como candidatos de canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ que podrían expresarse en EO de rata por dos razones: el alto porcentaje de identidad presente entre ellos (Fig. 4) y la expresión de rbClCa1 y rbClCa2 en sistema nervioso de rata.

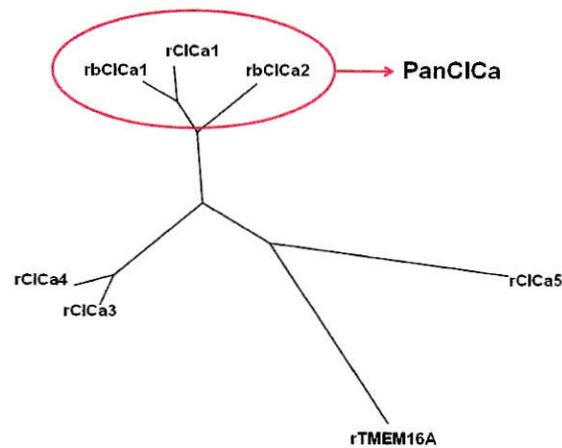


Fig. 4: Cladograma de canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ en rata: en el cladograma se pueden observar todos los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ expresados en rata agrupados en función de su identidad. Nótese que los canales en estudio PanClCa presentan una gran identidad entre ellos. Este cladograma se diseñó realizando alineamientos múltiples con las secuencias nucleotídicas de los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺, para ello se utilizó el programa Genious Basic 3.7.1 (Drummond et al., 2009).

4. OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

La corriente de Cl^- activada por Ca^{2+} detectada en NSOs de rata es generada por canales pertenecientes al grupo PanClCa.

4.2 Objetivo General

Determinar la presencia de PanClCa (rClCa1, rbClCa1 y rbClCa2) y Bestrofina-2 en Epitelio Olfatorio de rata.

4.3 Objetivos Específicos

- Muestreo bioinformático de canales de Cl^- activados por Ca^{2+} expresados en sistema nervioso de rata.
- Diseño de partidores dirigidos contra PanClCa (rClCa1, rbClCa1 y rbClCa2).
- Comprobar la expresión de PanClCa en EO de rata utilizando la técnica de RT-PCR anidado.
- Purificar, secuenciar y analizar el amplicón para distinguir cuál o cuáles de los 3 canales PanClCa se expresan en epitelio olfatorio de rata.
- Determinar si hay expresión del canal de Cl^- activado por Ca^{2+} mBest2 en EO de rata.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestreo de canales ClCa en rata:

La búsqueda de las secuencias completas de mRNA y de las secuencias aminoacídicas de los canales PanClCa publicadas: rClCa1 (N° identificación: AB119249), rbClCa1 (N° identificación: AB212889) y rbClCa2 (N° identificación: AB256513), se realizó utilizando la página web “NCBI” (National Center for Biotechnology Information). Para la búsqueda de las secuencias de mRNA utilizamos la herramienta “Nucleotide Home” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), mientras que para la búsqueda de las respectivas secuencias aminoacídicas usamos la herramienta “Protein Home” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

5.2 Búsqueda de partidores específicos para ClCa.

Considerando que los canales en estudio (rClCa1, rbClCa1 y rbClCa2) presentan un porcentaje de identidad de un 89.9% según el alineamiento múltiple de sus secuencias nucleotídicas (Fig. 5), diseñamos 2 pares de partidores capaces de amplificar, utilizando la técnica de RT-PCR anidado, los cDNA de cualesquiera de estos tres canales.

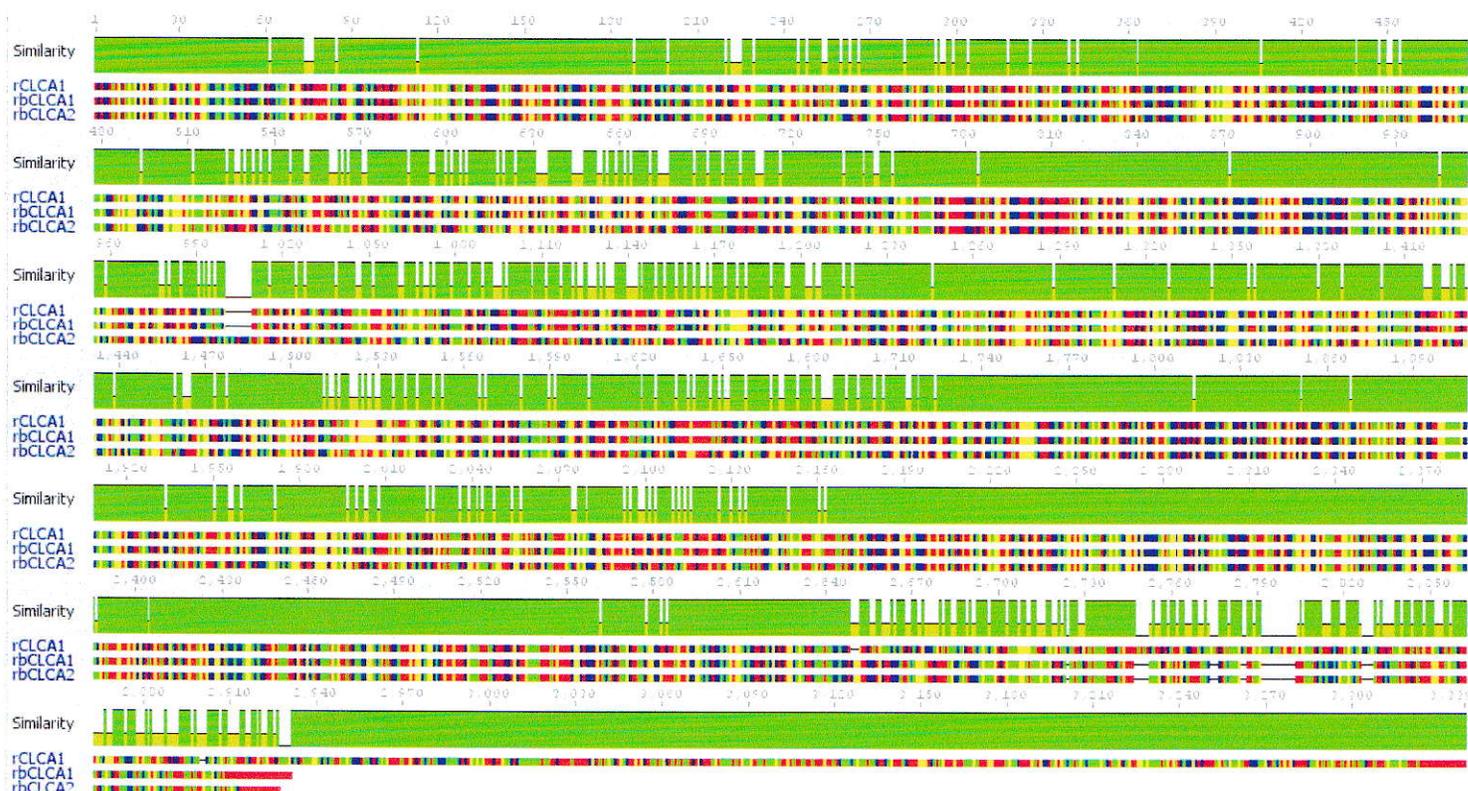


Fig. 5: Alineamientos múltiples entre los canales PanCICa. El alineamiento nucleotídico de los canales PanCICa arrojó un porcentaje de identidad de un 89,9%. Con respecto a la similitud, las barras verdes muestran regiones conservadas en las 3 secuencias, mientras que las barras color mostaza muestran regiones en las cuales los residuos varían entre los canales. Los residuos color rojo indican los nucleótidos de Adenina, los de color azul representan los nucleótidos Citosina, los de color amarillo los nucleótidos de Guanina y los de color verde los nucleótidos de Timina. El largo de las secuencias nucleotídicas de rbCICa1 y rbCICa2 es de aproximadamente 2900 pb, mientras que la del canal rCICa1 supera las 3100 pb. Nótese que la secuencia que más difiere de las 3 corresponde a rbCICa2. El alineamiento se realizó utilizando el programa “Genious Basic 3.7.1” (Drummond et al., 2009).

El diseño de los partidores PanClCa se realizó utilizando el programa *on-line* “Primer3” (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). El posterior análisis de los partidores se efectuó utilizando el programa *on-line* “IDT” (Integrated DNA Technology, <http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx>) (Tabla 1) página en la cual también realizamos un Blast para verificar que estos no amplificaran otro cDNA fuera del de nuestro interés. Por último, realizamos un alineamiento múltiple utilizando el programa *on-line* “Clustal W” contenido dentro del programa “Genious Basic 3.7.1” (Drummond et al., 2009) para comprobar que los partidores tuvieran un 100% de identidad con las tres secuencias de los canales PanClCa en estudio (Fig. 6).

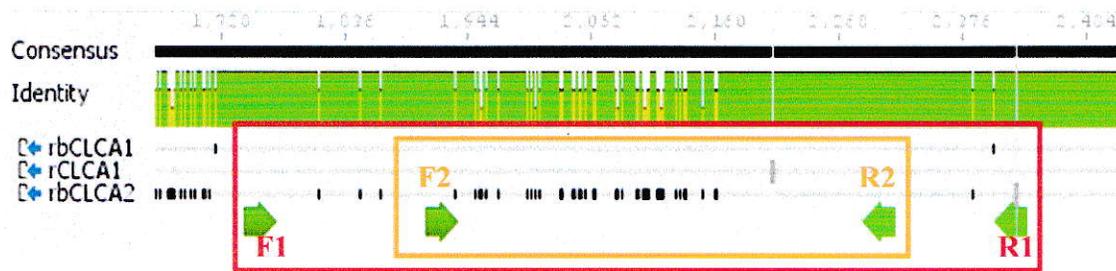


Fig 6: Diseño de partidores específicos para PanCICa: En la figura se observan los dos pares de partidores (flechas verdes) diseñados para amplificar los canales PanCICa. Nótese que el primer par de partidores amplifica una secuencia mayor (segmento rojo) que el segundo par (segmento naranja). Esto debido a que la técnica de RT-PCR anidado en una primera ronda amplifica un segmento mayor, el cual se usa como sustrato para una segunda ronda de PCR, donde los partidores acotan una zona dentro del primer amplificado. Esta técnica es utilizada cuando las cantidades de cDNA son muy pequeñas para ser amplificadas por una ronda de PCR tradicional, como fue nuestro caso. En la figura se observa cómo los 2 pares de partidores son capaces de amplificar cualesquiera de los cDNA de los canales PanCICa que llegara a expresarse en EO de rata, lo cual se observa al ver la barra de identidad (representada en verde cuando los pares de bases de cada uno de lo tres canales coinciden entre sí). Las barras negras presentes a lo largo de cada una de las tres secuencias representan las bases no coincidentes en el alineamiento. Como podemos observar, la secuencia amplificada entre los partidores internos presenta diferencias entre los 3 canales. Estas diferencias en las secuencias nucleotídicas las utilizamos luego de secuenciar el fragmento amplificado, para identificar cuál de los canales PanCICa se expresa en EO. El alineamiento se realizó utilizando el programa “Genious Basic 3.7.1” (Drummond et al., 2009).

PARTIDORES PanCICa

Partidores	Forward 1 (F1)	Reverse 1 (R1)	Forward 2 (F2)	Reverse 2 (R2)
Secuencia partidor (5´- 3´)	AAGGGGGTCAAACCTCAGTT	CGGCTCATTCTGATGACGTA	GTTCTGGGAGCCAATGTCAC	TACTGGGTGGGAACACATGA
Posición de hibridación	1752-1771	2409-2428	1911-1930	2294-2313
Tm (°C)	59,8	59,8	56,1	55,8
%GC	50	50	55	50
Tamaño partidor (pb)	20	20	20	20
Tamaño amplicón (pb)	677		403	

Tabla 1: Información de partidores específicos para los canales PanCICa. En la tabla se muestra toda la información de los partidores ilustrados en la figura 6: secuencia partidores; posición de hibridación de cada partidor en el cDNA; Tm (Temperatura de denaturación); %GC (porcentaje Guanina-Citosina); largo de los partidores y largo del segmento de cDNA amplificado.

Los controles utilizados para la técnica de PCR anidado fueron los siguientes:

CNGA2 (Figura 7, Tabla 2). Subunidad principal del canal gatillado por nucleótidos cíclicos, el cual se expresa específica y constitutivamente en cilios de NSO (Nakamura and Gold, 1987); por esta razón la utilizaremos como control positivo en las pruebas de RT-PCR anidado.

mBest2: (Figura 8, Tabla 3) canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ presente en NSO de ratón (Pifferi et al., 2006).

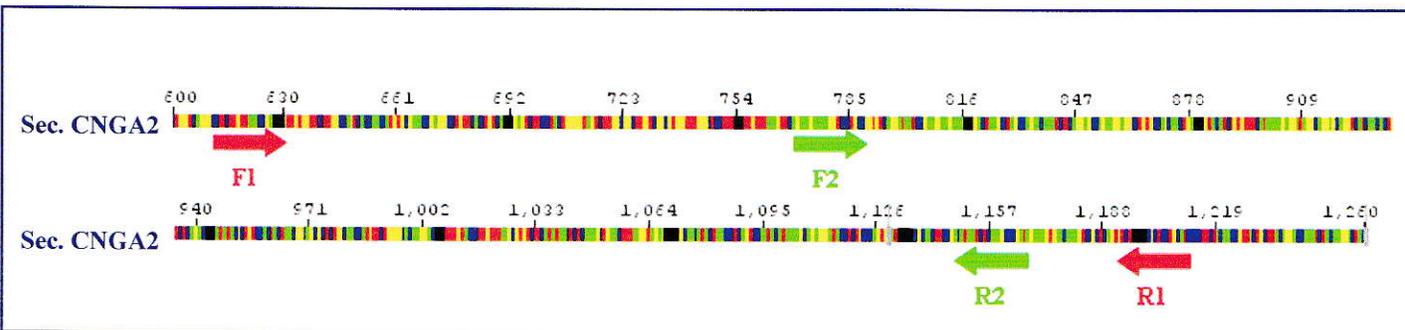


Fig. 7: Diseño de partidores específicos para CNGA2: En la figura se observan los dos pares de partidores diseñados para amplificar cDNA de CNGA2. Las flechas color rojo representan los partidores encargados de amplificar el segmento mayor, el cual se utiliza como sustrato para amplificar un segmento dentro de este (indicado por las flechas verdes que muestran el lugar de unión de los partidores en la secuencia de cDNA). Los residuos color rojo indican los nucleótidos de Adenina, los de color azul representan los nucleótidos Citosina, los de color amarillo los nucleótidos de Guanina y los de color verde los nucleótidos de Timina. La figura se realizó utilizando el programa “Genious Basic 3.7.1 (Drummond et al., 2009)”.

PARTIDORES CNGA2

Partidores	Forward 1 (F1)	Reverse 1 (R1)	Forward 2 (F2)	Reverse 2 (R2)
Secuencia partidor (5' - 3')	CAAGGCCTGACTCCTTCCTA	TCCAGTGGATGATGACCAAG	CGTTGGTTGTTTGTCATTGC	TTCCGAAGATGTTGGGGTAG
Posición de hibridación	611-630	1191-1210	769-788	1149-1168
T _m (°C)	56,1	54,3	53,2	54,2
%GC	50	50	45	50
Tamaño partidor (pb)	20	20	20	20
Tamaño amplicón (pb)	600		400	

Tabla 2: información de partidores utilizados para amplificar cDNA de CNGA2 mediante RT-PCR anidado. En la tabla se muestra la información correspondiente a los 2 pares de partidores (F1, R1, F2, R2) utilizados para amplificar, mediante RT-PCR anidado los cDNA del control positivo (CNGA2).

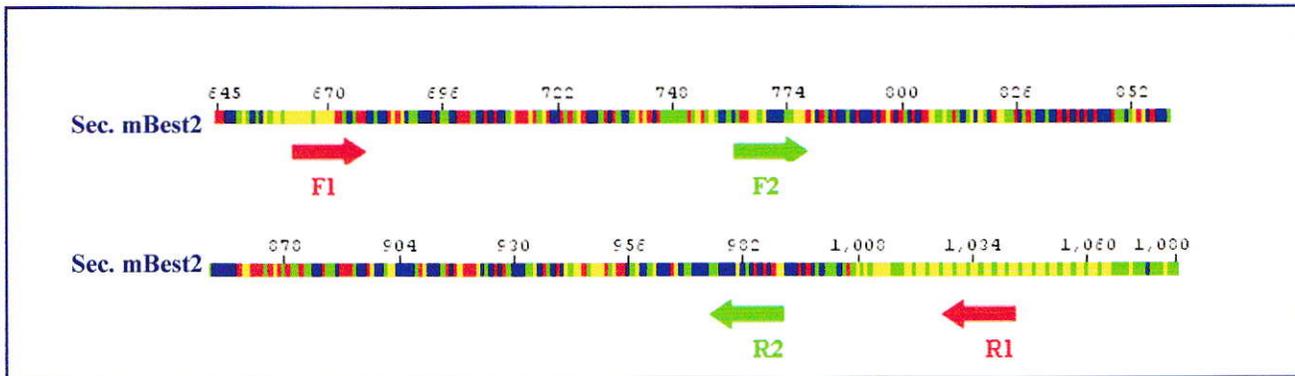


Fig. 8: Diseño de partidores específicos para mBest2: La figura muestra el fragmento de cDNA de mBest2 amplificado por los dos pares de partidores. Al igual que en la figura 7, las flechas color rojo representan los partidores encargados de amplificar el segmento mayor, dentro del cual se encuentra la zona a amplificar en una segunda ronda de PCR por los partidores internos (flechas verdes). Los residuos color rojo indican los nucleótidos de Adenina, los de color azul representan los nucleótidos Citosina, los de color amarillo los nucleótidos de Guanina y los de color verde los nucleótidos de Timina. La figura se realizó utilizando el programa “Genious Basic 3.7.1” (Drummond et al., 2009).

PARTIDORES mBest2

Partidores	Forward 1 (F1)	Reverse 1 (R1)	Forward 2 (F2)	Reverse 2 (R2)
Secuencia partidor (5'-3')	GCGACAACAGTGCCCTAAAG	CATGGCCAAGTCGTCATACA	CCTCGTCTACACCCAGGTA	GCGGTCAATAAGAAAGTTGGTC
Posición de hibridación	664-683	1033-1052	757-775	977-998
T _m (°C)	56.5	55	55.4	54.2
%GC	55	50	57.9	45.5
Tamaño partidor (pb)	20	20	19	22
Tamaño amplicón (pb)	389		242	

Tabla 3: información de partidores utilizados para amplificar cDNA de mBest2 mediante RT-PCR anidado. Al igual que las tablas 1 y 2, la tabla 3 muestra la información de los 2 pares de partidores utilizados para amplificar el canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ expresado en NSO de ratón. La secuencia e información del par de partidores **Forward 2** y **Reverse 2** fueron obtenidos del texto complementario de Pifferi et al. (2006).

5.3 Extracción de RNA:

La extracción de RNA de los diferentes tejidos, se realizó utilizando “RNeasy Mini Kit” (QIAGEN). Para evitar cualquier tipo de contaminación con DNA genómico, el extracto total de RNA fue incubado con “DNasa I libre de RNasa” QIAGEN (incluida en el kit). La extracción de RNA se realizó a partir los siguientes tejidos: Epitelio Olfatorio (Rata y Ratón), Cerebro (Rata), Cerebelo (Rata) Testículo (Rata), Corazón (Rata) e Hígado (Rata).

Los animales fueron obtenidos del vivero de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las ratas utilizadas fueron machos *Sprague Dawley* entre 18 y 30 días, mientras que los ratones fueron machos adultos *Balb/c* (30 días). Ratas y ratones fueron sacrificados utilizando decapitación sin anestesia, en acuerdo con los procedimientos aceptados por Conicyt. Esto con el único objetivo de no dañar el EO, tejido muy sensible a tratamientos anestésicos.

5.4 Retrotranscripción:

El proceso de retrotranscripción se realizó con los RNA extraídos de los tejidos anteriormente nombrados (Tabla 4). Para esto utilicé la enzima “MLV-Reverse Transcriptase” (INVITROGEN). Cada muestra de tejido incluyó un control RT- (retrotranscriptasa negativo), en el cual se sustituyó la enzima por H₂O tratada con DEPC, para verificar que no hubiera contaminación con DNA genómico que pudiera arrojar falsos positivos.

Componentes	Volumen (μl)
Oligo dT primers (5μg/μl)	1
Dntp's (10 mM)	2
RNA	23
Buffer 5X	8
DTT (0,1 M)	4
RNAsin (40 U/ μl)	1
Transcriptasa Reversa (200 U/ μl)	1

Tabla 4: Protocolo de retrotranscripción: en la tabla 4 se pueden observar los volúmenes utilizados de cada uno de los componentes necesarios para la obtención de cDNA a partir de mRNA.

La mezcla se incubó a 42 °C por 1 hora, tiempo en el que se produce la retrotranscripción del RNA. Para inactivar la reacción, las muestras se incubaron a 75°C por 10 minutos.

Posterior a la retrotranscripción, se procedió a medir las absorbancias de los cDNAs obtenidos a partir de los diferentes tejidos, con el fin de obtener la concentración de las muestras de cDNA y verificar su pureza. Los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm; a esta longitud por lo tanto, la absorción es proporcional a la concentración. Por otro lado, las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 nm (principalmente por residuos de triptófano), por lo que las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe algún contaminante proteico. El cálculo de la relación A_{260} / A_{280} es una manera común para expresar la pureza del cDNA.

Dependiendo de la composición nucleica, valores entre 1.6 a 1.9 indican una muestra pura.

La absorbancia de los cDNA obtenidos a partir de los tejidos anteriormente nombrados a 260 y a 280 nm y la relación entre ellos (A_{260}/A_{280}) se muestra en la tabla 5.

Especie	Tejidos	A₂₆₀ (nm)	A₂₈₀ (nm)	A₂₆₀/A₂₈₀
Rata	Epitelio Olfatorio	0,219	0,126	1,738
	Cerebro	0,292	0,118	2,475
	Cerebelo	0,307	0,186	1,651
	Testículo	0,227	0,137	1,657
	Corazón	0,300	0,183	1,639
	Hígado	0,269	0,160	1,681
Ratón	Epitelio Olfatorio	0,309	0,175	1,766
	Cerebro	0,187	0,109	1,716

Tabla 5: absorbancias de cDNA a 260 y 280 nm: En la tabla se observan las absorbancias a 260 y 280 nm de los cDNA obtenidos a partir de los tejidos utilizados para realizar RT-PCR anidado. Nótese que la relación A_{260}/A_{280} es mayor a 1,6 en las muestras de todos los tejidos, lo cual indica que los cDNA utilizados se pueden considerar como puros.

5.5 Reacción PCR anidado:

Las reacciones de PCR anidado se llevaron a cabo con los cDNA obtenidos a partir de los tejidos mencionados anteriormente. La concentración de cDNA utilizada fue de 2 µg totales, la cual se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = A_{260 \text{ nm}} * 50 \text{ µg/ml} * \text{factor de dilución}$$

Donde:

$A_{260 \text{ nm}}$: Absorbancia a 260 nm

50 µg/ml: constante de absorbancia de ácidos nucleicos de cadena doble a 260 nm en una muestra que presenta una concentración de 1 µg/ml.

Factor de dilución = 100

Utilizando esta fórmula, pudimos determinar la concentración de cDNA de las muestras obtenidas de todos los tejidos en estudio utilizando las absorbancias a 260 nm (Tabla 5), las que se expresan en la tabla 6.

Especie	Tejidos	Concentración (µg/µl)
Rata	Epitelio Olfatorio	1,09
	Cerebro	1,46
	Cerebelo	1,54
	Testículo	1,14
	Corazón	1,50
	Hígado	1,35
Ratón	Epitelio Olfatorio	1,55
	Cerebro	0,94

Tabla 6: concentraciones de cDNA de los tejidos en estudio. La tabla muestra las concentraciones finales de los cDNAs, obtenidos luego de la retrotranscripción de cada uno de los tejidos estudiados.

La concentración de cDNA utilizada para la primera reacción de PCR fue de 2 µg totales. Esta reacción se realizó utilizando los partidores F1 y R1 para ClCa, CNGA2 y mBest2 respectivamente (ver figuras 6, 7 y 8); para ello se siguió el protocolo descrito en la tabla 7, el cual posee un volumen final de reacción de 30 µl.

Componentes	Volumen (µl)
cDNA + H ₂ O con DEPC	24,3
Buffer PCR 10X	3
MgCl ₂ (50 mM)	0,9
dNTPs (10 mM)	0,6
Partidores: Forward	0,5
Reverse	0,5
Taq polimerasa	0,2

Tabla 7: Protocolo primera ronda de PCR: en la tabla se observan los volúmenes de cada uno de los componentes utilizados para llevar a cabo la primera reacción de PCR.

En la segunda ronda de PCR se utilizó como sustrato el producto de la primera ronda para lo cual, en este caso, usamos los partidores F2 y R2 para ClCa, CNGA2 y mBest2 respectivamente (ver figuras 6, 7 y 8). Trabajamos con una dilución 1:50 y un volumen final de 30 µl, siguiendo el protocolo descrito en la tabla 8.

Componentes	Volumen (µl)
Producto 1° PCR	0,6 µl
Buffer PCR 10X	3
MgCl ₂ (50 mM)	0,9
dNTPs (10 mM)	0,6
Partidores: Forward	0,5
Reverse	0,5
Taq polimerasa	0,2
H ₂ O con DEPC	23,7

Tabla 8: Protocolo segunda ronda de PCR: al igual que en la tabla 7 en esta tabla se observan los volúmenes usados de cada uno de los componentes necesarios para realizar, a partir del producto de la primera reacción, la segunda ronda de PCR.

Para realizar ambas reacciones de PCR se utilizó la misma enzima “Taq DNA polimerasa”, (INVITROGEN). Las condiciones de ambas rondas de PCR, para cada uno de los partidores, se muestran en la tabla 9.

		1° Ronda (°C)	2° Ronda (°C)
CICa	Denaturación	94	94
	Apareamiento	58	55
	Extensión	72	72
CNGA2	Denaturación	94	94
	Apareamiento	58	52
	Extensión	72	72
mBest2	Denaturación	94	94
	Apareamiento	59	53
	Extensión	72	72

Tabla 9: condiciones de PCR para la amplificación de CICa, CNGA2 y mBest2: En la tabla se observan las condiciones estandarizadas que se utilizaron para realizar las rondas de PCR anidado correspondientes a los 3 tipos de partidores utilizados (CICa, CNGA2 y mBest2). La denaturación en ambas rondas tuvo una duración de 30 segundos; por su parte el apareamiento en ambas rondas tuvo una duración de 45 segundos; por último la extensión de los partidores usados tuvo una duración de 1 minuto para la primera ronda y 45 segundos para la segunda. La primera ronda de PCR se realizó con 25 ciclos, mientras que la segunda ronda con 35.

5.6 Extracción de DNA a partir de geles:

La extracción del amplicón PanCICa obtenido luego de la reacción de RT-PCR anidado desde el gel de agarosa se realizó utilizando el kit “QIAquick Gel Extraction Kit” (Quiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5.7 Secuenciación de DNA purificado a partir de gel de agarosa:

El extracto de cDNA purificado a partir del gel de agarosa y el partidor reverse, se enviaron a la empresa “Macrogen” (Corea) donde se efectuó la secuenciación de la muestra. Para ello utilizamos el sistema de orden de secuenciación online (<http://dna.macrogen.com/eng/>).

5.8 Análisis del amplicón secuenciado

El análisis del amplicón secuenciado se realizó utilizando el programa “Genious Basic 3.7.1” (Drummond et al., 2009). Los alineamientos del amplicón con las secuencias ClCa publicadas: rClCa1 (N° identificación: AB119249), rbClCa1 (N° identificación: AB212889) y rbClCa2 (N° identificación: AB256513), se realizaron utilizando el programa “Clustal W” contenido dentro del programa anteriormente mencionado. La secuencia nucleotídica obtenida del amplicón secuenciado fue traducida a secuencia aminoacídica utilizando el programa “Expasy” (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>), con el fin de comprobar si el porcentaje de identidad entre los canales PanClCa y el amplicón obtenido variaban al realizar los alineamientos utilizando sus secuencias aminoacídicas. Esta secuencia aminoacídica fue alineada con las secuencias del mismo tipo de los canales PanClCa publicados, utilizando también el programa “Clustal W” contenido dentro de “Genious Basic 3.7.1 (Drummond et al., 2009)”.

6. RESULTADOS

6.1 PCR anidado:

6.1.1 PanCICa se expresa en EO de rata:

Los experimentos de RT-PCR anidado los realizamos utilizando los partidores y los tejidos mencionados en la sección Materiales y Métodos. El primer experimento se realizó para comprobar si los partidores confeccionados para amplificar los canales PanCICa, amplificaban en cDNA extraído de EO de rata (Fig 9). Como control positivo utilizamos los partidores diseñados para amplificar cDNA del canal CNGA2. Se detectó la expresión de PanCICa y del control positivo (CNGA2) en tejido de EO de rata. Por otro lado podemos apreciar lo sensible de la técnica de PCR anidado, ya que aunque en la primera ronda de PCR no se observó expresión alguna, existe material suficiente para permitir la amplificación necesaria del cDNA en una segunda ronda de PCR. Nótese que la expresión de PanCICa en EO de rata es más intensa que la expresión de CNGA2.

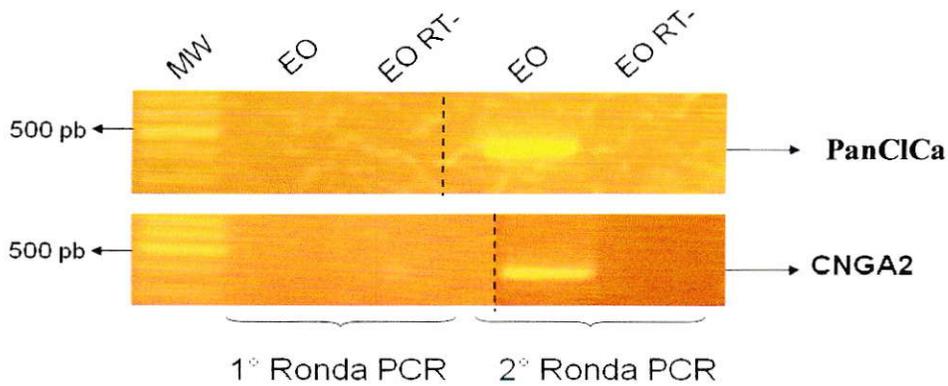


Fig. 9: PanClCa se expresa EO de rata. Las rondas de PCR se realizaron usando los partidores diseñados para amplificar PanClCa y CNGA2, utilizando las condiciones ilustradas en la sección Materiales y Métodos. Ambos amplicones son de aprox. 400 pb, lo que calza con la migración de éstas respecto al control de peso molecular MW (Bench top ladder, Promega), cuya banda destacada corresponde a 500 pb. EO RT+: Extracto de cDNA obtenido a partir de EO de rata. EO RT-: muestras libres de retrotranscriptasa reversa. Se realizaron 5 experimentos de PCR anidado utilizando los partidores específicos para PanClCa y 3 experimentos usando los partidores para CNGA2, donde se obtuvieron los mismos resultados que los mostrados.

6.1.2 Expresión de PanClCa en tejidos de rata:

Tal como los canales rbClCa1 y rbClCa2 se expresan en sistema nervioso y presentan una expresión diferencial en los diferentes órganos periféricos de rata, probamos la expresión de los canales ClCa blanco utilizando los partidores PanClCa diseñados en dichos órganos. Efectivamente, comprobamos que la expresión utilizando estos partidores es diferencial: PanClCa se expresa en sistema nervioso (Fig. 10.a) y en testículo, pero no en corazón ni en hígado (Fig. 10.b), al igual que la expresión descrita para rbClCa1 (Jeong et al., 2005) y rbClCa2 (Yoon et al., 2006).

Fig. 10.a

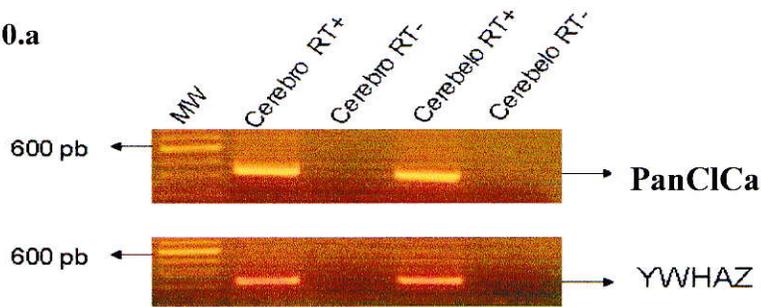


Fig. 10.b

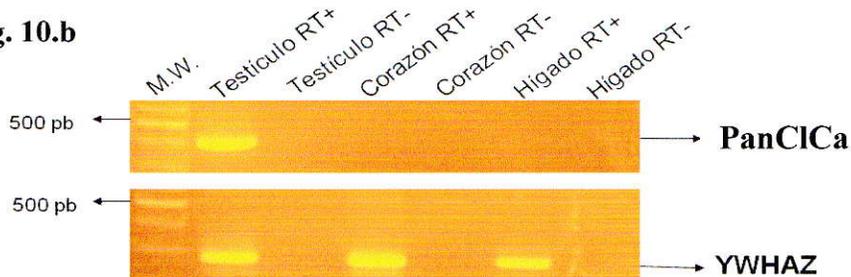


Fig. 10: Expresión de canales PanCICa en sistema nervioso y en órganos periféricos de rata. Los fragmentos observados, corresponden a CICa (400 pb) y a YWHAZ (250 pb). YWHAZ es un *House Keeping*, es decir, se expresa constitutivamente en todos los tejidos de rata. En la figura 10.a la banda destacada en el estándar de peso molecular corresponde a 600 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen), mientras que la banda destacada del MW en la figura 10.b corresponde a 500 pb (Bench top ladder, Promega). El uso de los partidores YWHAZ se realizó utilizando las condiciones estándar para ello (40 ciclos; denaturación de 94°C por 30 s, apareamiento de 57°C por 30 s; elongación de 72°C por 30 s). RT+: muestras de mRNA sometidas a retrotranscripción. RT-: muestras libres de retrotranscriptasa reversa. Para las reacciones de PCR anidado: partidores PanCICa, n = 4, partidores YWHAZ, n = 3.

6.1.3 Expresión de PanClCa y mBest2 en EO de rata y ratón:

Se analizó la expresión de los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ mBest2 y PanClCa en EO de rata y de ratón (Fig. 11.a). La descripción de los partidores utilizados (mBest2 y PanClCa) se encuentran en la sección Materiales y Métodos. Claramente se observa que, los canales PanClCa (rClCa1, rbClCa1, rbClCa2) se expresan en EO de rata, pero no en EO de ratón. Por el contrario, mBest2 se expresa en ratón, pero no en rata. Es decir, la expresión de estos canales de Cl⁻ es diferencial en ambas especies.

Fig. 11.a

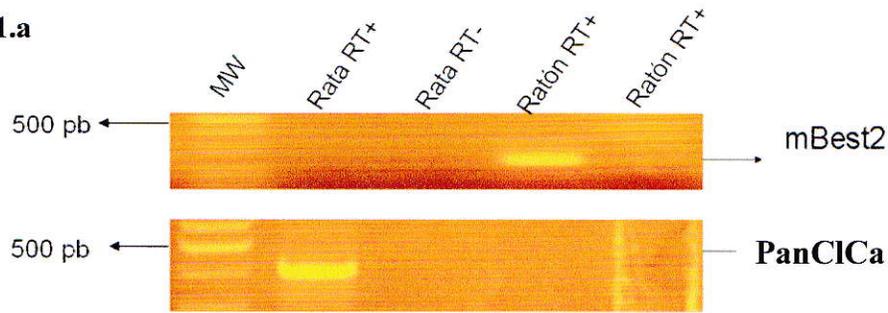


Fig. 11.b

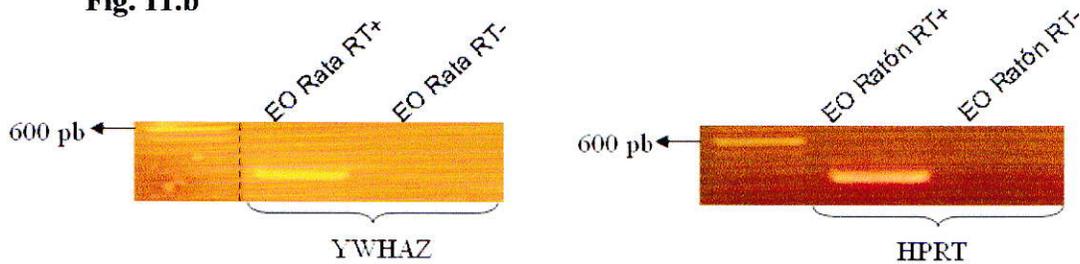


Fig. 11: expresión de PanC1Ca y mBest2 en EO de rata y ratón. Los fragmentos observados en la figura 11.a, corresponden a mBest2 (240 pb) y a PanC1Ca (402 pb). MW: marcador de peso molecular, la banda destacada corresponde a 500 pb (Bench top ladder, Promega). RT+: muestras de mRNA sometidas a retrotranscripción. Por otro lado, en la figura 11.b podemos observar los controles realizados en EO de rata y ratón con sus *House keeping* correspondientes: YWHAZ (250 pb) y HPRT (350 pb) respectivamente. En estos dos casos, la banda destacada del marcador de peso molecular corresponde a 600 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen). RT-: muestras libres de retrotranscriptasa reversa. Para reacciones de PCR anidado en EO de rata: partidores mBest2 n = 6, partidores PanC1Ca n = 5. Por su parte para las reacciones de PCR anidado en EO de ratón: partidores mBest2 n = 3, partidores PanC1Ca n = 1. Los PCR control ilustrados en la figura 11.b se realizaron 3 veces cada uno.

6.2 Secuenciación y análisis del amplicón CICA:

El amplicón obtenido utilizando los partidores específicos para PanCICA en EO de rata (Fig. 9), se sometió a secuenciación (ref. Materiales y Métodos) para saber a cuál de los canales PanCICA corresponde (rCICA1, rbCICA1 ó rbCICA2).

Obtenida la secuenciación, se procedió a alinear la secuencia con cada uno de los 3 canales PanCICA, para determinar cuál de ellos se expresa en EO de rata. El alineamiento nucleotídico (Fig. 12) reflejó que el amplicón secuenciado corresponde al canal rbCICA2 presentando un 99,1% de identidad, en comparación con los porcentajes obtenidos por los canales rCICA1 y rbCICA1, con identidades de 88% cada uno. Este porcentaje se acerca bastante al 89,9% observado al alinear las secuencias nucleotídicas completas de los 3 canales PanCICA (Fig. 5).

Observando las barras de identidad (en verde) en el alineamiento nucleotídico (Fig. 12) y aminoacídico (Fig. 13) entre los canales PanCICA (rCICA1, rbCICA1 y rbCICA2) y el amplicón secuenciado, se observa que la mayor identidad la presenta el canal rbCICA2, en comparación con los otros 2 canales CICA (rCICA1, rbCICA1). Al observar la figura 13, podemos apreciar que en la zona acotada por la amplificación de los partidores (aminoácidos 628-748), rbCICA2 muestra una identidad del 95,9%, mientras que los canales rCICA1 y rbCICA1 muestran una identidad del 79,3% cada uno. Sin embargo, si la región acotada por los partidores se restringe entre los aminoácidos 651 a 742,

sorpresivamente encontramos que rbClCa2 aumenta su porcentaje de identidad a un 100% con el amplicón secuenciado.

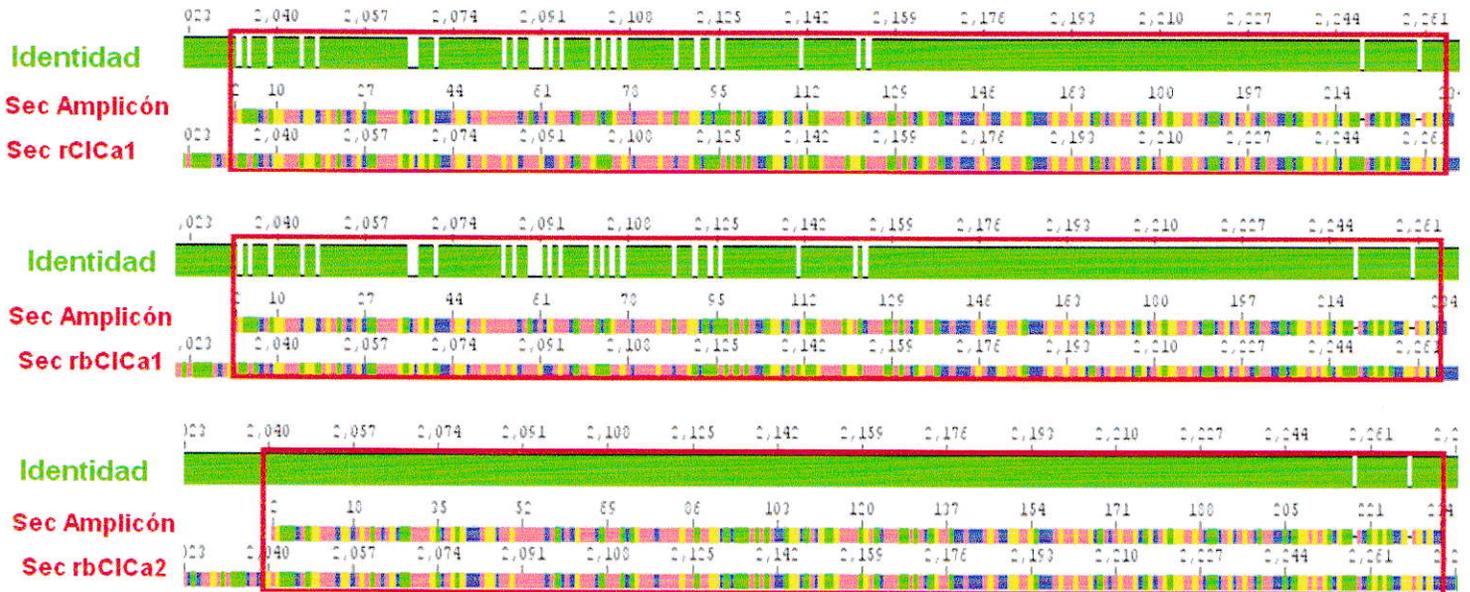


Fig. 12: Secuenciación y alineamientos nucleotídicos entre el amplicón ClCa obtenido y las secuencias PanClCa: Luego de obtenida la secuencia del amplicón ClCa a partir de EO de rata, se procedió a realizar los alineamientos múltiples con las secuencias nucleotídicas de los canales PanClCa publicadas (rClCa1, rbClCa1 y rbClCa2). Las zonas acotadas en rojo en los tres alineamientos representan la región secuenciada por el cebador reverse, que en las secuencias nucleotídicas de los canales PanClCa corresponde a la región comprendida entre las bases 2032 y 2266. Esta región corresponde a uno de los sectores en donde la secuencia del canal rbClCa2 presenta la mayor diferencia con los canales rClCa1 y rbClCa1. Los residuos color rosa representan los nucleótidos de Adenina, los de color azul los nucleótidos de Citosina, los de color amarillo los nucleótidos de Guanina y los de color verde los de Timina.

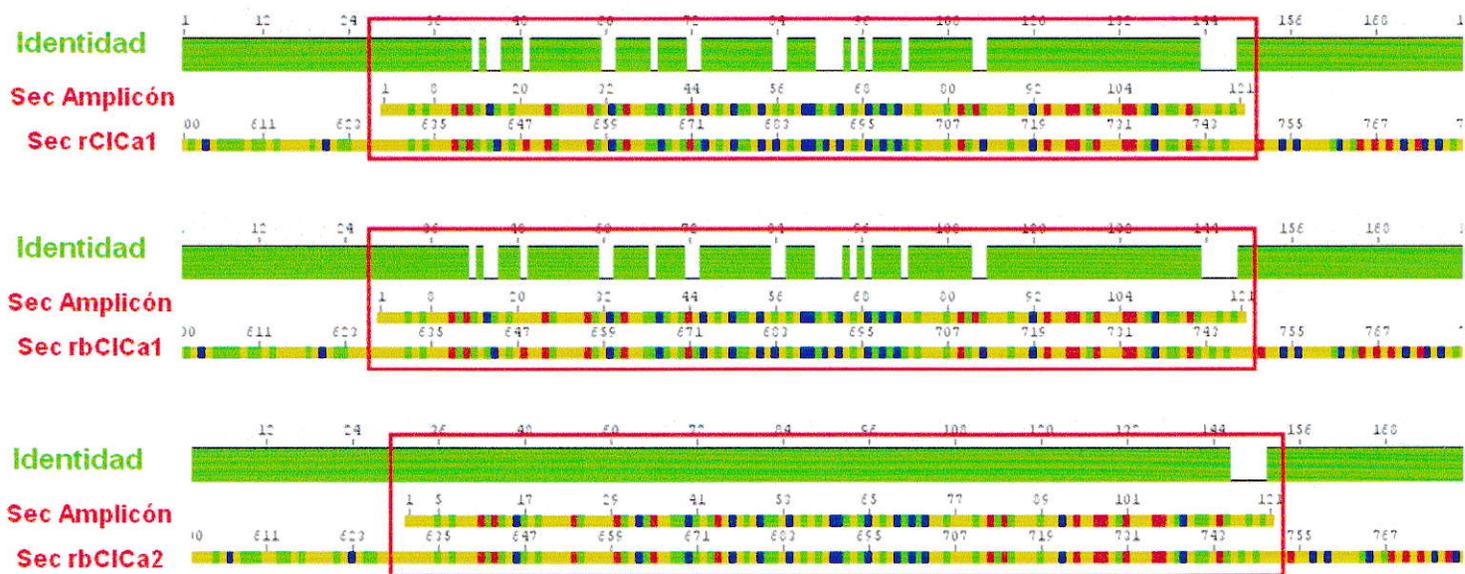


Fig. 13: Alineamientos aminoacídicos entre el amplicón CICa obtenido y las secuencias

PanCICa: El alineamiento múltiple realizado con las secuencias aminoacídicas, muestra el mismo resultado que el observado en la Fig.12, la zona acotada corresponde a la región secuenciada a partir del cebador reverse la cual fue traducida a secuencia aminoacídica (ref. Materiales y Métodos). Los residuos color verde corresponden a residuos polares, los residuos color mostaza pertenecen al grupo de los apolares, los residuos rojos al grupo de los ácidos y los residuos azules al grupo de los básicos.

7. Discusión

La olfacción comienza cuando los compuestos químicos odoríferos presentes en el aire se unen a proteínas receptoras de odorantes (Buck and Axel, 1991), ubicadas en los cilios de las NSOs (Mombaersts, 1999; Buck, 2000; Firestein, 2001). La unión del compuesto químico odorífero al receptor olfatorio desencadena una cascada de transducción (Fig. 2), la cual termina con la activación de un canal de Cl^- activado por Ca^{2+} (Kleene and Gesteland, 1991) que contribuye, junto al canal catiónico inespecífico gatillado por nucleótidos cíclicos, al potencial de receptor despolarizante (Zufall et. al., 1994).

El estudio de la identidad molecular de los canales de Cl^- activados por Ca^{2+} abordados en este Seminario de Título fue motivado por las marcadas diferencias encontradas en las conductancias de estos canales, medidas mediante registros de canal único con la técnica de *patch clamp* directamente en cilios olfatorios ($\gamma \approx 15$ pS) (Delgado y Bacigalupo, resultados no publicados) y estimaciones por análisis de ruido de corrientes macroscópicas de Cl^- activados por Ca^{2+} ($\gamma = 0.8-1.2$ pS) (Kleene and Gesteland, 1991). Dichas observaciones ponen de manifiesto la necesidad de identificar y caracterizar este canal para comprender cabalmente su participación en la quimiotransducción.

Para conocer la identidad molecular del canal de Cl^- activado por Ca^{2+} , el cual da cuenta de aproximadamente el 80% de la corriente neta excitatoria en las NSOs, realizamos una búsqueda nucleotídica en NCBI donde seleccionamos

los posibles canales de Cl⁻ activados por Ca⁺² que pudieran expresarse en EO de rata. Seleccionamos los canales rbClCa1 (Jeong et al., 2005) y su isoforma rbClCa2 (Yoon et al., 2006), basándonos en recientes publicaciones que reportan la expresión de estos canales en sistema nervioso, y en su alto porcentaje de similitud con el canal rClCa1, expresado en glándulas salivales y en células ductales de rata. A estos tres canales seleccionados en su conjunto los denominamos con el nombre de PanClCa, por pertenecer todos a la familia de canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ ClCa.

El alineamiento múltiple realizado entre las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los canales PanClCa (rClCa1, rbClCa1 y rbClCa2) confirmó la gran similitud presente entre ellos, arrojando un 89.9% de identidad (Fig. 5).

Para estudiar la expresión de los canales PanClCa (rClCa1, rbClCa1, rbClCa2), en EO de rata debimos utilizar la técnica de RT-PCR anidado, ya que la técnica de PCR tradicional fue insuficiente para amplificar cDNA de PanClCa en EO debido a la pequeña cantidad de muestra disponible. La reacción de PCR anidado mostró que efectivamente PanClCa se expresa en EO de rata (Fig. 9), lo que nos indica que el amplicón podría corresponder a uno (o más de uno) de los canales PanClCa ó a alguna isoforma de estos canales. El control positivo CNGA2 verificó el buen estado del cDNA, y el control RT-nos confirmó que la muestra no estaba contaminada con DNA genómico.

Tal como se observa en la figura 10, PanClCa se expresa en sistema nervioso (cerebro y cerebelo) y presenta una expresión diferencial en órganos periféricos de rata, igual a la presentada por sus integrantes rbClCa1 (Jeong et al., 2005) y rbClCa2 (Yoon et al., 2006). Estos últimos, al igual que los partidores diseñados, no amplificaron ni en corazón ni en hígado, donde estos canales no han sido hallados. Esta evidencia nos inclinó a pensar que el canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ expresado en EO de rata podría corresponder a rbClCa1 ó a rbClCa2.

Para conocer la secuencia del amplicón expresado en EO de rata (Fig. 9), secuenciamos dicho amplicón y posteriormente realizamos los alineamientos de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas entre los canales PanClCa y el amplicón obtenido (Fig. 12 y 13). El canal rbClCa2 presentó un porcentaje de identidad del 99,1% versus los canales rbClCa1 y rClCa1, que presentaron un 88% de identidad cada uno. De esto concluimos que el canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ expresado en EO de rata corresponde al canal rbClCa2.

Pifferi et al. (2006) propusieron que el canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ perteneciente a la familia de las bestrofinas “mBest2”, correspondería al canal involucrado en la transducción olfatoria en ratón. Basándonos en esa evidencia, y utilizando la técnica de RT-PCR anidado junto con los partidores indicados (PanClCa y mBest2), observamos que la expresión de los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺, PanClCa y mBest2 es diferencial en EO de rata y ratón. Comprobamos la expresión de mBest2 en EO de ratón (Pifferi et al., 2006),

pero también observamos que este canal no se expresa en EO de rata. Por el contrario, PanClCa el cual se expresa en EO de rata (Fig. 9), no lo hace en EO de ratón (Fig 11.a). Estas evidencias nos hacen pensar que, la expresión de los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ es especie específica.

Para confirmar que Bestrofina no se expresa en EO de rata, realizamos una búsqueda en Blast. Encontramos que los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ pertenecientes a la familia de las Bestrofinas solo se expresan en retina de rata (Best1, Best2 y Best3) cuando éstas sufren la enfermedad *Distrofia Macular Vitelliforme de Best*, patología relacionada con la degeneración macular, un tipo de retinoplastia relacionada con la edad (Marmorstein A. y col, 2000). Sin embargo, no se ha documentado la presencia de ninguno de los canales pertenecientes a la familia de las Bestrofinas en EO de rata.

Por otro lado, realizamos el mismo procedimiento para verificar si algunos de los canales PanClCa se expresa en ratón. Efectivamente, a través de una búsqueda nucleotídica en NCBI, comprobamos la expresión en ratón de canales de Cl⁻ pertenecientes a la familia ClCa (mClCa1, mClCa2, mClCa3, mClCa4, mClCa5, mClCa6), pero no encontramos reporte alguno que indicara la expresión de alguno de estos canales en EO del mismo animal. Los canales expresados en ratón que presentan mayor similitud con los canales PanClCa expresados en rata tienen por nombre mClCa1, mClCa2 y mClCa4. Fue por esto que decidimos comprobar si los partidores diseñados para amplificar los canales PanClCa en rata tenían la capacidad de amplificar alguno de estos tres

canales en EO ratón. Realizando un Blast con los partidores PanClCa diseñados, descubrimos que estos partidores no tienen la capacidad de amplificar ninguno de estos 3 canales expresados en ratón. Por lo tanto, nada podemos decir de la expresión en EO de ratón de los canales PanClCa expresados en rata.

En la figura 14 podemos observar el cladograma en dónde se agrupan los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ expresados tanto en rata como en ratón, en función de su identidad. Observando el cladograma confirmamos que los canales PanClCa (rClCa1, rbClCa1 y rbClCa2) presentan la mayor similitud con los canales mClCa1, mClCa2 y mClCa4 expresados en ratón.

Hemos identificado un canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ presente en EO de rata, sin embargo, este es solo el primer paso, ya que nuestros resultados no demuestran que el canal rbClCa2 se exprese en NSOs de rata, ni mucho menos en sus cilios y menos aún que esté implicado en la quimiotransducción olfatoria. Por otro lado, aunque rbClCa2 resulte participar en la cascada de transducción olfatoria, es posible que no sea el único canal responsable de la corriente de Cl⁻ en cilios olfatorios de rata. Lo importante de este trabajo es que contamos con un candidato a ser el canal de transducción ciliar que nos ayudará a responder esta pregunta fundamental.

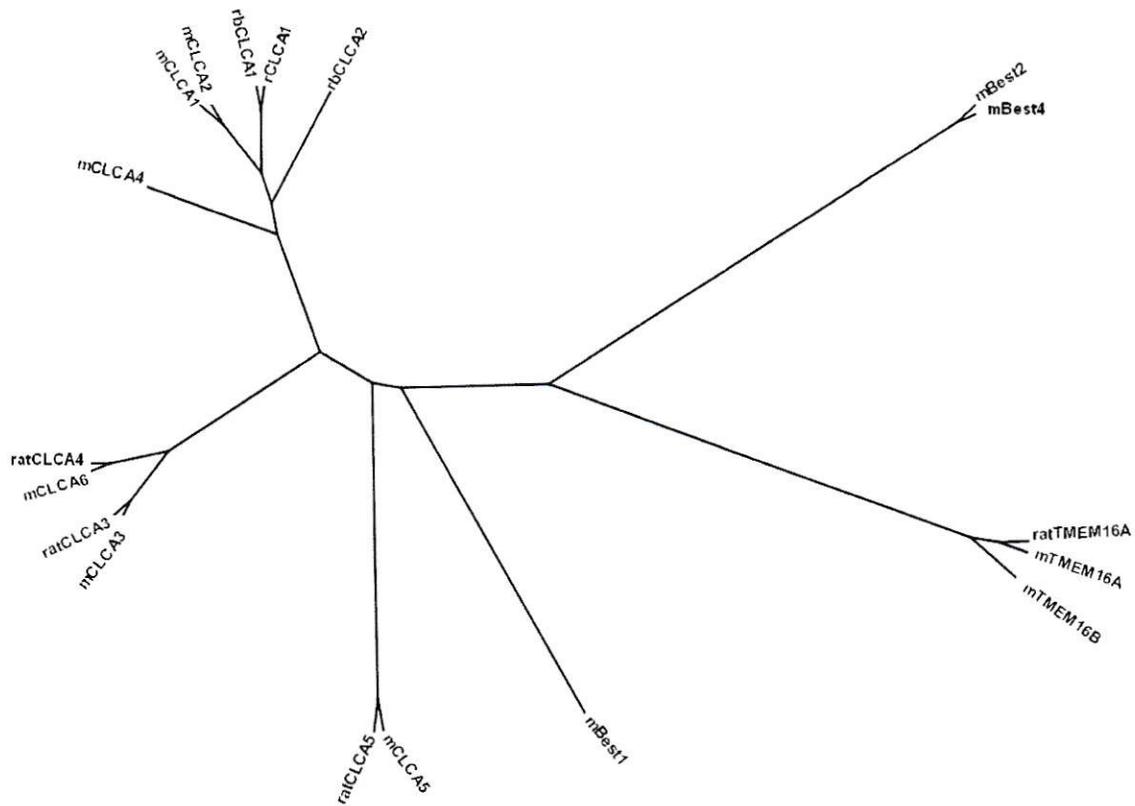


Fig 14: Cladograma de canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ expresados en rata y ratón. En el cladograma podemos observar todos los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ expresados tanto en rata como en ratón agrupados en función de su identidad. Podemos apreciar la distribución de las tres familias de canales de cloruro descritas hasta el momento: CLCa, Bestrofinas y TMEM16. Este cladograma se diseñó realizando alineamientos múltiples con las secuencias nucleotídicas de los canales descritos en rata y ratón utilizando el programa Genious Basic 3.7.1 (Drummond et al., 2009).

8. Conclusión:

En EO de rata se expresa el canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ rbClCa2. Si este canal se expresara en NSO de rata, específicamente en sus cilios, sería altamente probable que correspondiera al canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ que participa en la transducción olfatoria.

El canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ mBest2 expresado en ratón no se expresa en EO de rata. Por otro lado, ninguno de los canales PanClCa (rClCa1, rbClCa1 ó rbClCa2) expresado en EO de rata se expresa en EO de ratón. Estas evidencias indican que los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ presentan una expresión especie específica.

9. Referencias

- Bakalyar, H. A. and Reed, R. R. (1990). **Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection.** Science 250: 1403-1406.
- Buck, L. B. (2000). **The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals.** Cell 100:611-618.
- Buck, L. and Axel, R. (1991). **A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition.** Cell 65:175-187.
- Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O., and Galiotta, L.J. (2008). **TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity.** Science 322, 590-594.
- Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Thierer T, Wilson A (2009) Geneious v4.6, Available from <http://www.geneious.com/>.
- Eggermont, J. (2004). **Calcium-activated chloride channels: (un)known, (un)loved?** Proc Am Thorac Soc 1(1): 22-7.
- Firestein, S. (2001). **How the olfactory system makes sense of scents.** Nature 413: 211-218.
- Firestein, S. and F. Werblin (1989). **Odor-induced membrane currents in vertebrate-olfactory receptor neurons.** Science 244(4900): 79-82.
- Jaworsky, D.E., Matsuzaki, O., Borisy, F.F., and Ronnett, G.V. (1995). **Calcium modulates the rapid kinetics of the odorant-induced cyclic AMP signal in rat olfactory cilia.** J Neurosci 15, 310-318.
- Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F., and Zdebik, A.A. (2002). **Molecular structure and physiological function of chloride channels.** Physiol Rev 82, 503-568.
- Jeong, S.M., Park, H.K., Yoon, I.S., Lee, J.H., Kim, J.H., Jang, C.G., Lee, C.J., and Nah, S.Y. (2005). **Cloning and expression of Ca²⁺-activated chloride channel from rat brain.** Biochem Biophys Res Commun 334, 569-576.

- Jones, D.T. and Reed, R.R. (1989). **Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction.** *Science* 244: 790-795.

- Kleene, S. J. and Gesteland, R. C. (1991). **Calcium activated chloride conductance in frog olfactory cilia.** *J. neurosci.* 11:3624-3629.
- Kurahashi, T. (1989). **Activation by odorants of cation-selective conductance in the olfactory receptor cell isolated from the newt.** *J Physiol* 419: 177-92.

- Kurahashi, T. and K. W. Yau (1993). **Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells.** *Nature* 363(6424): 71-4.

- Leffingwell, J. C. (2001). <http://www.Leffingwell.com/olfaction.htm>

- Lowe, G. and G. Gold (1991). **The spatial distributions of odorant sensitivity and odorant-induced currents in salamander olfactory receptor cells.** *J. Physiol.* 442: 147-168.

- Lowe, G. and G. Gold (1993). **Contribution of the ciliary cyclic nucleotide-gated conductance to olfactory transduction in the salamander.** *J Physiol* 462: 175-196.

- Marmorstein, A.D., Marmorstein, L.Y., Rayborn, M., Wang, X., Hollyfield, J.G., and Petrukhin, K. (2000). **Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12758-12763.

- Matthews, H.R., and Reisert, J. (2003). **Calcium, the two-faced messenger of olfactory transduction and adaptation.** *Curr Opin Neurobiol* 13, 469-475.

- Mombaerts, P. (1999). **Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors.** *Science* 286: 707-711.

- Morrison, E. E. and Costanzo, R. M. (1990). **Morphology of the human olfactory epithelium.** *J. Comp. Neurol.* 297:1-13.

- Nakamura, T. and Gold, G. H. (1987). **A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia.** *Nature* 325: 442-444.

- Pifferi, S., Pascarella, G., Boccaccio, A., Mazzatenta, A., Gustincich, S., Menini, A., and Zucchelli, S. (2006). **Bestrophin-2 is a candidate calcium-activated chloride channel involved in olfactory transduction.** *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 12929-12934.
- Pifferi, S., Pascarella, G., Boccaccio, A., Mazzatenta, A., Gustincich, S., Menini, A., and Zucchelli, S. (2006). **Bestrophin-2 is a candidate calcium-activated chloride channel involved in olfactory transduction. Supporting Text.** 10.1073 /pnas.0604505103.
- Reisert, J., Bauer, P.J., Yau, K.W., and Frings, S. (2003). **The Ca-activated Cl channel and its control in rat olfactory receptor neurons.** *J Gen Physiol* *122*, 349-363.
- Ronnet, G. V. and Moon, C. (2002). **G proteins and olfactory signal transduction.** *Annu. Rev. Physiol.* *64*: 189-222.
- Schroeder, B.C., Cheng, T., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2008). **Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit.** *Cell* *134*, 1019-1029.
- Sun, H., Tsunenari, T., Yau, K.W., and Nathans, J. (2002). **The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels.** *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 4008-4013.
- Trotier, D. (1986). **A patch-clamp analysis of membrane currents in salamander olfactory receptor cells.** *Pflugers Arch* *407*(6): 589-95.
- Yamazaki, J., Okamura, K., Ishibashi, K., and Kitamura, K. (2005). **Characterization of CLCA protein expressed in ductal cells of rat salivary glands.** *Biochim Biophys Acta* *1715*, 132-144.
- Yoon, I. S., Jeong, S.M., Lee, S.N., Lee, J.H., Kim, J.H., Pyo, M.K., Lee, B.H., Choi, S.H., Rhim, H., Choe, H., and Nah, S.Y. (2006). **Cloning and heterologous expression of a Ca²⁺-activated chloride channel isoform from rat brain.** *Biol Pharm Bull* *29*, 2168-2173.
- Zufall, F., Firestein, S. and Sheperd, G. M. (1994). **Cyclic nucleotide-gated channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons.** *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *23*: 577-607