

UCH-FC  
MAG-BMCN  
G643  
CA



**Expresión de canales de cloruro activados por calcio  
pertenecientes a la familia "ClCa" en cilios de neuronas  
olfatorias de rata.**

**Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento  
parcial de los requisitos para optar al grado de**

**Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Biología  
Molecular, Celular Y Neurociencias**

**Facultad De Ciencias**

**Carolina Blanca Paz González Silva**

**Octubre, 2010**

**Director de Tesis Dr: Juan Bacigalupo Vicuña.  
Co-Directora de Tesis Dra: María Rosa Bono.**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

**Carolina Blanca Paz González Silva**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 23 de agosto 2010.

**Director de Tesis:**  
**Dr. Juan Bacigalupo**



**Co-Director de Tesis:**  
**Dra. María Rosa Bono**



**Comisión de Evaluación de la Tesis**

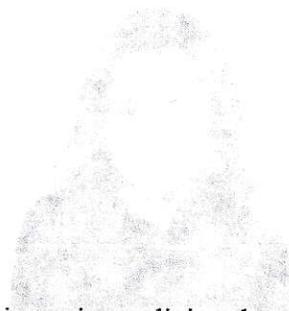
**Dra. Cecilia Vergara**



**Dr. Alejandro Roth**



## Dedicatoria



A mis padres, quienes incondicionalmente me han apoyado durante todos estos años de estudio. Gracias por su infinito amor.

A mi novio Alejandro, por guiarme, aconsejarme, apoyarme, y sobre todo amarme.

Y por sobre todo al amigo que nunca falla....



## Agradecimientos

Agradezco al laboratorio de Fisiología Celular en el cual desarrolle mi seminario de título, especialmente 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. Como no agradecer a mis incondicionales amigas con las que estrechamos profundos lazos de amistad: Graciela, Karen, Romi, Lupe, Lore, Coté, Vivi.

No dejo de mencionar a aquellos que me ayudaron en la elaboración de mi tesis, especialmente a los miembros de los laboratorios y los profesores Verónica Palma, Christian González, María Rosa Bono y Úrsula Wyneken, sin su ayuda y paciencia este proyecto no se hubiese llevado a cabo exitosamente.

Eternamente agradecida de mis padres, quienes han dado todo por mi formación y bienestar, a mi novio quien una y otra vez me dio animo y fuerzas para seguir adelante en aquellos difíciles momentos. Mención especial a quien siempre me acompaño y guió mis pasos, al que alienta mi corazón y me llena de fuerzas para seguir adelante, al que cada día me entrega toda su sabiduría, entendimiento y fortaleza, para ti Dios todo mi trabajo y esfuerzo.

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 Fondecyt 1100682.

Instituto de Milenio de Dinámica Celular y Biotecnología.





## Índice de Materias

	<b>Página</b>
<b>1.1 Resumen</b> .....	13
<b>1.2 Abstract</b> .....	15
<b>2 Introducción</b> .....	17
<b>3 Objetivos</b> .....	23
3.1 Hipótesis.....	23
3.2 Objetivo general .....	23
3.3 Objetivos específicos .....	23
<b>4 Materiales y Métodos</b> .....	25
4.1 Determinación de la expresión de CICa en NSOs de rata.....	25
4.1.1 Diseño de partidores CICa.....	25
4.1.2 RT-PCR anidado de célula única.....	29
4.2 Secuenciación de amplicón CICa.....	33
4.2.1 Extracción de DNA a partir de geles.....	33
4.2.2 Secuenciación de DNA purificado a partir de gel de agarosa.....	33
4.2.3 Análisis del amplicón secuenciado.....	33
4.3 Determinación de la expresión de mRNA de CICa2 y CICa4l en EO y NSOs de rata.....	34
4.3.1 Diseño de partidores CICa2 y CICa4l.....	34



4.3.2 PCR anidado en EO de rata .....	35
4.3.3 Relación de abundancia entre mRNA de CICa2 y CICa4l en EO de rata.....	39
4.3.4 RT-PCR anidado de célula única.....	39
4.4 Obtención de la secuencia nucleotídica completa del canal CICa más abundante en EO de rata.....	40
4.4.1 Diseño de partidores.....	40
4.4.2 Reacción de PCR.....	42
4.4.3 Purificación de los productos de PCR.....	42
4.4.4 Secuenciación de DNA purificado.....	42
4.4.5 Análisis de los amplicones secuenciados.....	43
4.5 Generación de un anticuerpo monoclonal anti-CICa.....	44
4.6 Determinación de la expresión de CICa en cilios de NSOs de rata.....	44
4.6.1 Experimentos de western blot.....	44
4.7 Determinación de la expresión del mRNA de TMEM16A y TMEM16B en EO de rata y ratón.....	49
4.7.1 Diseño de partidores TMEM16A y TMEM16B.....	49
4.7.2 Reacciones de PCR en EO de rata y ratón.....	50
<b>5. Resultados.....</b>	<b>51</b>
5.1 CICa se expresa en NSOs de rata.....	51



5.2 ClCa4l se expresa en EO y NSOs de rata.....	53
5.3 ClCa2 se expresan en EO y NSOs de rata.....	56
5.4 ClCa4l es el amplicón más abundante en EO de rata.....	59
5.5 El amplicón más abundante en EO de rata corresponde a ClCa4l y no a una isoforma de éste.....	61
5.6 ClCa se expresa en cilios de NSOs de rata.....	65
<b>6. Discusión.....</b>	<b>69</b>
<b>7. Conclusión.....</b>	<b>75</b>
<b>8. Referencia.....</b>	<b>76</b>

## Lista de tablas

	Página
<b>Tabla 1</b> Información de partidores C1Ca.....	18
<b>Tabla 2</b> Información de partidores CNGA2.....	19
<b>Tabla 3</b> Información de partidores mBest2 .....	20
<b>Tabla 4</b> Componentes Solución A para RT-PCR anidado de célula única .....	21
<b>Tabla 5</b> Componente mezcla RT para RT-PCR de célula única.....	22
<b>Tabla 6</b> Protocolo primera ronda de RT-PCR anidado de célula única.....	23
<b>Tabla 7</b> Protocolo segunda ronda de RT-PCR anidado de célula única.....	24
<b>Tabla 8</b> Información de partidores C1Ca2.....	26
<b>Tabla 9</b> Información de partidores C1Ca4l.....	27
<b>Tabla 10</b> Componentes mezcla de retrotranscripción.....	28
<b>Tabla 11</b> Componentes de la mezcla para la primera ronda de PCR anidado.....	29
<b>Tabla 12</b> Componentes de la mezcla para la segunda ronda de PCR anidado .....	30
<b>Tabla 13</b> Información de partidores genéricos C1Ca2/C1Ca4l.....	33
<b>Tabla 14</b> Componentes de geles para western blot al 8 y 10%.....	37
<b>Tabla 15</b> Información de partidores TMEM16A.....	40
<b>Tabla 16</b> Información de partidores TMEM16B.....	40



## Lista de Figuras

	Página
<b>Fig. 1</b> Neuroepitelio Olfatorio.....	17
<b>Fig. 2</b> Cascada de transducción olfatoria.....	19
<b>Fig. 3</b> Registro de <i>voltage-clamp</i> en NSO aislada de salamandra.....	20
<b>Fig. 4</b> Cladograma de canales de Cl <sup>-</sup> activados por Ca <sup>2+</sup> en rata.....	22
<b>Fig. 5</b> Diseño de partidores ClCa.....	26
<b>Fig. 6</b> Células disociadas a partir de EO de rata .....	29
<b>Fig. 7</b> Diseño de partidores genéricos ClCa2/ClCa4l .....	40
<b>Fig. 8</b> Alineamiento aminoacídico entre ClCa2, ClCa4l y péptido sintético.....	45
<b>Fig. 9</b> Expresión de ClCa de NSOs.....	52
<b>Fig. 10</b> Alineamiento nucleotídico entre el amplicón ClCa y las secuencias ClCa2 y ClCa4l.....	54
<b>Fig. 11</b> Alineamiento nucleotídico entre el amplicón ClCa obtenido a partir de NSOs y EO de rata.....	55
<b>Fig. 12</b> Expresión de ClCa2 y ClCa4l en EO de rata.....	57
<b>Fig. 13</b> Expresión de ClCa2 y ClCa4l en NSOs de rata.....	58
<b>Fig. 14</b> Abundancia relativa de mRNA de ClCa2 y ClCa4l en EO de rata.....	60
<b>Fig. 15</b> Amplicones correspondientes a los siete fragmentos del canal ClCa más abundante en EO y cerebro de rata.....	62





**Fig. 16** Alineamientos nucleotídicos entre la secuencia de los fragmentos obtenidos y ClCa2.....63

**Fig. 17** Alineamientos nucleotídicos entre la secuencia de los fragmentos obtenidos y ClCa4l.....64

**Fig. 18** Expresión de la proteína ClCa en cilios de EO de rata.....66

**Fig. 19** Expresión de TMEM16A y TMEM16B en EO de rata y ratón.....68

## Lista de abreviaturas

**Bestofina:** Canal de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup>.

**cAMP:** AMP cíclico.

**cDNA:** DNA complementario.

**ClCa:** Canal de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup>.

**ClCa2:** Canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> tipo 2.

**ClCa4l:** Canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> tipo 4 like.

**CNG:** Canal gatillado por nucleótidos cíclicos.

**EO:** Epitelio Olfatorio.

**G<sub>olf</sub>:** Proteína G de epitelio olfatorio.

**mBest2:** Mouse Bestrophin tipo 2

**mRNA:** RNA mensajero.

**NSO:** Neurona Sensorial Olfatoria.

**ORs:** Receptores olfatorios.

**Pb:** Pares de bases.

**TMEM16:** Proteínas de membrana plasmática.

## RESUMEN

Los canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  son un componente clave en el proceso de transducción olfatoria. La unión de un odorante a su receptor específico ubicado en los cilios de las neuronas sensoriales olfatorias (NSOs) produce la despolarización de la membrana, producto de la entrada de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio intraciliar a través de los canales gatillados por nucleótidos cíclicos, CNG. El  $\text{Ca}^{2+}$  a su vez activa canales de  $\text{Cl}^-$  a través de los cuales sale este ión, amplificando substancialmente la despolarización de las NSOs. A pesar del rol fundamental del canal de  $\text{Cl}^-$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  en la transducción olfatoria, su identidad molecular es todavía controversial.

En mi tesis de pregrado describimos la expresión del canal de  $\text{Cl}^-$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{ClCa4l}$  en epitelio olfatorio (EO) de rata, sin que llegáramos a determinar el tipo celular en que se expresaba, ni mucho menos su localización subcelular. Es esperable que si este canal participa en la quimiotransducción, se exprese en los cilios de las neuronas olfatorias. Por este motivo, en la presente tesis comprobamos la expresión de  $\text{ClCa4l}$  en estas células, mediante experimentos de RT-PCR de célula única en NSOs. También verificamos en EO y en NSOs la expresión de un segundo canal de  $\text{Cl}^-$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , llamado  $\text{ClCa2}$ , menos abundante que  $\text{ClCa4l}$ . Amplificando y secuenciando los 2900 pb del canal  $\text{ClCa}$  expresado en EO de rata, comprobamos que este corresponde a  $\text{ClCa4l}$  y no a alguna isoforma de este. Utilizando un anticuerpo  $\text{ClCa}$  dirigido contra  $\text{ClCa2}$  y  $\text{ClCa4l}$ , realizamos experimentos de *inmuno blot* en extracto purificado de cilios olfatorios, encontrando expresión de  $\text{ClCa}$  en cilios de NSOs. Por último, también

detectamos la expresión de mRNA de los canales de  $\text{Cl}^-$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , pertenecientes a la familia TMEM16, TMEM16A y TMEM16B en EO de rata.

Estos resultados nos indican que los canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  ClCa2 y ClCa4l se expresan en NSOs, y que uno ó ambos canales se encuentran en los cilios de estas neuronas, lugar donde se produce la transducción olfatoria. Por otra parte también podemos decir que en EO no solo se expresan canales de  $\text{Cl}^-$  pertenecientes a la familia ClCa, sino que también hay canales pertenecientes a la familia TMEM16.

## ABSTRACT

The  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{Cl}^-$  channel is an important component of olfactory transduction process. The binding of an odorant to its specific receptor located in the cilia of the olfactory sensory neurons (OSNs) produces the depolarization of the membrane, initiated by the influx of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  into the cilia through the cyclic nucleotides gated channel (CNG). The  $\text{Ca}^{2+}$  ions in turn activate  $\text{Cl}^-$  channels, allowing a prominent  $\text{Cl}^-$  ion efflux, thus amplifying substantially the depolarization. In spite of the fundamental role of the  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{Cl}^-$  channel in olfactory transduction, its molecular identity remains controversial.

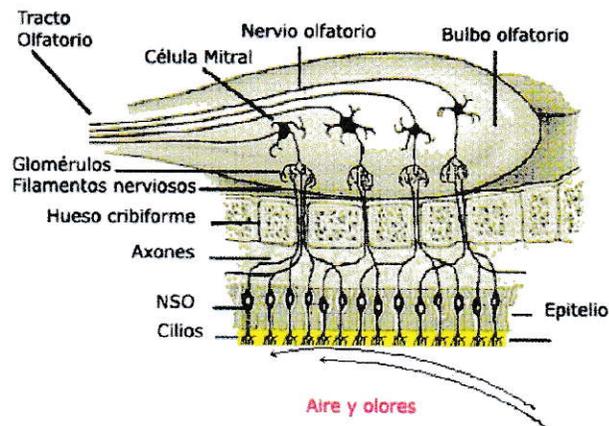
In my undergraduate thesis, we described the expression of the  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{Cl}^-$  channel  $\text{ClCa4l}$ , belonging to the  $\text{ClCa}$  family, in rat olfactory epithelium (OE), without determining the cell type where it was expressed. If this channel participates in chemotransduction, it is expected to be found in the cilia of the olfactory neurons. Accordingly, in the present thesis we verified the expression of  $\text{ClCa4l}$  in these cells by single cell RT-PCR. We also found that a second  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{Cl}^-$  channel,  $\text{ClCa2}$ , is expressed more weakly than  $\text{ClCa4l}$  in OE and OSNs. After amplifying and sequencing the 2900 bp of the  $\text{ClCa}$  channel expressed in rat OE, we showed that this channel corresponds to  $\text{ClCa4l}$  and not an isoform of it. Finally, immuno blot of a purified olfactory cilia extract using an antibody directed against  $\text{ClCa2}$  and  $\text{ClCa4l}$ , revealed expression of  $\text{ClCa}$  protein in the cilia of OSNs. Finally, we detected the expression of

the Ca<sup>2+</sup> activated Cl<sup>-</sup> channel mRNA, belonging to the TMEM16 family, TMEM16B and TMEM16A in rat OE.

These results indicate that Ca<sup>2+</sup> activated Cl<sup>-</sup> channels ClCa4l and ClCa2 are expressed in OSNs, and that one or both of these channels may be present in their cilia. Furthermore we can also say that not only Cl<sup>-</sup> channels belonging to the ClCa family are expressed in OE, there are also channels of the TMEM16 family.

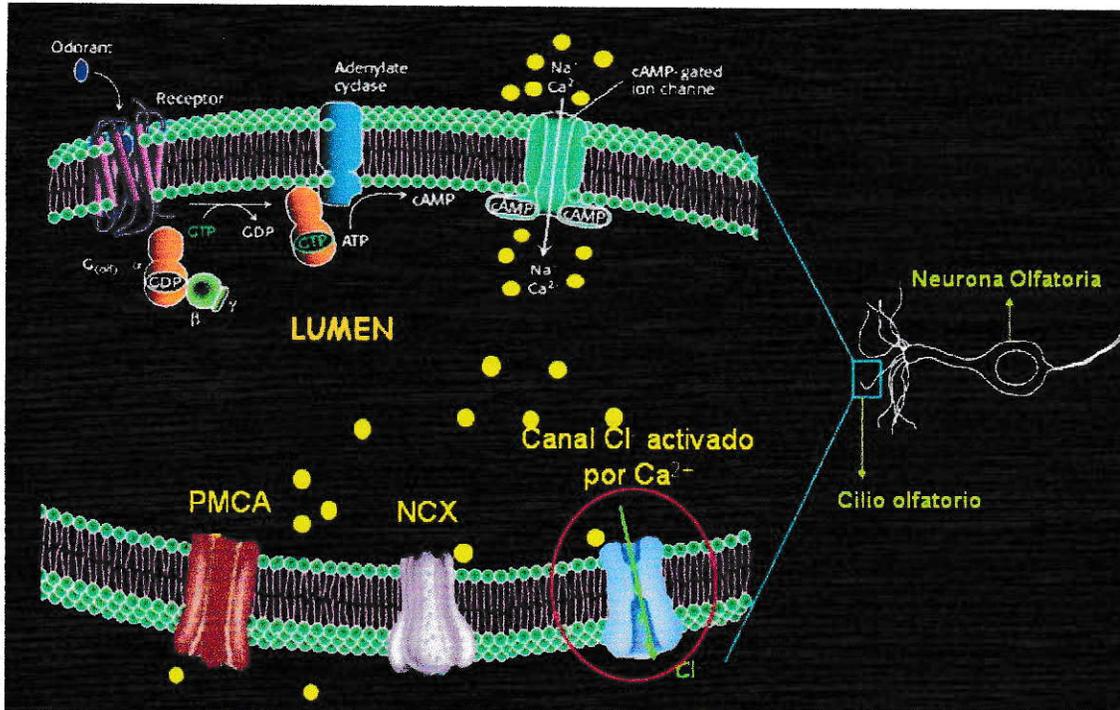
## INTRODUCCION

Las neuronas sensoriales olfatorias (NSOs) responden a estímulos odoríferos a través de una corriente de entrada (Trotier, 1986; Firestein y Werblin, 1989; Kurahashi, 1989) generada en los cilios de estas neuronas (Lowe y Gold, 1991), las que junto con otros tipos celulares conforman el neuroepitelio olfatorio (EO). Las NSOs son las responsables de la detección de moléculas de odorantes presentes en el ambiente. 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, que se encuentran 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).



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

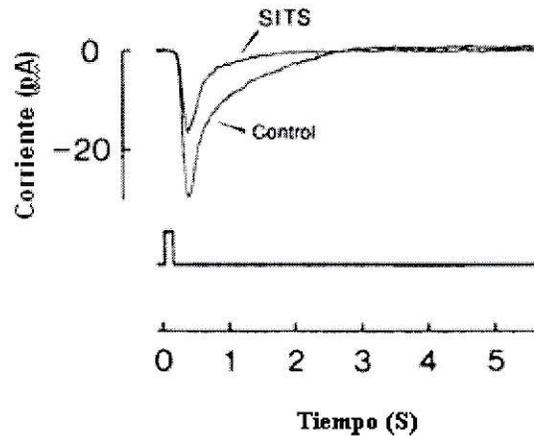
La cascada de transducción olfatoria se inicia con la unión de moléculas odoríferas a los receptores olfatorios (ORs) ubicados en los cilios de las NSOs. Esta unión activa una proteína G específica de NSOs, llamada  $G_{olf}$  (Jones y Reed, 1989). Cada  $G_{olf}$  a su vez activa una enzima de adenilato ciclasa tipo III, la cual cataliza la producción de miles de moléculas de AMP cíclico (cAMP) por segundo (Bakalyar y Reed, 1990). El cAMP activa canales gatillados por nucleótidos cíclicos CNG (Nakamura y Gold, 1987; Schild y Restrepo, 1998), a través de los cuales ingresan los cationes  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  al cilio, despolarizando las NSOs. Los iones  $Ca^{2+}$  activan a su vez canales iónicos selectivos a  $Cl^-$  a través de los cuales sale este ión (Kleene y Gesteland, 1991; Reisert y cols., 2003) (Fig. 2). Comúnmente los iones  $Cl^-$  median respuestas inhibitorias, ya que en la mayoría de las células este anión se encuentra en menor concentración en el espacio intraciliar que en el extracelular. Sin embargo en las NSOs se observa lo contrario, debido a que poseen una concentración intraciliar de  $Cl^-$  inusualmente alta. Por lo tanto, la salida de estos iones desde el citoplasma despolariza aún más a las NSOs, aumentando considerablemente la magnitud de la respuesta excitatoria. Esta inusual corriente de  $Cl^-$  ha sido demostrada en NSOs de anfibios (Kleene y Gesteland, 1991; Kurahashi y Yau, 1993), mamíferos (Lowe y Gold, 1993) y peces (Sato y Suzuki, 2000).



**Fig. 2: Cascada de transducción olfatoria.** En este esquema se puede observar la participación del canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> (ClCa Channel) en la cascada de transducción olfatoria la cual se desarrolla en los cilios de las neuronas olfatorias. PMCA: Bomba de Ca<sup>2+</sup>. NCX: Intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>.

La conductancia de Cl<sup>-</sup> hace una importante contribución a la respuesta inducida por odorantes, tal como puede observarse en la figura 3, donde se registró la corriente total en una NSO de salamandra estimulada con una mezcla de olores (Kurahashi and Yau, 1993) en presencia y ausencia de SITS, un bloqueador de canales de Cl<sup>-</sup>. La respuesta “Control” corresponde a la corriente total registrada desde la célula (corriente producida por la entrada de iones Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup> a través del canal CNG sumada a la corriente producida por la salida de iones Cl<sup>-</sup> a través de los canales de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup>); por otro lado, la corriente en presencia de SITS corresponde a la que no es bloqueada por esta droga, es

decir, a la corriente catiónica. Por lo tanto, la diferencia entre ambas corrientes corresponde a la de  $\text{Cl}^-$ .



**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  $\text{Cl}^-$ , SITS (Kurahashi and Yau, 1993).

Los canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ , también participan en otras importantes funciones fisiológicas, tales como secreción epitelial de electrolitos y agua (Wagner y cols., 1991), excitabilidad del músculo cardíaco (Zygmunt, 1994) y regulación neuronal (Frings y cols., 2000), entre otras.

Hasta el momento se han descrito tres familias de canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ , las que se diferencian por su sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  y a voltaje: familia  $\text{ClCa}$  (Eggermont, 2004; Jentsch y cols., 2002), Bestrofina (Sun y cols., 2002) y TMEM16 (Caputo y cols., 2008; Schroeder y cols., 2008). A pesar del importante papel que tienen los canales de  $\text{Cl}^-$

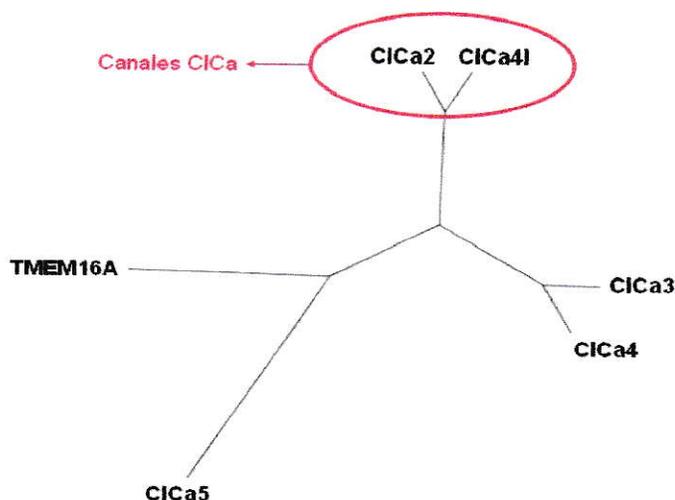
activados por  $\text{Ca}^{2+}$  en la transducción sensorial olfatoria, su identidad molecular aún está en duda.

En rata se ha reportado la expresión de seis canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ , cinco de ellos pertenecen a la familia  $\text{ClCa}$  y uno a la familia  $\text{TMEM16}$ . Entre los canales  $\text{ClCa}$ , se encuentran  $\text{ClCa2}$  (Yamazaki y cols., 2005) y  $\text{ClCa4l}$  (Yoon y cols., 2006), los cuales presentan un 88% de identidad entre sí. A diferencia de los demás canales de esta familia, ambos se expresan en sistema nervioso central (cerebro y cerebelo), y en algunos órganos periféricos.

Considerando estos antecedentes, decidimos analizar la expresión de  $\text{ClCa2}$  y  $\text{ClCa4l}$  en EO, NSOs y cilios de NSOs. Nos referiremos a estos dos canales con el nombre genérico de  $\text{ClCa}$  (Fig.4).

Con respecto a lo canales  $\text{TMEM16}$ , en rata solo se ha descrito el canal  $\text{TMEM16A}$ , mientras que  $\text{TMEM16B}$ , propuesto por ser el canal de  $\text{Cl}^-$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  participe en la transducción olfatoria en ratón (Stephan y cols., 2009), no se ha descrito en rata. Por este motivo, decidimos también estudiar la expresión de estos canales en EO de rata.

Cabe destacar que  $\text{TMEM16A}$  y  $\text{TMEM16B}$  presentan un 92% de identidad entre sí, mientras que los canales de familia  $\text{ClCa}$  y  $\text{TMEM16}$  no presentan similitud.



**Fig. 4: Cladograma de canales de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> en rata:** en el cladograma se pueden observar todos los canales de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> expresados en rata agrupados en función de su identidad. Nótese que los canales C1Ca en estudio presentan una gran identidad entre ellos. Este cladograma lo diseñamos realizando alineamientos múltiples con las secuencias nucleotídicas de los canales de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> reportados en rata utilizando el programa Genious Basic 3.7.1 (Drummond y cols., 2009).

Durante mi tesis de pregrado, utilizando la técnica de RT-PCR anidado y considerando el alto porcentaje de identidad presente entre los canales C1Ca2 y C1Ca4l, diseñamos dos pares de partidores capaces de amplificar una región conservada en las secuencias de los mRNA que codifican para estos canales. Aunque estos partidores son capaces de amplificar cualquiera de los transcritos que codifican para los canales C1Ca en RT-PCR, la secuencia del amplicón obtenido para cada canal permitió distinguirlos entre sí. De esta manera encontramos que en EO de rata se expresa el canal C1Ca4l. Sin embargo, no determinamos si la expresión de este canal ocurría específicamente en NSOs; por otro lado, los resultados obtenidos durante esta tesis no descartaron la presencia del canal C1Ca2 en EO.

## OBJETIVOS

### *3.1 Hipótesis*

Canales pertenecientes a la familia ClCa contribuyen a la corriente de Cl<sup>-</sup> activada por Ca<sup>2+</sup> que participa en la quimiotransducción en NSOs de rata.

### *3.2 Objetivo General*

Determinar la presencia de canales ClCa en NSOs de rata, específicamente en sus cilios.

### *3.3 Objetivos Específicos*

- 1.- Determinar la expresión de ClCa2 y/o ClCa4l en NSOs de rata utilizando partidores genéricos capaces de amplificar cualquiera de estos dos canales.
- 2.- Secuenciar el amplicón obtenido para establecer si ClCa4l, el canal expresado en epitelio olfatorio, se encuentra también en neuronas sensoriales.
- 3.- Determinar la expresión del mRNA de ClCa2 y ClCa4l en epitelio olfatorio y en neuronas sensoriales olfatorias de rata.
- 4.- Obtención de la secuencia nucleotídica completa del canal ClCa más abundante en EO de rata.
- 5.- Generar un anticuerpo monoclonal anti-ClCa, dirigido contra un péptido sintético basado en la región amino terminal conservada entre ClCa2 y ClCa4l.

6.- Determinar la expresión de ClCa en cilios de neuronas sensoriales olfatorias mediante *western blot*, utilizando el anticuerpo anti-ClCa.

7.- Determinar la expresión del mRNA de TMEM16A y TMEM16B en epitelio olfatorio de rata y ratón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

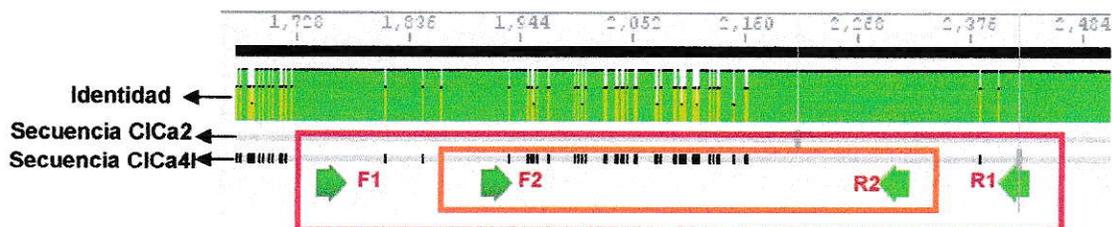
### 4.1 Determinación de la expresión de ClCa en NSOs de rata

#### *4.1.1 Diseño de partidores ClCa.*

Considerando que los canales en estudio, ClCa2 (GeneID: 362052) y ClCa4l (GeneID: 499721), presentan un porcentaje de identidad de un 85% según el alineamiento de sus secuencias nucleotídicas, diseñamos 2 pares de partidores capaces de amplificar, mediante la técnica de RT-PCR anidado, ClCa2 y/o ClCa4l. A este par de partidores, al igual que a los canales ClCa2 y ClCa4l, los llamamos con el nombre genérico de ClCa.

Los partidores ClCa (Fig. 5, tabla 1) y los partidores controles CNGA2 (GeneID: 25411; Tabla 2) y mBest2 (GeneID: 212989; Tabla 3), que en esta Tesis fueron utilizados para realizar los experimentos de RT-PCR en NSOs, fueron los mismos que se utilizaron para realizar los experimentos de RT-PCR en EO de rata (Carolina González Silva, Memoria en Ingeniería en Biotecnología Molecular, 2009).

## Partidores C1Ca



**Fig. 5: Diseño de partidores C1Ca:** En la figura se observan los dos pares de partidores (flechas verdes) diseñados para amplificar los canales C1Ca (C1Ca2 y C1Ca4l). Nótese que el primer par de partidores (F1 y R1) amplifica una secuencia más grande (segmento rojo) que F2 y R2 (segmento naranja). Esto es 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 amplicón. 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 C1Ca que llegara(n) a expresarse en NSOs de rata, lo cual se observa al ver la barra de identidad (representada en verde cuando las bases de los canales se encuentran conservadas). Las barras negras presentes a lo largo de cada una de las dos secuencias representan las bases no coincidentes en el alineamiento. Como podemos observar, la secuencia amplificada entre los partidores internos presenta diferencias entre C1Ca2 y C1Ca4l. Estas diferencias en las secuencias nucleotídicas las utilizamos para determinar, si C1Ca4l, el canal expresado en EO de rata, corresponde al mismo expresado en NSOs. El alineamiento se realizó utilizando el programa “Genious Basic 3.7.1” (Drummond y cols., 2009).

Partidores	Forward 1 (F1)	Reverse 1 (R1)	Forward 2 (F2)	Reverse 2 (R2)
<b>Secuencia partidor (5' - 3')</b>	aagggggtcaaacctcagtt	cggctcattctgatgacgta	gttctgggagccaatgtcac	tactgggtgggaacacatga
<b>Posición de hibridación</b>	1752-1771	2409-2428	1911-1930	2294-2313
<b>Tm (°C)</b>	59,8	59,8	56,1	55,8
<b>%GC</b>	50	50	55	50
<b>Tamaño partidor (pb)</b>	20	20	20	20
<b>Tamaño amplicón (pb)</b>	677		403	

**Tabla 1: Información de partidores CICA.** En la tabla se muestra toda la información de los partidores ilustrados en la figura 5: secuencia de los partidores; posición de hibridación de cada partidor al cDNA; Tm (Temperatura de hibridación); %GC (porcentaje Guanina-Citosina); largo de los partidores y largo del segmento de cDNA amplificado.

Los controles utilizados para realizar los experimentos de RT-PCR anidado de célula única fueron los siguientes:

**CNGA2** (Tabla 2). Subunidad principal del canal gatillado por nucleótidos cíclicos, el cual se expresa específica y constitutivamente en cilios y botón dendrítico de NSO (Nakamura and Gold, 1987).

**mBest2:** (Tabla 3) canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> expresado en NSO de ratón (Pifferi y cols., 2006).

## Partidores CNGA2

Partidores	Forward 1 (F1)	Reverse 1 (R1)	Forward 2 (F2)	Reverse 2 (R2)
Secuencia partidor (5' - 3')	caaggcctgactcctccta	tccagtgatgatgaccaag	cgttggtgtttgcattgc	ttcggagatgttgggtag
Posición de hibridación	611-630	1191-1210	769-788	1149-1168
Tm (°C)	56,1	54,3	53,2	54,2
%GC	55	50	45	50
Tamaño partidor (pb)	20	20	20	20
Tamaño amplicón (pb)	600		400	

**Tabla 2: información de partidores CNGA2.** 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. Los partidores externos F1 y R1 son los encargados de amplificar el segmento dentro del cual se encuentra la zona amplificada por los partidores internos (F2 y R2) en una segunda ronda de PCR. Tm: Temperatura de hibridación; %GC: porcentaje Guanina-Citosina.

## Partidores mBest2

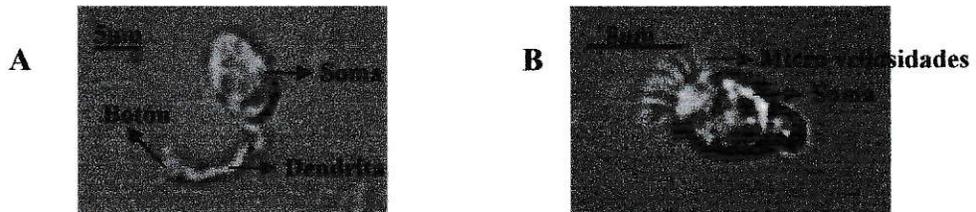
Partidores	Forward 1 (F1)	Reverse 1 (R1)	Forward 2 (F2)	Reverse 2 (R2)
Secuencia partidor (5' - 3')	gcgacaacagtgccctaaag	catggccaagtgctacataca	cctcgtctacaccaggta	gcggtcaataagaaagtggte
Posición de hibridación	664-683	1033-1052	757-775	977-998
Tm (°C)	56,5	55	55,4	54,2
%GC	55	50	57,9	45,5
Tamaño partidor (pb)	20	20	19	22
Tamaño amplicón (pb)	389		242	

**Tabla 3: información de partidores mBest2.** 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<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> 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 y cols. (2006).

#### 4.1.2 RT-PCR anidado de célula única.

Extracción de NSOs:

Bajo lupa disociamos mecánicamente EO de rata. Posteriormente bajo microscopio óptico se identificaron por sus características morfológicas NSOs (Fig. 6A) y células no neuronales (células respiratorias epiteliales) (Fig. 6B). Se selló una micropipeta de vidrio para *patch-clamp* en estas células y ejerciendo presión negativa se extrajeron sus citoplasmas. Las puntas de las micropipetas, que contenían el material extraído, se quebraron dentro de un tubo de 200  $\mu$ l *DNasa/RNasa free* el cual contenía 16  $\mu$ l de Solución A (tabla 4).



**Fig. 6: Células disociadas a partir de EO de rata.** En la figura se observa una NSO (6A) y una célula respiratoria epitelial (6B), seleccionadas luego de disociar mecánicamente EO.

Solución A	Volumen ( $\mu$ l)
1,25 X Buffer PCR (10X), [200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl] (Invitrogen)	2
6,25 mM MgCl <sub>2</sub> (50 mM) (Invitrogen)	2
8 Unidades RNasin (40U/ $\mu$ l) (Promega)	0,20
2 mM DTT (0,1 M) (Invitrogen)	0,32
Agua tratada con DEPC (Invitrogen)	11,48

**Tabla 4: Componentes Solución A RT-PCR anidado de célula única.** En la tabla se indican los componentes, concentraciones y volúmenes de la solución A (Tong y cols., 1994).

#### Tratamiento con DNasa:

Con el objetivo de eliminar el DNA proveniente de los núcleos cosechados, realizamos un tratamiento con DNasa (Promega, 1U/ $\mu$ l) agregando 1 unidad de la enzima al tubo que contiene las células cosechadas en solución A. Luego incubamos a 37°C por 40 min y a 65°C por 10 min. Esta última incubación tiene el objetivo de inactivar la reacción.

#### Retrotranscripción:

El proceso de retrotranscripción se realizó agregando 4  $\mu$ l de mezcla RT (tabla 5) al tubo que contenía las células tratadas con DNasa. La mezcla se incubó a 42°C por 30 min. Para detener la reacción se incubó a 75°C por 5 min.

De forma paralela se separó una alícuota en la cual se sustituyó la enzima transcriptasa reversa por H<sub>2</sub>O tratada con DEPC, para verificar que no hubiera contaminación con DNA genómico que pudiera arrojar falsos positivos.

Mezcla RT	Volumen ( $\mu$ l)
250 ng Random primer (3 $\mu$ g/ $\mu$ l) (Invitrogen)	0,2
DNTPs (10 mM) (Invitrogen)	1
40 Unidades RNAsin (40 U/ $\mu$ l) (Promega)	1
200 Unidades transcriptasa reversa (Superscript III, Invitrogen)	1
Agua tratada con DEPC (Invitrogen)	0,8

**Tabla 5: Componentes mezcla RT para RT-PCR de célula única.** En la tabla se indican los componentes, concentraciones y volúmenes de la mezcla RT (Tong y cols., 1994).

Primera ronda PCR anidado:

Los 21  $\mu$ l totales obtenidos luego de la retrotranscripción se alicuotaron en 3 tubos de 200  $\mu$ l DNasa/Rnasa free, cada uno de los cuales contenía 7  $\mu$ l de la solución obtenida.

En la primera ronda de PCR (tabla 6) utilizamos los partidores F1 y R1 correspondientes a CICa, y a los controles CNGA2 (control positivo) y mBest2 (canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> expresado en NSO de ratón), con un volumen final de reacción de 30  $\mu$ l.

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l) por muestra
Producto RT	7
1X Buffer PCR (10X) (Invitrogen)	3
0,2 mM dNTPs (10mM) (Invitrogen)	0,6
Partidor <i>Forward</i> (10 $\mu$ M) (IDT)	0,5
Partidor <i>Reverse</i> (10 $\mu$ M) (IDT)	0,5
Taq polimerasa (6U/ $\mu$ l) (Invitrogen)	0,2
Agua tratada con DEPC (Invitrogen)	18,2

**Tabla 6: Protocolo primera ronda de PCR anidado de célula única:** en la tabla se observan los volúmenes de cada uno de los componentes utilizados para llevar a cabo la primera reacción de PCR.

Segunda ronda PCR anidado:

En la segunda ronda de PCR (tabla 7) se utilizó como sustrato el producto de la primera ronda, para lo cual, en este caso, utilizamos los partidores F2 y R2 de C1Ca, CNGA2 y mBest2. Utilizamos un volumen final de reacción 20  $\mu$ l.

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l) por muestra
Producto primera ronda PCR	10
1X Buffer PCR (10X) (Invitrogen)	2
MgCl <sub>2</sub> (50 mM) (Invitrogen)	0,6
dNTPs (10 mM) (Invitrogen)	0,4
Partidor <i>Forward</i> (10 $\mu$ M) (IDT)	0,35
Partidor <i>Reverse</i> (10 $\mu$ M) (IDT)	0,35
Taq polimerasa (6U/ $\mu$ l) (Invitrogen)	0,2
Agua tratada con DEPC (Invitrogen)	6,1

**Tabla 7: Protocolo segunda ronda de PCR anidado de célula única:** en la tabla se observan los volúmenes de cada uno de los componentes utilizados para llevar a cabo, a partir de la primera ronda, la segunda reacción de PCR.

Para realizar ambas reacciones de PCR se utilizó la misma enzima “Taq platinum”, (INVITROGEN).

La denaturación en ambas rondas tuvo una duración de 30 s; por su parte el apareamiento tuvo una duración de 45 s para la primera ronda y 30 s para la segunda; por último la extensión de los partidores tuvo una duración de 1 min para la primera ronda y 30 s para la segunda. La primera y segunda ronda de PCR se realizó con 40 ciclos cada una.

## **4.2 *Secuenciación del amplicón ClCa.***

### **4.2.1 *Extracción de DNA a partir de geles.***

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

### **4.2.2 *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/>).

### **4.2.3 *Análisis del amplicón secuenciado.***

El análisis del amplicón secuenciado se realizó utilizando el programa “Genious Basic 3.7.1” (Drummond y cols., 2009). Los alineamientos entre la secuencia nucleotídica del amplicón obtenido y las secuencias ClCa2 y ClCa4l se realizaron utilizando el programa “Clustal W” contenido dentro del programa anteriormente mencionado.

**4.3 Determinación de la expresión del mRNA de ClCa2 y ClCa4l en EO y en NSOs de rata**

**4.3.1 Diseño de partidores ClCa2 y ClCa4l.**

El diseño y análisis de los partidores específicos para ClCa2 (Tabla 8) y ClCa4l (Tabla 9) se realizó utilizando el programa *on-line* “NCBI Primer-BLAST” ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)).

**Partidores ClCa2**

Partidores	Forward 1 (F1)	Reverse 1 (R1)	Forward 2 (F2)	Reverse 2 (R2)
Secuencia partidor (5' - 3')	tgctgacaattgggggta	tgcaagggtfacaacgatca	tcaatgtctgctgtcaacaa	gctcttgactgacatatgcgtt
Posición de hibridación	2682-2702	3239-3258	2805-2825	3018-3040
Tm (°C)	54,1	54,4	54,7	55,6
%GC	42,9	45	42,9	43,5
Tamaño partidor (pb)	21	20	21	23
Tamaño amplicón (pb)	577		236	

**Tabla 8: información de partidores ClCa2.** En la tabla se muestra la información de los 2 pares de partidores (F1, R1, F2, R2) utilizados para amplificar cDNA del canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup>, ClCa2. Los partidores externos F1 y R1 son los encargados de amplificar el segmento dentro del cual se encuentra la zona amplificada por los partidores internos (F2 y R2) en una segunda ronda de PCR. Tm: Temperatura de hibridación; %GC: porcentaje Guanina-Citosina.

## Partidores ClCa4l

Partidores	Forward 1 (F1)	Reverse 1 (R1)	Forward 2 (F2)	Reverse 2 (R2)
Secuencia partidor (5' - 3')	agagcaaagccctggagatt	gctgtatctgccgtttccat	ctctgttcgccttcagatcc	gagcaccaggggtgactgat
Posición de hibridación	1501-1520	2047-2066	1688-1707	1957-1976
T <sub>m</sub> (°C)	56,4	55,4	55,3	55,4
%GC	50	50	55	50
Tamaño partidor (pb)	20	20	20	20
Tamaño amplicón (pb)	566		289	

**Tabla 9: información de partidores ClCa4l.** En la tabla se muestra la información de los 2 pares de partidores (F1, R1, F2, R2) utilizados para amplificar cDNA de ClCa4l.

### 4.3.2 PCR anidado en EO de rata.

Extracción de RNA de EO:

La extracción de RNA de EO y cerebro (control positivo) 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).

Los animales fueron obtenidos del vivero de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las ratas machos *Sprague Dawley* entre 18 y 30 días, fueron sacrificadas 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.

### Retrotranscripción:

El proceso de retrotranscripción se realizó con los RNA extraídos de EO y cerebro. Utilizamos la enzima “MLV-Reverse Transcriptase” (INVITROGEN) (Tabla 10). Cada muestra de tejido incluyó un control RT- (retrotranscriptasa negativo), en el cual se substituyó la enzima por H<sub>2</sub>O tratada con DEPC para verificar que no hubiera contaminación con DNA genómico.

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

**Tabla 10: Componentes mezcla de retrotranscripción.** En la tabla 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 min.

Primera ronda PCR anidado:

La concentración de cDNA utilizada en la primera ronda de PCR fue de 2 µg totales en un volumen final de reacción de 30 µl. Esta reacción se realizó utilizando los partidores F1 y R1 para ClCa2 y ClCa4l respectivamente junto con los componentes ilustrados en la tabla 11.

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

**Tabla 11: Componentes de la mezcla para la primera ronda de PCR anidado:** en la tabla se observan los volúmenes de cada uno de los componentes utilizados para llevar a cabo la primera reacción de PCR.

Segunda ronda de PCR anidado:

En la segunda ronda de PCR se utilizó como sustrato el producto de la primera ronda de PCR, para lo cual usamos los partidores F2 y R2 respectivos para ClCa2 y ClCa4l. Trabajamos con una dilución 1:50 y un volumen final de 30 µl, siguiendo el protocolo descrito en la tabla 12.

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

**Tabla 12: Componentes de la mezcla para la segunda ronda de PCR anidado:** al igual que en la tabla 11, 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 utilizamos la enzima “Taq DNA polimerasa”, (INVITROGEN). La denaturación en ambas rondas tuvo una duración de 30 s; por su parte el apareamiento tuvo una duración de 45 s en la primera ronda y 30 s en la segunda; por último la extensión de los partidores usados tuvo una duración de 1 minuto para la primera ronda y 30 s para la segunda. Cada una de las rondas de PCR se realizó con 40 ciclos.

#### *4.3.3 Relación de abundancia relativa entre mRNA de ClCa2 y ClCa4l en EO de rata.*

Para estudiar la relación de abundancia relativa entre ClCa2 y ClCa4l utilizamos la técnica de PCR anidado, para lo cual usamos cDNA de EO. La primera ronda de PCR se realizó con un total de 30 ciclos, en la que usamos los partidores F1 y R1 correspondientes a ClCa2 (tabla 8) y ClCa4l (tabla 9). Posteriormente hicimos una segunda ronda de PCR, utilizando como sustrato el producto de la primera ronda y los respectivos partidores F2 y R2 para ClCa2 y ClCa4l. De esta última obtuvimos muestras en los ciclos 5, 10, 15, 20, 25, 30, y 35. Ambas rondas se realizaron de acuerdo a lo especificado en el punto 4.3.2.

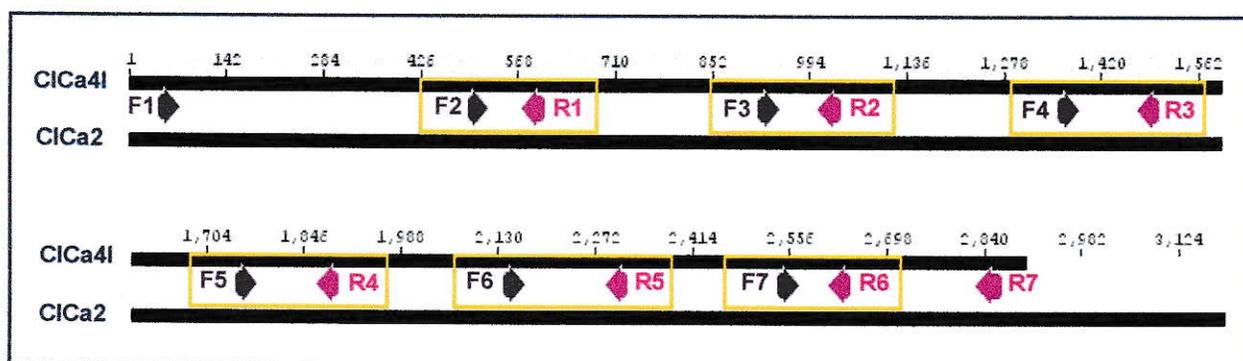
#### *4.3.4 RT-PCR anidado de célula única.*

La reacción de PCR anidado de célula única en NSOs se realizó siguiendo el protocolo descrito en el punto 4.1.2. En este caso utilizamos los respectivos partidores F1, R1 y F2, R2 respectivos a ClCa2 y ClCa4l.

#### 4.4 Obtención de la secuencia nucleotídica completa del canal ClCa más abundante en EO de rata.

##### 4.4.1 Diseño de partidores.

Con el fin de obtener con exactitud la secuencia completa del más abundante de los dos canales ClCa expresado en EO, diseñamos 7 pares de partidores consecutivos y sobrepuestos (Fig. 7) de aproximadamente 500 pb cada uno (Tabla 13), que abarcan los 2900 pb de longitud donde se alinean los mRNA de ClCa2 y ClCa4l. Mediante PCR y utilizando cDNA de EO de rata, amplificamos, purificamos y secuenciamos dichos segmentos.



**Fig. 7: Diseño de partidores genéricos ClCa2/ClCa4l.** En la figura se esquematizan los 7 pares de partidores diseñados para amplificar y así obtener la secuencia del canal ClCa más abundante en EO de rata. Las flechas lila corresponden a cada uno de los partidores *forward* en tanto que las flechas rosa corresponden a los partidores *reverse*. La zona entre los partidores *Forward*<sub>(n+1)</sub> y *Reverse*<sub>(n)</sub> dentro de las cajas amarillas corresponden a las secuencias en donde los partidores consecutivos se sobrepone. Esto nos ayudará a armar la secuencia completa del mRNA en el momento de secuenciar cada uno de los fragmentos. La figura se realizó utilizando el programa “Genious Basic 3.7.1” (Drummond y cols., 2009).

Partidor	Secuencia	Posición Hibridación	T <sub>m</sub> (°C)	%GC	Fragmento Amplificado (pb)	Largo del fragmento (pb)
F1	ttcctcacccctgcattctctt	48-67	55,8	50	48-600	552
R1	tgccagtgatgtcagtagaaca	579-600	55,9	45,4		
F2	cgggtggggagtattgatga	500-519	54,3	50	500-1033	533
R2	tacagctctgctgcttggtt	1013-1033	56,8	50		
F3	tcaagtcagacagcgagtg	925-944	56,9	55	925-1498	574
R3	aactgcagagcctgctggg	1480-1498	60,6	63,2		
F4	cccagaaactggagactctg	1363-1382	56,7	60	1363-1890	527
R4	cccgtgcatacacaatc	1871-1890	53,9	50		
F5	aaggggggtcaaacctcagtt	1752-1771	56,4	50	1752-2313	561
R5	tactgggtgggaacacatga	2294-2313	55,8	50		
F6	cctggctacgttgaatga	2142-2161	52,9	45	2142-2638	497
R6	aagttgacagcctgtgcat	2619-2638	57,2	50		
F7	aatagaaaacggcaccaga	2543-2562	54,2	45	2543-2859	316
R7	gactcagataggaaattgacag	2838-2859	50,5	40,9		

**Tabla 13: Información de partidores genéricos C1Ca2/C1Ca4l.** En la tabla se muestra la información de los 7 pares de partidores utilizados para obtener la secuencia nucleotídica completa del amplicón C1Ca más abundante en EO de rata (C1Ca4l ó alguna isoforma de este). Al igual que en la figura 7, los partidores *Forward* están representados en color lila y los *Reverse* en rosa.

#### *4.4.2 Reacción de PCR.*

El protocolo utilizado en la retrotranscripción del mRNA obtenido desde EO y cerebro (control positivo) de rata fue el mismo utilizado en el punto 4.3.2.

Las reacciones de PCR contaron con una ronda de 40 ciclos y un volumen final de 30 µl basado en el protocolo descrito en el punto 4.3.2, ítem “primera ronda del PCR anidado”. En esta reacción se utilizó la enzima “Taq DNA polimerasa”, (INVITROGEN). La denaturación tuvo una duración de 30 s, en tanto que el apareamiento y la extensión tuvieron una duración de 45 s y 1 min, respectivamente.

#### *4.4.3 Purificación de los productos de PCR.*

El producto de PCR de cada uno de los fragmentos fue purificado utilizando “Qiaquick PCR Purification Kit” (Qiagen). Antes de purificar dichos productos verificamos que estos sólo presentaran el amplicón esperado, para lo cual corrimos 10 µl de cada una de las muestras en geles de agarosa al 1,5%.

#### *4.4.4 Secuenciación de DNA purificado.*

Al igual que en el punto 4.2.2, el extracto de cDNA purificado y el partidor *forward*, se enviaron a la empresa “Macrogen” (Corea), donde se efectuó la secuenciación de la muestra.

#### *4.4.5 Análisis de los amplicones secuenciados.*

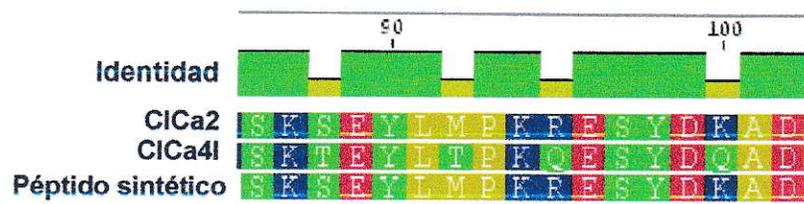
El análisis de los amplicones secuenciados y el posterior alineamiento con los canales en estudio ClCa2 y ClCa4l, se realizó utilizando el programa “Genious Basic 3.7.1” (Drummond y cols., 2009).

#### 4.5 Generación de un anticuerpo monoclonal anti-CiCa.

En el año 2005, Yamazaki y cols. generaron un anticuerpo anti-CiCa2 basado en la región amino terminal de este canal, para lo cual utilizaron un péptido sintético cuya secuencia es SKSEYLMFKRESYDKAD. Realizando un alineamiento entre la secuencia de este péptido sintético y la secuencia aminoacídica del canal CiCa4l, encontramos un 76% de identidad entre ambas secuencias (Fig. 8). Esto lo convierte en un buen candidato para elaborar un anticuerpo anti-CiCa, ya que permitiría inmunodetectar cualesquiera de estos dos canales.

Para producir el anticuerpo anti-CiCa, se inmunizaron ratones con el péptido sintético acoplado a una proteína portadora, se aislaron los linfocitos B y se fusionaron con células tumorales para formar hibridomas, células inmortales capaces de producir anticuerpos constantemente. La identificación de los hibridomas que secretan anticuerpos específicos anti-CiCa se realizó mediante un ELISA, en el cual se ensayaron los anticuerpos de los diferentes hibridomas, usando como antígeno el péptido sintético acoplado a una proteína portadora diferente de la usada en las inmunizaciones. Los hibridomas seleccionados se mantuvieron en cultivo con el objetivo de obtener una producción constante de anticuerpos para realizar experimentos posteriores.

Este anticuerpo se produjo en el laboratorio de Inmunología de la Profesora María Rosa Bono.



**Fig. 8: alineamiento aminoacídico entre ClCa2, ClCa4l y péptido sintético.** Como podemos observar, de los 17 aminoácidos que posee el péptido sintético, 13 residuos permanecen conservados en la secuencia del canal ClCa4l (representado en verde en la barra de identidad), mientras que 4 residuos no se encuentran conservados (representados en color mostaza en la barra de identidad). De los 4 residuos no conservados, uno de ellos mantiene su carácter polar (residuo tres), mientras que los otros tres presentan un cambio de apolar a polar (residuo 7) y de básico a polar (residuo 10 y 15). 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. El alineamiento se realizó utilizando el programa “Genious Basic 3.7.1” (Drummond y cols., 2009).

#### **4.6 Determinación de la expresión de ClCa en cilios de NSOs de rata.**

##### ***4.6.1 Experimentos de Western Blot.***

Para determinar la expresión de ClCa (ClCa2 y/o ClCa4l) en cilios de neuronas olfatorias realizamos experimentos de western blot con extractos ciliares de NSOs utilizando el anticuerpo anti-ClCa referido en el objetivo anterior. Para la obtención del extracto purificado de cilios de NSOs, utilizamos la técnica descrita por Saavedra y cols, (2008). Esta técnica consiste básicamente en aislar muestras de EO completo de rata, las cuales se someten a una serie de centrifugaciones diferenciales, obteniéndose como resultado una preparación altamente enriquecida en proteínas ciliares de NSOs. Como control utilizamos muestras de epitelio olfatorio desciliado, con el fin de determinar si el(los) canal(es) de Cl<sup>-</sup> se expresa(n) solo en cilios, o si también lo hace(n) en el soma de las NSOs y en el resto de las células que conforman el EO de rata (células basales y sustentaculares). La muestra de epitelio desciliado es posible aislarla a partir de uno de los pasos en la obtención del extracto purificado de cilios. También utilizamos como control muestras de epitelio olfatorio completo, cerebro (control positivo) e hígado (control negativo), las que obtuvimos utilizando “ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent” (Fermentas), según las instrucciones del fabricante.

Teniendo en cuenta que las proteínas ClCa2 y ClCa4l tienen un peso aproximado de 100 KDa, realizamos la electroforesis en geles al 8% para facilitar la migración de las proteínas más grandes. Por su parte utilizamos como control de carga  $\beta$ -actina, que posee un peso de 42 KDa, para lo cual usamos geles al 10% con el fin de obtener mayor

resolución en la separación de proteínas pequeñas. Los detalles de la preparación de los geles se observan en la tabla 14.

	<b>Componentes</b>	<b>Gel 8% (ml)</b>	<b>Gel 10% (ml)</b>
<b>Separador</b>	30% Acrilamida / 0,8% Bisacrilamida	4	5
	4*Tris Cl/SDS pH 8.8	3,75	3,75
	APS (10%)	0,05	0,05
	TEMED	0,02	0,02
	H <sub>2</sub> O bidestilada	7,25	6,25
<b>Concentrador</b>	30% Acrilamida / 0,8% Bisacrilamida	0,65	
	4*Tris Cl/SDS pH 6.8	1,25	
	APS (10%)	0,025	
	TEMED	0,01	
	H <sub>2</sub> O bidestilada	3,05	

**Tabla 14: Componentes de geles para western blot 8 y 10%.** En la tabla se detallan los componentes y los volúmenes utilizados en la preparación del gel separador (8 y 10%) y concentrador.

La determinación de proteínas se realizó utilizando el método colorimétrico de Hartree (1972). Se cargaron 50 µg de extracto de proteínas en un volumen final de 30 µl las cuales fueron previamente calentadas a 95°C por 5 min. Una vez cargadas las proteínas en el gel, procedimos a separarlas en base a su peso molecular, para lo cual utilizamos tampón de corrida pH 8,3 (tris-base; glicina; SDS; H<sub>2</sub>O bi-destilada). Habiendo finalizada la separación de las proteínas, procedimos a transferirlas a un papel de nitrocelulosa, para lo cual usamos tampón de electrotransferencia pH 8,3 (tris-base; glicina; metanol; H<sub>2</sub>O bi-destilada).

En el caso de los geles hechos al 8%, incubamos la membrana de nitrocelulosa con anticuerpo anti-CiCa diluido 1:200 en solución de bloqueo (leche descremada en polvo al 5% en PBS 1X + tween 0,1%). Por su parte, para los geles hechos al 10% utilizamos el anticuerpo anti β-actina (Sigma, N° catálogo: A3853), diluido 1:250 también en solución de bloqueo.

Debido que ambos anticuerpos fueron hechos en ratón, utilizamos el anticuerpo secundario Goat anti-mouse IgG-HRP (Thermo Scientific. Número de catálogo: 31430) diluido 1:10000 en solución de bloqueo.

Revelamos las membranas incubándolas durante 1 minuto en solución ECL (Thermo. Número de catálogo: 32106), posteriormente las expusimos en un cassette junto con el film de revelado durante 30 min en el caso de las membranas incubadas con anticuerpo anti-CiCa y 10 min en el caso de las membranas incubadas con anticuerpo anti β-actina. Por último y para observar las proteínas, incubamos los films en solución de revelado y posteriormente en solución de fijación.

**4.7 *Determinación de la expresión del mRNA de TMEM16A y TMEM16B en EO de rata y ratón.***

**4.7.1 *Diseño de partidores TMEM16A y TMEM16B.***

El diseño y análisis de los partidores específicos para TMEM16A (GeneID: 309135; tabla 15) y TMEM16B (GeneID: 243634; Tabla 16) se realizó utilizando el programa *on-line* “NCBI Primer-BLAST” ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)).

<b>Partidores</b>	<b>Forward TMEM16A</b>	<b>Reverse TMEM16A</b>
<b>Secuencia partidor (5'- 3')</b>	GCCATCAGAGCCAAAGACAT	TACTCGTAGCTGGGGACTGG
<b>Posición de hibridación</b>	2541-2560	3135-3154
<b>Tm (°C)</b>	60	60
<b>%GC</b>	50	60
<b>Tamaño partidor (pb)</b>	20	20
<b>Tamaño amplicón (pb)</b>	614	

**Tabla 15: información de partidores TMEM16A.** Esta tabla muestra la información de los partidores utilizados para amplificar cDNA de TMEM16A: Secuencia de los partidores; posición de hibridación de cada partidor al cDNA; Tm (Temperatura de hibridación); %GC (porcentaje Guanina-Citosina); largo de los partidores y largo del segmento de cDNA amplificado.

<b>Partidores</b>	<b><i>Forward</i> TMEM16B</b>	<b><i>Reverse</i> TMEM16B</b>
<b>Secuencia partidor (5' - 3')</b>	TGCAACAGCAGTCATCATCA	TGCTCTGGACGTTTTGAGTG
<b>Posición de hibridación</b>	2047-2066	2468-2487
<b>Tm (°C)</b>	54,7	55,3
<b>%GC</b>	45	50
<b>Tamaño partidor (pb)</b>	20	20
<b>Tamaño amplicón (pb)</b>	441	

**Tabla 16: información de partidores TMEM16B.** Al igual que en la tabla 15 se ilustra la información referente a los partidores TMEM16B.

#### 4.7.2 Reacciones de PCR en EO de rata y ratón.

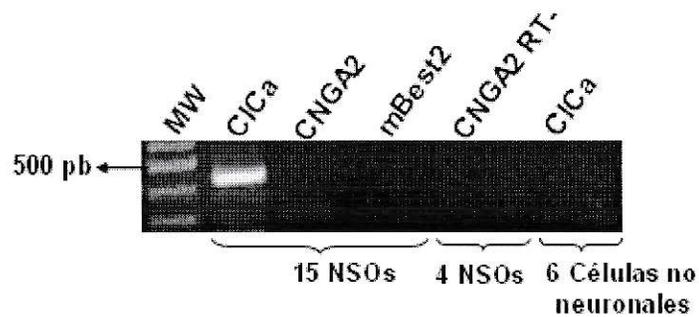
La obtención de cDNA a partir de EO de rata y ratón, y las rondas de PCR se realizaron según lo descrito en el ítem 4.3.2 (extracción de RNA a partir de EO, retrotranscripción y primera ronda de PCR). Las reacciones de PCR contaron con una ronda de 35 ciclos y un volumen final de 30  $\mu$ l. La denaturación tuvo una duración de 30 s, en tanto que el apareamiento y la extensión tuvieron una duración de 45 s y 1 min respectivamente.

Las ratas utilizadas fueron machos *Sprague Dawley* entre 18 y 30 días, mientras que los ratones fueron machos adultos *Balb/c* de 30 días.

## RESULTADOS

### *5.1 ClCa se expresa en NSOs de rata*

Con el fin de determinar la expresión de ClCa2 y/o ClCa41 en NSOs extrajimos mRNA de 15 NSOs, con las que realizamos la técnica de RT-PCR anidado de célula única (ver Materiales y Métodos, sección 4.1.2), utilizando los partidores genéricos ClCa capaces de amplificar ClCa2 y/o ClCa41 (ver Materiales y Métodos, sección 4.1.1). Por otro lado, quisimos comprobar si el canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> perteneciente a la familia de las bestrofinas, mBest2, presente en NSOs de ratón (Pifferi y cols., 2006), se expresaba también en NSOs de rata, por lo que utilizamos los partidores específicos para mBest2 (Tabla 3). Como control positivo usamos CNGA2, expresado específicamente en cilios olfatorios y botón dendrítico (Tabla 2). Con el fin de comprobar si los canales ClCa son exclusivos de NSOs de rata, extrajimos mRNA de 6 células no neuronales (células respiratorias epiteliales) desde EO de rata y realizamos la técnica de RT-PCR anidado de célula única. Como se observa en la figura 9, ClCa se expresa en neuronas olfatorias, pero no en células no neuronales. Por su parte, observamos una señal de CNGA2 (control positivo) aunque bastante diluida en comparación con ClCa. Por último, y tal como ocurrió en tejido de EO (Carolina González Silva, Memoria en Ingeniería en Biotecnología Molecular, 2009), mBest2 no se detectó en NSOs de rata.

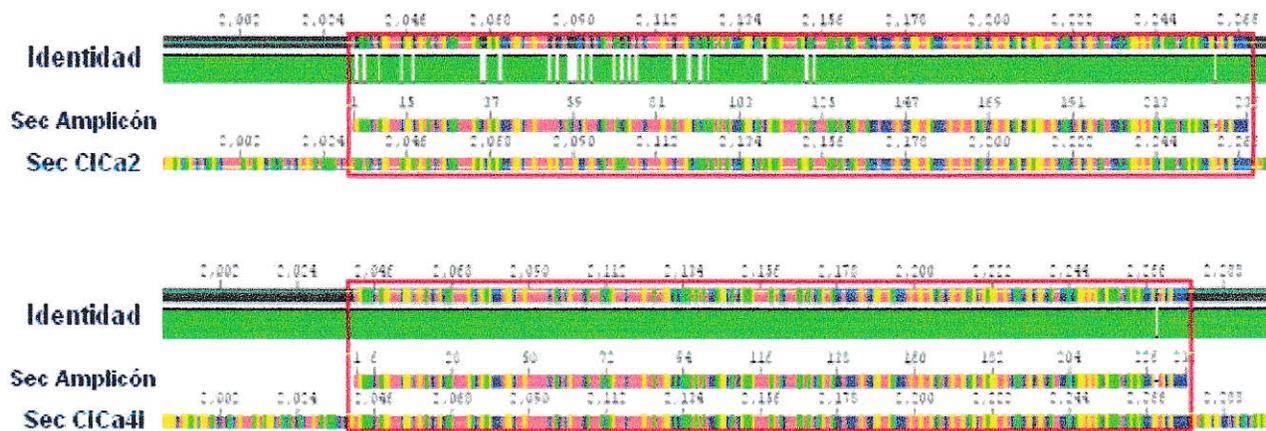


**Fig. 9: Expresión de C1Ca de NSOs.** El mRNA cosechado a partir de 15 NSOs fue utilizado en la técnica de RT-PCR anidado de célula única. En este caso usamos los partidores C1Ca, CNGA2 (control positivo) y mBest2 (canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> presente en NSOs de ratón). El mRNA de 6 células no neuronales también fue cosechado, para lo cual utilizamos los partidores C1Ca. CNGA2 RT-: muestra libres de retrotranscriptasa reversa. MW: Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas). La banda destacada corresponde a 500 pb. (N = 3).

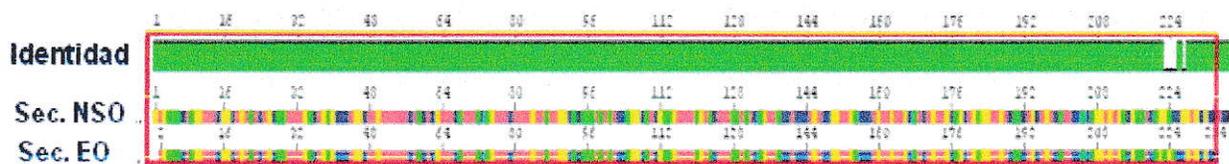
### 5.2 ClCa4l se expresa en EO y en NSOs de rata

El amplicón ClCa obtenido en el punto anterior (Fig. 9) se purificó y se sometió a secuenciación (ver Materiales y Métodos, sección 4.2.2). El alineamiento nucleotídico entre el amplicón obtenido y las secuencias publicadas de los canales ClCa2 y ClCa4l (Fig. 10) reflejó que éste corresponde a ClCa4l, con el cual presentó un 99% de identidad versus el 88% presentado con ClCa2.

Este resultado es similar al que obtuvimos al secuenciar el amplicón ClCa obtenido a partir de EO de rata, el cual también presentaba un 99% de identidad con el canal ClCa4l y un 88% con ClCa2 (Carolina González Silva, Memoria en Ingeniería en Biotecnología Molecular, 2009). Al alinear los amplicones ClCa obtenidos a partir de EO y NSOs de rata, apreciamos que presentan un 98% de identidad, lo cual nos indica que efectivamente estamos secuenciado el mismo canal (Fig. 11).



**Fig. 10: alineamiento nucleotídico entre el amplicón CICa y las secuencias de CICa2 y CICa4l.** Luego de obtenida la secuencia del amplicón CICa expresado en NSOs de rata, procedimos a realizar los alineamientos con las secuencias nucleotídicas de los canales CICa2 y CICa4l. La identidad se representa en verde cuando los nucleótidos alineados se encuentran conservados. Como podemos observar, solo un nucleótido no se encuentra conservado al realizar el alineamiento entre la secuencia del amplicón CICa y la secuencia de CICa4l. Las zonas acotadas en los segmentos rojo en ambos alineamientos representan la región secuenciada a partir del cebador *reverse*, que en las secuencias nucleotídicas de los canales CICa corresponde a la región comprendida entre las bases 2032 y 2266. Los residuos rosados representan nucleótidos de Adenina, los azules de Citosina, los amarillos de Guanina y los verdes de Timina. Esta nomenclatura rige también para la figura 11. La figura se realizó utilizando el programa “Genious Basic 3.7.1 (Drummond y cols., 2009)”.



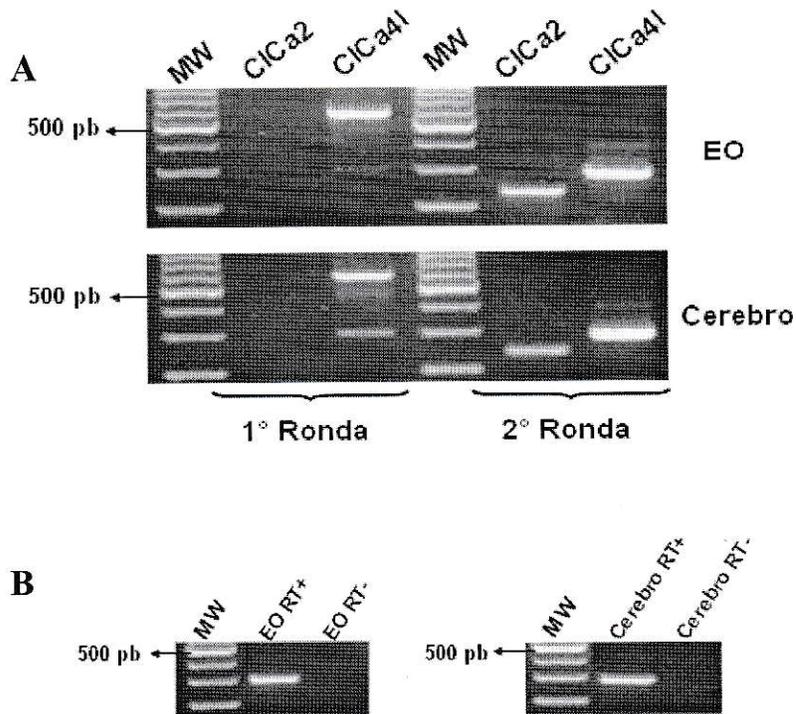
**Fig. 11: alineamiento nucleotídico entre el amplicón ClCa obtenido a partir de NSOs y EO de rata.**

Teniendo las secuencias nucleotídicas de los amplicones ClCa obtenidos a partir de EO (Carolina González Silva, Memoria en Ingeniería en Biotecnología Molecular, 2009) y NSOs de rata, decidimos alinear ambas secuencias para verificar que se tratara del mismo amplicón. Ambas secuencias presentan un 98% de identidad, lo cual sugiere que efectivamente corresponden al mismo canal (ClCa4l). La zona acotada por el segmento rojo representa la región secuenciada por el cebador *Reverse*. La figura se realizó utilizando el programa "Genious Basic 3.7.1 (Drummond y cols., 2009)".

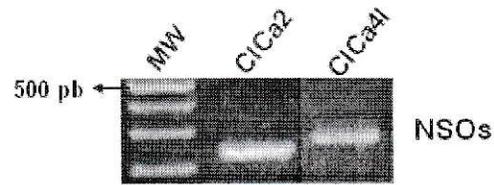
### 5.3 ClCa2 se expresa en EO y en NSOs de rata.

Como mencionamos anteriormente, la secuenciación realizada en el punto anterior no es excluyente ya que en esta técnica se secuencia el amplicón más abundante. Por este motivo, diseñamos partidores específicos capaces de amplificar cDNA de ClCa2 y ClCa4l respectivamente (ver Materiales y Métodos, sección 4.3.1). Esto con el objetivo de corroborar, mediante la técnica de PCR anidado en EO y RT-PCR anidado de célula única en NSOs, si ClCa2, al igual que ClCa4l, se expresa en EO y específicamente en NSOs de rata.

Si bien ClCa2 no aparece hasta una segunda ronda de PCR, podemos observar que éste sí se expresa en EO y en cerebro (control positivo; Yoon y cols, 2006) de rata (Fig. 12.A) al igual que en NSOs (Fig. 13). Estos resultados nos indican que efectivamente ambos canales ClCa se expresan en EO y en NSOs de rata.



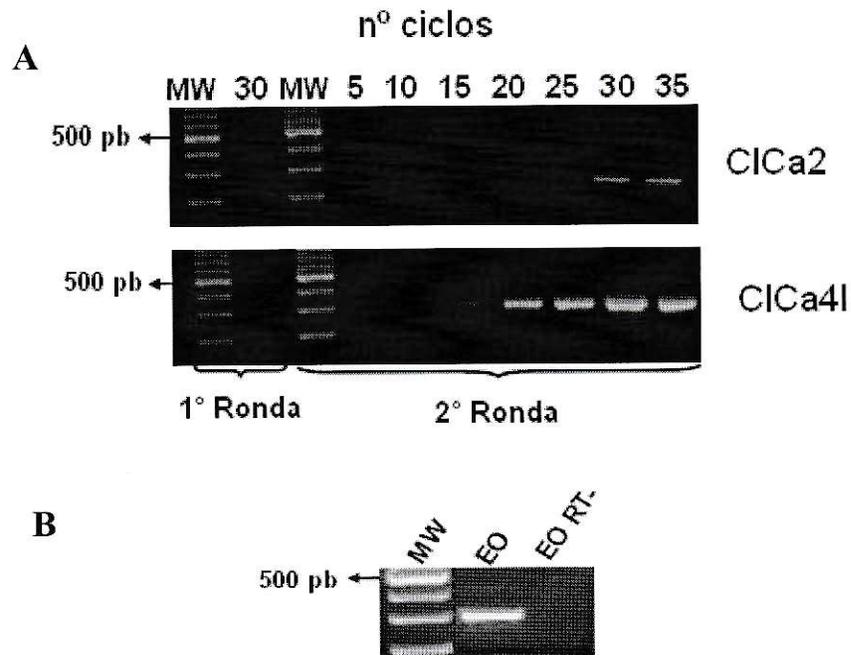
**Fig. 12: expresión de ClCa2 y ClCa4l en EO de rata. A.** Se utilizó la técnica de PCR anidado en EO y en cerebro (control positivo) de rata utilizando los partidores específicos para ClCa2 y ClCa4l. Se observan los fragmentos correspondientes a ClCa2 (236 pb) solo en la segunda ronda de PCR, mientras que los fragmentos de ClCa4l se observan tanto en la primera (566 pb) como en la segunda ronda (289 pb) de PCR. MW: marcador de peso molecular, la banda destacada corresponde a 500 pb (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas) (N=5). **B.** PCR realizado en EO y cerebro de rata utilizando el control de carga YWHAZ (287 pb). EO RT+ y Cerebro RT+: muestras de mRNA sometidas a retrotranscripción. EO RT- y Cerebro RT-: muestras de mRNA sometidas a retrotranscripción sustituyendo la enzima transcriptasa reversa por H<sub>2</sub>O tratada con DEPC.



**Fig. 13: Expresión de ClCa2 y ClCa4l en NSOs de rata.** Utilizando la técnica de RT-PCR anidado de célula única, comprobamos que tanto ClCa2 (236 pb) como ClCa4l (289 pb) se expresan en NSOs de rata. Ambos amplicones se observan luego de la segunda ronda de PCR. MW: marcador de peso molecular, la banda destacada corresponde a 500 pb (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas) (N =3).

#### 5.4 ClCa4l es el amplicon más abundante en EO de rata.

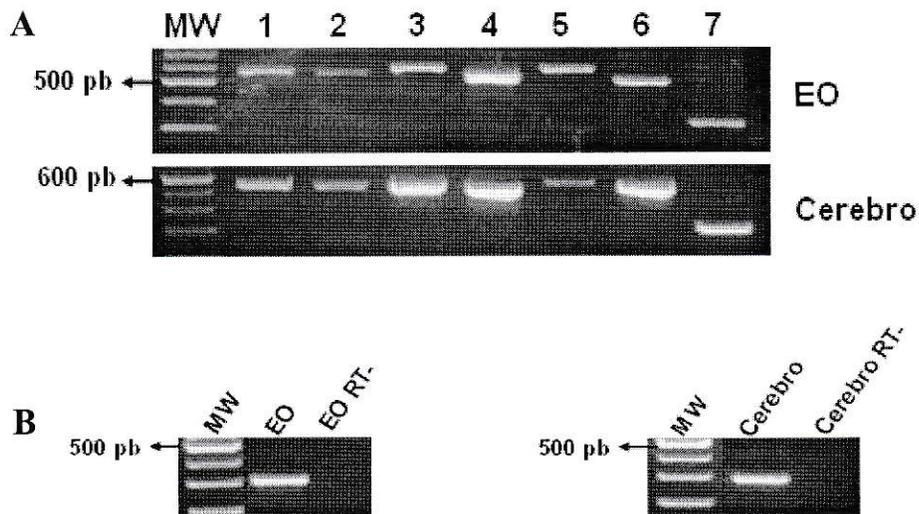
Para estudiar la abundancia relativa de los mRNA de ClCa4l y ClCa2 en EO de rata, realizamos una primera ronda de PCR de 30 ciclos, al final del cual no observamos amplificación de ClCa4l ni de ClCa2. Posteriormente, utilizando como sustrato el producto de la primera ronda, realizamos la segunda ronda correspondiente al PCR anidado. De esta última obtuvimos muestras en los ciclos 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35. Como observamos en la figura 14.A, el amplicón ClCa2 se observa desde el ciclo 25, contrastando con ClCa4l, el cual se observa desde el ciclo 15. Esto nos indica que ClCa4l se encuentra mucho más enriquecido que ClCa2 en una muestra de cDNA de EO de rata.



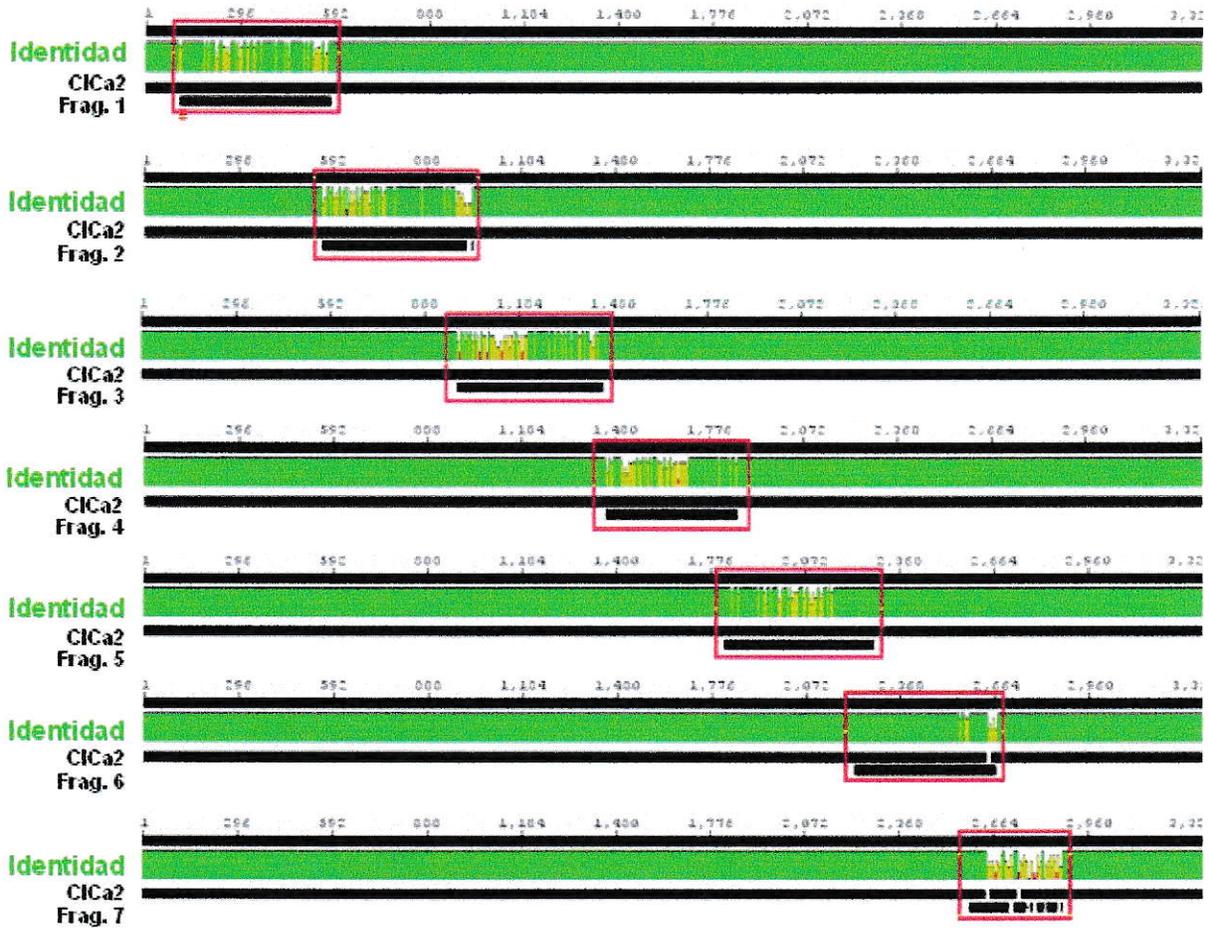
**Fig. 14: abundancia relativa de mRNA de CICa2 y CICa4I en EO de rata.** **A.** Utilizando 2000 ng de cDNA de EO de rata y los respectivos partidores F1 y R1 para cada uno de los canales en estudio, realizamos la primera de ronda de PCR con un total de 30 ciclos. En la segunda ronda utilizamos como sustrato el producto de la primera, usandouna dilución 1:50 y los partidores F2 y R2 correspondientes a CICa2 y CICa4I. Realizamos un total de 35 ciclos en la segunda ronda, a partir de la cual obtuvimos muestras en los ciclos 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35. MW: marcador de peso molecular, la banda destacada corresponde a 500 pb (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas) (N = 3). **B.** PCR en EO de rata utilizando el control de carga YWHAZ (287 pb). EO: muestras de mRNA sometidas a retrotranscripción. EO RT-: muestras de mRNA sometidas a retrotranscripción sustituyendo la enzima transcriptasa reversa por H<sub>2</sub>O tratada con DEPC.

5.5 El amplicón más abundante en EO de rata corresponde efectivamente a ClCa4l y no a una isoforma de este.

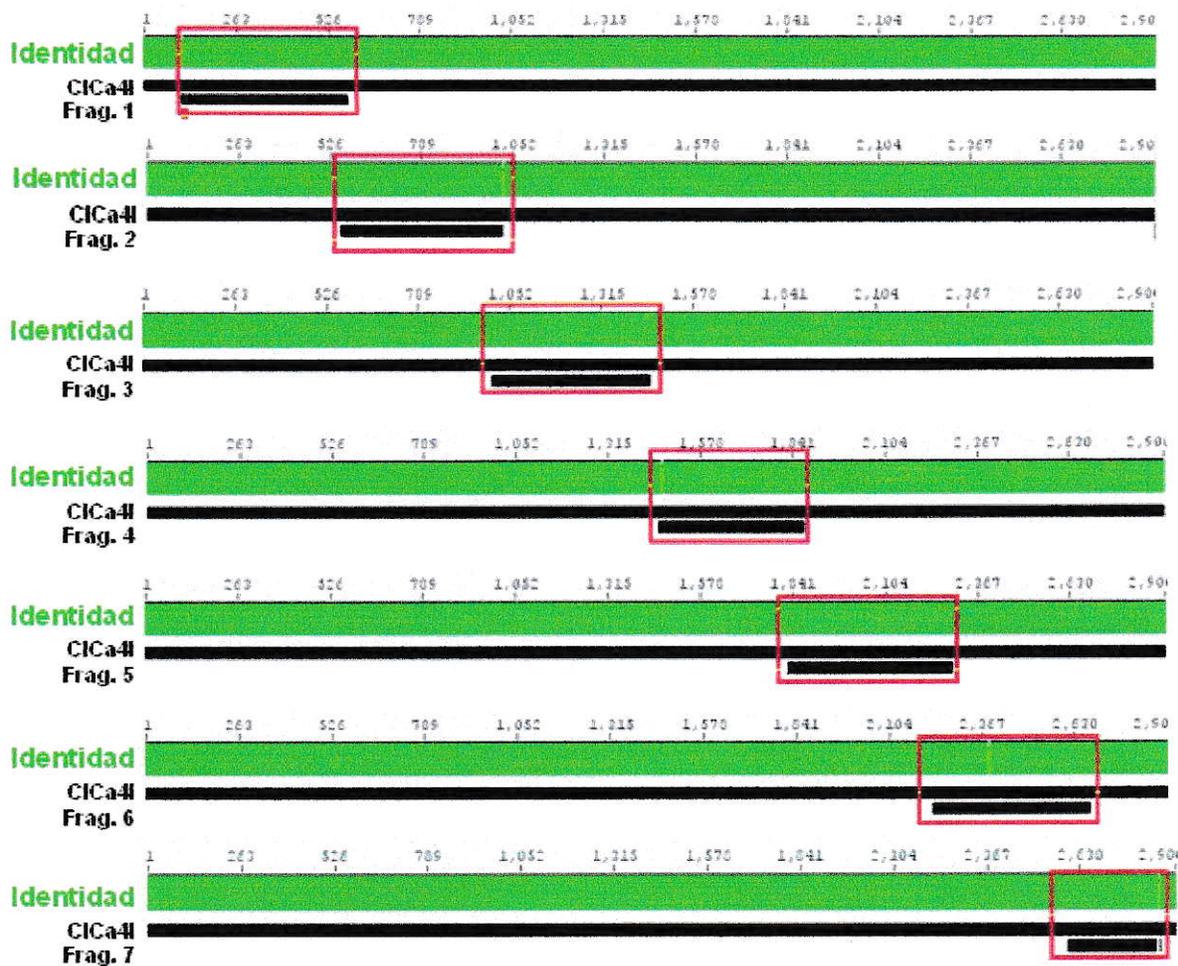
En la figura 14.A observamos que en EO ClCa4l se expresa en mayor abundancia que ClCa2. Con el objetivo de descartar que este amplicón corresponda a alguna isoforma de ClCa4l ó de ClCa2, amplificamos mediante PCR siete fragmentos consecutivos y sobrepuestos que en su conjunto abarcan la longitud completa de los canales ClCa en EO y cerebro (control positivo; Yoon y cols, 2006) de rata (Fig. 15.A). Posteriormente secuenciamos los amplicones obtenidos a partir de EO de rata y los alineamos con las secuencias publicadas de los canales en estudio, ClCa2 (Fig. 16) y ClCa4l (Fig. 17). Como observamos en la figura 17, cada uno de los amplicones secuenciados presentan un 100% de identidad con la secuencia del canal ClCa4l, contrario a lo que sucede con ClCa2 en donde se observan tanto segmentos conservados como no conservados (Fig. 16). Estos resultados confirman que el amplicón ClCa más abundante en EO de rata corresponde en toda su longitud a ClCa4l y no a una isoforma de este.



**Fig. 15: amplicones correspondientes a los 7 fragmentos del canal CICA más abundante en EO y cerebro de rata.** En la Fig. 15.A observamos los amplicones correspondientes a los 7 segmentos consecutivos y sobrepuestos (ver tabla 12) amplificados mediante la técnica de PCR en EO y de cerebro (control positivo) de rata. MW: marcador de peso molecular, la banda destacada en el caso de EO corresponde a 500 pb (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas) mientras que la banda destacada en el MW utilizado en cerebro corresponde a 600 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen) (N = 5). **B.** PCR en EO y cerebro de rata utilizando el control de carga YWHAZ (287 pb). EO y Cerebro: muestras de mRNA sometidas a retrotranscripción. EO RT- y Cerebro RT-: muestras de mRNA sometidas a retrotranscripción sustituyendo la enzima transcriptasa reversa por H<sub>2</sub>O tratada con DEPC.



**Fig. 16: Alineamientos nucleotídicos entre las secuencias de los fragmentos obtenidos y ClCa2.** Los recuadros rojo presentes en cada uno de los alineamientos, representan el fragmento alineado entre cada uno de los 7 amplicones secuenciados y ClCa2. Si analizamos la identidad en los fragmentos alineados, las barras verdes representan las zonas en donde las bases permanecen conservadas, mientras que las zonas que muestran barras color rojo y mostaza corresponden a zonas en donde existen tanto bases conservadas como no conservadas. Los alineamientos se realizaron utilizando el programa “Genious Basic 3.7.1” (Drummond y cols., 2009).



**Fig. 17: Alineamientos nucleotídicos entre las secuencias de los fragmentos obtenidos y CICA4I.** Al igual que en la figura 16, los recuadros rojos representan el fragmento alineado entre cada uno de los 7 amplicones obtenidos y la secuencia del canal CICA4I. Las barras verdes representan las zonas en donde las bases alineadas permanecen conservadas. Los fragmentos 2, 4, 6 y 7 presentan 1 de las 500 bases no conservadas (barras mostaza). Estas bases no conservadas corresponden al 0,1% del total de las bases. Los alineamientos se realizaron utilizando el programa “Genious Basic 3.7.1” (Drummond y cols., 2009).

### 5.6 ClCa se expresa en cilios de NSOs de rata

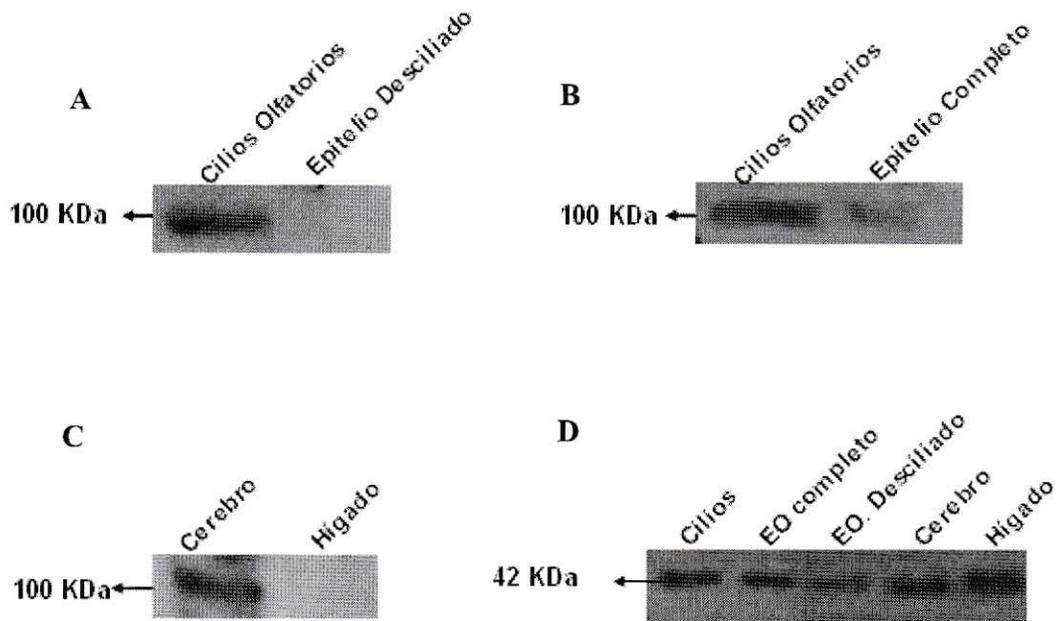
Sabiendo que el mRNA de los canales de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> ClCa4l y ClCa2 se expresan en EO y específicamente en las NSOs, el próximo paso en nuestra investigación fue estudiar la presencia de dichas proteínas en cilios de NSOs, lugar donde se produce la quimiotransducción olfatoria.

Utilizando el anticuerpo monoclonal anti-ClCa capaz de reconocer los canales ClCa2 y ClCa4l (ver Materiales y Métodos, sección 4.5) y una preparación purificada de cilios olfatorios, realizamos experimentos de *western blot*. Como controles usamos muestras de epitelio desciliado, epitelio completo, cerebro (control positivo) e hígado (control negativo).

En la Figura 18.a podemos observar la expresión de ClCa2 y/o ClCa4l en cilios de neuronas olfatorias, al contrario de lo que ocurre en epitelio desciliado (preparación de epitelio libre de cilios olfatorios), donde no se observan estos canales. Por su parte, en la Figura 18.b podemos observar que la señal presente en la preparación de epitelio olfatorio completo se ve diluida con respecto a la preparación de cilios olfatorios, posiblemente porque en esta última dichas proteínas se encuentran en mayor abundancia.

En la Figura 18.c examinamos la expresión de estos canales en cerebro (control positivo) y en hígado (control negativo). Observamos que, de acuerdo con los datos reportados en la literatura (Yamazaki y cols., 2005), ClCa2 y/o ClCa4l se expresa(n) en cerebro pero no en hígado.

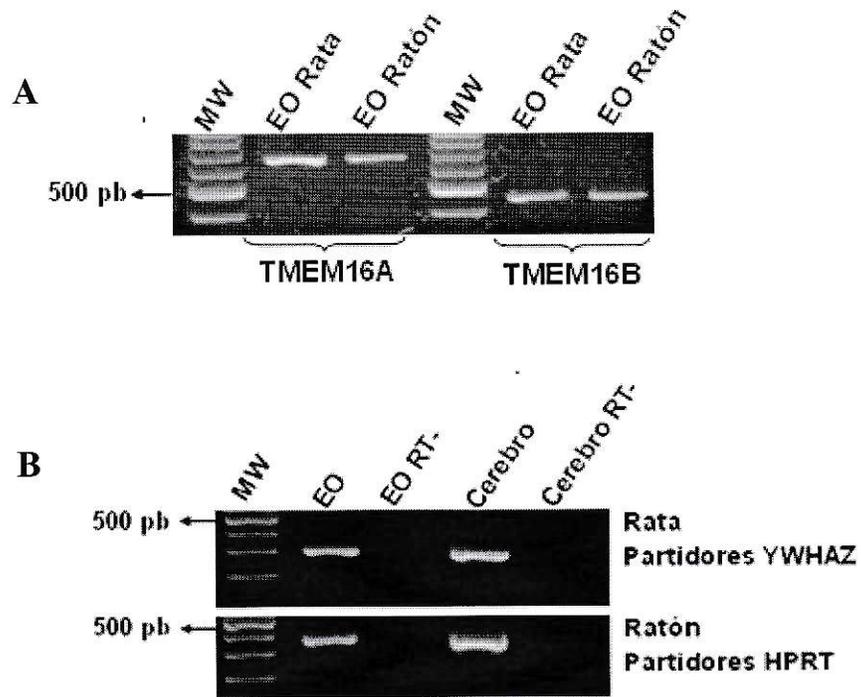
En la Figura 18.d utilizamos como control el anticuerpo anti  $\beta$ -actina, con el fin de certificar que las muestras anteriormente nombradas se encontraran en buenas condiciones y que la determinación de proteínas se hubiera realizado correctamente.



**Fig. 18: Expresión de la proteína CICa en cilios de EO de rata.** A-C: experimentos de *western blot* utilizando el anticuerpo anti-CICa (dilución 1:200). Usamos preparaciones de cilios, epitelio desciliado, epitelio completo, corazón (control positivo, Yoon y cols, 2006) e hígado (control negativo, Yoon y cols, 2006) (N =3). **D:** Western blot utilizando anticuerpo anti  $\beta$ -actina (dilución 1:250) en las preparaciones nombradas anteriormente (N = 3).

### 5.7 TMEM16B no se expresa en EO de rata

En el año 2009 Stephan y cols. propusieron a TMEM16B como el canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> responsable de la transducción olfatoria en ratón. Teniendo en cuenta que en rata se expresa el canal TMEM16A (Fig. 4), quisimos estudiar la expresión de ambos canales en EO de rata y ratón utilizando la técnica de RT-PCR. En la Figura 19.A observamos que los mRNA de los canales TMEM16A y TMEM16B se expresan en EO de ambos animales.



**Fig. 19: Expresión de TMEM16A y TMEM16B en EO de rata y ratón.** A: expresión de los mRNA de TMEM16A (614 pb) y TMEM16B (441 pb) en EO de rata y ratón. MW: marcador de peso molecular, la banda destacada corresponde a 500 pb (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas) (N = 3). B. PCR en EO y cerebro de rata y ratón utilizando el control de carga YWHAZ (287 pb) para rata y HPRT (350 pb) para ratón. EO RT+ y Cerebro RT+: muestras de mRNA sometidas a retrotranscripción. EO RT- y Cerebro RT-: muestras de mRNA sometidas a retrotranscripción sustituyendo la enzima transcriptasa reversa por H<sub>2</sub>O tratada con DEPC.

## DISCUSIÓN

El estudio de la identidad molecular de los canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  abordados en esta tesis 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 de rana chilena *Caudiverbera caudiverbera* ( $\gamma \sim 15$  pS) (Delgado y Bacigalupo, resultados no publicados) y estimaciones por análisis de ruido de corrientes macroscópicas de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  en rana *pipiens* ( $\gamma = 0.8-1.2$  pS) (Kleene and Gasteland, 1991). Dichas observaciones ponen de manifiesto la necesidad de identificar y caracterizar este canal para comprender cabalmente su participación en la quimiotransducción, ya que a pesar del importante papel que tienen estos canales en la transducción sensorial olfatoria, su identidad molecular aún no ha sido elucidada.

Para abordar este tema, durante mi Memoria de Título (Carolina González Silva, Memoria en Ingeniería en Biotecnología Molecular, 2009) realizamos una búsqueda de los canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  descritos en rata. Encontramos seis canales, cinco de los cuales pertenecen a la familia  $\text{ClCa}$  y uno a la familia  $\text{TMEM16}$  (Fig 4). Debido que, a diferencia de los demás canales,  $\text{ClCa2}$  y  $\text{ClCa4l}$  se expresan en sistema nervioso de rata, decidimos seleccionarlos como candidatos de participar en la quimiotransducción olfatoria. Teniendo en cuenta el alto porcentaje de identidad presente entre las secuencias nucleotídicas de ambos canales, diseñamos partidores capaces de amplificar cDNA de cualquiera de los dos (partidores  $\text{ClCa}$ ). Utilizando la técnica de RT-PCR anidado y secuenciando el amplicón obtenido, observamos que el canal expresado en EO de rata

correspondía a ClCa4l. Sin embargo, no determinamos en qué tipo celular del EO se expresaba dicho canal.

El primer paso en el presente estudio fue verificar si ClCa4l se expresaba en NSOs de rata. Para esto utilizamos la técnica de RT-PCR anidado de célula única, adaptada por nosotros a partir de la publicación de Tong y cols. (1994), para lo cual usamos los partidores ClCa diseñados durante mi Memoria de Título. Comprobamos que efectivamente había expresión de ClCa en NSOs de rata (Fig. 9) y que dicho amplicón correspondía, al igual que en EO, a ClCa4l (Fig. 10).

Aunque los resultados obtenidos nos indicaban que ClCa4l se expresaba en EO y en NSOs de rata, esto no excluía la posibilidad de que también se expresara ClCa2. Esto porque en la técnica de secuenciación se secuencia el amplicón más abundante, lo cual abre la posibilidad que ClCa2 también se exprese en EO y en NSOs de rata. Por esta razón, diseñamos partidores exclusivos tanto para ClCa2 (Tabla 8) como para ClCa4l (Tabla 9). Mediante RT-PCR anidado y utilizando ambos pares partidores descubrimos que efectivamente ClCa2 se expresaba en EO de rata (Fig. 12.a).

Con el fin de determinar si ClCa2 también se encontraba en las NSOs del EO, extrajimos mRNA a partir de 15 de estas células (ítem 1.2 de Materiales y Métodos). Utilizando la técnica de RT-PCR anidado de célula única con los partidores ClCa2 y ClCa4l descubrimos que, al igual que en EO, los mRNA de ambos canales se expresan en estas neuronas (Fig. 13).

Sabiendo que nuestros dos canales candidatos se expresan en EO y en NSOs de rata, quisimos estudiar la relación de abundancia entre ClCa2 y ClCa4l en EO. Realizamos la

técnica de PCR anidado utilizando los partidores específicos ClCa4l y ClCa2. Observamos que ClCa2 aparece a partir del ciclo 25, mientras que ClCa4l lo hace a partir del ciclo 15 de la segunda ronda de RT-PCR (Fig. 14). Este resultado nos indica que la muestra de cDNA de EO se encuentra mucho más enriquecida con ClCa4l. Esto explica por qué ClCa2 no aparecía al realizar la secuenciación de los amplicones ClCa obtenidos a partir de EO y NSOs de rata, y por qué al estudiar la expresión de ambos canales en EO y cerebro, se detectó ClCa4l luego de una primera ronda de PCR, mientras que ClCa2 apareció luego de la segunda ronda (Fig. 12.a).

Teniendo en cuenta que ClCa4l es el amplicón más abundante, quisimos comprobar que lo que observábamos correspondía efectivamente a ClCa4l y no a una isoforma no descrita de este. Para esto diseñamos siete pares de partidores, consecutivos y sobrepuestos, los que en su conjunto abarcan la longitud completa de los canales ClCa (Fig. 7). Luego de obtenido dichos amplicones a partir de EO (Fig. 15.A), procedimos a secuenciarlos y a alinearlos con las secuencias publicadas de los canales ClCa2 (Fig. 16) y ClCa4l (Fig. 17). Comprobamos que cada uno de los siete amplicones obtenidos presentan un 100% de identidad con la secuencia de ClCa4l, lo que descarta la posibilidad que este amplicon corresponda a una isoforma del canal.

Sabiendo que los mRNA de ClCa2 y ClCa4l se expresan en NSOs y considerando que uno o ambos canales podrían estar involucrados en el proceso de quimiotransducción olfatoria, estudiamos la expresión de las correspondientes proteínas en los cilios de NSOs, lugar donde ocurre este fenómeno. Para esto fue necesario obtener un anticuerpo anti-ClCa, el cual no está disponible en el mercado. Decidimos usar la secuencia

aminoacídica utilizada por Yamakazi y cols (2005), la cual presenta un 100 y un 76% de identidad con las secuencias de ClCa2 y ClCa4l respectivamente (Fig. 8), para crear un anticuerpo monoclonal anti-ClCa. El alto porcentaje de identidad entre ambos canales nos impidió obtener un anticuerpo exclusivo para cada una de estas proteínas. Mediante western blot y utilizando un extracto purificado de cilios de NSOs (Saavedra y cols, 2008) junto con el anticuerpo ClCa, comprobamos que ClCa2 y/o ClCa4l se expresan en cilios olfatorios de rata (Fig. 18.a y 18.b). No observamos señal de ClCa en la muestra de epitelio desciliado, lo cual nos indica que estos canales se expresan fundamentalmente, sino exclusivamente en los cilios olfatorios (Fig. 18.a) y no en el resto de las NSOs ni en las demás células que conforman el EO. También observamos que la señal observada en la muestra de EO completo es mas débil que la del extracto de cilios, posiblemente porque en EO las proteínas ClCa se encuentran en menor concentración que en la muestra de cilios (Fig. 18.b).

Previamente Pifferi y cols. (2006) propusieron que el canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> perteneciente a la familia de las bestrofinas “mBest2”, correspondía al canal involucrado en la transducción olfatoria en ratón. Quisimos saber si este canal también se expresaba en rata. Por esto en durante mi tesis de pregrado estudiamos su expresión en EO, encontrando que dicho canal no se expresaba en este tejido (Carolina González Silva, Memoria en Ingeniería en Biotecnología Molecular, 2009). Verificamos este resultado en la presente tesis investigando la expresión de mBest2 en NSOs de rata, para lo cual utilizamos la técnica de RT-PCR anidado de célula única. Comprobamos que el mRNA de este canal no se expresa en dichas neuronas (Fig. 9). Aunque mBest2 se expresa en

cilios de NSOs de ratón y muestra características de canal de  $\text{Cl}^-$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  al expresarlo en sistema heterólogo (Pifferi y cols., 2006), recientemente este mismo grupo de científicos descartó que este canal estuviera involucrado en la quimiotransducción olfatoria. Ellos observaron que las respuestas detectadas en electroolfatogramas realizados en ratones normales y transgénicos, carentes de este canal, estimulados con odorantes no presentaban diferencias significativas (Pifferi y cols., 2009).

Recientemente Stephan y cols. (2009) propusieron a TMEM16B como el canal de  $\text{Cl}^-$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  responsable de la transducción olfatoria en ratón. Este grupo realizó una búsqueda proteómica en membrana ciliar de NSOs de ratón, encontrando 53 proteínas involucradas en la cascada de transducción olfatoria, entre las cuales TMEM16B correspondía al único canal de  $\text{Cl}^-$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  reportado en este estudio. Quisimos estudiar la expresión de los mRNA de TMEM16B y del canal descrito en rata TMEM16A (Fig. 4), en una muestra de cDNA de EO de rata y ratón. Realizamos experimentos de RT-PCR y descubrimos que los dos canales se expresan en EO de ambos animales (Fig. 19). Cabe destacar que aunque el canal TMEM16A ha sido también reportado en ratón (Gene ID: 101772), el canal TMEM16B no se ha descrito en rata.

Estos resultados nos hacen pensar que quizás uno o ambos canales TMEM16 se expresan en cilios de NSOs de rata además de  $\text{ClCa41}$  y  $\text{ClCa2}$ . Si esto fuera cierto y en distintos animales se produjera una combinatoria específica de tipos y proporciones de canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  según sus requerimientos, podríamos explicar por qué en distintos organismos se obtienen conductancias de  $\text{Cl}^-$  diferentes.

Aunque los canales TMEM16 y ClCa parezcan ser buenos candidatos de ser partícipes de la transducción olfatoria, el primer paso para fortalecer esta idea sería contar con experimentos electrofisiológicos en ratas silvestres y carentes de estos canales, tal como los realizados por Pifferi (2009) con el canal Best2, con el fin de tener certeza de que estos participan en la transducción olfatoria.

## CONCLUSIÓN

Hemos identificado dos canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  en neuronas sensoriales olfatorias de rata,  $\text{ClCa2}$  y  $\text{ClCa4l}$ , entre lo cuales al menos uno debería estar presente en los cilios quimiosensoriales de estas neuronas. Estos resultados son importantes porque sugieren que uno de ellos o ambos podrían estar involucrados en la quimiotransducción olfatoria. Para demostrarlo se deben realizar experimentos funcionales.

## 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.
- Frings S, Reuter D, Kleene SJ. (2000). **Neuronal Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels-homing in on an elusive channel species.** *Prog. Neurobiol.* 60:247-89.
- González C, Bacigalupo J. 2009. Memoria en Ingeniería en Biotecnología Molecular. **Estudio de la familia de canales de cloruro activados por calcio CICa en epitelio olfatorio de rata.**

- Hartree, E.F. (1972). **Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response.** *Anal Biochem* 48, 422-427.
- 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.
- 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.
- 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., Dibattista, M., Sagheddu, C., Boccaccio, A., Al Qteishat, A., Ghirardi, F., Tirindelli, R., and Menini, A. (2009). **Calcium-activated chloride currents in olfactory sensory neurons from mice lacking bestrophin-2.** *J Physiol* 587, 4265-4279.
- 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.
- Saavedra, M.V., Smalla, K.H., Thomas, U., Sandoval, S., Olavarria, K., Castillo, K., Delgado, M.G., Delgado, R., Gundelfinger, E.D., Bacigalupo, J., and Wyneken, U. (2008). **Scaffolding proteins in highly purified rat olfactory cilia membranes.** *Neuroreport* 19, 1123-1126.
- Sato, K., and Suzuki, N. (2000). **The contribution of a Ca(2+)-activated Cl(-) conductance to amino-acid-induced inward current responses of ciliated olfactory neurons of the rainbow trout.** *J Exp Biol* 203, 253-262.
- Schild, D., and Restrepo, D. (1998). **Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells.** *Physiol Rev* 78, 429-466.
- 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.
- Stephan, A.B., Shum, E.Y., Hirsh, S., Cygnar, K.D., Reisert, J., and Zhao, H. (2009). **ANO2 is the ciliary calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11776-11781.

- 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.
- Tong, J., Bendahhou, S., Chen, H., and Agnew, W.S. (1994). **A simplified method for single-cell RT-PCR that can detect and distinguish genomic DNA and mRNA transcripts.** *Nucleic Acids Res* 22, 3253-3254.
- Trotier, D. (1986). **A patch-clamp analysis of membrane currents in salamander olfactory receptor cells.** *Pflugers Arch* 407(6): 589-95.
- Wagner JA, Cozens AL, Schulman H, Gruenert DC, Stryer L, Gardner P. 1991. **Activation of chloride channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase.** *Nature* 349:793–96.
- 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 Ca<sup>2+</sup>-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
- Zygmunt AC. 1994. **Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes.** *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 267:H1984–95.