

UCH-PC
DOC-BMCN
§ 112
C. 2

Presencia de proteínas de andamio en cilios olfatorios de rata y su posible papel en el proceso de quimiotransducción

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular,

Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

por

María Verónica Saavedra Molina

Diciembre, 2006

Directores de tesis: Dra. Ursula Wyneken H.
Dr. Juan Bacigalupo V.



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.

MARIA VERONICA SAAVEDRA MOLINA

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 de Tesis rendido el día 28 de Agosto de 2006.

Directora de Tesis
Dra. Ursula Wyneken

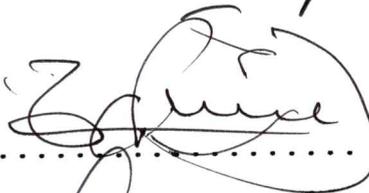
... 

Director de Tesis:
Dr. Juan Bacigalupo

... 

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marco Tulio Nuñez

... 

Dr. Enrique Jaimovich

... ..

Dra. Jimena Sierralta

... 

Dr. Patricio Velez

... 





BIOGRAFIA

María Verónica Saavedra Molina nació en Viña del Mar el 23 de Enero de 1974. Hizo sus estudios secundarios en esa misma ciudad, en el Liceo Guillermo Rivera, graduándose en el año 1990. Al año siguiente ingresó a la carrera de Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, obteniendo su título de Bioquímica en 1997. Posteriormente realizó su doctorado en el Programa de Biología Molecular, Celular y Neurociencias, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, con el apoyo de una beca MECESUP. Su tesis la realizó en los laboratorios de los Drs. Juan Bacigalupo, Universidad de Chile, y Ursula Wyneken, Universidad de los Andes. Siendo estudiante de dicho programa, hizo cuatro estadias en el laboratorio del Profesor Eckart Gundelfinger, en el Leibniz Institut für Neurobiologie, en Magdeburg, Alemania, donde hizo una parte de sus experimentos. Continuará su carrera científica en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, en Madrid, donde hará su entrenamiento posdoctoral supervisada por el Dr. Ginés Morata.



A mi madre, con mucho cariño

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores de tesis, Dr. Juan Bacigalupo y la Dra. Ursula Wyneken por haber apostado por mí desde el principio, además por la supervisión y el apoyo que me han dispensado durante todo el doctorado, que ha sido de inestimable ayuda para poder acabar mi doctorado.

Al Prof. Dr. Eckart Gundelfinger, por permitirme realizar gran parte de los experimentos de la tesis en sus laboratorios del Departamento de Neuroquímica, en el Instituto Leibniz de Neurobiología (Magdeburg, Alemania), y por su permanente guía durante cada una de mis estadías.

Al Dr. Ulrich Thomas y al Dr. Karl-Heinz Smalla por su incalculable ayuda, consejos y ánimos durante mis estadía en Alemania, y a todo el equipo de técnicos.

Al Dr. Mario Luxoro, por su preocupación con las becas MACESUP, que permitió sufragar los gastos del doctorado.

A mis compañeros de laboratorio de la Universidad de Los Andes, por todos los buenos momentos compartidos durante mi estancia en el laboratorio y que además soportaron mis largas conversaciones telefónicas

A mis compañeros del laboratorio de Fisiología Celular de la Universidad de Chile por sus críticas y consejos sobre mi tesis. A Jeannette y Dani por su compañía y buena conversación

A los proyectos MECESUP y MILENIO por el financiamiento entregado durante mis estudios de doctorado

Al proyecto Anillo AC-45 por financiar mi asistencia al 17th Congress of the European Chemoreception Research Organization, ECRO 2006, en Granada, España

Y especialmente a mi madre y hermanos por darme su apoyo incondicional.

A Ricard por ayudarme y apoyarme en todo momento.

A Lorena y Claudio por darme refugio cuando más lo necesitaba.



INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	x
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
I. Morfología del Epitelio Olfatorio	1
II. Quimiotransducción olfatoria	2
II.1 Receptores a odorantes	2
II.2 La respuesta excitatoria a odorantes	3
II.3 Generación de segundos mensajeros durante la transducción y amplificación de la señal	3
II.4 Adaptación a estímulos de odorantes	5
II.5 La respuesta inhibitoria a odorantes	6
II.6 La respuesta excitatoria e inhibitoria en una misma neurona	6
III. Proteínas de Andamio	7
III.1 Dominios o módulos de interacción	8
III.1.1 Dominios PDZ	9
III.1.2 Dominio SH3	11
III.1.3 Dominio GuK (<u>G</u> uanylate <u>k</u> inase)	11
III.1.4 Dominio similar a la secuencia catalítica de CaMKII	12
III.1.5 Dominio SAM	13
III.1.6 Repetido de Ankirina	13
III.1.7 Dominio L27	14
III.2. Familias de proteínas de Andamio	15
III.2.1 Familia MAGuK	15
III.2.1.1 Sub-familia PSD95/SAP90	15
III.2.1.2 Subfamilia ZO-1	16
III.2.1.3 Subfamilia p55	16
III.2.1.4 Subfamilia Lin-2	16



III.2.2 Familia ProSAP/Shank	17
III.3 Función de las proteínas de andamio en distintos sistemas	17
III.3.1 Fototransducción en <i>D. melanogaster</i>	17
III.3.2 Sinapsis química excitatoria en mamíferos	18
III.3.3 Determinación de polaridad epitelial	21
IV Proteínas de andamio en el sistema olfatorio	22
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
MÉTODOS	24
I. Métodos de preparaciones bioquímicas	24
I.1 Preparación de membranas ciliares de epitelio olfatorio de rata	24
I.2 Membranas de Bulbo Olfatorio y Corteza cerebral más hipocampo	25
I.3 Preparación de Sinaptosomas	25
I.4 Preparación de una fracción enriquecida en proteínas de membrana para cargar sobre un gradiente continuo de sacarosa	26
I.5 Análisis del perfil proteico de PM en un gradiente continuo de sacarosa	26
I.6 Determinación de proteínas	27
I.6.1 Método del ácido Bicinconínico	27
I.6.2 Método Bradford Modificado	27
I.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE)	27
I.8 Western blot	28
II. Métodos de inmunohistoquímica (IHQ)	28
II.1 Perfusión de animales	28
II.2 Cortes de tejido en crióstato	29
II.3 Tinción Azán	29
II.4 Inmunohistoquímica (IHQ)	29
III. Métodos de biología molecular	30
III.1 Obtención de cDNA a partir de epitelio olfatorio de rata	30
III.2 PCR (Polimerase Chain reaction)	31
III.3 Electroforesis en geles de agarosa	31

III. 4	Subclonación de productos de PCR	31
III.5	Transformación de bacterias <i>E. coli</i> de la cepa TOP10F'	32
III.6	Secuenciación de los fragmentos subclonados	33
III.7	Mini-preparación de plásmidos	33
III.8	Digestión con la endonucleasa EcoRI	33
IV.	Métodos de proteómica	34
IV.1	Precipitación con acetona	34
IV.2	Primera dimensión: Isoelectroenfoque	34
IV.3	Segunda dimensión: Electroforesis sobre geles denaturantes de poliacrilamida	35
IV.4	Tinción con plata de geles	35
V.	Métodos de análisis de interacción entre proteínas	35
V.1	Inmunoprecipitación utilizando Dynabeads™	35
	SOLUCIONES Y ANTICUERPOS	37
I.	Preparaciones bioquímicas	37
II.	Determinación de proteínas	37
II.1	Método BCA	37
III.	SDS-PAGE y Western blot	37
IV.	Perfusión, tinción de Azán e inmunohistoquímica	38
V.	Biología Molecular	39
V.1	Mini preparaciones de DNA plasmidial	39
VI.	Geles bidimensionales	39
	RESULTADOS	41
I.	Mejoramiento y caracterización de una preparación de membranas ciliares provenientes de epitelio olfatorio	41
II.	Búsqueda de proteínas de andamio en cilios olfatorios de rata	47
II.1	Miembros de la familia ProSAP	51
II.2	Proteína de andamio Lin-7/Veli/MALS	53
II.3	Miembros de la familia MAGuK de proteínas de andamio	55
II.4	Estudios de posibles interacciones de las proteínas de andamio ciliares con componentes de la quimiotransducción	



	olfatoria	59
III.	Estudio de la presencia de una isoforma de SAP102/NE-Dlg en epitelio olfatorio	61
III.1	Análisis mediante RT-PCR de la presencia de variantes de procesamiento de SAP102/NE-Dlg en epitelio olfatorio	64
III.2	Determinación de la secuencia aminoacídica de la(s) isoforma(s) de SAP102/NE-Dlg presente(s) en epitelio olfatorio	68
	DISCUSIÓN	70
I.	Estrategias para la búsqueda de proteínas de andamio	70
I.1	Preparación bioquímica de membranas ciliares y Western blot	70
I.2	Estudios de localización de proteínas de andamio en cilios olfatorios a través de Inmunohistoquímica	72
II.	Proteínas de andamio	73
II.1	Presencia de proteínas de la familia ProSAP	73
II.2	Proteína Lin-7/Veli/MALS	74
II.3	Miembros de la familia MAGuK de proteínas de andamio	75
III.	Estudios de interacción de las proteínas de andamio ciliares con componentes de la quimiotransducción olfatoria	78
IV.	Variantes de procesamiento de SAP102/NE-Dlg en epitelio olfatorio	79
IV.1	Determinación de la secuencia aminoacídica de la(s) isoforma(s) de SAP102/NE-Dlg presente(s) en epitelio olfatorio	79
V.	Posibles funciones de las proteínas de andamio en el epitelio olfatorio y el proceso de quimiotransducción	80
	CONCLUSIÓN	83
	REFERENCIAS	84



LISTA DE TABLAS

Tabla A	Detalle de los partidores utilizados para los experimentos de RT-PCR	31
Tabla B	Anticuerpos utilizados para Western blot, Inmunohistoquímica e inmunoprecipitaciones	40
Tabla 1A	Resumen de la búsqueda de proteínas de andamio mediante Western blot e IHQ	49
Tabla 1B	Resumen de los experimentos de IHQ desarrollados en cortes coronales de epitelio olfatorio	50
Tabla 2	Resumen de los experimentos de co-inmunoprecipitación realizados con una preparación de cilios olfatorios	60

LISTA DE FIGURAS

Figura A	Esquema del vector utilizado para subclonar los fragmentos amplificados por PCR	32
Figura 1	Esquema de una preparación bioquímica de membranas obtenida desde epitelio olfatorio de rata	42
Figura 2	Protocolo de ultracentrifugación al equilibrio de una suspensión de cilios, en un gradiente de sacarosa	42
Figura 3	Análisis de la distribución de proteínas ciliares sobre un gradiente continuo de sacarosa	43
Figura 4	Protocolo optimizado de la preparación de membranas ciliares desde epitelio olfatorio de rata	46
Figura 5	Western blots representativos de una preparación de membranas ciliares obtenida con el protocolo optimizado	46
Figura 6	IHQ de cortes coronales de epitelio olfatorio	48
Figura 7	IHQ de cortes de epitelio olfatorio y Western blot utilizando anticuerpos contra proteínas de la familia ProSAPs de proteínas de andamio	52
Figura 8	Lin-7/Veli/MALS está presente tanto en cilios como en fascículos	

	de axones en epitelio olfatorio	54
Figura 9	La proteína andamio Lin-2/CASK está presente en epitelio olfatorio	56
Figura 10	Proteínas de la subfamilia PSD95/SAP90 también están presentes en epitelio olfatorio	57
Figura 11	Experimentos representativos de inmunoprecipitaciones utilizando diversas proteínas de andamio	60
Figura 12	Western blot representativo de una preparación de epitelio olfatorio de rata, utilizando el protocolo de la Figura 1	62
Figura 13	Análisis mediante Western blot de todas las fracciones de una preparación de epitelio olfatorio	62
Figura 14	Análisis de la migración de la proteína de andamio SAP102/NE-Dlg sobre un gradiente continuo de sacarosa	63
Figura 15	Identificación mediante RT-PCR de al menos dos isoformas de SAP102/NE-Dlg expresadas en epitelio olfatorio de rata	65
Figura 16	Análisis utilizando geles bidimensionales, de las fracciones S1 y S2 de una preparación de epitelio olfatorio	69



ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

AMPA:	ácido α -amino 5-hidroxi-3 metil 4-isoxazol propiónico
AMPc:	3', 5' Adenosina monofosfato cíclico
ACIII:	Adenilil ciclase tipo III
ADP:	Adenilil 5'-difosfato
AKAP79/150:	Proteína de andamio asociada a PKA
ATP:	Adenosina 5'-trifosfato
BCA:	Ácido bicinconínico
BSA:	Seroalbúmina de bovino
C2:	Dominio de unión a calcio
CaM:	Calmodulina
Camguk:	CamKII de <i>D. melanogaster</i>
CaMKII:	Proteína quinasa tipo II activada por Calmodulina
Cdc10:	Proteína del ciclo celular 10 (Ciclina)
Cdk-5:	Quinasa dependiente de Ciclina
cDNA:	Cadena complementaria de DNA
Chapsyn110/SAP93:	Proteína de andamio asociada a sinapsis, de peso molecular 110/93
CNG:	Canal gatillado por nucleótido cíclico
CRIPT:	Proteína rica en cisteína que interacciona con el dominio PDZ3 de PSD95/SAP90
DAB:	3,3-diaminobenzidina
DAG:	1,2-Diacilglicerol
Dlg:	Proteína de andamio asociada a uniones septadas en <i>D. melanogaster</i>
DPS:	Densidad post-sináptica
DTT:	Di-tiotreitol
EcoRI:	Endonucleasa I de <i>E. Coli</i>
ETS:	Familia de factores de transcripción
GABA:	Ácido γ -amino butírico
GAP:	Proteína activadora de la actividad GTPásica de las proteínas G
GAKIN:	Proteína de unión a PSD95/SAP90, similar a las kinesinas
GDP:	Guanosina 5'-difosfato
GEF:	Proteína activadora de la actividad de intercambio de ADP/ATP de las proteínas G
GKAP/SAPAP:	Proteína asociada a dominios Guk en sinapsis
GluR2:	Receptor a glutamato metabotrópico tipo 2
GMP:	Guanosina 5'-monofosfato
Gq:	Proteína G isoforma q
GRIP/ABP:	Proteína que interacciona con el receptor de glutamato tipo AMPA
GRK3:	Proteína quinasa de los receptores acoplados a proteína G
GuK:	Dominio de interacción con otras proteínas similar a la proteína Guanilato quinasa
HEPES:	ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfónico
IHQ:	Inmunohistoquímica
INAD:	Proteína de andamio de la fototransducción en <i>D. melanogaster</i>
IP3:	Inositol 1,4,5-trifosfato

IP: Inhibidores de proteasas
 IPTG: Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido
 Kv: Canal de potasio activado por voltaje
 Kir: Canal de potasio rectificador de entrada
 L27: Dominio de interacción con proteínas encontrado en las proteínas Lin-2 y Lin-7 (Lin-2/Lin-7)
 LB: Medio de cultivo para bacterias (Lysogeny broth)
 LET-23: Receptor tirosina quinasa de *C. elegans*
 LIM: Dominio de interacción con proteínas (Lin-11; Isl1 y Mec-3)
 Lin-2/CASK: Proteína de andamio que contiene un dominio similar a la CaMKII
 Lin-7/Veli/MALS: Proteína de andamio que contiene un dominio L27 y un PDZ
 Lin-10/Mint/x11: Proteína de andamio
 MAP1A: Proteína asociada a microtúbulos 1A
 MUPP-1: Proteína de andamio que contiene múltiples dominios PDZ
 NINAC: Miosina atípica, presente en células fotorreceptoras en *D. melanogaster*
 NMDA: Ácido N-metil D-aspartico
 nNOS: Óxido nítrico sintetasa neuronal
 Notch: Receptor de membrana involucrado en desarrollo
 NR2B: Receptor sensible a NMDA, isoforma 2B
 PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida
 pb: Pares de bases
 PBS-T: Tampón de fosfato salino más Tween20
 PCR: Reacción de la polimerasa
 PDE1C: Fosfodiesterasa 1C
 PDZ: Dominio de interacción con proteínas (PSD95/SAP90, Dlg, ZO-1)
 PFA: ρ -formaldehído
 PKA: Proteína quinasa A
 PKC: Proteína quinasa C
 PH: Dominio de unión a fosfolípidos
 PLC: Fosfolipasa C
 ppl: Secuencia rica en prolina
 PPII: Poliprolina tipo II
 ProSAP: Proteína de andamio enriquecida en prolinas asociada a sinapsis
 ProSAPiP: Proteína que interactúa con ProSAP
 PSD95/SAP90: Proteína de andamio asociada a densidad post-sináptica de peso molecular 95/90
 PTB: Sitio de unión a tirosinas fosforiladas
 PVDF: Membrana de poli-vinil di-fluoruro
 Rab5A: Proteína asociada a endosomas tempranos 5A
 Rap: Pequeña GTPasa trimérica
 Ras: Pequeña GTPasa trimérica
 RGS2: Regulador de la señalización de la proteína G 2
 Rho: Pequeña GTPasa trimérica
 RNA: Ácido ribonucleico
 RO: Receptor olfatorio
 SAM: Dominio de interacción con proteínas (Sterile alpha motif)
 SAP97/Dlg: Proteína de andamio asociada a sinapsis de 97 kDa
 SAP102/NE-Dlg: Proteína de andamio asociada a sinapsis de 102 kDa

SDS:	Dodecil (lauril) sulfato de sodio
SH3:	Dominio de interacción con proteínas que reconoce sitios ricos en prolina (<u>S</u> rc <u>H</u> omology <u>3</u>)
SPAR:	GAP de Rap asociada a espinas dendríticas
SynGAP:	GAP de Ras específica de sinapsis
TRP:	Canal catiónico
ZO-1:	Proteína de andamio asociada a uniones septadas en <i>D. melanogaster</i> (<u>Z</u> one <u>o</u> ccudens <u>1</u>)
Ø:	Aminoácido hidrófobo

RESUMEN

Los receptores de las neuronas olfatorias detectan un amplio rango de moléculas odorantes. La transducción olfatoria se inicia en los cilios olfatorios con la unión de los odorantes a los receptores acoplados a proteína G. El receptor activado interacciona con una proteína G (G_{olf}) específica de epitelio olfatorio, la cuál a su vez activa a la adenilil ciclasa (ACIII). El aumento en AMPc produce la apertura de un canal catiónico no selectivo (canal CNG). Esto provoca un aumento de los niveles de calcio intraciliar activando una conductancia de Cl^- dependiente de Ca^{2+} . Ambas corrientes despolarizan la membrana, aumentando la frecuencia de disparos de potenciales de acción (respuesta excitatoria). La misma neurona puede también generar respuestas inhibitorias a diferentes estímulos odoríferos, en este caso implicando una conductancia de potasio dependiente de calcio (K_{Ca}). Ambos tipos de respuestas comparten la misma cascada de traducción, diferenciándose en el canal efector, el cuál en el primer caso es un canal de Cl^- dependiente de Ca^{2+} (Cl_{Ca}), mientras que en el segundo es el K_{Ca} . Cómo ambos tipos de respuesta co-existen en la misma neurona independiente una de la otra, es razonable pensar que las proteínas de andamio podrían organizar y segregar las proteínas de la traducción en distintos complejos macromoleculares dentro de los cilios, como ocurre en otros sistemas de transducción.

Para probar esta hipótesis, se llevó a cabo una búsqueda de proteínas de andamio en base a dos estrategias complementarias: Análisis mediante Western Blot de fracciones de membranas ciliares purificadas, obtenidas con un fraccionamiento subcelular del epitelio olfatorio, e inmunohistoquímica de este tejido.

Se ha desarrollado un protocolo mejorado para el fraccionamiento subcelular del epitelio olfatorio para el análisis de Western blot. Se ha encontrado la presencia de las siguientes proteínas de andamio en los cilios olfatorios: ProSAP1/Shank2, ProSAP2/Shank3, Lin-2/CASK, SAP97/Dlg y Lin7/Veli/MALS. También se ha podido mostrar que la proteína de andamio SAP102/NE-Dlg está presente en el epitelio olfatorio, aunque asociado a membranas intracelulares. Al tener esta proteína un peso molecular menor al descrito, se realizaron experimentos de RT-PCR que relevaron dos nuevas isoformas de esta proteína. Una de estas isoformas carece del dominio GuK.

Finalmente, se realizaron experimentos de co-immunoprecipitación para probar si alguna de las proteínas de andamio descritas anteriormente estaban asociadas a

proteínas de la cascada de transducción olfatoria. Aunque ProSAP2/Shank3 y Lin-2/CASK fueron inmunoprecipitadas exitosamente, no está claro con que proteínas ciliares interactúan.

Estos resultados muestran que las proteínas de andamio en el epitelio olfatorio están asociadas a fracciones subcelulares específicas, y que son expresadas de forma diferencial entre las zonas del epitelio. El presente trabajo confirma la hipótesis y sugiere que las proteínas de andamio están involucradas en diferentes aspectos de la transducción olfatoria.

ABSTRACT

Olfactory receptor neurons detect a wide range of odorant molecules. Olfactory transduction begins upon the binding of odorants to G-protein-coupled receptors in the chemosensory cilia. The receptor then interacts with a G-protein (G_{olf}) specific of the olfactory epithelium, which in turn activates adenylyl cyclase (ACIII). Increase in cAMP directly gates a cationic cyclic nucleotide-gated channel (CNG channel). This causes a raise in intraciliar calcium levels activating a Ca^{2+} -dependent Cl^- channel. Both currents depolarize the membrane, increasing the firing rate (excitatory response). The same neuron can also generate an inhibitory response to different odor stimuli, in this case involving a Ca^{2+} -dependent K^+ conductance (K_{Ca}). Both responses share the same cAMP transduction pathway, differing on the effector channel, which in the first case is a Ca^{2+} -dependent Cl^- channel (Cl_{Ca}), while in the last one is a K_{Ca} . As both kinds of responses occur in the same neuron independently to each other, it is reasonable to postulate that scaffolding proteins may organize and segregate the transduction proteins in distinct macromolecular complexes within the cilium, as it occurs with some other transduction systems.

To test this hypothesis, a screening of scaffolding proteins was performed using two complementary strategies: Western blot analysis of purified cilia membrane fractions, obtained by subcellular fractionation of the olfactory epithelium, and immunohistochemistry of this tissue.

It was developed an improved subcellular fractionation protocol for the Western blot analysis. It was found the presence of the following scaffolding proteins in the olfactory cilia: ProSAP1/Shank2, ProSAP2/Shank3, Lin-2/CASK, SAP97/Dlg and Lin7/Veli/MALS. It could be shown that the scaffolding protein SAP102/NE-Dlg is present in the olfactory epithelium, although associated to intracellular membranes. Based on its low molecular weight, we conducted RT-PCR experiments which revealed two new isoforms of this protein. One of these isoforms is lacking of GuK domain.

Finally, it was performed co-immunoprecipitation experiments to test whether any of the described scaffolding proteins were associated to olfactory transduction proteins. Although ProSAP2/Shank3 and Lin-2/CASK were successfully immunoprecipitated, it is unclear which cilia proteins they interact with.

The results show that scaffolding proteins in the olfactory epithelium are

associated to specific subcellular fractions, and that they are expressed differentially among the distinct epithelium zones. The present work confirms the hypothesis and suggests that scaffolding proteins are involved in different aspects of the olfactory transduction.

INTRODUCCIÓN

El sistema olfatorio es una modalidad sensorial química que detecta y procesa odorantes e interviene en funciones y comportamientos tan importantes como la adquisición e ingesta de alimentos, la detección de predadores y el apareamiento. El diseño básico y las capacidades funcionales de este sistema están altamente conservados en vertebrados; posee conexiones en el sistema nervioso central tanto en la corteza como en la amígdala y el hipocampo (Kandel y cols., 2000). Este sentido puede estar disminuído (hiposmia) o ausente (anosmia), lo que puede tener bases genéticas, pero frecuentemente es un defecto adquirido. Ocurre también durante el envejecimiento, enfermedades virales y en algunas enfermedades neurodegenerativas, como en las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson.

La transducción de la señal olfatoria en los mamíferos ocurre en un espacio celular compartimentalizado, el cilio olfatorio. La comprensión de la transducción de la señal olfatoria, desde el estímulo químico hasta la generación del potencial de receptor en la neurona sensorial olfatoria, podrían ayudar no sólo a dilucidar aspectos generales de la quimiotransducción, sino también de la organización de cascadas de transducción en microambientes finamente compartimentalizados, o las bases de algunas alteraciones en este sistema.

I. Morfología del Epitelio Olfatorio

El epitelio olfatorio es la interfase entre el medio ambiente y el sistema nervioso central. Este tejido está exquisitamente organizado para detectar una inmensa variedad de moléculas volátiles de bajo peso molecular y de estructuras muy diferentes llamadas odorantes (Lledo y cols., 2005). En los vertebrados, el epitelio olfatorio se encuentra ubicado al fondo de la cavidad nasal, en las turbinas y cubriendo el septum que separa ambas fosas. Éste posee una estructura de epitelio pseudoestratificado compuesto por neuronas olfatorias en distintos estados de desarrollo, células basales, células sustentaculares y conductos de las glándulas de Bowman (Nomura y cols., 2004). Las neuronas son células bipolares con dos procesos, uno correspondiente a la dendrita que se dirige hacia la zona apical del epitelio y otro al lado opuesto, el axón, que viaja al bulbo olfatorio. La dendrita termina en la parte apical del epitelio en un

engrosamiento llamado botón dendrítico, del cual nacen varios cilios que se orientan radialmente de forma paralela a la superficie del tejido, formando así una red (Nomura y cols., 2004). Los cilios están inmersos en moco, secreción generada mayoritariamente por las glándulas de Bowman. En los cilios de las neuronas olfatorias es donde se produce la detección de los odorantes (quimiotransducción).

II. Quimiotransducción olfatoria

II.1 Receptores a odorantes

En las membranas ciliares se ubican los receptores a odorantes (RO), que son proteínas de siete segmentos transmembrana acoplados a proteína G (G_{olf}) (Buck y Axel, 1991). En ratón, se han identificado 1000 a 1300 genes que codifican receptores funcionales, éstos están organizados en grupos en el genoma. Se ha observado que la expresión de un determinado gen es monoalélica y está restringida a neuronas que pertenecen a una de cuatro zonas en las que se divide el epitelio (descritas en Mori y cols., 2000); dentro de cada zona las neuronas tienen una distribución aleatoria.

En mamíferos, se acepta que una neurona olfatoria expresa un solo tipo de RO, como lo indican experimentos de hibridación *in situ* (Tsuboi y cols., 1999). Pero aún no es posible descartar totalmente la posibilidad de que se exprese más de un tipo de RO por neurona olfatoria, ya que un estudio de conteo de neuronas expresando el receptor OR14 muestra que éste está presente en un número mayor de neuronas que el esperado; además, Rawson y cols. (2000) han mostrado la co-expresión de dos distintos RNA mensajeros de RO en algunas neuronas de rata. Por otra parte, la llamada hipótesis oligogénica propone que la presencia de más de un RO funcionaría como un sistema de selección neuronal durante el desarrollo, más que en el proceso de quimiotransducción mismo (Mombaerts, 2004), existiendo procesos de selección positiva y negativa, al igual que en el sistema inmune. Así, en un primer paso durante el desarrollo del epitelio, sobrevivirían sólo aquellas neuronas que expresan uno o más RO (selección positiva). Posteriormente, las neuronas pasarían por un proceso de selección negativa, en la que las células que expresen más de un RO serían eliminadas. Este tipo de selección permitiría tener un fino control sobre las neuronas que pueblan el epitelio y seleccionaría de manera eficiente las células funcionales.

Estudios en *Drosophila* han mostrado la co-expresión de dos RO diferentes (DOR83b y DOR 43a) en una misma neurona; uno de ellos, DOR83b, parece no tener actividad fisiológica y funcionaría como un cofactor del receptor funcional, DOR83a, aumentando la sensibilidad a los odorantes que se usaron en la estimulación (Neuhaus y cols., 2005). Una hipótesis similar fue presentada por Goldman y cols. (2005), según la cual dos tipos de receptores funcionales podrían ser co-expresados en una neurona en *Drosophila*.

II.2 La respuesta excitatoria a odorantes

La quimiotransducción se inicia por la unión de odorantes a los RO, generándose la activación de la subunidad alfa de una proteína G trimérica, G_{olf} , y el posterior aumento de la actividad de adenilil ciclasa tipo III (ACIII, Pace y cols., 1985; Sklar y cols., 1986). La activación de esta enzima produce un alza del AMPc intraciliar, suficiente para causar la apertura de un canal catiónico no selectivo (CNG, cyclic nucleotide gated), que permite la entrada de calcio y sodio, produciendo una despolarización de la membrana ciliar. Este canal es tetramérico y está compuesto por tres tipos de subunidades, dos CNGA2 que forman el poro del canal, una CNGA4 y una CNGB1b que son regulatorias.

Finalmente, el calcio que entra en el cilio provoca la activación de un canal de cloruro (Lowe y Gold, 1993) que posee al menos dos estados de conductancia, de 11 y 22 pS, recientemente descritas (Delgado y Bacigalupo, 2005), las que provocan un efecto amplificador de la despolarización de la membrana anteriormente producida por el canal CNG. La consecuencia celular final de la despolarización es un aumento en la descarga de potenciales de acción de la neurona, mediada por canales de sodio dependientes de voltaje presentes en la membrana del soma y axón de la neurona (Gold, 1999; Nakamura, 2000; Frings, 2001).

II.3 Generación de segundos mensajeros durante la transducción y amplificación de la señal

Estudios recientes (Bhandawat y cols., 2005) han mostrado que el tiempo que dura la unión de una molécula de odorante a un RO es extremadamente breve, lo que produce una respuesta elemental de muy baja amplitud; en otras palabras, el evento

de unión Odorante-RO tiene una baja probabilidad de activar a una proteína G_{olf} . En el caso de la fototransducción en vertebrados ocurre el fenómeno opuesto: una Rodopsina activada por un fotón permanece en este estado por decenas de milisegundos produciendo la activación de cientos de proteínas G (Arshavsky y cols., 2002). La activación del RO o de la proteína G no contribuyen a la amplificación de la señal, sino que ésta ocurriría más bien río abajo de la ACIII. Además, estudios utilizando AMPc enjaulado dializado en la neurona bajo registro de célula completa, han mostrado que no hay diferencias sustanciales en la pendiente ni en la magnitud de la corriente total estimulando con odorantes o con un haz de luz UV que libera el AMPc de su jaula, esto confirma que las etapas anteriores a la generación del AMPc no contribuyen a la amplificación (Takeuchi y Kurahashi, 2002).

También se ha sugerido que la magnitud del aumento de AMPc, aún en condiciones saturantes, es pequeña, debido principalmente a la baja disponibilidad de ATP (los cilios no poseen mitocondrias); sin embargo, dado el reducido volumen del cilio, pequeños cambios de segundos mensajeros pueden significar grandes cambios locales de su concentración. Estas evidencias apoyan la hipótesis de aumentos localizados de AMPc en el cilio (Takeuchi y Kurahashi, 2005).

Los aumentos de calcio serían localizados y transitorios, debido a la retroalimentación negativa provocada por calcio-Calmodulina (Ca^{2+} -CaM) sobre el CNG (Reidl y cols., 2006), y a la vez por la acción de un intercambiador Na^+/Ca^{2+} (Schulze y cols., 2002) y una Ca^{2+} -ATPasa (Castillo y Bacigalupo, 2006), que lo extraen desde el interior del cilio.

La cascada de transducción está regulada a distintos niveles llevando a la terminación de la respuesta. Los RO son fosforilados e inactivados por GRK3 (quinasa de los receptores acoplados a proteína G, Peppel y cols., 1997). Además, RGS2 (proteína inactivadora de la proteína G) y CaMKII (proteína quinasa activada por CaM) que inactivan a la ACIII (Pifferi y cols., 2006; Adelman y Herson, 2004) y PDE1C (fosfodiesterasa 1C) que degrada el AMPc producido (Wei y cols., 1998; Sinnarajah y cols., 2001; Yan y cols., 1995). Los niveles de calcio intraciliares son a su vez controlados, como se dijo anteriormente, por el intercambiador de Na^+/Ca^{2+} y una Ca^{2+} -ATPasa.

La organización del sistema de transducción debería permitir la co-localización de los elementos moleculares involucrados, de tal forma que la baja probabilidad de la

activación de una proteína G sea suficiente para activar a la ACIII y que aumentos localizados de AMPc y calcio actúen en forma eficiente y rápida sobre los efectores de estos mensajeros, es decir, los canales CNG, cloruro y potasio.

Como se ha descrito hasta el momento, el sistema de transducción está finamente regulado. Posiblemente en los cilios se producen aumentos localizados de AMPc y calcio. De este modo, las proteínas que participan en la quimiotransducción deberían estar organizadas de forma tal que permitan que estos aumentos localizados sean suficientes para generar la respuesta.

II.4 Adaptación a estímulos de odorantes

Se ha observado en las neuronas olfatorias, que luego de ser aplicado un estímulo odorífero de alta intensidad por vez única, existe un período de tiempo, durante el cual si se aplica un segundo estímulo de la misma intensidad, el cambio del potencial es menor que el generado por el primero. Además, frente a exposiciones prolongadas a odorantes, la neurona genera inicialmente la respuesta típica, pero posteriormente el potencial de membrana no vuelve al estado basal, sino que se observan oscilaciones de éste (Reisert y Matthews, 2001).

Estos tipos de comportamiento frente a estímulos de alta intensidad o larga duración son procesos de adaptación, que permiten aumentar el rango dinámico de la respuesta y evitar la sobre-excitación por estímulos prolongados, respectivamente. En ambos procesos está involucrado el calcio, a través de la acción inhibitoria de CaM sobre el CNG, que en mamíferos se une en su forma apo (sin calcio) a las subunidades regulatorias CNGB1b y CNGA4 (Kurahashi y Menini, 1997). Al ingresar calcio a través del canal CNG, se une a CaM, lo que produce la disminución de la sensibilidad del canal por AMPc (Kurahashi y Menini, 1997; Trudeau y Zagotta, 2003; Bradley y cols., 2004). Posteriormente, entran en acción los demás elementos que intervienen en la terminación de la respuesta (ver apartado II.3).

Ante una exposición prolongada a odorantes el potencial de membrana de la neurona olfatoria presenta oscilaciones. Este comportamiento es generado por cambios en la concentración de calcio dentro de la neurona. Al generarse la respuesta excitatoria, la entrada de calcio a través del canal CNG activa los canales de cloruro, lo que en conjunto provoca despolarización. Pero al haber una estimulación continua, la

presencia constante de AMPc impide el cierre total de los canales CNG. Por lo tanto, el calcio entra permanentemente a través de él, pero la presencia del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que lo extrae hacia el exterior genera oscilaciones intraciliares de este segundo mensajero que afectan directamente la actividad del canal de cloruro produciendo oscilaciones del potencial de membrana (Reisert y Matthews, 2001).

II.5 La respuesta inhibitoria a odorantes

Por otra parte, en peces, anfibios y mamíferos (ratas) también se ha observado una respuesta inhibitoria a odorantes (Kang y Caprio, 1995; Vogler y Schild, 1999, Duchamp-Viret y cols., 2000), consistente en una disminución de la frecuencia de potenciales de acción. En este fenómeno están involucrados canales de potasio dependientes de calcio (K_{Ca}) (Morales y cols., 1994), que se activan por la entrada de calcio a los cilios a través del canal CNG (Madrid y cols., 2005; Morales y cols., 1997). Se ha determinado la presencia de estas conductancias de potasio inducidas por odorantes mediante registros de corrientes tanto macroscópicas en sapo chileno (*Caudiverbera caudiverbera*) y rata (Morales y cols., 1994; Sanhueza y cols., 2000), como a nivel de canal único en *C. Caudiverbera* (Jorquera y cols., 1995; Delgado y cols., 2003; Delgado y Bacigalupo, 2004; Castillo y cols., 2005). Por otra parte, han sido identificados canales de potasio activados por calcio mediante Western blot en una preparación de membranas ciliares de rata y por inmunolocalización en cilios de neurona olfatoria de *C. caudiverbera* y rata (Castillo y cols., 2005). Estas evidencias demuestran que en los cilios de las neuronas olfatorias están presentes canales de potasio que participan en la generación de la respuesta inhibitoria a odorantes.

II.6 Respuestas excitatoria e inhibitoria en una misma neurona

Es interesante destacar el hecho de que en distintos tipos de vertebrados tanto la respuesta excitatoria como inhibitoria puede ser generada por una misma neurona, dependiendo de la naturaleza de los odorantes con los que se estimule (Morales y cols., 1994; Morales y cols., 1997). Ambos tipos de respuesta se producen en los cilios y desencadenan aumentos transitorios de calcio en estas estructuras. Este catión ingresa a través del canal CNG en ambos casos, ya que el uso de un bloqueador

específico de este canal (LY83583) anula ambas respuestas. Las dos son gatilladas por un aumento del AMPc (Madrid y cols., 2005), es decir, ambas respuestas utilizan los mismos segundos mensajeros en su mecanismo de transducción, pero divergen en cuanto a los canales iónicos efectores. Esta hipótesis es apoyada por la evidencia que ratones knockout tanto para ACIII (Wong y cols., 2000), para el canal CNG (Baker y cols., 1999, Brunet y cols., 1996) o para G_{olf} (Belluscio y cols., 1998) son anósmicos.

Ya que una neurona olfatoria es capaz de responder de forma excitatoria o inhibitoria, dependiendo del odorante con el cual se estimule, cabe preguntarse cómo el sistema de transducción discrimina el estímulo, generando respuestas diferenciales e independientes. Una posibilidad es que los componentes de las cascadas de señalización se encuentran agrupados de tal forma que se genera una segregación física y funcional de ambas vías de transducción. Dicha segregación podría estar dada por la formación de complejos macromoleculares a través de proteínas de andamio, como ocurre en otros complejos de transducción.

Así la organización en el sistema olfatorio de la cascada de quimiotransducción además de conferir especificidad a la respuesta, contribuiría a la eficiencia, permitiendo la cercanía física entre los segundos mensajeros y sus efectores. En esta tesis se postula que los cilios poseen proteínas de andamio, las cuales serían responsables de agrupar los elementos involucrados en la cascada de transducción en complejos moleculares o microdominios.

III. Proteínas de Andamio

El término proteína de andamio se acuñó por primera vez en los años noventa, estudiando este tipo de proteínas que estaban implicadas en la cascada de señalización de las quinasas activadas por mitógeno (MAP quinasas). Las proteínas de andamio contienen en su estructura dominios de interacción proteína-proteína, facilitando así la formación de complejos proteicos macromoleculares involucrados, por ejemplo, en la organización de cascadas de señalización, de uniones intercelulares, de tráfico intracelular entre otros.

Las proteínas de andamio permiten la organización de cascadas de transducción en microdominios moleculares. Estas proteínas actúan como pseudo-catalizadores de una reacción química, o sea, aumentan la probabilidad de que dos proteínas interactúen entre sí. Al favorecer que dos proteínas interactúen entre sí (por ejemplo, A y B), se limita la amplificación que podría ser generada si A y B estuvieran libres para difundir (la activación de la proteína A produciría la activación de múltiples proteínas B). Sin embargo, la estructuración en microdominios disminuye el período de latencia de la respuesta y la probabilidad de entrecruzamiento de señales, lo que aumenta la especificidad de los sistemas de transducción, haciendo el sistema más eficiente (Vondriska y cols., 2004).

La especificidad de unión que poseen las proteínas de andamio está determinada fundamentalmente por dominios de interacción con otras proteínas que se encuentran en su estructura. Adicionalmente, el complejo que se forma en cada caso depende de la localización subcelular y de las condiciones celulares.

Las proteínas de andamio han sido identificadas en especies tan distantes evolutivamente como *C. elegans*, *D. melanogaster*, *Mus musculus* y *Homo sapiens*; también se expresan en distintos tejidos, como son el nervioso (sistema nervioso central o SNC), renal, cardiovascular, epitelial, embrionario, etc. Han sido implicadas en cascadas de señalización de diversos tipos como en las presentes en sinapsis, transducción sensorial (fototransducción en *Drosophila*), también en señalización al núcleo, tráfico intracelular, etc (Funke y cols., 2005; Cohen y cols., 2004; Dodge-Kafka y cols., 2006; Glynn y Evans, 2002; Lecuit y Wieschaus, 2002).

III.1 Dominios o módulos de interacción

Hasta el momento, se han caracterizado diversos dominios de interacción presentes en las proteínas de andamio, que reconocen secuencias específicas de sus blancos como residuos de tirosina fosforiladas, secuencias ricas en prolina, extremos carboxi-terminales en proteínas, etc. Por otra parte, hay otros dominios cuyos blancos de interacción se desconocen.

El análisis genómico ha demostrado que los módulos de interacción están ampliamente distribuidos en células eucarióticas. Hay una expansión explosiva de los dominios en metazoos con respecto a levadura, consistente con la generación de

sistemas de transducción de señales más complejos que acompañan a la multicelularidad (Li, 2005).

Los mencionados dominios son polipéptidos de entre 30 a 200 aminoácidos. Cada clase de dominio se caracteriza por una secuencia y/o estructura tridimensional determinada. Esta estructura, en general, es retenida al ser aislada desde su proteína nativa y son clasificados según la secuencia consenso que reconocen. Cada proteína de andamio, contiene por lo general, uno o varios tipos de dominios.

Entre los dominios presentes en las proteínas de andamio, cabe destacar los PDZ (PSD95/SAP90-Dlg-ZO-1), SH3 (Src Homology 3), GuK (dominio Guanilato quinasa), SAM (Sterile Alpha Motif), L27 (dominio Lin-2/Lin-7), dominio similar a CaMKII y los repetidos de Ankirina.

III.1.1 Dominios PDZ

Es uno de los dominios de interacción más estudiados. Corresponde a una secuencia de aproximadamente 90 aminoácidos, que reconocen secuencias de cuatro aminoácidos específicos en el extremo carboxi-terminal de las proteínas blanco. Su nombre proviene del acrónimo de las tres proteínas en las que fueron descritos inicialmente (PSD95/SAP90, Dlg, ZO-1). Análisis de secuencia en los genomas de *H. sapiens*, *D. melanogaster* y *C. elegans* han estimado la presencia de 440 dominios PDZ en 259 proteínas diferentes; 133 en 83 y 138 en 96, respectivamente (Hung y Sheng, 2002), lo que indica que es un dominio frecuente y conservado durante la evolución. Los dominios PDZ poseen un carácter modular, es decir, pueden ser transplantados a una secuencia aminoacídica no relacionada y conservan su función y especificidad. Tienen una estructura tridimensional de un sandwich de seis hebras β , flanqueado por dos hebras α -hélices. Los dominios PDZ pueden ser clasificados según su afinidad, por secuencias carboxi-terminales específicas de la proteínas blanco, pudiéndose clasificar en: Clase I, que reconocen la secuencia carboxi-terminal X-S/T-X-V/L (en donde X es cualquier aminoácido), un ejemplo es el PDZ1 y 2 de PSD95/SAP90. Clase II, que reconocen las secuencias X- \emptyset -X- \emptyset (donde \emptyset es un residuo hidrófobo), como el PDZ de Lin-2/CASK proteína serina quinasa dependiente

de CaM y Clase III, reconocen la secuencia X-D-X-V, presente por ejemplo, en la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (Sheng y Sala, 2001).

A pesar de que los diferentes dominios PDZ de una misma clase tienen una alta homología de secuencia entre sí, poseen distinta afinidad por diferentes ligandos, y la unión a éstos, en algunos dominios, está regulada por fosforilación de los residuos de serina y/o treonina de los ligandos.

Otra forma de interacción menos frecuente que se ha descrito es la dimerización entre dominios PDZ, un ejemplo es la interacción de los PDZ de nNOS y Syntrophin (proteína adaptadora asociada a citoesqueleto), en la cual un giro β que se forma en el extremo carboxi-terminal del PDZ de nNOS que actúa como una secuencia reconocida por el dominio PDZ de Syntrophin. Esta interacción deja libre el sitio de unión del dominio PDZ de nNOS de tal forma que este dominio puede mediar la formación de un trímero.

Las proteínas que contienen dominios PDZ pueden dividirse en varios grupos: Grupo I, Proteínas que no poseen actividad enzimática intrínseca. Dentro de este grupo se pueden encontrar proteínas compuestas sólo por dominios PDZ, como INAD y MUPP-1 (proteínas de andamio de la fototransducción en *Drosophila* y sinápsis química en mamíferos, respectivamente), y otras que además de los PDZ poseen dominios de otras características como son el SH3, LIM, PTB, etc, o también dominios de interacción con lípidos como C2 y PH. Esta característica le confiere a las proteínas de andamio versatilidad para asociarse con diversos blancos.

Grupo II, Proteínas de andamio que además poseen actividad enzimática, por ejemplo nNOS, y algunos tipos de quinasas.

Grupo III, Ellas se encuentran mayoritariamente en bacterias y plantas, donde están generalmente presentes en proteínas con actividad proteasa. Los dominios de este grupo de proteínas de andamio presentan una baja homología de secuencia con respecto a los PDZ convencionales, pero espacialmente son muy similares. Se ha observado que interactúan con el sitio catalítico de la proteasa, regulando el acceso del ligando. (Fan y cols., 2002).

III.1.2 Dominio SH3 (Li, 2005)

El dominio SH3 (Src Homology 3) consiste en aproximadamente 60 aminoácidos, y reconoce una secuencia consenso rica en prolinas, PxxP. La especificidad de los dominios por determinados blancos está dada por los residuos que se encuentran alrededor de PxxP. En la estructura tridimensional del dominio SH3, hay al menos tres regiones que interactúan con el ligando, dos hendiduras que acomodan el dipéptido xP y un bolsillo que recibe a los residuos adyacentes. La afinidad del ligando por el dominio es baja (1-100 μ M).

Una de las características de las prolinas (residuos reconocidos por este dominio) es que al romper estructuras secundarias como las hojas β y las α -hélices, generalmente están expuestas y son accesibles al medio. Secuencias de poliprolina forman una estructura hélice de tres residuos por giro llamada PPII (poliprolina tipo II); este tipo de estructura se forma espontáneamente en solución desde un péptido de prolinas. Estando tanto las cadenas laterales de los residuos como el esqueleto de carbonos de la hélice dirigidas hacia afuera del eje de la hélice y siendo esta estructura altamente resistente a la sustitución de las prolinas por otros aminoácidos, la hace una estructura versátil capaz de generar distintos sitios de reconocimiento con diferentes afinidades de unión de ligandos.

Los dominios SH3 se pueden clasificar según las secuencias consenso que reconocen. Hay al menos tres tipos distintos de dominios SH3:

Tipo I: K/RxxPxxP

Tipo II: PxxPxR/K

Tipo III: RxxK (esta es una excepción a la regla, ya que no hay prolinas involucradas en la secuencia consenso)

III.1.3 Dominio GuK (Guanylate kinase)

Este dominio posee una significativa identidad de secuencia (40%) con la guanilato quinasa de *S. cerevisiae* (GuK1), una enzima que cataliza la fosforilación de GMP a GDP usando como fuente de fosfato el ATP. Sin embargo, el dominio GuK no posee actividad catalítica. Este dominio puede ser subdividido en tres estructuras llamadas centro, cubierta y giro de unión a GMP. El centro está formado por cinco

hebras β y cuatro α -hélices, y la cubierta y el giro flanquean el centro. El dominio GuK contiene los supuestos sitios de unión a GMP, ATP y la actividad transferasa, pero un estudio estructural comparativo con GuK1 ha mostrado que esta región muestra grandes diferencias espaciales, lo que explicaría la ausencia de actividad catalítica (Funke y cols., 2005).

Sin embargo, hasta el momento no se sabe cuales son las características que determinan la interacción con este dominio. Se han identificado algunos ligandos de GuK, por ejemplo, GKAP/SAPAP (proteína de la sinapsis, Takeuchi y cols., 1997), GAKIN (quinasa asociada a guanilato quinasa, Hanada y cols., 2000), AKAP79/150 (proteína de andamio de la proteínas quinasa A, PKA, Colledge y cols., 2000), y MAP1A (proteína asociada a microtúbulos 1A, Brenman y cols., 1998). Por otra parte, se ha determinado que el dominio GuK se une de manera intramolecular al dominio SH3 en la proteína PSD95/SAP90, aunque de una manera no canónica para este último, ya que GuK no posee secuencias ricas en prolina (Funke y cols., 2005; Dimitratos y cols., 1999). Se ha observado que dicha interacción interfiere con la unión de GKAP al dominio GuK y también ejerce un efecto negativo sobre el acercamiento de proteínas que se unen a dominios PDZ de PSD95/SAP90 (Caruana, 2002)

III.1.4 Dominio similar a la secuencia catalítica de CaMKII

Este dominio está presente al menos en la proteína Lin-2/CASK (mamífero) y al igual que el dominio GuK, no posee actividad catalítica. El ortólogo de Lin-2/CASK en *Drosophila*, llamado Camguk, se une a CaMKII de manera dependiente de ATP. La unión de ATP a CaMKII gatilla la formación del complejo Camguk-CaMKII y si esto ocurre en presencia de calcio, provoca la autofosforilación de CaMKII y su consiguiente activación. De esta manera se produce un "pool" de CaMKII activa, localizado sobre la proteína de andamio Camguk. Al contrario, si los niveles de calcio son bajos, el complejo se disocia. Así, este dominio actúa como una base para generar aumentos de actividad CaMKII altamente localizados en los sitios donde se producen aumentos de calcio. Una evidencia funcional de la importancia de este complejo es que la mosca mutante nula de Camguk muestra alteraciones en el cortejo, un comportamiento en el cual está involucrada CaMKII (Funke y cols., 2005; Dimitratos y cols., 1999).

III.1.5 Dominio SAM

Es un dominio de aproximadamente 70 aminoácidos que recibió este nombre (SAM, Sterile Alpha Motif) debido a su alto contenido en estructura α -hélice y al hecho de que cuatro de las primeras proteínas identificadas que contienen este dominio son cruciales para la diferenciación sexual en levadura. Mutaciones en este dominio impiden el acoplamiento en estos organismos.

Los dominios SAM se encuentran en complejos macromoleculares en todos los compartimentos celulares y además de estar presentes en proteínas de andamio, han sido descritos en quinasas, proteínas de unión a RNA y factores de transcripción.

Dentro de la familia de factores de transcripción ETS (que intervienen en procesos de control de crecimiento celular, diferenciación y desarrollo embrionario) los dominios SAM están en el 40% de ellos.

Una característica del dominio SAM es su capacidad de polimerizar. Por ejemplo, el represor de la transcripción Yan forma polímeros unidos entre sí por los dominios SAM, los que se unen al DNA y reprimen la transcripción. La forma de levantar la represión es por medio de la intervención de Mae, una proteína que posee sólo un dominio SAM que se une a Yan, con una afinidad mayor que la unión Yan-Yan. Una característica de esta unión es que no hay formación de polímeros Yan-Mae, lo que impide su unión a DNA, permitiendo levantar la represión. De este modo, la capacidad de formar polímeros de SAM permite la regulación dinámica de procesos celulares (Qiao y Bowie, 2005).

III.1.6 Repetido de Ankirina

Fue descrito por primera vez en 1987 (Hall y Bennett, 1987) como una secuencia conservada en proteínas que regulan el ciclo celular en levadura (Cdc10) y en el receptor involucrado en desarrollo, Notch. Este dominio consta de una secuencia de 33 aminoácidos y debe su nombre a que en la proteína asociada a citoesqueleto, ankirina, existen 24 de estos repetidos (Foord y cols., 1999). Los repetidos de Ankirina se encuentran en todos los súper-reinos (bacterias, arqueas y eucarias, además de algunos genomas virales). A nivel subcelular, se pueden encontrar en proteínas asociadas a núcleo, citoplasma y matriz extracelular. Estructuralmente, los

aminoácidos están organizados en dos α -hélices antiparalelas apiladas, conectadas por un giro β , la que se orienta en un ángulo de casi 90° con respecto a las hélices, adquiriendo forma de L. No ha sido detectada ninguna función enzimática del repetido de ankirina, y frecuentemente se presentan en secuencias de 2 a 6, aunque se han encontrado hasta 33 de estos repetidos en una proteína. Un análisis de secuencia ha mostrado que la existencia de 3 o más repetidos permitiría el correcto plegamiento de éstos, pero un número menor genera plegamiento parcial o inexistente. La magnitud de la superficie de este dominio depende del número de repetidos ankirina que contienen, lo que en parte define sus blancos. Algunos de los residuos de este dominio están altamente conservados; sin embargo, hasta el momento no ha sido encontrada una secuencia consenso reconocida por estos repetidos.

Estos repetidos se encuentran en proteínas tan diversas como organizadores del citoesqueleto, reguladores del desarrollo, toxinas, en la familia de canales catiónicos como los TRP, que incluyen receptores sensibles a calor, frío y proteínas mecanosensoriales, entre otras (Sedgwick y Smerdon, 1999; Mosavi y cols., 2004).

III.1.7 Dominio L27

Este dominio fue descrito por primera vez en las secuencias de las proteínas Lin-2 y Lin-7, y su nombre deriva de ellas. Consta de 50-60 aminoácidos (Doerks y cols., 2000) y el análisis de su estructura ha mostrado que una unidad de L27 permanece mayoritariamente desplegada. La interacción entre dos de ellos provenientes de distintas proteínas (no ha sido detectada dimerización en una misma proteína) es suficiente para estabilizar la estructura, generándose en cada dominio tres α -hélices, con un gran lazo entre las hélice 1 y 2, pero sólo un residuo entre la 2 y 3. La interacción de dos unidades L27 se debe mayoritariamente a residuos hidrófobos (Li y cols, 2004).

Lin-7 posee un dominio L27 en el extremo amino-terminal y Lin-2 posee dos, entre el dominio CaMKII y el dominio SH3, llamados L27N y L27C según su ubicación más cercana al amino- o carboxi-terminal. El único dominio de Lin-7 interactúa con el L27C de Lin-2, formando un complejo que deja libre el resto de los dominios de ambas proteínas para establecer uniones con otros ligandos, como por ejemplo, la unión de

LET-23 (receptor tirosina quinasa, involucrado en la diferenciación de células vulvales en *C. elegans*) o la subunidad NR2B de los receptores sensibles a NMDA ambos al dominio PDZ de Lin-7 (Harris y cols., 2002). Por otra parte, el dominio L27N de Lin-2/CASK (mamíferos) interacciona con el extremo amino-terminal de SAP97/Dlg, otra proteína de andamio. (Lee y cols., 2002)

Todos estos dominios están contenidos en las proteínas andamio, que se caracterizan por la presencia de uno o más de ellos en su estructura.

III.2 Familias de proteínas de Andamio

III.2.1 Familia MAGuK

Miembros de la familia MAGuK existen desde *Drosophila* y *C.elegans* hasta mamíferos. Todas las proteínas de esta familia comparten las características de poseer un dominio GuK, pero carente de actividad enzimática (Dimitratos y cols., 1999; Montgomery y cols., 2004).

Los miembros identificados de esta familia han sido agrupados en al menos cuatro sub-familias:

III.2.1.1 Sub-familia PSD95/SAP90. Poseen tres dominios PDZ, uno SH3 y uno GuK. El primer gen identificado de esta familia, Dlg, fue descubierto en una búsqueda de supresores de tumores en *Drosophila* (Woods y Bryant, 1991), donde las larvas que carecen de Dlg muestran crecimiento descontrolado de los discos imaginales (estructuras de la larva que darán origen a las distintas partes de la mosca adulta, durante la metamorfosis). Además, las uniones septadas desaparecen (equivalente a las uniones estrechas en mamíferos) y se altera la estructura celular del epitelio embrionario (Funke y cols., 2005). Los miembros de esta subfamilia, que en mamíferos incluye a PSD95/SAP90, SAP97, SAP93/Chapsyn110 y SAP102/NE-Dlg, poseen una estructura similar a Dlg de *Drosophila* (Dimitratos y cols., 1999). Se ha determinado que PSD95/SAP90 y SAP93/Chapsyn110 pueden ser palmitoladas, lo que ayuda a su localización en la membrana. Además, existen variantes de procesamiento que aumentan la versatilidad de estas proteínas: SAP97 posee insertos en la región Hook,

determinados por procesamiento alternativo, llamados I2, I3, I4, I5, pero por ejemplo, sólo el inserto I4 se encuentra en cerebro y en hígado y el inserto I3 tiene una región de unión a la proteína asociada a citoesqueleto 4.1N (Lue y cols., 1994). Modificaciones post-traduccionales también pueden regular a estas proteínas: por ejemplo, PSD95/SAP90 es fosforilada en su extremo amino-terminal por la quinasa Cdk-5, proteína involucrada en ciclo celular.

III.2.1.2 Subfamilia ZO-1. Tienen los dominios característicos de la subfamilia PSD95/SAP90, es decir, tres dominios PDZ, uno SH3 y un GuK, pero además, en el extremo carboxi-terminal tienen una región rica en prolinas. Sus miembros son ZO-1, 2 y 3 (mamíferos), además de Tamou (*Drosophila*) (Dimitratos y cols., 1999). ZO-1 fue identificada mediante la generación de anticuerpos monoclonales contra los complejos de unión epitelial aislados desde hepatocitos (Funke y cols., 2005).

III.2.1.3 Subfamilia p55. Contienen sólo un dominio PDZ, SH3 y GuK y poseen una región Hook que se asocia con a la proteína banda 4.1 (asociada al citoesqueleto). La proteína p55, que da nombre a esta subfamilia, fue la primera MAGuK aislada bioquímicamente desde membranas de eritrocitos, aunque posteriormente ha sido encontrada también en otros tipos celulares. Otros miembros de esta subfamilia son Dlg2 y Dlg3 (Dimitratos y cols., 1999).

III.2.1.4 Subfamilia Lin-2. Contiene un dominio PDZ, uno SH3 y uno GuK. Además en su extremo amino-terminal existe una secuencia similar al dominio regulatorio de la CaMKII y dos dominios L27, ortólogos de esta proteína en *Drosophila*, mamíferos y *C. elegans* son Camguk, CASK y Lin-2 respectivamente (Dimitratos y cols., 1999). Este gen fue identificado mediante una búsqueda de genes que causan el fenotipo de ausencia de vulva en *C. elegans* (Dimitratos y cols., 1999) y posteriormente se determinó que además es requerido Lin-7/Veli/MALS y Lin-10/Mint, los cuales forman un complejo que determina el correcto desarrollo vulval (Funke y cols., 2005).

Por otra parte, se ha descubierto que Lin-2/CASK puede ser traslocada al núcleo, donde se une a factores de transcripción y activa la transcripción de genes como *Reelin*, o regula la expresión de la subunidad NR2B del receptor para glutamato NMDA (Hsueh y cols., 2000).

III.2.2 Familia ProSAP/Shank

Miembros de esta familia fueron inicialmente descritos por varios grupos a la vez, lo que explica los diferentes nombres que recibe una misma proteína (Boeckers y cols., 1999; Naisbitt y cols., 1999, Sheng y Kim, 2000). Son el producto de al menos tres genes, que codifican para Shank1, ProSAP1 o Shank2 y ProSAP2 o Shank3. ProSAP1 y ProSAP2 poseen en su extremo amino-terminal 5 a 6 repetidos de ankirina, además de un dominio SH3 y PDZ. En la zona carboxi-terminal se encuentran varios sitios ricos en prolina y un sitio de unión a Cortactina, que también es rico en prolina (denominado ppl), para terminar en un dominio SAM. Se ha propuesto una homodimerización cola-cola de ProSAP por medio de este dominio. Existe más de una variante de procesamiento, también distintos sitios de inicio y terminación de la traducción para los productos génicos, lo que aumentaría la versatilidad a estas proteínas.

Todas las ProSAPs están presentes en cerebro; ProSAP1/Shank2 está localizada en neuronas y glías y además se ha encontrado en otros tejidos como hígado y riñón. Los tres miembros de la familia han sido detectados en espinas dendríticas, que son las estructuras postsinápticas de las sinapsis glutamatérgicas.

Las ProSAP/Sank son capaces de formar puentes entre el citoesqueleto proteínas de andamio y receptores en la sinapsis glutamatérgica, por lo que se postula que juegan un papel esencial en la organización de grandes complejos proteicos (Boeckers y cols., 1999). También localizan componentes del mecanismo de endocitosis mediada por clatrina cercano a los receptores de glutamato (Okamoto y cols., 2001).

III.3. Función de las proteínas de andamio en distintos sistemas de señalización

III.3.1 Fototransducción en *D. melanogaster*

El sistema de fototransducción en *Drosophila* está organizado sobre una proteína de andamio llamada INAD y se localiza en las microvellosidades de las células fotorreceptoras. La transducción se inicia en las membranas de las microvellosidades al activarse una Rodopsina, un receptor de siete segmentos transmembrana, por

acción de un fotón. La Rodopsina activa a alrededor de 5 moléculas de proteínas Gq, generando una amplificación de la señal (Hardie y cols., 2002). La proteína G activa la PLC, por lo que incrementan los niveles de IP₃ y DAG. Este último activaría al canal catiónico TRP (Delgado y Bacigalupo, 2006), lo que lleva a la despolarización de la membrana, y al aumento de calcio intracelular, necesario para el apagamiento de la respuesta y la adaptación.

Dentro de los sistemas de transducción acoplados a proteínas G, la fototransducción en la mosca es el más rápido descrito hasta ahora, con tiempos de activación y desactivación de 20 ms y <100 ms, respectivamente. Existen al menos dos factores que determinan esta característica: primero, la transducción ocurre en un espacio reducido (microvellosidad), por lo que pequeñas corrientes por los canales TRP afectarán los niveles de iones dentro de este compartimento, particularmente el calcio, induciendo cambios rápidos de potencial de membrana; y segundo (Sheng y Sala, 2001) este sistema está organizado sobre una proteína de andamio llamada INAD que interacciona con PLC, TRP y PKC (Hardie y Raghu, 2001), con lo cual la interacción de los distintos componentes es rápida y eficiente. INAD está compuesta por cinco dominios PDZ. Diversos estudios han demostrado que PLC está unida al PDZ1 y a PDZ5 de INAD, TRP al PDZ3 y PKC a PDZ2 y PDZ4 (Montell, 2005; Tsunoda y cols., 1997; van Huizen, 1998). Estas tres proteínas componen un complejo mínimo con INAD. El TRP ancla al complejo a la membrana de las microvellosidades, como fue mostrado con mutantes nulos de INAD o mutaciones en sus dominios PDZ (Tsunoda y cols., 1997). También se ha observado que CaM, Gq y una miosina poco común (NINAC) pueden asociarse a INAD de manera transitoria. INAD también es capaz de oligomerizar por medio de los dominios PDZ 3 y PDZ4, generando una red de señalización (Sheng y Sala, 2001).

III.3.2 Sinapsis química excitatoria en mamíferos

En las sinapsis químicas excitadoras del cerebro, la membrana post-sináptica contiene una estructura muy rica en proteínas que está especializada en responder al glutamato liberado desde la membrana pre-sináptica e iniciar una compleja transducción de señales. Mediante microscopía electrónica se puede observar un engrosamiento de la membrana subsináptica de aproximadamente 40 a 50 nm y un

ancho de cerca de 500 nm, llamada densidad post-sináptica (DPS). Esta estructura posee una alta concentración de receptores de glutamato integrados en una red de elementos regulatorios, de andamio y de citoesqueleto. La DPS es considerada funcionalmente como un organelo especializado en la transducción y regulación de la señal glutamatérgica.

Dentro de la DPS están todas las proteínas implicadas en la generación de la respuesta a glutamato y las que median procesos de plasticidad. Estas proteínas están organizadas por medio de proteínas de andamio, de las cuales existe una gran variedad en la sinapsis, predominando las que contienen dominios PDZ (Hata y cols., 1998; Montgomery y cols., 2004).

Una de las proteínas de andamio más abundante en la DPS es PSD95/SAP90, que une a los receptores NMDA. También interactúa con Neuroligina, una proteína de adhesión intercelular y a canales de potasio gatillados por voltaje (Kv y Kir).

PSD95/SAP90 forma una red, favorecida por la formación de dímeros a través del extremo amino-terminal, que localiza los receptores y otras proteínas de membrana en la DPS, pero también se asocia a proteínas que no tienen dominios transmembrana, como nNOS sensible a calcio. nNOS es activada por el calcio que ingresa través del receptor de NMDA. PSD95/SAP90 también se asocia a proteínas que controlan GTPasas de las familias Ras, Rho y Rap, como GAPs (GTPase activating proteins) y GEFs (GTP/GDP exchange factor). Ellas son SynGAP (GAP para Ras), Kalirina (GEF para Rac-1) y SPAR (GAP de proteínas G de sinapsis) (Kim y Sheng, 2004).

PSD95/SAP90 es una de las proteínas más abundantes de la DPS (Cheng y cols., 2006) y forma parte fundamental de una compleja red de señalización que va desde los receptores de NMDA hasta el citoesqueleto de actina, interviniendo tanto en la localización de componentes, como en las características de la respuesta a glutamato. Knockouts de PSD95/SAP90 muestran un dramático efecto sobre la potenciación sináptica en hipocampo. Un efecto similar es causado al utilizar una subunidad del receptor (NR2) sin el extremo carboxi-terminal que es reconocido por el dominio PDZ de PSD95/SAP90, pero que conserva las características eléctricas del canal. (Sheng y Sala, 2001; Hata y cols., 1998).

Otros ligandos encontrados para PSD95/SAP90 son MAP1A y CRIPT, que se unen al dominio GuK y PDZ3, respectivamente. Estas son proteínas asociadas a microtúbulos, estructuras que se suponen ausentes de las sinápsis, aunque esto

podría ser importante en procesos de tráfico y destinación hacia sinapsis de PSD95/SAP90 y de algunas de las proteínas con las que se asocia (Sheng y Sala, 2001).

Estudios de localización de las proteínas de la subfamilia PSD95/SAP90 (Chapsyn110/SAP93, PSD95/SAP90, SAP97/Dlg y SAP102/NE-Dlg) muestran una distribución diferencial, es decir, Chapsyn110/SAP93 y PSD95/SAP90 están mayoritariamente localizadas en las DPS, en cambio SAP97/Dlg y SAP102/NE-Dlg están en la dendrita, axón, citoplasma y sinapsis (Valtschanoff y cols., 2000; Sans y cols., 2000; Rumbaugh y cols., 2003). Esto hace pensar que estas últimas están involucradas en procesos de transporte, más que cumpliendo una función de andamio. Por ejemplo, Sec8, una proteína del exocisto (sistema que transporta vesículas de secreción a la superficie celular), se une a SAP102/NE-Dlg (Sans y cols., 2003).

Por otra parte, los receptores de glutamato sensibles a AMPA interactúan con otra familia de proteínas de andamio, llamadas GRIP/ABP. Éstas se caracterizan por poseer de 6 a 7 dominios PDZ, y al igual que PSD95/SAP90 pueden estar palmitoladas, lo que genera dos poblaciones de GRIP/ABP, una asociada a membrana citoplasmática (palmitolada) y otra a membranas internas. Además puede dimerizar a través del PDZ6. Las subunidades GluR2 y GluR3 de los receptores AMPA se unen a los PDZ 4 y PDZ5 de GRIP. También se ha observado que GRIP/ABP interactúa con proteínas de adhesión celular, RasGEF y con receptores de glutamato sensibles a kainato y metabotrópicos (Kim y Sheng, 2004). Sin embargo, no se ha observado co-localización de GRIP/ABP con los receptores y gran parte de esta proteína de andamio permanece en los compartimentos intracelulares (Dong y cols., 1999). Se ha propuesto que GRIP está involucrada en el tráfico de estos receptores, similar a la función del complejo ternario Lin (ver próximo apartado).

Como se comentó en el apartado III.2.2 ProSAP también es parte fundamental de la sinapsis y su función es constituir una interfase entre el citoesqueleto y las proteínas centrales a la densidad. Así, las ProSAP están enriquecidas mayoritariamente en las zonas profundas de la densidad post-sináptica. Alteraciones en los niveles de ProSAP generan cambios en la densidad, forma y tamaño de la espina dendrítica.

III.3.3 Determinación de polaridad epitelial

En *D. melanogaster* las proteínas Bazooka y DmPar-6 (contienen dominios PDZ) y una PKC atípica (DaPKC) están implicadas en el establecimiento y mantención de la polaridad ápico-basal en tejidos epiteliales (Hung y Sheng, 2002; Ohno, 2001). Así, embriones mutantes de Bazooka muestran una epidermis altamente desorganizada (Payre, 2004).

Por otra parte, en *C. elegans* se encuentran las proteínas Lin-2, Lin-7 y Lin-10 que especifican el destino basolateral del receptor del factor de crecimiento epidermal, LET-23 (Hung y Sheng, 2002; Whitfield y cols., 1999). En las células epiteliales precursoras vulvales, LET-23 se une al dominio PDZ de Lin-7 mediante el extremo carboxi-terminal –ETCL (unión a PDZ clase I). Los ortólogos en mamífero de estas proteínas son: Lin-2/CASK; Lin-7/Veli/MALS y Lin-10/Mint/X11, que contienen dominios PDZ y forman un complejo ternario, en el cual no están involucrados los dominios PDZ (Borg y cols., 1998; Butz y cols., 1998; Kaech y cols., 1998).

Se ha observado que Lin-7 está enriquecida en sinapsis en donde une a receptores del tipo NMDA vía –ESDV (subunidades NR2) (Jo y cols., 1999) y en uniones celulares de los epitelios uniendo al transportador epitelial del neurotransmisor GABA, reconociendo su extremo carboxi-terminal –ETHL (Perego y cols., 1999).

CASK une la proteína de adhesión celular Neurexin (vía –EYYV, clase II) implicada en la formación de uniones septadas en *Drosophila*. Por otra parte, Syndecan (proteoglicano) y CASK co-localizan en células epiteliales de mamíferos, específicamente en membrana basolateral (Cohen y cols., 1998) y también CASK une a la proteína asociada a citoesqueleto Banda 4.1 (Hung y Sheng, 2002; Sheng y Sala, 2001).

Estudios de localización subcelular Lin-2/CASK, Lin-7/Veli/Mals y Lin-10 muestran una localización celular difusa en que ninguna de las tres co-localiza con las otras de manera evidente, ni tampoco con sus ligandos. Por ejemplo, Lin-10 localiza mayoritariamente en Golgi, mientras Lin-7/Veli/Mals se encuentra enriquecida en sinapsis y en las uniones adherentes en células epiteliales. Lin-2/CASK se distribuye en las zonas pre- y post-sináptica y además, bajo ciertas condiciones, se trasloca al núcleo (Hsueh y cols., 2000). Esto ha llevado a pensar que este complejo está involucrado en procesos de transporte, más que funcionar como un andamio de

sistemas de transducción. Se ha observado que los receptores sensibles a NMDA viajan a lo largo del citoesqueleto por medio de este complejo ternario a KIF17, que pertenece a la familia de proteínas motoras de la familia kinesina (Kim, 1997; Bredt, 1998; Setou y cols., 2000).

IV. Proteínas de andamio en el sistema olfatorio

Como se ha mostrado, las proteínas de andamio están involucradas en una variedad de procesos de transducción de señales y algunas de sus funciones son: aumentar la eficiencia de la respuesta a un estímulo a través de segregación en microdominios de diversos sistemas de transducción, localización adecuada de los componentes de la transducción y tráfico de proteínas a membrana citoplasmática.

La organización de la cascada de quimiotransducción sobre proteínas de andamio podría permitir una segregación molecular que daría cuenta de las respuestas excitatoria e inhibitoria, que una misma neurona olfatoria es capaz de generar independientemente. Además permitiría eficiencia en la transducción en un sistema en el cual se sugiere que existen niveles bajos de segundos mensajeros. También permitiría acercar los componentes implicados en la terminación y adaptación de la respuesta.

Hasta el inicio de este estudio, sólo había indicio de la presencia de la proteína de andamio Homer/VESL en neuronas de epitelio olfatorio, aunque no se observó un enriquecimiento de esta proteína en los cilios olfatorios. Homer/VESL es una proteína involucrada principalmente en el tráfico y agrupamiento de los receptores a glutamato metabotrópicos en sistema nervioso, su papel en la quimiotransducción se desconoce (Gasperini y Foa, 2004).

En esta tesis se estudió la presencia de las proteínas de andamio en el epitelio olfatorio, por la relevancia que éstas podrían tener organizando en microdominios los componentes de la quimiotransducción en los cilios olfatorios.

HIPÓTESIS

En cilios olfatorios están presentes proteínas de andamio, las que podrían estar participando en la organización de la cascada de transducción olfatoria en complejos moleculares.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar la presencia de proteínas de andamio en los cilios olfatorios.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar una preparación de membrana ciliar purificada y altamente enriquecida en proteínas propias de los cilios olfatorios.
2. Investigar la presencia de proteínas de andamio en cilios olfatorios, utilizando las técnicas de Western blot e inmunohistoquímica.
3. Investigar las posibles interacciones entre las proteínas de andamio ciliares, así como entre éstas y componentes de la transducción olfatoria.

MÉTODOS

Los métodos están ordenados de acuerdo a cinco grandes áreas:

- I. Métodos de preparaciones bioquímicas**
- II. Métodos de inmunohistoquímica**
- III. Métodos de biología molecular**
- IV. Métodos de proteómica**
- V. Métodos de estudio de interacción entre proteínas**

I. Métodos de preparaciones bioquímicas

1.1 Preparación de membranas ciliares de epitelio olfatorio de rata (Figura 4)

Se sacrificaron ratas Sprague Dawley por decapitación, de acuerdo a las indicaciones de ética de la Universidad de Chile. Se extrajeron los epitelios olfatorios desde el septum y las turbinas de la cavidad nasal y se colocaron en una solución salina/HEPES pH 7,4 más inhibidores de proteasas (1 ml por los dos epitelios provenientes de una rata). Luego se sometieron a una suave agitación por 20 min sobre hielo y posteriormente se centrifugó a 1.500xg por 10 min a 4°C. Se apartó el sobrenadante y se volvió a repetir el proceso de agitación.

El pellet restante se resuspendió en 5 ml de tampón (por 6 epitelios de rata) y se sonicó por 5 s, se separó el sobrenadante, y se volvió a sonicar, esta vez por 10 s. Los sobrenadantes de las sonicaciones se centrifugaron a 1.500xg y el sobrenadante final se unió a los obtenidos por medio de la agitación.

Los sobrenadantes juntos se cargaron sobre un gradiente discontinuo de sacarosa en solución salina/HEPES 0,75 M/1,4 M y se centrifugaron por 1,5 h a 100.000xg (4°C). Se extrajo el material de la interfase 0,75 M y 1,4 M, se diluyó con solución salina/HEPES al menos 4 veces y se centrifugó por 1 h a 100.000xg. El pellet obtenido (membranas ciliares, C) se resuspendió en 300 µl de solución salina/HEPES pH 7,4 más inhibidores de proteasas (IP). La fracción que no entró al gradiente corresponde a S2, compuesta por membranas no ciliares y proteínas citosólicas.

Por otro lado, el epitelio desprovisto de los cilios, se homogenizó y se centrifugó 10 min, 4°C a 1.500xg, y luego el sobrenadante a 43.140xg por 25 min, el pellet (membranas del epitelio desciliado, ED) resultante se resuspendió en 500 µl solución salina/HEPES pH 7,4 más IP, el sobrenadante de la última centrifugación corresponde a S1 (proteínas de membranas internas y citosólicas).

La concentración de proteínas fue medida mediante el método del ácido Bicinconínico (BCA).

I.2 Membranas de Bulbo Olfatorio y Corteza cerebral más hipocampo, BO y Cx respectivamente (controles para Western blot)

De las mismas ratas que se utilizaron para la extracción de epitelio olfatorio, se obtuvo el bulbo olfatorio o la corteza más hipocampo. El tejido proveniente de 5 ratas se colocó en 5 ml de tampón de homogenización con IP y se homogenizó, luego se centrifugó durante 1 h a 100.000xg, se recuperó el pellet, se volvió a resuspender en el mismo volumen de tampón de homogenización inicial. Se centrifugó 1 h a 100.000xg y el pellet se resuspendió en 500 µl tampón de homogenización más IP.

La concentración de proteínas fue medida mediante el método del ácido Bicinconínico (BCA).

I.3 Preparación de Sinaptosomas, Sy (controles para Western blot)

Los sinaptosomas se aislaron siguiendo el procedimiento de Carlin y cols. (1980), modificado por Wyneken y cols. (2001). Se aislaron los telencéfalos de 5 ratas y se colocaron inmediatamente en 6 ml/gth (gramo tejido húmedo) de tampón de preparación, más IP. Los telencéfalos se homogenizaron en un homogenizador vidrio-terfón (doce golpes). El homogenizado se centrifugó a 1.000 x g por 10 minutos, se lavó el pellet (P₁) en tampón de homogenización y se volvió a centrifugar a 1.000 x g por 5 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes (S₁), que se centrifugaron a 12.000 x g por 20 min. La porción sedimentada (P₂) se resuspendió en un volumen final de 1 ml/gth de sacarosa 0,32 M, EGTA 0,5 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8,1 y se cargó sobre una gradiente discontinua de sacarosa 1,0 M/1,2 M (4,5 ml por fase) que contenía Tris-Cl 5 mM pH 8,1. Se centrifugó a 250.000 x g por 60 minutos. Después de la centrifugación

se descartó el pellet, compuesto principalmente por mitocondrias, y la interfase 0,32/1 M de sacarosa, compuesta principalmente por mielina. La interfase 1,0/1,2 M sacarosa corresponde a los botones sinápticos resellados y unidos a membranas presinápticas (Sinaptosomas), los que se fraccionaron para su posterior análisis.

La concentración de proteínas fue medida mediante el método del ácido Bicinónico (BCA).

I.4 Preparación de una fracción enriquecida en proteínas de membranas para cargar sobre un gradiente continuo de sacarosa (Figura 2)

Se realizó el mismo procedimiento descrito en el apartado I.1 pero la suspensión de cilios en este caso, se centrifugó a 200.000xg por 1 h. El pellet resultante (proteínas de membrana, PM) se resuspendió en un máximo de 500 µL de solución salina/HEPES más IP. Esta suspensión fue utilizada para cargar la gradiente continua de sacarosa.

La concentración de proteínas fue medida mediante el método del ácido Bicinónico (BCA).

I.5 Análisis del perfil proteico de PM en un gradiente continuo de sacarosa

En un tubo de ultracentrífuga, se colocó un colchón de 1 ml de sacarosa 1,8 M en solución salina/HEPES pH 7,4, sobre él se formó un gradiente continuo de sacarosa en solución salina/HEPES pH 7,4 de 14 ml entre 1,8 M y 0,45 M, utilizando un sistema de vasos comunicantes y una bomba peristáltica. La muestra se cargó sobre la gradiente, en un volumen no superior a 500 µl. Posteriormente se centrifugó a equilibrio (9 h a 200.000xg a 4°C). La gradiente se alicuotó en fracciones de 500 µl cada una, en tubos Eppendorf, y cada fracción se analizó de la siguiente forma:

- Determinación de proteínas mediante el método del ácido Bicinónico (BCA).
- Determinación de la concentración de sacarosa mediante un refractómetro.
- Análisis de proteínas mediante Western blot.

1.6 Determinación de proteínas

Según las características de la muestra, como presencia de azul de bromofenol, alto contenido de SDS, etc, se usaron distintos tipos de determinación de proteínas, los cuales se describen a continuación

1.6.1 Método del ácido Bicinconínico (BCA), rango lineal desde 20 µg/ml a 2 mg/ml de proteína

Se utilizó el kit de Pierce, siguiendo las indicaciones del fabricante. Un volumen de 25 µl de muestra se incubó a 37°C por 30 min con 250 µl del reactivo Bicinconínico. Posteriormente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro o lector ELISA a 562 nm.

1.6.2 Método Bradford Modificado, rango lineal desde 0.1 a 1.4 mg/mL de proteína

Se utilizó en los procedimientos de geles bidimensionales, en donde las muestras contienen azul de bromofenol, que debe ser acidificado para eliminar el color azul. Consiste en colocar un volumen de 10 µl de muestra más 10 µl de HCl 0,1 N más 1 ml de reactivo Bradford (BioRad). Incubar 5 min a temperatura ambiente y luego se mide la absorbancia a 595 nm.

1.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE)

La electroforesis en condiciones denaturantes se realizaron en geles en gradiente del 4-20% de poliacrilamida y 1,5 mm de grosor, siguiendo el procedimiento según Cleveland y colaboradores, 1977.

I.8 Western blot

Las proteínas separadas previamente en el gel de poliacrilamida fueron electrotransferidas hacia membranas de nitrocelulosa o PVDF. Las proteínas se electrotransfirieron a la membrana por 1,5 h a 350 mA, 4°C, con un voltaje de inicio no mayor a 130 Volts.

Luego de la electrotransferencia, las membranas se tiñeron con Ponceau-S para ver si el proceso fue exitoso. Posteriormente, se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron para eliminar el exceso de leche y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario en BSA al 5% en PBS-azida (azida al 0,01%) toda la noche a 4 °C. Se lavaron tres veces por 10 minutos cada uno con PBS-T (Tween-20 al 0,1%). Se incubaron con el anticuerpo secundario en leche descremada al 5% en PBS por 1 h en agitación a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces por 10 minutos cada uno con PBS-T. Se lavó una vez con PBS y se reveló usando el kit ECLplus de Amersham. La señal quimioluminiscente se detectó mediante películas fotográficas Hyperfilm, Amersham.

II. Métodos de inmunohistoquímica (IHQ)

II.1 Perfusión de animales

Ratas de la raza Sprague Dawley fueron profundamente anestesiadas con inyección intraperitoneal de hidrato de cloral al 16% (0,6 ml por kg de peso). Posteriormente, se abrió la cavidad torácica y se preparó el corazón para una perfusión intracardial. Se comenzó la perfusión con alrededor de 200 ml de PBS o NaCl al 0,9%, posteriormente se pasaron 200 ml de PFA al 4% preparado fresco en PBS. Luego de la perfusión se extrajeron los epitelios olfatorios desde el septum de la rata y se colocaron en PBS. También se extrajo el cerebro que se post-fijó por 24 h en PFA al 4% a 4°C. Ambos tejidos fueron crioprotectados con sacarosa al 30% en PBS al menos 24 h a 4°C.

II.2 Cortes de tejido en crióstato

Los tejidos crioprottegidos fueron congelados en pentanol a -70°C . El epitelio olfatorio fue inmerso en un medio para congelamiento (OCT-medium) antes de congelarlo. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en el crióstato a -20°C y se realizaron cortes de $14\ \mu\text{m}$ de grosor y se pegaron en portaobjetos SuperFrost. Las muestras fueron guardadas a -20°C hasta por dos semanas.

II.3 Tinción Azán

Cortes de epitelio olfatorio incluidos en parafina fueron deparafinados por medio del siguiente procedimiento: Xilol por 10 min (dos veces), etanol al 100% por 10 min (dos veces), etanol al 90% por 10 min, etanol al 70% por 10 min, por último agua bidestilada por 5 min.

Los cortes hidratados fueron primero incubados 10 min con una solución de penetración, posteriormente se lavaron 5 min con agua bidestilada. Luego son sumergidos en solución de Orange-G por 15 min, lavados con agua bidestilada 5 min y colocados en una solución de Azocarmina-G por 10 min. Los cortes son lavados con agua potable por 5 min y con anilina-etanol por algunos segundos, después lavados 5 veces con una solución de ácido acético y etanol, nuevamente lavados con agua potable por 2 min. Posteriormente, los cortes son incubados con una solución de ácido fosfotungstico por 1 a 3 h, lavados por 2 min con agua potable, sumergidos en una solución de anilina azul y lavado por unos segundos con etanol al 100%.

Finalmente, los cortes son deshidratados con el siguiente procedimiento: etanol al 100% por 3 min, repetir el lavado pero por 5 min, xilol por 5 min (dos veces) y 10 min. Montar los cortes con Entellan (Merck).

II. 4 Inmunohistoquímica (IHQ)

Se lavaron con PBS los portaobjetos con los cortes, dos veces 5 min cada uno (agitación lenta). Luego se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena incubando los cortes con 1% H_2O_2 en 50% metanol/PBS pH 7,4 por 20 min; posteriormente se lavó tres veces con PBS (5 min cada uno).

Para bloquear los sitios inespecíficos, se incubó al menos 30 min con suero normal del animal en el cual estaba hecho el anticuerpo secundario al 10% en PBS más Tritón X-100 al 0,3% y azida de sodio al 1%. Luego se incubó con el anticuerpo primario, preparado en la solución de bloqueo toda la noche a 4°C.

Posteriormente se lavó tres veces con PBS, 10 min cada uno y se incubó 30 min con solución de bloqueo, se colocó el anticuerpo secundario (1:2000 Vector, acoplado a peroxidasa) en solución de bloqueo y se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

Se lavó tres veces con PBS, 10 min cada uno, luego se incubó 30 min con solución de bloqueo BSA (4 mg/ml en PBS) a temperatura ambiente. Se incubó 4 h con la solución ABC Vectastain (Vector), que consistió en una dilución 1:1000 de biotina y streptavidina, en solución de bloqueo BSA. Se lavó dos veces con PBS, 10 min cada uno y luego una vez con Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 por 10 min. Finalmente, se incubó con una solución de DAB (3,3-diaminobenzidina) más H₂O₂ de 3 a 15 min. Para detener la reacción se lavó dos veces con PBS, 10 min cada uno. Antes de montar las muestras se deshidrataron con el siguiente procedimiento (incubaciones de 2 min cada uno): etanol 50%, etanol 70%, etanol 85%, etanol 96%, etanol 100% (dos veces), xilol (dos veces, 5 min cada uno). Los cortes se montaron en Entellan (Merck) y se almacenaron a temperatura ambiente.

III. Métodos de biología molecular

III.1 Obtención de cDNA a partir de epitelio olfatorio de rata

Epitelios olfatorios de la zona del septum de ratas Sprague Dawley fueron extraídos y colocados en tubos Eppendorf libres de RNasa, posteriormente fue obtenido el RNA mensajero (mRNA) de la muestra por medio de columnas unidas a poli-T (Oligotex Direct mRNA Midi/Maxi kit, Qiagen). A partir del mRNA se sintetizó DNA complementario (cDNA) por medio de la transcriptasa reversa (Sensiscript kit, Qiagen). Las alícuotas de cDNA fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

III.2 PCR (Polimerase Chain reaction)

Se realizaron reacciones de amplificación por PCR usando como templado el cDNA de epitelio olfatorio de rata. Los partidores usados se detallan en la Tabla A, éstos fueron diseñados utilizando el cDNA de SAP102 (GenBank U50147).

Tabla A. Detalle de los partidores utilizados para los experimentos de RT-PCR

Nombre partidior	Secuencia	Dominio o secuencia involucrada
Nterminal.s	5'taagtgcccgagtgctatga3'	Secuencia amino-terminal
Epitope_1.s	5'ccccaaaactcaacggcagtg3'	Región reconocida por el anticuerpo anti-SAP102/NE-Dlg (Alomone)
Epitope_2.s	5'agctggtggcccgagtgcac3'	Región reconocida por el anticuerpo anti-SAP102/NE-Dlg (Alomone)
Epitope_3.s	5'aatcgggactggtatgagcag3'	Región reconocida por el anticuerpo anti-SAP102/NE-Dlg (Alomone)
PDZ3.s	5'acaggcctgggcttcaacatt3'	Inicio PDZ3
HOOK.a	5'gatcacaggcctggcataatg3'	Final región HOOK
3UTR.a	5'gagaatggtggaggggattc3'	Secuencia no traducida, del extremo 3'

Los partidores fueron sintetizados en Invitrogen y las condiciones de la reacción de PCR usando Taq PCR Core kit (Qiagen) fueron las determinadas por el fabricante.

III.3 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR fueron cargados en geles de agarosa al 0,8% más bromuro de etidio. Los marcadores de tamaño de DNA utilizados fueron GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

Los geles fueron fotografiados usando BioRAD Transiluminator acoplado a una cámara fotográfica Canon y el programa PDQuest para análisis de imágenes (BioRAD).

III.4 Subclonación de productos de PCR

Algunos productos de PCR fueron subclonados. Para este procedimiento, las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo utilizando una polimerasa a prueba de fallas

(con actividad exonucleotídica), Turbo Pfx (Invitrogen), según las especificaciones del fabricante.

Posteriormente, los productos de PCR fueron separados por medio de electroforesis en geles de agarosa, con las condiciones descritas en III.3.

Las bandas de interés (según su número de pares de bases) fueron extraídas desde el gel de agarosa utilizando el kit ULTRAClean™ de MoBio, después los insertos purificados fueron introducidos al vector de clonación pCR 2.1 (TA-cloning, Invitrogen, Figura A), siguiendo las instrucciones del catálogo.

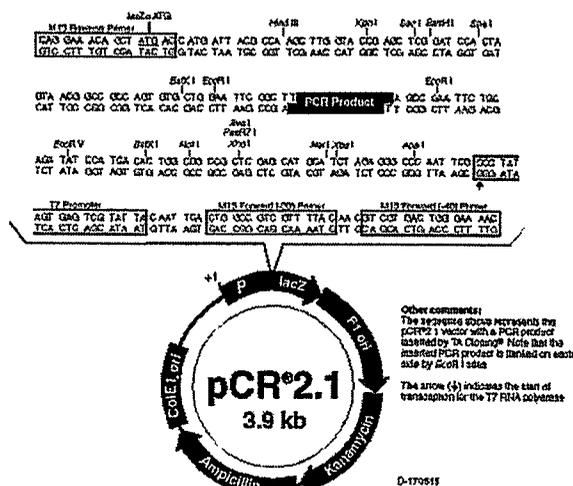


Figura A. Esquema del vector utilizado para subclonar los fragmentos amplificados por PCR. La inserción del producto de PCR producirá la truncación del gen LacZ, así las colonias que posean el inserto en el plásmido son blancas ya que no degradan el sustrato, Xgal, que da un producto azul. Las colonias azules contienen el plásmido vacío pero cerrado.

III.5 Transformación de bacterias *E. coli* de la cepa TOP10F'

Con el cDNA de interés subclonado en el vector se procedió a transformar bacterias TOP10F' (Invitrogen) por medio de shock térmico a 42°C, siguiendo las especificaciones del fabricante. Posteriormente se plaquearon sobre LB-agar con Ampicilina-IPTG-Xgal, los clones positivos eran las colonias blancas.

III.6 Secuenciación de los fragmentos subclonados

Los fragmentos obtenidos por medio de la mini-preparación (ver apartado III.7) y digeridos con EcoRI (ver apartado III.8) fueron secuenciados utilizando partidores como el M13 (reconocen secuencias del plásmido) o los partidores Nterm.s y 3UTR.a. Las secuencias obtenidas fueron analizadas por medio de programas disponibles en www.ncbi.nlm.nih.gov, www.expasy.org.

III.7 Mini-preparación de plásmidos

Mini cultivos de 2 ml de medio LB fueron inoculados con una colonia de bacterias TOP10F' transformadas. Se incubaron toda la noche a 37°C con agitación. Posteriormente, se centrifugaron las células a 3.000 rpm, descartando el sobrenadante. Las células se resuspenden en 25 µl de tampón S1 más Lisozima (2 mg/ml), se mezcló en un vortex y se incubó de 1-3 min. Se agregó 25 µl de tampón S2 y se mezcló sobre un vortex, se hirvió por 1 min y luego se colocó rápidamente en hielo (3 min). Se agregó 250 µl de tampón S3, se mezcló cuidadosamente varias veces, luego se centrifugó a máxima velocidad por 15-30 min y se transfirió el sobrenadante hacia un tubo nuevo. El DNA plasmidial fue precipitado con isopropanol y posteriormente lavado con etanol al 70%, finalmente se resuspendió en 50 a 100 µl de agua con RNasa.

III.8 Digestión con la endonucleasa EcoRI de los plásmidos obtenidos de la mini-preparación

Para realizar el ensayo se mezclaron los siguientes reactivos:

7,5 µl agua destilada estéril

2,0 µl tampón de reacción 10x para EcoRI (Fermentas)

0,5 µl enzima de restricción EcoRI (Fermentas)

10 µl plásmido de la mini-preparación

Se incubó 1 h a 37°C

Posteriormente, los productos de la digestión se analizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa

IV. Métodos de proteómica

IV.1 Precipitación con acetona

Muestras de proteínas de membranas ciliares olfatorias (200 a 900 μg de proteína total determinada por el método BCA) obtenidas desde ratas Sprague Dawley fueron precipitadas utilizando acetona ultrapura a -20°C , luego el pellet se resuspendió en tampón de solubilización, se incubó 1 h a temperatura ambiente, se centrifugó a 14.000 rpm por 1 h a 20°C y el sobrenadante se recuperó en un tubo limpio. Se volvió a determinar proteínas usando el método de Bradford modificado (I.6.2). Posteriormente se agregó el tampón IPG (Amersham, mezcla de anfolitos para desarrollar el isoelectroenfoque).

IV.2 Primera dimensión: Isoelectroenfoque

La suspensión de proteínas obtenidas en el paso anterior fueron sometidas a isoelectroenfoque utilizando tiras de poliacrilamida con un gradiente preformado de pH 3-11 (Amersham) en un equipo Amersham modelo Ettan™ IPGphor™. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

12 h	30 Volts	hidratación y entrada de la muestra en la tira
1 h	500 Volts	
1 h	1000 Volts	
1 h	4000 Volts	
60.000 v/h	8000 Volts	

A 20°C y un máximo de 50 μA por tira

IV.3 Segunda Dimensión: Electroforesis sobre geles denaturantes de poliacrilamida

Finalizado el isoelectroenfoque, las tiras de poliacrilamida fueron removidas desde el contenedor, y posteriormente fueron equilibradas en dos tipos de tampones:

-Tampón de equilibrio DTT durante 20 min a temperatura ambiente

-Tampón de equilibrio Iodoacetamida durante 20 min a temperatura ambiente

Luego se lavó brevemente en tampón de electroforesis y se colocó sobre un gel de poliacrilamida al 8% y se realizó la electroforesis (85 Volt, 16°C), los geles posteriormente fueron sometidos a Western blot o teñidos con plata o Coomassie.

Para el Western blot las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa 0,3 μ m tamaño del poro, Amersham, (400 mA por 5 h, 4°C), luego se prosiguió con el protocolo de Western blot del apartado I.7.

IV.4 Tinción con plata de geles, método modificado de Shevchenko y cols., 1996

Se incubaron los geles por 45-60 min en ácido acético al 5%/metanol al 50%, luego se lavaron una vez con metanol al 50% y con agua destilada 15 min. Se incubaron 3 min con tiosulfato de sodio al 0,02%, se lavaron dos veces 2 y 1 min, respectivamente, con agua destilada, luego se incubaron 30-45 min con nitrato de plata al 0,15% en oscuridad, se lavaron nuevamente con agua destilada.

Para revelar se cambió la solución a formalina o formaldehído al 0,04% en carbonato de sodio al 2% hasta que se alcanzó la intensidad deseada. Se detuvo la reacción con ácido acético al 5% por 10 min. Los geles se almacenaron en ácido acético al 1% /metanol al 10%.

Las imágenes de los geles como de los Western blot fueron obtenidos utilizando un escaner BioRAD G-800 y analizados con el programa PDQuest de BioRAD.

Posteriormente, se extrajeron muestras de proteínas desde los geles, para lo cual se cortaron cuidadosamente zonas del gel que correspondían a las señales observadas mediante Western blot. Las muestras fueron preparadas y sometidas a espectrometría de masas según Li y cols., 2005.

V. Métodos de análisis de interacción entre proteínas

V.1 Inmunoprecipitación utilizando Dynabeads™

Se colocaron 200 a 250 μ g de proteína en 200 μ l de tampón de solubilización (Solución salina/HEPES pH 7,4 más Tritón X-100 al 0,5%) y se incubaron en agitación

por 2 h. Posteriormente, se centrifugó a 14.000xg por 10 min, se recuperó el sobrenadante que correspondía a las proteínas solubilizadas en el tampón.

Por otra parte, se lavaron las esferas magnéticas Dynabeads™ con PBS filtrado (100 µl de la suspensión de esferas más 500 µl PBS), 10 min, se repitió un total de dos veces. Luego a 100 µl de bolitas Dynabeads™ se agregaron 5 µg de anticuerpo en 300 µl PBS, se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente, se hicieron dos lavados con PBS. Se agregó 200 µg de proteínas previamente solubilizadas en 200 µl de tampón de solubilización más IP a las esferas y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. El sobrenadante de esta mezcla fue la fracción NO UNIDO, las esferas se lavaron dos veces con tampón de solubilización más IP. Se resuspendieron en 70 µl en tampón de carga 2x de electroforesis. Se hirvió 5 min y se centrifugó 10.000 rpm por 5-10 min, recuperándose el sobrenadante (fracción UNIDO). Posteriormente todas las fracciones fueron analizadas a través de SDS-PAGE y Western blot (1.7 y 1.8).

SOLUCIONES Y ANTICUERPOS

I. Preparaciones bioquímicas

Solución salino/HEPES: HEPES 20 mM, NaCl 145 mM, KCl 5 mM, K_2HPO_4 1,6 mM, $MgSO_4$ 2 mM, glucose 7,5 mM, pH 7,4.

Tampón de homogenización de tejido de bulbo olfatorio y corteza cerebral más hipocampo: TrisHCl 5 mM, Tritón X-100 0,5%, pH 8,1.

Tampón de preparación sinaptosomas: Sacarosa 0,32 M, 5 mM Tris HCl, EGTA 0,5 mM, pH 7,4

II. Determinación de proteínas

II.1 Método BCA

Reactivo A: BCA- Na_2 2% (1,77% si es ácido libre), Na_2CO_3 0,14%, tartrato de Sodio 0,4%, $NaHCO_3$ 0,95%, NaOH 0.4% para ajustar pH
pH final 11.25

Reactivo B: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 4%

III. SDS-PAGE y Western blot

Tampón de carga para SDS-PAGE: TrisHCl 2M, SDS 20%, Glicerol 87%, 0.1% azul de Bromofenol, β -mercaptoetanol al 5%, pH 6,8.

PBS 10x: NaCl 1,5 M, KH_2PO_4 25 mM, K_2HPO_4 100 mM, pH a 7,2.

Ponceau-S: Ponceau-S 0,1% en ácido acético glacial al 5%

IV. Perfusión, tinción de Azán e inmunohistoquímica

p-formaldehído 4%: Disolver en PBS entre 60-80°C agregar unas gotas de 10 N NaOH, para su completa disolución

PBS 10x: NaCl 1,5 M, KH₂PO₄ 25 mM, K₂HPO₄ 90 mM. Ajustar pH a 7.2 con NaOH.

Solución penetrante: Mezclar 100 ml de K₂Cr₂O₇ al 10% con 100 ml de Cl₃C.COOH al 10%.

Solución Orange-G: Orange-G al 0,75% en agua bidestilada, agregar unas gotas de ácido acético glacial.

Solución de Azocarmina-G: Pesar 0,4 gr de Azocarmina-G y mezclar en un mortero con un poco de agua bidestilada, luego agregar 200 ml de agua bidestilada y calentar esta solución por 1 h. Dejar enfriar y agregar 2 ml de ácido acético. No es necesario filtrar esta solución.

Solución de anilina-etanol: Mezclar 0,2 ml de anilina con 200 ml de etanol al 90%

Solución ácido acético-etanol: Mezclar 0,2 ml de ácido acético con 200 ml de etanol al 90%

Solución de ácido fosfotúngstico: Mezclar 5 g de ácido fosfotúngstico en 100 ml de agua destilada

Solución de azul de anilina: Disolver 0,25 gr de anilina azul en 100 ml de agua bidestilada, y luego agregar 8 ml de ácido acético glacial

V. Biología Molecular

V.1 Mini preparaciones de DNA plasmidial

Tampón S1: Sacarosa 8%, CDTA 50 mM, TrisHCl 50 mM, pH 8,0

Tampón S2: sacarosa 8%, CDTA 50 mM, TrisHCl 50 mM, pH 8,0, Tritón X-100 10%

Tampón S3: NaCl 500 mM, TrisHCl 10 mM, pH 8,0

LB-Agar: Triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 1%, autoclavar. Luego agregar Ampicilina a una concentración final de 5 µg/ml

VI. Geles bidimensionales

Tampón de solubilización: Urea Ultra Pura 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4%, Tritón X-100 0.5%, Tris-HCl 20 M, DTT 64 mM, IPG buffer 0.5% (del mismo rango de pH que las tiras de poliacrilamida), trazas de azul de bromofenol.

Tampón de equilibrio-DTT: TrisHCl 50 mM, Urea 6 M, glycerol 30%, SDS 2%, trazas de azul de bromofenol, DTT 10 mg/ml, pH 8,8.

Tampón de equilibrio-Iodoacetamida: TrisHCl 50 mM, Urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, trazas de azul de bromofenol, Iodoacetamida 25 mg/ml, pH 8,8.

Tabla B. Anticuerpos utilizados para Western blot, Inmunohistoquímica e inmunoprecipitaciones

Anticuerpo (anti-)	Referencia	animal	epitope
ACIII	Santa Cruz	conejo (P)	carboxi-terminal ACIII ratón
SAP102/NE-Dlg (1)	Alomone	conejo (P)	residuos 93-124 humano
SAP102/NE-Dlg (2)	ABR	conejo (P)	residuos 83-100 de rata
SAP102/NE-Dlg (3)	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	ratón (M)	amino terminal de rata
SAP102/NE-Dlg (4)	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	conejo (P)	residuos 1-119 de rata
SAP102/NE-Dlg (5)	SIGMA	conejo (P)	residuos 83-100 de rata
SAP102/NE-Dlg (6)	Calbiochem	ratón (M)	residuos 1-119 de rata
SAP102/NE-Dlg (7)	Santa Cruz	cabra (P)	amino terminal humano
SAP97/Dlg (1)	Calbiochem	ratón (M)	residuos 1-163 rata
SAP97/Dlg (2)	ABR	conejo (P)	residuos 115-133 de rata
SAP97/Dlg (3)	Stressgene	ratón (M)	residuos 1-163 de rata
SAP97/Dlg (4)	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	ratón (M)	amino terminal de rata
SAP93/Chapsyn	Zymed	cabra (P)	residuos 1-386 de humano
SAP90/PSD95 (1)	Santa Cruz	cabra (P)	carboxi-terminal humano
SAP90/PSD95 (2)	Transductions Labs	ratón (M)	amino-terminal de rata
PDZ	Upstate	ratón (M)	residuos 77-299 de humano
ProSAP1/Shank2	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	conejo (P)	residuos 355-509 de rata
ProSAP2/Shank3	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	guinea pig (P)	residuos 1055-1806 de rata
Shank1	Abcam	conejo (P)	
ProSAPiP	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	conejo (P)	residuos 332-704 de ratón
SerSAP2 (1)	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	guinea pig (P)	residuos 1-93 de ratón
SerSAP2 (2)	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	conejo (P)	residuos 1-93 de ratón
SPAR (1)	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	guinea pig (P)	
SPAR (2)	Santa Cruz	cabra (P)	amino terminal de humano
SPAR (3)	Lab. Dr. Boeckers	conejo (P)	residuos 1-93 de ratón
Lin-7/Veli/MALS	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	conejo (P)	
Lin-2/CASK	ABR	conejo (P)	residuos 578-592 de humano
Homer	Abcam	conejo (P)	
PATJ	Abcam	cabra (P)	humano
MAGI1	Santa Cruz	cabra (P)	carboxi-terminal de humano
beta-catenina	Santa Cruz	conejo (P)	residuos 680-781 de humano
Adducin	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	ratón (M)	
Abp1	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	guinea pig (P)	26 N y 282-370
Syndapin1	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	conejo (P)	dominio SH3 y amino terminal
Jacob	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	conejo (P)	residuos 285-299
Caldendrin	Lab. Prof. Dr. Gundelfinger (IfN)	guinea pig (P)	residuos 137-298

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio están divididos en tres secciones:

La primera (I) se relaciona con la caracterización de fracciones subcelulares provenientes del epitelio olfatorio de la rata, incluyendo una fracción enriquecida en cilios, lo cual fue fundamental para esta tesis.

La segunda (II) corresponde a la búsqueda de proteínas de andamio en cilios olfatorios utilizando las técnicas de Western blot e inmunohistoquímica, además de experimentos de inmunoprecipitación para estudiar posibles interacciones entre estas proteínas de andamio y los componentes de la quimiotransducción.

La tercera parte (III) corresponde a la identificación y estudio de una nueva isoforma de la proteína de andamio SAP102/NE-Dlg, encontrada en epitelio olfatorio, utilizando técnicas de biología molecular como RT-PCR, secuenciación nucleotídica y herramientas de proteómica, como geles bidimensionales y espectrometría de masas.

I. Mejoramiento y caracterización de una preparación de membranas ciliares provenientes de epitelio olfatorio

El método de purificación de membranas ciliares fue inicialmente adaptado de protocolos de Jorquera (1995) y de Washburn y cols., (2002), Figura 1. Las fracciones de interés obtenidas una vez finalizada la preparación fueron: fracción ciliar (FC) que contiene proteínas ciliares más otras provenientes de membranas más livianas y citosólicas, y membranas de epitelio desciliado (ED) (Figura 1). Con el propósito de aumentar la pureza de las membranas ciliares obtenidas, y separar tipos de membranas diferentes a las ciliares, como también proteínas citosólicas presentes en esta fracción, se introdujo una modificación a la preparación.

Para ello, se realizaron experimentos de ultracentrifugación de la suspensión de cilios (S, en la Figura 1) sobre un gradiente continuo de sacarosa entre 0,5 y 1,8 M ($n=3$, Figura 2). Análisis de las fracciones mediante SDS-PAGE (tinción Coomassie, Figura 3A) mostró que los geles teñidos con Coomassie reflejaron que algunas bandas proteicas estaban diferencialmente enriquecidas: en las fracciones livianas, se observa una banda intensa entre 55 y 66 kDa y bajo los 30 kDa, mientras

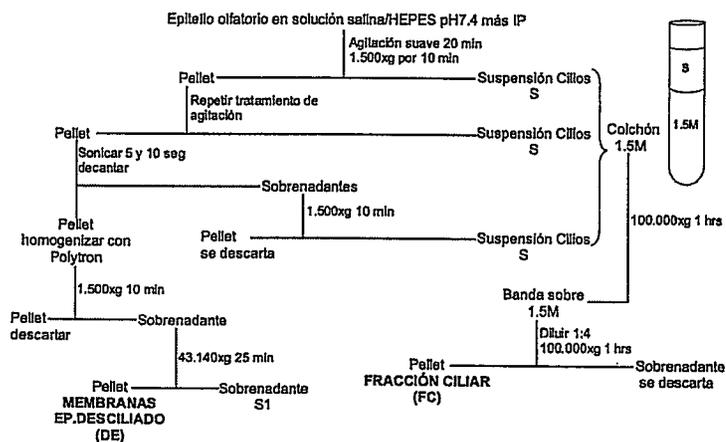


Figura 1. Esquema de una preparación bioquímica de membranas obtenida desde epitelio olfatorio de rata. Protocolo modificado desde Washburn y cols, 2002 y Jorquera, 1995. Las fracciones finales obtenidas fueron: Membranas de epitelio desciliado (ED) y una fracción ciliar (FC) que contiene mayormente membranas ciliares y restos de proteínas citosólicas. IP: inhibidores de proteasas

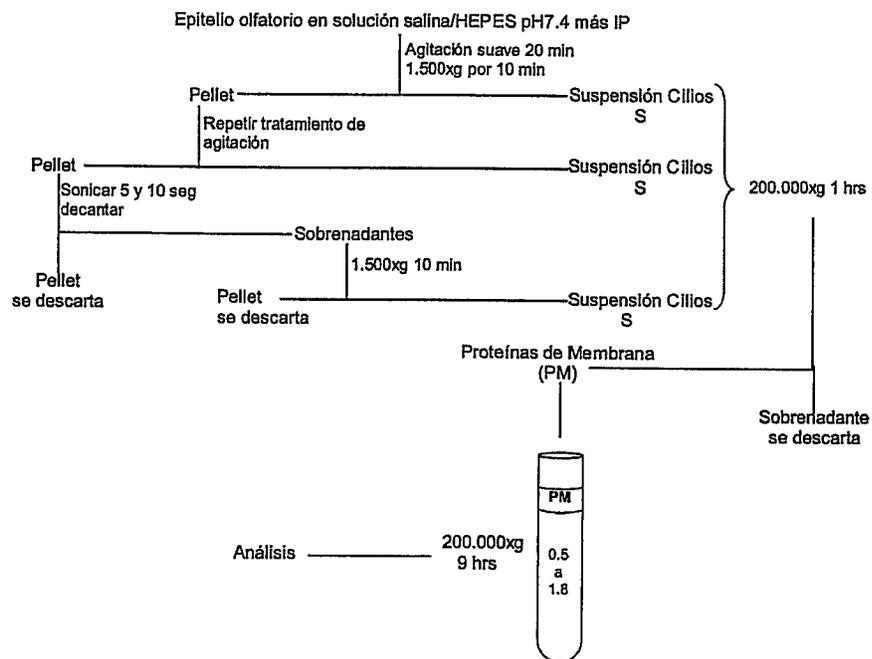


Figura 2. Protocolo de ultracentrifugación al equilibrio de una suspensión de cilios, en un gradiente de sacarosa. Se obtuvo una suspensión de cilios desde epitelio olfatorio de rata y posteriormente fue cargado sobre un gradiente de sacarosa entre 0,4 y 1,8 M (IP: inhibidores de proteasas; PM: proteínas de membrana)

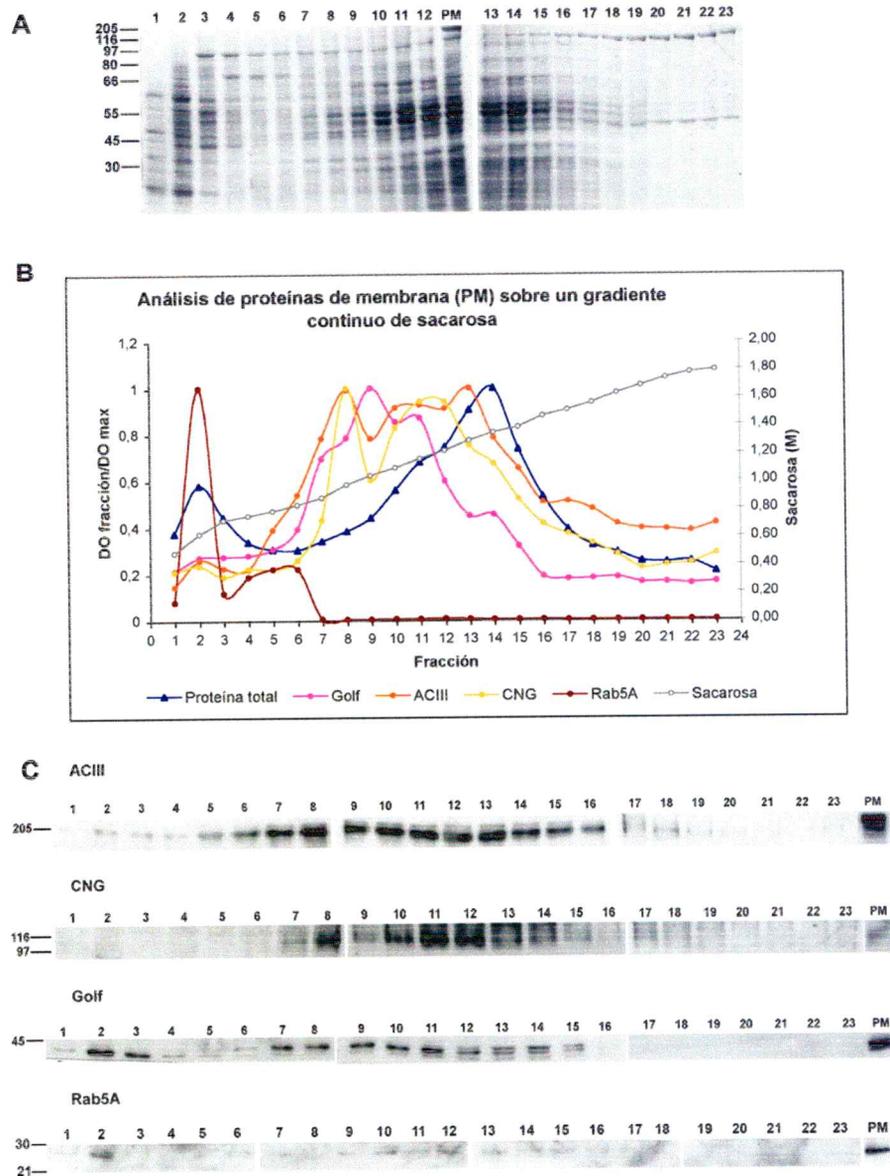


Figura 3. Análisis de la distribución de proteínas ciliares sobre un gradiente continuo de sacarosa (experimento representativo) **A.** Perfil proteico del gradiente de sacarosa observado mediante tinción Coomassie **B.** Análisis densitométrico de Western blot de las fracciones obtenidas desde el gradiente de sacarosa, todas las señales cuantificadas fueron normalizadas con el valor máximo (eje izquierdo), la concentración de sacarosa en cada fracción también fue graficado (eje derecho) **C.** Western blots representativos de las proteínas ACIII, canal CNG, G_{off} , Rab5A, mostrando su distribución en el gradiente. PM: Material cargado sobre el gradiente (Proteínas de Membrana)

en las fracciones más pesadas se observan dos bandas importantes entre 45 y 55 kDa,

coincidentes con el segundo pico, las que podrían corresponder a proteínas asociadas a citoesqueleto, como β III-tubulina y actina (aproximadamente 50 y 40 kDa, respectivamente), las que contribuirían en gran medida a construir el segundo pico.

La Figura 3B contiene un análisis densitométrico de los Western blot y su relación con la concentración de proteínas y de sacarosa, la Figura 3C muestra Western blot representativos de todas las fracciones obtenidas del gradiente. Coincidente con lo que se observó en la determinación de proteínas, los geles mostraron un pico de proteínas en las fracciones 2-3 y 11-15 (Figura 3B, en azul). Con la ayuda de un refractómetro, se midieron las concentraciones de sacarosa en estas fracciones, las que estuvieron en el rango entre 0,6 M y 1,1-1,5 M (Figura 3B, en gris), respectivamente. Los Western blot, en los cuales se usaron anticuerpos contra proteínas que fueran componentes moleculares de la quimiotransducción, mostraron que ACIII (n= 3) y el canal CNG (n= 3) están enriquecidas entre las concentraciones 0,85 y 1,35 M de sacarosa (en naranja y amarillo en la Figura 3B). Por lo tanto, los picos de máximo enriquecimiento para ACIII y CNG se encontraron a concentraciones de sacarosa menores que el segundo pico de proteínas totales. También se observó el enriquecimiento de la proteína G_{off} (n= 3). El anticuerpo reconoce tres tipos de proteínas G que poseen un peso similar, cercano a 45 kDa, las cuales se distribuyeron diferencialmente en el gradiente. Pensamos que la banda asociada a cilios es la central, pues ésta co-migra en el gradiente con los demás componentes de la quimiotransducción. Además esta banda no es observada en un homogenizado de cerebro, un tejido que no posee la G_{off} y que fue usado como control negativo.

Además, al utilizar el marcador de endosomas tempranos Rab5A (Bucci y cols., 1994), éste mostró un enriquecimiento en las zonas de menor densidad de sacarosa (aprox. 0,6 M sacarosa) asociado al primer pico de proteínas (Figura 3A, B, C). Rab5A también estuvo presente en las fracciones que contienen las proteínas ciliares, aunque en menor cantidad (Figura 3C). Esto puede explicarse porque Rab5A transita entre membrana plasmática y endosomas tempranos (Bucci y cols., 1994). En conclusión, como Rab5A se encuentra enriquecida en las fracciones de menor densidad de sacarosa, que contendrían membranas más livianas que los cilios, pensamos que en el gradiente se obtuvo una separación de distintos tipos de membranas existentes en el

material de partida, es decir, desde una fracción de membranas obtenida después del desciliado.

Sobre la base de estos resultados, durante este trabajo se usó un gradiente discontinuo de sacarosa con concentraciones de 0,75 y 1,4 M para purificar los cilios (Figura 4). Las fracciones obtenidas mediante este protocolo modificado, fueron membranas ciliares (C), membranas de epitelio desciliado (ED), las que fueron analizadas mediante Western blot. Como se pudo comprobar, en la interfase 0,75 M/1,4 M se concentran proteínas consideradas marcadores ciliares. Ellas son ACIII, G_{olf} y el canal CNG (Figura 5A, B y C). Como controles negativos (en el caso de ACIII y G_{olf}) o positivos (para el canal CNG) se usó homogenizado de corteza (Cx) o sinaptosomas (Sy). Además no apareció señal detectable de Rab5A (Figura 5D), lo que indica que la preparación tiene un alto grado de pureza.

En resumen, se logró obtener una preparación de proteínas enriquecidas en membranas ciliares y altamente purificada, separando por densidad membranas más livianas de membranas ciliares. Esta preparación fue utilizada para la búsqueda de proteínas de andamio.

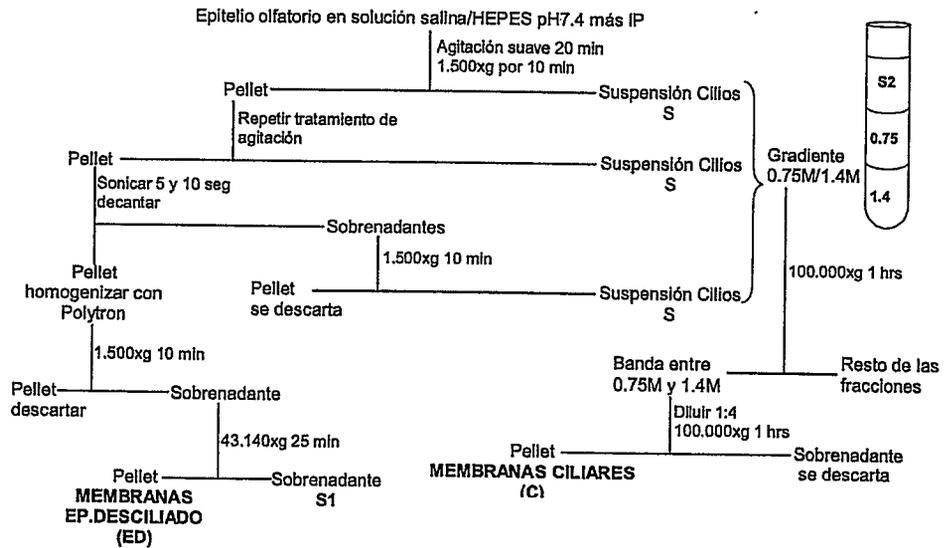


Figura 4. Protocolo optimizado de la preparación de membranas ciliares desde epitelio olfatorio de rata. La suspensión de cilios es cargada sobre un gradiente discontinuo de sacarosa 0,75 y 1,4 M de sacarosa. Las fracciones obtenidas son: Membranas ciliares (C), Membranas de epitelio desciliado (ED) y la fracción que contiene proteínas de membranas internas y citosólicas (S1 y S2). IP: inhibidores de proteasas.

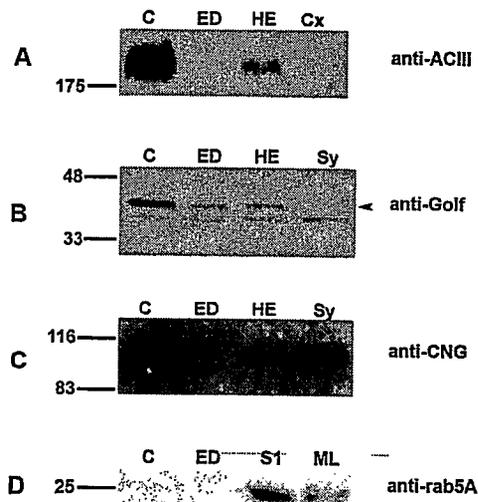


Figura 5. Western blots representativos de una preparación de membranas ciliares obtenida con el protocolo optimizado. **A.** anti-ACIII 1:2000; **B.** anti-G_{olf} 1:2000, la punta de flecha indica la isoforma de epitelio olfatorio; **C.** Anti-canal CNG 1:400; **D.** Anti-rab5A 1:500. C: membranas ciliares, ED: membranas de epitelio desciliado, HE: homogenizado de epitelio olfatorio, Cx: homogenizado de corteza de cerebro de rata, Sy: sinaptosomas, S1: fracción de membranas internas y proteínas citosólicas, obtenida al utilizar el protocolo de la Figura 4; ML: fracción enriquecida en membranas livianas (internas) de corteza. Cada carril contiene 50 µg de proteína, excepto Cx, Sy y ML que contienen 20 µg.

II. Búsqueda de proteínas de andamio en cilios olfatorios de rata

Para realizar esta búsqueda se utilizaron dos técnicas, Western blot de la preparación de membranas ciliares, descrita en el Apartado I, e inmunohistoquímica (IHQ). Para los experimentos de IHQ, se realizaron cortes coronales de epitelio olfatorio proveniente del septum que separa ambas fosas nasales. La Figura 6A muestra un corte representativo teñido con Azan. Se puede observar la típica morfología del epitelio, pseudoestratificado, en donde los núcleos neuronales se ven acumulados mayoritariamente en la zona inferior del epitelio. La lámina propia se distingue justo abajo del epitelio, en azul, separándolo del tejido conectivo. También se observan los fascículos de axones (N) provenientes del epitelio; junto a los fascículos se pueden apreciar algunas vénulas (V) y el tejido conectivo que los rodea. El límite superior corresponde a la capa ciliar (C); sin embargo, los cilios no fueron reactivos a la tinción con Azan. Se realizaron experimentos de IHQ con este tipo de cortes usando un anticuerpo contra un marcador para cilios, como anti-ACIII (n=3), el que mostró señal mayoritariamente en la capa ciliar (Figura 6C). La tinción fue específica, ya que el control negativo, donde no se incubó con anticuerpo primario pero sí con el secundario, no mostró tinción de cilios (Figura 6B).

Utilizando ambas técnicas, se realizó una búsqueda de proteínas de andamio pertenecientes a diversas familias no relacionadas estructuralmente, como también de proteínas que unen calcio y se asocian a citoesqueleto, las que también cumplirían una función secundaria como andamio. Para algunas proteínas fueron utilizados varios anticuerpos, que reconocían distintos epítopes. Un resumen de los anticuerpos usados y los resultados obtenidos tanto por Western blot como por IHQ son mostrados en la Tabla 1A y 1B, respectivamente. La Tabla 1A contiene la información de los resultados de Western blot e IHQ. Por otra parte, la Tabla 1B muestra los resultados detallados de las IHQ, es decir, los métodos alternativos de exposición del antígeno que se utilizaron para ciertos anticuerpos y los tipos de muestra usados (cortes incluidos en parafina o congelados). Cabe destacar que algunas de las señales sólo fueron vistas mediante la exposición de los cortes congelados en ácido clorhídrico diluido; éstas fueron

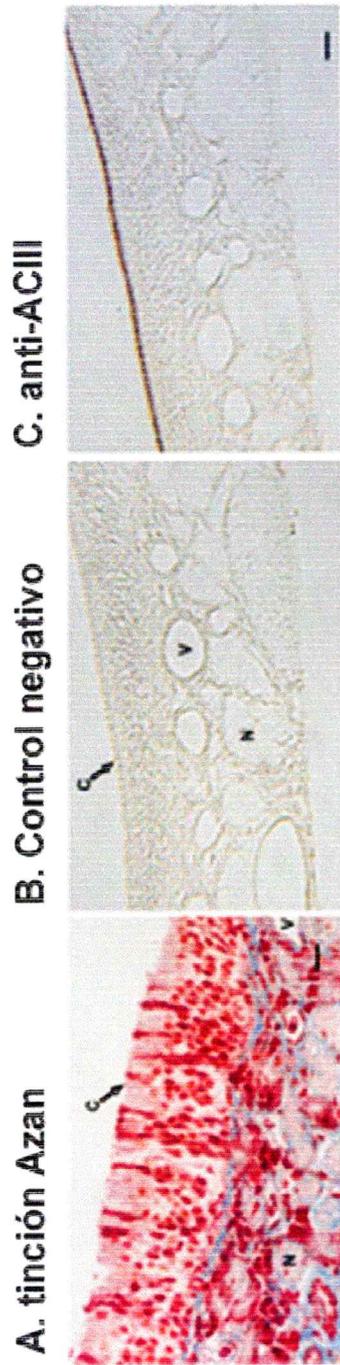


Figura 6. IHQ de cortes coronales de epitelio olfatorio. **A.** Corte teñido con Azan; **B.** Control negativo de una inmunotinción, el corte fue incubado solo con el anticuerpo secundario; **C.** Inmunotinción utilizando un anticuerpo anti-ACIII 1:800. Las barras corresponden a 10 μ m. C: capa ciliar; N: fascículos de axones; V: vénula.

Tabla 1A. Resumen de la búsqueda de proteínas de andamio mediante Western blot e IHQ. Se resumen los resultados obtenidos en Western blot, en distintas fracciones obtenidas desde epitelio olfatorio. Todos los anticuerpos que mostraron banda en membranas ciliares, fueron probados en IHQ. √ Presencia de una notoria banda mediante Western blot o IHQ; x: No hay bandas en Western blot ni tinción en IHQ; ?: El anticuerpo no funciona en los controles positivos; (-): no probado; NE: tinción no específica

Anticuerpo (anti-)	Western blot			IHQ
	Cilios	ED	Cerebro	
ACIII	√	x	x	√
SAP102/NE-Dlg (1)	x	x	√	√
SAP102/NE-Dlg (2)	?	?	x	x
SAP102/NE-Dlg (3)	x	x	√	x
SAP102/NE-Dlg (4)	x	x	√	x
SAP102/NE-Dlg (5)	*	x	√	x
SAP102/NE-Dlg (6)	x	x	√	x
SAP102/NE-Dlg (7)	x	x	√	x
SAP97/Dlg (1)	√	√	√	x
SAP97/Dlg (2)	√	√	√	√
SAP97/Dlg (3)	√	√	√	x
SAP97/Dlg (4)	√	√	√	x
SAP93/Chapsyn	x	x	√	x
PSD95/SAP90 (1)	x	x	√	(-)
PSD95/SAP90 (2)	x	x	√	(-)
PDZ	√	√	√	√
ProSAP1/Shank2	√	√	√	√
ProSAP2/Shank3	√	√	√	√
Shank1	?	?	x	(-)
ProSAPiP	√	√	√	√
SerSAP2 (1)	?	?	x	(-)
SerSAP2 (2)	?	?	x	(-)
SPAR (1)	NE	NE	NE	(-)
SPAR (2)	x	√	√	(-)
SPAR (3)	NE	NE	NE	(-)
Lin-7/Veli/MALS	√	√	√	√
Lin-2/CASK	√	√	√	√
Homer	?	?	x	(-)
PATJ	?	?	x	(-)
MAGI1	x	√	√	(-)
Beta-catenina	√	√	√	√
Adducin	x	√	√	(-)
Abp1	√	√	√	x
Syndapin1	√	√	√	√
Jacob	√	√	√	(-)
Caldendrin	x	x	√	(-)

Tabla 1B. Resumen de los experimentos de IHQ desarrollados en cortes coronales de epitelio olfatorio. Se muestra en detalle los resultados obtenidos con esta técnica al probar distintos tipos de inclusión de la muestra (congelado o en parafina), como también los tratamientos de exposición de antígeno. √ Presencia de una notoria señal mediante IHQ; x: No hay tinción; ST: Cortes sin ningún tratamiento antes de inmunotefir, HCl: pre-tratamiento con HCl 0,2 N por 20 min a 37°C; pepsin: pre-tratamiento con pepsina 1 mg/mL por 5 min

Anticuerpo (anti-)	Cortes Congelados			Cortes Parafina		
	ST	HCl	Pepsin	ST	HCl	Pepsin
ACIII	√	√	√	√	√	√
SAP102/NE-Dlg (1)	√	x	x	x	x	x
SAP102/NE-Dlg (2)	x	x	x			
SAP102/NE-Dlg (3)	x	x	x			
SAP102/NE-Dlg (4)	x	x	x			
SAP102/NE-Dlg (5)	x	x	x			
SAP102/NE-Dlg (6)	x	x	x			
SAP102/NE-Dlg (7)	x	x	x			
SAP97/Dlg (1)	x					
SAP97/Dlg (2)	x	√	x	x	x	x
SAP97/Dlg (3)	x	x	x	x	x	
SAP97/Dlg (4)	x	x	x	x	x	x
PDZ	x	√				
ProSAP1/Shank2	x	√				
ProSAP2/Shank3	√	√	x			
ProSAPiP	√	x	x	x	x	x
Lin-7/Veli/MALS	√	x	x	x	x	x
Lin-2/CASK	√	x	x	x	x	x
Beta-catenina	√	±	x			
Abp1	x	x	x			
Syndapin1	√	√	x			

SAP97/Dlg, proteínas con dominios PDZ y ProSAP1/Shank3. Por otra parte, la inclusión de las muestras en parafina mostró ser poco útil para todos los anticuerpos usados, excepto para ACIII.

Los resultados obtenidos, que se muestran en las figuras siguientes, están organizados de la siguiente manera: la imagen de la izquierda corresponde al control negativo, es decir, sin el anticuerpo primario. Las imágenes del centro y la derecha son tinciones usando el anticuerpo, bajo dos magnificaciones. Finalmente, se muestra el resultado del Western blot y las respectivas cuantificaciones.

II.1 Miembros de la familia ProSAP (Proline-enriched Synapse-Associated Protein)

Las proteínas de la familia ProSAP encontradas en cilios olfatorios fueron ProSAP1/Shank2 y ProSAP2/Shank3. En la Figura 7A se muestra que ProSAP1/Shank2 (n= 2) está mayoritariamente concentrada en la franja ciliar del epitelio. Al observar a una magnificación mayor, no es posible distinguir estructura alguna en la franja ciliar, lo cual es debido a la disposición en forma de red de los cilios, además de su pequeño diámetro. Los Western blot también mostraron la presencia de ProSAP1/Shank2 (n= 6) en cilios olfatorios (Figura 7A). El análisis densitométrico de éstos no mostró un enriquecimiento relativo con respecto a un homogenizado de epitelio (Figura 7D). El peso molecular de esta proteína en cilios es levemente mayor que la observada en bulbo olfatorio. Esta observación se puede deber a que las ProSAPs, en general, poseen un alto número de variantes de procesamiento alternativo (Lim y cols., 1999).

ProSAP2/Shank3 también se observó enriquecida en cilios mediante IHQ (n= 2, Figura 7B). En Western blot la señal de esta proteína se presentó en tres bandas de un peso molecular sobre 175 kDa (n= 4), mientras que en bulbo olfatorio (control positivo) la señal se distribuyó en más de tres bandas cercanas a 175 kDa, las que también podrían corresponder a variantes de procesamiento alternativo. Análisis densitométrico (Figura 7D) mostró un enriquecimiento relativo significativo para ProSAP2/Shank3 en cilios olfatorios ($p < 0,01$)

Ambas proteínas están involucradas en la formación de complejos macromoleculares en la sinapsis química excitatoria, donde forman un puente entre el citoesqueleto y otros complejos organizados por las proteínas MAGuK (Okamoto,

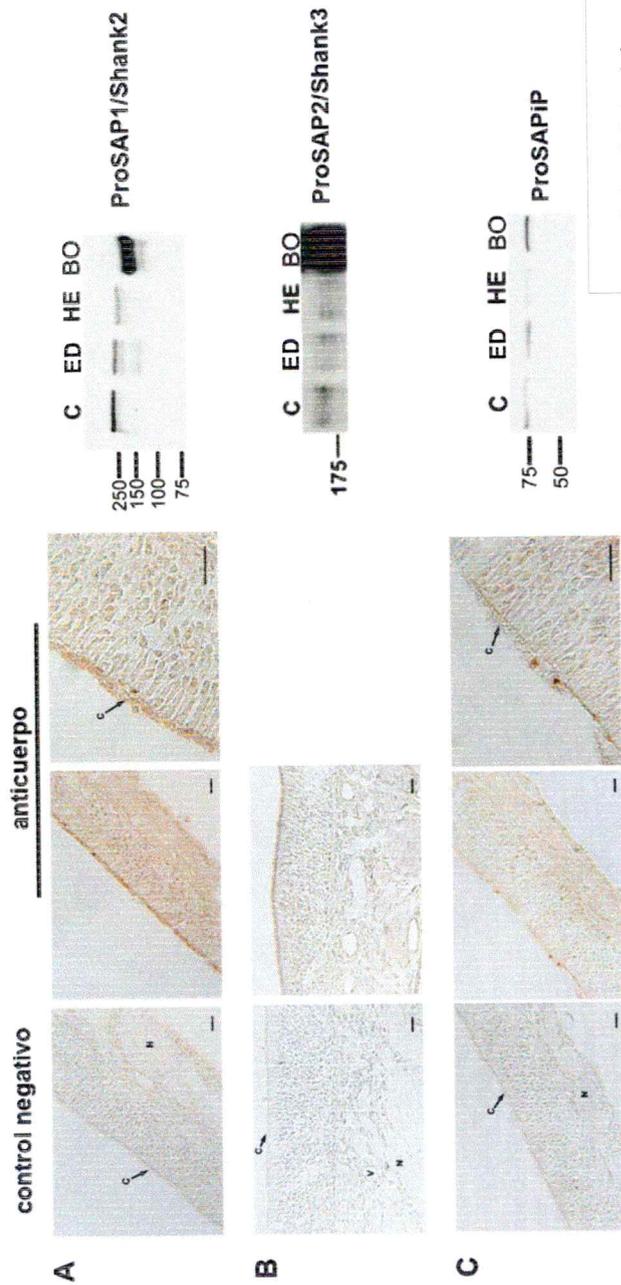
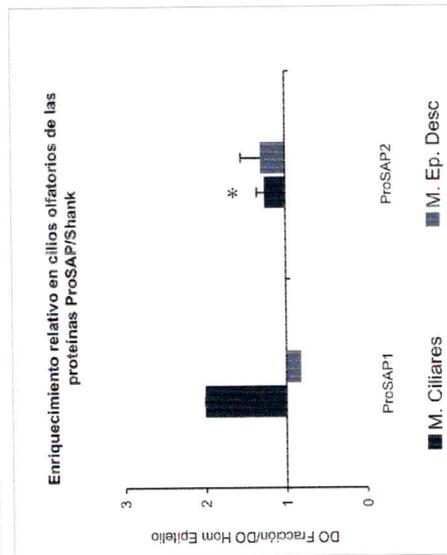


Figura 7. Inmunohistoquímica de cortes de epitelio olfatorio y Western blot utilizando anticuerpos contra proteínas de la familia ProSAPs de proteínas de andamio. **A.** anti-ProSAP1/Shank2 1:1000; **B.** anti-ProSAP2/Shank3 1:1000; **C.** anti-ProSAP1p 1:1000. En las IHQs la barra corresponde a 10 μ m, C: capa ciliar, N: fascículos de axones, V: vénulas. En los Western blots C: membranas ciliares, ED: membranas de epitelio desciliado, HE: homogenizado de epitelio olfatorio, BO: homogenizado de bulbo olfatorio. **D.** Enriquecimiento relativo de cada proteína en cilios y epitelio desciliado con respecto a un homogenizado de epitelio olfatorio.



2001). Debido al interés que ha generado esta proteína andamio como organizadora de complejos multimoleculares, se han hecho esfuerzos por identificar proteínas que interactúan con las ProSAPs. Una de ellas es ProSAPiP (ProSAP interacting Protein, Figura 7C). La tinción para esta proteína en epitelio olfatorio no fue homogénea a lo largo de la capa ciliar, como para ProSAP1/Shank2 y ProSAP2/Shank3, sino que más bien se concentró en puntos determinados de ella, dando el aspecto de manchas positivas, mientras el resto de los cilios no se tiñó (n= 1). También se observó marca en algunos somas en la base del epitelio.

Los Western blot mostraron que la proteína se encontró presente en todas las fracciones obtenidas en la preparación bioquímica de membranas de epitelio olfatorio, sin un enriquecimiento obvio en ninguna de ellas con respecto a las otras (n=1). Su peso molecular es idéntico al observado en el bulbo olfatorio (control positivo).

Así, al menos dos miembros de la familia ProSAP más la proteína ProSAPiP, que interactúa con ellas, han sido encontrados en cilios olfatorios.

II.2 Proteína de andamio Lin-7/Veli/MALS

Lin-7/Veli/MALS está implicada en formar complejos de transducción de señales en unión neuromuscular de *Drosophila* (Bachmann y cols., 2004), y en conjunto con Lin-2/CASK y Lin-10/Mint ha sido implicada en la determinación de la polaridad ápico-basal de los epitelios y la localización de receptores de membrana (Kaech y cols., 1998).

Usando un anticuerpo contra la proteína Lin-7/Veli/MALS (Figura 8A) se observó una clara localización en cilios, pero también en fascículos de axones (n= 4). Experimentos de Western blot (n= 6) mostraron la presencia de dos bandas inmunoreactivas al anticuerpo de alrededor de los 25 kDa; la banda inferior está más enriquecida con respecto a la mayor en todas las fracciones, exceptuando el bulbo olfatorio, en que su abundancia es similar (Figura 8B). El análisis densitométrico mostró que al igual que con la proteína ProSAPiP descrita anteriormente, no hay un enriquecimiento obvio en ninguna de las fracciones estudiadas (Figura 8C). Por otra parte, el enriquecimiento relativo de la banda inferior es de alrededor de cuatro veces (Figura 8 D) con respecto a la banda superior ($p < 0,001$).

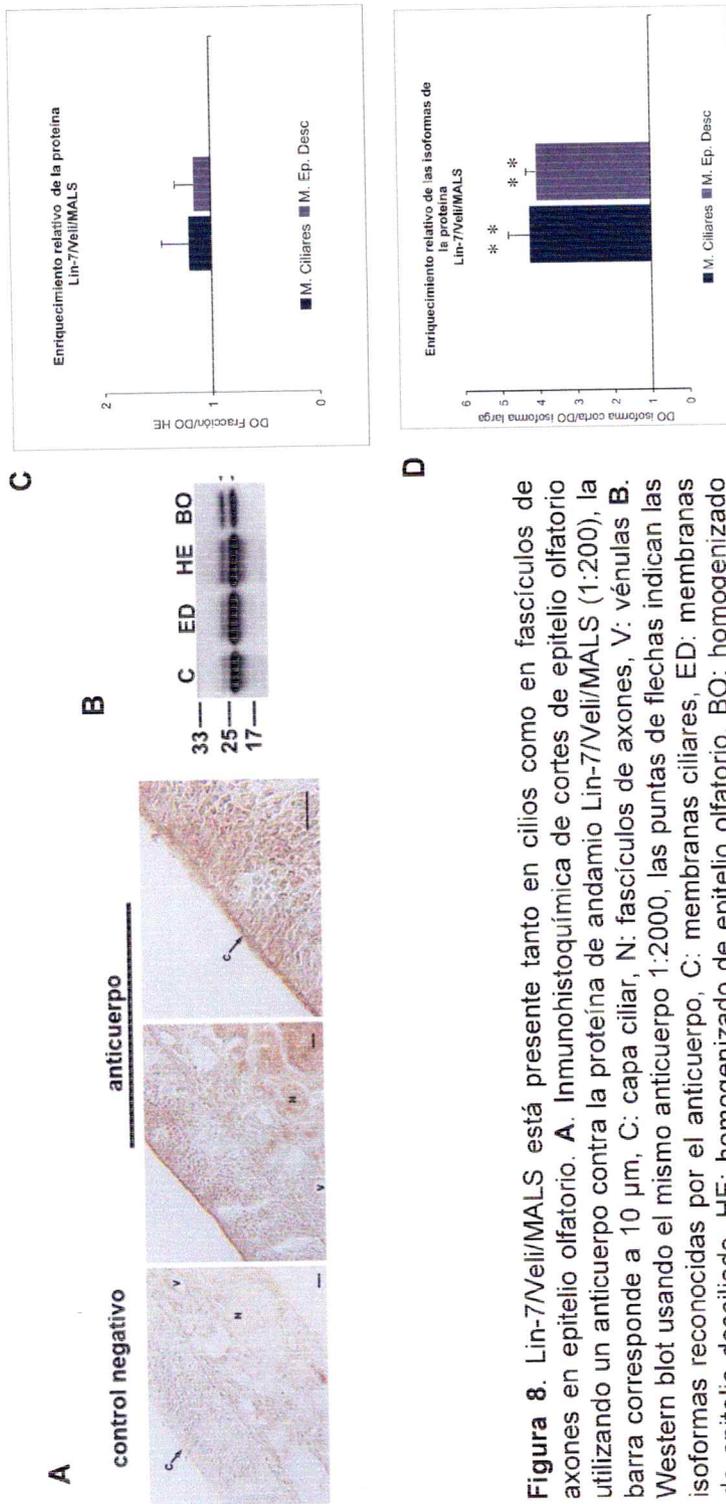


Figura 8. Lin-7/Veli/MALS está presente tanto en cilios como en fascículos de axones en epitelio olfatorio. **A.** Inmunohistoquímica de cortes de epitelio olfatorio utilizando un anticuerpo contra la proteína de andamio Lin-7/Veli/MALS (1:200), la barra corresponde a 10 μ m, C: capa ciliar, N: fascículos de axones, V: vênulas **B.** Western blot usando el mismo anticuerpo 1:2000, las puntas de flechas indican las isoformas reconocidas por el anticuerpo, C: membranas ciliares, ED: membranas de epitelio desciliado, HE: homogenizado de epitelio olfatorio, BO: homogenizado de bulbo olfatorio. **C.** Enriquecimiento relativo de Lin-7/Veli/MALS en epitelio olfatorio. **D.** Cuantificación del enriquecimiento relativo de las bandas observadas en epitelio olfatorio.

II.3 Miembros de la familia MAGuK de proteínas de andamio

Además fueron encontradas proteínas pertenecientes a la familia MAGuK, que se caracterizan por poseer un dominio GuK, como Lin-2/CASK que pertenece a la subfamilia Lin-2 de las MAGuK. Mediante IHQ (Figura 9A), se observó una localización muy evidente de esta proteína alrededor de los fascículos de axones, aunque también se apreció señal en la capa ciliar (n= 4). Análisis por Western blot (Figura 9B), mostraron la presencia de una banda única para Lin-2/CASK tanto en cilios como en epitelio desciliado (n= 6); su peso molecular fue de alrededor de 75 kDa, igual al encontrado en el control positivo (bulbo olfatorio), aunque en este tejido existe una banda adicional sobre 75 kDa (Figura 9B, Western blot superior). Un análisis preliminar mediante Western blot, de todas las fracciones obtenidas desde una preparación de epitelio olfatorio (Figura 4), mostraron que la banda de mayor peso molecular también está presente, pero en las fracciones S1 y S2 de la preparación (Figura 9B, Western blot inferior), correspondientes a proteínas asociadas a membranas no ciliares y proteínas citosólicas.

Por otra parte, se observa un enriquecimiento mayor en la fracción del epitelio desciliado (ED) de la banda de menor peso molecular, debido posiblemente a que la presencia de esta proteína alrededor de los axones fue cuantitativamente mayor que en los cilios. Análisis por densitometría confirman esta observación (Figura 9C, $p < 0,01$).

Debido a su doble localización, la proteína Lin-2/CASK podría estar cumpliendo distintas funciones en el epitelio, lo que concuerda con la diversidad de funciones en las que han sido involucradas.

Por otra parte, muchas de las proteínas andamio contienen dominios PDZ en su estructura. Por ello, también se orientó la búsqueda hacia proteínas que poseen este dominio. Para esto se aprovechó la existencia de un anticuerpo que reconoce específicamente a los dominios PDZ de la subfamilia PSD95/SAP90. Mediante IHQ se observó la localización de la señal en los fascículos de axones (n= 3, Figura 10A). Es importante considerar que el procedimiento para observar la marca de anti-PDZ por medio de IHQ implica hacer un pre-tratamiento a los cortes para exponer el antígeno

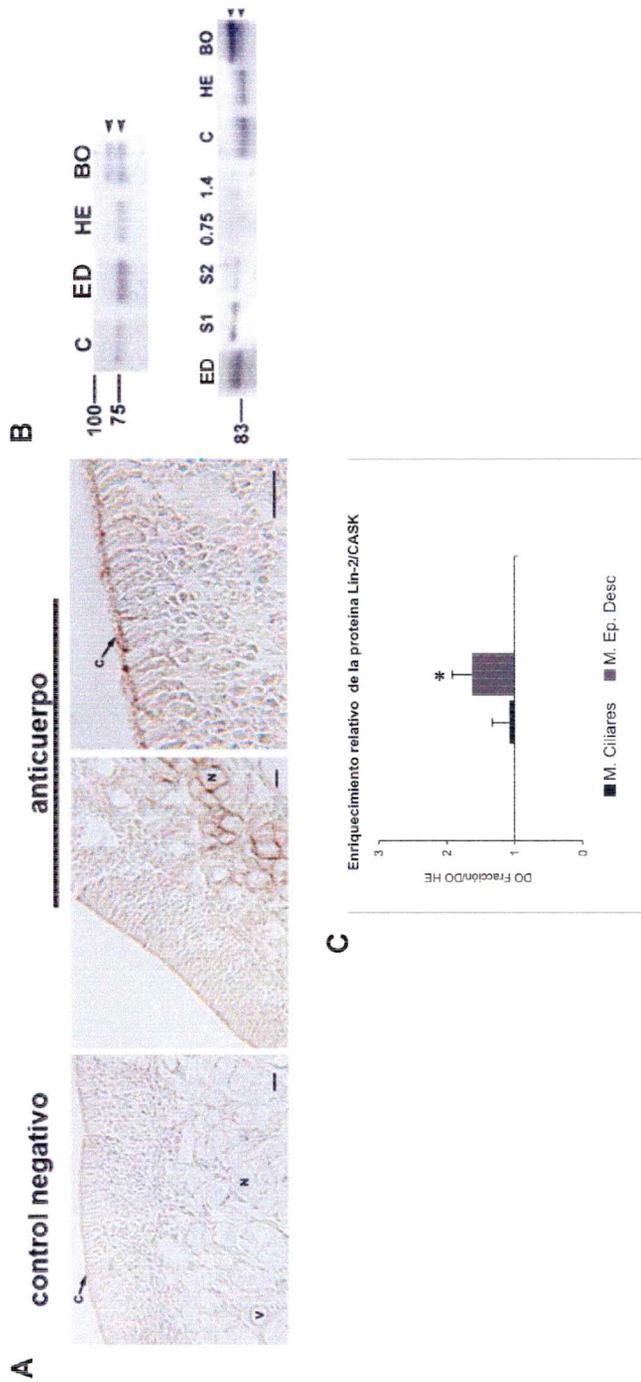


Figura 9. La proteína andamio Lin-2/CASK está presente en epitelio olfatorio. **A.** IHQ utilizando un anticuerpo contra esta proteína (1:200), la señal se concentra en la capa ciliar y alrededor de los fascículos de axones, la barra corresponde a 10 μ m, C: capa ciliar, N: fascículos de axones, V: vénulas. **B.** Western blots confirman que las isoformas de esta proteína se distribuyen de forma diferencial en las distintas fracciones de una preparación bioquímica (Figura 4), las puntas de flechas indican las isoformas reconocidas por el anticuerpo, C: membranas ciliares, ED: membranas de epitelio desciliado, S1 y S2: membranas internas, 0,75 y 1,4: fracciones de sacarosa, HE: homogenizado de epitelio olfatorio, BO: homogenizado de bulbo olfatorio. **C.** Enriquecimiento relativo de Lin-2/CASK en las membranas de epitelio desciliado es significativo ($p < 0,01$).

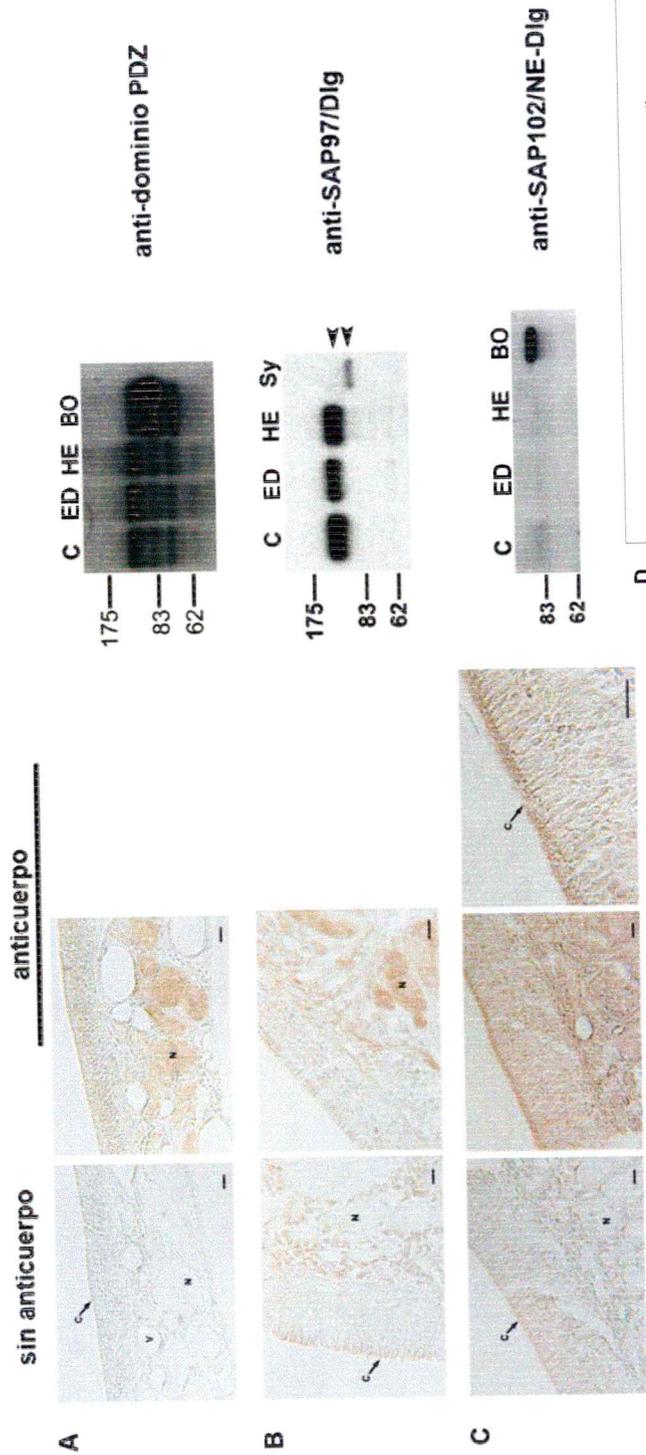


Figura 10. Proteínas de la subfamilia PSD95/SAP90 también están presentes en epitelio olfatorio **A.** anti-dominio PDZ 1:5000; **B.** anti-SAP97/Dlg 1:1000; **C.** anti-SAP102/NE-Dlg 1:500. En las IHQs la barra corresponde a 10 μ m, C: capa ciliar, N: fascículos de axones, V: vénulas. En los Western blots C: membranas ciliares, ED: membranas de epitelio desciliado, HE: homogenizado de epitelio olfatorio, BO: homogenizado de bulbo olfatorio, Sy: synaptosomas. **D.** Cuantificación del enriquecimiento relativo de las proteínas pertenecientes a esta subfamilia

(tratamiento con HCl), ya que el anticuerpo reconoce a una secuencia implicada en la interacción con otras proteínas, por lo que está normalmente enmascarada en el ambiente celular. Experimentos de Western blot mostraron varias bandas entre 70 y 120 kDa, que se observaron en todas las fracciones (n=5). Sin embargo este patrón fue diferente al observado en bulbo olfatorio (control positivo), en donde se vió una señal muy fuerte de alrededor de 83 kDa. No se distinguió un enriquecimiento evidente en ninguna de las fracciones analizadas de epitelio olfatorio (Figura 10A y D)

El motivo por el cual la señal es observada en membranas ciliares mediante Western blot y no por IHQ puede ser por que en cortes de tejido las proteínas que contienen dominios PDZ mantienen el epítotope enmascarado; en cambio, el procedimiento de Western blot denatura la proteína, exponiendo el epítotope.

Se investigó cuál de los miembros de la subfamilia PSD95/SAP90 estaban presentes. Se encontró SAP97/Dlg (Figura 10B, n= 3), pero no SAP93/Chapsyn ni SAP90/PSD95. Anti-SAP97/Dlg mostró una tinción muy parecida a la de anti-PDZ (Figura 10B), es decir, asociada a fascículos de axones. En Western blot, se observó una sola banda de aprox 100-120 kDa, en todas las fracciones de epitelio olfatorio (n=5), la cual es distinta a la encontrada en el control positivo (~ 90 kDa). Una vez más, esta diferencia puede deberse a la existencia de diversas variantes de procesamiento alternativo descritas para esta proteína (Schluter y cols., 2006; Godreau y cols., 2003). Análisis de cuantificación de los Western blot (Figura 10D) no mostraron enriquecimiento relativo en ninguna de las fracciones estudiadas.

A través de IHQ se observó que la señal de SAP102/NE-Dlg (cuarto miembro de esta sub-familia) estaba confinada a la capa ciliar, aunque también fueron teñidos algunos somas (n= 2). Extrañamente, los Western blots no mostraron señal de SAP102/NE-Dlg en membranas ciliares (n= 8), aunque sí el control positivo (bulbo olfatorio, Figura 10C). La explicación de este resultado será detallado en la sección III.

II.4 Estudios de posibles interacciones de las proteínas de andamio ciliares con componentes de la quimiotransducción olfatoria

El paso siguiente consistió estudiar si algunas de las proteínas de andamio encontradas en cilios olfatorios interaccionaba con alguno de los componentes moleculares de la transducción olfatoria. Para esto, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos contra las siguientes proteínas de andamio: ProSAP1/Shank2, ProSAP2/Shank3 y Lin-2/CASK, que claramente se localizaron en cilios olfatorios (Figura 7 y 9). Tanto ProSAP2/Shank3 como Lin-2/CASK fueron exitosamente inmunoprecipitadas (Figura 11). Posteriormente, se estudió si alguno de los componentes de la transducción olfatoria o elementos moduladores de ésta co-inmunoprecipitaban con estas proteínas. La Tabla 2 resume los resultados obtenidos. No se observó co-inmunoprecipitación de ninguna de las proteínas estudiadas, aunque quedaron algunas de las posibles interacciones sin probar.

También se desarrollaron experimentos de inmunoprecipitación utilizando proteínas de la quimiotransducción como ACIII, CNG y CaMKII, aunque sólo ACIII fue inmunoprecipitada con éxito; sin embargo, no fue posible observar interacción de esta proteína con Lin-2/CASK. Futuros experimentos deberían ahondar en el estudio de proteínas de andamio que interaccionen con ACIII.

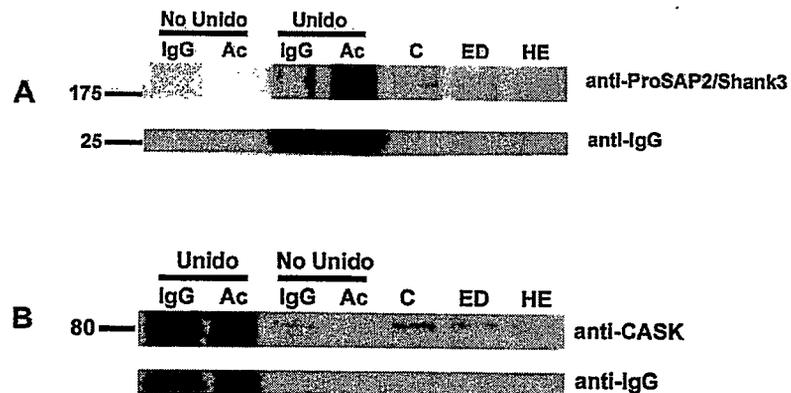


Figura 11. Experimentos representativos de inmunoprecipitaciones utilizando diversas proteínas de andamio. **A.** anti-ProSAP2/Shank3, **B.** anti-Lin-2/CASK. Se utilizaron proteína G-Dynabeads™. Fracción No Unido: corresponde a lo que no se unió a las esferas Dynabeads, Fracción Unido: corresponde a las proteínas que se unieron a las Dynabeads acopladas al anticuerpo específico (Ac) o a suero normal del mismo animal en el que fue hecho el anticuerpo específico (IgG), C: membranas ciliares, ED: membranas epitelio desciliado, HE: homogenizado epitelio olfatorio.

Tabla 2. Resumen de los experimentos de co-inmunoprecipitación realizados con una preparación de cilios olfatorios. OO: inmunoprecipitación exitosa, XX: la proteína no fue inmunoprecipitada, X: No se detectó co-inmunoprecipitación, ?: No hay una inmunoprecipitación evidente. Entre paréntesis se muestra el número de veces que la inmunoprecipitación fue exitosa con respecto al total de veces de realizado el experimento.

	ACIII	Golf	CNG	CaATPasa	CaMKII α	CaM	PDZ	SAP97	CASK	Lin7	ProSAP1	ProSAP2	Actina
ACIII	OO(2/2)	X	X				X		X				
CNG			XX										
CaATPasa			X	?? (2/2)	X	?		X (2/2)	X (2/2)	X		?	
CaMKII α					XX (2/2)								
PDZ	X	X	X (3/4)				OO (4/4)	SI	X	X			X
SAP97	X	X (2/2)	X					OO (2/2)	X	X			
CASK	X	X (2/2)	X (2/2)						OO (2/4)			X	
Lin7										X (2/2)			
ProSAP1											XX		
ProSAP2	X	X	X		X (2/3)	? (1/2)			X			OO (2/4)	? (1/2)

III. Estudio de la presencia de una isoforma de SAP102/NE-Dlg en epitelio olfatorio

Durante estudios preliminares, al inicio de este trabajo de tesis, la preparación de cilios olfatorios utilizando el protocolo de la Figura 1 fue analizada mediante Western blot con un anticuerpo contra SAP102/NE-Dlg, se observó en la fracción ciliar una banda inmunoreactiva cerca de 80 kDa, diferente a la observada en bulbo olfatorio (aproximadamente 100 kDa, Figura 12, n= 4). La señal fue específica, ya que fue bloqueada al utilizar el anticuerpo pre-incubado con el péptido usado como antígeno. Posteriores experimentos de IHQ confirmaron la presencia de SAP102/NE-Dlg en cilios olfatorios, pero no así mediante Western blot de muestras obtenidas desde el protocolo de la Figura 4 (Figura 10C). Para investigar la presencia y localización de esta proteína en el epitelio, todas las fracciones obtenidas desde la preparación de membranas ciliares (Figura 4) fueron estudiadas mediante Western blot, usando el anticuerpo contra SAP102/NE-Dlg. Los resultados obtenidos mostraron la localización de esta proteína en las fracciones livianas de la preparación (S1 y S2, Figura 13A, n= 5). La localización subcelular de SAP102/NE-Dlg fue diferente a ACIII, la que se encontró exclusivamente en la fracción de membranas ciliares (Figura 13B), sugiriendo fuertemente que esta proteína no estaría asociada a membrana ciliar. Al analizar la proteína SAP102/NE-Dlg en el gradiente continuo de sacarosa, se observó que esta proteína flota en una densidad correspondiente a concentraciones de sacarosa entre 0,5 y 0,7 M (n= 3, Figura 14B en rosado, fracciones 2-3), más liviana que las densidades en donde se encuentran los marcadores de cilios como ACIII, G_{olf} y el canal CNG. Más aún, la señal de SAP102/NE-Dlg flota junto a un marcador de membranas internas como es Rab5A (marcador de endosomas tempranos, en marrón), ver figura 14B y C. Así, mientras SAP102/NE-Dlg mediante IHQ se detectó en cilios, en los estudios bioquímicos se vió asociada a un compartimento enriquecido en membranas intracelulares.

La diferencia de peso molecular de SAP102/NE-Dlg en cilios con respecto a la presente en bulbo olfatorio (control positivo), sugería la presencia de una isoforma en epitelio olfatorio. Como no hay antecedentes sobre isoformas de SAP102/NE-Dlg en la literatura, se exploró este punto en mayor detalle.

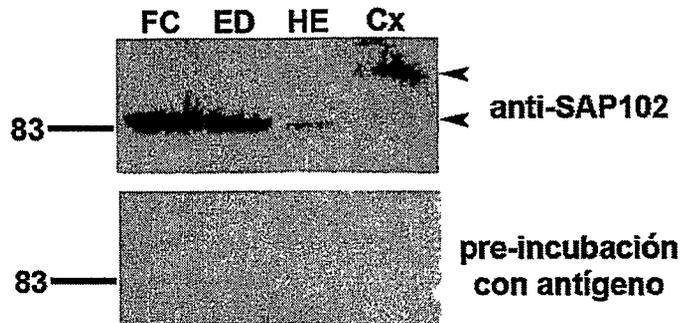


Figura 12. Western blot representativo de una preparación de epitelio olfatorio de rata, utilizando el protocolo de la Figura 1. Se probó un anticuerpo contra SAP102/NE-Dlg (1:500 imagen superior) y el mismo anticuerpo bloqueado con el antígeno correspondiente, en una relación 1:3. Las puntas de flecha indican las bandas reconocidas por el anticuerpo. FC: fracción ciliar, ED: membranas de epitelio desciliado, HE: homogenizado de epitelio olfatorio, Cx: homogenizado de corteza de cerebro.

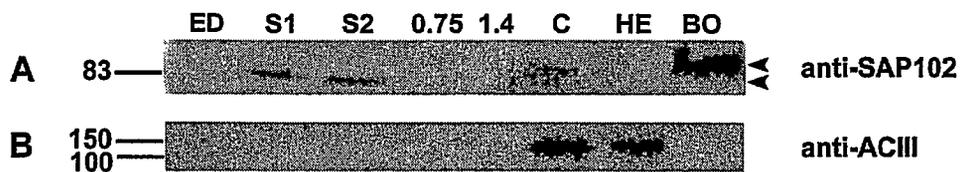


Figura 13. Análisis mediante Western blot de todas las fracciones de una preparación de epitelio olfatorio. A. anti-SAP102/NE-Dlg 1:500, las puntas de flechas indican las bandas reconocidas por este anticuerpo, tanto en epitelio como en bulbo olfatorio. B. Distribución de un marcador de membrana ciliar, anti-ACIII 1:2000.

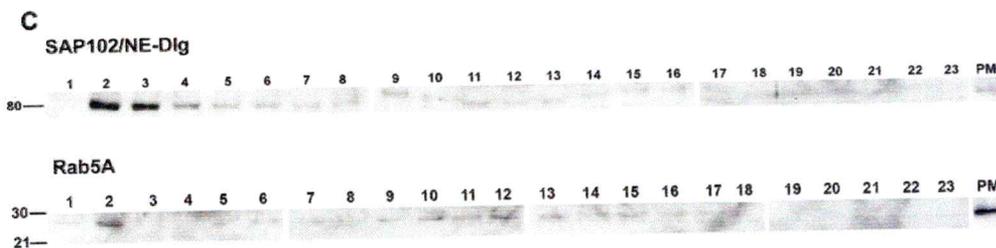
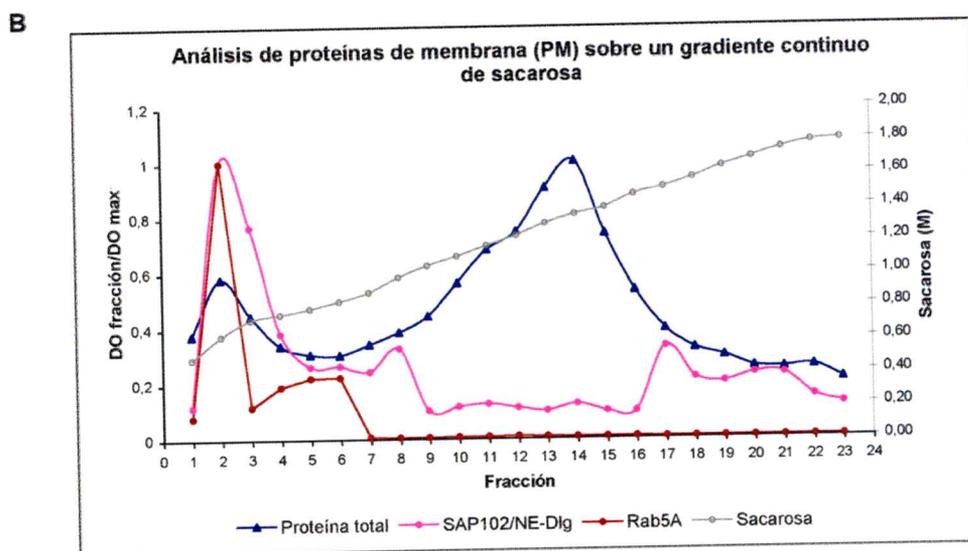
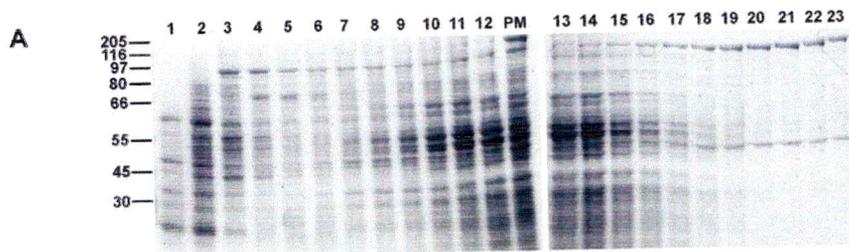
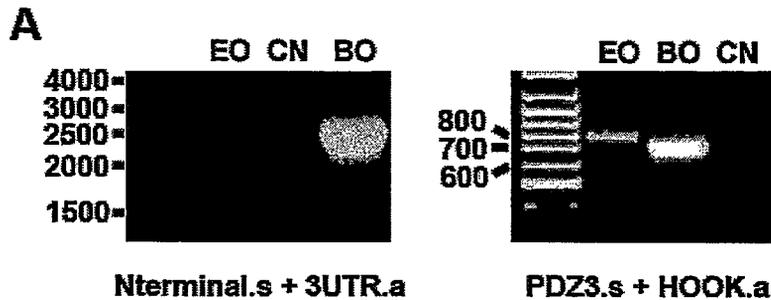


Figura 14. Análisis de la migración de la proteína de andamio SAP102/NE-Dlg sobre un gradiente continuo de sacarosa. **A.** Perfil proteico del gradiente de sacarosa observado mediante tinción Coomassie. **B.** Análisis densitométrico de las fracciones obtenidas desde la gradiente de sacarosa, todas las señales cuantificadas fueron normalizadas con el valor máximo (eje izquierdo), la concentración de sacarosa en cada fracción también fue graficado (eje derecho). **C.** Western blot representativo utilizando anti-SAP102/NE-Dlg 1:500 y Rab5A 1:500 analizadas por densitometría.

III.1 Análisis mediante RT-PCR de la presencia de variantes de procesamiento de SAP102/NE-Dlg en epitelio olfatorio

Para profundizar en el estudio de esta posible isoforma, se realizaron experimentos de RT-PCR utilizando un cDNA generado a partir de mRNA de epitelio olfatorio. Se diseñaron partidores específicos, para amplificar distintas partes de SAP102/NE-Dlg. Como control positivo se utilizó el cDNA obtenido desde bulbo olfatorio. Como se observa en la Figura 15A, el análisis mediante electroforesis sobre geles de agarosa de los productos de RT-PCR utilizando los partidores Nterm.s, 3UTR.a y PDZ3.s, HOOK.a (ver Tabla A en Materiales y Métodos) mostró la presencia de fragmentos la SAP102/NE-Dlg en epitelio olfatorio que poseen un número de pares de bases distinto al visto en el control positivo (bulbo olfatorio). Por este motivo se decidió subclonar los fragmentos correspondientes a los productos de RT-PCR utilizando el par de partidores Nterm.s, 3UTR.a, para estudiar si corresponderían a variantes de procesamiento. Se eligieron estos pares de partidores ya que el producto amplificado es el más largo y representa casi la totalidad del cDNA de la SAP102/NE-Dlg.

Fueron aislados y secuenciados cuatro clones, los que fueron comparados mediante el programa de alineamiento de proteínas CLUSTALW (www.expasy.org), con la secuencia descrita de SAP102/NE-Dlg en cerebro (GenBank U50147, Muller y cols., 1996, Figura 15B). Los clones tienen las siguientes características: en todos ellos el exón 2 fue removido (54 pares de bases que corresponden a 18 aminoácidos, antes del inicio del dominio PDZ1), además, en tres de ellos también el exón 16 fue removido (43 pb que corresponden a 14 aminoácidos, dentro de la secuencia Hook, que está entre el dominio SH3 y GuK) (Figura 15B). En los dos clones restantes además de ser removido el exón 2, contienen un inserto de 100 pb, empalmado justo después del exón 14 (Figura 15B). Una búsqueda en la secuencia genómica de SAP102/NE-Dlg de rata (GenBank U53367) dio como resultado la presencia de este inserto entre los exones 13 y 14; la forma en que los exones son procesados para cada variante es mostrada en la Figura 15C. Los clones al ser traducidos utilizando el programa TRANSLATE (www.expasy.org) dieron como resultado dos isoformas de SAP102/NE-Dlg, una de aproximadamente 90 kDa, correspondiente a la isoforma carente de los exones 2 y 16, y la otra truncada (carente del dominio GuK) con un peso molecular de



B

SAP102	cerebro	MHKHQHCKCKPECYEVTRLAALRRLEPPGYGDWQVDPDYGPSGGNGASSGYGGYSSQTLP	60
Clon13	SAP102eo	-----RLAALRRLEPPGYGDWQVDPDYGPSGGNGASSGYGGYSSQTLP	43
Clon10	SAP102eo	-----TRLAALRRLEPPGYGDWQVDPDYGPSGGNGASSGYGGYSSQTLP	44
Clon15	SAP102eo	-----TRLAALRRLEPPGYGDWQVDPDYGPSGGNGASSGYGGYSSQTLP	44
Clon5	SAP102eo	-----TRLAALRRLEPPGYGDWQVDPDYGPSGGNGASSGYGGYSSQTLP	44
Clon6	SAP102eo	-----LAALRRLEPPGYGDWQVDPDYGPSGGNGASSGYGGYSSQTLP	42
SAP102	cerebro	SQAGATPTPRTKAKLIPTGRDVGVPVPPKVPVGKNTPKLNGSGPSWWPECTCTNRDWYEQ	120
Clon13	SAP102eo	SQAGATPTPRTKAKLIPTGRDVGVPVPPKVPVGKNTPKLNGSGPSWWPECTCTNRDWYEQ-	102
Clon10	SAP102eo	SQAGATPTPRTKAKLIPTGRDVGVPVPPKVPVGKNTPKLNGSGPSWWPECTCTNRDWYEQ-	103
Clon15	SAP102eo	SQAGATPTPRTKAKLIPTGRDVGVPVPPKVPVGKNTPKLNGSGPSWWPECTCTNRDWYEQ-	103
Clon5	SAP102eo	SQAGATPTPRTKAKLIPTGRDVGVPVPPKVPVGKNTPKLNGSGPSWWPECTCTNRDWYEQ-	103
Clon6	SAP102eo	SQAGATPTPRTKAKLIPTGRDVGVPVPPKVPVGKNTPKLNGSGPSWWPECTCTNRDWYEQ-	101
SAP102	cerebro	SPAPLLVNPEALEPSL SVNGSDGMFKYEEIVLERGNSGLGFSIAGGIDNPHVPDDPGIFI	180
Clon13	SAP102eo	-----VNGSDGMFKYEEIVLERGNSGLGFSIAGGIDNPHVPDDPGIFI	145
Clon10	SAP102eo	-----VNGSDGMFKYEEIVLERGNSGLGFSIAGGIDNPHVPDDPGIFI	146
Clon15	SAP102eo	-----VNGSDGMFKYEEIVLERGNSGLGFSIAGGIDNPHVPDDPGIFI	146
Clon5	SAP102eo	-----VNGSDGMFKYEEIVLERGNSGLGFSIAGGIDNPHVPDDPGIFI	146
Clon6	SAP102eo	-----VNGSDGMFKYEEIVLERGNSGLGFSIAGGIDNPHVPDDPGIFI	144
SAP102	cerebro	TKIIPGGAAAMDGR LGVND CVLRVNEVDVSEVVHSRAVEALKEAGPVVRLV VRRRQPPPE	240
Clon13	SAP102eo	TKIIPGGAAAMDGR LGVND CVLRVNEVDVSEVVHSRAVEALKEAGPVVRLV VRRRQPPPE	205
Clon10	SAP102eo	TKIIPGGAAAMDGR LGVND CVLRVNEVDVSEVVHSRAVEALKEAGPVVRLV VRRRQPPPE	206
Clon15	SAP102eo	TKIIPGGAAAMDGR LGVND CVLRVNEVDVSEVVHSRAVEALKEAGPVVRLV VRRRQPPPE	206
Clon5	SAP102eo	TKIIPGGAAAMDGR LGVND CVLRVNEVDVSEVVHSRAVEALKEAGPVVRLV VRRRQPPPE	206
Clon6	SAP102eo	TKIIPGGAAAMDGR LGVND CVLRVNEVDVSEVVHSRAVEALKEAGPVVRLV VRRRQPPPE	204
SAP102	cerebro	TIMEVNLLKGP KGLGFSIAGGIGNQHIPGDNSIYITKIIEGGAAQKDGR LQIGDRLLAVN	300
Clon13	SAP102eo	TIMEVNLLKGP KAWVFSIAGGIGNQHIPGDNSIYITKIIEGGAAQKDGR LQIGDRLLAVN	265
Clon10	SAP102eo	TIMEVNLLKGP KGLGFSIAGGIGNQHIPGDNSIYITKIIEGGAAQKDGR LQIGDRLLAVN	266
Clon15	SAP102eo	TIMEVNLLKGP KGLGFSIAGGIGNQHIPGDNSIYITKIIEGGAAQKDGR LQIGDRLLAVN	266
Clon5	SAP102eo	TIMEVNLLKGP KGLGFSIAGGIGNQHIPGDNSIYITKIIEGGAAQKDGR LQIGDRLLAVN	266
Clon6	SAP102eo	TIMEVNLLKGP KGLGFSIAGGIGNQHIPGDNSIYITKIIEGGAAQKDGR LQIGDRLLAVN	264
SAP102	cerebro	NFNLQDVRHEEAVASLKN TSDMVYLK VAKPGSLHLNDMYAPPDYASTFTALADNHISHNS	360
Clon13	SAP102eo	NFNLQDVRHEEAVASLKN TSDMVYLK VAKPGSLHLNDMYAPPDYASTFTALADNHISHNS	325
Clon10	SAP102eo	NFNLQDVRHEEAVASLKN TSDMVYLK VAKPGSLHLNDMYAPPDYASTFTALADNHISHNS	326
Clon15	SAP102eo	NFNLQDVRHEEAVASLKN TSDMVYLK VAKPGSLHLNDMYAPPDYASTFTALADNHISHNS	326
Clon5	SAP102eo	NFNLQDVRHEEAVASLKN TSDMVYLK VAKPGSLHLNDMYAPPDYASTFTALADNHISHNS	326
Clon6	SAP102eo	NFNLQDVRHEEAVASLKN TSDMVYLK VAKPGSLHLNDMYAPPDYASTFTALADNHISHNS	324

SAP102 cerebro SLGYLGAVESKVITYPAPPQVPTRYSPIPRHMLAEEEDFTREPRKIIILHKGSTGLGFNIVG 420
 Clon13 SAP102eo SLGYLGAVESKVITYPAPPQVPTRYSPIPRHMLAEEEDFTREPRKIIILHKGSTGLGFNIVG 385
 Clon10 SAP102eo SLGYLGAVESKVITYPAPPQVPTRYSPIPRHMLAEEEDFTREPRKIIILHKGSTGLGFNIVG 386
 Clon15 SAP102eo SLGYLGAVESKVITYPAPPQVPTRYSPIPRHMLAEEEDFTREPRKIIILHKGSTGLGFNIVG 386
 Clon5 SAP102eo SLGYLGAVESKVITYPAPPQVPTRYSPIPRHMLAEEEDFTREPRKIIILHKGSTGLGFNIVG 386
 Clon6 SAP102eo SLGYLGAVESKVITYPAPPQVPTRYSPIPRHMLAEEEDFTREPRKIIILHKGSTGLGFNIVG 384

SAP102 cerebro GEDGEGIFVSVFILAGGPADLSGELRRGDRIILSVNGVNLRNATHEQAAAAALKRAGQSVTIV 480
 Clon13 SAP102eo GEDGEGIFVSVFILAGGPADLSGELRRGDRIILSVNGVNLRNATHEQAAAAALKRAGQSVTIV 445
 Clon10 SAP102eo GEDGEGIFVSVFILAGGPADLSGELRRGDRIILSVNGVNLRNATHEQAAAAALKRAGQSVTIV 446
 Clon15 SAP102eo GEDGEGIFVSVFILAGGPADLSGELRRGDRIILSVNGVNLRNATHEQAAAAALKRAGQSVTIV 446
 Clon5 SAP102eo GEDGEGIFVSVFILAGGPADLSGELRRGDRIILSVNGVNLRNATHEQAAAAALKRAGQSVTIV 446
 Clon6 SAP102eo GEDGEGIFVSVFILAGGPADLSGELRRGDRIILSVNGVNLRNATHEQAAAAALKRAGQSVTIV 444

SAP102 cerebro AQYRPEEYSRFESKIHDLREQMMNSSMSSGSGSLRTSEKRSLYVRALFDYDRTRDSCLEPS 540
 Clon13 SAP102eo AQYRPEEYSRFESKIHDLREQMMNSSMSSGSGSLRTSEKRSLYVRALFDYDRTRDSCLEPS 505
 Clon10 SAP102eo AQYRPEEYSRFESKIHDLREQMMNSSMSSGSGSLRTSEKRSLYVRALFDYDRTRDSCLEPS 506
 Clon15 SAP102eo AQYRPEEYSRFESKIHDLREQMMNSSMSSGSGSLRTSEKRSLYVRALFDYDRTRDSCLEPS 506
 Clon5 SAP102eo AQYRPEEYSRFESKIHDLREQMMNSSMSSGSGSLRTSEKRSLYVRALFDYDRTRDSCLEPS 506
 Clon6 SAP102eo AQYRPEEYSRFESKIHDLREQMMNSSMSSGSGSLRTSEKRSLYVRALFDYDRTRDSCLEPS 504

SAP102 cerebro QGLSFSYGDILHVINASDDEWQARLVTPHGESEQIGVIPSKKRVEKKERARLKTVKFHA 600
 Clon13 SAP102eo QGLSFSYGDILHVINASDDEWQARLVTPHGESEQIGVIPSKKRVEKKERARLKTVKFHA 565
 Clon10 SAP102eo QGLSFSYGDILHVINASDDEWQARLVTPHGESEQIGVIPSKKRVEKKERARLKTVKFHA 566
 Clon15 SAP102eo QGLSFSYGDILHVINASDDEWQARLVTPHGESEQIGVIPSKKRVEKKERARLKTVKFHA 566
 Clon5 SAP102eo QGLSFSYGDILHVINASDDEWQARLVTPHGESEQIGVIPSKKRVEKKERARLKTVKFHA 566
 Clon6 SAP102eo QGLSFSYGDILHVINASDDEWQARLVTPHGESEQIGVIPSKKRVEKKERARLKTVKFHA 564

SAP102 cerebro RTGMIESNRDFPGLSDDYYGAKNLKGVTSNTSDSESSSIQGEDAILSYEPVTRQEIHYAR 660
 Clon13 SAP102eo RTGMIESNRDFPGLSDDYYGAKNLK-----GQEDAILSYEPVTRQEIHYAR 611
 Clon10 SAP102eo RTGMIESNRDFPGLSDDYYGAKNLK-----GQEDAILSYEPVTRQEIHYAR 612
 Clon15 SAP102eo RTGMIESNRDFPGLSDDYYGAKNLK-----GQEDAILSYEPVTRQEIHYAR 612
 Clon5 SAP102eo RTGMIESNR----- 589
 Clon6 SAP102eo RTGMIESNR----- 587

SAP102 cerebro PVIILGPMKDRVNDLISEFPHKFGSCVPHTTRPRRDNEVDGQDYHFVVSREQMEKDIQD 720
 Clon13 SAP102eo PVIILGPMKDRVNDLISEFPHKFGSCVPHTTRPRRDNEVDGQDYHFVVSREQMEKDIQD 671
 Clon10 SAP102eo PVIILGPMKDRVNDLISEFPHKFGSCVPHTTRPRRDNEVDGQDYHFVVSREQMEKDIQD 672
 Clon15 SAP102eo PVIILGPMKDRVNDLISEFPHKFGSCVPHTTRPRRDNEVDGQDYHFVVSREQMEKDIQD 672
 Clon5 SAP102eo -----
 Clon6 SAP102eo -----

SAP102 cerebro NKFIEAGQFNDNLYGTSIQSVRAVAERGKHCILDVSGNAIKRLQQAQLYPIAIFIKPKSI 780
 Clon13 SAP102eo NKFIEAGQFNDNLYGTSIQSVRAVAERGKHCILDVSGNAIKRLQQAQLYPIAIFIKPKSI 731
 Clon10 SAP102eo NKFIEAGQFNDNLYGTSIQSVRAVAERGKHCILDVSGNAIKRLQQAQLYPIAIFIKPKSI 732
 Clon15 SAP102eo NKFIEAGQFNDNLYGTSIQSVRAVAERGKHCILDVSGNAIKRLQQAQLYPIAIFIKPKSI 732
 Clon5 SAP102eo -----
 Clon6 SAP102eo -----

SAP102 cerebro EALMEMNRRQTYEQANKIFDKAMKLEQEFGEYFTAI VQGDSLEEI YNKIKQIIEQDSGHY 840
 Clon13 SAP102eo EALMEMNRRQTYEQANKIFDKAMKLEQEFGEYFTAI VQGDSLEEI YNKIKQIIEQDSGHY 791
 Clon10 SAP102eo EALMEMNRRQTYEQANKIFDKAMKLEQEFGEYFTAI VQGDSLEEI YNKIKQIIEQDSGHY 792
 Clon15 SAP102eo EALMEMNRRQTYEQANKIFDKAMKLEQEFGEYFTAI VQGDSLEEI YNKIKQIIEQDSGHY 792
 Clon5 SAP102eo -----
 Clon6 SAP102eo -----

SAP102 cerebro IWVPSPEKL 849
 Clon13 SAP102eo IWVPS---- 796
 Clon10 SAP102eo IWVPS---- 797
 Clon15 SAP102eo IWVPS---- 797
 Clon5 SAP102eo ----- SIKTKRKKSFRLSRKFFPYKSKENMAQEKSIQERLPWVK 614
 Clon6 SAP102eo ----- SIKTKRKKSFRLSRKFFPYKSKENMAQEKSIQERLPWVK 612

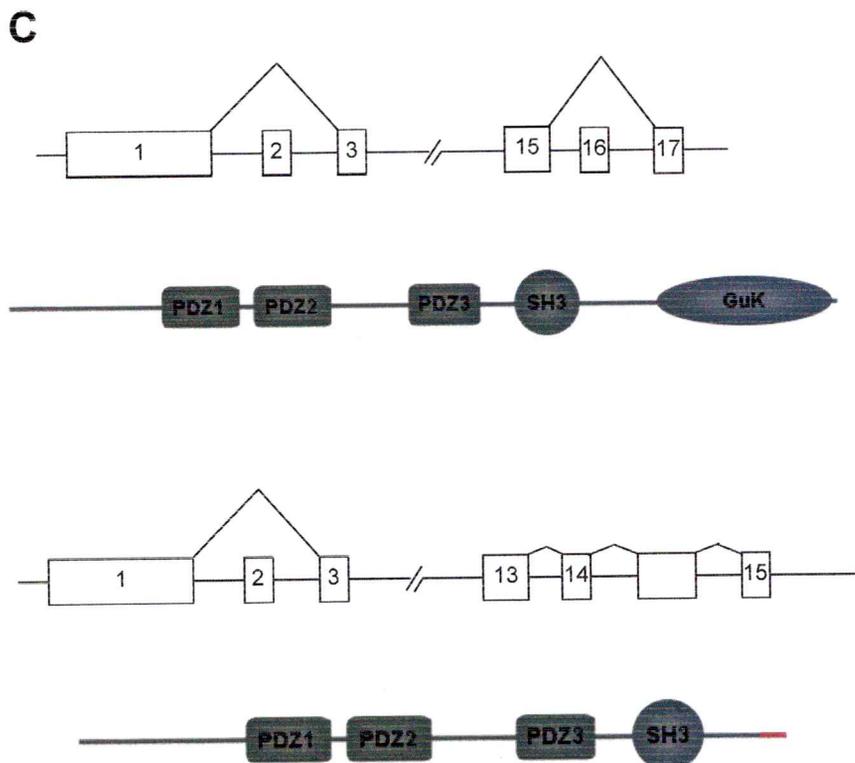


Figura 15. Identificación mediante RT-PCR de al menos dos isoformas de SAP102/NE-Dlg expresadas en epitelio olfatorio de rata. **A.** Análisis sobre geles de agarosa de los productos de RT-PCR obtenidos al utilizar los partidores especificados nombrados en la figura (ver Tabla A, Materiales y Métodos). EO: cDNA de epitelio olfatorio, CN: control negativo, BO: cDNA de bulbo olfatorio. **B.** Posteriormente, estos productos de PCR fueron subclonados y cinco clones (SAP102eo) obtenidos fueron analizados mediante secuenciación y alineamiento con la SAP102/NE-Dlg neuronal (GenBank U50147). Las líneas continuas corresponde a los dominios PDZ, línea segmentada al dominio SH3 y línea punteada al dominio GuK de la SAP102/NE-Dlg. Con un asterisco es destacada la zona donde se produce el empalme del exón (entre el exón 14 y 15) no descrito con anterioridad. Y en rojo se destaca la secuencia aminoacídica de este exón. Encerrado en un cuadrado está en exón 2 y 16. **C.** Esquema del procesamiento alternativo producido en el RNA mensajero de SAP102/NE-Dlg en epitelio olfatorio y sus respectivos productos proteicos. El empalme de un nuevo exón produce una proteína truncada, carente del dominio GuK. En rojo se destaca la secuencia del exón.

aproximadamente 80 kDa (Figura 15C), que corresponde a los clones sin el exón 2 y el exón empalmado entre los exones 14 y 15.

Estos resultados muestran la presencia de variantes de procesamiento alternativo de SAP102/NE-Dlg en epitelio olfatorio, es decir, de isoformas, al menos una de las cuales es reconocida por el anticuerpo anti-SAP102/NE-Dlg utilizado en los experimentos de Western blot.

III.2 Determinación de la secuencia aminoacídica de la(s) isoforma(s) de SAP102/NE-Dlg presente(s) en epitelio olfatorio

Para determinar si alguna de las variantes de SAP102/NE-Dlg encontrada en epitelio olfatorio era finalmente traducida, fueron analizadas muestras de proteínas provenientes de una preparación de epitelio olfatorio (fracciones S1 y S2, Figura 4) mediante geles bidimensionales. Las muestras luego de ser separadas sobre un gradiente de pH entre 3 y 11, fueron sometidas a electroforesis sobre geles de poliacrilamida. Algunos de los geles fueron teñidos con Coomassie o plata para la detección de proteína total, otros fueron sometidos a Western blot y probados con un anticuerpo contra SAP102/NE-Dlg (Figura 16A). Utilizando el programa PDQuest™ de BioRAD se superpusieron las señales del Western blot con los puntos en los geles teñidos con plata ó azul de Coomassie (Figura 16B). Los puntos de los geles fueron recortados y analizados mediante espectrometría de masas. Los fragmentos peptídicos fueron analizados utilizando bases de datos asociados a este método. Un análisis preliminar de los resultados obtenidos mostró que los péptidos identificados y analizados no correspondían a ninguna de las isoformas de SAP102/NE-Dlg observada en epitelio olfatorio. Por lo tanto, quedó pendiente la tarea de cuál de las isoformas de SAP102/NE-Dlg, encontradas por medio de RT-PCR, está presente en epitelio olfatorio.

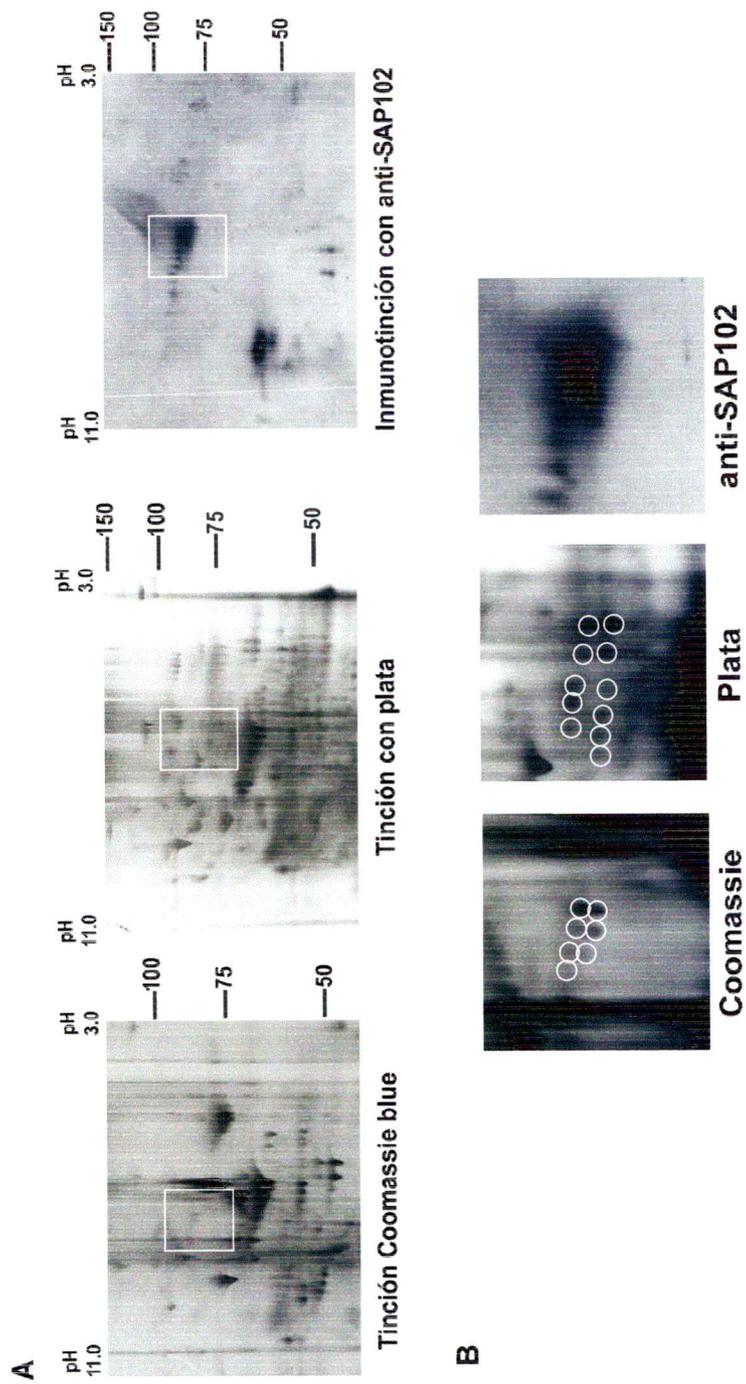


Figura 16. Análisis, utilizando geles bidimensionales, de las fracciones S1 y S2 de una preparación de epitelio olfatorio. **A.** Son mostrados geles teñidos con plata, coomassie y el inmunoblot. Se seleccionó la zona en donde se concentra la señal vista por anti-SAP102/NE-Dlg 1:500. **B.** Se muestra un aumento de la zona seleccionada, además se marcaron los puntos que fueron cortados desde los geles y posteriormente analizados por espectrometría de masas.

DISCUSIÓN

I. Estrategias para la búsqueda de proteínas de andamio

I.1 Preparación bioquímica de membranas ciliares y Western blot

Durante mucho tiempo se utilizó un método de preparación de membranas que consistió en desprender los cilios desde el botón dendrítico, usando altas concentraciones de calcio (Anholt y cols., 1986). Así, los cilios desprendidos lograban mantener su estructura, como fue mostrado mediante microscopía electrónica, observándose su característica forma larga y delgada, además de vesículas membranosas como resultado del desprendimiento de parte de la membrana desde los cilios (Anholt y cols., 1986; Schmidt, 1991). Sin embargo, cómo las células poseen proteasas dependientes de calcio, era posible que este método de desciliación comprometiera tanto la integridad como la función de los componentes moleculares de la cascada.

Posteriormente, fue desarrollado otro tipo de método de desciliado, que consistió simplemente en agitar los epitelios inmersos en una solución fisiológica (solución salina/HEPES, pH 7,4), sin agregar calcio extra. Esta preparación conserva todas las características de enriquecimiento de membranas y mantenimiento de la actividad de enzimas como la ACIII (Washburn y cols., 2002) (Figura 2). Sin embargo, no era posible descartar el arrastre de proteínas o membranas no ciliares, pertenecientes por ejemplo a membranas intracelulares, plasmáticas pero de origen somático o axonal, además de contaminación por proteínas solubles atrapadas en los compartimentos membranosos.

Para desarrollar el presente estudio, era fundamental contar con una preparación lo más enriquecida en membranas ciliares y pura posible. Por ello, el primer paso fue aumentar la pureza de la preparación de cilios descrita en la literatura, para lo cual se empleó ultracentrifugación a equilibrio sobre gradientes continuos de sacarosa, para separar componentes subcelulares según su densidad. Estos experimentos mostraron que una suspensión de cilios (S, Figura 2) muestra la presencia de dos picos de proteína (Figura 3A): uno liviano (0,6 M sacarosa) y otro pesado (1,1-1,5 M sacarosa). La mayor cantidad de proteínas ciliares se encontró entre

los dos picos de proteínas totales (0,75-1,35 M de sacarosa, Figura 3B, C). Por otra parte, el pico liviano estaba enriquecido en Rab5A, una proteína mayoritariamente asociada a endosomas tempranos (Bucci y cols., 1994, Figura 3B, C).

De este modo, la fracción de membranas cargada sobre el gradiente de sacarosa estaba compuesta por dos tipos de poblaciones membranosas, una más pesada que contiene parte de las proteínas ciliares y otra más liviana, asociada a membranas internas. Estos experimentos mostraron que es posible separar una fracción enriquecida en membranas ciliares. Con estos antecedentes se procedió a modificar el protocolo obtenido de la literatura para la preparación de membranas ciliares, lo que consistió en agregar una fase de sacarosa de 0,75 M sobre el colchón de 1,4 M (Figura 4).

Las membranas ciliares obtenidas de esta manera muestran un enriquecimiento en proteínas propias de los cilios olfatorios, tales como ACIII, G_{olf} y el canal CNG, pero carecía de otras pertenecientes a membranas internas como Rab5A (Figura 5). El enriquecimiento de nuestra preparación en membranas ciliares ha sido corroborado a través de experimentos electrofisiológicos. Membranas ciliares incorporadas en bicapas lipídicas revelaron la presencia de canales de potasio dependientes de calcio, los mismos que fueron previamente identificados en registros de patch clamp en fragmentos de membranas escindidos directamente de cilios olfatorios (Delgado y cols., 2003). Es aceptado que canales de K^+ activados por Ca^{2+} participan en la respuesta inhibitoria a odorantes (Morales y cols., 1994). Sin embargo, ni con patch clamp ni en bicapas se observaron canales dependientes de voltaje en la membrana ciliar (Castillo, 2005). No se espera que los cilios contengan dicho tipo de canales, porque no tienen relación alguna con la transducción; como en los organelos especializados en transducción, se piensa que los cilios sólo contienen proteínas que participan en este proceso. Por otro lado, estudios de Western blot tampoco detectaron presencia de canales de sodio en la fracción de membranas ciliares, los cuáles sí estaban presentes en membranas de epitelio desciliado y en homogenizados de cerebro (Castillo y cols., 2005).

I.2 Estudios de localización de proteínas de andamio en cilios olfatorios a través de Inmunohistoquímica (IHQ)

Los experimentos de IHQ cumplieron el objetivo de complementar los resultados de Western blot, ya que nos entregaron información de la localización *in situ* de las proteínas estudiadas.

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron cortes coronales de la zona del septum del epitelio olfatorio, ya que esta zona es fácilmente manejable. No fueron utilizadas las turbinas, porque éstas habrían requerido una fase de decalcificación de varios días, lo que podría afectar a la integridad del epítotope, además de requerir un manejo y equipamiento diferentes.

Como se comentó en la primera parte de la introducción, el epitelio se puede dividir en cuatro zonas de expresión diferencial de receptores olfatorios. Al hacer IHQ sólo con la zona del septum, no existe una representación total del tejido. De este modo, no se puede descartar que las proteínas que no fueron observadas mediante IHQ pero sí en Western blot, podrían localizarse en zonas funcionales que no se encuentran en el septum.

También fueron probados dos tipos de inclusión de la muestra, uno sobre una resina para congelamiento y otro de inclusión en parafina. Este último resultó ser desventajoso ya que en todos los casos, excepto para anti-ACIII, la inmunoreactividad se perdió. De esta manera, se estimó que los cortes congelados son los más aptos para desarrollar experimentos de IHQ en epitelio olfatorio. Además, se utilizaron varios métodos de exposición del antígeno, ya que algunos estaban enmascarados en los cilios olfatorios, es decir, existiría un impedimento estérico para el acceso del anticuerpo al epítotope, más aún si éste se encuentra cerca o dentro de los dominios de interacción o en secuencias reconocidas por un dominio.

Por otra parte, como se discute más adelante, las tinciones observadas en la capa ciliar pueden ser de dos tipos; una que corresponde a una franja importante sobre el límite superior del epitelio (Figuras 6, 7, 9 y 11) y otra mucho más restringida, que se observa con alta magnificación (Figura 10). La primera se clasifica como tinción ciliar debido a que los cilios son extremadamente delgados (0,2 a 0,25 μm de diámetro en ratas, Schild y Restrepo, 1998) y forman una intrincada red, no pudiendo ser resuelta su estructura mediante microscopía de luz, observándose como una franja teñida. La

segunda podría corresponder a tinción asociada a membranas de los botones dendríticos y/o extremo superior de la dendrita, mayoritariamente.

II. Proteínas de andamio

Durante el desarrollo de esta tesis se logró identificar diversas proteínas de andamio en cilios olfatorios, que cumplen diversas funciones en otros tipos celulares. Sin embargo, ¿cuál podría ser el papel que cumplen estas proteínas en la quimiotransducción?

Se procederá a discutir las proteínas de andamio encontradas y sus posibles papeles en la quimiotransducción olfatoria.

II.1 Presencia de proteínas de la familia ProSAP

Fueron encontradas en cilios olfatorios las proteínas de andamio ProSAP1/Shank2, ProSAP2/Shank3 y una proteína que interacciona con las ProSAPs, llamada ProSAPiP (Figura 7). Todas ellas mostraron localización en cilios, aunque mediante Western blot fueron encontradas también en la fracción de epitelio desciliado; esto se pudo deber a que una cantidad importante de estas proteínas se encontraban en tráfico intracelular y que sus epítopes no estaban accesibles al anticuerpo en la IHQ. Otra posibilidad es que algo de los cilios quedara en la fracción de epitelio desciliado. Sin embargo, la ausencia de ACIII en esta fracción en los Western blot (Figura 5A) sugiere que la contaminación por cilios es extremadamente baja. Por otra parte, al cuantificar las señales de Western blot se observa que no hay enriquecimiento de estas proteínas en los cilios con respecto a un homogenizado de epitelio olfatorio (Figura 8), lo que indica que además de en cilios, estas proteínas están en otras zonas del epitelio.

Tanto ProSAP1/Shank2 como ProSAP2/Shank3 presentan un peso molecular distinto al visto en un homogenizado de cerebro (control positivo), una observación que no es extraña, considerando las distintas variantes de procesamiento que tienen estas proteínas (Lim y cols., 1999). También mediante Western blot se observó que el enriquecimiento de ProSAP2/Shank3 en cilios no es mayor que en la fracción de epitelio desciliado y es mucho menor que en un homogenizado de cerebro, donde esta

proteína está altamente enriquecida. Esto podría indicar que esta proteína no posee niveles de expresión elevados en cilios. Sin embargo, no se puede descartar que cumpla un papel importante en la organización de microdominios ciliares.

ProSAPiP, al contrario de las ProSAPs encontradas en cilios, posee una localización diferente concentrada en puntos en la capa ciliar (Figura 7C). No es claro si esta marca se relaciona con un tipo determinado células epiteliales. Se requieren más experimentos para poder determinarlo, como por ejemplo estudios de co-localización entre ProSAPiP y marcadores celulares específicos para los diferentes tipos celulares del epitelio olfatorio.

En las sinapsis excitadoras las ProSAPs formarían puentes entre los complejos constituidos por las MAGuK y el citoesqueleto (Boeckers y cols., 1999; Okamoto y cols., 2001), además de conectar sistemas de transducción de receptores acoplados a proteína G con almacenes de calcio intracelular (Tu y cols., 1999).

En cilios olfatorios, la presencia de las ProSAPs podría estar relacionada con la conexión de complejos multiproteicos con el citoesqueleto.

II.2 Proteína Lin-7/Veli/MALS

También se encontró en cilios, así como en fascículos de axones, la proteína Lin-7/Veli/MALS (Figura 8). Estudios de Western blot mostraron que el anticuerpo utilizado reconoce dos bandas de un peso cercano a 25 kDa, al igual que en el homogenizado de bulbo olfatorio. Las bandas corresponden a variantes de procesamiento de esta proteína (Jo y cols., 1999). Ambas isoformas están presentes en cilios, aunque el enriquecimiento de una con respecto a la otra es distinto, lo que podría indicar alguna función diferencial de ambas (Figura 8). La relación de enriquecimiento de las bandas se mantiene en todas las fracciones y no se observan diferencias entre los niveles totales de las distintas fracciones, lo que está en acuerdo con los resultados de IHQ, en donde la señal se observó tanto en cilios como en estructuras no ciliares.

En *C. elegans*, Lin-7/Veli/MALS ha sido implicada en la localización basolateral del receptor LET-23 (receptor tirosina quinasa), en el epitelio precursor del tejido vulval, lo que resulta fundamental para la posterior diferenciación de este tejido (Kaeck y cols., 1998; Caruana, 2002). Además, también ha sido encontrada en sinapsis excitadoras,

donde participa en la localización del receptor tipo NMDA en la densidad post-sináptica.

De la misma forma, estas proteínas en cilios podrían estar implicadas en la localización y agrupación de los componentes involucrados en la transducción.

II.3 Miembros de la familia MAGuK de proteínas de andamio

Dentro de las proteínas que pertenecen a esta familia que fueron investigadas, se encontró Lin-2/CASK (Figura 9). Experimentos de IHQ mostraron que esta proteína posee una localización diferencial en el epitelio, ya que una fracción se encontró en la franja ciliar y otra alrededor de los fascículos de axones. La señal se observó mucho más restringida al límite superior del epitelio; si se compara con las ProSAPs (comparar Figura 7 y 9), como se sugirió anteriormente, esto podría corresponder a tinción en el botón dendrítico. Es decir, Lin-2/CASK no se concentraría en los cilios sino que en la zona del botón dendrítico donde podría participar en la organización de los complejos proteicos asociados a uniones intercelulares, que ocurren entre el botón dendrítico y las células sustentaculares.

La localización diferencial de Lin-2/CASK dentro del epitelio sugiere su participación en distintas funciones en este tejido, consistente con el alto grado de versatilidad de las proteínas de andamio.

Los resultados de Western blot indicaron la presencia de esta proteína tanto en la fracción ciliar (C) como en la fracción del epitelio desciliado (ED), lo cual confirmó lo observado mediante IHQ. Sin embargo, la señal en el control positivo, bulbo olfatorio (BO), se manifestó como dos bandas de similar peso molecular, en cambio en las distintas fracciones membranosas del epitelio sólo se observó la de menor peso molecular. Un análisis preliminar, mediante Western blot, de todas las fracciones obtenidas desde una preparación de epitelio olfatorio (n=1), mostraron que la banda de mayor peso molecular también está presente en las fracciones S1 y S2 de la preparación (Figura 10), correspondientes a membranas no ciliares. Esto implicaría la presencia de ambas isoformas en distintas localizaciones subcelulares, lo que nuevamente sugiere papeles diferenciales de la misma proteína.

En *C. elegans*, esta proteína ha sido implicada, junto a Lin-7/Veli/MALS, en la localización del receptor LET-23 en la zona basolateral del epitelio precursor de la

vulva, mientras que en los epitelios de mamíferos interacciona con el proteoglicano Syndecan (Cohen y cols., 1998). Otros estudios muestran que está implicada en la organización de complejos proteicos en uniones intercelulares. Por ejemplo, su ortólogo en *Drosophila* se une a la proteína de adhesión Neurexina en las uniones septadas (Funke y cols., 2005). En cilios podría estar involucrada en una función similar, debido a su localización muy cercana a los botones; también podría participar en el transporte de complejos multiproteicos hacia el cilio. En sistema nervioso central se ha demostrado que interacciona con KIF17, una proteína motora de la familia de la kinesinas (Setou y cols., 2000). Por último, también podría constituir un puente con el citoesqueleto, como las ProSAPs (Cohen y cols., 1998).

Cabe destacar que Lin-7/Veli/MALS y Lin-2/CASK han sido implicados en la formación de un complejo de señalización, en el proceso de localización de LET-23 en membrana basolateral. De este modo, se esperaría que si en el epitelio olfatorio cumplen una función similar (localización de receptores), ambas señales serían muy similares en la IHQ. Por el contrario, a pesar de encontrarse ambas en la capa ciliar, Lin-2/CASK estaba concentrada en el límite superior del epitelio, mientras que Lin-7/Veli/MALS se encontraba asociada a cilios, lo que se observa al comparar las Figuras 9 y 10. Esto sugiere que no hay una interacción de ambas proteínas en los cilios, es decir, más que formar un complejo estable de organización, podrían estar formando complejos transitorios, como ha sido mostrado en la literatura (Funke y cols., 2005). Por otra parte, en los fascículos de axones la marca de Lin-7/Veli/MALS está concentrada en los axones mismos, mientras que la señal de Lin-2/CASK se encuentra rodeando los fascículos. En este caso posiblemente la señal de Lin-2/CASK estaría presente en las células equivalentes a las glías que rodean a los fascículos de axones (*ensheating cells*).

Finalmente, proteínas de la subfamilia SAP90/PSD95 como SAP97/Dlg y NE-Dlg fueron encontradas en cilios olfatorios (Figura 10). La tinción con un anticuerpo contra dominios PDZ de esta familia mostró la presencia en cilios de varias bandas de peso molecular distinto al encontrado en el control positivo, bulbo olfatorio. Esto puede ser explicado por la presencia de distintos miembros de esta subfamilia o por la existencia de variantes de procesamiento alternativo de las proteínas con dominios

PDZ. Para ahondar en este aspecto, anticuerpos específicos para cada miembro de esta subfamilia fueron probados, y se encontró SAP97/Dlg y SAP102/NE-Dlg. La proteína SAP97/Dlg posee un peso molecular distinto al del control positivo, aunque similar al de una banda observada con un anticuerpo anti-PDZ en Western blot (Western blot de la Figura 10). Los resultados indican que el anticuerpo anti-PDZ reconoce a SAP97/Dlg pero todavía se debe investigar la identidad de las otras proteínas. Los experimentos de IHQ mostraron que la localización subcelular de SAP97/Dlg es muy similar a la encontrada para anti-PDZ, es decir, mayoritariamente en los axones, lo que corrobora la hipótesis de que anti-PDZ reconoce a SAP97/Dlg. Un punto importante es que en ambos casos se observó marca tanto en cilios como en epitelio desciliado (Western blot), pero en IHQ la capa ciliar no fue teñida. Estos resultados sugieren que el epítipo está enmascarado en los cilios y no es accesible al anticuerpo. Por otro lado, no se observa un enriquecimiento significativo en cilios con respecto a un homogenizado de epitelio (Figura 10)

La proteína SAP102/NE-Dlg también fue encontrada en el epitelio olfatorio. Experimentos de IHQ mostraron una localización ciliar, lo cual en un principio contradice lo encontrado en Western blot, en los que observó que no hay marca de esta proteína en ninguna de las fracciones de epitelio olfatorio (Figura 10C). Al estudiar la localización de esta proteína en todas las fracciones subcelulares obtenidas desde una preparación, se observó una banda inmunoreactiva al anticuerpo contra SAP102/NE-Dlg en las fracciones S1 y S2 de una preparación de cilios olfatorios, las que correspondían a proteínas asociadas a membranas plasmáticas no ciliares, internas o citosólicas (Figura 11). Además, la banda reconocida por el anticuerpo en epitelio olfatorio presentaba un peso molecular menor al del control positivo (BO). Estudios en gradiente de sacarosa indicaron que esta proteína migró junto a una fracción enriquecida en un marcador de endosomas tempranos, Rab5A (Figura 14) y no colocalizó junto a las membranas ciliares como ACIII, Golf y el canal CNG. Esto sugiere que la proteína SAP102/NE-Dlg encontrada en cilios olfatorios está asociada mayoritariamente a fracciones membranosas no ciliares. Es decir, que SAP102/NE-Dlg podría estar asociada a procesos que no implican asociación a membrana ciliar, como por ejemplo, en tráfico desde y hacia el cilio. Este tipo de función ha sido ya descrito para SAP102/NE-Dlg. Sans y cols. (2003) la encontraron asociada a la proteína Sec8, que pertenece al exocisto (sistema de tráfico de vesículas hacia la membrana

citoplasmática), y permite el tráfico de los receptores de glutamato sensibles a NMDA hacia la membrana citoplasmática.

III. Estudios de interacción de las proteínas de andamio ciliares con componentes de la quimiotransducción olfatoria

Se estudió, mediante co-inmunoprecipitación, si algunas de las proteínas de andamio identificadas en cilios olfatorios interaccionaba con alguna de las proteínas que participan en la quimiotransducción. Los resultados resumidos en la Tabla 2, muestran que tanto ProSAP2/Shank3 y Lin-2/CASK fueron inmunoprecipitadas (Figura 12), aunque no se observó interacción con ninguno de los componentes de la transducción de señales probados. Una posible razón para esto es que no haya interacción entre los componentes probados; una segunda posibilidad es que las condiciones utilizadas para realizar los experimentos no mantuvieron las interacciones intermoleculares.

Por otra parte, también ACIII fue inmunoprecipitada, aunque no co-inmunoprecipitó con Lin-2/CASK, ni con proteínas de andamio que contienen dominios PDZ.

No se probaron todas las proteínas que participan en la transducción, ya que no se disponía de todos los anticuerpos, como por ejemplo, contra el canal de cloruro activado por calcio. Tampoco se probaron anticuerpos contra receptores olfatorios; existen alrededor de 1000 a 1300 receptores diferentes y posiblemente el enriquecimiento relativo de cada uno de ellos en la fracción de membranas ciliares sería extremadamente bajo. Tampoco fue estudiado en profundidad la búsqueda de interacciones entre diferentes tipos de proteínas de andamio encontradas en cilios.

Esto no descarta que las proteínas de andamio inmunoprecipitadas interaccionen con componentes de la transducción que no fueron estudiados en estos experimentos, debido a las razones antes expuestas.

IV. Variantes de procesamiento de SAP102/NE-Dlg en epitelio olfatorio

Como se comentó anteriormente, la banda reconocida por anti-SAP102/NE-Dlg era de un peso molecular menor que el encontrado en el bulbo olfatorio (Figura 12). Debido a esto, se decidió investigar si esta banda correspondía a alguna isoforma de esta proteína generada por procesamiento alternativo del RNA mensajero.

Los clones obtenidos mostraron la existencia de al menos dos tipos de isoformas (Figura 14), una de ellas carente del exón 2, lo que produce una pérdida de 18 aminoácidos antes del comienzo del primer dominio PDZ y la pérdida del exón 16 (13 aminoácidos) en la región *Hook*, generando una proteína SAP102/NE-Dlg hipotética que posee todos los dominios característicos y un peso molecular estimado de 90 kDa. Otros clones mostraron también la pérdida del exón 2, pero en la región *Hook* apareció empalmado un exón no descrito hasta el momento en la secuencia de esta proteína, correspondiente a aproximadamente 33 aminoácidos. Una búsqueda en la secuencia genómica de SAP102/NE-Dlg de rata (GenBank U53367) demostró la presencia de este exón entre los exones 14 y 15. Por otro lado, la inserción de este exón produce un desplazamiento en el marco de lectura de la secuencia, lo que determina la aparición de un codón de término al inicio del dominio GuK, es decir, traducándose una proteína truncada carente de este dominio, con un peso molecular estimado de 80 kDa.

No se sabe hasta el momento cuál de las dos isoformas encontradas es la que se expresa en el epitelio olfatorio, pero la ausencia del dominio GuK en una de ellas explicaría una localización diferente a la descrita en sinapsis excitadoras. El dominio GuK ha sido implicado en la asociación de proteínas con el citoesqueleto. De este modo, por ejemplo, permite la localización de los complejos que forma con la subunidad NR2 del receptor sensible a NMDA o con proteínas de adhesión celular como neuroligina a la membrana sináptica (Sans y cols., 2001).

IV.1 Determinación de la secuencia aminoacídica de la(s) isoforma(s) de SAP102/NE-Dlg presente(s) en epitelio olfatorio

Se realizaron experimentos de proteómica con el fin de determinar si alguna de las isoformas encontradas mediante RT-PCR era la reconocida por el anticuerpo

correspondiente. Estos experimentos no mostraron resultados concluyentes, posiblemente debido a que la proteína está presente en cantidad demasiado baja para espectrometría de masas, o que las muestras obtenidas desde un gel bidimensional contenían, además de la isoforma, otras proteínas en una mayor proporción, lo que dificultó el análisis.

Sin embargo, hay que destacar que el método de análisis de geles bidimensionales fue optimizado para realizar este tipo de estudios en epitelio olfatorio, ya que las condiciones de la isoelectrofocalización y la posterior electroforesis dependen de las características de cada tejido a estudiar.

V. Posibles funciones de las proteínas de andamio en el epitelio olfatorio y el proceso de quimiotransducción

Hasta el momento se puede sugerir que las proteínas de andamio encontradas en cilios olfatorios, podrían estar involucradas en cualquiera de las funciones ya descritas para estas proteínas, como son:

1. Localización de proteínas en los sitios específicos dentro de la célula
2. Mediar la formación de complejos multiproteicos, confiriendo rapidez y especificidad en la transducción de señales
3. Regular el tráfico de proteínas ciliares

A continuación se discutirá, para cada punto, qué importancia tendría la presencia de proteínas de andamio en la quimiotransducción olfatoria.

En cilios olfatorios, las proteínas de andamio podrían ser determinantes para la correcta localización de los componentes de la quimiotransducción.

La transducción olfatoria está compuesta de varios pasos que generan la activación del canal efector, sea éste de cloruro o potasio (ver Introducción. Apartado II). Todos estos eventos deberían estar organizados de tal manera de generar una eficiente activación secuencial. La secuencia de eventos que genera la respuesta a odorantes, está ampliamente descrita en diversas especies (Schild y Restrepo, 1998; Nakamura, 2000). Las proteínas de andamio median la formación de complejos macromoleculares, que en este caso permitirían por un lado la correcta activación secuencial y por otro la segregación de las respuestas excitatoria e inhibitoria.

Un ejemplo de este concepto está presente en la sinapsis química excitatoria, en donde varios tipos de proteínas de andamio, que anclan receptores diferentes a la sinapsis, organizan sistemas de transducción con alta especificidad para cada uno de los complejos (Ver Introducción, apartado III.2). De esta forma, las proteínas de andamio organizan zonas de la membrana que corresponden a microdominios de señalización.

Suponiendo que la neurona solo expresa un tipo de RO (concepto ampliamente aceptado), la segregación de las respuestas podría ocurrir a través de diferentes mecanismos:

1. La unión de un odorante determinado a un RO induce sobre el receptor un cambio conformacional específico. El cambio conformacional producido en el RO sería dependiente de la naturaleza del odorante. Esto conllevaría a la interacción de este receptor activado con un complejo de transducción determinado, que contendría el canal efector asociado a la respuesta excitatoria (canal de cloruro activado por calcio) o aquel asociado a la inhibitoria (canal de potasio activado por calcio); esto implicaría la existencia de dos complejos diferentes, uno "excitatorio" y otro "inhibitorio", los cuales podrían estar organizados sobre diferentes proteínas de andamio.
2. El RO está asociado a un complejo pre-ensamblado sobre proteínas de andamio que inicialmente no contiene ninguno de los canales efectores. Al unir un odorante, genera un cambio conformacional sobre la proteína de andamio de tal manera de favorecer la unión de un canal de cloruro o de potasio. En este caso solo sería necesaria la presencia de un tipo de proteína de andamio.

Alternativamente, si se acepta la hipótesis de la presencia de dos tipos de receptores en una misma neurona cada uno asociado a un tipo de respuesta, cada receptor podría formar parte de un complejo de transducción "excitatorio" o "inhibitorio", ensamblado sobre proteínas de andamio distintas. Esto permitiría la segregación de los componentes involucrados en ambos tipos de respuestas, de modo que el canal Cl_{Ca} y el canal K_{Ca} se encontrarían en complejos diferentes.

Se ha sugerido que la unión de un odorante a un RO provocaría la activación de no más de una proteína G y ésta a su vez activaría sólo a una ACIII (Ver Introducción. Apartado II.3). Por otra parte, se piensa que los aumentos de segundos y terceros mensajeros están altamente localizados. El aumento no homogéneo de calcio en el cilios olfatorios, que se han observado (Leinders-Zufall y cols., 1998), apoyan esta idea. De este modo, el gasto energético para restablecer las condiciones basales sería menor. La organización sobre proteínas de andamio contribuiría al ahorro de moléculas de ATP, el precursor del mensajero AMPc, lo que sería importante considerando la ausencia de mitocondrias u otras fuentes de ATP en el cilio (Menco 1995 y 1997)

Finalmente, las proteínas de andamio han sido relacionadas, además de la formación de microdominios, con procesos de tráfico intracelular de proteínas (Setou y cols., 2000; Sans y cols., 2003). Es posible que en analogía con otros sistemas de transducción, los elementos involucrados se recambien rápidamente. En ese sentido, recientemente se han descrito algunos mecanismos de endocitosis y tráfico de receptores odorantes (Mashukova et al, 2006) en los cuáles las proteínas de andamio podrían cumplir un papel determinante.

CONCLUSION

En esta tesis se demostró, mediante diferentes estrategias experimentales, que en los cilios olfatorios de rata existen diferentes proteínas de andamio. Los resultados permiten plantear que éstas podrían estar implicadas en múltiples funciones, tales como la organización de un complejo de proteínas de transducción, el tráfico de proteínas ciliares y la organización de uniones intercelulares entre las neuronas olfatorias y las células sustentaculares del epitelio olfatorio.

REFERENCIAS

- Adelman, J. P., and Herson, P. S. (2004). Making scents of olfactory adaptation. *Nat Neurosci* 7, 689-690.
- Anholt, R. R., Aebi, U., and Snyder, S. H. (1986). A partially purified preparation of isolated chemosensory cilia from the olfactory epithelium of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *J Neurosci* 6, 1962-1969.
- Arshavsky, V. Y., Lamb, T. D., and Pugh, E. N., Jr. (2002). G proteins and phototransduction. *Annu Rev Physiol* 64, 153-187.
- Bachmann, A., Timmer, M., Sierralta, J., Pietrini, G., Gundelfinger, E. D., Knust, E., and Thomas, U. (2004). Cell type-specific recruitment of *Drosophila* Lin-7 to distinct MAGUK-based protein complexes defines novel roles for Sdt and Dlg-S97. *J Cell Sci* 117, 1899-1909.
- Baker, H., Cummings, D. M., Munger, S. D., Margolis, J. W., Franzen, L., Reed, R. R., and Margolis, F. L. (1999). Targeted deletion of a cyclic nucleotide-gated channel subunit (OCNC1): biochemical and morphological consequences in adult mice. *J Neurosci* 19, 9313-9321.
- Belluscio, L., Gold, G. H., Nemes, A., and Axel, R. (1998). Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* 20, 69-81.
- Bhandawat, V., Reisert, J., and Yau, K. W. (2005). Elementary response of olfactory receptor neurons to odorants. *Science* 308, 1931-1934.
- Boeckers, T. M., Winter, C., Smalla, K. H., Kreutz, M. R., Bockmann, J., Seidenbecher, C., Garner, C. C., and Gundelfinger, E. D. (1999). Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 247-252.
- Borg, J. P., Straight, S. W., Kaech, S. M., de Taddeo-Borg, M., Kroon, D. E., Karnak, D., Turner, R. S., Kim, S. K., and Margolis, B. (1998). Identification of an evolutionarily conserved heterotrimeric protein complex involved in protein targeting. *J Biol Chem* 273, 31633-31636.
- Bradley, J., Bonigk, W., Yau, K. W., and Frings, S. (2004). Calmodulin permanently associates with rat olfactory CNG channels under native conditions. *Nat Neurosci* 7, 705-710.
- Bredt, D. S. (1998). Sorting out genes that regulate epithelial and neuronal polarity. *Cell* 94, 691-694.
- Brenman, J. E., Topinka, J. R., Cooper, E. C., McGee, A. W., Rosen, J., Milroy, T., Ralston, H. J., and Bredt, D. S. (1998). Localization of postsynaptic density-93 to dendritic microtubules and interaction with microtubule-associated protein 1A. *J Neurosci* 18, 8805-8813.
- Brunet, L. J., Gold, G. H., and Ngai, J. (1996). General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* 17, 681-693.
- Bucci, C., Wandinger-Ness, A., Lutcke, A., Chiariello, M., Bruni, C. B., and Zerial, M. (1994). Rab5a is a common component of the apical and basolateral endocytic machinery in polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5061-5065.

- Buck, L., and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175-187.
- Butz, S., Okamoto, M., and Sudhof, T. C. (1998). A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell* 94, 773-782.
- Carlin, R.K., Grab, D.J., Cohen, R.S., Siekevitz, P. (1980). Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biol* 86, 831-45.
- Caruana, G. (2002). Genetic studies define MAGUK proteins as regulators of epithelial cell polarity. *Int J Dev Biol* 46, 511-518.
- Castillo, K., Bacigalupo J. (2006). Calcium ATPase in olfactory cilia. XXVIII Annual Meeting, AChemS. Sarasota, Florida, USA.
- Castillo, K., (2005). Caracterización de canales de potasio dependientes de calcio de los cilios de las neuronas olfatorias de rata incorporados en bicapas planas de fosfolípidos. Tesis para optar al título de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, U. de Chile.
- Castillo, K., Bacigalupo, J., and Wolff, D. (2005). Ca²⁺-dependent K⁺ channels from rat olfactory cilia characterized in planar lipid bilayers. *FEBS Lett* 579, 1675-1682.
- Cheng, D., Hoogenraad, C.C., Rush, J., Ramm, E., Schlager, M.A., Duong, D.M., Xu, P., Wijayawardana, S.R., Hanfelt, J., Nakagawa, T., Sheng, M., Peng, J. (2006). Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol Cell Proteomics* 5(6):1158-70.
- Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W., and Laemmli, U. K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* 252, 1102-1106.
- Cohen, A. R., Woods, D. F., Marfatia, S. M., Walther, Z., Chishti, A. H., and Anderson, J. M. (1998). Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol* 142, 129-138.
- Cohen, A. W., Hnasko, R., Schubert, W., and Lisanti, M. P. (2004). Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 84, 1341-1379.
- Colledge, M., Dean, R. A., Scott, G. K., Langeberg, L. K., Huganir, R. L., Scott, J. D. (2000). Targeting of PKA to glutamate receptors through a MAGUK-AKAP complex. *Neuron* 27, 107-19.
- Delgado, R., and Bacigalupo, J. (2006). Single channel recording of olfactory cilia transduction channels. 17th Congress of the European Chemoreception Research Organization, ECRO, Granada, Spain.
- Delgado, R., and Bacigalupo, J. (2005). Single Ca²⁺ activated Cl⁻ channels in chemosensory cilia of toad olfactory receptors neurons. XXVII Annual Meeting, AChemS. Sarasota, Florida, USA.
- Delgado, R., and 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., Saavedra, M. V., Schmachtenberg, O., Sierralta, J., and Bacigalupo, J. (2003). Presence of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in chemosensory cilia support a role in odor transduction, Vol 90).

Dimitratos, S. D., Woods, D. F., Stathakis, D. G., and Bryant, P. J. (1999). Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family. *Bioessays* 21, 912-921.

Dodge-Kafka, K. L., Langeberg, L., and Scott, J. D. (2006). Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins. *Circ Res* 98, 993-1001.

Doerks, T., Bork, P., Kamberov, E., Makarova, O., Muecke, S., and Margolis, B. (2000). L27, a novel heterodimerization domain in receptor targeting proteins Lin-2 and Lin-7. *Trends Biochem Sci* 25, 317-318.

Dong, H., Zhang, P., Liao, D., and Haganir, R. L. (1999). Characterization, expression, and distribution of GRIP protein. *Ann N Y Acad Sci* 868, 535-540.

Duchamp-Viret, P., Duchamp, A., and Chaput, M. A. (2000). Peripheral odor coding in the rat and frog: quality and intensity specification. *J Neurosci* 20, 2383-2390.

Fan, J. S., and Zhang, M. (2002). Signaling complex organization by PDZ domain proteins. *Neurosignals* 11, 315-321.

Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413, 211-218.

Foord, R., Taylor, I. A., Sedgwick, S. G., and Smerdon, S. J. (1999). X-ray structural analysis of the yeast cell cycle regulator Swi6 reveals variations of the ankyrin fold and has implications for Swi6 function. *Nat Struct Biol* 6, 157-165.

Frings, S. (2001). Chemoelectrical signal transduction in olfactory sensory neurons of air-breathing vertebrates. *Cell Mol Life Sci* 58, 510-519.

Funke, L., Dakoji, S., and Bredt, D. S. (2005). Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem* 74, 219-245.

Gasparini, R., and Foa, L. (2004). Homer 1b/c expression correlates with zebrafish olfactory system development. *J Neurocytol* 33, 671-680.

Glynne, P. A., and Evans, T. J. (2002). Role of the PDZ scaffolding protein in tubule cells in maintenance of polarised function. *Exp Nephrol* 10, 307-312.

Godreau, D., Vranckx, R., Maguy, A., Goyenvalle, C., and Hatem, S. N. (2003). Different isoforms of synapse-associated protein, SAP97, are expressed in the heart and have distinct effects on the voltage-gated K⁺ channel Kv1.5. *J Biol Chem* 278, 47046-47052.

Gold, G. H. (1999). Controversial issues in vertebrate olfactory transduction. *Annu Rev Physiol* 61, 857-871.

Goldman, A. L., Van der Goes van Naters, W., Lessing, D., Warr, C. G., and Carlson, J. R. (2005). Coexpression of two functional odor receptors in one neuron. *Neuron* 45, 661-666.

Hall, T. G., and Bennett, V. (1987). Regulatory domains of erythrocyte ankyrin. *J Biol Chem* 262, 10537-10545.

Hanada, T., Lin, L., Tibaldi, E. V., Reinherz, E. L., Chishti, A. H. (2000). GAKIN, a novel kinesin-like protein associates with the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor in T lymphocytes. *J Biol Chem* 275, 28774-84.

Hardie, R.C., Martin, F., Cochrane, G.W., Juusola, M., Georgiev, P., Raghu, P. (2002). Molecular basis of amplification in *Drosophila* phototransduction: roles for G protein, phospholipase C, and diacylglycerol kinase. *Neuron* 36, 689-701.

Hardie, R. C., and Raghu, P. (2001). Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 413, 186-193.

Harris, B. Z., Venkatasubrahmanyam, S., and Lim, W. A. (2002). Coordinated folding and association of the LIN-2, -7 (L27) domain. An obligate heterodimerization involved in assembly of signaling and cell polarity complexes. *J Biol Chem* 277, 34902-34908.

Hata, Y., Nakanishi, H., and Takai, Y. (1998). Synaptic PDZ domain-containing proteins. *Neurosci Res* 32, 1-7.

Hsueh, Y. P., Wang, T. F., Yang, F. C., and Sheng, M. (2000). Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature* 404, 298-302.

Hsueh, Y. P., Yang, F. C., Kharazia, V., Naisbitt, S., Cohen, A. R., Weinberg, R. J., and Sheng, M. (1998). Direct interaction of CASK/LIN-2 and syndecan heparan sulfate proteoglycan and their overlapping distribution in neuronal synapses. *J Cell Biol* 142, 139-151.

Hung, A. Y., and Sheng, M. (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* 277, 5699-5702.

Jo, K., Derin, R., Li, M., and Bredt, D. S. (1999). Characterization of MALS/Velis-1, -2, and -3: a family of mammalian LIN-7 homologs enriched at brain synapses in association with the postsynaptic density-95/NMDA receptor postsynaptic complex. *J Neurosci* 19, 4189-4199.

Jorquera, O. (1995). Tesis para optar al título de Bioquímico. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Jorquera, O., Latorre, R., and Labarca, P. (1995). Ion channel classes in purified olfactory cilia membranes: planar lipid bilayer studies. *Am J Physiol* 269, C1235-1244.

Kaech, S. M., Whitfield, C. W., and Kim, S. K. (1998). The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. *Cell* 94, 761-771.

Kandel, E., Schwartz J. H., Thomas M. J. (2000). Principles of Neural science. En Mc-Graw-Hill (eds). Smell and Taste: The chemical sense. pp 625-636.

Kang, J., and Caprio, J. (1995). In vivo responses of single olfactory receptor neurons in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Neurophysiol* 73, 172-177.

Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5, 771-781.

Kim, S. K. (1997). Polarized signaling: basolateral receptor localization in epithelial cells by PDZ-containing proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9, 853-859.

- Kurahashi, T., and Menini, A. (1997). Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell. *Nature* 385, 725-729.
- Lecuit, T., and Wieschaus, E. (2002). Junctions as organizing centers in epithelial cells? A fly perspective. *Traffic* 3, 92-97.
- Lee, S., Fan, S., Makarova, O., Straight, S., and Margolis, B. (2002). A novel and conserved protein-protein interaction domain of mammalian Lin-2/CASK binds and recruits SAP97 to the lateral surface of epithelia. *Mol Cell Biol* 22, 1778-1791.
- Leinders-Zufall, T., Greer, C. A., Shepherd, G. M., and Zufall, F. (1998). Imaging odor-induced calcium transients in single olfactory cilia: specificity of activation and role in transduction. *J Neurosci* 18, 5630-5639.
- Li, S. S. (2005). Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J* 390, 641-653.
- Li K.W., Hornshaw M. P., van Minnen J., Smalla K. H., Gundelfinger E. D., Smit A. B. (2005). Organelle Proteomics of Rat Synaptic Proteins: Correlation-Profilng by Isotope-Coded Affinity Tagging in Conjunction with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to Reveal Post-synaptic Density Specific Proteins. *J of Proteome Res* 4, 725-733.
- Li, Y., Karnak, D., Demeler, B., Margolis, B., and Lavie, A. (2004). Structural basis for L27 domain-mediated assembly of signaling and cell polarity complexes. *Embo J* 23, 2723-2733.
- Lim, S., Naisbitt, S., Yoon, J., Hwang, J. I., Suh, P. G., Sheng, M., and Kim, E. (1999). Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing, and differential expression in brain and development. *J Biol Chem* 274, 29510-29518.
- Lledo, P. M., Gheusi, G., and Vincent, J. D. (2005). Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev* 85, 281-317.
- Lowe, G., and Gold, G. H. (1993). Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* 366, 283-286.
- Lue, R. A., Marfatia, S. M., Branton, D. and Chishti, A. H. (1994). Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to protein 4.1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91, 9818-9822.
- Madrid, R., Delgado, R., and Bacigalupo, J. (2005). Cyclic AMP cascade mediates the inhibitory odor response of isolated toad olfactory receptor neurons. *J Neurophysiol* 94, 1781-1788.
- Mashukova, A., Spehr, M., Hatt, H., Neuhaus, E.M. (2006). Beta-arrestin2-mediated internalization of mammalian odorant receptors. *J Neurosci* 26, 9902-12.
- Menco, B. P. (1995). Freeze-fracture, deep-etch, and freeze-substitution studies of olfactory epithelia, with special emphasis on immunocytochemical variables. *Microsc Res Tech* 32, 337-356.
- Menco, B. P. (1997). Ultrastructural aspects of olfactory signaling. *Chem Senses* 22, 295-311.
- Mombaerts, P. (2004). Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited. *Curr Opin Neurobiol* 14, 31-36.

- Montell, C. (2005). TRP channels in *Drosophila* photoreceptor cells. *J Physiol* 567, 45-51.
- Montgomery, J. M., Zamorano, P. L., and Garner, C. C. (2004). MAGUKs in synapse assembly and function: an emerging view. *Cell Mol Life Sci* 61, 911-929.
- Morales, B., Madrid, R., and Bacigalupo, J. (1997). Calcium mediates the activation of the inhibitory current induced by odorants in toad olfactory receptor neurons. *FEBS Lett* 402, 259-264.
- Morales, B., Ugarte, G., Labarca, P., and Bacigalupo, J. (1994). Inhibitory K⁺ current activated by odorants in toad olfactory neurons. *Proc Biol Sci* 257, 235-242.
- Mori, K., von Campenhouse, H., and Yoshihara, Y. (2000). Zonal organization of the mammalian main and accessory olfactory systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 1801-1812.
- Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C., Peng Z. (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* 13, 1435-1448
- Muller, B. M., Kistner, U., Kindler, S., Chung, W. J., Kuhlendahl, S., Fenster, S. D., Lau, L. F., Veh, R. W., Huganir, R. L., Gundelfinger, E. D., and Garner, C. C. (1996). SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron* 17, 255-265.
- Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J. C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R. J., Worley, P. F., and Sheng, M. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 23, 569-582.
- Nakamura, T. (2000). Cellular and molecular constituents of olfactory sensation in vertebrates. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 126, 17-32.
- Neuhaus, E. M., Gisselmann, G., Zhang, W., Dooley, R., Stortkuhl, K., and Hatt, H. (2005). Odorant receptor heterodimerization in the olfactory system of *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci* 8, 15-17.
- Nomura, T., Takahashi, S., and Ushiki, T. (2004). Cytoarchitecture of the normal rat olfactory epithelium: light and scanning electron microscopic studies. *Arch Histol Cytol* 67, 159-170.
- Ohno, S. (2001). Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 13, 641-648.
- Okamoto, P. M., Gamby, C., Wells, D., Fallon, J., and Vallee, R. B. (2001). Dynamin isoform-specific interaction with the shank/ProSAP scaffolding proteins of the postsynaptic density and actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 276, 48458-48465.
- Pace, U., Hanski, E., Salomon, Y., and Lancet, D. (1985). Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature* 316, 255-258.
- Payre, F. (2004). Genetic control of epidermis differentiation in *Drosophila*. *Int J Dev Biol* 48, 207-215.
- Peppel, K., Boekhoff, I., McDonald, P., Breer, H., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1997). G protein-coupled receptor kinase 3 (GRK3) gene disruption leads to loss of odorant receptor desensitization. *J Biol Chem* 272, 25425-25428.

Perego, C., Vanoni, C., Villa, A., Longhi, R., Kaech, S. M., Frohli, E., Hajnal, A., Kim, S. K., and Pietrini, G. (1999). PDZ-mediated interactions retain the epithelial GABA transporter on the basolateral surface of polarized epithelial cells. *Embo J* 18, 2384-2393.

Pifferi, S., Boccaccio, A., and Menini, A. (2006). Cyclic nucleotide-gated ion channels in sensory transduction. *FEBS Lett* 580, 2853-2859.

Qiao, F., and Bowie, J. U. (2005). The many faces of SAM. *Sci STKE* 2005, re7.

Rawson, N. E., Eberwine, J., Dotson, R., Jackson, J., Ulrich, P., and Restrepo, D. (2000). Expression of mRNAs encoding for two different olfactory receptors in a subset of olfactory receptor neurons. *J Neurochem* 75, 185-195.

Reidl, J., Borowski, P., Sensse, A., Starke, J., Zapotocky, M., and Eiswirth, M. (2006). Model of calcium oscillations due to negative feedback in olfactory cilia. *Biophys J* 90, 1147-1155.

Reisert, J., and Matthews, H. R. (2001). Responses to prolonged odour stimulation in frog olfactory receptor cells. *J Physiol* 534, 179-191.

Rumbaugh, G., Sia, G. M., Garner, C. C., and Huganir, R. L. (2003). Synapse-associated protein-97 isoform-specific regulation of surface AMPA receptors and synaptic function in cultured neurons. *J Neurosci* 23, 4567-4576.

Sanhueza, M., Schmachtenberg, O., and 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.

Sans, N., Petralia, R. S., Wang, Y. X., Blahos, J., 2nd, Hell, J. W., and Wenthold, R. J. (2000). A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci* 20, 1260-1271.

Sans, N., Prybylowski, K., Petralia, R. S., Chang, K., Wang, Y. X., Racca, C., Vicini, S., and Wenthold, R. J. (2003). NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. *Nat Cell Biol* 5, 520-530.

Sans, N., Racca, C., Petralia, R. S., Wang, Y. X., McCallum, J., and Wenthold, R. J. (2001). Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway. *J Neurosci* 21, 7506-7516.

Schild, D., and Restrepo, D. (1998). Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol Rev* 78, 429-466.

Schluter, O. M., Xu, W., and Malenka, R. C. (2006). Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor function. *Neuron* 51, 99-111.

Schulze, D. H., Pyrski, M., Ruknudin, A., Margolis, J. W., Polumuri, S. K., and Margolis, F. L. (2002). Sodium-calcium exchangers in olfactory tissue. *Ann N Y Acad Sci* 976, 67-72.

Sedgwick, S. G., Smerdon, S. J. (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *TIBS* August, 311-16

Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D. H., and Hirokawa, N. (2000). Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288, 1796-

1802.

Sheng, M., and Kim, E. (2000). The Shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci* 113 (Pt 11), 1851-1856.

Sheng, M., and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* 24, 1-29.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.

Sinnarajah, S., Dessauer, C. W., Srikumar, D., Chen, J., Yuen, J., Yilma, S., Dennis, J. C., Morrison, E. E., Vodyanoy, V., and Kehrl, J. H. (2001). RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III. *Nature* 409, 1051-1055.

Sklar, P. B., Anholt, R. R., and Snyder, S. H. (1986). The odorant-sensitive adenylyl cyclase of olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants. *J Biol Chem* 261, 15538-15543.

Schmidt, P., (1991). Caracterización de la actividad de la adenilato ciclase de cilios quimiosensores aislados del epitelio olfatorio de la rana chilena *Caudibervera caudibervera*. Tesis para optar al título de bioquímico, Facultad de Ciencias, U. de Chile.

Takeuchi, H., and Kurahashi, T. (2002). Photolysis of caged cyclic AMP in the ciliary cytoplasm of the newt olfactory receptor cell. *J Physiol* 541, 825-833.

Takeuchi, H., and Kurahashi, T. (2005). Mechanism of signal amplification in the olfactory sensory cilia. *J Neurosci* 25, 11084-11091.

Takeuchi, M., Hata, Y., Hirao, K., Toyoda, A., Irie, M., Takai, Y. (1997). SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density. *J Biol Chem* 272, 11943-51.

Trudeau, M. C., and Zagotta, W. N. (2003). Calcium/calmodulin modulation of olfactory and rod cyclic nucleotide-gated ion channels. *J Biol Chem* 278, 18705-18708.

Tsuboi, A., Yoshihara, S., Yamazaki, N., Kasai, H., Asai-Tsuboi, H., Komatsu, M., Serizawa, S., Ishii, T., Matsuda, Y., Nagawa, F., and Sakano, H. (1999). Olfactory neurons expressing closely linked and homologous odorant receptor genes tend to project their axons to neighboring glomeruli on the olfactory bulb. *J Neurosci* 19, 8409-8418.

Tsunoda, S., Sierralta, J., Sun, Y., Bodner, R., Suzuki, E., Becker, A., Socolich, M., and Zuker, C. S. (1997). A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature* 388, 243-249.

Tu, J. C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J. P., Petralia, R. S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V. K., Lanahan, A. A., Sheng, M., and Worley, P. F. (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* 23, 583-592.

Valtschanoff, J. G., Burette, A., Davare, M. A., Leonard, A. S., Hell, J. W., and Weinberg, R. J. (2000). SAP97 concentrates at the postsynaptic density in cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 12, 3605-3614.

van Huizen, R., Miller, K., Chen, D. M., Li, Y., Lai, Z. C., Raab, R. W., Stark, W. S., Shortridge,

- R. D., and Li, M. (1998). Two distantly positioned PDZ domains mediate multivalent INAD-phospholipase C interactions essential for G protein-coupled signaling. *Embo J* 17, 2285-2297.
- Vogler, C., and Schild, D. (1999). Inhibitory and excitatory responses of olfactory receptor neurons of *xenopus laevis* tadpoles to stimulation with amino acids. *J Exp Biol* 202 (Pt 8), 997-1003.
- Vondriska, T. M., Pass, J. M., and Ping, P. (2004). Scaffold proteins and assembly of multiprotein signaling complexes. *J Mol Cell Cardiol* 37, 391-397.
- Washburn, K. B., Turner, T. J., and 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.
- Wei, J., Zhao, A. Z., Chan, G. C., Baker, L. P., Impey, S., Beavo, J. A., and 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.
- Whitfield, C. W., Benard, C., Barnes, T., Hekimi, S., and Kim, S. K. (1999). Basolateral localization of the *Caenorhabditis elegans* epidermal growth factor receptor in epithelial cells by the PDZ protein LIN-10. *Mol Biol Cell* 10, 2087-2100.
- Wong, S. T., Trinh, K., Hacker, B., Chan, G. C., Lowe, G., Gaggar, A., Xia, Z., Gold, G. H., and Storm, D. R. (2000). Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* 27, 487-497.
- Woods, D. F., and Bryant, P. J. (1991). The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* 66, 451-464.
- Wyneken, U., Smalla, K.H., Marengo, J.J., Soto, D., de la Cerda, A., Tischmeyer, W., Grimm, R., Boeckers, T.M., Wolf, G., Orrego, F., Gundelfinger, E.D. (2001) Kainate-induced seizures alter protein composition and N-methyl-D-aspartate receptor function of rat forebrain postsynaptic densities. *Neuroscience* 102, 65-74.
- Yan, C., Zhao, A. Z., Bentley, J. K., Loughney, K., Ferguson, K., and Beavo, J. A. (1995). Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9677-9681.