

UCH-FC
DOC-BMCN
C352
C.1

**PARTICIPACIÓN DE UNA Ca^{2+} -ATPasa EN LA REMOCIÓN DE
 Ca^{2+} DE LOS CILIOS DE LAS NEURONAS OLFATORIAS**

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

En Cumplimiento Parcial de los Requisitos

Para Optar al Grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y

Neurociencias

Facultad de Ciencias

Por

KAREN LORENA CASTILLO HUERA

Septiembre, 2008

Directores de Tesis: Dr. Juan Bacigalupo Vicuña

Dr. Mario Luxoro Mariani

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

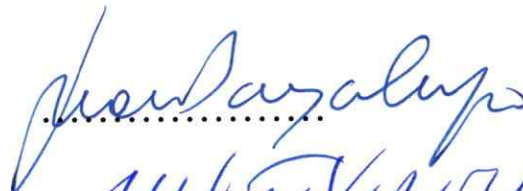
TESIS DE DOCTORADO

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

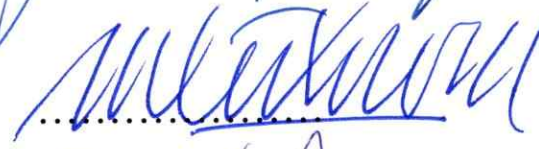
KAREN LORENA CASTILLO HUERA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 25 de Agosto de 2008.

Director de Tesis:
Dr. Juan Bacigalupo



Director de Tesis
Dr. Mario Luxoro

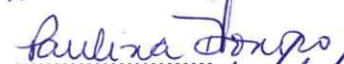


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Daniel Wolff



Dra. Paulina Donoso



Dr. Manuel Villalón



Dr. Patricio Vélez

.....

*A los que ya se han ido,
a los que están presentes,
y a los que tienen que llegar.*

RESUMEN BIOGRAFICO

Desde niña tuve una tremenda inquietud por todo, quería saberlo todo, entender todo, explorar todo. Desde pequeña a mi espíritu le gustó la ciencia. Un día la vorágine de la vida me condujo, entre muchas otras cosas, a leer *El Perfume*. Este libro cambió por completo mi forma de ver el modo en que los seres vivos nos conectamos con el mundo a través de los sentidos, que nos conducen a una gran variedad de manifestaciones emocionales y que pueden moldear nuestra conducta. Me dije: la vida es una maravilla quiero saber cómo se manifiesta en sus múltiples relaciones complejas. Luego de una rebeldía de espíritu que me inclinó hacia el humanismo, decidí intentar recorrer el camino de ser científica y aprender a expresar las cosas de un modo más formal.



Ingresé a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile donde estudié Biotecnología. Hice mi memoria de título en el laboratorio de Fisiología Celular, al que me reincorporé más tarde para realizar esta tesis doctoral, en el área de la transducción odorífera. Cada día me maravillo más, y mientras más “sé” más caigo en cuenta de nuestra inmensa ignorancia, o dicho de otra manera a pesar de que entendemos muchas cosas que suceden en los seres vivos, hay demasiadas que aún son un misterio. Un día mirando el documental “*winged migration*” tuve la insensata idea de que por más que lo estamos intentando, tal vez nunca entenderemos las relaciones de lo vivo con su entorno, el origen de todo, ¿será un problema del enfoque? No creo que hasta el día de hoy haya comprendido lo que eso significa en términos de la historia de este planeta o de la de una “simple” célula, pero estoy en el camino del intento, eso por un lado me conforta, y por otro, me desalienta. Hacer este doctorado fue una experiencia muy buena e intensa, tanto a nivel de estudios como humano. Y aunque nunca comprendamos todo, en este camino me siento feliz, llena de estímulos y desafíos que quiero disfrutar por mucho tiempo más. Ojalá en el futuro pueda seguir contribuyendo con mi aporte al conocimiento humano. Nos vemos en el próximo capítulo.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se llevó a cabo gracias a las siguientes fuentes de financiamiento: Beca doctoral Instituto Milenio CBB (2004), Beca doctoral CONICYT, Doctoral fellowship Universidad de Colorado, Beca de Término de Tesis CONICYT, Proyecto FONDECYT 1050124, Proyecto MIDEPLAN ICM P05-001-F, Proyecto MIDEPLAN ICM P99-031-F, Proyecto Anillos en Ciencia y Tecnología ACT45 Programa Bicentenario CONICYT, Beca Fundación JS Guggenheim (JB), Proyecto FONDECYT 1080653, Beca Proyecto MECESUP UCH0409, Beca de estancias en el extranjero Vicerrectoría Académica Universidad de Chile, Proyectos NIH NIDCD y NIH Fogarty.

Agradezco a las personas que de manera generosa y desinteresada colaboraron en la realización de los diferentes experimentos que se presentan en este trabajo: Jeannette Bravo, Carolina González, Susana Cabello, Claudio Elgueta, Romina Vargas, Estefanía López, Viviana Ordenes, Ignacio Moreno, Lorena Sülz, Ricardo Delgado; al profesor Mike Hanford por abrirme las puertas de su laboratorio cuando fue necesario; Al profesor Diego Restrepo, Yoshihiro Wakabayashi, Stephen Fadool y Clinton Cave por su invaluable colaboración en los experimentos de fluorescencia de Ca^{2+} en el doble fotón; y finalmente al profesor Felipe Court por abrirme las puertas de su laboratorio en la etapa final de esta tesis.

Adicionalmente, quisiera destacar el apoyo de los directores de esta tesis. Gracias al profesor Juan Bacigalupo por creer que era posible llevar a cabo exitosamente las metas propuestas al principio de este trabajo y apoyar su realización hasta el final. Agradezco también al profesor Mario Luxoro por asumir un papel que no estaba en sus

planes y enseñarme de manera crítica a tener cautela ante la interpretación de los resultados observados. A ambos gracias por el respaldo, así como por sus opiniones y aportes en la discusión de los resultados de esta tesis.

Al grupo humano-científico del laboratorio de Fisiología Celular.

Por supuesto no podría dejar de lado a quienes han sido mi segunda familia por largos años: el club deportivo y social OPA. Me siento tremendamente complacida de ser parte de este grupo humano tan especial con quienes hemos compartido en amistad muchas alegrías, viajes y compañerismo. A todos los amigos y esperando que no se quede alguien fuera he aquí los nominados: Carolina Oliva, Raúl Araya, María Graciela Delgado, Francisco Araya, Alexander Vergara, Guadalupe Astorga, Mauricio Pinto, Paula Michea, Cristian Undurraga, Amanda, Ricardo Fuentes, Viviana Valdés, Pablo Vargas, Loreddana Rondanelli, Pablo Muñoz, Eliana Ramos, Mario Bustamante, Marianne Kreigher, César Díaz, Natalia Márquez, Luis Pouchucq, Maurizio Pezzoli, Lorena Sulz, Walter Apaza, Luis Milla, Maria Eliana Rivera, Andrés Esparza, Karina Pino, Karel Olavarría, Ricardo Delgado, Cristian Zambrano, Susana Camacho, Andrés León, David Bustamante, Marcelo Galleguillos, Claudio Rey, Mario Correa, Yoshi, Tomas Nicholl, Marco Tizano.

Y, por supuesto, a mi familia.

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xix
INTRODUCCIÓN	1
I Estructura del Epitelio Olfatorio	1
II Transducción sensorial olfatoria	3
III Canales iónicos presentes en la membrana de los cilios olfatorios	5
III.1 Canal dependiente de cAMP (CNG)	5
III.2 Canal de Cl^- activado por Ca^{2+} (Cl_{Ca})	7
III.3 Canal de K^+ activado por Ca^{2+}	9
IV El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática ciliar	10
V Ca^{2+} -ATPasas de la membrana plasmática (PMCA)	11
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
I. Distribución celular de la PMCA	17

I.1	Western blot	18
I.2	Inmunofluorescencia	19
I.3	Inmunohistoquímica	20
II.	Obtención de vesículas de membrana de cilios olfatorios	21
III.	Obtención de otras membranas	22
IV.	Mediciones de transporte de Ca^{2+} en vesículas de membranas de cilios por incorporación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	23
V.	Inversión de membranas purificadas de cilios olfatorios	24
VI.	Determinación electrofisiológica de la actividad de la PMCA y el NCX en los cilios olfatorios	25
VII.	Mediciones de Ca^{2+} en los cilios mediante fluorescencia	27
RESULTADOS		29
I.	Determinación de la expresión de la PMCA en los cilios olfatorios	29
I.1	Distribución celular de la PMCA	29
II.	Estudios funcionales del transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP en las membranas de los cilios olfatorios y sus posibles moduladores de interés para el sistema de transducción olfatoria	35
III.	Participación de la PMCA en la remoción del Ca^{2+} que ingresa a los cilios por activación de los canales CNG	38
III.1	Determinación electrofisiológica de la actividad de la PMCA	

y el NCX en los cilios olfatorios de <i>C. caudibervera</i>	38
III.2 Participación de la PMCA y el NCX en la remoción del Ca^{2+} medido mediante fluorescencia de Ca^{2+} directamente en los cilios olfatorios de <i>Rana pipiens</i>	42
III.2.1 Efecto del bloqueo de los transportadores de Ca^{2+} ciliar al liberar cAMP	45
III.2.1.1 Bloqueo de la PMCA	45
III.2.1.2 Bloqueo del NCX	46
III.2.1.3 La señal localizada de la fluorescencia de Ca^{2+} en el cilio por activación de los canales CNG, se modifica al inhibir la hidrólisis de cAMP y al eliminar el colesterol de la membrana plasmática	47
III.3 Distribución del canal CNG y la PMCA a lo largo de los cilios olfatorios	51
DISCUSIÓN	53
I.- Expresión de la PMCA en los cilios de las neuronas sensoriales olfatorias	54
II.- Transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP modulado por Ca^{2+} -CaM en vesículas invertidas de cilios olfatorios	57
III.- Utilización de la corriente de Cl^- activada por Ca^{2+} para estimar la remoción del Ca^{2+} ciliar	64
IV.- Microdominios de Ca^{2+} en los cilios olfatorios	67

CONCLUSIONES

79

REFERENCIAS

80

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Resumen de los valores de relajación y amplitud de la I_{Ca} al activar los canales CNG	41
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estructura del órgano sensorial del olfato	2
Figura 2	Cascada de transducción sensorial olfatoria	4
Figura 3	Análisis de enriquecimiento y pureza de la preparación de membranas ciliares	30
Figura 4	Expresión de PMCA y NCX en cilios olfatorios	31
Figura 5	Expresión de la PMCA y el NCX en neuronas receptoras olfatorias	32
Figura 6	Distribución de la PMCA en cilios olfatorios	32
Figura 7	Expresión de la PMCA en el tejido olfatorio	33
Figura 8	Isoformas de la PMCA en los cilios olfatorios	34
Figura 9	Transporte de Ca^{2+} dependiente de Ca^{2+} en las membranas ciliares	36
Figura 10	La PMCA ciliar es modulada por CaM	37
Figura 11	Corrientes dependientes de voltaje en NSO	40
Figura 12	Corrientes de transducción en NSO activadas por cAMP	40
Figura 13	Participación de la PMCA en la extracción de Ca^{2+} desde los cilios olfatorios	41
Figura 14	Aumentos transientes y localizados de Ca^{2+} en los cilios olfatorios	44
Figura 15	Los incrementos de Ca^{2+} en los cilios olfatorios ocurren por entrada del ión desde el medio extracelular	44

Figura 16	La PMCA participa en la remoción de Ca^{2+} desde los cilios olfatorios	45
Figura 17	EL NCX participa en la remoción de Ca^{2+} desde los cilios olfatorios	47
Figura 18	Dispersión de los microdominios de Ca^{2+} por bloqueo de la hidrólisis del cAMP	48
Figura 19	Los microdominios de Ca^{2+} están formados por ambientes de membrana ricos en colesterol	49
Figura 20	Puntos discretos de entrada de Ca^{2+} en el cilio olfativo	51
Figura 21	Distribución de la PMCA y el canal CNG a lo largo del cilio	52

LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

τ : constante de tiempo de relajación de la I_{CaCl}

$\tau_{0.5}$: tiempo de relajación de la fluorescencia al 50%

ACIII: adenilil ciclasa tipo III olfatoria

ATP: adenosina 5'-trifosfato

BSA: albúmina de suero bovino

Ca^{2+} -CaM: calcio unido a calmodulina

CaM: calmodulina

CaMKII: Proteína quinasa tipo II activada por CaM

cAMP: 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico

CD: metil- β -ciclodextrina

CE: carboxyeosina

cGMP: 3', 5'-guanosina monofosfato cíclico

Cl_{Ca} : canal de Cl^- activado por Ca^{2+}

CMZ: calmidazolio

CNG: canal catiónico inespecífico activado por nucleótidos cíclicos

DAB: 3,3-diaminobenzidina

DMNB-caged cAMP: AMP cíclico enjaulado

EC: epitelio completo

ED: epitelio desciliado

FCCP: carbonilcianida-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona

HEPES: ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfónico

HEPES-BTP: HEPES + 1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano

IBMX: isobutil-metil-xantina

INAD: Proteína de andamio de la fototransducción en *D. melanogaster*

$K_{0.5}$: $[Ca^{2+}]$ a la cual ocurre la mitad de activación de la PMCA

K_{Ca} : canal de K^+ activado por Ca^{2+}

NCX: intercambiador Na^+/Ca^{2+}

NSO: neurona sensorial olfatoria

OB: bulbo olfatorio

RO: receptor de olores

PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida

PBS: tampón fosfato salino

PBS-T: tampón de fosfato salino y 0.1% Tween-20

PDE: fosfodiesterasa

PDZ: dominio de interacción con proteínas (PSD95/SAP90, Dlg, ZO-1)

PFA: *p*-formaldehído

PMCA: Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática

SDS: dodecil (lauril) sulfato de sodio

SERCA: sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase

RESUMEN

En este trabajo de tesis se investigó si hay una Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA) expresándose en los cilios olfatorios y si ésta participa en la extracción del Ca^{2+} desde el lumen luego de producirse un incremento de este ión en dicho organelo. Evidencias previas indicaban que un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) era el responsable de la remoción del Ca^{2+} desde los cilios.

La expresión y distribución de la PMCA y del NCX se indagó mediante western blot en vesículas de membranas ciliares purificadas de neuronas olfatorias, inmunocitoquímica en células disociadas de epitelio olfatorio e inmunohistoquímica de cortes de epitelio olfatorio. La PMCA, en efecto, se expresa en los organelos sensoriales del olfato, mostrando una distribución discreta a lo largo de estos. La actividad de esta bomba se caracterizó midiendo la acumulación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en vesículas invertidas purificadas de cilios olfatorios. Se determinó que su actividad es dependiente del Ca^{2+} intracelular ($K_{0.5} = 670 \text{ nM}$). La bomba incrementa sus niveles de actividad ~5 veces al aumentar la concentración de Ca^{2+} libre a partir de 300 nM con un máximo de actividad a $\sim 1 \mu\text{M} \text{ Ca}^{2+}$. El Ca^{2+} regula la actividad de la bomba mediante calmodulina ($K_{0.5} = 31 \text{ nM}$). La actividad de la bomba es inhibida en ausencia nominal de ATP, así como cuando es expuesta al bloqueador carboxyeosina (CE) y al inhibidor de CaM calmidazolio. Las características bioquímicas de la bomba indican que la PMCA ciliar podría pertenecer a las isoformas 1 ó 4. Las 4 isoformas de la PMCA se expresan en las membranas ciliares, pareciendo estar más representada la PMCA 4 respecto de las otras

tres. La participación funcional de la PMCA en la remoción de Ca^{2+} ciliar, así como la del NCX, se estudió determinando la constante de relajación (τ) de la corriente total de Cl^- activada por Ca^{2+} (I_{CaCl}) como indicador del Ca^{2+} intraciliar, luego de activar esta corriente mediante un aumento rápido de Ca^{2+} . En condición control, la I_{CaCl} presentó una $\tau = 272 \pm 78$ ms. Este valor aumentó al inhibir la PMCA con $100 \mu\text{M}$ CE ($\tau = 2181 \pm 437$ ms), omitiendo el ATP en la pipeta de registro ($\tau = 666 \pm 49$ ms) y alcalinizando el medio extracelular a pH 9,4 ($\tau = 725 \pm 65$ ms). A su vez, al anular el NCX reemplazando el Na^+ extracelular por Li^+ , la constante de relajación de la corriente de transducción también aumentó ($\tau = 442 \pm 8$ ms). La prolongación de la τ de la I_{CaCl} sugiere que el Ca^{2+} permanecía elevado por un mayor tiempo en los cilios en dichas condiciones. Estas evidencias respaldan fuertemente que tanto la PMCA como el NCX extraen Ca^{2+} desde los cilios en las condiciones experimentales utilizadas.

Por otro lado, se midió el curso temporal de la remoción del Ca^{2+} desde los cilios mediante microscopía de 2 fotones, luego de producir un incremento abrupto del Ca^{2+} por fotoliberación de cAMP enjaulado. La relajación de la señal fluorescente debida a la recuperación de la concentración de Ca^{2+} del estado de reposo en la condición control presentó una $\tau_{0.5} = 12,5 \pm 2,3$ s. Ésta se prolongó al bloquear la PMCA con CE $50 \mu\text{M}$ ($\tau_{0.5} = 30,18 \pm 6,4$ s) y al anular funcionalmente el NCX reemplazando el Na^+ externo por Li^+ ($\tau_{0.5} = 28,12 \pm 5,2$ s). Estos resultados indican que tanto la PMCA como el NCX participan en la remoción del Ca^{2+} luminal.

El incremento de Ca^{2+} en los cilios olfatorios ocurría de manera altamente localizada a lo largo del organelo, observándose destellos de fluorescencia en sitios

discretos al fotoactivar el cAMP enjaulado. Los tamaños promedio de dichos sitios de entrada de Ca^{2+} eran variables en las distintas condiciones exploradas. Estos sitios se dividieron arbitrariamente en cuatro grupos: aquellos menores a $0,4 \mu\text{m}$; entre $0,4$ y $0,6 \mu\text{m}$; entre $0,6$ y $0,8 \mu\text{m}$; y los que eran mayores a $0,9 \mu\text{m}$ de ancho. En condiciones control se observó habitualmente tamaños de $0.39 \pm 0.08 \mu\text{m}$ ($n=20$) y $0.54 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ($n=17$). El ancho de estos sitios fue mayor cuando las NSO estuvieron previamente expuestas a los bloqueadores del NCX y la PMCA alcanzando valores de $0.67 \pm 0.05 \mu\text{m}$ ($n=14$) y $0.98 \pm 0.25 \mu\text{m}$ ($n=13$); sugiriendo que el ion Ca^{2+} se acumula en las cercanías de estos lugares al estar bloqueados los mecanismos que lo extraen. Cuando las NSO son expuestas a 1 mM del bloqueador de la PDE IBMX los puntos discretos de ingreso de Ca^{2+} se dispersan, posiblemente debido a una acumulación persistente del ión dentro del cilio a causa de una mayor disponibilidad de cAMP, agonista de los canales CNG. La remoción del colesterol, con ciclodextrina, de las membranas también suprimió las señales localizadas de Ca^{2+} , observándose además un notable retardo en la entrada del ion al cilio. Esto es consistente con una participación de dominios ricos en colesterol en la formación y mantención de dichos sitios. Por otro lado, cuando se exploró la distribución de la PMCA y el canal CNG, interesantemente se observó que ambas proteínas colocalizaban y se distribuían de manera particulada a lo largo de los cilios. Esto es congruente con una disposición localizada de los lugares por donde entra Ca^{2+} al cilio, sugiriendo que la maquinaria de quimiotransducción podría formar complejos moleculares donde se agrupan los componentes de la transducción olfatoria.

En conclusión en los cilios olfatorios hay una Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática que, en las condiciones estudiadas, participa en la extracción del Ca^{2+} que ingresa al lumen al activarse los canales CNG. Se confirmó, adicionalmente, que en la remoción del Ca^{2+} ciliar también participa un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Estos dos transportadores de Ca^{2+} podrían estar funcionando de manera complementaria para sacar el Ca^{2+} durante la respuesta odorífera. Es probable que debido a la naturaleza electrogénica del NCX, su eficiencia se vea disminuida con la despolarización celular inducida por olores. A su vez la disponibilidad limitada de ATP en el cilio podría impedir que la bomba funcione de manera óptima durante todo el tiempo que dura la respuesta odorífera. De este modo, la PMCA y el NCX podrían ser complementarios en el trabajo de remoción del Ca^{2+} desde el lumen ciliar.

ABSTRACT

The expression of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) in the olfactory cilia and its possible participation in the removal of Ca^{2+} after incrementing in these organelles was investigated in this thesis. Previously, the participation of a $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) was postulated as the responsible of this process.

The expression and distribution of PMCA and NCX was demonstrated by western blot in purified ciliary membrane vesicles from olfactory sensory neurons (OSN), by immunofluorescence in isolated OSN and by immunohistochemistry in olfactory tissue sections. The pump was partially characterized in inverted vesicles purified from olfactory cilia and by $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation, a Ca^{2+} -dependent activity with a $K_{0.5} = 670 \text{ nM}$ was observed. The PMCA activity increased around 5 times when the intracellular Ca^{2+} concentration increased from 300 nM to 1 μM , where the maximal activity was observed. Calmodulin (CaM) modulates the pump activity with a $K_{0.5} = 31 \text{ nM}$, and its activity diminished in the absence of ATP, in the presence of the PMCA blocker carboxyeosin (CE) and of the CaM inhibitor calmidazolium. Based on its biochemical properties, the pump isoform that is expressed in the olfactory cilia may correspond to isoforms 1 or 4. Moreover, the expression of the 4 PMCA isoforms were observed in the ciliary membranes, but PMCA 4 seemed to be the most abundant. In order to investigate the functional participation of PMCA and NCX in Ca^{2+} clearance from the cilia, the Ca^{2+} -activated Cl^- current (I_{ClCa}) was recorded and used to monitor Ca^{2+} in the cilia. The relaxation time constant (τ) of I_{ClCa} after inducing CNG channel opening by photoreleasing cAMP from a cage compound was measured under various

conditions. Under control conditions the τ of I_{CaCl} was 278 ± 78 ms. τ increased upon abolishing PMCA either by blocking the pump with $100 \mu\text{M}$ CE ($\tau = 2181 \pm 437$ ms); omitting ATP in the recording pipette ($\tau = 666 \pm 49$ ms) and raising the extracellular pH up to 9.4 ($\tau = 725 \pm 265$ ms). A similar effect was observed when NCX was blocked by replacing external Na^+ by Li^+ ($\tau = 442 \pm 8$ ms). These results suggest that in the experimental approaches utilized, Ca^{2+} concentration stayed elevated in the ciliary lumen for longer times than under control conditions. This evidence support the participation of both Ca^{2+} transporters, the PCMA and NCX, in Ca^{2+} removal from the olfactory sensory organelle.

In addition, the time course of Ca^{2+} removal from individual cilia was measured using 2 photon confocal fluorescence microscopy following cAMP photorelease. The recovery of Ca^{2+} fluorescence under control conditions showed a $\tau_{0.5}$ of 12.5 ± 2.3 s. This parameter was prolonged by blocking PMCA with $50 \mu\text{M}$ CE ($\tau_{0.5} = 30.18 \pm 6.4$ s) and by abolishing NCX with Li^+ ($\tau_{0.5} = 28.12 \pm 5.2$ s), thus confirming that PCMA and NCX have a role in Ca^{2+} removal from the olfactory cilia. The Ca^{2+} increase along the cilia was highly localized and the average size of the Ca^{2+} fluorescence spots were $0.39 \pm 0.08 \mu\text{m}$ wide ($n=20$). The spots size increased 2-3-fold ($n=13$) when the NSO were previously exposed to NCX or PMCA blockers, whereas in the presence of IBMX (PDE blocker) the Ca^{2+} fluorescence spots became dispersed. A similar effect, added to a significant latency increase, was observed when the cell was exposed to a cholesterol scavenger (CD), suggesting the involvement of cholesterol rich domains in the discrete distribution of the spots. Supporting this, PMCA and the CNG channel colocalized in a

discrete manner along the olfactory cilia. Taking all together, the formation of macromolecular complex of the chemotransduction machinery can be suggested.

In conclusion, in the olfactory cilia there is a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase that under the studied conditions, participates in the Ca^{2+} removal after Ca^{2+} influx to the cilia when CNG channels were activated. The participation of NCX in the Ca^{2+} removal was confirmed. Both transporters could complement each other removing the intracellular Ca^{2+} during the odorant response. It is possible that the efficiency of NCX decrease with the cellular depolarization induced by odors due to its electrogenic mode operation.

INTRODUCCIÓN

I.- Estructura del epitelio olfatorio

El sentido del olfato en los vertebrados terrestres posee la capacidad de reconocer y discriminar entre una gran cantidad y variedad de compuestos químicos volátiles de carácter hidrofóbico presentes en el ambiente, conocidos como odorantes. Los odorantes son detectados por neuronas especializadas del epitelio olfatorio, el que posee varios millones neuronas olfatorias (NSO). Estas son células bipolares que extienden una dendrita única hacia la superficie de la mucosa, donde se ensancha formando el botón dendrítico. Desde esta estructura emergen los cilios olfatorios (Figuras 1 y 2), cuyo número varía dependiendo de la especie (habitualmente entre 5-30). La región apical del botón dendrítico y los cilios se asoman a la cavidad nasal y están inmersos en un moco, medio donde los odorantes interactúan con las proteínas receptoras de olor (RO) localizadas en la membrana de los cilios quimiosensoriales (Buck y Axel, 1991) de la NSO. Por su extremo basal las neuronas olfatorias proyectan un axón amielínico hacia los glomérulos del bulbo olfatorio, donde hacen sinapsis con las neuronas mitrales y en cepillo.

Se ha encontrado que en cada NSO se expresan muy pocos de los cientos de genes codificantes para RO, posiblemente solo uno (Malnic y cols., 1999). Los RO son proteínas integrales de la membrana ciliar cuya cascada de activación está acoplada a una proteína G propia de este sistema de transducción, G_{olf} . Un receptor de olor es capaz de reconocer a varios odorantes, así como un odorante puede ser reconocido por varios RO

diferentes, de modo que en el reconocimiento de odorantes participa una combinación particular de NSOs que expresan diferentes RO (Malnic y cols., 1999).

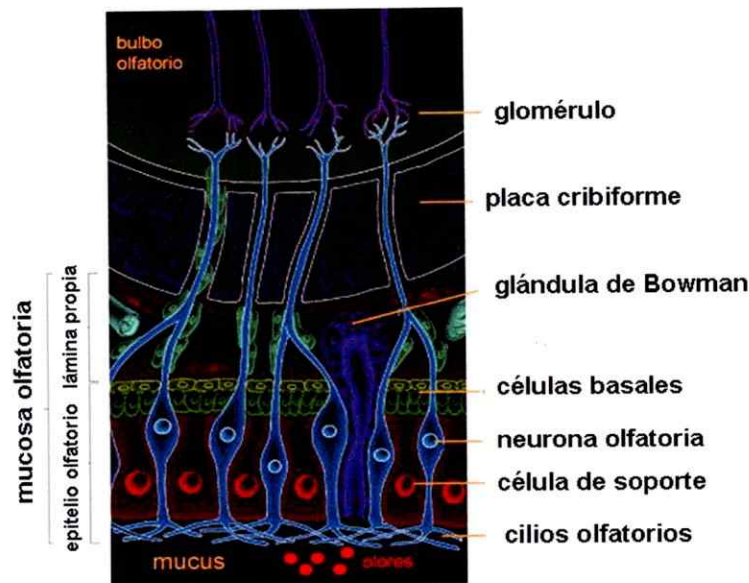


Figura 1.- Estructura del órgano sensorial del olfato. El epitelio olfatorio está formado por células basales, de soporte y neuronas olfatorias (NSO). Las NSO transducen la señal química de los olores a una señal eléctrica y están en contacto directo con el ambiente a través de sus cilios. Estas células bipolares poseen un solo axón el que se proyecta hacia el bulbo olfatorio, cruzando la placa cribiforme, donde hace sinapsis en un glomérulo específico en el bulbo olfatorio.

Las NSO descargan potenciales de acción (PA) espontáneamente, con una frecuencia que varía con la especie y de célula en célula. La interacción de los odorantes con los receptores de la membrana ciliar desencadena una respuesta eléctrica en estas células sensoriales, que consiste en un cambio en la frecuencia de descarga de los PA. Este cambio puede ser un aumento (respuesta excitatoria) o una disminución (respuesta inhibitoria) de esta frecuencia de descarga. La respuesta excitatoria está asociada a un potencial de receptor despolarizante (Getchell y Shepherd, 1978; Firestein y cols., 1990), mientras que la inhibitoria se asocia a un potencial de receptor hiperpolarizante (Dionne, 1992; Morales y cols., 1994). Se ha demostrado que una misma neurona olfatoria puede

generar respuestas excitatorias e inhibitorias, dependiendo del estímulo odorífero (Morales y cols., 1994; Kang y Caprio, 1995; Sanhueza y cols., 2000).

II.- Transducción sensorial olfatoria

El mecanismo de quimiotransducción excitatorio ha sido extensamente caracterizado (Schild y Restrepo, 1998). Los estudios bioquímicos de los cilios han contribuido de manera fundamental al conocimiento actual de la quimiotransducción olfativa (Sklar y cols., 1986). Usando una preparación parcialmente purificada de membranas ciliares, se estableció que los cilios olfatorios están altamente enriquecidos en adenilil ciclasa tipo III (ACIII), enzima que se activa por odorantes vía G_{olf} en presencia de GTP (Pace y cols., 1985; Sklar y cols., 1986; Jones y Reed, 1989; Lowe y cols., 1989; Bakalyar y Reed, 1990), generando AMP cíclico (cAMP) (Figura 2).

El cAMP abre directamente canales catiónicos no selectivos (conocidos como *cyclic nucleotide gated channels* o CNG) a través de los cuales ingresan Na^+ y Ca^{2+} al lumen ciliar (Nakamura y Gold, 1987a). Estos canales son parcialmente responsables del potencial de receptor despolarizante. El Ca^{2+} que ingresa a través de ellos activa, a su vez, la apertura de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} (Cl_{Ca}) por los cuales sale Cl^- desde los cilios, ya que este ión está más concentrado adentro que afuera en estas neuronas (Lowe y Gold, 1993c; Kurahashi y Yau, 1994). La corriente Cl_{Ca} ($I_{Cl_{Ca}}$) constituye el principal componente de la corriente neta despolarizante, que es la causante del potencial de receptor excitatorio (Berger y cols., 1993; Kleene, 1993; Kurahashi y Yau, 1993; Lowe y Gold, 1993a). Este potencial de receptor provoca un aumento en la frecuencia de disparo

de los PA, lo que se conoce como la respuesta excitatoria. La corriente excitatoria puede alcanzar magnitudes de 1-2 nA, de la cual en la rata un 85% es portada por el Cl^- (Lowe y Gold, 1993a).

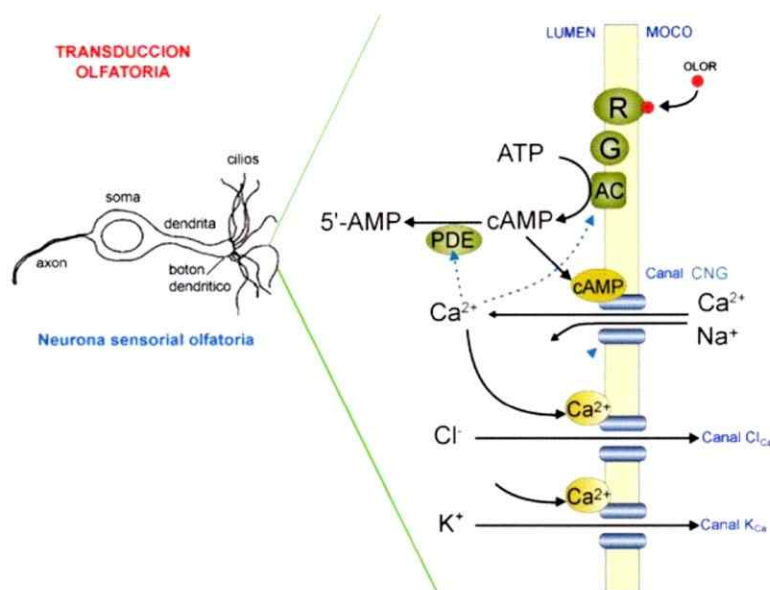


Figura 2.- Cascada de transducción sensorial olfatoria. Los cilios de la NSO contienen las proteínas responsables de la quimi-transducción odorífera. La transducción comienza cuando un olor se une a un receptor (R), el cual a través de una proteína G (G) activa a una adenilil ciclasa (AC) incrementando los niveles de cAMP en el lumen. Este, activa al canal CNG, a través del cual entra Na^+ y Ca^{2+} al cilio. Este último puede activar canales de K^+ (K_{Ca}) o de Cl^- (Cl_{Ca}) promoviendo una respuesta excitatoria o inhibitoria, respectivamente. El Ca^{2+} participa también en la adaptación, regulando el *turnover* de cAMP modulando la actividad de la AC y de una fosfodiesterasa (PDE), y disminuyendo la afinidad del canal CNG por cAMP.

El blanco electrofisiológico del mecanismo inhibitorio es una conductancia de K^+ , que al igual que la de Cl^- es activada por Ca^{2+} . Las evidencias indican que durante la respuesta inhibitoria hay entrada de Ca^{2+} en los cilios, lo que provoca un aumento de su concentración, tal como ocurre durante la respuesta excitatoria (Morales y cols., 1994). En este caso el Ca^{2+} también ingresa al cilio a través de los canales CNG (Madrid y cols., 2005), ya que el bloqueo de dichos canales suprime la corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} (K_{Ca}), al igual que lo que ocurre con la corriente excitatoria (Leinders-Zufall y Zufall, 1995).

El Ca^{2+} que ingresa al lumen ciliar regula, adicionalmente, la actividad de las enzimas que determinan el nivel de cAMP, la ACIII y la fosfodiesterasa (PDE) (Borisy y cols., 1992; Wayman y cols., 1995) y, en asociación con la calmodulina (CaM), regula negativamente al canal CNG reduciendo su afinidad por cAMP (Chen y Yau, 1994). Estos efectos regulatorios del Ca^{2+} desensibilizan a la célula cuando el estímulo odorífero supera una cierta magnitud o duración, fenómeno conocido como adaptación. La adaptación, que es una característica de los receptores sensoriales, es una propiedad de gran importancia fisiológica, por cuanto le permite a la célula ajustar su sensibilidad al estímulo, expandiendo dramáticamente su rango dinámico. Tanto la excitación como la adaptación olfatoria dependen del Ca^{2+} , por lo cual resulta fundamental entender cabalmente la dinámica de los cambios de Ca^{2+} que tienen lugar en los cilios olfatorios durante la respuesta a odorífera para comprender la transducción odorífera.

III.- Canales iónicos presentes en la membrana de los cilios olfatorios.

III.1 El canal dependiente de cAMP (CNG). Este canal se encuentra principalmente en los cilios quimiosensoriales, en una densidad de 1000 a 2500 por μm^2 . El canal CNG también se halla en el botón dendrítico, aunque en una densidad de solo 2 a 6 por μm^2 en NSO de anfibios (Kurahashi y Kaneko, 1991; Kleene, 1997). Este canal ha sido clonado y estudiado en considerable detalle (Dhallan y cols., 1990; Ludwig y cols., 1990). Puede ser activado también por cGMP, nucleótido por el cual el canal presenta mayor afinidad que por el cAMP, su agonista fisiológico. La concentración de cAMP necesaria para producir la mitad de la activación máxima de los canales ($K_{0.5}$) está entre 10 y 20 μM

(Nakamura y Gold, 1987a). La conductancia de este canal es de 1,5 pS en condiciones fisiológicas, pero aumenta a 45 pS en ausencia de cationes divalentes en la solución externa (Zufall y Firestein, 1993). Esto se debe a que los cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) bloquean parcialmente el canal, reduciendo su conductancia aparente, tal como ocurre en el canal dependiente de cGMP de fotorreceptores retinianos (Zimmerman y Baylor, 1986), con el cual el canal olfatorio tiene una notable similitud (Kaupp, 1991). El canal dependiente de cAMP es bloqueado por las drogas nifedipina, 1-cis-diltiazem (Frings y cols., 1992) y LY83583 (Leinders-Zufall y Zufall, 1995). Aun no está claro cómo se distribuye este canal a lo largo del cilio. Mediciones en cilios escindidos no muestran una correlación entre el largo del cilio y la magnitud de la conductancia dependiente de cAMP (Kleene y cols., 1994). Registros de Ca^{2+} en los cilios con sondas fluorescentes, muestran que su distribución no es uniforme a lo largo del cilio (Leinders-Zufall y cols., 1998). Por el contrario, sobre la base del análisis de mediciones electrofisiológicas en fragmentos de membrana obtenidos del botón dendrítico, los cuales también incluirían membranas ciliares, se propuso que los canales CNG y los incrementos de Ca^{2+} estarían uniformemente distribuidos (Reisert y cols., 2003). Adicionalmente, experimentos en que se registró las corrientes inducidas en una NSO por incrementos localizados de cAMP, usando cAMP enjaulado en segmentos sucesivos de $\sim 1 \mu\text{m}$ de cilios individuales, sugirieron una distribución homogénea de los canales CNG en los cilios (Takeuchi y Kurahashi, 2008).

Como se verá más adelante, las evidencias proporcionadas en esta tesis, obtenidas con una mayor resolución espacial y temporal sugieren que, por el contrario, la entrada de Ca^{2+} al cilio ocurre de manera altamente localizada. Adicionalmente, se muestra que los

canales CNG, el NCX y la PMCA se distribuyen de manera puntuada a lo largo del organelo sensorial, sugiriendo que los componentes de la cascada de transducción se agrupan en microdominios de membrana, lo cual explicaría el confinamiento de los incrementos de Ca^{2+} .

III.2 El canal de Cl^- activado por Ca^{2+} (Cl_{Ca}). Como se mencionó anteriormente, este canal está localizado principalmente en los cilios (Hallani y cols., 1998; Reisert y cols., 2003). No se han reportado registros de corrientes de estos canales a nivel unitario. El análisis de ruido de la corriente asociada a la actividad del canal de Cl^- llevó a concluir que este tendría una conductancia unitaria de 0,8 pS (Larsson y cols., 1997). De ser así, las corrientes unitarias serían demasiado pequeñas para ser resueltas mediante la técnica de *patch clamp*, en condiciones fisiológicas. A pesar de ello, algunos datos importantes sobre este canal han sido obtenidos mediante análisis de ruido en anfibios, a partir de registros de corrientes macroscópicas de Cl^- en células y en parches escindidos del botón dendrítico de rata y de ratón (Hallani y cols., 1998; Pifferi y cols., 2006). Este canal es sensible a concentraciones micromolares de Ca^{2+} . Se determinó una $K_{0,5}$ de 26 μM en cilios completos escindidos de salamandra, (Kleene y Gesteland, 1991) y 4,8 μM en la rata, medido en parches aislados del botón dendrítico (Hallani y cols., 1998). El valor determinado en salamandra pudo haber sido sobreestimado debido a que no se intentó bloquear al NCX, mientras que el segundo no se determinó en los cilios, existiendo la posibilidad de que el canal de Cl^- ciliar presente diferencias con el del botón dendrítico. Recientemente, se ha propuesto que el canal de Cl^- ciliar pertenece la familia de los canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} conocidos como bestrofenos (Pifferi y cols., 2006),

sobre la base de su distribución apical en el tejido olfatorio y su detección en membranas purificadas de cilio con estudios inmunoquímicos, y de análisis de ruido en fragmentos aislados de botones dendríticos de NSO de rata (presumiblemente conteniendo cilios). Del análisis de ruido se obtuvieron valores de conductancia de 1,2 pS similar a los antes mencionados (Larsson y cols., 1997). Por otra parte, registros de canales unitarios realizados en parches escindidos directamente de cilios olfatorios de sapo, indican la presencia de canales Cl_{Ca} con conductancias de 11 y 22 pS (Delgado y Bacigalupo, 2006). La marcada discrepancia respecto a las diversas conductancias reportadas en los canales de Cl^- de los cilios aun no está esclarecida.

La concentración de Ca^{2+} que se alcanzaría en los cilios durante la exposición a odorantes, estimada mediante mediciones con sondas fluorescentes, es algo menor que 1 μM (Leinders-Zufall y cols., 1998), suficiente para activar una pequeña fracción de los canales de Cl^- (Hallani y cols., 1998). Sin embargo, estas son determinaciones de la concentración de Ca^{2+} global del lumen ciliar. Es probable que junto a la membrana, cerca a la boca de los canales por donde entra el Ca^{2+} , este podría alcanzar niveles considerablemente superiores a los estimados por fluorescencia. En tal caso el número de canales de Cl^- activados podría ser mayor, en concordancia con las mediciones hechas en condiciones de registro de célula completa (Lowe y Gold, 1993a). El canal de Cl^- se activa directamente por Ca^{2+} , según se puede concluir de los estudios hechos en parches aislados del botón dendrítico y del cilio (Kleene y Gesteland, 1991; Hallani y cols., 1998; Delgado y Bacigalupo, 2006), en contraste con otros canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} cuya activación es mediada por fosforilación por la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} (CaMKII) (Fuller y cols., 1994). Se ha reportado, en experimentos realizados en una

línea celular derivada de precursores de NSO, que el canal de Cl^- encontrado en esas células es activado por CaM (Kaneko y cols., 2006). Sin embargo, este canal no necesariamente corresponde al canal que se expresa en los cilios de las NSO maduras. El canal de Cl^- de las NSO es bloqueado por ácido niflúmico, DIDS, clorotoxina y otros compuestos (Frings y cols., 2000). Su densidad y número total en los cilios de anfibios ha sido estimada en $\sim 80 \mu\text{m}^{-2}$ y ~ 2500 por cilio, respectivamente (Kleene, 1997; Larsson y cols., 1997).

III.3 El canal de K^+ activado por Ca^{2+} (K_{Ca}). La presencia de canales K_{Ca} en los cilios se descubrió mediante mediciones de corrientes totales en neuronas aisladas bajo potencial controlado. Estos canales, responsables de la respuesta inhibitoria, se activan a través de un mecanismo de segundos mensajeros, como lo sugieren la latencia de 100 o más milisegundos que precede a la corriente de K^+ desde la llegada de los olores a los cilios (Morales y cols., 1994). Recientemente se estableció, mediante registros de canal único (*patch clamp*) en los cilios olfatorios y en membranas ciliares incorporadas en bicapas lipídicas, que al menos cuatro tipos diferentes de canales K_{Ca} están presentes en estos organelos: con conductancias entre 15 y 220 pS (Delgado y cols., 2003; Castillo y cols., 2005). El de menor conductancia es bloqueado por apamina, otros dos de conductancia intermedia son sensibles a clotrimazol y el de alta conductancia se bloquea por caribdotoxina (CTx) e iberiotoxina (IbTx).

Mediante registros de corrientes de K^+ activadas por Ca^{2+} realizados a nivel de canal único en fragmentos aislados del cilio, se estimó que la concentración de Ca^{2+} en las vecindades del lado interno de la membrana ciliar puede llegar a 100 μM (Delgado y

Bacigalupo, 2004). Estas estimaciones se obtuvieron comparando la fracción de tiempo que el canal K_{Ca} permaneció abierto (P_0) registrado *in situ* en el cilio bajo estimulación con odorante, con la concentración de Ca^{2+} que corresponde a ese mismo valor de P_0 en la curva P_0 vs. $[Ca^{2+}]$, construida a partir de varios fragmentos de membrana escindidos de cilio conteniendo el mismo canal. Algo similar se hizo con los canales de Cl^- , obteniéndose valores máximos de activación a concentraciones de Ca^{2+} de alrededor de $10 \mu M$ (Delgado y Bacigalupo, 2006).

IV.- El intercambiador Na^+/Ca^{2+} de la membrana plasmática ciliar

Los NCX son proteínas integrales de membrana y juegan un papel importante en el control del Ca^{2+} intracelular en muchos tipos celulares ya que constituyen una vía de extracción de Ca^{2+} desde el interior de la célula hacia el medio externo. Estas proteínas transportan Ca^{2+} en contra de su gradiente de concentración. La energía necesaria para el funcionamiento del intercambiador proviene del gradiente de Na^+ y su estequiometría es de $3Na^+:1Ca^{2+}$, siendo, por lo tanto, electrogénico. Los fotorreceptores retinianos poseen una forma de intercambiador Na^+/Ca^{2+} que aprovecha además el gradiente de concentración del K^+ , siendo su estequiometría $4Na^+:1K^+,1Ca^{2+}$ (Cervetto y cols., 1989). El NCX tiene alrededor de 940 aminoácidos y aparentemente nueve segmentos de transmembrana, destacando un gran lazo intracelular entre los segmentos 5 y 6. Se han descrito al menos 3 isoformas, con un alto grado de identidad entre sí y con una gran similitud funcional. El intercambiador puede funcionar en modo directo (sacando Ca^{2+} de la célula) o reverso (ingresando Ca^{2+} desde el exterior), dependiendo de los gradientes

electroquímicos de Na^+ y Ca^{2+} . La despolarización puede revertir su modo de funcionamiento de directo a reverso, pero el aumento de Ca^{2+} intracelular contrarresta en cierta medida el efecto de la despolarización. Este intercambiador puede ser inhibido reemplazando el Na^+ externo por Li^+ y es bloqueado por La^{3+} . Se ha propuesto que esta proteína está sujeta a regulación por varios factores (sus sustratos, Na^+ y Ca^{2+} , PIP_2 y fosforilación), pero los rangos dentro de los cuales estos podrían ejercer acciones regulatorias no coinciden con las condiciones fisiológicas, lo que descartaría una significación funcional (Philipson y Nicoll, 2000). El transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de las neuronas olfatorias ha sido hasta ahora estudiado principalmente con aproximaciones electrofisiológicas (Reisert y Matthews, 1998; Reisert y cols., 2003). El mRNA del NCX ha sido detectado en el epitelio olfatorio mediante hibridación *in situ* (Schulze y cols., 2002). Se estableció, mediante el uso de anticuerpos específicos, que en las NSO se expresan las tres isoformas conocidas del NCX (Pyrski y cols., 2007), pero sin el nivel de resolución suficiente para determinar si su expresión ocurre en los cilios.

V.- Ca^{2+} -ATPasas de la membrana plasmática (PMCA).

Estas bombas de iones constituyen otro importante mecanismo de extracción de Ca^{2+} , que también se encuentra en muchos tipos celulares. En células animales se distinguen dos tipos de Ca^{2+} -ATPasas: la de la membrana plasmática (PMCA) y la de retículo endoplasmático (SERCA), existiendo de cada una de ellas varias isoformas. Un modo de distinguir estas dos bombas es farmacológicamente, ya que la segunda es inhibida por tapsigarguina, mientras que la primera no lo es. La PMCA tiene 4 isoformas,

todas ellas de aproximadamente 1200 aminoácidos y con 10 dominios de transmembrana. La PMCA posee un sitio de unión para calmodulina y un sitio de auto-inhibición cercano al anterior, que mantiene a esta bomba en un modo de baja actividad a concentraciones bajas de Ca^{2+} . Sin embargo, cuando ocurre un aumento de Ca^{2+} intracelular la unión de Ca^{2+} -CaM a la ATPasa releva la inhibición y la bomba se activa considerablemente (Falchetto y cols., 1992; Carafoli y Brini, 2000).

Se han identificado cuatro genes que codifican para la PMCA (1-4) en vertebrados (Greeb y Shull, 1989; Brandt y Vanaman, 1994). Estos 4 genes poseen, a su vez, variantes de *splicing*, lo que genera un incremento adicional en la diversidad de isoformas de la proteína. De hecho, el *splicing* alternativo en el carboxilo y el amino terminal genera más de 30 variantes de la PMCA (Strehler y Zacharias, 2001). Las diferentes isoformas de la bomba presentan actividades máximas de transporte de Ca^{2+} semejantes entre ellas, teniendo, en condiciones de estado estacionario, una marcada dependencia de Ca^{2+} .

Otra propiedad notable de las PMCA es que cotransportan Ca^{2+} y protones, es decir, actúan como un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$. La estequiometría no está clara aún, pudiendo ser $1\text{Ca}^{2+}:1\text{H}^+$ o bien $1\text{Ca}^{2+}:2\text{H}^+$ (Carafoli y Brini, 2000), lo que determinaría que una PMCA sea electrogénica o electroneutra, respectivamente. Midiendo transporte de Ca^{2+} en vesículas invertidas e membranas de eritrocitos, se han obtenido evidencias de que la PMCA opera de manera electrogénica durante el transporte (Waisman y cols., 1981; Rossi y Schatzmann, 1982; Smallwood y cols., 1983). Por otro lado, la reconstitución en proteoliposomas de PMCA purificadas sugirió que la PMCA transporta Ca^{2+} de manera electroneutra (Niggli y cols., 1982). Otro estudio, realizado también en

PMCA de eritrocitos reconstituidas en proteoliposomas, mostró que la actividad de la PMCA es electrogénica; ya que se observó un exceso de carga asociado al transporte de Ca^{2+} (Hao y cols., 1994). Sin embargo, en este último estudio la electrogenicidad fue críticamente dependiente del detergente utilizado para la reconstitución, por lo que el fenómeno observado podría no tener un significado fisiológico. En vesículas sinápticas, la estequiometría parece ser $1\text{Ca}^{2+}:1\text{H}^+$ (Salvador y cols., 1998), mientras que un estudio realizado en linfocitos-T indica que la Ca^{2+} -ATPasa es electroneutra e independiente del voltaje (Bautista y Lewis, 2004). El mismo estudio muestra que esta proteína depende fuertemente del Ca^{2+} , lo que guarda relación con el ingreso de este catión a través de canales de Ca^{2+} y su acumulación localmente junto a la membrana plasmática, más que a incrementos en el nivel global de Ca^{2+} en las células. Estas evidencias apoyan la idea de que los aumentos de Ca^{2+} en las células ocurren en microdominios en torno a los canales de Ca^{2+} (en este caso, canales de Ca^{2+} dependientes del vaciamiento de Ca^{2+} de depósitos intracelulares), donde estaría ubicada también la PMCA (Bautista y Lewis, 2004).

Por los efectos del Ca^{2+} en el lumen de los cilios de las NSO, cabe pensar que su disponibilidad intraluminal es finamente regulada. A diferencia del cuerpo celular, los cilios carecen de sistemas de membranas internas (Menco, 1992), que puedan capturar el Ca^{2+} luego de aumentar por la estimulación odorífera y retornarlo a su nivel de reposo. Adicionalmente, es probable que la difusión del Ca^{2+} al interior del cilio esté fuertemente reducida debido a su unión a proteínas citoplasmáticas y de la membrana.

Existen sólidas evidencias funcionales que indican que luego de que ha ocurrido un aumento en el Ca^{2+} intraciliar producto de un estímulo odorífero, éste es restaurado a la condición de reposo por un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (Reisert y Matthews,

1998). El reemplazo de Na^+ por Li^+ (que no es capaz de impulsar al intercambiador) en la solución externa, prolonga la duración de la corriente activada por odorantes, debido probablemente a una acumulación sostenida del Ca^{2+} intraciliar que activa los canales Cl_{Ca} . Dado a que la actividad del NCX es electrogénica, es decir, por cada ciclo de actividad ingresa una carga positiva neta a través de la membrana plasmática, su eficiencia puede ser afectada por la despolarización celular. El potencial de inversión de la corriente portada por el NCX es ~ -30 mV (Eisner y Lederer, 1985). Los estudios que vinculan al NCX con la extracción de Ca^{2+} desde los cilios se realizaron midiendo corrientes extracelulares con una pipeta de succión, sin control del potencial (Reisert y Matthews, 1998), o bien bajo registro de corrientes totales, controlando el potencial a -40 mV (Reisert y Matthews, 2001). En tales condiciones no es posible establecer el efecto del potencial transmembrana sobre la actividad de este transportador.

Las consideraciones anteriores sugieren fuertemente que en los cilios olfatorios habría un mecanismo de extracción de Ca^{2+} adicional al NCX. El candidato más obvio para este transportador es una Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática.

En efecto, como se muestra en este trabajo de tesis, los cilios olfatorios expresan dicha proteína. La existencia de una Ca^{2+} -ATPasa no había sido previamente descrita en cilios olfatorios de vertebrados al iniciarse esta tesis, a excepción de un estudio realizado en salmón (Lo y cols., 1994), donde las condiciones fisiológicas son muy diferentes. El posible papel de una Ca^{2+} -ATPasa en la homeostasis del Ca^{2+} en las NSO se sugirió previamente, a partir de mediciones de Ca^{2+} en NSO de anfibios cargadas con Fura-2, en paralelo con mediciones de corrientes mediante *patch clamp*. Al omitir el ATP en la pipeta de registro, se observó que la concentración de Ca^{2+} en estado estacionario pasa de

35 nM a 500 nM, indicando que se requiere ATP para mantener los niveles basales de Ca^{2+} y sostener su extracción desde la NSO (Lischka y Schild, 1993). Estas mediciones, sin embargo, no se realizaron en los cilios, sino en células enteras. Mientras el presente trabajo estaba en curso, se reportó la presencia de una PMCA en neuronas olfatorias la que se detectó mediante inmunofluorescencia en células aisladas de epitelio olfatorio de ratón y mediante PCR de NSO sin que se pudiera discernir, sin ambigüedad, su expresión en los cilios (Weeraratne y cols., 2006).

Por lo expuesto, es posible pensar que un sistema de extracción de Ca^{2+} basado exclusivamente en el NCX no podría por sí solo dar cuenta de su remoción desde el cilio durante todo el rango de potenciales en que funciona una NSO (~ -70 a ~ -5 mV). Cabe destacar que si se inspeccionan de manera cuidadosa los resultados de Reisert y Matthews (1998), se advierte que si bien al inhibir el NCX la I_{ClCa} se prolonga notablemente, ésta tiene una cierta tasa de recuperación, la que podría atribuirse a la actividad de un segundo tipo de transportador; sin embargo, este no fue identificado así como tampoco su posible contribución a la remoción del Ca^{2+} ciliar, fue debidamente apreciada en dicho estudio. Debido al rol crucial del Ca^{2+} en la transducción olfatoria, es imprescindible entender cómo ocurre su regulación y homeostasis en las NSO, particularmente en los cilios olfatorios.

Con los antecedentes expuestos, el objetivo de esta tesis fue determinar la expresión y función de una PMCA en los cilios olfatorios.

HIPOTESIS

En los cilios olfatorios se expresa una Ca^{2+} -ATPasa que participa en la remoción de Ca^{2+} .

OBJETIVO GENERAL

Investigar si hay una Ca^{2+} -ATPasa que participe en la remoción del Ca^{2+} desde los cilios olfatorios

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si en los cilios olfatorios se expresa una Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA).
2. Determinar si la PMCA es modulada por Ca^{2+} y CaM.
3. Determinar si la PMCA participa en la extracción de Ca^{2+} desde los cilios olfatorios.

MATERIALES Y METODOS

Las neuronas olfatorias de rata y de anfibios exhiben esencialmente las mismas características fisiológicas (Schild y Restrepo, 1998; Sanhueza y cols., 2000; Lagostena y Menini, 2003), por lo cual han sido utilizadas de manera complementaria en los experimentos descritos aquí, según las conveniencias experimentales.

Todos los procedimientos experimentales con animales descritos en esta tesis se realizaron de acuerdo a las normas del Comité de Ética de la Universidad de Chile, FONDECYT y el National Institutes of Health (NIH) de Estados Unidos.

Para los experimentos de *Western blot* y de transporte, se purificaron cilios olfatorios de rata, ya que en estos animales las NSO se descilian con facilidad desde el epitelio olfatorio, permitiendo obtener una preparación altamente purificada en estos organelos. Las NSO de anfibios, por el contrario, resisten mejor el proceso de disociación, conservando un alto número de NSO con cilios, los que son mucho más largos que los de la rata (250 μm vs. 5 μm), por lo que se utilizaron para experimentos electrofisiológicos, de fluorescencia de Ca^{2+} e inmunofluorescencia.

I.- Distribución celular de la PMCA. La expresión y distribución de la PMCA en las NSO se determinó mediante las siguientes técnicas inmunoquímicas: 1) *Western blots* de membranas purificadas de cilios olfatorios de rata; 2) inmunocitoquímica en NSO disociadas del epitelio olfatorio de rana; y 3) inmunohistoquímica en cortes de tejido epitelial olfatorio de rata. La expresión del NCX se examinó mediante las mismas técnicas.

MATERIALES Y METODOS

Las neuronas olfatorias de rata y de anfibios exhiben esencialmente las mismas características fisiológicas (Schild y Restrepo, 1998; Sanhueza y cols., 2000; Lagostena y Menini, 2003), por lo cual han sido utilizadas de manera complementaria en los experimentos descritos aquí, según las conveniencias experimentales.

Todos los procedimientos experimentales con animales descritos en esta tesis se realizaron de acuerdo a las normas del Comité de Ética de la Universidad de Chile, FONDECYT y el National Institutes of Health (NIH) de Estados Unidos.

Para los experimentos de *Western blot* y de transporte, se purificaron cilios olfatorios de rata, ya que en estos animales las NSO se descilian con facilidad desde el epitelio olfatorio, permitiendo obtener una preparación altamente purificada en estos organelos. Las NSO de anfibios, por el contrario, resisten mejor el proceso de disociación, conservando un alto número de NSO con cilios, los que son mucho más largos que los de la rata (250 μm vs. 5 μm), por lo que se utilizaron para experimentos electrofisiológicos, de fluorescencia de Ca^{2+} e inmunofluorescencia.

I.- Distribución celular de la PMCA. La expresión y distribución de la PMCA en las NSO se determinó mediante las siguientes técnicas inmunoquímicas: 1) *Western blots* de membranas purificadas de cilios olfatorios de rata; 2) inmunocitoquímica en NSO disociadas del epitelio olfatorio de rana; y 3) inmunohistoquímica en cortes de tejido epitelial olfatorio de rata. La expresión del NCX se examinó mediante las mismas técnicas.

Se utilizaron anticuerpos PAN para detectar tanto la PMCA (Sigma) como el NCX (Diagnóstics Research). Los anticuerpos PAN detectan todas las isoformas de una misma proteína, PMCA 1 a 4 y NCX 1 a 3, para la bomba y el intercambiador, respectivamente. Adicionalmente, para determinar la(s) isoforma(s) de PMCA expresada(s) en los cilios, se trataron membranas con anticuerpos específicos para cada una de ellas, PMCA 1, 2, 3 y 4 (Abcam).

I.1 Western blot: se cargaron 70 µg de proteínas por carril en geles de poliacrilamida al 10% para detectar la PMCA, el NCX, el canal CNG (Alomone Labs), la ACIII (Santa Cruz Biotechnology); al 15% para la detección de CaM (Sigma); y al 7,5% para detectar el canal de Na⁺ activado por voltaje (Alomone Labs). Típicamente, las electroforesis se corrieron a 70 V durante el paso por el gel concentrador y a 90 V para el gel separador. Luego de separadas, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) durante toda la noche a 25 V o durante 1 h 30 min a 65 V. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche descremada al 5% disuelta en PBS-T (tampón fosfato salino, suplementado con el detergente Tween-20 al 0,1%). Los anticuerpos primario y secundario fueron preparados en la misma solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios se utilizaron a una dilución de 1:600 para el NCX, el canal de Na⁺ y el canal CNG y 1:000 para la PMCA, la ACIII, el canal CNG y la CaM. Los anticuerpos isoforma-específicos de la PMCA se utilizaron a una dilución de 1:600 y cada uno puede reconocer 2 variantes de *splicing* de cada una de las cuatro isoformas, *a* y *b*. Las membranas se incubaron con el anticuerpo durante toda la noche a 4°C con agitación o 2 h a temperatura ambiente en agitación. Luego se lavaron 4 veces, 5 min

cada vez, con PBS-T. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-ratón (Sigma) para la PMCA (PAN), PMCA 4, la ACIII, el canal de Na⁺ activado por voltaje, y la CaM; anti-conejo (Sigma) para el canal CNG, el NCX, la PMCA 1, la PMCA 2 y la PMCA 3; acoplados a HRP. Las membranas se trataron con el agente quimioluminescente ECL (Amersham Biosciences) durante 1 min y se reveló una película (Fuji film) expuesta a la membrana.

I.2 Inmunofluorescencia: se realizó en células disociadas del epitelio olfatorio del sapo chileno, *Caudibervera caudibervera*. Los animales se anestesiaron en hielo, se sacrificaron y se les extrajo el epitelio olfatorio desde la cavidad nasal. El epitelio se mantuvo en solución Ringer (en mM: 115 NaCl, 2,5 KCl, 1 CaCl₂, 1,5 MgCl₂, 10 HEPES, 10 sacarosa, pH 7,6), se cortó en trozos de ~1 mm² con microtijeras (Fine Sciences Tools) y se disociaron las células olfatorias pasando micropinzas finas (Fine Sciences Tools) sobre el tejido y resuspendiendo suavemente las células en solución Ringer. Estas se dejaron decantar sobre cubreobjetos pretratados con pegatina (Bios-Chile) para facilitar la adherencia celular. Se fijaron 5 min con *p*-formaldehído (PFA) al 4% en PBS y luego se lavaron 3 veces, 5 min cada vez con PBS. Las células fueron luego bloqueadas con 2% BSA, 10% del suero del animal en que fue hecho el anticuerpo secundario, 0,01% Triton-X100, todo en PBS. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios respectivos (1:100) durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C. Los cubreobjetos conteniendo las células se lavaron 3 veces con PBS, 5 min cada vez. Luego se incubó con los anticuerpos secundarios pertinentes (1:500) en solución de bloqueo, en una cámara húmeda y oscura, toda la noche a 4°C o 3h a temperatura ambiente (20 ± 2 °C). Se lavaron las células 3 veces, 5 min cada vez con PBS, se

montaron con fluoromount (Electron Microscopy Sciences) y se mantuvieron en oscuridad hasta ser visualizadas al microscopio de epifluorescencia invertido (Carl Zeiss OX10 VERT 200M) con un objetivo de inmersión en aceite 63X (Plan apocromático; 1,4 NA) y equipado con una cámara CCD. Los anticuerpos secundarios utilizados estaban acoplados a sondas fluorescentes: Alexa fluor-488 anti-ratón para PMCA (PAN) y PMCA 4, y Alexa fluor 564 anti-conejo para el NCX y el canal CNG.

I.3 Inmunohistoquímica: se llevaron a cabo en cortes criostáticos de epitelio olfatorio de rata. Los animales se anestesiaron con barbital sódico (45 mg/Kg de peso corporal) y se fijó el tejido olfatorio por perfusión con PFA 4% en PBS. El epitelio olfatorio se extrajo desde la cavidad nasal, *septum* y turbinas, y se dejó en 30% sacarosa durante toda la noche. Los tejidos tratados se congelaron en medio de congelamiento (TBS, Electron Microscopy Sciences) y se cortaron en secciones de ~10 µm. Los cortes se pegaron sobre cubreobjetos pretratados con pegatina y se bloquearon los sitios inespecíficos con 2% BSA, 10% del suero en que fue hecho el anticuerpo secundario (burro), 5% leche descremada, 0,1% Tritón-X 100, todo en PBS. El tejido se incubó con el anticuerpo primario anti-PMCA (PAN) (1:100) en solución de bloqueo, toda la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Luego se lavó 3 veces, 10 min cada vez con PBS. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón (1:2000) toda la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda. El tejido se lavó 3 veces, 10 min cada vez con PBS y se incubó 4 h con solución del *kit* ABC (vecstatin kit, Vector Laboratories) para inmunohistoquímica. Los cortes se expusieron a diaminobenzidina (DAB) por unos minutos, se deshidrataron con una serie de pasos por metanol entre 50%

y 100 %, y se montaron con Entellan (Merck) para ser vistas al microscopio usando un objetivo 40X (LD acroplan; 0,6 NA; PH2; KORR).

II.- Obtención de vesículas de membrana de cilios olfatorios. Las membranas ciliares se obtuvieron mediante un procedimiento que incluye ruptura mecánica del epitelio olfatorio (Washburn y cols., 2002) y purificación en gradientes de sacarosa (Castillo y cols., 2005): ratas de 35-40 días, se anestesiaron con una sobredosis de barbital sódico y se sacrificaron por decapitación. Se realizó un corte sagital de la cabeza y se extrajo el epitelio olfatorio desde la zona de las turbinas. Todos los pasos se realizaron a 4°C. Los tejidos extraídos se colocaron en una solución salina (en mM: 145 NaCl, 5 KCl, 1,6 K₂HPO₄, 2 MgSO₄, 20 HEPES, 7,5 D-Glucosa, pH 7,4) y se agregó EDTA a concentración final 1 mM. La suspensión se agitó suavemente por 20 minutos y se centrifugó por 10 min a 1.500 x g. El sobrenadante (S₁) se recuperó y el sedimento se resuspendió en solución salina suplementada con EDTA. La suspensión se sonicó suavemente a baja potencia por 10 s y se recuperó el sobrenadante (S₂). El sedimento se resuspendió nuevamente en solución salina/EDTA y se sonicó a baja potencia por 30 s. Se dejó decantar y se recuperó el sobrenadante (S₃). Los sobrenadantes de las sonicaciones (S₂+S₃) se juntaron y se centrifugaron a 1.500 x g por 10 minutos. El sobrenadante (S₄) se recuperó y se juntó con el S₁, para ser colocado delicadamente sobre un gradiente discontinuo de sacarosa entre 20% y 43% el cual se centrifugó por 1 h a 100.000 x g. La banda que se formó entre ambos gradientes se extrajo delicadamente con una pipeta *Pasteur*, se diluyó 10 veces y se centrifugó nuevamente a 100.000 x g por 1 h. El sedimento obtenido se resuspendió en volumen mínimo (100-200 µL) de solución

salina suplementada con EGTA 1 mM y sacarosa 0,5 mM. Las membranas de vesículas de cilios olfatorios así obtenidas se utilizaron al día siguiente para experimentos de western blot o transporte, o bien se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta ser utilizadas. Las proteínas totales se determinaron mediante un método modificado de Lowry (Hartree, 1972). Típicamente se obtienen de 1 a 3 µg de proteínas ciliares totales por microlitro de preparación de membranas (10-20 ratas).

III.- Obtención de otras membranas. Las membranas de epitelio desciliado se obtuvieron como se describe en Washburn et al., 2002. Membranas de cerebro, bulbo olfatorio y epitelio completo se obtuvieron homogenizando los tejidos respectivos en tampón-sacarosa (0,2 mM EDTA, 10 mM MOPS, 0,3 M sacarosa, 0,02% NaN₃, pH 7,4). Las suspensiones se centrifugaron a 15.000 x g durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante, se centrifugó 1 h a 100.000 x g y el sedimento se resuspendió en solución salina. Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C y todas las soluciones se suplementaron con un *cocktail* de inhibidores de proteasas (Sigma). Las membranas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta ser utilizadas. Se determinaron las proteínas totales mediante el método de Hartree (1972).

Las membranas de Golgi y retículo endoplasmático fueron gentilmente facilitadas por el Dr. Daniel Wolff, y se obtuvieron según se describió previamente (Surroca y Wolff, 2000).

IV.- Mediciones de transporte de Ca^{2+} en vesículas de membrana de cilios olfatorios por incorporación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$: Para determinar si las membranas ciliares presentan transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP, se midió la incorporación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en vesículas invertidas (ver más adelante) de cilios olfatorios y se investigó la dependencia de Ca^{2+} y CaM en la acumulación de Ca^{2+} .

Las vesículas se utilizaron a una concentración final de $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ en un volumen total de $200 \mu\text{L}$ de buffer de reacción (en mM: 500 sacarosa, 2,5 HEPES-BTP; 20 KCl, 0,5 EGTA, 1 nM FCCP, pH 7,0). Se agregó Ca^{2+} y CaM a diferentes concentraciones desde una solución *stock*. La actividad específica de la bomba se determinó midiendo la incorporación de Ca^{2+} en ausencia de ATP. La carboxyeosina (CE, Molecular Probes), inhibidor de la PMCA (Gatto y Milanick, 1993), el calmidazolio (CMZ, Sigma), inhibidor de la CaM (Fischer y cols., 1987) y el iónóforo de Ca^{2+} A23187 (Sigma) (Martina y cols., 1994) se agregaron al medio de reacción para indagar sus efectos. La reacción se inició agregando 2 mM de ATP al medio y se detuvo a los 90 s con 4 mL de solución de detención (en mM: 250 sacarosa, 2,5 HEPES-BTP, 0,2 CaCl_2 , pH 7,0), a la vez que se hacía pasar por filtros de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore) de tamaño de poro donde quedaban retenidas las vesículas, con un sistema de vacío. Los filtros conteniendo las membranas ciliares se dejaron secar a temperatura ambiente y se colocaron en tubos *Eppendorf* de 1,5 mL con líquido de centelleo y la emisión de radiactividad se leyó en un contador de centelleo (TRICARB 100 TR, Packard Instruments).

Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) en soluciones libres de Na^+ para evitar la posible contribución del NCX al transporte de Ca^{2+} en las mediciones.

Las concentraciones de Ca^{2+} libre a concentraciones dadas de Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATP y EGTA se calcularon con el programa WinMaxc v2.05 (C. Patton, Stanford University).

V.- Inversión de membranas purificadas de cilios olfatorios. Las vesículas de membranas ciliares se obtuvieron mediante el método descrito previamente, el que permite obtener vesículas que están principalmente en orientación fisiológica, como se infiere de los experimentos de transporte de Ca^{2+} , donde se mide muy poca actividad previo a la inversión vesicular. Las vesículas ciliares fueron invertidas con el fin de exponer la cara interna de la membrana ciliar, donde están localizados los sitios catalíticos y regulatorios de las PMCA. El proceso de inversión de membranas se llevó a cabo mediante un método que involucra ruptura osmótica de las membranas (Fraser y cols., 1985) y dilución rápida, lo que facilita el resellado de las vesículas. Se agregaron 200 μL de una suspensión de vesículas ciliares a un tubo *Eppendorf* que contenía solución de inversión (50 mM Tris-acetato, 10% glicerol y 250 μM sacarosa) para completar un volumen de 2 mL. La solución se suplementó con 2 mM ouabaina (Sigma) para bloquear la Na^+/K^+ -ATPasa ciliar y evitar el consumo de ATP por parte de esta bomba durante los experimentos de transporte. La suspensión se diluyó 10 veces en solución de equilibrio y se centrifugó a 100.000 x g por 1 h. El sedimento se resuspendió y homogenizó en 200 μL de solución de equilibrio y se determinó la concentración de proteínas totales.

Cabe destacar que es probable que un porcentaje de vesículas no se hayan revertido. Esto no se determinó, puesto que no debiera influir en estas determinaciones por tener los sitios regulatorios y catalíticos de las ATPasas hacia el interior.

VI.- Determinación electrofisiológica de la actividad de la PMCA y del NCX en cilios olfatorios. Debido a que las corrientes de transducción en el olfato son directamente activadas por Ca^{2+} (canales K_{Ca} y Cl_{Ca}), se pueden utilizar para monitorear el Ca^{2+} intraciliar. Se escogió medir la corriente de Cl^- activada por Ca^{2+} (I_{ClCa}) para estimar los efectos del bloqueo de los transportadores de Ca^{2+} en la relajación de la corriente, ya que al ser esta directamente activada por Ca^{2+} , el bloqueo de los mecanismos de remoción, debería afectar la cinética de relajación de la misma. La conductancia K_{Ca} también está presente en la dendrita y el soma de la NSO (Sanhueza y cols., 2000; Madrid y cols., 2005), por lo que sólo la I_{ClCa} es adecuada para monitorear el Ca^{2+} relacionado con la transducción sensorial, ya que su expresión se restringe a los cilios. Los registros se hicieron en NSO disociadas de epitelio olfatorio de *C. caudibervera*. Estos experimentos se realizaron con la asesoría y colaboración de Ricardo Delgado, experto en técnicas electrofisiológicas.

La I_{ClCa} se determinó mediante la técnica de *patch clamp* (Axopatch 1D, Axon Instruments) en la configuración de registro de corriente total, bajo potencial controlado ($V_h = -70$ mV). Se indujeron aumentos de Ca^{2+} en el cilio liberando cAMP desde un compuesto jaula (100 μM DMNB-caged cAMP, Molecular Probes) con un pulso de luz UV proveniente de una lámpara de Xenón (JML-C2, Rapp OptoElectronic). Este procedimiento permite activar la vía de entrada de Ca^{2+} al cilio, es decir, los canales CNG y tiene por objeto emular el efecto global de los olores de aumentar la concentración del Ca^{2+} ciliar de un modo más reproducible y definido que con odorantes. El compuesto jaula se introdujo a la célula a través de la pipeta de registro y se esperó entre 3-5 min

para que se equilibrara e invadiera los cilios. De este mismo modo se introdujo a la célula 100 μM de CE, para bloquear la PMCA.

Las células olfatorias se resuspendieron en solución Ringer (en mM: 115 NaCl, 2,5 KCl, 1 CaCl₂, 1,5 MgCl₂, 10 HEPES, 10 sacarosa, pH 7,6), se colocaron sobre un cubreobjeto en la cámara de registro y se dejaron decantar sin adherirlas al fondo. Las NSO se visualizaron en un microscopio invertido (Olympus IX70) equipado con un objetivo de contraste de fase 40X (Plan N, 0,65 NA). Sólo células con cilios batientes se utilizaron para estos registros.

El papel de la PMCA en la remoción del Ca²⁺ ciliar se investigó midiendo la corriente de transducción en 3 condiciones distintas que la anulan: bloqueando la PMCA con 100 μM CE; omitiendo el ATP en la pipeta de registro; y alcalinizando el medio extracelular desde pH 7,6 a pH 9,4. El NCX se anuló reemplazando equimolarmente el Na⁺ de la solución Ringer externa por Li⁺.

La solución intracelular en la pipeta de registro contenía (en mM): 120 KCl, 5 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 2 EGTA, 4 HEPES, 2 Mg-ATP, pH 7,6.

Las pipetas de registro se hicieron de capilares de vidrio de borosilicato y se estiraron en un estirador horizontal de pipetas (P97, Sutter Instruments). Las resistencias de las pipetas fueron de 2 a 4 M Ω y al sellarse, típicamente de 3 a 5 G Ω .

Los registros se digitalizaron a 20 kHz, se filtraron a 5 kHz con el programa pCLAMP 6.0 (Axon Instruments) y se almacenaron en un PC para ser analizadas. Se indican los valores promedio de relajación de las corrientes y sus amplitudes \pm S.E.M.

VII.-Mediciones de Ca^{2+} en los cilios olfatorios mediante fluorescencia. Para estudiar la dinámica de Ca^{2+} en los cilios olfatorios en función del espacio y el tiempo con alta resolución, se monitorearon los cambios en la fluorescencia de Ca^{2+} directamente en los cilios con un microscopio de doble fotón. Adicionalmente, el láser del doble fotón también se puede usar para liberar simultáneamente compuestos enjaulados. Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. Diego Restrepo en el *Taste and Smell Center* en la Universidad de Colorado Denver en Estados Unidos. En NSO de anfibios se ha observado aumentos de Ca^{2+} inducidos por olor utilizando sondas fluorescentes de Ca^{2+} (Leinders-Zufall y cols., 1998). El bajo apagamiento de la señal de fluorescencia y zonas de excitación y emisión de fluorescencia altamente focalizadas se tuvieron en cuenta a la hora de elegir la microscopia de doble fotón como herramienta para medir Ca^{2+} en los cilios. Toda la fluorescencia se colecta y esta proviene solo del plano focal, evitando posibles contribuciones fuera foco que podrían afectar las mediciones.

Se disociaron células de epitelio olfatorio de la rana leopardo (*Rana pipiens*). Las células se disociaron en solución extracelular (en mM: 115 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl₂, 0,4 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7,5) y se dejaron decantar en cubreobjetos pretratados con cell-TAK (BD Biosciences) para facilitar la adhesión celular y evitar el movimiento ciliar que podría generar falsas señales fluorescentes. Las células se incubaron con 10 μM de la sonda Fluo 4-AM (Molecular Probes) durante 40 min. Se lavó dos veces, diez min cada vez, con solución extracelular. A continuación las células fueron expuestas y mantenidas, al menos por 25 min, a solución externa conteniendo 250 μM de cAMP enjaulado, el que puede traspasar la membrana celular. Los cilios que presentaban un segmento recto de al menos 5 μm de largo se escogieron para realizar las mediciones de fluorescencia en el

modo de barrido lineal. Las mediciones se llevaron a cabo en solución extracelular normal, en solución extracelular con 0- Ca^{2+} externo (tamponada con 1 mM EGTA), en solución extracelular suplementada con 50 μM CE para bloquear la PMCA, en solución Ringer- Li^+ (en la cual el Li^+ ha reemplazado al Na^+ para bloquear el NCX), en solución extracelular suplementada con 1 mM IBMX (Sigma) para bloquear la PDE, o en solución normal luego de una incubación por 30 min con el atrapador de colesterol 10 mM metil- β -ciclodextrina (CD, Sigma).

Todos los experimentos se hicieron en un microscopio (Carl Zeiss, LSM-510 NLO) equipado con un láser doble fotón de *Ti:sapphire*, trabajando a una longitud de onda de 795 nm. Las células fueron visualizadas con un objetivo de inmersión en agua 63X (Acroplan, 1,4 NA). Se posicionó una fibra óptica de 250 μm de diámetro justo debajo de la cámara de registro, centrada en el plano focal. La fotoactivación del cAMP se produjo mediante un destello de luz UV. Se hizo un barrido en línea de la zona elegida a lo largo del cilio, cada 3 ms durante 1 a 3 min. La emisión de fluorescencia del Fluo 4 se colectó utilizando los filtros BP 500-550 IR del microscopio. Las imágenes se visualizaron, analizaron y los datos se exportaron con el programa Zeiss LSM image.

Se analizó el curso temporal de la señal de fluorescencia debida al Ca^{2+} en condiciones control y bloqueando los transportadores de Ca^{2+} . Se graficaron los cambios relativos de fluorescencia ($\Delta F/F$) en el tiempo y se determinó el tiempo que demora la señal de fluorescencia en caer al 50% de su valor máximo ($\tau_{0.5}$). Adicionalmente se midió el ancho de los segmentos del cilio donde ocurrieron aumentos de fluorescencia al liberar cAMP. Se muestran los valores obtenidos \pm S.E.M.

RESULTADOS

I. Determinación de la expresión de la PMCA en los cilios olfatorios.

I.1 Distribución celular de la PMCA.

Luego de obtener una fracción de membranas purificadas de cilios olfatorios, se analizó mediante *Western blot* su grado de enriquecimiento y pureza. Se comprobó la expresión de proteínas típicas de la cascada de transducción olfativa, como la ACIII y el canal CNG (Figura 3A y B, n = 5 y 8). La ausencia del canal de Na⁺ dependiente de voltaje en las fracciones de membrana ciliar se utilizó como criterio de pureza de esta preparación (Figura 3C, n = 6). Como control se utilizaron membranas de epitelio desciliado, epitelio completo, bulbo olfatorio y cerebro. La ACIII se detectó en membranas de cilios, epitelio olfatorio completo (EO) y epitelio desciliado (Fig. 3A), pero no se observó en membranas de bulbo olfatorio o cerebro. La presencia de ACIII en la fracción desciliada del epitelio se debe a que probablemente no hubo desciliación completa quedando restos de cilios olfatorios en la fracción de membranas olfatorias desciliadas. El control sin anticuerpo primario en membranas de cilios (C) y cerebro (B) no exhibe marca (Fig.3A a la derecha). En otro experimento se observó que el canal CNG también estaba presente en la fracción de membranas ciliares (Fig. 3B) y era prácticamente indetectable en la fracción de membranas de epitelio desciliado (ED) y bulbo olfatorio (BO). El canal de Na⁺ activado por voltaje no se expresa en las membranas ciliares, pero sí en las fracciones de membranas de ED, BO, EO y B (Fig. 3C). Los controles sin anticuerpo primario en membranas de C y B no muestran marca.

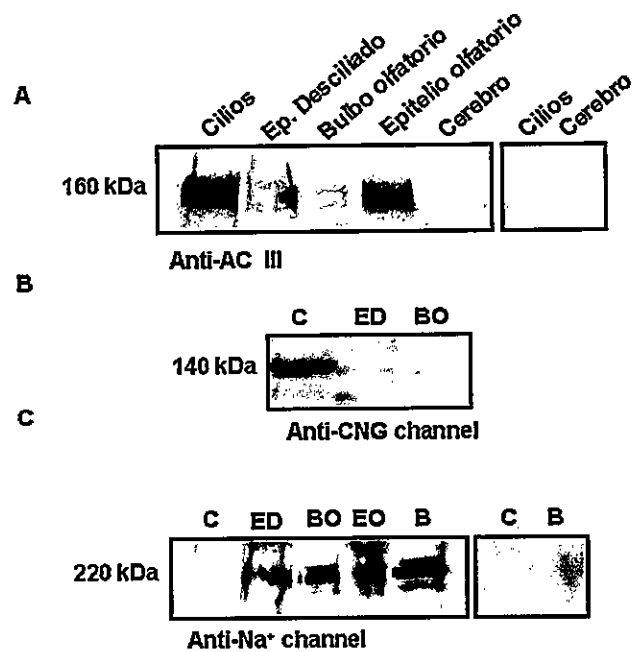


Figura 3.- Análisis de Enriquecimiento y Pureza de la Preparación de Membranas Ciliares. La fracción de membranas ciliares (C) está enriquecida en proteínas propias de la maquinaria de transducción olfatoria, presentes sólo en los cilios olfatorios, como la adenilil ciclasa tipo III (A, n=5) y el canal activado por nucleótidos cíclicos, CNG (B, n=8). La ausencia del canal de Na⁺ dependiente de voltaje en la fracción ciliar, se utilizó como criterio de pureza (C, n=6).

Con la certeza que la preparación de membranas de cilios olfatorios es altamente enriquecida en dichos organelos y virtualmente libre de contaminación por otras membranas de la NSO, se abordó el estudio de la expresión de la PMCA y el NCX. Se observó que tanto la PMCA (n=8) como el NCX (n=4) se expresan en los cilios de las neuronas olfatorias (Figura 4). Estas proteínas son universalmente reconocidas como sistemas de extracción de Ca²⁺ desde las células, por lo que no es de extrañar su presencia en todas las fracciones de membranas investigadas, indicadas en la Fig. 3A. En el caso del NCX, su expresión es menos evidente en la fracción desciliada y no se observa en membranas de retículo endoplásmático, usadas como control negativo.

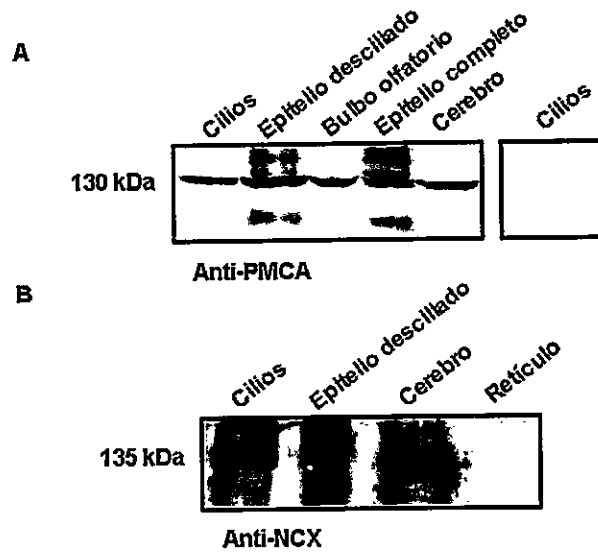


Figura 4.- Expresión de PMCA y NCX en cilios olfatorios. A, Los cilios olfatorios contienen una Ca^{2+} ATPasa de membrana plasmática. La proteína se expresa en todas las fracciones de membrana testeadas (epitelio desciliado, bulbo olfatorio, epitelio completo y cerebro), y no se observa en membranas ciliares que no han sido tratadas con el anticuerpo primario que detecta la bomba. B, El NCX también se expresa en las membranas ciliares, y se detecta en las membranas de epitelio desciliado y cerebro, pero no en membranas de retículo endoplásmico usadas como control negativo.

La distribución celular de ambos transportadores de Ca^{2+} fue examinada adicionalmente mediante inmunocitoquímica de NSO aisladas de sapo (*Caudibervera caudibervera*) (Figura 5). Se observó que tanto la PMCA (fluorescencia verde) como el NCX (fluorescencia roja) se expresan en toda la NSO, (n=18).

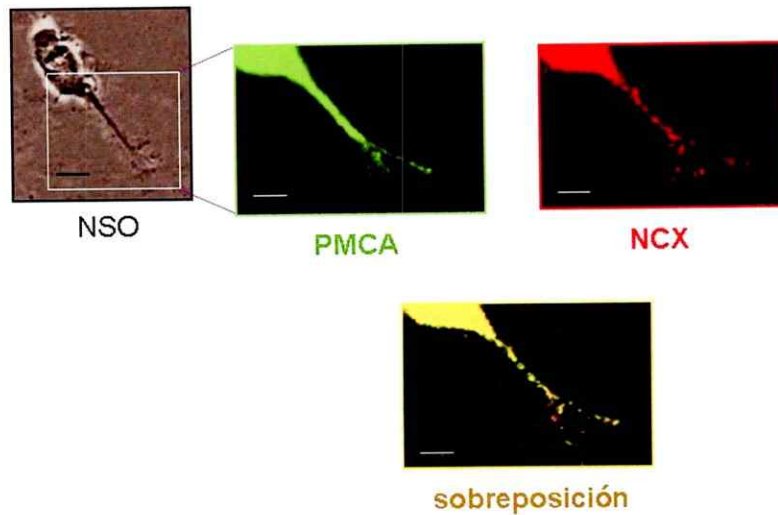


Figura 5.- Expresión de la PMCA y el NCX en Neuronas Receptoras Olfatorias. La inmunocitoquímica muestra que ambos transportadores de Ca^{2+} son expresados en las NSO. La PMCA se expresa en el soma, dendrita y cilios, así como también el NCX. Es posible advertir que hay una distribución punteada de ambas proteínas a lo largo de los cilios. Barra: 10 μm .

En la Figura 6 se observa, con mayor resolución, que la expresión de la PMCA exhibe una distribución discreta a lo largo de los cilios (n=13), pudiendo corresponder este modo de organización a la presencia de microdominios donde podría estar expresándose la proteína.



Figura 6.- Distribución de la PMCA en cilios olfatorios. Se observa y comprueba la expresión de la PMCA en los cilios olfatorios destacándose su distribución en puntos discretos a lo largo de estos organelos sensoriales. Las cabezas de flecha blanca indican lugares discretos de expresión de la PMCA. Barra 30 μm

La distribución de la PMCA en el tejido olfatorio se indagó mediante inmunohistoquímica en criosecciones de $\sim 10 \mu\text{m}$ del tejido sensorial de rata (Figura 7, n=9). La capa ciliar (CL) muestra un notable enriquecimiento en la expresión de la

PMCA comparado con el resto del tejido. La expresión de la proteína en el resto del epitelio es menos evidente y no se exploró en profundidad en este estudio. La misma estrategia experimental no arrojó resultados positivos para observar la expresión del NCX en el tejido olfatorio, probablemente debido a que el anticuerpo disponible no era adecuado para inmunohistoquímica.

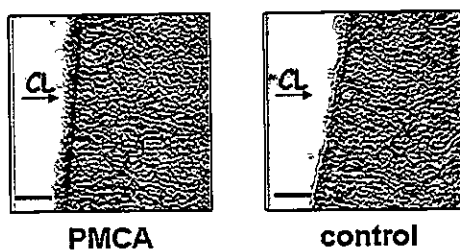


Figura 7.- Expresión de la PMCA en el tejido olfatorio. La expresión de la PMCA en la capa ciliar (CL) del epitelio olfatorio es evidente (panel a la izquierda). La marca que detecta la proteína en el resto del tejido es menos intensa. El control sin anticuerpo primario (panel a la derecha) exhibe mucho menos marca. Barra: 20 μm

Para explorar la expresión de las distintas isoformas de la bomba en los cilios olfatorios, se llevaron a cabo experimentos de *western blot* con anticuerpos que reconocen las 4 isoformas de la PMCA (Figura 8, $n=3$). Se observa que en los cilios olfatorios se expresan los productos génicos de las 4 PMCA. Los anticuerpos utilizados permiten reconocer 2 variantes de *splicing* de cada isoforma. Los pesos moleculares estimados a los cuales migran las bandas de proteína, indican que en los cilios olfatorios se expresan la PMCA 1a, la PMCA 2a y 2b, la PMCA 3, y la PMCA 4b, esta última aparentemente en mayor abundancia. Para estos experimentos se utilizó como control negativo membranas de Golgi y de retículo endoplasmático; como era esperable, estos no exhiben marca de reconocimiento para ninguna de las isoformas de la PMCA. Las

membranas de cerebro utilizadas como control positivo muestran alta expresión de las 4 isoformas, al igual que las membranas de bulbo olfatorio.



Figura 8.- Isoformas de la PMCA en los cilios olfatorios. En los cilios olfatorios (C) se expresan las 4 isoformas de PMCA, estando la PMCA 4 mayormente representada. En epitelio desciliado (DE) se observa la PMCA 1, 3 y 4. en epitelio olfatorio completo se observa expresión de las 4 isoformas. Las membranas de bulbo olfatorio (OB) y cerebro (B, control positivo) muestran marca intensa para las 4 isoformas. Membranas de aparato de Golgi (G) y retículo endoplásmico (R) se usaron como controles negativos en todos los casos.

En conclusión, en los cilios olfatorios se expresan tanto la PMCA como el NCX. Ambos transportadores se distribuyen de manera localizada a lo largo del organelo. La capa ciliar del epitelio olfatorio está enriquecida en PMCA. Todas las isoformas de PMCA están presentes en las membranas ciliares.

II. Estudios funcionales de transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP en las membranas de cilios olfatorios y sus posibles moduladores de interés para el sistema de transducción olfatoria.

Habiéndose demostrado la expresión de la PMCA en los cilios olfatorios, se realizaron, estudios funcionales de esta bomba de Ca^{2+} en vesículas invertidas de membranas ciliares purificadas.

Se investigó los efectos de Ca^{2+} y CaM sobre la actividad de la PMCA. Como se muestra en la Figura 9A, el transporte de Ca^{2+} es dependiente de la concentración de Ca^{2+} del medio que baña la cara intracelular de las vesículas (correspondiente al lado luminal del cilio olfatorio). La tasa de incorporación de Ca^{2+} se potenció aproximadamente 5 veces en un intervalo de concentración de ~ 300 nM a $1 \mu\text{M}$, con una $K_{0.5} = 670$ nM por Ca^{2+} . A partir de dicho valor la tasa de incorporación de Ca^{2+} a las vesículas se mantuvo relativamente constante. Las vesículas ciliares invertidas incorporaron Ca^{2+} con una tasa dependiente de la concentración de Ca^{2+} (Figura 9, n=5 en triplicado).

Como se muestra en la Figura 9, el transporte de Ca^{2+} disminuyó dramáticamente en ausencia de ATP, en presencia del bloqueador de la bomba carboxyeosina (CE $50 \mu\text{M}$) y al agregar el ionóforo de Ca^{2+} A23187 al medio de reacción, indicando que las vesículas acumularon Ca^{2+} a expensas de ATP. El bloqueo con CE indica que el transporte de Ca^{2+} fue realizado por una PMCA (Figura 9B). La caída en el transporte de Ca^{2+} en presencia del bloqueador de la CaM calmidazolio (CMZ $10 \mu\text{M}$) sugiere que la actividad de la PMCA es regulada por CaM (n=2, en triplicado), y que ésta permanecía asociada a las membranas ciliares tras el proceso de fraccionamiento celular para

obtenerlas. La disminución de la señal en presencia del ionóforo de Ca^{2+} A23187 indica que las vesículas estaban selladas. La marca remanente puede deberse a la unión del catión a proteínas asociadas a las membranas ciliares que unen Ca^{2+} (Surroca y Wolff, 2000). El rango de concentraciones de Ca^{2+} en el cual la bomba es regulada por este catión es congruente con el rango de concentraciones en que varía el Ca^{2+} en los cilios durante la respuesta a odorantes, sugiriendo un papel de importancia de esta bomba en la remoción del Ca^{2+} ciliar.

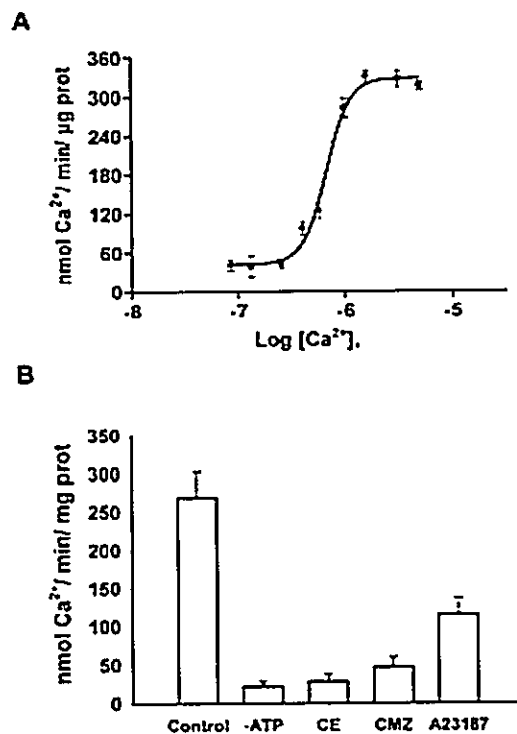


Figura 9.- Transporte de Ca^{2+} dependiente de Ca^{2+} en las membranas ciliares. A, La actividad de la PMCA es potenciada por Ca^{2+} con una $K_{0.5} = 670$ nM. **B,** El transporte de Ca^{2+} es notablemente reducido en ausencia de ATP; en presencia del bloqueador de PMCA, CE; CMZ; y del ionóforo de Ca^{2+} A23187.

Uno de los principales y más reconocidos moduladores de la PMCA es la proteína de unión a calcio CaM. En los experimentos previos se observó que, tras agregar CMZ, el transporte de Ca^{2+} en las vesículas ciliares disminuyó, indicando que hay CaM asociada a

las membranas ciliares que contienen la PMCA. En efecto, fue posible detectar esta proteína mediante *Western blot* de las membranas purificadas de cilios olfatorios (C) (Fig.10A, n=6). Las membranas de cerebro (B), utilizadas como control positivo, presentaron altos niveles de CaM, mientras que el control negativo sin anticuerpo primario no exhibió marca. El transporte de Ca^{2+} se intensificó a concentraciones crecientes de CaM, presentando una $K_{0.5} = 31 \text{ nM}$, lo que indica que la actividad de la PMCA es modulada por Ca^{2+} -CaM.

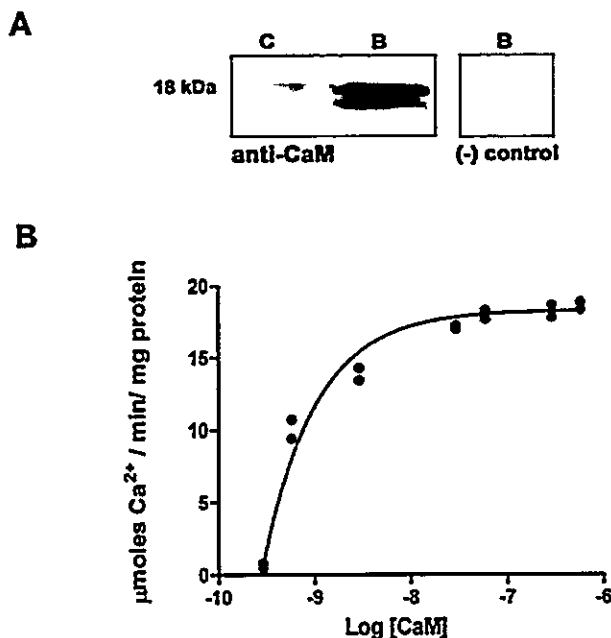


Figura 10.- La PMCA ciliar es modulada por CaM. A, CaM esta presente en las fracciones purificadas de membrana ciliar (C) y en cerebro (B, control positivo). El control sin anticuerpo primario no exhibe marca. B, Transporte de Ca^{2+} vs. [CaM] exhibe una $K_{0.5} = 31 \text{ nM}$ para CaM. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de 2 mM ATP, 1 μM Ca^{2+} , en soluciones sin Na^+ .

Las evidencias presentadas confirman que los cilios olfatorios expresan una bomba de Ca^{2+} , cuya actividad muestra una marcada dependencia del Ca^{2+} interno para su activación y modulación por Ca^{2+} -CaM.

III.- Participación de la PMCA en la remoción del Ca^{2+} que ingresa a los cilios por activación de los canales CNG.

Para establecer la participación de la PMCA en la remoción de Ca^{2+} ciliar se plantearon dos estrategias experimentales: i) medición de la corriente de Cl^- activada por Ca^{2+} (I_{ClCa}); y ii) medición del Ca^{2+} en los cilios mediante sondas fluorescentes, tras activar los canales CNG con un pulso de luz UV.

III.1 Determinación electrofisiológica de la actividad PMCA y del NCX en los cilios olfatorios de *C. caudibervera*

Dado que la I_{ClCa} es directamente activada por el Ca^{2+} intraciliar, puede ser utilizada para monitorear el Ca^{2+} luminal. Con este propósito, se registró, en condiciones de voltaje controlado, la corriente de Cl^- generada por la entrada de Ca^{2+} a través de los canales CNG tras la fotoliberación de cAMP enjaulado, el que se agregó a la célula a través de la pipeta de registro. Esta estrategia permite producir aumentos de Ca^{2+} partiendo de una etapa intermedia de la cascada de transducción, de un modo más simple y reproducible que estimulando con odorantes. Como se mencionó anteriormente, estos experimentos se realizaron con la colaboración de Ricardo Delgado.

Una vez establecida la condición de registro de célula completa, fijando el potencial a -70 mV, se midieron las corrientes dependientes de potencial de la NSO (Figura 11), de modo de asegurar que las células eran saludables. Se esperó entre 3 a 5 minutos para permitir que el cAMP enjaulado accediera al citoplasma de la NSO e invadiera los cilios. Se midió la corriente activada por fotoliberación de cAMP, en condiciones control y bloqueando los mecanismos de remoción de Ca^{2+} en el cilio. El

NCX se inhibió reemplazando el Na^+ de la solución externa por Li^+ , y la PMCA se anuló adicionando CE, omitiendo ATP en la pipeta de registro y alcalinizando el medio extracelular. La Figura 12 muestra registros representativos para cada situación experimental. Obsérvese que la relajación de la I_{ClCa} se enlentece al bloquear cualesquiera de los dos transportadores de Ca^{2+} .

Cabe destacar que la amplitud de la I_{ClCa} es menor cuando se bloquean los transportadores de Ca^{2+} (ver Tabla 1). Esto podría deberse a que el Ca^{2+} acumulado inhibe a los canales CNG (ver Discusión) disminuyendo su afinidad por cAMP, provocando una menor entrada de Ca^{2+} al cilio, reduciéndose como consecuencia esto la corriente de Cl^- .

Para estimar la participación de la PMCA en la extracción del Ca^{2+} desde el lumen ciliar, se calculó la constante de tiempo de la relajación de la corriente de Cl^- (τ) activada por Ca^{2+} luego de la liberación del cAMP. En condiciones control se obtuvo un valor de $\tau = 272 \pm 78$ ms (n=4), el que aumentó al bloquear la PMCA con CE (2181 ± 437 ms, n=5), al omitir ATP en la pipeta de registro (666 ± 49 ms, n=5) y al aumentar el pH extracelular (725 ± 65 ms, n=3). Al reemplazar el Na^+ del medio extracelular por Li^+ para anular al NCX, se obtuvo una $\tau = 442 \pm 80$ ms, (n=3) (Figura 13).

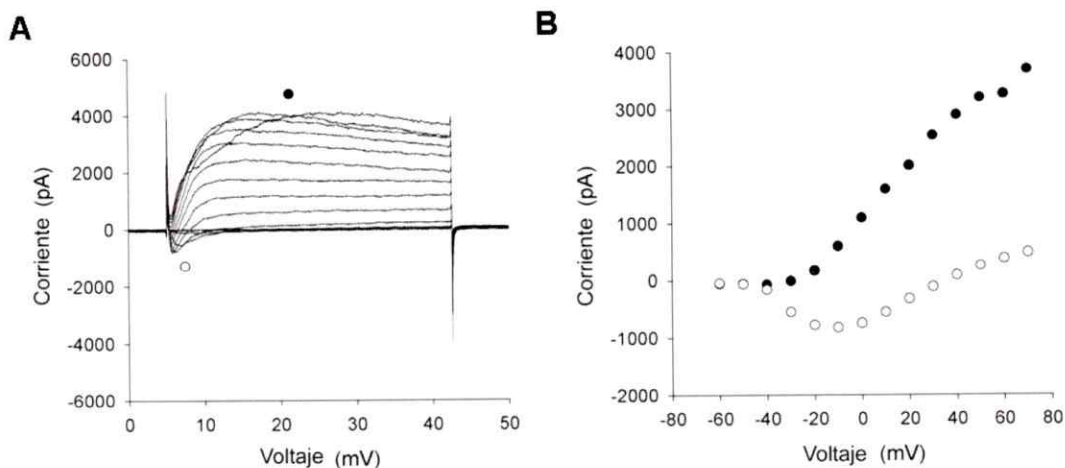


Figura 11.- Corrientes dependientes de voltaje en la NSO. A, Registro representativo de las corrientes activadas por cambios en el potencial de membrana en una NSO. Se aplicaron pulsos despolarizantes de 400 ms cada 10 mV entre -60 mV a 70 mV. B, Curvas I/V del registro mostrado en A. Se graficaron las amplitudes máximas de la corriente de entrada (círculos blancos) y salida (círculos negros) a los distintos potenciales explorados.

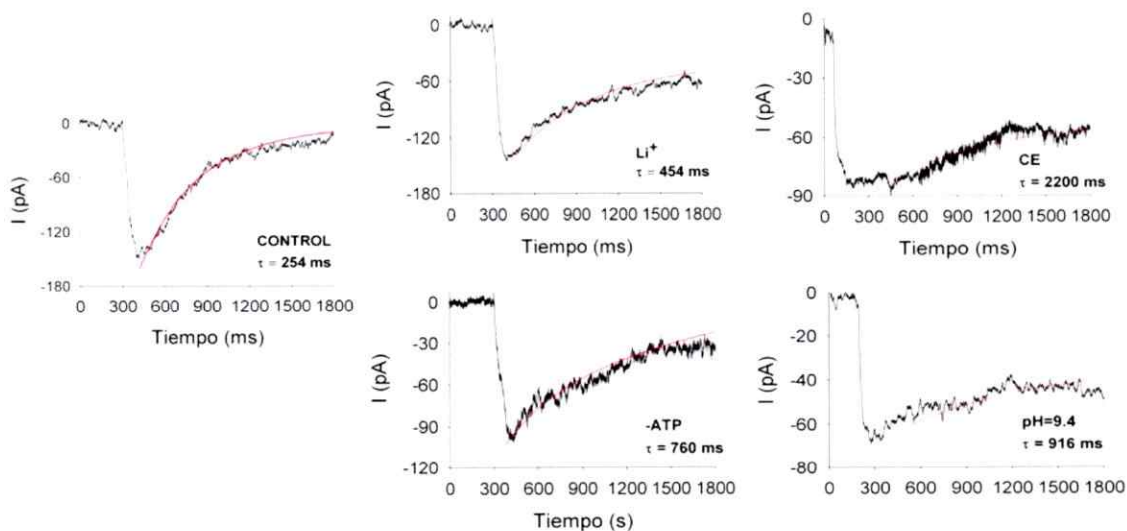


Figura 12.- Corrientes de transducción en NSO activadas por cAMP. Se muestran registros representativos luego de liberar cAMP en NSO de sapo, lo que activa la corriente de transducción. Se muestra un registro para cada caso estudiado: control; bloqueo del NCX por reemplazo del Na^+ externo por Li^+ ; y bloqueo de la PMCA con CE, omitiendo ATP en la pipeta de registro o alcalinizando el medio extracelular, y sus respectivos τ .

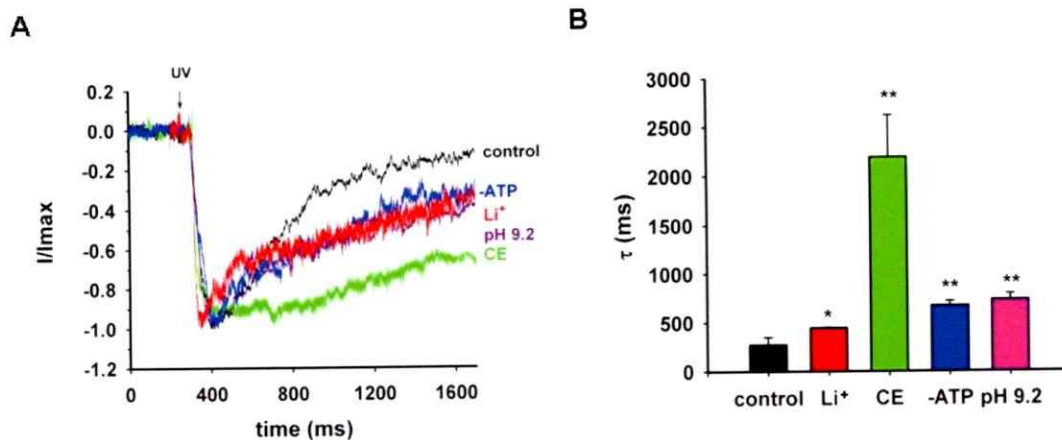


Figura 13.- Participación de la PMCA en la extracción de Ca^{2+} desde los cilios olfatorios. **A**, Trazos representativos de corrientes normalizadas generadas al liberar cAMP en las NSO con un destello de luz UV, en situación control y bloqueando el NCX y la PMCA. **B**, La constante de relajación de la I_{CaCl} es menor en la situación control (272 ± 78 ms, $n=4$), que cuando se anula el NCX (442 ± 80 ms, $n=3$), o la la PMCA con CE (2181 ± 437 ms, $n=5$), omitiendo ATP (666 ± 49 ms, $n=5$), y alcalinizando el medio externo (725 ± 65 ms, $n=3$). T-test $p < 0.05$, $V_h = -70$ mV.

En la Tabla 1 se resumen los valores de las constantes de relajación de la I_{CaCl} y sus amplitudes, luego de producir incrementos en la concentración de Ca^{2+} liberando cAMP en la NSO. Nótese que el curso temporal de la activación de la corriente no sufre modificaciones, sino que sólo se alteró su retorno a los niveles de reposo. Estas evidencias sugieren fuertemente que tanto la PMCA como el NCX participan en la recuperación del Ca^{2+} en los cilios, al nivel de reposo.

Tabla 1.- Resumen de los valores promedio de relajación y amplitud de la I_{CaCl} al activar los canales CNG

Condición	τ ($X \pm \text{S.E.M}$), ms	I_{CaCl} max ($X \pm \text{S.E.M}$), pA	# de experimentos
Control	272 ± 78	160 ± 40	4
Li ⁺	442 ± 80	110 ± 15	3
CE	2181 ± 43	70 ± 10	5
-ATP	666 ± 49	90 ± 25	5
pH 9,4	725 ± 65	80 ± 30	3

III.2 Participación de la PMCA y del NCX en la remoción de Ca^{2+} medido mediante fluorescencia de Ca^{2+} directamente en los cilios olfatorios de la *Rana pipiens*

Las mediciones de la concentración de Ca^{2+} en los cilios han sido difíciles de realizar debido a sus minúsculas dimensiones (~0,1 a 0,2 μm de diámetro y entre 5 a 250 μm largo, dependiendo de la especie), que están en el límite de resolución de la microscopía de luz. El trabajo más notable realizado hasta ahora, proviene de investigaciones en las que se logró demostrar, mediante el uso de sondas fluorescentes, que la concentración Ca^{2+} aumenta primero en los cilios de las NSO, al ser estimulados con odorantes, que en el resto de la neurona. Estos incrementos parecían estar altamente localizados (Leinders-Zufall y cols., 1998).

En esta tesis se midieron los cambios de la fluorescencia de Ca^{2+} al activar los canales CNG mediante la fotoliberación de cAMP enjaulado y se estudiaron los efectos de eliminar funcionalmente cada uno de los transportadores de Ca^{2+} ciliar, sobre la cinética de remoción del ión usando un microscopio de doble fotón. Las células se cargaron con el fluoróforo permeante de Ca^{2+} Fluo 4-AM. Para esta serie de experimentos se escogieron zonas rectas de cilios de NSO adheridas al fondo de un cubreobjetos, sobre las que se posicionó una línea de barrido del microscopio de 2 fotones, desde la cual se colectó la fluorescencia emitida por el fluoróforo al unir el Ca^{2+} que ingresa por los canales CNG.

La Figura 14 ilustra un experimento representativo llevado a cabo en condiciones control. En la Figura 14A se muestra la imagen de una NSO cargada con el fluoróforo de Ca^{2+} , donde una flecha roja indica la zona del cilio escogida para registrar los cambios en

la fluorescencia debidos a cambios en el Ca^{2+} luminal luego de activar los canales CNG. Un registro tridimensional representando los cambios de fluorescencia de Ca^{2+} en función de la distancia y del tiempo se muestra en la Figura 14B. Se observa que la fotoactivación del cAMP produce sucesivos aumentos transitorios de la fluorescencia de Ca^{2+} , pudiendo distinguirse incrementos discretos de fluorescencia a lo largo del cilio. El cambio relativo de la fluorescencia en el tiempo seleccionado desde la zona indicada con una cabeza de flecha negra en B, correspondiente a una sección de $\sim 0,7 \mu\text{m}$ de longitud del cilio, decayó a nivel basal con un $\tau_{0.5}$ de 10 s ($\tau_{0.5} = 12,50 \pm 2,30$ s; $n = 11$) tras alcanzar su valor máximo, (Fig. 14C).

Un experimento similar, llevado a cabo en un cilio de otra NSO bañado en solución Ringer con 0 Ca^{2+} y tamponada con EGTA, no exhibió incrementos en la fluorescencia de Ca^{2+} (Figura 15). Se muestra la NSO y la zona escogida para ese experimento (Fig.15A), donde no se observan incrementos de fluorescencia de Ca^{2+} (Fig. 15B y C, $n = 8$) luego de activar los canales CNG. Esto es coherente con la noción que los aumentos intraciliares de Ca^{2+} se originan por el ingreso del ión desde el medio externo a través de los canales CNG en la membrana ciliar.

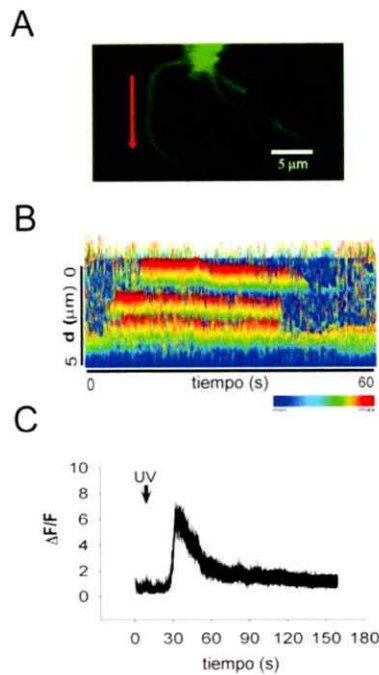


Figura 14.- Aumentos transientes y localizados de Ca^{2+} en los cilios olfatorios. **A**, Botón dendrítico y cilios de una NSO mostrando con una flecha roja la zona escogida para el barrido. **B**, Perfil 3-D representativo de fluorescencia de Ca^{2+} en el cilio tras activar la cascada de transducción. **C**, Cambios en la fluorescencia de Ca^{2+} en el tiempo correspondiente a la zona indicada con una cabeza de flecha negra en B, $\tau_{0.5}=10$ s.

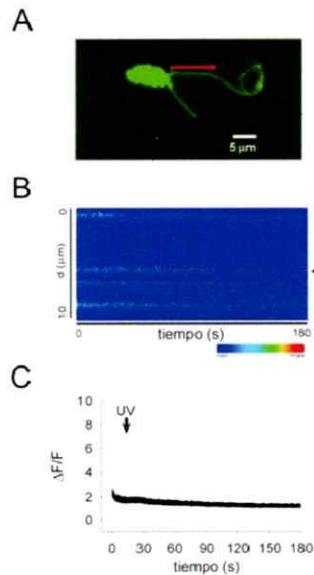


Figura 15.- Los incrementos de Ca^{2+} en los cilios no ocurren cuando el ión está ausente del medio extracelular. **A**, Se muestra una NSO indicando con una flecha roja, la zona escogida para realizar el experimento. **B**, No se observan aumentos de la fluorescencia de Ca^{2+} al activar el cAMP, como se visualiza en el registro representativo que se muestra. **C**, El gráfico de los cambios de fluorescencia vs. tiempo de la zona señalada con una cabeza de flecha en B, indica que no hay incrementos de fluorescencia de Ca^{2+} cuando el ión se omite en el medio que baña las células.

Estos experimentos sugieren que el Ca^{2+} ingresa al cilio de modo transitorio y localizado desde el medio externo.

III.2.1 Efecto del bloqueo de los transportadores de Ca^{2+} ciliar al liberar cAMP.

III.2.1.1 Bloqueo de la PMCA.

A continuación se exploró el efecto de bloquear los transportadores de Ca^{2+} presentes en el cilio sobre la señal de fluorescencia de Ca^{2+} . Para verificar la participación de la PMCA en la remoción de Ca^{2+} en el organelo quimiosensorial. La solución extracelular se suplementó con 50 μM CE. Tras aplicar el destello de luz UV para liberar cAMP, se observó que el incremento transitorio de la señal de Ca^{2+} era más prolongado que en la situación control (Figura 16).

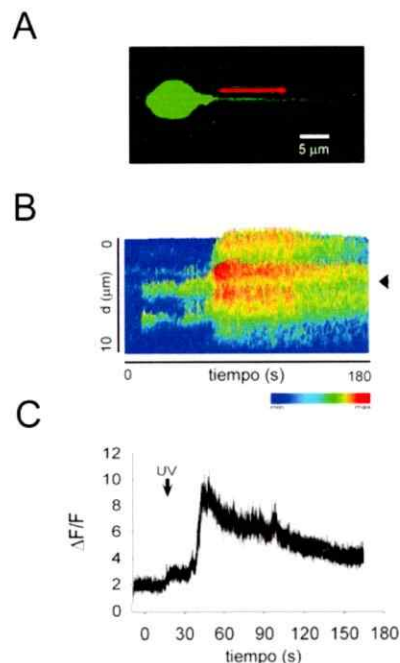


Figura 16.- La PMCA participa en la remoción de Ca^{2+} desde los cilios olfatorios. A, NSO con un solo cilio donde la zona sobre la cual se realizaron las mediciones se indica con una flecha roja. B, Registro representativo de la fluorescencia de Ca^{2+} ciliar en el tiempo y la distancia al bloquear la PMCA con CE. C, Curso temporal de la fluorescencia tomado desde la zona indicada en B con una cabeza de flecha negra, $\tau_{0.5} = 34$ s.

Como se infiere del registro de fluorescencia de la Figura 16B el Ca^{2+} se acumuló en el cilio al anular la bomba. El curso temporal de la fluorescencia inducida por liberación de cAMP, correspondiente a la zona indicada con una cabeza de flecha negra en B, revela que la relajación de la señal de Ca^{2+} se prolongó respecto del control al bloquear la PMCA, presentando una $\tau_{0,5} = 34$ s ($\tau_{0,5} = 30,18 \pm 6,40$ s; n = 8). Los efectos observados son consistentes con una acumulación de Ca^{2+} en el lumen ciliar en ausencia de la PMCA, confirmando la participación de esta bomba en la extracción de Ca^{2+} en los organelos sensoriales del olfato.

III.2.1.2 Bloqueo del NCX.

La participación del NCX en la remoción del Ca^{2+} en los cilios se exploró sustituyendo el Na^+ de la solución externa por Li^+ (Figura 17). Como sucede al bloquear la PMCA, cuando se anula el NCX, la relajación de la fluorescencia de Ca^{2+} se prolongó. El curso temporal de la señal de Ca^{2+} proveniente de una zona escogida del registro de fluorescencia, indicada con una cabeza de flecha negra en B, mostró un $\tau_{0,5} = 31$ s ($\tau_{0,5} = 28,12 \pm 5,20$ s, n = 6) (Fig.17C), siendo comparable al bloqueo con CE, en coherencia con un papel del NCX en la extracción del Ca^{2+} desde los cilios.

Ni el bloqueo de la PMCA ni del NCX modifica la presencia de puntos discretos de ingreso de Ca^{2+} en un cilio. La fase de incremento de Ca^{2+} es similar al caso control, como ocurre también con la fase de activación de las corrientes totales, sugiriendo que ambos transportadores están involucrados en la remoción del Ca^{2+} que ingresa la cilio a

través de los canales CNG y que su ausencia funcional no modifica la cinética de entrada de Ca^{2+} al cilio.

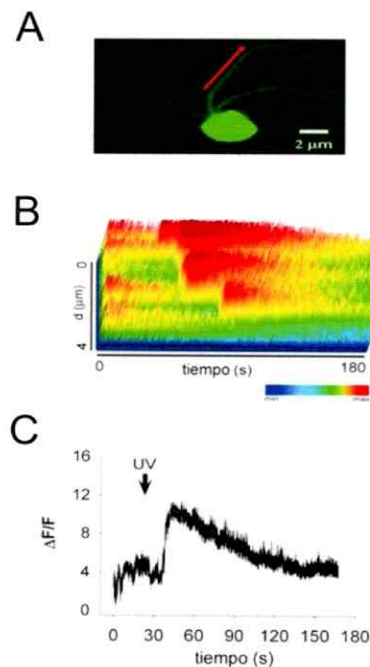


Figura 17.- EL NCX participa en la remoción de Ca^{2+} desde los cilios olfatorios. A, NSO se indica con una flecha roja la zona sobre la cual se realizaron las mediciones. B, Registro representativo de la fluorescencia de Ca^{2+} ciliar en el tiempo y la distancia al anular el NCX con Li^+ . C, Curso temporal de la fluorescencia tomado desde la zona indicada en B con una cabeza de flecha negra, $\tau_{0.5}=31$ s.

III.2.1.3 La señal localizada de la fluorescencia de Ca^{2+} en el cilio por activación de los canales CNG, se modifica al inhibir la hidrólisis de cAMP y al eliminar el colesterol de la membrana plasmática.

Los experimentos precedentes muestran que el Ca^{2+} entra al cilio a través de lugares espacialmente restringidos. La PDE, enzima que hidroliza el cAMP y que se encuentra en el lumen ciliar, debiera tener un papel de importancia en controlar la difusión de su sustrato en la vecindad de la membrana en el cilio. Se exploró el efecto de bloquear la PDE exponiendo las NSO a 1 mM IBMX y se examinó el transcurso de la

fluorescencia de Ca^{2+} (Figura 18). Tras la exposición a IBMX se observó que la señal de fluorescencia se distribuye de modo uniforme en el segmento ciliar escogido, pareciendo provocar una dispersión de los lugares discretos por los cuales entró Ca^{2+} al cilio, lo que sugiere que hubo una acumulación sostenida del catión en el organelo en estas condiciones (Fig. 18B). Este efecto se debe probablemente que hay una mayor acumulación de cAMP en el cilio al estar inhibida la PDE, lo que produce una activación más prolongada de los canales CNG respecto de la situación control, resultando en una entrada de Ca^{2+} por un mayor tiempo al cilio. El perfil de fluorescencia en el tiempo exhibe un decaimiento muy lento luego de alcanzar el máximo.

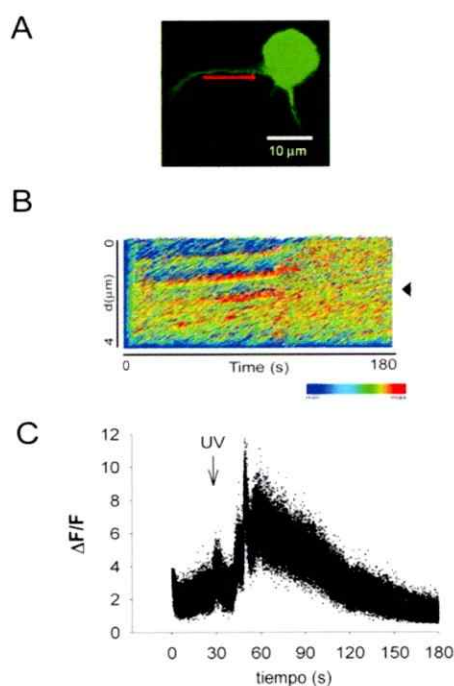


Figura 18.- Dispersión de la señal de Ca^{2+} por bloqueo de la hidrólisis del cAMP. **A**, NSO, se indica con una flecha roja la zona sobre la cual se realizaron las mediciones. **B**, Registro representativo de la fluorescencia de Ca^{2+} ciliar en el tiempo y la distancia al exponer la célula a IBMX. **C**, Curso temporal de la fluorescencia tomado desde la zona indicada en B con una cabeza de flecha negra, $\tau_{0.5} = 31\text{s}$.

La presencia de sitios de entrada localizada de Ca^{2+} en los cilios olfatorios sugiere que las proteínas de la maquinaria de transducción podrían encontrarse agrupadas formando complejos moleculares espacialmente definidos en la membrana del cilio. Debido a que a los ambientes lipídicos ricos en colesterol se les ha asignado un papel como elementos de agrupamiento de proteínas de cascadas de transducción en microdominios de membrana (Sengupta y cols., 2007), se examinó si el tratamiento con un agente atrapador de colesterol tenía un efecto sobre la distribución de la señal fluorescente de Ca^{2+} en el cilio. Las OSN se incubaron con 10 mM del secuestrador de colesterol, metil- β -ciclodextrina (CD) (Figura 19).

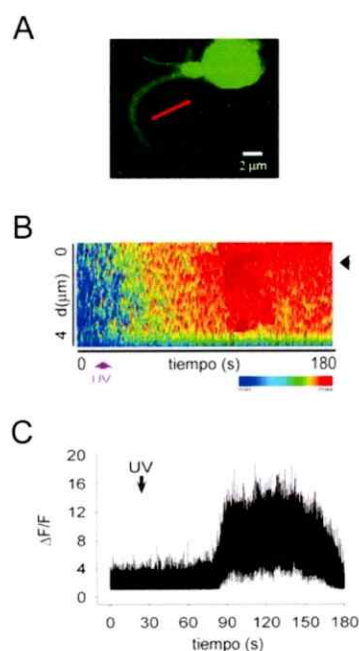


Figura 19.- Los microdominios de Ca^{2+} están formados por ambientes de membrana ricos en colesterol. **A**, NSO, se indica con una flecha roja la zona sobre la cual se realizaron las mediciones. **B**, Registro representativo de la fluorescencia de Ca^{2+} ciliar en el tiempo y la distancia al incubarse la célula con CD. **C**, Curso temporal de la fluorescencia tomado desde la zona indicada en B con una cabeza de flecha negra, $\tau_{0.5} = 41\text{s}$.

La fotoactivación del cAMP indujo incrementos de la fluorescencia caracterizados por presentar un latencia considerablemente larga, comparado con los casos anteriores (Fig. 19B y

La presencia de sitios de entrada localizada de Ca^{2+} en los cilios olfatorios sugiere que las proteínas de la maquinaria de transducción podrían encontrarse agrupadas formando complejos moleculares espacialmente definidos en la membrana del cilio. Debido a que a los ambientes lipídicos ricos en colesterol se les ha asignado un papel como elementos de agrupamiento de proteínas de cascadas de transducción en microdominios de membrana (Sengupta y cols., 2007), se examinó si el tratamiento con un agente atrapador de colesterol tenía un efecto sobre la distribución de la señal fluorescente de Ca^{2+} en el cilio. Las OSN se incubaron con 10 mM del secuestrador de colesterol, metil- β -ciclodextrina (CD) (Figura 19).

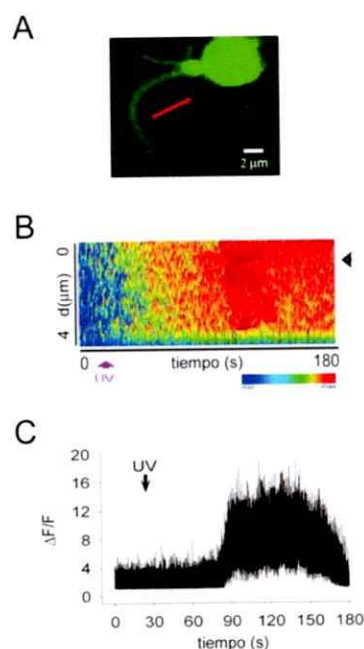


Figura 19.- Los microdominios de Ca^{2+} están formados por ambientes de membrana ricos en colesterol. **A**, NSO, se indica con una flecha roja la zona sobre la cual se realizaron las mediciones. **B**, Registro representativo de la fluorescencia de Ca^{2+} ciliar en el tiempo y la distancia al incubarla célula con CD. **C**, Curso temporal de la fluorescencia tomado desde la zona indicada en B con una cabeza de flecha negra, $\tau_{0.5} = 41\text{s}$.

La fotoactivación del cAMP indujo incrementos de la fluorescencia caracterizados por presentar un latencia considerablemente larga, comparado con los casos anteriores (Fig. 19B y

C), y por la aparente fusión de los destellos de fluorescencia de Ca^{2+} en los cilios, que se manifiesta como una desaparición de sitios discretos de ingreso de Ca^{2+} . De hecho, la señal de fluorescencia debida al Ca^{2+} exhibe un perfil esencialmente uniforme (Fig. 19B). El tiempo de retorno de la fluorescencia a las condiciones basales se prolongó de manera ostensible en estas condiciones. Esta observación es consistente con un papel del colesterol en la distribución de los lugares por donde ingresa el Ca^{2+} al cilio. Según esto, CD podría afectar la arquitectura de la membrana ciliar, enlenteciendo el ingreso del Ca^{2+} al lumen (Fig. 19C). Este retardo en el ingreso de Ca^{2+} sugiere que el ambiente lipídico podría ser importante para el mecanismo de transducción.

La presencia de lugares puntuales donde incrementa el Ca^{2+} en un segmento de cilio olfatorio queda en evidencia en los registros de fluorescencia representativos que se muestran en la Figura 20. Se advierte que los puntos de entrada de Ca^{2+} exhiben anchos similares (Figura 20A). Se muestra que al exponer la célula a IBMX, ocurrió una paulatina acumulación de Ca^{2+} que provoca la dispersión de la señal fluorescente, pasando de la zona marcada como MD (microdominio) a -MD (sin microdominio) (Figura 20B).

Se midió el ancho promedio de los sitios de incremento de fluorescencia de Ca^{2+} en el segmento ciliar escogido para las distintas aproximaciones experimentales, luego de activar los canales CNG. Los tamaños promedio de tales sitios se agrupan en poblaciones de $0,23 \pm 0,05 \mu\text{m}$ (7 NSO, 18 cilios), $0,39 \pm 0,08 \mu\text{m}$ (8 NSO, 20 cilios) y $0,55 \pm 0,03 \mu\text{m}$ (11 NSO, 14 cilios) en condiciones control. Cuando los transportadores de Ca^{2+} han sido previamente bloqueados, el ancho de los sitios fluorescentes de Ca^{2+} es mayor, arrojando valores de $0,68 \pm 0,05 \mu\text{m}$ (6 NSO, 14 cilios) y $0,98 \pm 0,08 \mu\text{m}$ (9 NSO, 14 cilios). Estos resultados sugieren que el Ca^{2+} se está acumulando en las cercanías de los lugares por donde entra al cilio, cuando

están bloqueados el NCX y la PMCA. Esto es coherente con la disminución de la amplitud de la I_{ClCa} cuando se bloquean los transportadores de Ca^{2+} , debido a los efectos de regulación negativa del Ca^{2+} en el cilio (ver Discusión).

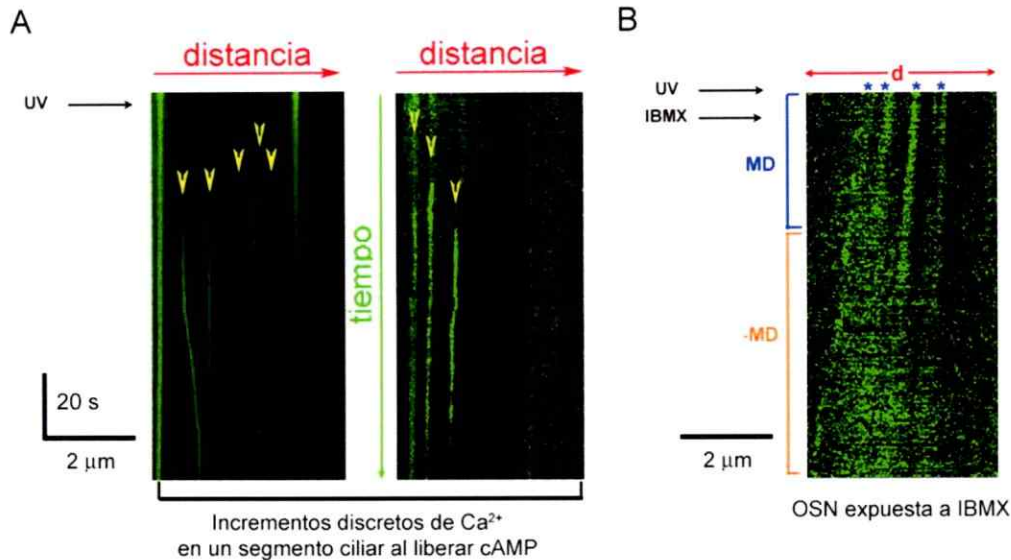


Figura 21.- Puntos discretos de entrada de Ca^{2+} en el cilio olfativo. A, Perfil 2D de la fluorescencia de Ca^{2+} en el tiempo (eje vertical) y la distancia (eje horizontal), de dos experimentos representativos donde se indica con cabezas de flecha amarilla lugares donde incrementó el Ca^{2+} en un segmento de cilio al liberar cAMP con un destello de luz UV. B, Registro representativo de la fluorescencia de Ca^{2+} en un cilio olfatorio al activar la los canales CNG en una NSO expuesta al bloqueador de PDE, IBMX. Los asteriscos indican lugares donde hubo aumento discreto del Ca^{2+} cuya localización se dispersa. MD, microdominios; -MD, sin microdominios.

III.3 Distribución del canal CNG y la PMCA a lo largo de los cilios olfatorios.

Los resultados anteriores sugieren que los canales CNG están altamente localizados en el cilio. Para corroborar esta suposición se realizó una inmunofluorescencia para detectar la PMCA 4 (isoforma de la PMCA aparentemente más abundante en los cilios) y el canal CNG, en NSO aisladas del epitelio olfatorio del sapo chileno (Figura 21). Se observó la expresión de ambas proteínas en los organelos sensoriales olfativos. La PMCA se detectó mediante un anticuerpo secundario acoplado a una sonda que emite fluorescencia en el color verde (Fig.

21A), mientras que el utilizado para el CNG lo hace en el rojo (Fig. 21B). La sobreposición de las marcas (color amarillo, Fig. 21C) indica que ambas proteínas se expresan en las mismas zonas discretas a lo largo los cilios quimiosensoriales (n=9). Se indica con cabezas de flecha blanca algunos lugares donde es posible distinguir una marca punteada de la PMCA y del canal CNG. Algunos lugares donde ambas proteínas coexisten (color amarillo) se indican también con cabezas de flecha blanca.

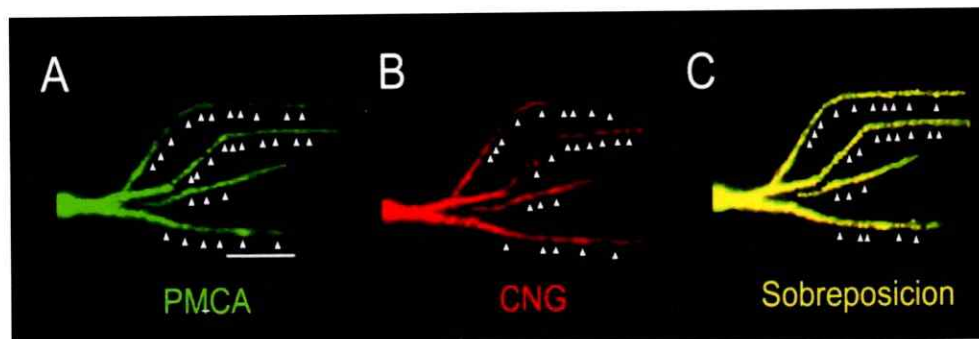


Figura 21.- Distribución de la PMCA y el canal CNG a lo largo del cilio. Se observa una NSO con una parte del botón dendrítico y los cilios. Se trataron las muestras con anticuerpo contra la isoforma 4 de la PMCA (A) y contra el canal CNG (B). La sobreposición de las marcas se muestra en C. Se ilustra con cabezas de flecha blanca algunas zonas representativas donde se observa una distribución punteada de ambas proteínas y su colocalización. Barra: 10 μm .

El confinamiento espacial de estas dos proteínas relevantes en la señalización de Ca^{2+} , en conjunto con las determinaciones de fluorescencia de Ca^{2+} al activar los canales CNG por liberación de cAMP enjaulado, respalda fuertemente la existencia de microdominios de membranas donde se organiza la maquinaria de transducción odorífera.

Los resultados presentados, sugieren fuertemente que la maquinaria de transducción de olores en los cilios reside en microdominios de membrana estructurados por colesterol, y confirman que la extracción de Ca^{2+} desde el cilio, en las condiciones experimentales descritas, depende de la actividad de la PMCA y del NCX.

DISCUSIÓN

El Ca^{2+} está involucrado en la transducción y media la adaptación a estímulos odoríferos, participando así como un mensajero clave en la transducción sensorial del olfato que tiene lugar en los cilios de las NSO. En esta investigación se estudió la expresión de una bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática en los cilios olfatorios y su participación en la remoción del Ca^{2+} desde estos organelos.

Por largos años la remoción del Ca^{2+} desde los cilios luego de una respuesta a odorantes se atribuyó solamente al funcionamiento del NCX (Reisert y Matthews, 1998; Schild y Restrepo, 1998). Si bien este transportador es clave en la remoción del ión en muchos sistemas celulares y especialmente en neuronas, su eficiencia podría verse marcadamente disminuida con la despolarización celular debido a que opera impulsado por el gradiente electroquímico del Na^+ y el cual es de naturaleza electrogénica. La estimulación odorífera despolariza a la NSO, debido a la entrada de Ca^{2+} y Na^+ a través de los canales CNG, seguida de la activación por Ca^{2+} de la I_{Ca} en los cilios. El rango de potenciales de membrana en que una NSO normalmente funciona es entre ~ -60 mV a ~ 5 mV (Firestein y cols., 1990). Si se considera que en condiciones fisiológicas el potencial de inversión de la corriente a través del NCX es ~ -30 mV (Eisner y Lederer, 1985) y que el gradiente electroquímico del Na^+ cae con la despolarización, esta proteína podría estar incapacitada para sacar Ca^{2+} cuando el potencial de receptor supera el potencial de equilibrio de la corriente a través del NCX durante la respuesta odorífera, en el caso que esta proteína opere extrayendo Ca^{2+} en la misma ventana temporal en la que ocurren los cambios en el potencial de receptor. Si a lo anteriormente expuesto se suma el hecho que

los organelos olfatorios no contienen sistemas de membranas internos que le permitan secuestrar el Ca^{2+} ingresado, y a que el vaciamiento del Ca^{2+} desde el cilio por difusión a la dendrita no representa un sumidero relevante del Ca^{2+} ciliar en el transcurso temporal de la respuesta odorífera, los mecanismos de extracción de Ca^{2+} de membrana plasmática adquieren gran relevancia.

Por lo tanto, es razonable pensar que para que la extracción del Ca^{2+} ciliar ocurra eficientemente durante la respuesta odorífera, se requiere de un mecanismo de remoción complementario al NCX. Como se muestra en esta tesis, este mecanismo correspondería a una PMCA.

En esta tesis se ha demostrado que los cilios olfatorios expresan una PMCA cuyas características son compatibles con un papel en la transducción. Esta bomba, en conjunto con el NCX, podría estar participando en la remoción del Ca^{2+} desde el lumen luego de activar los canales CNG a través de los cuales ingresa el Ca^{2+} al cilio producto de la estimulación odorífera.

Varios componentes de la transducción olfatoria tienen una distribución particulada a lo largo de los cilios, sugiriendo el agrupamiento de complejos de transducción altamente localizados en los organelos sensoriales del olfato, en adición al confinamiento de los componentes de transducción en una estructura celular altamente especializada como lo es el cilio quimiosensorial.

I.- Expresión de la PMCA en los cilios de las neuronas sensoriales olfatorias

La PMCA se detectó en una preparación de membranas enriquecida en cilios olfatorios. El alto grado de pureza de dicha preparación se determinó por la ausencia en

ella del canal de Na^+ dependiente de voltaje, que se encuentra en el soma de las NSO (epitelio desciliado). Como los cilios son organelos especializados en la quimiotransducción, es esperable que contengan los constituyentes encargados de dicho proceso y que las proteínas que participan en otra modalidad celular, no se expresen en los cilios. De hecho el canal CNG, la ACIII y G_{OLF} se encuentran en la fracción de membranas ciliares, donde también se encuentran el NCX y la PMCA, sugiriendo un papel de los transportadores de Ca^{2+} en la transducción. La expresión del NCX en las NSO había sido demostrada anteriormente mediante determinaciones electrofisiológicas (Reisert y Matthews, 1998), lo que fue confirmado en esta tesis mediante técnicas de inmunodetección y experimentos funcionales.

Tanto la PMCA como el NCX se expresan en el resto de la NSO. Las evidencias disponibles indican que todas las isoformas de la PMCA y del NCX se encuentran en una NSO (Weeraratne y cols., 2006; Pyrski y cols., 2007), pudiendo tener un papel de importancia en estas células para el control del Ca^{2+} .

Las bombas de Ca^{2+} se expresan prominentemente en la capa ciliar del tejido olfatorio, lo que es consistente con un posible papel de estas bombas en la transducción sensorial. La PMCA, el NCX, y el canal CNG, se distribuyen a lo largo del cilio de manera muy localizada como se desprende de las imágenes de inmunofluorescencia (Figuras 5, 6 y 21). El canal CNG y la PMCA colocalizan en los cilios, así como también sucede con el NCX y la PMCA. Esto sugiere, que las tres proteínas podrían estar formando parte de agrupamientos proteicos en la membrana del cilio.

En las fracciones de membrana ciliar se detectan las 4 isoformas de la PMCA. Las propiedades bioquímicas de las PMCA ciliares sugieren que las isoformas más

representadas en las membranas sensoriales podrían ser la 1 y la 4 (Figura 3, 9 y 10). La expresión de las diferentes isoformas y variantes de las PMCA parece ser un proceso altamente regulado en el desarrollo, y que conduce a la expresión discreta de estas bombas en células y en tejidos (Strehler y Zacharias, 2001). Esto sugiere que las PMCA están diferencialmente adaptadas a las necesidades fisiológicas particulares de un sistema celular determinado, por lo que su expresión tendría como consecuencia una distribución diferencial a través de los tejidos y en cada tipo celular, confiriéndoles una regulación dinámica del Ca^{2+} en el lugar preciso de las membranas plasmáticas donde estas se hallan. Las PMCA 1 y 4 se expresan virtualmente en todos los tejidos en el adulto, mientras que las PMCA 2 y 3 tienen una expresión más restringida al sistema nervioso y muscular. El gran número de PMCA es generado por el *splicing* alternativo de cuatro genes, no alélicos, y que afecta principalmente los sitios regulatorios de la bomba, tales como los de unión a CaM y fosfolípidos, así como sitios de fosforilación por proteínas quinasa y de interacción con dominios PDZ (Strehler y Zacharias, 2001).

Una característica interesante de todas las PMCA es que éstas tienen un sitio conservado de interacción con subunidades β y de proteína G, que no es afectado por el *splicing* alternativo ((Strehler y Zacharias, 2001). Esto sugiere que las PMCA contienen un sitio de regulación por proteína G, la cual podría ser directa o indirecta (Jouneaux y cols., 1993; Jouneaux y cols., 1994), y dado que su mRNA no es sometido a procesamiento es probable que sea un sitio de regulación conservado (Lotersztajn y cols., 1992). En concordancia con la regulación de las PMCA por proteína G, las subunidades de la proteína G_{olf} , así como de otras proteínas G expresadas en los cilios olfatorios (Ronnelt y Moon, 2002), podrían estar regulando la actividad de la PMCA ciliar actuando

como un interruptor entre los periodos de actividad y reposo de la célula. Cuando una proteína G heterotrimérica como G_{olf} es activada, se disocia en dos partes; una compuesta por la subunidad α , y otra formada por las subunidades $\beta\gamma$. La subunidad α activa a la ACIII incrementando los niveles ciliares de cAMP (Ronnett y Moon, 2002). En tanto, es posible que la subunidad $\beta\gamma$, interactúe con la PMCA del cilio tras la estimulación odorífera, regulando la actividad de esta bomba activándola. De ser así, dependería de la activación de la cascada de transducción en el cilio. Si esto fuera cierto, implicaría que la proteína G_{olf} estaría involucrada tanto en la generación de la respuesta odorífera como en su terminación, induciendo la extracción de Ca^{2+} a través de la PMCA. Esta posibilidad no ha sido explorada en la quimiotransducción olfatoria.

II.- Transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP modulado por Ca^{2+} -CaM en vesículas invertidas de cilios olfatorios

En el presente estudio se encontró que la PMCA de los cilios olfatorios presenta una $K_{0,5}$ por Ca^{2+} de 670 nM y es modulada por CaM con una $K_{0,5}$ de 31 nM. La regulación por Ca^{2+} -CaM es común a las isoformas de PMCA y es de especial interés en el sistema de transducción olfatorio, donde Ca^{2+} -CaM ejerce numerosos efectos como regulador de las proteínas involucradas en la transducción y como tampón de Ca^{2+} .

La CaM se encuentra asociada a las membranas ciliares, como lo indica su detección en las fracciones de membrana ciliar y los experimentos de transporte de Ca^{2+} donde el CMZ disminuyó la actividad de la bomba. Esta unión permanente de la CaM a la membrana del cilio podría ser de gran relevancia en la transducción olfatoria, por las

múltiples funciones ejercidas por el Ca^{2+} a través de la CaM. Se ha postulado que la CaM podría encontrarse a concentraciones de 1 mM en el lumen del cilio. (Hsu y Molday, 1993). Otras proteínas de unión a Ca^{2+} cuya función aun no ha sido establecida y que se encuentran en los cilios son p26olf y VILIP (visinin-like protein) (Boekhoff y cols., 1997). Estudios *in vitro* indican que esta última atenúa la formación de cAMP inducida por odorantes de manera Ca^{2+} -dependiente, por lo que se ha sugerido que tiene un papel en la adaptación.

Chen & Yau (1994) observaron que la afinidad aparente del canal CNG por cAMP disminuye en presencia de Ca^{2+} , efecto que es intensificado unas 20 veces por la CaM. La disminución en la afinidad del canal por su agonista parece involucrar una interacción directa entre Ca^{2+} -CaM y el canal. La actividad del canal por ese efecto disminuye varios cientos de veces, por lo que se ha propuesto que es el mecanismo principal de la adaptación el cual es desencadenado por Ca^{2+} . La constante de afinidad, $K_{0,5}$, del canal por cAMP medida por estos autores es de alrededor de 3-4 μM a -60 mV. Al aumentar el Ca^{2+} en los cilios producto de la estimulación odorífera y tras su unión a CaM, se produce un corrimiento de la $K_{0,5}$ a valores mas altos, por lo tanto hay una disminución de la afinidad del canal CNG por cAMP, lo que produce el cierre de canales CNG.

Las PMCA son, en general, reguladas por CaM. Se sabe que las isoformas 1 y 4 de la PMCA presentan una dependencia similar por Ca^{2+} entre ellas, semejante a la que se observa en la PMCA ciliar (Enyedi y cols., 1994). Esas dos isoformas muestran una actividad máxima a $\sim 10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} en presencia de CaM, y una dependencia de la CaM con valores de $K_{0,5}$ de 28 y 35 nM, respectivamente. Las isoformas 3f, 2a y 2b alcanzan

su actividad máxima a $\sim 1 \mu\text{M Ca}^{2+}$, la 4b a $\sim 5 \mu\text{M Ca}^{2+}$ y la isoforma 4a a $\sim 10 \mu\text{M}$ (Filoteo y cols., 2000). La isoforma 2 posee una sensibilidad a la CaM ~ 100 veces mayor que las demás ($K_{0,5} = 0,2 \text{ nM}$). La isoforma 3 ha sido poco estudiada, pero se sabe que 3f es débilmente estimulada por Ca^{2+} (Filoteo y cols., 2000). Esta última, es característica de células musculares, las que requieren extracción de Ca^{2+} rápida, y por lo tanto es una isoforma constitutivamente activa.

Se ha estimado que la PMCA 4b tiene una $K_{0,5}$ por Ca^{2+} de $0,25 \mu\text{M}$ y la 4a de $0,54 \mu\text{M}$, valores que son relevantes ya que están en el rango fisiológico de Ca^{2+} que se halla en células vivas (Enyedi y cols., 1994; Berridge y cols., 2003), incluyendo el lumen de los cilios olfatorios. Estas PMCA tienen diferencias en su afinidad por CaM, lo que se explica por diferencias en estructura y secuencia de su porción C-terminal o de los dominios de unión a CaM. La PMCA 4b es la isoforma que tiene la actividad más baja a niveles basales de CaM. Sin embargo, al aumentar el Ca^{2+} intracelular, dicha isoforma de PMCA es, de entre todas las variantes conocidas, la que es más fuertemente estimulada por CaM (Caride y cols., 2001). Las isoformas *a* de la PMCA presentan niveles significativamente elevados de actividad basal y menor dependencia de CaM, una propiedad que les podría otorgar a las células la capacidad de ser activas a incrementos moderados de Ca^{2+} incluso cuando la CaM es limitante, lo que no sería el caso del cilio olfatorio. Estas propiedades de las PMCA respaldan la posibilidad que la PMCA 4 sea la isoforma que tiene mayor participación en la extracción de Ca^{2+} ciliar. La expresión de esta isoforma, en particular la 4b en las membranas ciliares (Figura 8) y sus propiedades funcionales (Figuras 9 y 10) respaldan esta idea.

El NCX tiene menor afinidad por Ca^{2+} comparado con la PMCA unida a CaM, con una $K_{0.5} = 10 \mu\text{M}$ determinada en ensayos *in vitro* (Blaustein y Lederer, 1999). Sin embargo un estudio reciente indica que el NCX de las NSO es estimulado por CaM en presencia de Ca^{2+} , a través de un mecanismo que parece involucrar a la proteína OMP (de función aun no conocida del todo), incrementando su $K_{0.5}$ por Ca^{2+} a niveles submicromolares del catión (Kwon y cols., 2008).

Una notable característica de las formas *b* de las PMCA es que pueden unirse a proteínas de andamio con dominios PDZ, tales como las de la familia PSD-95 o MAGUKs. Las isoformas 2b y 4b pueden interactuar con alta afinidad con SAP90/PSD95, SAP97/hDlg y PSD93/Chapsina. Esta interacción parece ser selectiva y podría permitir que una PMCA se agrupe junto a otras moléculas de señalización en regiones específicas de la membrana del cilio. Los valores a los que se activa la PMCA ciliar por Ca^{2+} y CaM están en concordancia con los valores obtenidos en otros tipos celulares para la PMCA 4b y la PMCA 1 (Carafoli y Stauffer, 1994). Las demás isoformas de la PMCA detectadas en las fracciones de membrana ciliar podrían estar contribuyendo a la extracción del Ca^{2+} en alguna medida, aunque en menor grado. La inexistencia de bloqueadores específicos no permite distinguir la contribución de cada una de ellas a la remoción de Ca^{2+} en los organelos olfativos. La potenciación de la actividad de la PMCA ciliar por Ca^{2+} -CaM podría contribuir a acelerar y a restringir los incrementos transitorios de Ca^{2+} inducidos por los odorantes.

Un reciente estudio proteómico de las proteínas presentes en los cilios olfatorios obtenidas a partir de una preparación altamente purificada, indica que dichas membranas contienen las proteínas de transducción conocidas, como el canal CNG, AC III y varias

proteína G (Klimmeck y cols., 2008). En dicho trabajo se identificó una proteína transportadora de Ca^{2+} del tipo Ca^{2+} -ATPasa, lo que es coherente con los hallazgos de esta tesis. La mayoría de las proteínas que se conoce están involucradas en la transducción fueron identificadas en dicho estudio, aunque no se reportó la presencia del NCX. Entre estas proteínas se identificó a la estomatina, que se ha observado que interactúa con balsas lipídicas y cuya actividad es dependiente de Ca^{2+} . Esto sugiere que las balsas lipídicas podrían estar participando en el agrupamiento de proteínas en la membrana ciliar.

En concordancia con las observaciones de que CaM se encuentra asociada a las membranas ciliares, se ha demostrado que en los cilios olfatorios la CaM está permanentemente unida al canal CNG (Bradley y cols., 2004), indicando que se halla constitutivamente asociada a proteínas de la membrana de los cilios olfatorios. Esta característica podría ser esencial para maximizar el efecto de retroalimentación negativa del Ca^{2+} sobre el canal CNG, que es el principal mecanismo de la adaptación odorífera (Kurahashi y Menini, 1997). Como se mencionó antes, una regulación de la PMCA por Ca^{2+} -CaM permitiría un control rápido y eficiente de los abruptos cambios en la concentración de Ca^{2+} que ocurren en los cilios durante la respuesta a odorantes. Es posible que el complejo Ca^{2+} -CaM regule de manera opuesta las distintas proteínas dependientes del ion, inhibiendo unas y potenciando otras, dependiendo de la frecuencia y magnitud del estímulo, tal como lo hace activando a la PDE e inhibiendo a la ACIII. Se ha sugerido que los canales Cl_{Ca} ciliares son activados por Ca^{2+} vía CaM, ya que la ausencia de esta proteína reduce la sensibilidad por Ca^{2+} de estos canales. (Kaneko y cols., 2006) Estos experimentos se llevaron a cabo en una línea celular derivada de

neuronas olfatorias (carente de cilios), por lo que las conclusiones derivadas de dicho estudio no son necesariamente extrapolables a al funcionamiento de los canales Cl_{Ca} ciliares.

Algunos estudios indican que Ca^{2+} -CaM tiene un papel regulatorio mediante un mecanismo de retroalimentación sobre etapas clave de la transducción. Se ha propuesto que el Ca^{2+} asociado a CaM reduce los niveles de cAMP ciliar a través de la activación de una fosfodiesterasa y mediante la inhibición de la adenilil ciclasa III a través de la proteína quinasa dependiente de CaM, CaMKII (Wei y cols., 1998). Ambos efectos son mediados por el Ca^{2+} que ingresa a los cilios a través de los canales CNG durante la respuesta odorífera. Se ha postulado que CaM podría ser un mediador clave entre los canales CNG a través de los cuales entra Ca^{2+} al cilio y los canales activados por el Ca^{2+} (Cl_{Ca}). Se sabe que la CaM modula canales iónicos dependientes de Ca^{2+} tales como los BK_{Ca} y los SK_{Ca} (Delgado y cols., 2003; Castillo y cols., 2005). Ambos canales se expresan en los cilios (Delgado y cols., 2003) y son el blanco electrofisiológico del mecanismo que genera la respuesta inhibitoria de las NSO.

De todos modos, es notable el hecho que los cilios expresen una PMCA que sea activada por Ca^{2+} -CaM. La actividad de la PMCA aumenta al incrementar el Ca^{2+} intraciliar (aproximadamente 5 veces), con un máximo de actividad ubicado entre 1 a 10 μ M. Es esperable encontrar dichas concentraciones de Ca^{2+} en los cilios durante el máximo de la respuesta odorífera (Kleene y Gesteland, 1991; Leinders-Zufall y cols., 1997; Leinders-Zufall y cols., 1998; Delgado y Bacigalupo, 2004), lo que realza el papel de las bombas durante la transducción olfatoria.

Respecto al papel que la CaM podría tener como modulador de canales regulados por Ca^{2+} y su localización precisa en los lugares donde se requiere, se ha determinado que la CaM está asociada constitutivamente a los canales de Ca^{2+} activados por voltaje Cav1.2 (Wang y cols., 2007) y a los canales de Na^+ (Nav1.4) activados por voltaje (Biswas y cols., 2008). Esta asociación ocurre en etapas tempranas de la biosíntesis de estos canales, permitiendo que el blanco final (la membrana donde se localicen) pueda ser regulado por Ca^{2+} . En estos casos, la CaM es una subunidad obligatoria en el correcto funcionamiento de estos canales. Si algo similar sucede con el canal CNG permanentemente unido con CaM en los cilios, es una posibilidad que aún no ha sido explorada. Se desconoce cómo se produce la correcta localización del canal CNG en el compartimento sensorial olfatorio. Esto puede ser un punto importante a tratar ya que por ejemplo, en el caso de los canales CNG de los fotorreceptores, alteraciones en su correcta localización en las membranas de los discos de los bastones está asociado con un tipo de ceguera hereditaria (Baylor y cols., 1979; Nakamura y Gold, 1987b; Firestein y Werblin, 1989; Savchenko y cols., 1997). Es razonable pensar que el correcto posicionamiento de los canales CNG en regiones específicas de las células sensoriales, ricas en moléculas de señalización podría permitir respuestas eficientes y espacialmente confinadas frente a un estímulo sensorial.

III.- Utilización de la corriente de Cl^- activada por Ca^{2+} para estimar la remoción del Ca^{2+} ciliar.

Se ha documentado que los cilios de las NSO de anfibio y de rata poseen un NCX que extrae el Ca^{2+} después de un estímulo odorífero. La participación del NCX en la remoción del Ca^{2+} ciliar se infiere de la prolongación en la relajación de la I_{ClCa} cuando se reemplaza el Na^+ de la solución externa por Li^+ (Reisert y Matthews, 1998). El NCX tiene un requerimiento estricto por Na^+ para extraer Ca^{2+} (Blaustein y Russell, 1975; Yau y Nakatani, 1984), por lo que el reemplazo del Li^+ externo (por Na^+) lo anula. El enlentecimiento en la relajación de la corriente se explica por una activación prolongada de los canales ClCa ciliares debido a una mayor disponibilidad de su activador cuando se bloquea el NCX.

Cabe destacar que la conductancia I_{ClCa} reside en los cilios olfatorios y es activada por el Ca^{2+} que entra como consecuencia de la estimulación odorífera. Las NSO carentes de cilios no exhiben las corrientes dependientes de olor, sino sólo las dependientes de potencial (Lowe y Gold, 1991; Madrid y cols., 2005). La despolarización de la NSO con concentraciones altas de K^+ genera una corriente de salida cuando se aplica a la dendrita pero no tiene efecto cuando se aplica a los cilios (Kleene y Gesteland, 1991; Kleene, 1993; Hallani y cols., 1998). Estas evidencias indican fuertemente que la localización de la cascada de transducción se ubica exclusivamente en los cilios de las NSO. Se ha observado que las latencias de las corrientes generadas por un estímulo odorífero no varían con la región del cilio expuesta al odorante entre las partes distal y proximal a la dendrita, indicando que los CNG se distribuyen por toda la membrana ciliar (Lowe y Gold, 1991).

Se ha reportado que los canales de Cl^- permanecen abiertos en presencia de Ca^{2+} (Reisert y Matthews, 1998). Consecuentemente, la terminación de la respuesta requiere el retorno de la concentración de Ca^{2+} a los niveles de reposo, que se ha estimado en ~ 40 nM (Leinders-Zuffall y cols., 1997) lo cual requiere de la extracción de Ca^{2+} a través de la membrana ciliar. Esto se refleja en la cinética de relajación de las corrientes I_{ClCa} tras inducir un aumento en la concentración de Ca^{2+} . El bloqueo de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} prolonga sustancialmente la relajación de la corriente de ClCa (Reisert y Matthews, 1998; Castillo y cols., 2007). Al cerrarse los canales de Cl^- el potencial de membrana retorna a las condiciones de reposo. El bloqueo de la PMCA o del NCX tiene efectos similares, indicando la participación de ambos intercambiadores en la extracción del Ca^{2+} desde los cilios. Leinders-Zuffall et al (1998) determinaron que el tiempo de relajación de la corriente al 50% de la magnitud máxima en la NSO al estimular con odorantes, es 702 ± 163 ms, en el rango temporal esperable. Reisert y Matthews (1998) descubrieron la presencia de un NCX en los cilios. Si bien midieron las corrientes sensoriales, no informaron cuál fue el tiempo de relajación de la I_{ClCa} cuando se bloqueó el NCX. Sin embargo, se observó un notable efecto sobre la forma de relajación de la I_{ClCa} al bloquear el NCX, enlenteciéndose dramáticamente respecto de la condición control.

La reducción de la amplitud de la corriente inducida por liberación de cAMP al bloquear los mecanismos de extracción de Ca^{2+} , que se observó en esta tesis (Tabla 1), puede deberse a que el incremento sostenido en la concentración de este ion induce un estado de adaptación basal cuando las NSO están permanentemente expuestas a los bloqueadores de los transportadores de Ca^{2+} . Esto habría disminuido el número de

canales CNG abiertos, disminuyendo la magnitud de la corriente total. Al respecto cabe destacar que las NSO exhiben actividad eléctrica espontánea, la que se debe en parte a la apertura espontánea de una pequeña fracción de los canales CNG (Kleene, 2000). Esto causa una entrada basal de Ca^{2+} , en pequeñas cantidades, el cual se acumularía localmente junto a la membrana ciliar cuando los mecanismos de extracción de calcio se encuentran bloqueados. Esto podría producir un estado basal de adaptación, reduciendo la magnitud de la I_{ClCa} total cuando se fotoactiva el cAMP en comparación con la corriente observada en ausencia de bloqueadores de los transportadores. Este efecto no afecta el desarrollo de la corriente inducida por liberación de cAMP, portada mayormente por Cl^- , sino solamente su magnitud y tiempo de relajación.

En la línea celular *Odora*, derivada de precursores de NSO de rata, se ha determinado la presencia de canales de Cl^- activados por CaM (Kaneko y cols., 2006), y tienen una $K_{0.5}$ por Ca^{2+} de $1,28 \mu\text{M}$ a -40 mV y $1,14 \mu\text{M}$ a 40 mV . La $K_{0.5}$ por Ca^{2+} es mayor en células mutantes para CaM indicando que la afinidad por Ca^{2+} de los canales ClCa se encuentra disminuida en dichas condiciones. De modo que se ha propuesto que la CaM se asocia con el canal olfatorio y media su activación a concentraciones micromolares de Ca^{2+} . Estos autores sugirieron que la CaM participa tanto en la generación como en la terminación de la respuesta odorífera, pudiendo ser un enlace crucial entre los dos canales de transducción asociados con la corriente despolarizante inducida por odorantes en las NSO y que se activan secuencialmente. Sin embargo, cabe destacar que las determinaciones descritas no se realizaron directamente en los cilios olfatorios. La activación de los canales de Cl^- por CaM parece ser rápida (Kaneko y cols.,

2006), siguiendo la concentración de Ca^{2+} ciliar en el rango μM (Reisert y cols., 2003; Reisert y cols., 2005).

IV.- Microdominios de Ca^{2+} en los cilios olfatorios

Las mediciones de Ca^{2+} en los cilios han indicado que no existe una distribución continua sino discreta de los sitios de entrada de Ca^{2+} a estos organelos (Leinders-Zufall y cols., 1998), sugiriendo la presencia de microdominios. La distribución de la PMCA, el NCX, los canales BK_{Ca} y el canal CNG en los cilios también presenta una distribución similar (Esta tesis (Delgado y cols., 2003; Bhandawat y cols., 2005; Castillo y cols., 2007), sugiriendo que la entrada de Ca^{2+} , los canales activados por este ion (Cl_{Ca} o K_{Ca}) y mecanismos de extracción de Ca^{2+} podrían encontrarse asociados en lugares discretos en la membrana ciliar, respaldando la idea de la presencia de microdominios en los organelos sensoriales del olfato.

Un incremento en la concentración de cAMP en el cilio provoca un aumento prolongado de la concentración de Ca^{2+} en el lumen, como es posible advertir desde las mediciones con sondas fluorescentes realizadas en esta tesis. Como se describe en la sección de Resultados, la exposición de la NSO a elevaciones abruptas de cAMP provoca incrementos altamente localizados de Ca^{2+} . Esto genera la apertura de los canales de Cl^- a través de los cuales el anión sale del cilio. Los canales de K^+ ciliares también se activan por esta vía (Lowe y Gold, 1993b; Madrid y cols., 2005). La latencia, el tiempo de activación y la relajación de la I_{ClCa} dependen de la intensidad del estímulo (fotólisis u odorantes) y de si éste es dirigido a los cilios o al cuerpo celular.

Las mediciones de fluorescencia de Ca^{2+} en los cilios tras desenjaular cAMP mostraron en todos los casos que una latencia de varios segundos precede la respuesta. Esto puede deberse a una baja eficiencia en la liberación del cAMP. Si esto es así, implicaría que luego del destello de luz UV debe esperarse a que se acumule en el cilio en suficiente cantidad para activar los canales CNG, dando origen a los incrementos de Ca^{2+} medidos. La activación de los canales CNG es cooperativa, requiriéndose 3 moléculas de cAMP para activarlos (Frings y cols., 1992), por lo tanto si la liberación del compuesto jaula es poco eficiente, ocurrirá un retardo en la apertura de los canales.

Al analizar la tasa de decaimiento de la señal de Ca^{2+} en los cilios en el microscopio de 2 fotones, se observó que ésta es más rápida cuando los dos transportadores de Ca^{2+} están trabajando, que cuando se elimina la PMCA o el NCX. La constante de decaimiento de la señal de fluorescencia de Ca^{2+} en los cilios es consistente con mediciones previas realizadas por Leinders-Zufall y cols (1998, $t_{0.5} = 7,7 \pm 1,9$ s); esto concuerda con las mediciones obtenidas en esta tesis para la relajación de fluorescencia, que en el caso control sitúan este valor en torno a los 10 s. El incremento en el valor de la relajación de la fluorescencia al bloquear los mecanismos que remueven Ca^{2+} en el cilio es coherente con un papel de estos transportadores en la remoción del ion. Cabe hacer notar que no hay una correlación entre la cinética de relajación de la corriente Cl_{Ca} y de la fluorescencia de Ca^{2+} (Leinders-Zufall y cols., 1998); esta Tesis) indicando que el Ca^{2+} se remueve desde el lumen lentamente si se compara con el cierre de los canales Cl_{Ca} . Por un lado la cinética de la corriente de Cl^- ocurre en un curso temporal de cientos de milisegundos, mientras que los cambios de fluorescencia de Ca^{2+} suceden en el transcurso de segundos. Esto sugiere que la $\text{I}_{\text{Cl}_{\text{Ca}}}$ comienza a desactivarse antes que el

grueso del Ca^{2+} haya sido removido desde el lumen, sugiriendo que los canales de Cl^- constituyen un filtro eléctrico en las NSO y que se cierran cuando llegan a algún límite de estimulación. Cabe destacar que al parecer los canales de Cl^- ciliares no constituyen un blanco del mecanismo de adaptación en las NSO (Lagostena y Menini, 2003). La diferencia entre las cinéticas de relajación de dichas señales sugiere que la extracción del Ca^{2+} es lenta. Es posible que el Ca^{2+} en el cilio sea requerido para otras funciones adicionales a las de la activación de la I_{ClCa} o de la K_{Ca} , por lo que la célula ha desarrollado mecanismos que permiten mantener en el lumen por un tiempo más prolongado que la manifestación eléctrica de esta respuesta. Si se piensa que la apertura de los canales Cl_{Ca} es directamente dependiente del Ca^{2+} , otra explicación posible para las diferencias detectadas, es que entorno al microdominio de membrana que contiene los canales de Cl^- haya una exclusión local del catión, creándose un microambiente de difusión restringida en donde, a pesar que hay Ca^{2+} en el cilio, este es apartado y queda imposibilitado de penetrar al espacio donde se encuentran los canales Cl_{Ca} lo que provoca el cierre de estos. De este modo, aunque el Ca^{2+} sigue presente en el lumen, como lo indica el tiempo de relajación de la fluorescencia, los canales Cl^- se cerrarían por disminución local del ión entorno a ellos.

Cabe destacar que la constante de afinidad por Ca^{2+} de la bomba ciliar es más alta ($K_{0.5} = 670 \text{ nM}$), que las de otras PMCA, aunque es más baja que la del NCX que tiene afinidad del orden micromolar por Ca^{2+} , lo que indica que se requiere que el catión esté en ese rango de concentraciones para activar estos transportadores al máximo. Sin embargo, al parecer el NCX de las NSO es modulado por CaM, lo que le conferiría la

propiedad de activarse a concentraciones de Ca^{2+} menores que el orden micromolar (Kwon y cols., 2008).

Las mediciones de Ca^{2+} mediante fluorescencia realizadas en esta tesis revelan que hay sitios espacialmente confinados en los cilios olfatorios por donde entra Ca^{2+} , sugiriendo la existencia de microdominios de Ca^{2+} en el organelo. A su vez, confirman la participación del NCX y la PMCA en la extracción del Ca^{2+} . El tamaño promedio estimado de los microdominios es variable, y se dividió en varios grupos representativos, encontrándose tamaños promedio de $0,23 \pm 0,05 \mu\text{m}$, $0,39 \pm 0,08 \mu\text{m}$ y $0,55 \pm 0,03 \mu\text{m}$ en condiciones control. Estos microdominios podrían representar agrupaciones de los componentes proteicos involucrados en la transducción odorífera. Los microdominios son de un tamaño aparentemente mayor cuando se bloquean los transportadores de Ca^{2+} ciliar, sugiriendo que hay mayor cantidad de Ca^{2+} alrededor de los puntos de entrada del ion producto de su acumulación luminal local. Los microdominios parecieran dispersarse en presencia de IBMX, quizás debido a la acumulación de Ca^{2+} producto de su entrada a través de los canales CNG, que en estas condiciones mantienen niveles de actividad elevados debido a la presencia constante de cAMP por la inhibición de la PDE.

Los odorantes se unen a los RO en las NSO con afinidad moderada, necesiéndose concentraciones micromolares (entre 1 a $100 \mu\text{M}$) de odorantes para activar a un receptor (Takeuchi y Kurahashi, 2005). El tiempo de interacción de una molécula de odorante con su receptor es $\leq 1 \text{ ms}$, por lo que la probabilidad de activar incluso una sola proteína G en ese período de tiempo es baja, lo que es consistente con estudios que destacan una baja sensibilidad por odorantes en las NSO (Firestein y cols., 1993; Bhandawat y cols., 2005; Takeuchi y Kurahashi, 2005). Se ha reportado que, en su etapa inicial, la cascada de

transducción olfatoria opera con baja ganancia (Schreiber y cols., 2000), lo que podría ser el reflejo de un compromiso evolutivo por la necesidad de detectar una variedad virtualmente ilimitada de distintas moléculas odoríferas. El hecho que los RO tengan baja afinidad por sus odorantes impone serias restricciones a la maquinaria de transducción que opera en el cilio quimiosensorial. Dado que la producción de segundos mensajeros como el cAMP está limitada por la baja eficiencia de la maquinaria de transducción odorífera, se requiere de un mecanismo de amplificación adicional río abajo de la parte metabólica de la cascada, y que ocurre a través de los canales Cl_{Ca} . Para que la amplificación de la señal sea efectiva una organización en microdominios podría facilitar la activación secuencial eficiente de los canales Cl_{Ca} luego que ha entrado Ca^{2+} al cilio a través de los canales CNG.

Se ha sugerido que los canales CNG y el cAMP interactúan en espacios restringidos, limitando la difusión de cAMP (Paysan y Breer, 2001; Brady y cols., 2004). El agrupamiento de canales es un fenómeno observado en muchos tipos celulares y compartimentos neuronales, incluyendo axones, estereocilios de las células ciliadas del oído interno (Rispoli y cols., 2001), miotubos esqueléticos (Anson y Roberts, 2001), microvellosidades de los fotorreceptores de *Drosophila* (Hardie, 2001) y células pancreáticas (Johnson y cols., 2004). Posibles funciones del agrupamiento de canales incluyen la regulación de la frecuencia de oscilación en las células ciliadas del oído y en células neurosecretorias, así como la compartimentalización de los componentes de señalización en las sinapsis. En los cilios olfatorios el agrupamiento de los canales CNG, Cl_{Ca} , RO, G_{olf} , y los transportadores de Ca^{2+} podría ser parte de una estrategia que permite aumentar eficiencia de la transducción de señal mediante el agrupamiento de las

proteínas responsables de la transducción. A su vez, la concentración espacial de los componentes de la transducción podría facilitar la amplificación de la señal odorífera a través de los canales Cl_{Ca} y K_{Ca} . Así, un incremento en la concentración intraciliar de Ca^{2+} como resultado de la activación de los canales CNG, podría resultar en una razón de actividad de los canales Cl/CNG o K^+/CNG óptimo para maximizar la relación señal/ruido.

La activación de los canales CNG es el primer paso de las respuestas eléctricas inducidas por odorantes y es crucial para reconocer la señal ambiental en el SNC. Ratones deficientes en el gen del canal CNG son anósmicos (Brunet y cols., 1996). La regulación de estos canales es multimodal, siendo el modo más rápido la inhibición por retroalimentación negativa mediante Ca^{2+} -CaM (Chen y Yau, 1994; Kurahashi y Menini, 1997), al igual que lo que ocurre con canal CNG de los fotorreceptores (Chen y cols., 1994; Gordon y Zagotta, 1995).

La organización de los constituyentes de la maquinaria de transducción en complejos macromoleculares espacialmente definidos podría permitir y asegurar una alta sensibilidad, cinéticas rápidas de activación y desactivación, y una fina regulación de la retroalimentación negativa mediada por cambios intracelulares en la concentración de Ca^{2+} en los cilios. Adicionalmente, podría asegurar la especificidad del proceso de señalización mediante un posicionamiento molecular adecuado que permitiría respuestas precisamente orquestadas en el tiempo y en el espacio, las que podrían ser precisamente controlados por CaM. Los microdominios que agrupan a los componentes de la transducción podrían también estar ensamblados en complejos multiproteicos mediante

proteínas de andamio (Saavedra y cols., 2008), asociaciones al citoesqueleto celular y zonas de membrana ricas en colesterol y esfingolípidos.

Takeuchi y Kurahashi sugirieron que hay una distribución homogénea de alta densidad de los canales CNG a lo largo del cilio (Takeuchi y Kurahashi, 2008). Estas conclusiones provienen de experimentos en donde se indujeron incrementos localizados de cAMP con la idea de mapear la distribución de los canales CNG en un cilio. Se produjeron aumentos de cAMP fotoliberándolo secuencialmente en segmentos adyacentes de $\sim 1 \mu\text{m}$ a lo largo de un cilio y registrando cada la vez la corriente total de la célula mediante *patch clamp*. Se observó que, independientemente del segmento ciliar donde se liberaba el cAMP había respuestas eléctricas, cuya magnitud no varió de manera significativa con la posición ciliar excitada. De estos resultados los autores concluyeron que los canales CNG se distribuyen homogéneamente a lo largo del cilio, no en lugares discretos de éste. La aparente contradicción de éstas observaciones con los hallazgos de esta tesis es explicable por las dimensiones del área donde se liberó el cAMP enjaulado en el trabajo mencionado, la que es ostensiblemente mayor al tamaño de los supuestos microdominios medidos en esta tesis. De hecho, nuestras determinaciones espaciales indican que hay en promedio más de un microdominio de Ca^{2+} por micrómetro axial de cilio, por lo que si se fotolibera cAMP en una zona de un micrón, las posibilidades de activar la cascada de transducción son altas. Este resultado podría interpretarse como que hay una distribución uniforme de canales CNG en el cilio.

Previamente se sugirió que es necesaria una compartimentalización de los canales CNG y los efectores del Ca^{2+} para asegurar una activación rápida y eficiente de la respuesta odorífera. Se ha determinado que el canal CNG está asociado a balsas lipídicas,

en sistemas de expresión heterólogos y en epitelio olfatorio de rata (Brady y cols., 2004). La remoción del colesterol de la membrana de la NSO reduce dramáticamente la afinidad aparente del canal CNG homomérico por cAMP, alterando la función de estos canales (Trudeau y Zagotta, 2002). En este caso la pérdida de actividad del canal CNG no ocurrió debido a una menor acumulación de cAMP en el cilio, sino a que la afinidad del canal por cAMP disminuyó, aumentando el valor de $K_{0,5}$ desde 39 μM a 123 μM . El cambio en la afinidad aparente del CNG por cAMP puede resultar en un cambio de 9 veces en su actividad, debido a la naturaleza cooperativa de su activación. De acuerdo con esto, la supuesta desagregación de los microdominios de membrana en presencia de ciclodextrina en los experimentos de fluorescencia de Ca^{2+} que se muestran en el presente estudio, modifica la señal de Ca^{2+} en los cilios olfatorios generando una respuesta con una latencia mayor, incrementos de Ca^{2+} uniformes si se compara con la situación control y una remoción considerablemente más lenta desde el lumen. Esto sugiere que para que el cilio responda eficientemente, las moléculas de señalización sensorial deben estar espacialmente confinadas en regiones específicas de la membrana, físicamente definidas, donde la integridad del ambiente lipídico sería importante como modulador de la función y en la mantención de las interacciones entre los constituyentes importantes para la señalización.

Recientemente se mostró que en una preparación altamente purificada de cilios olfatorios, es posible detectar las proteínas de andamio ProSAP/Shanks y CASK (Saavedra y cols., 2008), sugiriendo que estas podrían estar implicadas en la organización de la maquinaria de transducción. Se ha descrito que las proteínas ProSAP/Shanks unen complejos de transducción con el citoesqueleto (Vondriska y cols., 2004), pudiendo tener

una función similar en los cilios. A su vez, la proteína de andamio CASK es la única entre las de la familia MAGUK que contiene, además de los dominios de interacción con otras proteínas (PDZ, SH3 y guanilato quinasa) un dominio adicional, homólogo a la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} -CaM (CaMKII) (Hardie y Raghu, 2001). Por esto es factible especular que podría actuar durante la transducción odorífera al aumentar el Ca^{2+} en los cilios.

Es notable que en sinaptosomas de cerebro la PMCA 4 se localice exclusivamente en balsas lipídicas, mientras que otras isoformas permanecen en fracciones solubles de membrana. El ensamble en balsas podría contribuir a la interacción de la PMCA 4 con proteínas involucradas en la señalización por Ca^{2+} en lugares funcionales discretos de los terminales sinápticos nerviosos (Sepulveda y cols., 2006). Interesantemente la PMCA 4 parece ser una isoforma de Ca^{2+} -ATPasa abundante en los cilios olfatorios, por lo que su capacidad de asociarse con balsas lipídicas y con proteínas de andamio sugiere que la PMCA de los cilios olfatorios podría tener propiedades similares, apoyando la idea que la maquinaria de transducción sensorial olfatoria podría encontrarse en lugares discretos del cilio. En algunos sistemas celulares la desintegración de las balsas lipídicas resulta en el desmantelamiento de las sinapsis excitatorias e inhibitorias, y la pérdida de espinas dendríticas (Hering y cols., 2003).

Se ha propuesto que los incrementos de cAMP modulan la actividad de canales de Ca^{2+} localmente y no de manera global o distante de su lugar de producción, provocando que haya un gran aumento de la concentración de cAMP en lugares confinados, más que en el citoplasma entero. De hecho, muchos resultados experimentales no serían explicables sino mediante el confinamiento de las proteínas y sus sustratos en un

microdominio con difusión restringida hacia el citoplasma (Cooper y cols., 1995; Jurevicius y Fischmeister, 1996; Rich y cols., 2000).

Una visión de las cascadas acopladas a proteína G es que éstas funcionan a través de colisiones al azar entre receptores y sus proteínas G efectoras. Sin embargo, este concepto es inconsistente con la especificidad inherente de las cascadas de señalización basadas en proteína G como la de la transducción odorífera, lo que sugiere que los actores de una vía de señalización de este tipo estarían agrupados en la membrana dando cuenta de una parte de la especificidad. En la transducción olfativa, el posible papel de las proteínas de andamio o de microdominios de membrana no ha sido establecido.

Si se piensa que los organelos sensoriales, como los cilios olfatorios, por sus dimensiones son lugares de confinamiento espacial donde se agrupan las proteínas de señalización, cabe preguntarse ¿cuál es la ventaja fisiológica de una compartimentalización adicional en microdominios en las membranas de estos organelos? En el caso de los cilios, en adición a lo expresado anteriormente sobre la ventaja de los agrupamientos proteicos, es tentador pensar que podría haber una segregación espacial de los componentes responsables de la generación de las respuestas excitatoria e inhibitoria, cuyos blancos electrofisiológicos son diferentes canales. Por un lado la respuesta excitatoria es generada por la activación de los canales Cl_{Ca} , mientras que la inhibitoria requiere la activación de canales K_{Ca} . Cómo la célula discrimina ambos blancos de una respuesta odorífera es aún un misterio. Se podría pensar que el hecho de que los canales K_{Ca} , los CNG y los transportadores de Ca^{2+} se distribuyan discretamente a lo largo de los cilios es un modo de confinar los componentes a lugares específicos de la membrana ciliar aumentando la eficacia de la detección de odorantes en la NSO.

La eficacia de los transportadores de Ca^{2+} en los cilios en el rango de potenciales y de tiempo en que una NSO normalmente funciona, debe ser determinada para definir la participación de cada mecanismo de extracción de Ca^{2+} ciliar durante la respuesta odorífera.

La expresión de las dos proteínas de remoción de Ca^{2+} en los cilios, la PMCA y el NCX, hace sentido si se considera que la célula se despolariza con la estimulación odorífera, por lo que el gradiente electroquímico del Na^+ se reduce, disminuyendo la fuerza impulsora del funcionamiento del NCX. De este modo, durante la respuesta fisiológica, el debilitamiento de la actividad del NCX puede ser compensado por la actividad de las PMCA ciliares, la que es intensificada por Ca^{2+} -CaM, lo que les conferiría una notable potenciación durante la respuesta a olores. Por otro lado, en el caso que la bomba fuera electrogénica, se favorecería la extracción del Ca^{2+} desde el lumen durante la despolarización de la NSO, al contrario del caso del NCX. Por otro lado, la disponibilidad de ATP podría ser un factor limitante en el cilio, ya que su fuente de producción (soma, dendrita o botón dendrítico) está alejada de las zonas distales del cilio lo que podría afectar la actividad de la PMCA en caso de estimulación sostenida, lo que no sería un factor limitante para la actividad de los NCX en el organelo sensorial. De este modo la acción complementaria del PMCA y del NCX aseguraría un correcto control del Ca^{2+} ciliar, sosteniendo la extracción de Ca^{2+} óptimamente durante todo el tiempo que dura una respuesta olfatoria. Los aspectos antes mencionados no han sido explorados en la fisiología de la transducción odorífera.

Podría pensarse que, dado que las isoformas de PMCA realizan esencialmente la misma función, es decir, remover el Ca^{2+} desde las células en contra su gradiente de

concentración, estos son redundantes. Sin embargo, dado el alto grado de correspondencia homóloga entre las isoformas entre especies, parece haber una presión selectiva para mantener las 4 isoformas en su presente estado. Esto sugiere que las diferencias entre isoformas son significantes ya que las 4 son necesarias para el correcto funcionamiento de los organismos. Entre las variantes de *splicing* de las PMCA hay interacciones diferenciales proteína-proteína, con proteínas de andamio (unión diferencial a dominios PDZ), y regulación selectiva por Ca^{2+} -CaM. Las PMCA son parte esencial del control de Ca^{2+} en neuronas y pueden limitar de modo dinámico la difusión y afectar el curso temporal y la magnitud de la señal de Ca^{2+} , regulando la especificidad de su acción.

En resumen, los hallazgos de esta tesis muestran que en la membrana de los cilios de las NSO se expresan bombas de Ca^{2+} cuyas propiedades las posicionan como candidatos para la remoción del Ca^{2+} desde el lumen durante la respuesta fisiológica. Esta función podría ser ejercida de manera complementaria junto con el NCX. Junto con lo anterior, la maquinaria de transducción parece estar confinada en lugares específicos de la membrana ciliar lo que sugiere la existencia de microdominios donde se agrupan.

Estas evidencias en conjunto permitirán tener una visión más completa del control de Ca^{2+} en los cilios olfatorios una vez que se determine la respectiva funcionalidad de la PMCA y del NCX en el rango de potenciales en los que una NSO es activa durante la respuesta a olores. A su vez, se podrá establecer la relevancia que podría tener en la transducción, la asociación de las proteínas ciliares en microdominios de membrana. Finalmente esto llevara a tener una visión más completa que la actual, respecto del proceso de transducción odorífera.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que:

- 1.- Los cilios olfatorios expresan una PMCA, cuya actividad es modulada por Ca^{2+} y por CaM.
- 2.- En las condiciones experimentales de este trabajo, tanto la PMCA como el NCX participan en la remoción de Ca^{2+} desde los cilios olfatorios.
- 3.- Los constituyentes de la maquinaria de transducción están, al parecer, altamente localizados lo largo de la membrana del cilio.
- 4.- Es razonable pensar que en condiciones fisiológicas ambos transportadores podrían, en conjunto, eliminar de los cilios el Ca^{2+} ingresado como resultado del proceso de la transducción olfatoria.

REFERENCIAS

- Anson, B.D.y Roberts, W.M. (2001) Sodium channel distribution on uninnervated and innervated embryonic skeletal myotubes. *J Neurobiol*, **48**, 42-57.
- Bakalyar, H.A.y Reed, R.R. (1990) Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science*, **250**, 1403-1406.
- Bautista, D.M.y Lewis, R.S. (2004) Modulation of plasma membrane calcium-ATPase activity by local calcium microdomains near CRAC channels in human T cells. *J Physiol*, **556**, 805-817.
- Baylor, D.A., Lamb, T.D.y Yau, K.W. (1979) Responses of retinal rods to single photons. *J Physiol*, **288**, 613-634.
- Berger, E.G., Grimm, K., Bachi, T., Bosshart, H., Kleene, R.y Watzele, M. (1993) Double immunofluorescent staining of alpha 2,6 sialyltransferase and beta 1,4 galactosyltransferase in monensin-treated cells: evidence for different Golgi compartments? *J Cell Biochem*, **52**, 275-288.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D.y Roderick, H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 517-529.
- Bhandawat, V., Reisert, J.y Yau, K.W. (2005) Elementary response of olfactory receptor neurons to odorants. *Science*, **308**, 1931-1934.
- Biswas, S., Deschenes, I., Disilvestre, D., Tian, Y., Halperin, V.L.y Tomaselli, G.F. (2008) Calmodulin regulation of Nav1.4 current: role of binding to the carboxyl terminus. *J Gen Physiol*, **131**, 197-209.
- Blaustein, M.P.y Lederer, W.J. (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev*, **79**, 763-854.
- Blaustein, M.P.y Russell, J.M. (1975) Sodium-calcium exchange and calcium-calcium exchange in internally dialyzed squid giant axons. *J Membr Biol*, **22**, 285-312.
- Boekhoff, I., Braunewell, K.H., Andreini, I., Breer, H.y Gundelfinger, E. (1997) The calcium-binding protein VILIP in olfactory neurons: regulation of second messenger signaling. *Eur J Cell Biol*, **72**, 151-158.

- Borisy, F.F., Ronnett, G.V., Cunningham, A.M., Juilfs, D., Beavo, J.y Snyder, S.H. (1992) Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons. *J Neurosci*, **12**, 915-923.
- Bradley, J., Bonigk, W., Yau, K.W.y Frings, S. (2004) Calmodulin permanently associates with rat olfactory CNG channels under native conditions. *Nat Neurosci*, **7**, 705-710.
- Brady, J.D., Rich, T.C., Le, X., Stafford, K., Fowler, C.J., Lynch, L., Karpen, J.W., Brown, R.L.y Martens, J.R. (2004) Functional role of lipid raft microdomains in cyclic nucleotide-gated channel activation. *Mol Pharmacol*, **65**, 503-511.
- Brandt, P.y Vanaman, T.C. (1994) Splicing of the muscle-specific plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoforms PMCA1c is associated with cell fusion in C2 myocytes. *J Neurochem*, **62**, 799-802.
- Brunet, L.J., Gold, G.H.y Ngai, J. (1996) General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron*, **17**, 681-693.
- Buck, L.y Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, **65**, 175-187.
- Carafoli, E.y Brini, M. (2000) Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr Opin Chem Biol*, **4**, 152-161.
- Carafoli, E.y Stauffer, T. (1994) The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J Neurobiol*, **25**, 312-324.
- Caride, A.J., Filoteo, A.G., Penheiter, A.R., Paszty, K., Enyedi, A.y Penniston, J.T. (2001) Delayed activation of the plasma membrane calcium pump by a sudden increase in Ca^{2+} : fast pumps reside in fast cells. *Cell Calcium*, **30**, 49-57.
- Castillo, K., Bacigalupo, J.y Wolff, D. (2005) Ca^{2+} -dependent K^{+} channels from rat olfactory cilia characterized in planar lipid bilayers. *FEBS Lett*, **579**, 1675-1682.
- Castillo, K., Delgado, R.y Bacigalupo, J. (2007) Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in the cilia of olfactory receptor neurons: possible role in Ca^{2+} clearance. *Eur J Neurosci*, **26**, 2524-2531.

- Cervetto, L., Lagnado, L., Perry, R.J., Robinson, D.W. y McNaughton, P.A. (1989) Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients. *Nature*, **337**, 740-743.
- Chen, T.Y., Illing, M., Molday, L.L., Hsu, Y.T., Yau, K.W. y Molday, R.S. (1994) Subunit 2 (or beta) of retinal rod cGMP-gated cation channel is a component of the 240-kDa channel-associated protein and mediates Ca^{2+} -calmodulin modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11757-11761.
- Chen, T.Y. y Yau, K.W. (1994) Direct modulation by Ca^{2+} -calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons. *Nature*, **368**, 545-548.
- Cooper, D.M., Mons, N. y Karpen, J.W. (1995) Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature*, **374**, 421-424.
- Delgado, R. y Bacigalupo, J. (2004) Cilium-attached and excised patch-clamp recordings of odourant-activated Ca-dependent K channels from chemosensory cilia of olfactory receptor neurons. *Eur J Neurosci*, **20**, 2975-2980.
- Delgado, R. y Bacigalupo, J. (2006) Single-Channel Recordings of Olfactory Cilia Transduction Channels. Abstracts of the Seventeenth Annual Meeting of the European Chemoreception Research Organisation. *Chem Senses*, **31**, E92.
- Delgado, R., Saavedra, M.V., Schmachtenberg, O., Sierralta, J. y Bacigalupo, J. (2003) Presence of Ca^{2+} -dependent K^+ channels in chemosensory cilia support a role in odor transduction. *J Neurophysiol*, **90**, 2022-2028.
- Dhallan, R.S., Yau, K.W., Schrader, K.A. y Reed, R.R. (1990) Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature*, **347**, 184-187.
- Dionne, V.E. (1992) Chemosensory responses in isolated olfactory receptor neurons from *Necturus maculosus*. *J Gen Physiol*, **99**, 415-433.
- Eisner, D.A. y Lederer, W.J. (1985) Na-Ca exchange: stoichiometry and electrogenicity. *Am J Physiol*, **248**, C189-202.
- Enyedi, A., Verma, A.K., Heim, R., Adamo, H.P., Filoteo, A.G., Strehler, E.E. y Penniston, J.T. (1994) The Ca^{2+} affinity of the plasma membrane Ca^{2+} pump is controlled by alternative splicing. *J Biol Chem*, **269**, 41-43.

- Falchetto, R., Vorherr, T. y Carafoli, E. (1992) The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Sci*, **1**, 1613-1621.
- Filoteo, A.G., Enyedi, A., Verma, A.K., Elwess, N.L. y Penniston, J.T. (2000) Plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 3f is weakly stimulated by calmodulin. *J Biol Chem*, **275**, 4323-4328.
- Firestein, S., Picco, C. y Menini, A. (1993) The relation between stimulus and response in olfactory receptor cells of the tiger salamander. *J Physiol*, **468**, 1-10.
- Firestein, S., Shepherd, G.M. y Werblin, F.S. (1990) Time course of the membrane current underlying sensory transduction in salamander olfactory receptor neurones. *J Physiol*, **430**, 135-158.
- Firestein, S. y Werblin, F. (1989) Odor-induced membrane currents in vertebrate-olfactory receptor neurons. *Science*, **244**, 79-82.
- Fischer, T.H., Campbell, K.P. y White, G.C., 2nd (1987) An investigation of functional similarities between the sarcoplasmic reticulum and platelet calcium-dependent adenosinetriphosphatases with the inhibitors quercetin and calmidazolium. *Biochemistry*, **26**, 8024-8030.
- Fraser, C.L., Sarnacki, P. y Arieff, A.I. (1985) Calcium transport abnormality in uremic rat brain synaptosomes. *J Clin Invest*, **76**, 1789-1795.
- Frings, S., Lynch, J.W. y Lindemann, B. (1992) Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction. Activation, selectivity, and blockage. *J Gen Physiol*, **100**, 45-67.
- Frings, S., Reuter, D. y Kleene, S.J. (2000) Neuronal Ca^{2+} -activated Cl^- channels--homing in on an elusive channel species. *Prog Neurobiol*, **60**, 247-289.
- Fuller, C.M., Ismailov, II, Keeton, D.A. y Benos, D.J. (1994) Phosphorylation and activation of a bovine tracheal anion channel by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*, **269**, 26642-26650.
- Gatto, C. y Milanick, M.A. (1993) Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues. *Am J Physiol*, **264**, C1577-1586.

- Getchell, T.V. y Shepherd, G.M. (1978) Responses of olfactory receptor cells to step pulses of odour at different concentrations in the salamander. *J Physiol*, **282**, 521-540.
- Gordon, S.E. y Zagotta, W.N. (1995) A histidine residue associated with the gate of the cyclic nucleotide-activated channels in rod photoreceptors. *Neuron*, **14**, 177-183.
- Greeb, J. y Shull, G.E. (1989) Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J Biol Chem*, **264**, 18569-18576.
- Hallani, M., Lynch, J.W. y Barry, P.H. (1998) Characterization of calcium-activated chloride channels in patches excised from the dendritic knob of mammalian olfactory receptor neurons. *J Membr Biol*, **161**, 163-171.
- Hao, L., Rigaud, J.L. y Inesi, G. (1994) $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ countertransport and electrogenicity in proteoliposomes containing erythrocyte plasma membrane Ca-ATPase and exogenous lipids. *J Biol Chem*, **269**, 14268-14275.
- Hardie, R.C. (2001) Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol*, **204**, 3403-3409.
- Hardie, R.C. y Raghu, P. (2001) Visual transduction in *Drosophila*. *Nature*, **413**, 186-193.
- Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*, **48**, 422-427.
- Hering, H., Lin, C.C. y Sheng, M. (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci*, **23**, 3262-3271.
- Hsu, Y.T. y Molday, R.S. (1993) Modulation of the cGMP-gated channel of rod photoreceptor cells by calmodulin. *Nature*, **361**, 76-79.
- Johnson, J.D., Kuang, S., Mislser, S. y Polonsky, K.S. (2004) Ryanodine receptors in human pancreatic beta cells: localization and effects on insulin secretion. *Faseb J*, **18**, 878-880.
- Jones, D.T. y Reed, R.R. (1989) Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science*, **244**, 790-795.
- Jouneaux, C., Audigier, Y., Goldsmith, P., Pecker, F. y Lotersztajn, S. (1993) Gs mediates hormonal inhibition of the calcium pump in liver plasma membranes. *J Biol Chem*, **268**, 2368-2372.

- Jouneaux, C., Mallat, A., Serradeil-Le Gal, C., Goldsmith, P., Hanoune, J. y Lotersztajn, S. (1994) Coupling of endothelin B receptors to the calcium pump and phospholipase C via Gs and Gq in rat liver. *J Biol Chem*, **269**, 1845-1851.
- Jurevicius, J. y Fischmeister, R. (1996) cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca²⁺ channels by beta-adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 295-299.
- Kaneko, H., Mohrlen, F. y Frings, S. (2006) Calmodulin contributes to gating control in olfactory calcium-activated chloride channels. *J Gen Physiol*, **127**, 737-748.
- Kang, J. y Caprio, J. (1995) In vivo responses of single olfactory receptor neurons in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Neurophysiol*, **73**, 172-177.
- Kaupp, U.B. (1991) The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. *Trends Neurosci*, **14**, 150-157.
- Kleene, S.J. (1993) Origin of the chloride current in olfactory transduction. *Neuron*, **11**, 123-132.
- Kleene, S.J. (1997) High-gain, low-noise amplification in olfactory transduction. *Biophys J*, **73**, 1110-1117.
- Kleene, S.J. (2000) Spontaneous gating of olfactory cyclic-nucleotide-gated channels. *J Membr Biol*, **178**, 49-54.
- Kleene, S.J. y Gesteland, R.C. (1991) Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J Neurosci*, **11**, 3624-3629.
- Kleene, S.J., Gesteland, R.C. y Bryant, S.H. (1994) An electrophysiological survey of frog olfactory cilia. *J Exp Biol*, **195**, 307-328.
- Klimmeck, D., Mayer, U., Ungerer, N., Warnken, U., Schnolzer, M., Frings, S. y Mohrlen, F. (2008) Calcium-signaling networks in olfactory receptor neurons. *Neuroscience*, **151**, 901-912.
- Kurahashi, T. y Kaneko, A. (1991) High density cAMP-gated channels at the ciliary membrane in the olfactory receptor cell. *Neuroreport*, **2**, 5-8.
- Kurahashi, T. y Menini, A. (1997) Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell. *Nature*, **385**, 725-729.
- Kurahashi, T. y Yau, K.W. (1993) Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature*, **363**, 71-74.

- Kurahashi, T. y Yau, K. W. (1994) Olfactory transduction. Tale of an unusual chloride current. *Curr Biol*, **4**, 256-258.
- Kwon, H., Koo, J., Margolis, J. y Margolis, F. (2008) Molecular mechanism of NCX regulation via dynamic interactions of CaM, OMP and BEX in olfactory sensory neurons. *Abstracts of the XV International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT). July 26-26 San Francisco, California, USA.*
- Lagostena, L. y Menini, A. (2003) Whole-cell recordings and photolysis of caged compounds in olfactory sensory neurons isolated from the mouse. *Chem Senses*, **28**, 705-716.
- Larsson, H.P., Kleene, S.J. y Lecar, H. (1997) Noise analysis of ion channels in non-space-clamped cables: estimates of channel parameters in olfactory cilia. *Biophys J*, **72**, 1193-1203.
- Leinders-Zufall, T., Greer, C.A., Shepherd, G.M. y Zufall, F. (1998) Imaging odor-induced calcium transients in single olfactory cilia: specificity of activation and role in transduction. *J Neurosci*, **18**, 5630-5639.
- Leinders-Zufall, T., Rand, M.N., Shepherd, G.M., Greer, C.A. y Zufall, F. (1997) Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics. *J Neurosci*, **17**, 4136-4148.
- Leinders-Zufall, T. y Zufall, F. (1995) Block of cyclic nucleotide-gated channels in salamander olfactory receptor neurons by the guanylyl cyclase inhibitor LY83583. *J Neurophysiol*, **74**, 2759-2762.
- Lischka, F.W. y Schild, D. (1993) Standing calcium gradients in olfactory receptor neurons can be abolished by amiloride or ruthenium red. *J Gen Physiol*, **102**, 817-831.
- Lo, Y.H., Bradley, T.M. y Rhoads, D.E. (1994) High-affinity Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase in plasma membrane-rich preparations from olfactory epithelium of Atlantic salmon. *Biochim Biophys Acta*, **1192**, 153-158.
- Lotersztajn, S., Pavoine, C., Deterre, P., Capeau, J., Mallat, A., LeNguyen, D., Dufour, M., Rouot, B., Bataille, D. y Pecker, F. (1992) Role of G protein beta gamma subunits in the regulation of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *J Biol Chem*, **267**, 2375-2379.

- Lowe, G.y Gold, G. (1993a) Contribution of the ciliary cyclic nucleotide-gated conductance to olfactory transduction in the salamander. *J Physiol*, **462**, 175-196.
- Lowe, G.y Gold, G.H. (1991) The spatial distributions of odorant sensitivity and odorant-induced currents in salamander olfactory receptor cells. *J Physiol*, **442**, 147-168.
- Lowe, G.y Gold, G.H. (1993b) Contribution of the ciliary cyclic nucleotide-gated conductance to olfactory transduction in the salamander. *J Physiol*, **462**, 175-196.
- Lowe, G.y Gold, G.H. (1993c) Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature*, **366**, 283-286.
- Lowe, G., Nakamura, T.y Gold, G.H. (1989) Adenylate cyclase mediates olfactory transduction for a wide variety of odorants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5641-5645.
- Ludwig, J., Margalit, T., Eismann, E., Lancet, D.y Kaupp, U.B. (1990) Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett*, **270**, 24-29.
- Madrid, R., Delgado, R.y Bacigalupo, J. (2005) Cyclic AMP cascade mediates the inhibitory odor response of isolated toad olfactory receptor neurons. *J Neurophysiol*, **94**, 1781-1788.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T.y Buck, L.B. (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, **96**, 713-723.
- Martina, M., Kilic, G.y Cherubini, E. (1994) The effect of intracellular Ca²⁺ on GABA-activated currents in cerebellar granule cells in culture. *J Membr Biol*, **142**, 209-216.
- Menco, B. (1992) Ultrastructural studies on membrane, cytoskeletal, mucous, and protective compartments in olfaction. *Microsc Res Tech*, **22**, 215-224.
- Morales, B., Ugarte, G., Labarca, P.y Bacigalupo, J. (1994) Inhibitory K⁺ currents activated by odorants in toad olfactory neurons. *Proc. R Soc Lond B*, **257**, 235-242.
- Nakamura, T.y Gold, G. (1987a) A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory recepto cilia. *Nature*, **325**, 442-444.
- Nakamura, T.y Gold, G.H. (1987b) A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature*, **325**, 442-444.

- Niggli, V., Sigel, E. y Carafoli, E. (1982) The purified Ca^{2+} pump of human erythrocyte membranes catalyzes an electroneutral Ca^{2+} - H^+ exchange in reconstituted liposomal systems. *J Biol Chem*, **257**, 2350-2356.
- Pace, U., Hanski, E., Salomon, Y. y Lancet, D. (1985) Odorant-sensitive adenylyl cyclase may mediate olfactory reception. *Nature*, **316**, 255-258.
- Paysan, J. y Breer, H. (2001) Molecular physiology of odor detection: current views. *Pflugers Arch*, **441**, 579-586.
- Philipson, K.D. y Nicoll, D.A. (2000) Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol*, **62**, 111-133.
- Pifferi, S., Pascarella, G., Boccaccio, A., Mazzatenta, A., Gustincich, S., Menini, A. y 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.
- Pyrski, M., Koo, J.H., Polumuri, S.K., Ruknudin, A.M., Margolis, J.W., Schulze, D.H. y Margolis, F.L. (2007) Sodium/calcium exchanger expression in the mouse and rat olfactory systems. *J Comp Neurol*, **501**, 944-958.
- Reisert, J., Bauer, P.J., Yau, K.W. y Frings, S. (2003) The Ca-activated Cl channel and its control in rat olfactory receptor neurons. *J Gen Physiol*, **122**, 349-363.
- Reisert, J., Lai, J., Yau, K.W. y Bradley, J. (2005) Mechanism of the excitatory Cl- response in mouse olfactory receptor neurons. *Neuron*, **45**, 553-561.
- Reisert, J. y Matthews, H.R. (1998) Na^+ -dependent Ca^{2+} extrusion governs response recovery in frog olfactory receptor cells. *J Gen Physiol*, **112**, 529-535.
- Reisert, J. y Matthews, H.R. (2001) Simultaneous recording of receptor current and intraciliary Ca^{2+} concentration in salamander olfactory receptor cells. *J Physiol*, **535**, 637-645.
- Rich, T.C., Fagan, K.A., Nakata, H., Schaack, J., Cooper, D.M. y Karpen, J.W. (2000) Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. *J Gen Physiol*, **116**, 147-161.
- Rispoli, G., Martini, M., Rossi, M.L. y Mammano, F. (2001) Dynamics of intracellular calcium in hair cells isolated from the semicircular canal of the frog. *Cell Calcium*, **30**, 131-140.

- Ronnett, G.V. y Moon, C. (2002) G proteins and olfactory signal transduction. *Annu Rev Physiol*, **64**, 189-222.
- Rossi, J.P. y Schatzmann, H.J. (1982) Is the red cell calcium pump electrogenic? *J Physiol*, **327**, 1-15.
- Saavedra, M.V., Smalla, K.H., Thomas, U., Sandoval, S., Olavarria, K., Castillo, K., Delgado, M.G., Delgado, R., Gundelfinger, E.D., Bacigalupo, J. y Wyneken, U. (2008) Scaffolding proteins in highly purified rat olfactory cilia membranes. *Neuroreport*, **19**, 1123-1126.
- Salvador, J.M., Inesi, G., Rigaud, J.L. y Mata, A.M. (1998) Ca²⁺ transport by reconstituted synaptosomal ATPase is associated with H⁺ countertransport and net charge displacement. *J Biol Chem*, **273**, 18230-18234.
- Sanhueza, M., Schmachtenberg, O. y Bacigalupo, J. (2000) Excitation, inhibition, and suppression by odors in isolated toad and rat olfactory receptor neurons. *Am J Physiol Cell Physiol*, **279**, C31-39.
- Savchenko, A., Barnes, S. y Kramer, R.H. (1997) Cyclic-nucleotide-gated channels mediate synaptic feedback by nitric oxide. *Nature*, **390**, 694-698.
- Schild, D. y Restrepo, D. (1998) Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol Rev*, **78**, 429-466.
- Schreiber, S., Fleischer, J., Breer, H. y Boekhoff, I. (2000) A possible role for caveolin as a signaling organizer in olfactory sensory membranes. *J Biol Chem*, **275**, 24115-24123.
- Schulze, D.H., Pyrski, M., Ruknudin, A., Margolis, J.W., Polumuri, S.K. y Margolis, F.L. (2002) Sodium-calcium exchangers in olfactory tissue. *Ann N Y Acad Sci*, **976**, 67-72.
- Sengupta, P., Baird, B. y Holowka, D. (2007) Lipid rafts, fluid/fluid phase separation, and their relevance to plasma membrane structure and function. *Semin Cell Dev Biol*, **18**, 583-590.
- Sepulveda, M.R., Berrocal-Carrillo, M., Gasset, M. y Mata, A.M. (2006) The plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4 is localized in lipid rafts of cerebellum synaptic plasma membranes. *J Biol Chem*, **281**, 447-453.

- Sklar, P.B., Anholt, R.R. & Snyder, S.H. (1986) The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants. *J Biol Chem*, **261**, 15538-15543.
- Smallwood, J.I., Waisman, D.M., Lafreniere, D. & Rasmussen, H. (1983) Evidence that the erythrocyte calcium pump catalyzes a $\text{Ca}^{2+}:\text{nH}^+$ exchange. *J Biol Chem*, **258**, 11092-11097.
- Strehler, E.E. & Zacharias, D.A. (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev*, **81**, 21-50.
- Surroca, A. & Wolff, D. (2000) Inositol 1,4,5-trisphosphate but not ryanodine-receptor agonists induces calcium release from rat liver Golgi apparatus membrane vesicles. *J Membr Biol*, **177**, 243-249.
- Takeuchi, H. & Kurahashi, T. (2005) Mechanism of signal amplification in the olfactory sensory cilia. *J Neurosci*, **25**, 11084-11091.
- Takeuchi, H. & Kurahashi, T. (2008) Distribution, amplification, and summation of cyclic nucleotide sensitivities within single olfactory sensory cilia. *J Neurosci*, **28**, 766-775.
- Trudeau, M.C. & Zagotta, W.N. (2002) An intersubunit interaction regulates trafficking of rod cyclic nucleotide-gated channels and is disrupted in an inherited form of blindness. *Neuron*, **34**, 197-207.
- Vondriska, T.M., Pass, J.M. & Ping, P. (2004) Scaffold proteins and assembly of multiprotein signaling complexes. *J Mol Cell Cardiol*, **37**, 391-397.
- Waisman, D.M., Gimble, J.M., Goodman, D.B. & Rasmussen, H. (1981) Studies of the Ca^{2+} transport mechanism of human erythrocyte inside-out plasma membrane vesicles. II. Stimulation of the Ca^{2+} pump by phosphate. *J Biol Chem*, **256**, 415-419.
- Wang, H.G., George, M.S., Kim, J., Wang, C. & Pitt, G.S. (2007) Ca^{2+} /calmodulin regulates trafficking of $\text{Ca}_v1.2$ Ca^{2+} channels in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*, **27**, 9086-9093.
- Washburn, K.B., Turner, T.J. & Talamo, B.R. (2002) Comparison of mechanical agitation and calcium shock methods for preparation of a membrane fraction enriched in olfactory cilia. *Chem Senses*, **27**, 635-642.

- Wayman, G.A., Impey, S. & Storm, D.R. (1995) Ca^{2+} inhibition of type III adenylyl cyclase in vivo. *J Biol Chem*, **270**, 21480-21486.
- Weeraratne, S.D., Valentine, M., Cusick, M., Delay, R. & Van Houten, J.L. (2006) Plasma membrane calcium pumps in mouse olfactory sensory neurons. *Chem Senses*, **31**, 725-730.
- Wei, J., Zhao, A.Z., Chan, G.C., Baker, L.P., Impey, S., Beavo, J.A. & Storm, D.R. (1998) Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in Neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals. *Neuron*, **21**, 495-504.
- Yau, K.W. & Nakatani, K. (1984) Electrogenic Na-Ca exchange in retinal rod outer segment. *Nature*, **311**, 661-663.
- Zimmerman, A.L. & Baylor, D.A. (1986) Cyclic GMP-sensitive conductance of retinal rods consists of aqueous pores. *Nature*, **321**, 70-72.
- Zufall, F. & Firestein, S. (1993) Divalent cations block the cyclic nucleotide-gated channel of olfactory receptor neurons. *J Neurophysiol*, **69**, 1758-1768.