



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Scarinci, María Noelia

Interacción y regulación de canales iónicos por microtúbulos



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Scarinci, M. N. (2020). *Interacción y regulación de canales iónicos por microtúbulos. (Tesis de doctorado).* Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/3064>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Interacción y Regulación de Canales Iónicos por Microtúbulos

TESIS DOCTORAL

María Noelia Scarinci

noelia.sca@gmail.com

Resumen

Los canales TRP (*Transient Receptor Potential*) son miembros de una superfamilia que hacen una contribución esencial a las actividades sensoriales en distintos tipos y funciones celulares. Una disfunción en el miembro de la subfamilia de las Policistinas, TRPP2, o policistina 2 (PC2) causa la enfermedad poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD). Nuestros trabajos previos demostraron que la PC2 es un canal catiónico no selectivo, permeable al Ca^{2+} , que es expresado en el cilio primario (CP) de las células epiteliales renales donde estaría involucrado en el transporte de Ca^{2+} y la señalización celular. La PQRAD es considerada una “ciliopatía”, un síndrome genético asociado a la estructura/función del CP, una organela sensorial formada por una estructura de microtúbulos (MTs), el axonema, y una membrana especializada. Poco se sabía al momento de inicio del presente trabajo, cómo el Ca^{2+} externo regulaba a la PC2, particularmente en el CP. En el estudio de los posibles efectos del Ca^{2+} externo sobre la PC2 de las células epiteliales renales LLC-PK1 con la técnica de “*patch clamp*”, descubrimos que la misma está mediada por el CaSR, un receptor del tipo GPCR, cuyo ligando natural es el ión Ca^{2+} . La presencia del CaSR y su co-localización con PC2 en células epiteliales renales se confirmó por inmunocitoquímica e inmunoprecipitación. Esto nos llevó a comprobar la existencia de un complejo molecular novedoso entre PC2 y CaSR, que es materia de estudio en nuestro laboratorio. También descubrimos que el axonema ciliar, compuesto de MTs, produce oscilaciones eléctricas reguladas por CaSR y PC2. Otro receptor, V2R, para vasopresina, también regularía la actividad eléctrica del axonema. Los estudios de la presente tesis, confirmarían la hipótesis de trabajo de que el CP actúa como una antena eléctrica para la transducción sensorial de señales ambientales. Los experimentos proveen evidencia de la conexión eléctrica entre canales ciliares y la maquinaria del axonema. El transporte electrodifusional de Ca^{2+} mediante canales ciliares, incluida la PC2, controlaría su actividad eléctrica por medio de los MTs y así, la morfología ciliar, central en la génesis de la PQRAD.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES

Interacción y Regulación de Canales Iónicos por Microtúbulos

Autora: Lic. María Noelia Scarinci

Director: Dr. Horacio Fabio Cantiello

Trabajo realizado en: **Facultad de Odontología de la Universidad de
Buenos Aires (FOUBA)**

**Centro de Investigación y Transferencia de
Santiago del Estero (CITSE)**

**Instituto Multidisciplinario de Salud, Tecnología y
Desarrollo (IMSaTeD)**

**Tesis presentada para optar al título de Doctora en Ciencia y
Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes**

Año 2020

Agradecimientos

El comienzo de esta Tesis doctoral marcó una nueva etapa de mi vida, un cambio de todo lo que conocía hasta ese momento. Entrar a un laboratorio y que te reciban con charlas y mates era muy distinto al estereotipo de laboratorio que uno tiene en la cabeza. Encontrar un director presente, atento a todo lo que haces, haciendo experimentos con vos, que se emociona con cada resultado y que pone toda la fe en vos, sin creérsela sabiendo toda la trayectoria que tiene, no se encuentra todos los días. Tanto es así, que cuando nos propuso que nos viniéramos a Santiago del Estero a continuar con nuestras investigaciones, Ro, Pauli y yo, “las chicas de Cantiello”, lo seguimos. Nosotros cuatro, alejados de nuestros círculos íntimos, nos convertimos en una familia. Pauli y Ro se convirtieron en mis grandes amigas. Pauli en mi compinche. Experimentos juntas, resultados juntas, bailes en el pasillo del labo juntas y crisis existenciales juntas. Y de Ro sólo puedo decir que ojalá en algún momento de mi vida sea la mitad de lo que es ella. Tampoco puedo dejar de nombrar a las incorporaciones de los últimos tiempos, la Bren, la Juli, la Anto, el Santi y Marcos, que me apoyaron muchísimo y me ayudaron, esta Tesis tiene un poquito de cada uno de ellos.

Sin embargo, no puedo decir que fue una experiencia fácil, es difícil estar lejos de tu propia familia, más con lo compañera que es la mía, pasar los cumpleaños sin que estén todos en casa era duro. Pero sé que los tengo siempre, que me tienen en cuenta a pesar de la distancia. Y tener a mis papás y a mi hermanita (sí, serás “hermanita” aunque tengas 80 años) aunque sea por videollamada es reconfortante, y hace que cada vez que los vea se me llene el corazón. Sin el apoyo de ellos no hubiese podido ser nada de lo que soy en este momento de mi vida.

Mientras me acostumbraba a la vida santiagueña, llegó mi gatita Scylla, que fue una compañía indispensable para mí hasta su último día de vida, y que jamás voy a olvidar.

Después de un tiempo teniendo un noviazgo a distancia, Nico se la jugó con todo y se vino para acá, apoyándonos incondicionalmente en cada aspecto de la vida, creciendo y aprendiendo juntos. Un amor así no es fácil de encontrar, por suerte yo lo encontré y no dejamos ni dejaremos que los kilómetros ni nada nos separen.

No puedo dejar de nombrar a mis amigos, que aprovecho para ver cada vez que voy a Buenos Aires, y que cuando me escriben es infaltable el “entonces, ¿ya terminas el Doctorado? ¿Ya te volvés?” En especial a Viky y Yami, que sé que cuento y contaré con ellas siempre, aunque seamos un poco colgadas.

Por último, quiero agradecer al IMSaTeD, nuestro instituto que crece a pasos agigantados, donde realicé la mayor parte de los experimentos de mi tesis. A la ANPCyT, ya que empecé con una beca PICT otorgada por ellos al laboratorio, y a CONICET por la beca de finalización interna doctoral. También a la FCM - UNSE por dejarme cumplir mis tareas docentes en esa institución. Y finalmente, a mi amada UNQ, donde terminé mis estudios de grado, concluyendo ahora los de posgrado, y a la que le estaré siempre agradecida por la formación de excelente calidad que me otorgó desde el día que la pisé por primera vez.

Índice

Abreviaturas	8
1. Introducción	15
1.1 El Movimiento Transmembranal de Iones y los Canales Iónicos	16
1.2 Canales TRP	17
1.3 Poliquistosis Renal Autosómica Dominante	20
1.4 El Canal Policistina-2	22
1.4.1 Mecanismos de Regulación de la PC2	23
1.5 Receptores Acoplados a Proteína G	25
1.5.1 El Receptor Sensor de Calcio	27
1.6. El Cilio Primario	30
1.7 Microtúbulos	32
1.7.1 Propiedades Eléctricas del Citoesqueleto	34
2. Hipótesis y Objetivos	40
3. Materiales y Métodos	42
3.1 Cultivos Celulares	43
3.2 Bioquímica y Biología Molecular – Técnicas de Aislamiento e Identificación	44
3.2.1 Inmunocitoquímica	44
3.2.2 Aislamiento de Membrana Plasmática	45
3.2.3 Purificación Tubulina de Células LLC-PK1	46
3.2.4. Preparación de Haces de MTs de Cerebro de Rata	47
3.2.5. Aislamiento de CPs	47
3.2.6 Marcación Inmunoquímica de las Muestras de MTS/CPs	48
3.2.7 Co-Inmunoprecipitación	49

3.2.8 <i>Western Blotting</i>	50
3.2.8.1 Medición de Concentración de Proteínas.....	51
3.2.8.2 Preparación de Muestras para Electroforesis	52
3.2.8.3 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida y Transferencia	52
3.2.8.4 Inmunodetección	53
3.2.8.5 <i>Dot Blotting</i>	53
3.3 Electrofisiología	53
3.3.1 Conceptos Básicos de Electricidad	54
3.3.2 Teoría de Campo Constante de Goldman-Hodgkin-Katz.....	55
3.3.3 Técnica de <i>Patch Clamp</i>	58
3.3.3.1 Otras Configuraciones de <i>Patch Clamp</i>	61
3.3.3.2 Configuración de <i>Patch Clamp</i> en “Parche Suelto”	61
3.3.3.3 Preparación de Pipetas para <i>Patch Clamp</i>	62
3.3.3.4 Soluciones Utilizadas para <i>Patch Clamp</i>	63
3.3.3.5 Práctica Experimental de las Técnicas de <i>Patch Clamp</i>	63
3.3.3.5.1 Adquisición de Datos en Planchas de MTs	63
3.3.3.5.2 Adquisición de Datos de Haces de MTs y CPs	64
3.3.3.6 Otros Análisis de Corrientes.....	64
3.3.4 Técnica de Reconstitución de Canales en Bicapas Lipídicas	65
3.4 Análisis Estadístico	67
4. Resultados	68
4.1 Co-localización de PC2 y CaSR	69
4.2 PC2 y CaSR en Membrana Celular	70
4.3 Complejo Estructural CaSR-PC2.....	72
4.3.1 Co-inmunoprecipitación.....	72
4.3.2 Detección por <i>Dot Blotting</i>	73
4.3.3 Detección por <i>Western Blotting</i>	74

4.3.4 Análisis de las Co-IP en BLM-----	75
4.3.4.1 Efecto del Anticuerpo Anti-PC2 en la Co-IP CaSR-----	77
4.3.4.2 Efecto de la Activación del CaSR en la Co-IP PC2 -----	78
4.4 Presencia del CaSR en CPs de las Células LLC-PK1-----	79
4.4.1 Inmunocitoquímica de CaSR y CP -----	80
4.4.2 Efecto Funcional del CaSR en el CP-----	80
4.5 Señalización Eléctrica del Citoesqueleto -----	81
4.5.1 Actividad Eléctrica de Haces de MTs-----	82
4.5.2 Señales Eléctricas de MTs y CPs en Células LLC-PK1-----	87
4.5.2.1 Señales Eléctricas de los MTs de Células LLC-PK1-----	87
4.5.2.2 Señales Eléctricas del CP en Células LLC-PK1 -----	90
4.5.2.2.1 Oscilaciones Eléctricas en CPs Permeabilizados-----	91
4.5.2.2.2 Señales Sobre la Superficie del CP Intacto -----	93
4.5.2.2.3 Efecto del Agonista del CaSR sobre el CP-----	95
4.5.2.2.4 Efecto de la Vasopresina sobre el CP-----	97
5. Discusión -----	100
5.1 Introducción-----	101
5.2 Señalización Celular por CaSR y su Interacción con la PC2 en Células Epiteliales Renales -----	102
5.3 Actividad Eléctrica del CP. Conexión Entre Axonema y Canales Iónicos --	110
6. Conclusiones-----	121
7. Bibliografía-----	123

Abreviaturas

AC, adenilil ciclasa

AA, ácido araquidónico

AMPC, adenosín monofosfato cíclico

ARNm, ácido adenosín ribonucleótido mensajero

ATP, adenosín trifosfato

AVP, arginina vasopresina

BAPTA, ácido aminopolicarboxílico específico de calcio

BCA, ácido becinconínico (del inglés, "*bicinchoninic acid*")

BSA, albúmina de suero bovino (del inglés, "*Bovine Serum Albumin*")

CaSR, receptor sensor de calcio (del inglés, "*Calcium Sensing Receptor*")

ABPs, proteínas de unión a la actina (del inglés, "*Actin Binding Proteins*")

cis, compartimiento cuyas soluciones bañan la cara citoplasmática de la membrana

CP, cilio primario

cPLA2, Fosfolipasa A2 citosólica

DAG, diacilglicerol

DAPI, 4',6-diamino-2-fenilindol

DE, desvío estándar

DIC (del Inglés, *Differential Interference Contrast microscopy*), también conocida como microscopía de Nomarsky

EE, error estándar

EGTA, ácido etilen-glicol- tetraacético

ENaC, canal epitelial de sodio (del inglés, "*Epithelial Sodium Channel*")

ERK: quinasa regulada por señal extracelular (del inglés, "*Extracellular signal-regulated kinases*")

G, conductancia total (Siemens)

g, conductancia de canal único (Siemens)

GHK, Goldman-Hodgkin-Katz

G_i, subunidad α de la proteína G heterotrimérica de tipo inhibitoria

G_q, subunidad α de la proteína G heterotrimérica de tipo estimuladora

G_s, subunidad α de la proteína G heterotrimérica de tipo estimuladora

GPCR, receptor acoplado a proteína G (del inglés, "*G-protein Coupled Receptor*")

GRKs, quinasas receptoras acopladas a proteínas G (del inglés, "*G protein-coupled receptor kinase*")

F, constante de Faraday (96.485 Coulomb/mol).

I, corriente total (Ampere)

i, corriente iónica unitaria de canal (Ampere)

IFT, transporte intraflagelar (del inglés, "*Intraflagellar Transport*")

IP3, inositol-3-fosfato

IP3R, receptor de inositol-3-trifosfato

i/V, relación corriente-voltaje

JNK: quinasa Jun amino-terminal (del inglés, "*Jun N-Terminal kinase*")

KIF3, quinesina miembro de la familia 3 (del inglés, "*Kinesin Family member 3*")

Kir, canales de potasio rectificadores hacia adentro

MAPK, proteínas quinasas activadas por mitógenos (del inglés, "*Mitogen-Activated Protein Kinases*")

MEK, MAPK quinasa

MTs, microtúbulos

NMDA, N-metil-D-aspartato

PACS, proteína de clasificación citosólica

PBS, solución salina con buffer fosfato (del inglés "*Phosphate buffered saline*")

PC1, policistina-1, TRPP1

PC2, policistina-2, TRPP2

PC2_{iv}, policistina-2 producto de traducción *in vitro*

PFA, para-formaldehído

PI4K, fosfatidilinositol 4-quinasa

PKA, proteína kinasa A

PKC, proteína kinasa C

PLA2, fosfolipasa A2 (del inglés, "*phospholipase A2*")

PLC, fosfolipasa C (del inglés, "*Phospholipase C*")

PLD, fosfolipasa D (del inglés, "*Phospholipase D*")

PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo

POPC, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

POPE, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina

PQRAD, poliquistosis renal autosómica dominante

PQRAR, poliquistosis renal autosómica recesiva

PtdIns(4,5)P₂, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

R, resistencia eléctrica (Ohm)

RE, retículo endoplásmico

RyR, receptor de rianodina

SFB, suero fetal bovino

STh, sinciciotrofoblasto humano

siRNA, pequeño ARN de interferencia (del inglés, "*small interfering RNA*")

TBS, solución salina tamponada con tris(hidroximetil)aminometano (del inglés, "*Tris-Buffered Saline*")

TBST, solución salina tamponada con tris(hidroximetil)aminometano y tween 20 (del inglés, "*Tris-Buffered Saline with tween 20*")

TM, dominios transmembrana

trans, compartimiento cuyas soluciones bañan la cara extracelular de la membrana

TRP, familia de canales cuya sigla proviene del inglés "*Transient Receptor Potential*"

V, diferencia de potencial eléctrico (Volt)

V_{rev}, potencial de reversión

V2R, receptor de vasopresina tipo 2

WB, Western blot

El presente trabajo de tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones y/o presentaciones a congresos y reuniones científicas

Publicaciones en revistas indizadas de carácter internacional

1. Cantero MR, Perez PL, **Scarinci N**, Cantiello HF. Two-dimensional brain microtubule structures behave as memristive devices. *Sci Rep*, 27;9(1):12398, 2019.
2. Lal S, **Scarinci N**, Perez PL, Cantero MR, Cantiello HF. Lipid bilayer-atomic force microscopy combined platform records simultaneous electrical and topological changes of the TRP channel Polycystin-2 (TRPP2). *PLOS One*, 13(8):e0202029, 2018.
3. Cantero MR, Villa Etchegoyen C, Perez PL, **Scarinci N**, Cantiello HF. Bundles of brain microtubules generate electrical oscillations. *Sci Rep*, 8(1):11899, 2018.
4. Dai XQ*, Perez PL*, Soria G, **Scarinci N**, Smoler M, Morsucci DC, Suzuki K, Cantero MR, Cantiello HF. External Ca^{2+} regulates polycystin-2 (TRPP2) cation currents in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Exp Cell Res*, 350(1):50-61, 2017.

Artículos en Revisión y en Preparación

Perez PL*, **Scarinci N***, Cantiello HF, Cantero MR. Polycystin-2 (TRPP2) Regulates Primary Cilium Length in LLC-PK1 Renal Epithelial Cells. *En revisión en la revista Cilia*.

Scarinci N*, Gutierrez BC*, Bonacina J, Perez PL, Cantero MR, Cantiello HF. The Primary Cilium of Renal Epithelial Cells is a Ca^{2+} -Sensitive Electrical Antenna. *En preparación*.

Scarinci N*, Perez PL*, Cantiello HF, Cantero MR. Ca^{2+} -Dependent Regulation by the Cyclic AMP Pathway the Primary. *En preparación*.

Comunicaciones a Congresos y Reuniones Científicas

1. Cantero MR, Perez PL, **Scarinci N**, Gutierrez BC, Bonacina J, Cantiello HF. Electrical oscillations generated by different structures of brain microtubules. Emerging Concepts of the Neuronal Cytoskeleton – EMBO Workshop. Villarrica, Temuco, Chile. Abril 14-18, 2019.
2. Perez PL, **Scarinci N**, Cantero MR, Cantiello HF. Effect of the camp pathway on the length of the primary cilium of LLC-PK1 renal epithelial cells. Reunión Anual Conjunta SAIC, SAI, SAFIS. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Noviembre 14 - 17, 2018.
3. **Scarinci N**, Perez PL, Cantiello HF, Cantero MR. Functional characterization of a Polycystin-2-Calcium Sensing Receptor complex present in LLC-PK1 renal epithelial cells. Reunión Anual Conjunta SAIC, SAI, SAFIS. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Noviembre 14 - 17, 2018
4. **Scarinci N**, Perez PL, Cantero MR, Cantiello HF. Functional characterization of a calcium-sensing receptor-polycystin-2 channel complex in the plasma membrane of LLC-PK1 cells. 62th Annual Meeting of the Biophysical Society. San Francisco, California, USA. Febrero 17 - 21, 2018
5. Perez PL, **Scarinci N**, Cantero MR, Cantiello HF. Regulation of ciliary length in LLC-PK1 renal epithelial cells. 62th Annual Meeting of the Biophysical Society. San Francisco, California, USA. Febrero 17 - 21, 2018
6. Cantero MR, Perez PL, Villa Etchegoyen C, **Scarinci N**, Cantiello HF. Generation of electrical oscillations by different microtubule structures. 62th Annual Meeting of the Biophysical Society. San Francisco, California, USA. Febrero 17 - 21, 2018
7. Perez PL, **Scarinci N**, Cantero MR, Cantiello HF. Effect of extracellular calcium on ciliary length in LLC-PK1 renal epithelial cells. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires, Noviembre 13-17, 2017.

8. **Scarinci N**, Perez PL, Cantero MR, Cantiello HF. Preliminary functional characterization of a calcium-sensing receptor, polycystin-2 channel complex in the plasma membrane of LLC-PK1 cells. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires, Noviembre 13-17, 2017.
9. Cantero MR, Villa Etchegoyen C, Perez PL, **Scarinci N**, Cantiello HF. Oscillatory currents generated by bundles of brain microtubules. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires, Noviembre 13-17, 2017.
10. Rodriguez Santos IP, **Scarinci N**, Cantiello HF, Cantero MR. Brain microtubule reconstitution in lipid bilayer system is associated with the presence of cation-selective channel activity. 60th Annual Meeting of the Biophysical Society. Los Angeles, California, USA. Febrero 27 - Marzo 2, 2016

Capítulo Uno

Introducción

1.1. El Movimiento Transmembranal de Iones y los Canales iónicos

Las membranas biológicas están compuestas por cadenas hidrocarbonadas de fosfolípidos, altamente impermeables a los iones (Hille, 1992). Es por ello que los mismos pasan a través de la membrana mediante proteínas intrínsecas que constituyen poros proteicos, denominados canales iónicos. La presencia de estos canales aumenta la permeabilidad y selectividad de la membrana al paso de determinados iones, que la atraviesan en una dirección determinada, en función del gradiente electroquímico (Hille, 1992). El transporte de iones a través de canales requiere la presencia de un poro hidrofílico de alta permeabilidad iónica. Se puede considerar a los canales iónicos como enzimas (Moczydlowski, 1986) cuya propiedad catalítica está asociada al aumento en la velocidad de transporte de iones a través de las membranas biológicas (Eisenman, 1987). El pasaje de iones a través de los canales produce también cambios en los campos eléctricos locales, que tienen un papel fundamental en todos los procesos fisiológicos, siendo tan variados como el establecimiento de los potenciales de reposo y acción, la movilidad y contracción celulares, la comunicación célula-célula y la proliferación celular, entre otros (Hille, 1992). Todos los procesos celulares, dependen de un modo u otro del flujo electrodifusional de iones a través de los canales iónicos y los defectos en estas proteínas tienen un impacto fisiológico importante.

El transporte mediado por canales es la consecuencia de fluctuaciones espontáneas y azarosas entre estados energéticos que inducen procesos de apertura y cierre del canal, es decir entre sus estados conductivos y no conductivos (Fig. 1) (Colquhoun, 1983). El transporte iónico a través de canales ocurre a velocidades cercanas a los 10^7 - 10^8 iones/s lo que representa tres órdenes de magnitud mayor respecto de otros tipos de transportadores (Moczydlowski, 1986). Cada canal presenta un tipo de actividad característica. Sin embargo, todos los registros eléctricos obtenidos de la actividad de canales tienen al menos un nivel de corriente mínima, usualmente indistinguible del cero de corriente instrumental, que se conoce como estado cerrado del canal, y al menos un estado conductivo o abierto (Fig. 1). Cada nivel (conductivo o cerrado) corresponde a una conformación específica del canal donde las transiciones entre una y otra ocurren en el rango de microsegundos hasta

segundos (Colquhoun, 1983). Son estas fluctuaciones estocásticas en el comportamiento de un canal iónico las que juegan una función fundamental en la magnitud del transporte iónico a través de canales.

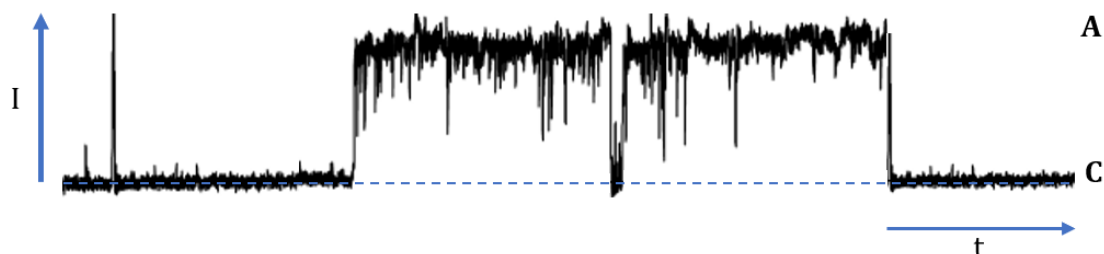


Figura 1. Registro eléctrico de un canal iónico. Se observan fluctuaciones espontáneas entre dos estados (abierto -A- y cerrado -C-) correspondientes a la corriente iónica (intensidad, I) que pasa a través del mismo en un determinado intervalo de tiempo (t).

Los canales iónicos generalmente manifiestan lo que se conoce como selectividad iónica, que es el pasaje preferencial de una (o varias) especie(s) iónica(s) respecto de otra(s). Los canales deben esta propiedad a la presencia de una región llamada “filtro de selectividad” (Hille, 1992), con grupos químicos aportados por los aminoácidos que configuran el poro conductor, y que interactúan con las especies iónicas que lo atraviesan de forma tal que el transporte de un ion particular esté energéticamente favorecido. Esta interacción energética permitiría explicar cómo un canal puede ser “selectivo” para un ion como el K^+ , que, aún siendo más grande, es más “permeable” que otro ion más chico, como lo es el Na^+ (Hille, 1992; Doyle, 1998).

1.2. Canales TRP

Los canales TRP constituyen una de las familias más recientemente caracterizadas y está conformada en su mayoría por canales catiónicos no selectivos con distribución ubicua y de funciones variadas (Montell, 2001). Su patrón de distribución tisular es muy amplio, habiéndose detectado en prácticamente todos los tejidos, teniendo una función crucial en la transducción sensorial (Emmons, 1999; Minke, 2010; Zhang, 2015). Estos canales son de importancia fundamental

por su contribución al potencial de reposo y, por ende, a una variedad de mecanismos celulares tanto en células excitables como no excitables (Emmons, 1999; Minke, 2010; Montell, 2001; Zhang 2015). El primer gen *trp* fue clonado de la *Drosophila melanogaster* (Montell, 1989). En la observación original se determinó que una mutación en el locus *trp* causaba una menor respuesta a la luz en el ojo de la *Drosophila*, cuya magnitud volvía al valor basal rápidamente luego de la excitación (Minke, 1975; Minke, 2010). Estudios electrofisiológicos revelaron que en los casos en que el gen *trp* presente en los fotorreceptores estaba mutado, la permeabilidad al Ca^{2+} también estaba reducida. Así fue como se identificó el primer canal TRP, siendo este un canal permeable al Ca^{2+} , con una función clave en la fototransducción en *Drosophila* (Minke, 2010). Posteriormente, se encontraron varios homólogos del TRP en distintos animales, desde invertebrados hasta mamíferos, incluidos los seres humanos (Montell, 2001). La variedad es tan grande, que los canales TRP de mamíferos se han convertido en una superfamilia que contiene al momento por lo menos siete subfamilias reconocidas y descritas: TRPA (anquirina), TRPC (canónico o clásico), TRPM (melastatina), TRPML (mucolipinas), TRPP (policistinas), TRPV (vainilloide) y TRPN (nompC, not mechanoreceptor potential C) (Montell, 2001; Clapham, 2001; Nilius, 2011).

La subfamilia TRPV se compone de seis miembros. De ellos, TRPV1-4 se expresan principalmente en los ganglios sensoriales y la piel, siendo responsables de la termo sensación, dolor y picazón, mientras que TRPV5 y TRPV6 se expresan principalmente en el riñón y el tracto gastrointestinal y tienen un papel importante en la absorción y homeostasis del Ca^{2+} (Zhang, 2015; Yamamoto, 2016). La subfamilia TRPM es la más grande, constando de ocho miembros ampliamente expresados en una variedad de células y tejidos, como lo son los ganglios sensoriales, las células beta pancreáticas, células inmunes, y órganos como la lengua, el corazón y el riñón. Estos canales son críticos para la fisiología sensorial, la liberación de insulina, la homeostasis del Mg^{2+} y las lesiones inflamatorias (Nilius, 2011; Yamamoto, 2016). TRPA1 es el único miembro de la subfamilia TRPA, involucrado en el dolor, la picazón y la inflamación (Nilius, 2011; Yamamoto, 2016). TRPC incluye siete subtipos ampliamente expresados en

el sistema nervioso central y varios otros tejidos que participan en diversas afecciones, como el desarrollo neuronal y la epilepsia (Nilius, 2011). Los canales TRPML se localizan principalmente en endosomas y lisosomas críticos para el movimiento de vesículas y la homeostasis iónica (Nilius, 2011; Yamamoto, 2016).

La subfamilia TRPP incluye las policistinas que se dividen estructuralmente en dos grupos, la proteína asociada a la PQRAD-tipo 1 (tipo PC1, similar a *PKD1*, TRPP1) y la policistina 2, o proteína asociada a PQRAD-tipo 2 (tipo PC2, similar a *PKD2*, TRPP2) (Montell, 2001; Delmas, 2004a). Los miembros del grupo similar a *PKD1* son TRPP1, PDKREJ, PKD1L1, PKD1L2 y PKD1L3. Los miembros similares a *PKD2* comprenden PKD2 (PC2), PKD2L1 y PKD2L2, que han sido renombrados como TRPP2, TRPP3 y TRPP5, respectivamente. Las mutaciones en TRPP1 y TRPP2 causan la poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD). TRPP1 y las proteínas similares a TRPP1 son completamente diferentes estructuralmente de las proteínas de tipo canales (Xu, 2003).

Los miembros de la familia TRP poseen seis dominios transmembrana (TM) con ambas colas, carboxi- y amino- terminales, orientadas hacia el citoplasma y la presencia de ciertos motivos repetidos como los dominios ankirina y las manos EF (Montell, 2001). Esta topología (Fig. 2a) es similar a la de canales catiónicos activados por voltaje y por nucleótidos (Wood, 1995). Los segmentos ubicados entre las porciones TM 5 y 6, contribuyen a la formación del poro del canal. La indentación que forma el bucle P (P- "loop") está compuesta generalmente por una hélice α , seguida de una extensa región que forma el filtro de selectividad (Sheng, 2001; Voets, 2003). Los residuos cargados negativamente en el filtro serían críticos para la permeabilidad selectiva (perm-selectividad) a distintos cationes (Owsianik, 2006a y b). Los canales TRP estarían conformados estructuralmente como homotetrámeros con cuatro monómeros necesarios para formar el canal funcional, tal como hemos descrito para la PC2 (Zhang, 2009) (Fig. 2b), y más recientemente con una técnica desarrollada en el laboratorio, para determinar simultáneamente la topología por microscopía de fuerza atómica (MFA) y su funcionalidad eléctrica por reconstitución (Lal, 2018).

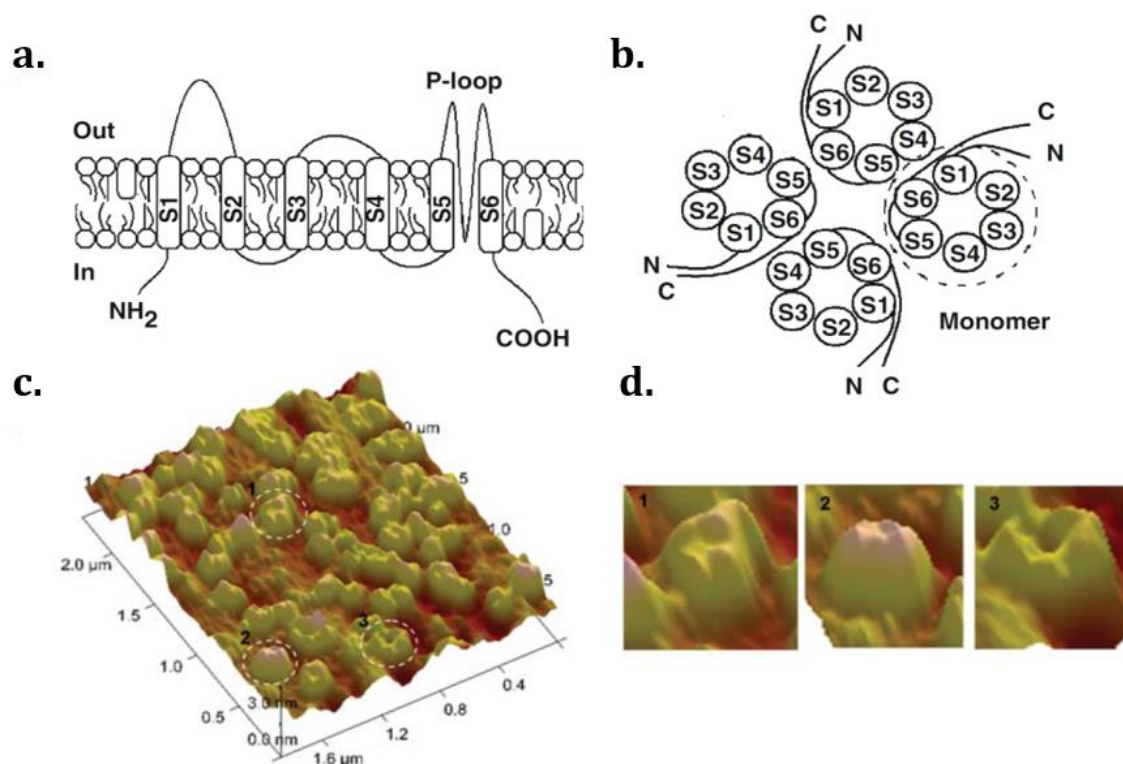


Figura 2. Estructura del canal PC2. **(a)** Topología del monómero de PC2, con 6 TM y extremos carboxi- y amino- terminales citoplasmáticos. **(b)** Distribución teórica de cuatro monómeros formando el tetrámero de la PC2, orientando los TMs 5 y 6 para la formación del poro (Cantero, 2011). **(c)** Los canales PC2 se identificaron por MFA en solución, como estructuras redondas, que a menudo mostraban una indentación central y una estructura tetra-lobular (Zhang, 2009). **(d)** Se muestran tres estructuras de PC2 expandidas resaltadas en los círculos en el panel C, donde 2 y 3, representan canales cerrados y abiertos, respectivamente, como hemos identificado recientemente (Zhang, 2009).

1.3. Poliquistosis Renal Autosómica Dominante

La poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD) es la enfermedad monogénica más común en los humanos, con una frecuencia que varía entre 1:400 y 1:1000, afectando a más de 12.000.000 de personas en todo el mundo, independientemente del sexo o etnia (Dalgaard, 1957; Arnaout, 2001; Sutters, 2003). Esta enfermedad es una causa sumamente importante de hipertensión arterial e insuficiencia renal crónica y representa el 10% de los casos de enfermedad renal en etapa terminal. La PQRAD resulta de la proliferación excesiva de células epiteliales tubulares renales y la remodelación de las estructuras circundantes, dando lugar al crecimiento de quistes revestidos de epitelio,

acompañados de fibrosis y acumulación de matriz extracelular. A medida que progresa la enfermedad se produce la destrucción del parénquima renal normal, agrandamiento renal masivo, deterioro de la función renal y, finalmente, insuficiencia renal en 50% de los individuos afectados al final de la edad adulta (Gallagher, 2010). La PQRAD es causada por mutaciones en los genes *PKD1* (~85%) y *PKD2* (~15%) (Mochizuki, 1996). Los quistes se pueden desarrollar en otros órganos, como el hígado y el páncreas. La enfermedad está también asociada a la formación de aneurismas intracraneales y anormalidades cardiovasculares tales como el prolapso de la válvula mitral (Ivy, 1995), de tal manera que, si bien la enfermedad tiene la más alta morbilidad y mortalidad en sus formas renales, se la puede considerar una enfermedad sistémica con complicaciones extra-renales severas.

En la República Argentina, la PQRAD es la causa de insuficiencia renal en el 7.2% de los pacientes con insuficiencia renal crónica terminal (Registro, 1994). En la actualidad, se piensa que el complejo formado por las PC1 y PC2 en el cilio primario (CP) de las células epiteliales renales, actuaría como un mecanosensor de flujo, lo que desencadenaría la liberación de Ca^{2+} intracelular a través de la activación de la PC2 en respuesta a los cambios de flujo de fluido (Zhang, 2009; Tsiokas, 2009). A su vez, la PC2 regularía la liberación de Ca^{2+} intracelular ya sea interactuando con canales permeables al Ca^{2+} como TRPC1 y TRPV4 en la membrana plasmática y en los CPs, y/o a través de una asociación con rianodina y receptores IP3 en el RE (Zhang, 2009; Tsiokas, 2009). La pérdida funcional de la PC2 causaría la interrupción de la señalización del Ca^{2+} , lo que se considera un acontecimiento primario para la formación de quistes en la PQRAD, pudiendo afectar la entrada de Ca^{2+} en el CP, a través de la membrana plasmática y el RE (Nauli, 2003). Si bien se sabe que la disfunción de las polycistinas provoca la activación aberrante de diferentes vías asociadas con la proliferación celular anormal y la secreción de fluidos, la cascada de eventos que ocurren entre la pérdida de función de la PC2 y la formación de quistes renales en la PQRAD aún no ha sido completamente comprendida. En los CPs, si bien los complejos PC1/PC2, PC2/TRPC1 y PC2/TRPV4 regularían la señalización de Ca^{2+} , la depleción de TRPC1 y TRPV4 no está asociada con la formación de quistes en ratones ni peces cebra, a pesar de que alteran la

señalización del Ca^{2+} ciliar (Kottgen, 2008). Por lo tanto, el deterioro de la señalización de Ca^{2+} ciliar por sí solo no es suficiente para desencadenar el desarrollo de quistes renales, un proceso que, en cambio, parece estar estrechamente relacionado con la actividad y función de las proteínas PC1 y PC2.

1.4. El Canal Policistina-2

El descubrimiento de la PC2 estuvo ligado a la observación que las mutaciones del gen *PKD2*, son causantes de la PQRAD. Mochizuki y cols (1996) descubrieron el gen *PKD2*, como el segundo locus responsable de esta enfermedad, siendo el primer responsable la mutación en el gen *PKD1* que codifica a la PC1. La PC1 presenta 11 dominios TM, un gran extremo amino-terminal extracelular y una cola carboxi-terminal corta citoplasmática que interactúa con el carboxi terminal de PC2 (Delmas, 2004b). La secuencia de la PC2 presenta homología con canales de Ca^{2+} y Na^+ voltaje-activables, en particular los segmentos TM dos a seis (Mochizuki, 1996). En su extremo carboxi-terminal presenta un dominio de unión al Ca^{2+} del tipo EF y un motivo PACS, cuya función está relacionada con el movimiento de la PC2 a las organelas y a la superficie celular (Kottgen, 2005). La primera caracterización funcional de la PC2 como canal catiónico no selectivo permeable al Ca^{2+} se hizo en el sinciotrofoblasto humano (STh) de placenta a término (González-Perrett, 2001) donde se demostró que la PC2 endógena tiene una conductancia de 177 pS con 4 subestados. La PC2 es sensible al amiloride con baja afinidad ($K_i \approx 80 \mu\text{M}$, González-Perret, 2001) y tiene baja perm-selectividad al Ca^{2+} , siendo la relación de permeabilidad $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ de 1/1,3. Se demostró también que en gradiente de K^+ , la actividad del canal se reduce sólo parcialmente en presencia de una alta concentración de Ca^{2+} (90 mM) del lado externo (*trans*), permitiendo así que las especies iónicas sigan transportándose. Es de notar que otros canales de la familia TRP han sido postulados como principales vías de transporte de Ca^{2+} en este tejido, presentando inhibición a concentraciones cercanas a las fisiológicas (Hoenderop, 2005), algo que no ocurre en la PC2 a diferencia de canales de Ca^{2+} como el tipo L y similares (Li, 2002; Nilius, 2003). La función de la PC2 es voltaje dependiente y altamente sensible a los cambios de pH (González-Perrett, 2002), observándose que su probabilidad de abierto sigue una función de Boltzmann respecto del potencial

impuesto, cuya dependencia se altera a bajo pH. La PC2 está involucrada en la entrada de Ca^{2+} en distintos tejidos epiteliales y órganos (González-Perrett, 2001; Luo, 2003; Tsiokas, 2009; Narayanan, 2013; Zhao, 2015). La contribución de la PC2 a la señalización celular y la homeostasis del Ca^{2+} ha sido reportada en diferentes compartimentos celulares, incluyendo el CP, reservorios intracelulares de Ca^{2+} y la membrana plasmática (Koulen, 2002; Raychowdhury, 2005; Tsiokas, 2009; Zhou, 2009; Dai, 2017). Por lo tanto, la PC2 cumple un rol importante en la entrada y activación celular mediada por Ca^{2+} .

Originalmente, se postuló que la PC2 y la PC1 funcionarían a modo de complejo funcional receptor - canal (Nauli, 2003; Xu, 2003). Esto ha sido comprobado en una variedad de tejidos y en particular en el CP de las células renales (Li, 2006), en donde funcionaría como un sensor de flujo, lo que desencadenaría la liberación de Ca^{2+} intracelular a través de la activación del canal PC2 en respuesta a los cambios de flujo de fluido. La interrupción de este complejo afectaría la entrada de Ca^{2+} intracelular, lo que conduciría al desarrollo y expansión de los quistes renales (Nauli, 2003). Independiente de su localización (Koulen, 2002), se esperaría que la PC2 tenga una función como transductor de señales (Cantiello, 2004). A diferencia de la PC2, que es similarmente expresada en tejidos fetales y adultos, la expresión de PC1 es mayor durante el desarrollo fetal (Ong, 1999), lo que sugirió que, a diferencia de lo postulado originalmente, las dos proteínas no siempre estarían asociadas o funcionando en el mismo complejo, reforzando la idea de que la PC2 sería funcional independientemente de la presencia de la PC1 (González-Perrett, 2001; Chauvet, 2002).

1.4.1. Mecanismos de Regulación de la PC2

Los cambios en la concentración del ion Ca^{2+} constituyen uno de los mecanismos más importantes de regulación a nivel celular. Por ello, es de particular importancia el estudio de los mecanismos reguladores de la PC2 por el mismo. El Ca^{2+} transportado por la PC2 podría regular su propio transporte a través de mecanismos de retroalimentación similares a los observados en los canales de Ca^{2+} voltaje-activables (Hille, 1992). El extremo carboxi-terminal de la PC2 presenta una mano

EF similar a la existente en varios canales TRP, como así en la subunidad α del canal de Ca^{2+} de tipo L (Hille, 1992). Esto ha hecho suponer que el Ca^{2+} intracelular podría regular al canal mediante una interacción directa con el mismo. Cai y cols (2004), observaron que la PC2 es fosforilada por la caseína quinasa II en la serina 812 (Ser-812) ubicada en su región carboxi-terminal. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la producción local de AMPc y la PKA regulan la actividad de PC2, lo que contribuye a la entrada de Ca^{2+} en las células. En particular, la fosforilación del residuo clave Ser-829 por PKA en PC2 presenta una función de canal altamente activa, que a su vez aumentaría la entrada de Ca^{2+} lo que podría retroalimentar las señales de AMPc (Cantero, 2015b).

Recientes estudios de nuestro laboratorio, han demostrado una regulación de la PC2 por Ca^{2+} externo (Dai, 2017). Mediante la técnica del “*clampeo*” de voltaje en células LLC-PK1, se observó que el agregado de Ca^{2+} externo indujo un aumento de la conductancia, teniendo la PC2 una participación importante en esta regulación. Hemos reportado también (Cantero, 2013) que el Ca^{2+} citoplasmático regula la actividad de canal de la PC2. En un sistema de reconstitución de canales en bicapas lipídicas, el agregado al lado citoplasmático del canal de quelantes de Ca^{2+} tales como el EGTA o el BAPTA, inhibió espontáneamente la actividad de la PC2 proveniente del STh (PC2_{sth}), con un tiempo de inhibición dependiente del quelante utilizado. El quelado con EGTA redujo las corrientes en un 86%, con un $t_{1/2}$ de 3,6 min, mientras que el BAPTA eliminó rápido y completamente la actividad del canal con un $t_{1/2}$ de 0,8 min. La titulación subsecuente incrementando la concentración de Ca^{2+} interno revirtió la inhibición, siguiendo una función del tipo de Hill con una $K_D = 1\text{-}5$ nM, y evidenciando al menos cuatro sitios de unión al Ca^{2+} . El grado de inhibición fue dependiente de la concentración de Ca^{2+} externo. Mediante la estimación de la geometría del canal (Zhang, 2009) y la teoría expuesta por Läuger (1973), hemos reportado un flujo máximo teórico de Ca^{2+} a través del canal de $3,92 \times 10^{-15}$ mol/s, con una conductancia máxima de 6,30 pS en presencia de tan solo 1 mM Ca^{2+} (Cantero, 2013). Nuestros datos experimentales validaron estos valores, dando para relaciones de corriente-voltaje de canal único de la PC2_{sth} en condiciones biónicas (K^+ 150 mM vs Ca^{2+} 90 mM) una conductancia al Ca^{2+} de 0,12-1,33 pS.

Cuando se exploró la actividad de la PC2 obtenida como producto de traducción *in vitro* (PC2_{iv}), sin embargo, se observó que la misma era completamente insensible al Ca²⁺, sugiriendo que los sitios de regulación por Ca²⁺ no serían intrínsecos al canal. Estudios previos de nuestro laboratorio indicaron que las estructuras de MTs presentes en el CP, controlarían la actividad de la PC2 (Li, 2006), con lo que la entrada de Ca²⁺ por este canal y otros mecanismos ciliares, serían un paso central en la función del CP. Esto hizo suponer que la sensibilidad al Ca²⁺ estaría conferida mediante componentes del citoesqueleto (Cantero, 2015a). También en nuestro laboratorio se ha demostrado, por ejemplo, que la PC2 interactúa física y funcionalmente con proteínas acopladoras de actina como la α -actinina (Li, 2005) y la gelsolina (Montalbetti, 2005b) ambas con conocida función Ca²⁺ dependiente (Chaponnier, 1987). El agregado de la proteína de unión a la actina, α -actinina, del lado citoplasmático, por ejemplo, aumentó la actividad de la PC2_{iv} en presencia de Ca²⁺, mientras que fue inhibitoria en su ausencia. Por el contrario, la filamina tuvo un fuerte efecto inhibitorio sobre la función de la PC2_{iv} en presencia, pero no en ausencia de Ca²⁺ *cis*. La gelsolina estimuló la función de canal de la PC2_{iv} en presencia, pero no en ausencia de Ca²⁺ *cis*. Por el contrario, la profilina, que comparte los dominios de unión a la actina con la gelsolina, aumentó significativamente la función del canal de la PC2_{iv} tanto en presencia como en ausencia de Ca²⁺. El efecto distinto de las proteínas de unión a la actina sobre la función de la PC2_{iv} demuestra que la regulación por Ca²⁺ del canal, es mediada por interacción directa con elementos estructurales del citoesqueleto de actina (Cantero, 2015a). En su conjunto, estos datos indicarían que los complejos específicos de proteínas del citoesqueleto conferirían sensibilidad al Ca²⁺ proporcionando así diversidad funcional al control que este ejerce sobre la PC2.

1.5. Receptores Acoplados a Proteína G

La familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR) incluye más de 800 miembros, que comprenden aproximadamente el 4% del genoma humano codificado, por lo que es la mayor familia de genes involucrados en la transducción de señales (Fredriksson, 2003; Pierce, 2002). Comparten una topología común de

siete dominios transmembrana (TM7) y son responsables de la transducción de una amplia variedad de señales externas en las funciones intracelulares (Pierce, 2002). Hace más de tres décadas se demostró que la unión del ligando de TM7 daba como resultado una señalización intracelular mediante el acoplamiento del receptor a un nucleótido de guanina heterotrimérico o proteínas G (formadas por subunidades alfa, beta y gama) (Rodbell, 1971; Northup, 1983). Al activarse, los GPCR sufren cambios conformacionales que transmiten a las proteínas G, las cuales inician un ciclo de activación-inactivación asociado a la unión e hidrólisis de GTP y conducen a la modulación positiva o negativa de efectores, ya sean canales iónicos y/o enzimas generadoras de segundos mensajeros, permitiendo la propagación de señales en el interior celular (García-Saínz, 2008).

Hay dos vías de transducción de señales principales que involucran a los GPCR: la vía del AMPc y la del fosfatidil-inositol (IP3). Sin embargo, una gran cantidad de investigaciones han demostrado que muchos GPCR tienen un comportamiento de señalización más complejo (Rosenbaum, 2009). Los GPCR no son estructuras rígidas que alternan entre una conformación activada y una desactivada, sino que pueden adoptar una serie de conformaciones fugaces que son determinadas por el ligando, otros receptores y proteínas reguladoras, modificaciones traslacionales y condiciones ambientales (Rosenbaum, 2009; Latorraca, 2016). Los GPCR en vertebrados se dividen comúnmente en cinco familias según su secuencia y similitud estructural: rodopsina (familia A), secretina (familia B), glutamato (familia C), adhesión y Frizzled, siendo la familia A, la más grande y diversa (Rosenbaum, 2009). La importancia de estos receptores se refleja en el rango de procesos fisiológicos clave que regulan, incluyendo la visión, el olfato, la neurotransmisión, la liberación de hormonas y enzimas, la respuesta inmune, la hemostasia, la respuesta cardíaca y el desarrollo tisular, entre otros (Wise, 2002). De hecho, las disfunciones de los GPCR contribuyen a enfermedades humanas de alta prevalencia, siendo el objetivo de aproximadamente el 40% de todos los fármacos utilizados en la práctica clínica en la actualidad (Wise, 2002).

1.5.1. El Receptor Sensor de Calcio

El Receptor Sensor de Calcio (CaSR, del inglés *Calcium-Sensing Receptor*) es un detector de los niveles extracelulares de Ca^{2+} del tipo de los GPCR que se encuentra expresado en una variedad de tejidos del organismo. El CaSR consta de una cadena polipeptídica de 1.078 o 1.085 aminoácidos, dependiendo de la isoforma expresada (Brown, 1993; Garret, 1995), y contiene tres regiones estructurales: (1) Un extremo amino-terminal formado por 612 residuos que constituye el dominio extracelular de la proteína; (2) un dominio de anclaje a la membrana formado por TM7, característicos de los GPCRs y (3) un extremo carboxi-terminal intra-citoplasmático de 216 aminoácidos (Brown, 1993; Bai, 2004). El dominio TM incluye siete regiones hidrofóbicas que forman hélices unidas por bucles intra- y extracelulares alternados (Garret, 1995). Este dominio participa en la dimerización del receptor a través de interacciones no covalentes en el dominio TM5, que actúa como transductor de señales. La unión al ligando en el dominio extracelular provoca un cambio conformacional de los dominios TM3 y TM4 que induce la activación de proteínas G a través de los bucles intracelulares 2 y 3 (Bai, 2004).

Los agonistas de CaSR se pueden dividir entre los que activan directamente al receptor, también llamados activadores tipo I, y los moduladores alostéricos o activadores tipo II, que se unen en la región transmembrana e inducen un cambio conformacional del receptor que lo torna más sensible a los cambios de las concentraciones de los verdaderos agonistas, como el Ca^{2+} (Hofer, 2003; Magno, 2011). El Ca^{2+} extracelular es el ligando o activador del CaSR por excelencia, pero hay diferentes estímulos que pueden modular la actividad de este receptor incluyendo, como activadores tipo I, a otros cationes divalentes (Mg^{2+} , Be^{2+} , Ba^{2+} y Sr^{2+}), metales, poliaminas (espermina, espermidina, putrecina), polipéptidos, antibióticos (neomicina, tobramicina, gentamicina, kanamicina), y cambios en el pH, entre otros (Brown 1993, 2001; Hofer, 2003). Entre los activadores tipo II positivos se encuentran el glutatión, los L-aminoácidos y compuestos calcimiméticos como el R568 y el cinacalcet (Hofer, 2003). Los moduladores alostéricos negativos corresponden a calcilíticos como el Ronacaleret (Hofer, 2003).

La principal función de este receptor es la regulación de la calcemia mediante la detección de las fluctuaciones del Ca^{2+} extracelular, regulando la secreción de hormona paratiroidea (PTH) en las glándulas paratiroides y de calcitonina en las células C de la tiroides. Un aumento de la calcemia induce la secreción de calcitonina, que inhibe la resorción ósea y a la vez estimula la excreción urinaria de Ca^{2+} . Por el contrario, cuando la calcemia disminuye, se secreta PTH, que promueve el aumento del Ca^{2+} plasmático mediante el incremento de la resorción ósea, la reabsorción de Ca^{2+} en los túbulos renales y la absorción intestinal de este catión (Hofer, 2003).

La señalización por CaSR se inicia con la activación de las proteínas G heterotriméricas asociadas. Se ha demostrado que el CaSR se une a $\text{G}\alpha_{i/0}$ y $\text{G}\alpha_{q/11}$ (Brown, 2001; Hofer, 2003; Ward, 2004) (Fig. 3). El acoplamiento del CaSR con $\text{G}\alpha_{i/0}$ y $\text{G}\alpha_{q/11}$ da lugar a la activación de la fosfolipasa C (PLC), un aumento transitorio del segundo mensajero inositol- 3-fosfato (IP3) y la liberación del Ca^{2+} almacenado en el RE, activando la proteína quinasa C (PKC) (Brown, 2001; Hofer, 2003; Ward, 2004). Este acoplamiento también se asocia al inicio de las cascadas de MAPK (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase family*), incluyendo las serina/treonina quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) 1 y 2, la quinasa 38 (p38MAPK) y la quinasa activada por estrés c-Jun N-terminal (JNK) (Kifor, 2002; Ward, 2004). La vía de ERK1/2 se activa a través de la vía de PI3K (fosfatidil-inositol-3-quinasa), PKC y filamina (Ward, 2004; Hobson, 2003), así como por la activación de receptores tirosina quinasa a través de la cascada de señalización de la proteína de unión a GTP de bajo peso molecular, p21 Ras (Smajilovic, 2007). La señal de activación de Ras-Raf, fosforila y activa a la MEK 1/2 (MAPK/ERK quinasa). Finalmente, se activa ERK 1/2 que, una vez fosforilada, es capaz de localizarse en el núcleo uniéndose al ADN y regulando procesos celulares como la diferenciación, proliferación, apoptosis celulares, y el ciclo celular (Chang, 2001).

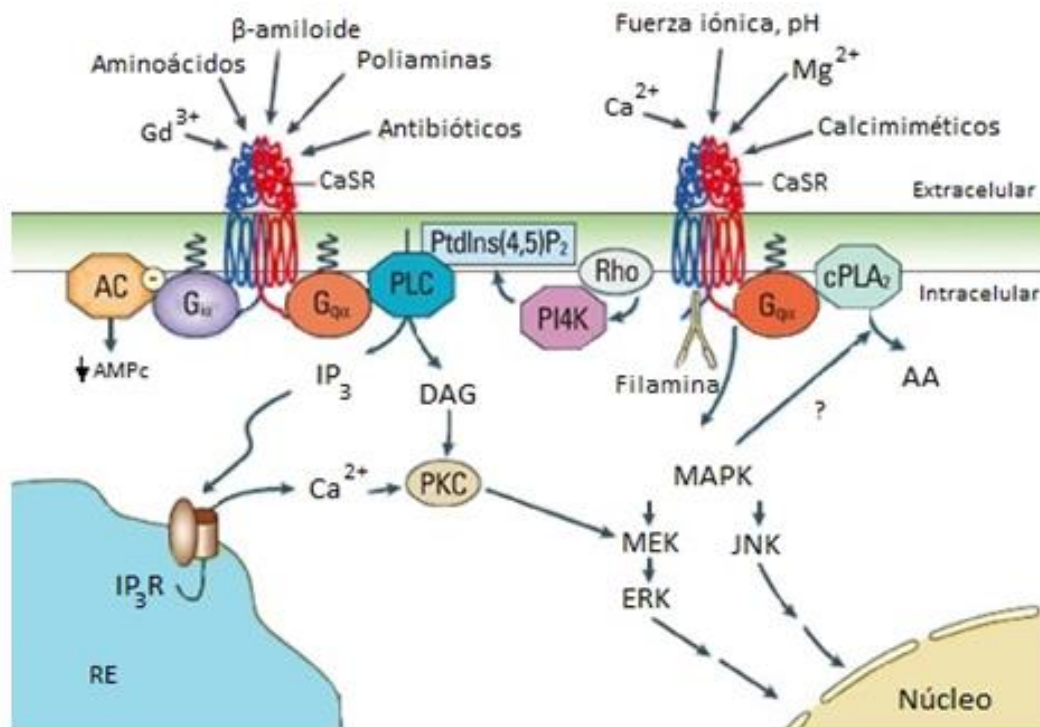


Figura 3. Vías de señalización mediadas por CaSR. Se observan los numerosos agonistas que convergen en la activación del CaSR para inducir diversas cascadas de señalización intracelular. Una vez estimulado, el CaSR estimula proteínas G triméricas para la consecuente activación de distintas fosfolipasas, asociadas a señales intracelulares de Ca^{2+} . A su vez, la activación del receptor estaría asociada a una inhibición en la producción de AMPc por inhibición de ACs, y a remodelación del citoesqueleto Ca^{2+} -dependiente. (Imagen modificada de Hofer, 2003).

Además de la vía de la PLC, el CaSR activa otras dos fosfolipasas: fosfolipasa D (PLD) y fosfolipasa A2 (PLA2). Esto promueve la formación de los ácidos fosfatídico y araquidónico, respectivamente. En algunos tipos celulares como la línea celular HEK-293, las células paratiroides y los hepatocitos, la activación del CaSR disminuye las concentraciones de AMPc a través de la inhibición de la AC, por acoplamiento a $G_{\alpha i}$. Por último, el CaSR interactúa con filamina A a través de su cola carboxi-terminal intracelular, y con las proteínas que controlan su degradación. Estas últimas son las quinasas asociadas a proteínas G (GRKs) como la dorfinina, la molécula asociada a SH3 (AMSH) y las β -arrestinas (Magno, 2011; Smajilovic, 2007; Rey, 2005). La interacción con filamina A es necesaria para la señalización del receptor a través de la vía de ERK1/2 (Awata, 2001), JNK, PI4K (fosfatidilinositol-4-quinasa) y Rho (Huang, 2004 y 2006), así como para evitar su degradación (Zhang, 2005). También se ha demostrado que el CaSR colocaliza e interactúa a través de su

cola intracelular con los canales de K^+ Kir4 (Huang, 2007), que están expresados en la membrana basolateral del nefrón distal del riñón y que regularían el potencial de membrana y el reciclado de K^+ para la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa (Lourdel, 2002).

1.6. El Cilio Primario

El cilio primario (CP) es una organela sensorial que protruye del centro de la mayoría de las células eucariotas, en particular de las células epiteliales (Wheatley, 1995). Aunque están relacionados con los cilios y flagelos móviles encontrados en los eucariotas inferiores y los tipos celulares especializados como el espermatozoide, los CPs son, en su gran mayoría, inmóviles. Los cilios móviles y los flagelos son fácilmente distinguibles de los CPs por el patrón de axonema que poseen. El complejo axonema (9 + 2) de los cilios móviles está constituido por nueve dobletes de MTs periféricos que rodean a dos MTs centrales individuales que le permite movimientos unidireccionales (Wheatley, 1995). Los cilios móviles contienen, además, estructuras accesorias involucradas en dicha movilidad, como los brazos internos y externos de dineína, extensiones radiales y un par de proyecciones centrales (Praetorius, 2005). Estos suelen encontrarse en múltiples copias por célula, como ocurre en las células de las superficies epiteliales del sistema respiratorio y de los oviductos, o las células endociliares de los ventrículos del cerebro humano adulto (Praetorius, 2005). Su función concreta es la de movilizar fluidos y sustancias a lo largo de la superficie epitelial (Praetorius, 2005), el CP está formado por un axonema "9 + 0", con nueve dobletes de MTs externos dispuestos en anillo, exceptuando los dobletes centrales (de ahí, el "0"). Tampoco poseen los brazos externos e internos de dineína, o el resto de los accesorios responsables de su movilidad (Bray, 1992; Praetorius, 2005) (Fig. 4). Con excepción de unos pocos tipos celulares como son los linfocitos y las células intercalares del túbulo renal distal, todas las células expresan uno o varios CPs en

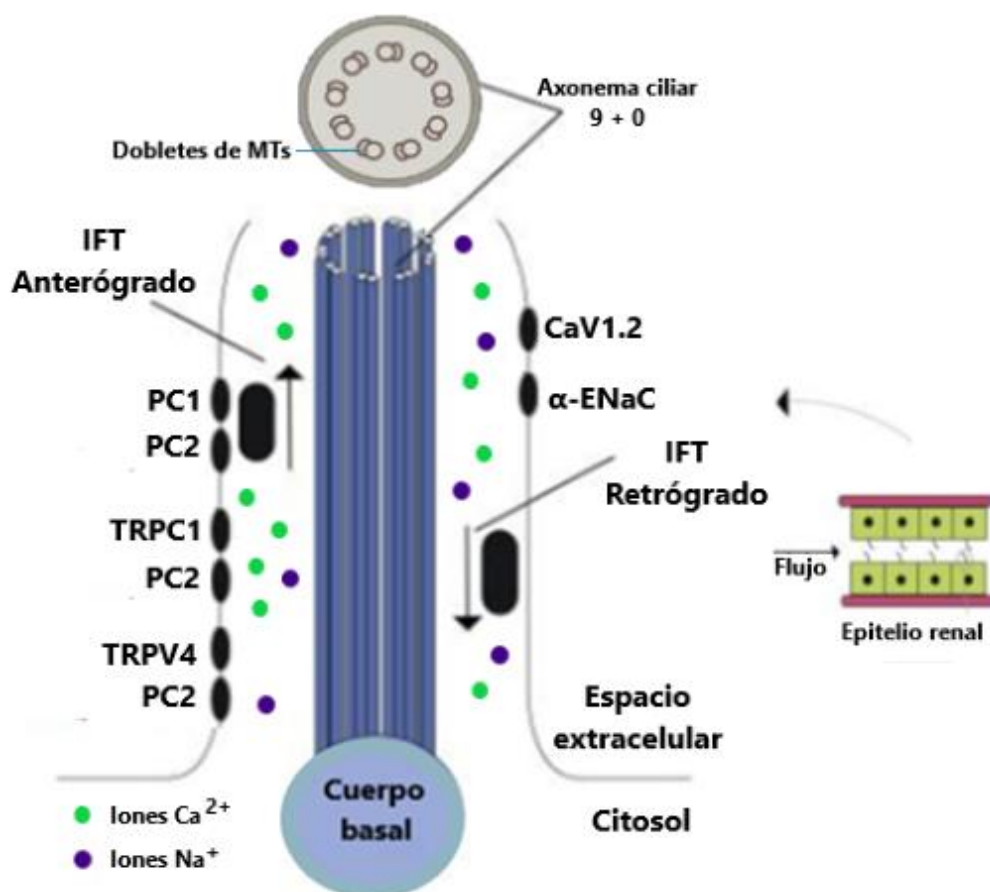


Figura 4. Estructura-función del CP de las células epiteliales. El CP está compuesto por una membrana selectiva que expresa el complejo PC1/PC2, y funcionalmente el canal PC2, que está regulado por las kinesinas (Li, 2006). El CP tiene un axonema de MTs centrales 9 + 0, típico de estas organelas (Diagrama reconstruido de Lee, 2014).

algún momento de su ciclo celular. Los CPs están rodeados por una bicapa lipídica continua con la membrana plasmática, llamada membrana ciliar. Esta membrana posee una dotación única de proteínas, entre ellas canales (Nauli, 2003; Raychowdhury, 2005) y receptores (Brailov, 2000; Masyuk, 2008; Raychowdhury, 2009; Milenkovic, 2009; Kim, 2009), que la convierten en una estructura altamente especializada. Los dobletes de MTs se extienden desde el centríolo hasta la base del CP, denominado cuerpo basal, de una manera que está coordinadamente regulada con el ciclo celular. El cuerpo basal se encuentra anclado a la membrana gracias a fibras de MTs denominadas fibras de transición. La región comprendida entre el axonema y el cuerpo basal se conoce como zona de transición (Plotnikova, 2009). La base del CP está envuelta por una profunda hendidura que forma una vaina de doble membrana denominada bolsillo ciliar, cuya naturaleza curva impone constricciones

geométricas al movimiento de proteínas y de lípidos de membrana, actuando como una barrera de difusión (Pazour, 2008). A su vez, el collar ciliar es un complejo formado por las fibras de transición y vesículas de membrana dispuestas en forma de collar de perlas en espiral, que se sitúan donde estas fibras contactan con la membrana, en la zona de transición. A este collar ciliar se lo denomina también complejo del poro ciliar, ya que junto con la estructura interna del centríolo madre modificado, restringen el tamaño de moléculas que entran al compartimento ciliar, y funcionan como una puerta de entrada altamente regulada, en la que se acumulan los precursores ciliares y las proteínas encargadas del transporte antes de entrar a dicho compartimento (Praetorius, 2005).

El CP de las células eucariotas ha sido considerado por mucho tiempo una organela de tipo vestigial (Wheatley 1995). Sin embargo, actualmente se sabe que los CPs transducen distintas señales de los estímulos extracelulares para generar respuestas celulares que regulan la proliferación, diferenciación, transcripción, migración, polaridad, y supervivencia celular (Lee, 2010). Muchos receptores presentes en el CP son necesarios para reconocer hormonas específicas como la somatostatina, factores de crecimiento o morfogenes como Sonic hedgehog (Shh) y Wnt, que desempeñan papeles esenciales en la fase embrionaria (Fliegauf, 2007). Recientemente se ha encontrado una relación directa entre la morfología del CP y la patogénesis de varias enfermedades conocidas como ciliopatías, entre las que se encuentran la retinitis pigmentosa, la PQRAD y la recesiva (PQRAR), las anomalías en asimetría axial embrionaria, la obesidad, el cáncer y los síndromes de Bardet-Biedl y Oro-Facial-digital tipo 1, entre otros (Badano, 2006; Fliegauf, 2007; Valente, 2014).

1.7. Microtúbulos

Los microtúbulos (MTs) son estructuras del citoesqueleto presentes en casi todas las células eucariotas. Están compuestos por dímeros de (α/β) tubulina, una proteína globular de 55 kD altamente cargada, con un diámetro exterior de aproximadamente 24 nm. Los MTs son capaces de cambiar su longitud acoplado o desacoplado sus

subunidades. Son sensibles al calor, a la alta presión hidrostática y a diversos químicos específicos, como colchicina o paclitaxel (taxol), fármaco utilizado para el tratamiento de distintos tipos de cáncer (Dustin, 1984; Shi, 2017). Además, junto con otras proteínas, ensambla complejos para formar distintas estructuras dentro de la célula como cilios y flagelos, axonemas, neurotúbulos y centriolos y participa de numerosos procesos celulares como su formato, movilidad, mitosis, como vía de proteínas motoras y de transporte de vesículas, entre otras cosas (Dustin, 1984).

Las subunidades de tubulina son heterodímeros formados por tubulina α y β que se agrupan de cabeza a cola en protofilamentos (Fig. 5a). *In vivo*, los MTs están formados por 13 protofilamentos, aunque este número puede variar en situaciones particulares (Dustin, 1984; Amos, 2004). Cuando los 13 protofilamentos forman una plancha bidimensional (2D) de subunidades (Fig. 5b), ésta debe girarse ligeramente, en una u otra dirección, para cerrarse perfectamente en tubos, que forman una línea recta, lo que permite que las proteínas motoras asociadas con los MTs, como la dineína y la kinesina, puedan recorrer largas distancias (Amos, 2004). *In vitro*, la tubulina aislada puede ensamblarse a distintos diámetros formados por 9 a 18 protofilamentos revelando cierta flexibilidad entre las uniones de los protofilamentos, al menos en la dirección involucrada en la curvatura de la pared de los MTs (Amos, 2004). Sin embargo, cuando la cantidad de protofilamentos es mayor a 13, es más difícil que se cierren las conformaciones 2D para formar los túbulos, por lo que también pueden retenerse en esa forma no cilíndrica, llamada lámina de MTs (Amos, 2004; Cantero, 2016).

El MT es una estructura dinámica, es decir, que cambia todo el tiempo. Esto significa que, al MT ya formado, pueden ensamblarse y desensamblarse en dímeros de tubulina rápidamente en respuesta a las necesidades de la célula, permitiéndole reorganizar su citoesqueleto. A estos procesos se los llama rescate o catástrofe, ya que lo realiza a grandes velocidades, utilizando la energía de la hidrólisis de GTP (Fig. 5c) (Desai, 1997). Recientemente, distintas propiedades de los MTs, como sus propiedades eléctricas, comenzaron a tomar mayor protagonismo independientemente de su función estructural, por lo que, actualmente, hemos profundizado el estudio de estas propiedades (Cantero, 2016; 2018; 2019; 2020).

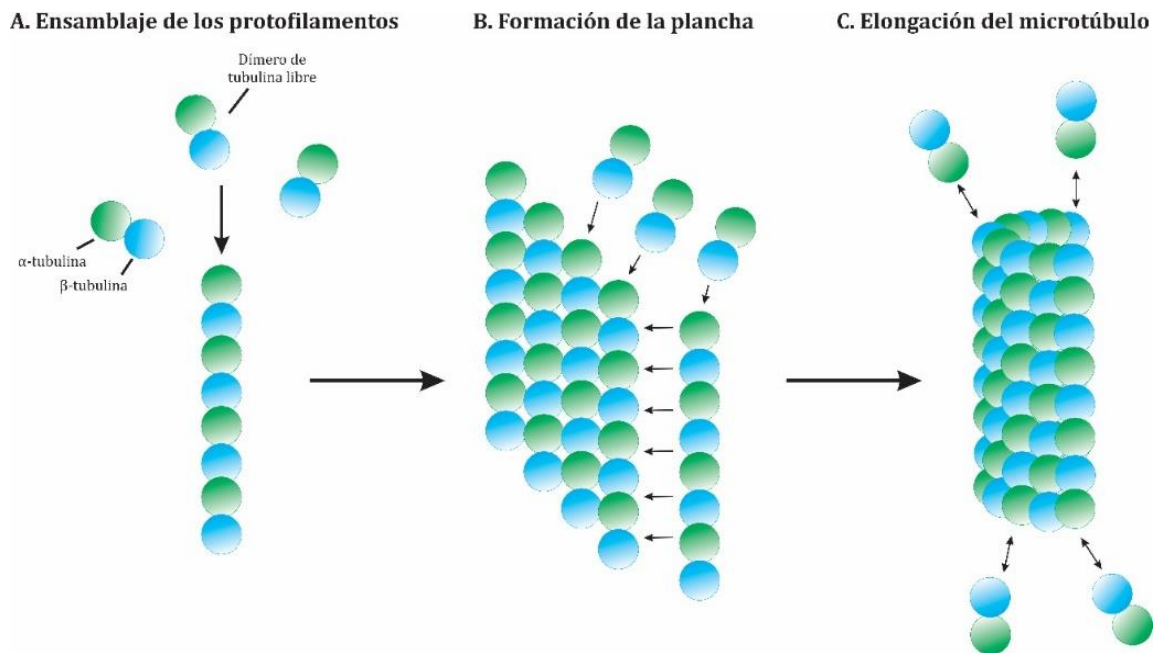


Figura 5. Formación de un MT. (a) Ensamblaje de los protofilamentos formados por dímeros de α/β tubulina. (b) Formación de la lámina (plancha) 2D de, generalmente, 13 protofilamentos. (c) Cierre de las conformaciones 2D que dan lugar al MT, y la catástrofe y rescate que ocurren continuamente según la necesidad de la célula.

1.7.1. Propiedades Eléctricas del Citoesqueleto

El citoesqueleto celular está formado por distintas proteínas, siendo las más importantes los polímeros de actina (microfilamentos) y la tubulina (MTs), además de los filamentos intermedios que varían dependiendo del tipo celular (Stephens, 1976). Se acepta generalmente, que la función del citoesqueleto está limitada al sostén de la estructura celular y a otras funciones como el transporte de cargo a través de vesículas y su participación en la división celular, entre otras (Stephens, 1976). Actualmente, se reconoce que el citoesqueleto es un sistema dinámico de procesamiento de información capaz de organizar el movimiento, crecimiento y comportamiento celular (Prassanawar, 2019). Por lo tanto, el mismo podría hipotetizarse como el sistema nervioso dentro de todas las células, desde organismos unicelulares como ameba y paramecio, hasta células nerviosas (neuronas) dentro del cerebro humano. En las neuronas, por ejemplo, el citoesqueleto representa la formación y la reorganización de la forma neuronal y las

conexiones sinápticas, factores asociados a una amplia gama de funciones cognitivas, incluidas las redes neuronales, el aprendizaje, la memoria y la conciencia (Hameroff, 1988). Por esto, los estudios del citoesqueleto se han profundizado, encontrando distintas características a las ya establecidas, como ser sus propiedades eléctricas.

Entre los estudios referidos al citoesqueleto más allá de su función estructural, se encontró una relación del citoesqueleto de actina con los canales iónicos insertos en la membrana plasmática. Se descubrió que el citoesqueleto de actina colocaliza y regula la actividad de los canales de sodio epiteliales (Smith, 1991; Cantiello, 1991b; Prat, 1996). En particular, se observó que distintas moléculas asociadas a actina, incluidas las tropomiosina, gelsolina, filamina y α -actinina, formaban complejos estructurales con el canal PC2, y que, junto con la profilina, también regulaban su función de canal (Li, 2003; Li, 2005; Montalbetti, 2005a; Wang, 2012; Cantero, 2015a). Por otro lado, se demostró que la PC2 también estaba regulada por el citoesqueleto de tubulina (Montalbetti, 2007). Se observó una disminución de la actividad del mismo con el agregado de colchicina, un agente despolimerizador de los MTs, mientras que el agregado de tubulina con GTP o taxol, un estabilizador de los MTs, activaban el canal. Además, la proteína motora KIF3A asociada a MTs, incrementó la actividad de la PC2 en el sincitiotrofoblasto humano (Montalbetti, 2007). Más aún, en el CP, se encontró una regulación de la PC2 mediada por MTs, dado que se observó la inhibición de la actividad del canal con el agregado de colchicina, y un aumento de su actividad con el agregado de tubulina. Esto estaría asociado al acoplamiento entre PC2 y los MTs, que colocalizan con la proteína KIF3A en los CPs (Li, 2006).

Paralelamente, estudios previos de nuestro laboratorio iniciaron una caracterización de las propiedades eléctricas de las proteínas del citoesqueleto por sí solas. La primera evidencia fue la demostración de que la actina filamentosa no respondía a la predicción de Donnan ante los cambios de osmolaridad (Cantiello, 1991a), sugiriendo que la actina podría tener propiedades de “cable” a partir de la condensación iónica sobre su superficie. Esta predicción fue confirmada por Lin y Cantiello en 1993, por medio del uso de una novedosa configuración de doble *patch*

clamp para comprobarlo. Se pudo observar que un pulso eléctrico enviado por la pipeta conectada a uno de los extremos de un filamento de actina, era recibido en forma de onda en la pipeta colectora con un efecto residual, es decir, se observaba la propagación de la misma a través del tiempo (Lin, 1993).

Por otra parte, los MTs son biopolímeros dipolares, siendo esta condición de gran interés para los procesos en los que está involucrado (Athenstaedt, 1974; Margolis, 1981). En 1987, Barnett conjeturó que los MTs eran canales de procesamiento a lo largo de los cuales podrían moverse cadenas de bits de información, transfiriendo mensajes de un lugar a otro, como si fuesen partes de una computadora. La señalización eléctrica a lo largo de los MTs se ha estudiado utilizando enfoques tanto experimentales como teóricos. En cuanto a este último, se predijo que los MTs cambian el campo electromagnético endógeno dependiendo de su longitud (Satarić, 1996) y que la velocidad en la cual los MTs se deslizan sobre una superficie recubierta de kinesina se puede controlar en una amplia gama de valores mediante la aplicación de un campo eléctrico (Dujovne, 2008; Kim, 2008), abriendo la posibilidad de diseñar nanodispositivos controlables que integren MTs y proteínas motoras en su función. Experimentalmente, estudios de nuestro laboratorio (Priel, 2006) repitieron la técnica de doble *patch clamp*, utilizada previamente en actina, en MTs aislados, adhiriéndolos a los electrodos de registro con taxol. Contrariamente al hallazgo hecho con actina, no se observó una propagación de ondas, sino una amplificación del pulso de estimulación en el otro extremo del MT, lo que implicaría que el MT actuaría como un transistor. Estos resultados coincidían con una simulación de dinámica molecular de la tubulina descrita previamente (Baker, 2001), que indicaba una distribución de carga sobre la superficie fuertemente negativa (Fig. 6).

Posteriormente, se introdujo un modelo no lineal con las condiciones que permiten a los MTs actuar como líneas de transmisión eléctrica para el flujo axial de iones en forma de “ondas”. En este modelo cada dímero de tubulina es visto como un elemento eléctrico con características capacitivas, inductivas y resistivas, que surgen debido a la naturaleza polielectrolítica de los MTs (Satarić, 2009). Por otro lado, poco se sabe sobre el rol que cumplen los nanoporos y el lumen microtubular,

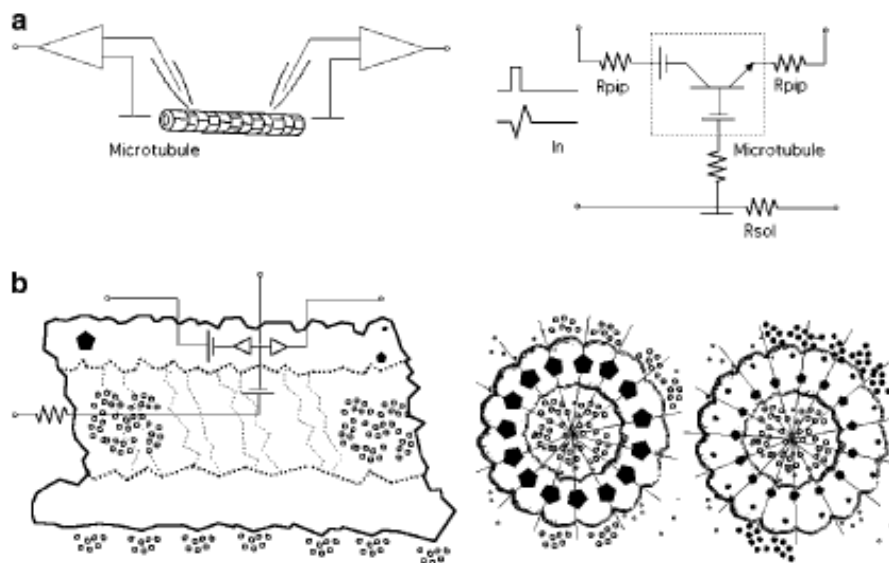


Figura 6. Modelo eléctrico de los MTs. (a) A la izquierda, se esquematiza el "setup" experimental de doble patch clamp utilizado por Priel y cols. (2006), para demostrar el comportamiento del MT como transistor. A la derecha, el modelo eléctrico efectivo del MT, que es consistente con un transistor, donde se ven las conexiones y fuentes de energía en forma de batería para polarizar el sistema amplificador. Incluye un "biotransistor" molecular y fuentes de energía en forma de baterías para polarizar el amplificador. (b) Relación del modelo eléctrico con las propiedades electrostáticas de un MT para los extremos positivo y negativo, reproducidos de Baker y cols. (2001). A la izquierda se observa el perfil electrostático de una sección transversal del MT mostrando la distribución periódica de cargas positivas (puntos negros) en la superficie del MT electronegativo. Las cargas distribuidas periódicamente (pentágonos grandes y pequeños) mantienen unión con los contraiones de su alrededor, observado también hacia la derecha, en los extremos positivos y negativos de los MTs. Esto se basa en una diferencia de potencial eléctrico en la pared del MT (círculos abiertos y círculos sólidos para cationes y aniones, respectivamente). Figura extraída de Priel, 2006.

debido a la dificultad que conlleva realizar experimentos con ellos. Se cree, por ejemplo, que el efecto estabilizador de MTs del taxol se debe a que atraviesa los nanoporos y se ensambla a sitios de unión en el lumen (Carpenter, 2006). Hasta ese momento, ningún estudio se enfocaba en la participación del lumen microtubular y las cargas que se encuentran alrededor de los MTs. Freedman y cols. (2010) realizaron un modelo computacional teniendo en cuenta tanto los nanoporos como el lumen, determinando las corrientes impulsadas que involucran el movimiento de cationes que circulan dentro y alrededor del MT. El modelo sugería que la geometría

cilíndrica con nanoporos en su superficie mejoraría la conducción de cationes a lo largo del MT (Freedman, 2010).

Recientemente, aplicamos la técnica de *patch clamp* en nuestro laboratorio para explorar los aspectos moleculares y eléctricos de los MTs, técnica también utilizada en el presente trabajo de tesis. Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando láminas de MTs de cerebro de vaca, rata y de tubulina comercial, siendo éstas macroscópicamente equivalentes a superficies planas de MTs (Downing, 1992; Nogales, 1998, Li, 2002b). En este trabajo, reportamos que, al aplicar un determinado voltaje a las planchas, éstas mostraban corrientes que tenían un régimen oscilatorio sincronizado, con una frecuencia fundamental de 29 Hz que se constante a distintos voltajes, donde sólo variaba la amplitud de las corrientes (Fig. 7, Cantero, 2016). Con el agregado de taxol, las oscilaciones fueron inhibidas de una manera concentración dependiente. Estos hallazgos podrían indicar la formación de campos eléctricos dentro de la célula generados por la red de MTs (Cantero, 2016).

Utilizando la misma metodología, recientemente también reportamos que las planchas de MTs que no desplegaban oscilaciones eléctricas, tenían un comportamiento de dispositivo *memristivo*, es decir, su resistencia (o conductancia) era una función temporal que dependía de la cantidad y dirección de la carga eléctrica que hubiera fluido a través de ellas en el pasado (Fig. 7, Cantero, 2019). Estos resultados son de suma importancia, ya que sería la primera estructura biológica con estas características, aunque este comportamiento fuera descripto teóricamente por Chua en 1971 como el “elemento faltante”. Recientemente, nuestros resultados fueron confirmados, demostrando variabilidad en la resistencia de gotas conteniendo MTs (Chiolerio, 2019).

Las propiedades eléctricas del citoesqueleto, y en particular, de los MTs, es un campo al que todavía le queda mucho por explorar, y que también hemos abordado en la presente tesis.

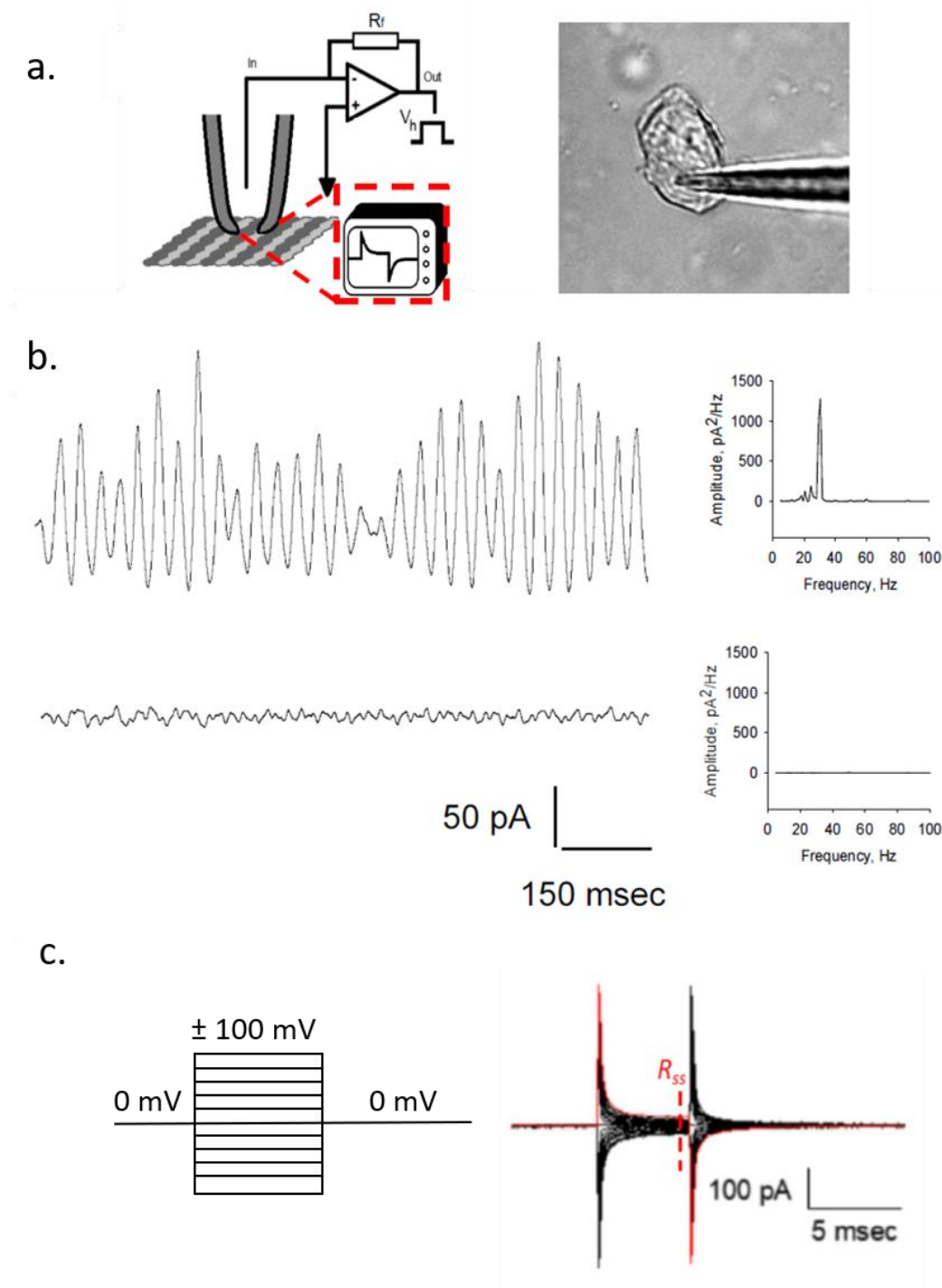


Figura 7. Actividad eléctrica de planchas de MTs. **(a)** En el panel izquierdo observamos la configuración experimental en planchas de MTs utilizando la técnica de patch clamp. A la derecha, plancha de MT siendo alcanzada por una pipeta. **(b)** Izquierda, oscilaciones eléctricas observadas en planchas de MTs con su respectivo espectro de frecuencia a la derecha (Cantero, 2016). Abajo, registro de planchas sin actividad, con su espectro respectivo espectro de Fourier mostrando la falta de oscilaciones utilizados para los experimentos de conductancia de las planchas de MTs (Cantero, 2019). **(c)** A la izquierda, protocolo experimental utilizado en el trabajo de Cantero y cols, (2019). A la derecha, registro representativo del protocolo en planchas inactivas. Figura modificada de Cantero, 2019.

Capítulo dos

Hipótesis y Objetivos

El presente trabajo de Tesis se enmarca en líneas de trabajo previamente desarrolladas en nuestro laboratorio, particularmente la regulación de canales iónicos por distintos segundos mensajeros, y elementos del citoesqueleto. Como modelo experimental, hemos identificado y estudiado el canal PC2 que funcionaría tanto en la membrana celular, el RE, como en el CP, donde cumpliría una función sensorial todavía desconocida.

Por otra parte, nuestro laboratorio tiene una larga trayectoria en el estudio de las características eléctricas de distintos componentes del citoesqueleto celular, principalmente en filamentos de actina y MTs. Nuestros estudios más recientes demostraron la presencia de oscilaciones eléctricas espontáneas en distintas estructuras de MTs.

Por lo descripto anteriormente, la hipótesis del presente trabajo es:

El cilio primario es una antena eléctrica, siendo el axonema su medio conductor, y su actividad regulada por receptores y canales insertos en la membrana ciliar, incluyendo el complejo CaSR – PC2.

Los objetivos de trabajo fueron:

- 1 Demostrar la presencia de un complejo CaSR-PC2 en la membrana plasmática de células LLC-PK1.
- 2 Caracterizar la actividad eléctrica del complejo CaSR-PC2 aislado.
- 3 Localizar el CaSR en el CP.
- 4 Estudiar la interacción funcional del CaSR y PC2 en la membrana del CP.
- 5 Caracterizar las propiedades eléctricas de los MTs de las células epiteliales renales LLC-PK1.
- 6 Estudiar las propiedades eléctricas del axonema del CP.
- 7 Caracterizar eléctricamente los canales del CP junto con el axonema para establecer una relación entre los mismos.

*Capítulo tres***Materiales y Métodos**

3.1. Cultivos celulares

Para realizar los experimentos de la presente Tesis se utilizó la línea celular renal LLC-PK1 (*Lilly Laboratories Cell - Porcine Kidney 1*, ATTC CL-101) con morfología de tipo epitelial derivada de riñón de cerdo macho de raza Hampshire de 3 a 4 semanas de edad (Hull, 1976). Es un modelo de la *pars recta* (S3) del túbulo proximal del riñón que ha sido extensamente estudiada por varios laboratorios incluido el nuestro particularmente, en la caracterización de mecanismos de transporte iónico y receptores, entre otros (Fig. 8).

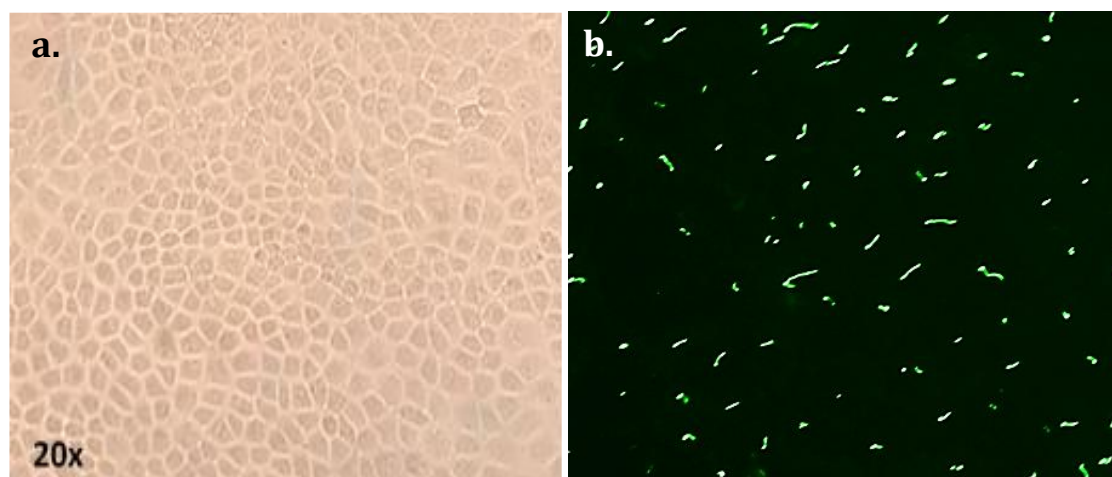


Figura 8. Línea celular LLC-PK1. (a) Monocapa confluyente de células LLC-PK1. La monocapa es uniforme y cada célula están completamente adherida a las que las rodean, comportamiento característico de las células epiteliales (20x). **(b)** Imagen representativa de células LLC-PK1, fijadas, permeabilizadas y marcadas con anticuerpo anti α -tubulina acetilada para evidenciar el cilio primario (40x).

Las células fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 3% SFB, incubadas en botellas T25 en atmósfera húmeda de 5% CO₂ y 37°C, renovándose el medio de cultivo en forma semanal.

El repique celular fue realizado por resuspensión con una solución de tripsina 0,25% con EGTA e incubación a 37°C durante 20 a 30 minutos. El desprendimiento de la monocapa fue monitoreado bajo un microscopio óptico invertido (Olympus IM10). Posteriormente, las células fueron resuspendidas en medio de cultivo fresco

en ausencia de tripsina, y sembradas en placas de Petri de 10 cm de diámetro (P10), o sobre portaobjetos, dependiendo del experimento a realizar.

3.2. Bioquímica y Biología Molecular – Técnicas de Aislamiento e Identificación

3.2.1. Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica es una metodología utilizada para la detección de moléculas de interés en células en cultivo mediante el empleo de anticuerpos específicos. La técnica se fundamenta en aplicar a la muestra en estudio un anticuerpo contra el antígeno que se desea detectar. A su vez es necesario emplear un anticuerpo secundario marcado que reconozca al primer anticuerpo empleado (detección indirecta). Estos anticuerpos secundarios pueden estar acoplados a moléculas fluorescentes para su posterior detección bajo microscopía de fluorescencia, o bien, pueden estar acoplados a enzimas que transforman un sustrato soluble en un producto insoluble coloreado cuya detección se realiza mediante el uso de un microscopio de contraste de fase (Sambrook, 1989).

Para la realización de este ensayo, las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos en placas de 24 *wells* y fijadas por 10 minutos con una solución de paraformaldehído (4%) y sacarosa (4%) y permeabilizadas con una solución de Tritón X-100 1% durante 15 minutos. Posteriormente, las células fueron bloqueadas en BSA 1% durante una hora e incubadas con el o los anticuerpos primarios correspondientes a cada experimento. En el presente trabajo como anticuerpos primarios fueron usados anti-PC2 humana (1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), anti-CaSR (1:100, NB120-19347, Novus Biologicals Littleton, CO, USA), anti-CaSR N-terminal (1:100, ab219182, Abcam, Cambridge, Reino Unido) y anti- α -tubulina acetilada (1:100, 6-11B-1, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Una vez terminada la incubación con anticuerpo primario, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con anticuerpo secundario. Según correspondiese en cada caso, los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: FITC goat

anti-mouse (1:100, Invitrogen), FITC bovine anti-rabbit (1:100, Santa Cruz), Texas Red bovine anti-mouse (1:100, Santa Cruz) y Texas Red goat anti-rabbit (1:100, Abcam). Finalmente, las células fueron lavadas, incubadas con DAPI durante 15 minutos y el cubreobjetos fue montado en un portaobjetos con medio de montaje Vectashield. Las imágenes fueron observadas en un microscopio invertido Olympus IX71 con una lámpara de mercurio con filtros fluorescentes, fotografiadas con una cámara digital CCD C4742-80-12AG (Hamamatsu Photonics, KK, Bridgewater, NJ) junto con el software IPLab y analizadas con ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Para cuantificar la inmuno-colocalización de las proteínas, la región de interés (ROI, del inglés "*Region of interest*") en cada imagen fusionada se analizó digitalmente con IPLab para Windows 4.0. Brevemente, la ROI se seleccionó como un área ovalada conteniendo aproximadamente una célula cada una (siguiendo la marcación por DAPI). Cada ROI fue explorada utilizando los tres filtros, a saber, verde para CaSR, rojo para PC2 y amarillo, para el complejo co-localizado. Cada color fue cuantificado con la subrutina de IPLab Measure Seg / ROI, y relativizado al 100% de marcación, para eliminar posibles diferencias en el brillo de un solo canal. Veinte a cuarenta células fueron contadas para cada condición (de Ca^{2+} externo), de cada experimento ($n=3$). Los datos fueron promediados y expresados como la media $\pm$ error estándar (EE) (n = número de células utilizadas en el promedio).

3.2.2. Aislamiento de Membrana Plasmática

Para realizar experimentos con membrana plasmática de las células LLC-PK1, fue obtenida una porción enriquecida de la misma y de las proteínas que se encuentren en ella. Brevemente, monocapas confluyentes de células LLC-PK1 fueron "cosechadas" en PBS y centrifugadas para obtener el pellet. El mismo fue resuspendido en un mililitro de solución conteniendo sacarosa 250 mM, Tris-base 10 mM pH 7.6, NaCl 50 mM con inhibidores de proteasas (buffer A) y sonificado en sonicador de baño (Solid State/Ultrasonic FS-14, Fisher Scientific) durante media hora. La suspensión fue diluida en buffer A y centrifugada a 800g durante 10 minutos. El sobrenadante fue nuevamente centrifugado en una ultracentrífuga

Sorvall WX+ Ultra Series con rotor *swinging bucket* TH-641 a 100.000g durante 1 hora a 4°C. Finalmente, el pellet fue resuspendido en buffer A y utilizado para reconstitución de canales iónicos (Raychowdhury, 2004).

3.2.3. Purificación de Tubulina de Células LLC-PK1

Para realizar experimentos con MTs de las células LLC-PK1, la tubulina fue aislada de las mismas como fuera detallado para cultivos celulares en general (Fourest-Lieuvin, 2006) con modificaciones que se resumen a continuación.

Las monocapas confluentes crecidas en placas de Petri P10 fueron lavadas con PBS, y tripsinizadas a 37°C, seguido del proceso de neutralización de la tripsina por agregado de medio de cultivo DMEM suplementado con 3% SFB. La suspensión celular fue centrifugada a 320g durante 3 minutos a 37°C y el pellet obtenido fue lavado con buffer PEM (100 mM Pipes pH 6.7, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂) a 37°C seguido de una nueva centrifugación a 320g durante 3 minutos. El nuevo pellet fue resuspendido en buffer OPT (80 mM Pipes pH 6,7, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 0,5% Triton X-100, 10% Glicerol, 1 µM pepstatina, 400 µM PMSF) para la lisis celular a 37°C. Las células lisadas fueron centrifugadas a 320g durante 3 minutos a 37°C descartándose cuidadosamente el sobrenadante. El pellet obtenido fue resuspendido en OPT a 4°C, incubado durante 15 minutos en hielo y ultracentrifugado a 200.000g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recogido y suplementado con 5 mM MgCl₂, 5,1 mM GTP y 5% DMSO (concentraciones finales) e incubado durante 30 minutos a 35°C para permitir la polimerización de los MTs. La muestra polimerizada fue colocada sobre un colchón de buffer PEM con el agregado de 60% glicerol y 400 µM de PMSF a 35°C y ultracentrifugada a 200.000g durante 20 minutos a 35°C. Los MTs fueron lavados sin resuspensión con PEM50 (35°C) (50 mM Pipes, pH 6,7, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 1 µM pepstatina y 400 µM PMSF) al que se añadió PEM50 frío para producir la despolimerización en hielo durante 15 minutos antes de la resuspensión. Finalmente, la suspensión de tubulina resultante fue ultracentrifugada a 200.000g durante 10 min a 4°C y

recogido el sobrenadante. Las muestras fueron alicuotadas y conservadas a -20°C hasta su utilización.

3.2.4. Preparación de Haces de MTs de Cerebro de Rata

Para realizar los experimentos que involucraban haces de MTs de cerebro de rata, estos fueron obtenidos como fuera descrito anteriormente (Shelanski, 1973; Cantero, 2016). Brevemente, los tejidos cerebrales fueron procesados durante 4 segundos con una licuadora de mano ajustada a baja velocidad en una solución que contenía, en mM: 100 MES (pH 6,4), 2,0 EGTA y 1,0 MgSO_4 para luego ser homogeneizados con un homogeneizador de vidrio con pistillo de teflón. Posteriormente, el homogenato fue centrifugado a $100.000g$ en una ultracentrífuga Sorvall WX+ Ultra Series con rotor swinging bucket TH-641 reteniendo el sobrenadante al que se le agregó GTP (1,0 mM) al sobrenadante, e incubado por 24 hs a 25°C . Los haces de MTs fueron identificados por DIC e inmunocitoquímica (anticuerpo anti- α tubulina, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) bajo microscopía de fluorescencia con un microscopio invertido Olympus IX71. Las muestras fueron mantenidas congeladas a -20°C hasta su utilización. Para iniciar los experimentos, una muestra de MTs fue situada en la superficie de un vidrio pretratado con una solución de APTES (3-aminopropil-trietoxisilano), como fuera descrito recientemente (Cantero, 2016). Brevemente, el APTES preparado fresco (0,1%, v/v, 02154766, MP Biomedicals) en agua destilada, fue aplicado sobre la superficie limpia de un cubreobjetos que se dejó secar durante 10 minutos antes de sembrar la preparación de MTs.

3.2.5. Aislamiento de CPs

Con el fin de estudiar las propiedades eléctricas de los CPs, los mismos fueron aislados de monocapas confluyentes de células LLC-PK1 como fuera descrito en Raychowdhury (2005). Las mismas se cosecharon por raspado en presencia de una solución salina libre de Ca^{2+} . La suspensión fue centrifugada a $52g$ durante 5 minutos. El sedimento celular fue suspendido en una solución de “deciliación” con

alto Ca^{2+} que contenía (en mM): 112 NaCl, 3,4 KCl, 10 CaCl_2 , 2,4 NaHCO_3 , 2 HEPES, pH 7,0. Las células resuspendidas fueron agitadas durante 10 minutos a 4°C y los CPs se separaron por centrifugación a $7.700g$ durante 5 minutos. El sobrenadante fue cargado en una solución de sacarosa al 45% en solución salina con alto Ca^{2+} y centrifugado a $100.000g$ durante 1 hora. La interface entre el sobrenadante y la solución de sacarosa fue recogida, y diluida 10 veces en solución salina con alto Ca^{2+} y fue centrifugada nuevamente a $100.000g$ durante 1 hora. El sedimento fue resuspendido en solución salina normal ajustada a pH 7,0 suplementada con EGTA 2,0 mM y sacarosa 0,5 mM. El sedimento resuspendido fue alicuotado y almacenado congelado a -20°C hasta su uso posterior (Li, 2006). Para su reconstitución en bicapas lipídicas, los CPs aislados fueron mezclados y sonicados en una mezcla lipídica.

3.2.6. Marcación Inmunoquímica de Muestras de MTs/CPs

Las muestras de MTs utilizadas en los experimentos fueron marcadas en el momento para corroborar la presencia de α -tubulina o α -tubulina acetilada en el caso de los CPs. El anticuerpo contra α -tubulina utilizado fue levantado en conejo contra los aminoácidos 149-448 de la α -tubulina humana, obtenido de Santa Cruz Biotechnology, Inc (H-300, sc-5546) y utilizado en una dilución 1:500, como fuera descrito anteriormente (Cantero, 2016). El anticuerpo secundario fue anti-IgG de conejo levantado en vaca (sc-2367, Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA), en una dilución 1:1000. Para los CPs, los anticuerpos utilizados fueron los detallados en la sección 3.2.1. Las muestras se observaron en un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX71 conectado a una cámara digital CCD C4742-80-12AG (Hamamatsu Photonics, KK, Bridgewater, NJ). Las imágenes fueron obtenidas con el software de adquisición y análisis IPLab Spectrum (Scanalytics, Viena, VA), en una computadora personal Dell-NEC.

3.2.7. Co-inmunoprecipitación

Para la detección del complejo CaSR-PC2 se utilizó la técnica de co-inmunoprecipitación (Co-IP), una de las técnicas utilizadas para identificar interacciones proteína-proteína fisiológicamente relevantes (Phizicky, 1995).

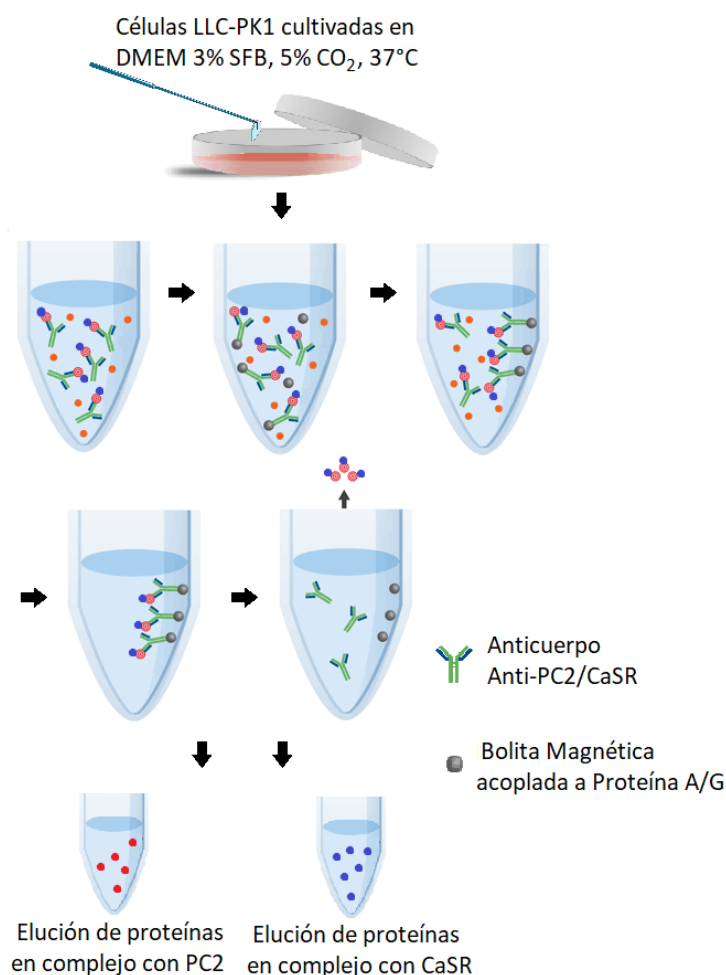


Figura 9. Co-inmunoprecipitación de complejos proteicos. Para obtener complejos proteicos, las células LLC-PK1 fueron lisadas de manera no desnaturizante y centrifugadas obteniendo la fracción proteica, la cual fue incubada por separado con anticuerpo específico anti-CaSR o anti-PC2. La suspensión fue incubada con bolitas magnéticas acopladas a proteína A/G y las proteínas obtenidas fueron eluidas sin romper las interacciones entre ellas, obteniendo por un lado las proteínas acopladas a CaSR y por otro, a PC2.

En nuestros estudios, de 5 a 10 placas P10 de células LLC-PK1 confluentes, fueron levantadas e incubadas en agitación durante 20 minutos en buffer de lisis no desnaturizante y sonicado en sonicador de baño durante 30 minutos. El lisado

celular fue centrifugado obteniendo la porción proteica en el sobrenadante, al que se le agregó, dependiendo del experimento, anticuerpo anti-PC2 o bien anti-CaSR (según el caso) incubando la mezcla a 4°C durante 1 hora y media. Para la recolección de los complejos proteicos, fueron agregadas bolitas magnéticas acopladas a proteína A/G PLUS (sc-2003, Santa Cruz Biotechnology) durante una hora a 4°C. Los mismos fueron diluidos con una solución de elución suave que rompe la interacción con el anticuerpo, pero no las interacciones proteína-proteína (Antrobus, 2011). De esta manera fueron obtenidos complejos funcionales para BLM, Western Blot y Dot Blot (Fig. 9).

3.2.8. *Western Blotting*

La técnica de *Western Blotting* (WB) es utilizada para la inmunodetección de proteínas específicas (Fig. 8). En primer lugar, las proteínas se separan por electroforesis para luego ser transferidas a una membrana afín a proteínas (nitrocelulosa, PDVF, entre otros) y se detectan las proteínas adheridas a la membrana por incubación con anticuerpos específicos. Estos anticuerpos pueden estar unidos a un fluoróforo o enzima con actividad detectable o pueden asociarse a un anticuerpo secundario que tenga dichos métodos de detección (Sambrook, 1989) (Fig. 10).

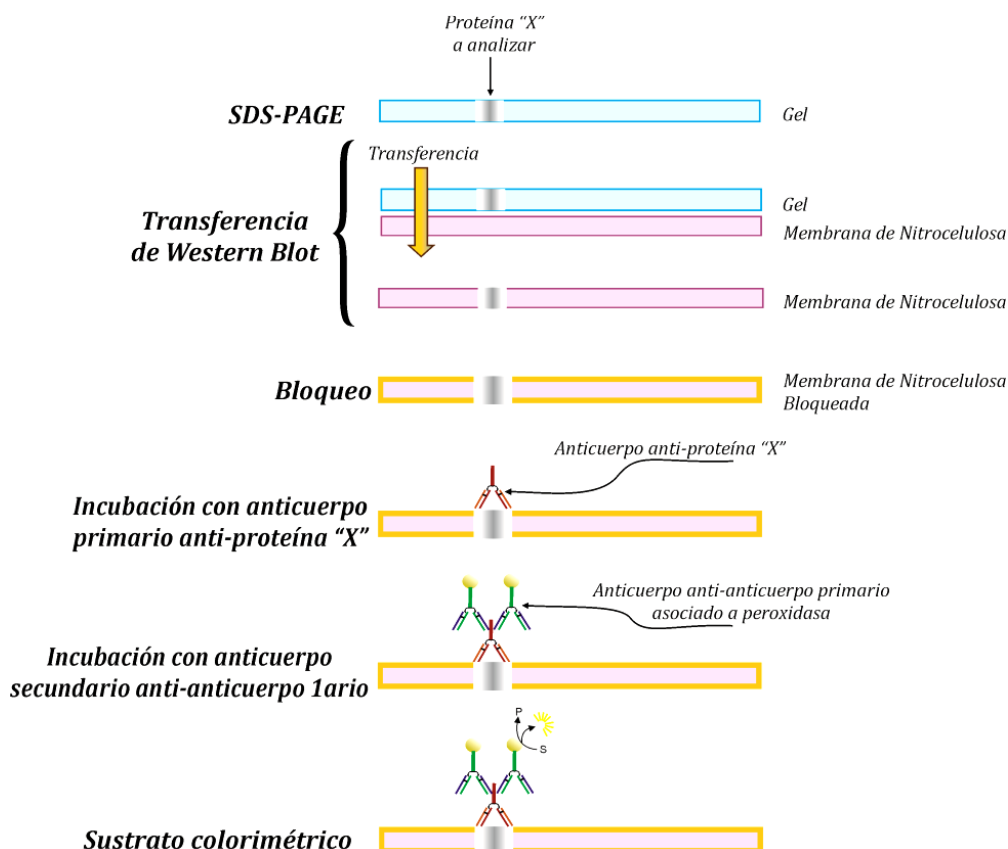


Figura 10. Esquema de la técnica de WB. En la figura se muestra la transferencia de proteínas desde el gel de SDS page a una membrana de nitrocelulosa que posteriormente se bloquea, e incuba con anticuerpos primario y secundario. Este último está acoplado a peroxidasa para visualizar la proteína por el agregado de un sustrato colorimétrico que reaccione con la enzima.

3.2.8.1. Determinación de la Concentración de Proteínas

La cuantificación de proteínas fue realizada con el ensayo del ácido bicinconínico (BCA) mediante el kit Pierce BCA Protein Assay (ThermoFisher, Waltham, MA, EEUU). La reducción del sulfato de cobre por medio del reactivo BCA permitió la detección colorimétrica de proteínas (Smith, 1985). El principio de la reacción se basa en que los enlaces peptídicos de las proteínas reducen los iones Cu^{2+} del CuSO_4 a Cu^+ en medio alcalino. Dos moléculas de BCA reaccionan con un ion Cu^+ , formando un complejo de color púrpura que absorbe fuertemente la luz a una longitud de onda de 562 nm. El Cu^+ reducido es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra, que puede cuantificarse midiendo la absorción y comparando con soluciones de proteína de concentración conocida (Smith, 1985).

Para el presente estudio fue utilizado un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 y soluciones patrón de BSA4+.

3.2.8.2. Preparación de las Muestras para Electroforesis

Una vez calculada la concentración proteica de las Co-IP, fueron tomadas alícuotas de proteínas que se diluyeron en buffer de lisis. Luego, fue agregado el buffer desnaturizante (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 3 mM DTT, 2% SDS, 15% β -mercaptoetanol, 0,15% Azul de Bromofenol) a las muestras de manera que se cumpla la relación 2:1 muestra: buffer. Las muestras fueron calentadas a 100 °C durante 10 minutos para favorecer la desnaturalización de las proteínas.

3.2.8.3. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida y Transferencia

Para realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida, los geles fueron preparados con una porción superior concentradora (gel concentrador) conteniendo 3,9% Acrilamida-Bisacrilamida y otra separadora (gel separador) conteniendo 8% Acrilamida-Bisacrilamida. Las muestras fueron sembradas en los geles y fueron corridas a un voltaje constante de 120V en presencia de buffer de electroforesis durante aproximadamente 120 minutos, empleando el dispositivo ENDURO™ Modular Vertical Gel System (Labnet International). Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron equilibrados en buffer de transferencia.

Las proteínas contenidas en el gel y separadas por electroforesis, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, para lo cual fue preparada una cassette de transferencia en el siguiente orden: una almohadilla de soporte inicial, dos papeles de filtro, gel, membrana de nitrocelulosa, otros dos papeles de filtro y una almohadilla de soporte final (Fig. 9). El sistema ENDURO™ Electroblotting System de Labnet fue utilizado con buffer de transferencia durante 100 minutos a un voltaje constante de 100V. La eficiencia de la transferencia fue constatada mediante la tinción de las membranas de nitrocelulosa con una solución de Rojo Ponceau.

3.2.8.4. Inmunodetección

Las membranas obtenidas por transferencia de los geles, fueron incubadas con solución de bloqueo durante 90 minutos bajo agitación suave. Posteriormente, se incubaron las membranas a 4°C con anticuerpo primario durante toda la noche y con agitación suave. Al día siguiente, el anticuerpo primario fue retirado, realizándose dos lavados con TBST (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) y dos lavados con TBS (50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl) de 10 minutos cada uno. A continuación, la membrana con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rabanito (HRP, por sus siglas del inglés *horseradish peroxidase*) fue incubada. Transcurridos 60 minutos, el mismo fue retirado realizándose tres lavados con TBST y uno con TBS, todos de 10 minutos de duración con agitación suave.

Las membranas fueron reveladas con el cromógeno Diaminobencidina (DAB Substrate Kit, Cell Marque, Rocklin, CA, USA) que reacciona con la enzima HRP del anticuerpo secundario haciendo evidente un precipitado color marrón sobre la membrana. Las membranas fueron secadas para su conservación.

3.2.8.5. *Dot Blotting*

Las muestras obtenidas de las co-immuno-precipitaciones fueron colocadas en gotas en una membrana de nitrocelulosa para su posterior immuno-detección. La misma fue realizada de igual forma que la técnica de WB (sección 2.2.8.4).

3.3. Electrofisiología

Gran parte del conocimiento alcanzado sobre la función de los canales iónicos se ha obtenido mediante el uso de distintas técnicas electrofisiológicas basadas en mediciones eléctricas de corrientes iónicas, tanto de membranas biológicas como de canales aislados.

3.3.1. Conceptos Básicos de Electricidad

La materia está compuesta por partículas cargadas, que, con carga neta, se denominan iones. La cantidad de carga de una partícula cargada es medida en Coulomb (C), donde la carga unitaria de un electrón es $e = 1,6 \times 10^{-19}$ C. La carga de un mol de cualquier ion monovalente completamente dissociado en una solución salina, se conoce como la constante de Faraday (F, 96.485 C/mol). Cualquier flujo neto de iones (J) es directamente proporcional a la corriente eléctrica (I) existente en el circuito equivalente de forma tal que (Schultz, 1980):

$$I = z \times F \times J \quad (1)$$

Donde I es la corriente total a través del circuito medida en Ampere (A), que correspondiente al movimiento de un Coulomb (C) de cargas por segundo, y z representa la valencia del ion.

La diferencia de potencial eléctrico (ΔV) entre dos puntos separados en el espacio es el trabajo necesario para mover una carga eléctrica de uno a otro de dichos puntos. El trabajo eléctrico expresado en Joule (J), representa el potencial eléctrico cuya unidad es el Volt (V), requerido para mover una carga de 1 C, siendo por lo tanto $J = C \times V$.

La ley de Ohm establece que la diferencia de potencial eléctrico entre dos puntos es igual al producto de la resistencia (R) y corriente (I) eléctricos establecidos en un circuito, por lo que:

$$V = R \times I \quad (2)$$

Donde R , se mide en Ohm (Ω) y representa la dificultad intrínseca que encuentran los iones o las cargas para moverse a través del medio conductor. Por ello, aquellos materiales que permitan el pasaje de corriente sin mayores dificultades poseerán una baja resistencia eléctrica. Otro modo de entender la relación de Ohm, es hacerlo

a través de la facilidad que brinda el medio conductor para que los iones o cargas se muevan a través del mismo. A esta propiedad, que es la recíproca de la resistencia ($1/R$) se la conoce como la conductancia (G), de forma tal que la ley de Ohm puede ser también expresada como:

$$I = G \times \Delta V \quad (3)$$

La conductancia eléctrica es entonces, estrictamente, una medida de la capacidad para permitir el flujo de corriente entre dos puntos, y su unidad es el Siemens (S). Cada canal iónico inserto en una membrana biológica puede ser considerado como un conductor elemental que atraviesa la bicapa lipídica, por lo que la conductancia eléctrica total (G) de una membrana biológica será la sumatoria de todas las conductancias elementales (g) en paralelo. A ésta, estaría sumada la conductancia intrínseca de la membrana (capa lipídica) que es sumamente baja comparada con la de los canales iónicos.

3.3.2. Teoría de Campo Constante de Goldman-Hodgkin-Katz

El formalismo más comúnmente utilizado para describir la permeabilidad y selectividad iónicas de membranas ha sido la teoría de campo constante desarrollada por Goldman (1943) y aplicada por Hodgkin y Katz (1949). Según esta teoría, la membrana sería conceptualizada como una barrera homogénea que puede ser atravesada por partículas desde el seno de la solución. Dado que las partículas están cargadas, el flujo a través de la membrana se establece tanto por el gradiente de concentración como por el campo eléctrico de acuerdo con la ecuación de Nernst-Planck (NP):

$$i_s = z_s F D_s \left(\frac{d[S]}{dx} + \frac{F z_s [S]}{RT} \frac{dV}{dx} \right) \quad (4)$$

Donde i_s es la corriente producida por el pasaje del ion S , z_s es la valencia del ion S , $[S]$ es la concentración del ion en el seno de la solución, V representa el voltaje aplicado, x es el espesor de la membrana, D_s el coeficiente de difusión del ion y F , R y T son las constantes Faraday, de los gases ideales y la temperatura absoluta, respectivamente.

La teoría de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) asume ambos, el principio de independencia, y el de campo constante, por lo que los iones que atraviesan la membrana lo harían sin interacciones entre sí o con el poro (principio de independencia), y el campo eléctrico a través de la membrana es constante ($dV^2/dx^2 = 0$), es decir que el potencial eléctrico (V) se disipa linealmente a través de la misma.

A partir de este modelo, Goldman, Hodgkin y Katz desarrollaron las ecuaciones de corriente y de voltaje que llevan su nombre, y que se muestran a continuación (Hille, 1992). La ecuación de corriente de GHK queda expresada como:

$$i_s = \frac{z_s^2 F^2 P_s V}{RT} \frac{[S]_i - [S]_e \exp\left(-\frac{z_s F V}{RT}\right)}{1 - \exp\left(-\frac{z_s F V}{RT}\right)} \quad (5)$$

Esta ecuación (Ec. 5) predice una relación corriente-voltaje (i/V) no lineal, a medida que la concentración del ion S a un lado de la membrana se aleja de la concentración del mismo al otro lado de la misma. Esta desviación de la linealidad es conocida como rectificación de Goldman (Fig. 11).

El segundo resultado de la teoría de GHK es la ecuación de voltaje (Ec. 6), que permite calcular la selectividad iónica de un canal a partir del potencial de reversión V_{rev} , potencial eléctrico de la membrana al cual se elimina el flujo neto de iones, aun en presencia de especies permeables.

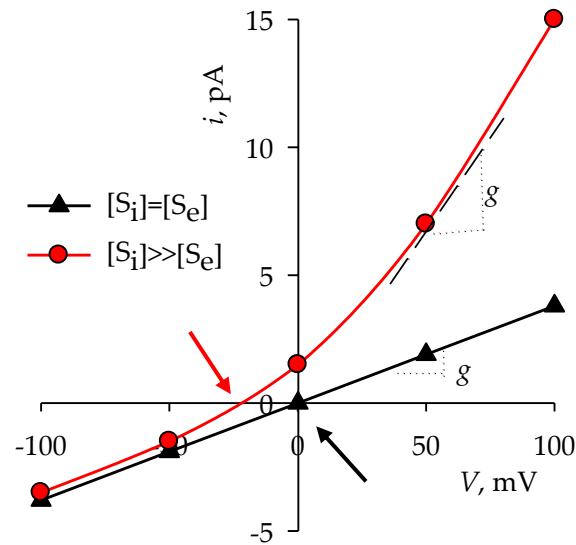


Figura 11. **Relaciones corriente-voltaje.** La i/V representa la corriente en función del voltaje para un ion S , con una concentración simétrica (triángulos) y asimétrica (círculos) a ambos lados de la membrana. La rectificación en la condición asimétrica se predice por la teoría de GHK. La “ g ” representa la conductancia, obtenida a partir de la pendiente máxima para cada curva. Las flechas indican el V_{rev} .

Por ejemplo, para el caso de una célula en la que tanto el Na^+ y el K^+ , como el Cl^- son especies permeables, el V_{rev} se puede calcular como:

$$V_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_e}{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i} \quad (6)$$

Donde P_K , P_{Na} y P_{Cl} son los coeficientes de permeabilidad para el K^+ , el Na^+ y el Cl^- a través de la membrana, respectivamente, mientras que “ i ” y “ e ” representan los lados intra y extracelulares, respectivamente. En el caso de existir solo una especie permeable, se puede deducir que la ecuación de voltaje de GHK (Ec. 6) se convierte en la ecuación de Nernst, de tal modo que el V_{rev} resulta ser el potencial de equilibrio del ion en cuestión:

$$V_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[S]_e}{[S]_i} \quad (9)$$

Cuando uno de los iones permeables difiere del otro en valencia, como, por ejemplo, para el caso, del Ca^{2+} vs. K^+ , la ecuación queda descripta como (Hille, 1992):

$$V_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{4P_{Ca} [Ca^{2+}]_e}{P_K [K^+]_i} \quad (10)$$

La mayor permeabilidad iónica de un canal iónico, respecto de otra, conocida como perm-selectividad, se puede determinar a partir de la obtención del potencial de reversión (V_{rev}) que surge de la intercepción de la corriente sobre la abscisa en las curvas i/V (ver Fig. 10). El V_{rev} es aquel potencial eléctrico en el que la corriente neta a través del canal es cero aun estando en presencia de especies iónicas permeantes (Hille, 1992).

3.3.3. Técnica de *Patch Clamp*

La técnica de *patch clamp* fue introducida por Erwin Neher y Bert Sackmann en 1976 (Neher, 1976), trabajo por el que obtuvieron el premio Nobel en 1991. Dicha técnica, permite mantener fija la diferencia de potencial de un sector de la membrana. De esta forma, midiendo la corriente necesaria para mantener la diferencia de potencial eléctrico, es posible cuantificar el flujo de iones a través de membranas celulares. La técnica emplea un electrodo para registrar la corriente, que es una pipeta de vidrio con punta micrométrica, llena de solución salina y que contiene un filamento de plata (Ag) clorurada. Dicho clorurado se obtiene mediante electrólisis con HCl (0,1 N) a través de una batería de 9 V, lo que forma una cubierta de AgCl sobre el filamento de Ag^0 . El primer paso para ejecutar la técnica (Fig. 11), consiste en colocar la punta de la pipeta de vidrio previamente pulida a fuego y llenada con una solución, sobre la superficie de la célula u organela, de manera que los bordes de la pipeta establezcan un sello de alta resistencia eléctrica, del orden de los gigaohm, que aísla

un parche de membrana (*patch*) del resto de la membrana la fracción de la misma que queda dentro del orificio de la pipeta. Presumiblemente, la fracción de membrana aislada contendrá algunos canales iónicos que podrán ser estudiados. De esta forma, una vez obtenido el “gigasello”, se habrá adquirido la configuración de célula adherida (*cell-attached*). La gran resistencia de este sello hace posible aislar eléctricamente las corrientes a través de la fijación de voltaje de la membrana con una buena relación señal-ruido. Esta técnica permite registrar corrientes del orden de los picoAmpere (pA) con la ayuda de un amplificador de la señal.

El equipo de *patch clamp* consta de una cámara donde se colocan las muestras a ser estudiadas sumergidas en solución de baño. El electrodo de referencia se sumerge en el baño, que se conecta al electrodo de registro introducido en el interior de la pipeta de patch (Fig. 11) mediante el cabezal de un sistema de amplificación (Axopatch 200B, Molecular Devices). El amplificador, a su vez, se conecta a tierra. El amplificador de *patch clamp* se conecta a un conversor análogo/digital (A/D, Digidata 1440A, Molecular Devices), que transforma las corrientes registradas en tiempo real (señal analógica) en señales digitales que se almacenan en una computadora, mediante el programa pCLAMP 10.2 (Molecular Devices) para su posterior análisis (Fig. 12).

Para la conducción de un experimento de *patch clamp*, la cámara que contiene la muestra experimental (célula) se monta sobre la platina de un microscopio invertido apoyado sobre una mesa antivibratoria que le confiere estabilidad ante vibraciones e influencias externas. Los macro y micromanipuladores (Narishige) se utilizan para mover la pipeta para posicionarla sobre la celular y presionar la punta de la pipeta contra la membrana hasta lograr el parche. Todo el procedimiento se sigue por observación directa a través del microscopio y la recolección de imágenes en una computadora a través una cámara (Orca-ER, Hamamatsu, Sunayama.cho, Nakaku, Hamamutsu City, Shizuoka, Japón) conectada al microscopio.

Existen cuatro configuraciones básicas de parches de membrana que se describen a continuación. La configuración *cell-attached* (célula adherida) es la utilizada para comenzar cualquiera de las demás configuraciones y consiste en posicionar la pipeta

sobre la membrana celular y generar un sello de alta resistencia. Una vez conseguido el giga-sello en la configuración *cell-attached*, es posible romper la membrana del parche y obtener la configuración *whole cell* o célula entera. A partir de la configuración *cell-attached* también es posible obtener otra configuración conocida como *inside out* (interior hacia afuera) en donde el parche de membrana es escindido de la célula. La última configuración posible, se obtiene a partir de la configuración *whole-cell* y se conoce como *outside out* (exterior hacia afuera).

Si bien la técnica fue diseñada para el estudio eléctrico de las células, es posible utilizarla para obtener registros eléctricos de otras estructuras sin membrana, como se desarrollará en la presente tesis.

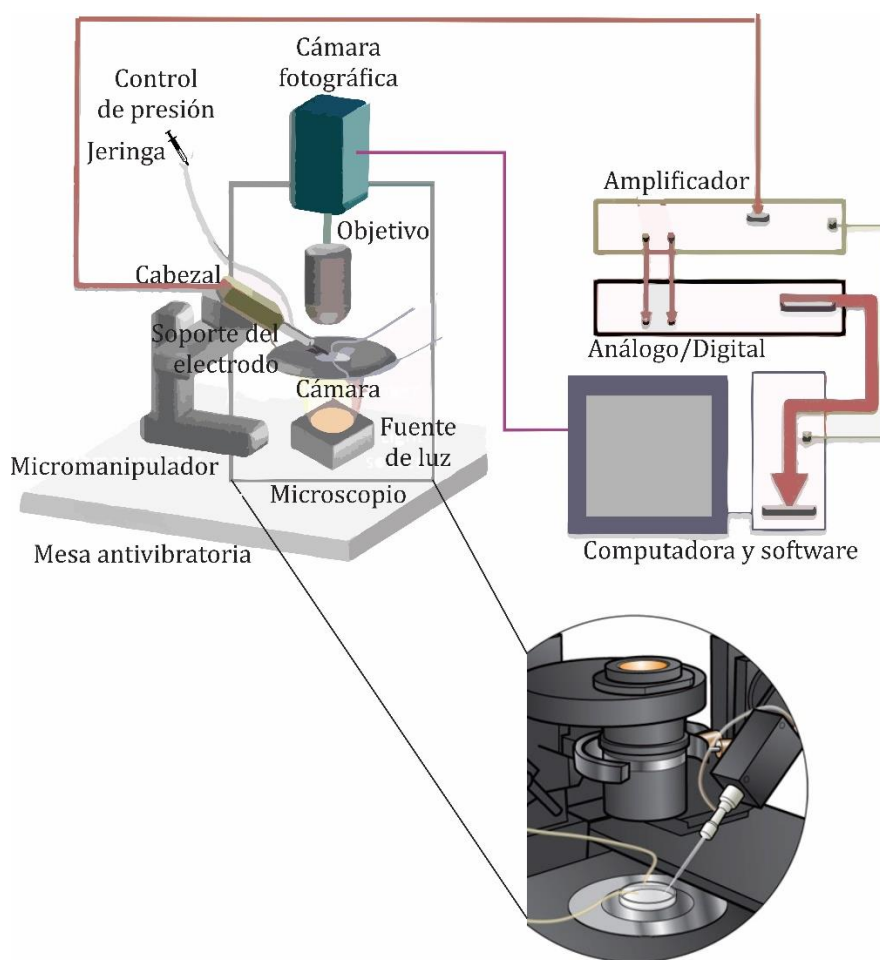


Figura 12. Diseño del instrumental utilizado para patch clamp. El equipo, montado sobre un microscopio, posee un electrodo de registro que se conecta a un sistema amplificador, que a su vez está conectado a un sistema análogo-digital que digitaliza las señales y la envía a una computadora para ser almacenadas y analizadas posteriormente. Una cámara fotográfica permite captar las imágenes de interés. La mesa antivibratoria le otorga estabilidad al sistema.

3.3.3.1. Otras Configuraciones de *Patch Clamp*

Además de las anteriormente nombradas, la técnica de *patch clamp* permite otras configuraciones independientes de la estructura en estudio. En la presente tesis se utilizaron las configuraciones “*cell-attached*” en láminas de MTs y la de “parche suelto” en haces de MTs y CPs.

3.3.3.2. Configuración de *Patch Clamp* en “Parche Suelto”

Una técnica análoga al método *cell-attached*, donde los voltajes aplicados a la pipeta afectan a la superficie abajo de su apertura, es conocida como “*loose patch*” o parche flojo o suelto. La diferencia principal entre estas técnicas reside en las consideraciones de la resistencia del sello. En los parches *cell-attached* con sellos ajustados, la resistencia del sello es muy grande ($\geq 1 \text{ G}\Omega$), de tal manera que se esperan corrientes muy pequeñas a través del mismo, lo que hace que el valor del potencial eléctrico de la punta de la pipeta sea cercano al valor del potencial aplicado. En cambio, los parches sueltos tienen resistencias considerablemente menores (en el rango de los $\text{M}\Omega$), lo que hace que existan corrientes de fuga significativas que fluyan a través del sello afectando el potencial de la punta. En estos casos, el potencial aplicado a través del amplificador, no será el mismo que el potencial de punta “visto” sobre la superficie en estudio. La diferencia dependerá de la magnitud de la resistencia del sello. Cuando existe un sello con baja resistencia, el voltaje de la punta de la pipeta (V_{punta}) será dado por la ecuación 11:

$$V_{\text{punta}} = V_{\text{cmd}} \left(\frac{R_{\text{sello}}}{R_{\text{sello}} + R_{\text{pip}}} \right) = V_{\text{cmd}} \times B \quad (11)$$

donde R_{pip} , R_{sello} y V_{cmd} son las resistencias de la pipeta y del sello respectivamente, y el comando voltaje. Bajo estas condiciones, donde R_{sello} está en el orden de magnitud de la R_{pip} , el voltaje de la punta de la pipeta será por lo tanto menor que el voltaje de

comando en un factor B (nótese que cuando $R_{seal} \gg R_{pip}$, $V_{pip} \approx V_{cmd}$, como en los casos de sellos ajustados).

La configuración de clampeo de parche suelto se utilizó en haces de MTs y en CPs.

3.3.3.3. Preparación de Pipetas para *Patch Clamp*

Las pipetas fueron obtenidas a partir de capilares de cal sodada (Biocap, Buenos Aires, Argentina), y fueron confeccionadas utilizando un estirador de pipetas (*pipette puller*, por su nombre en inglés) (PB-7, Narishige, Tokio, Japón) programado para dividir el capilar en dos mitades. En el sector de la división se generan puntas muy finas de aproximadamente $2\ \mu\text{m}$ de diámetro, que luego son refinadas por calor mediante el uso de una microforja o *fire polisher* (MF-9, Narishige), para suavizar el contorno y permitir una mejor adhesión del vidrio, a la estructura a estudiar. Posteriormente, las pipetas fueron llenadas con la solución de interés, de acuerdo con las condiciones que se desearon utilizar.

Es posible hacer una estimación del tamaño de la punta de una pipeta de patch haciendo burbujear aire a través de la misma en metanol puro (Corey, 1983). Para ello, la pipeta se conecta a una jeringa de 10 ml con una tubería de polietileno de 10 cm de longitud y la punta de la pipeta se sumerge en un recipiente con metanol. El émbolo de la jeringa se presiona desde un inicio en 10 ml y se observa el volumen remanente en la jeringa a partir que se escapan burbujas en el metanol. Este volumen corresponde al “número de burbuja”. Este método se basa en que, al aplicar presión, las burbujas se formarán si la presión excede la generada por la tensión superficial, y será inversamente proporcional al radio de la curvatura. Aunque el número de burbuja es inexacto, ya que depende de la geometría de la punta de la pipeta, permite una medida aproximada del tamaño en forma inmediata (Corey, 1983).

El llenado de la pipeta fue realizado por succión en la punta, completándose mediante el llenado a través de una jeringa por el otro lado. Para el llenado de la

punta, fue sumergida en un recipiente con la solución de llenado, conectando el otro extremo de la pipeta a un tubo de polietileno, ejerciendo presión negativa durante 2-5 segundos para succionar la solución. Dentro de la punta, posteriormente, fue colocada en la pipeta la aguja de una jeringa cargada con la solución correspondiente, aplicando presión positiva para completar el llenado desde el otro extremo (Corey, 1983).

3.3.3.4. Soluciones Utilizadas para *Patch Clamp*

Las planchas de MTs, los haces de MTs y los CPs fueron expuestos a soluciones salinas simétricas o asimétricas. En primer lugar, la solución de KCl "intracelular" contenía, en mM: KCl 140, NaCl 5, EGTA 1.0 y Hepes 10, ajustada a pH 7.18 con KOH. En segundo lugar, la solución de NaCl "externa", contenía en mM: NaCl 135, KCl 5.0, EGTA 1.0 y Hepes 10, se ajustó a pH 7.23 con NaOH.

3.3.3.5. Práctica Experimental de las Técnicas de *Patch Clamp*

3.3.3.5.1. Adquisición de Datos en Planchas de MTs

Para los registros eléctricos mediante *patch clamp*, la pipeta previamente confeccionada, con una resistencia de punta del orden de 5 a 15 M Ω en la solución del baño fue aproximada a la plancha de MTs mediante un micromanipulador, siendo observado bajo un microscopio a una resolución de 20x y luego de 40x. Una vez la pipeta en contacto con la plancha, fue ejercida una suave succión que permitió una unión firme entre la pipeta y la estructura de MTs. De esta manera fueron conseguidos parches del orden de los giga-sellos (G Ω , 10⁹ Ω). El seguimiento de la obtención de la resistencia del sello y, por lo tanto, la calidad del parche fue hecho mediante la imposición de pulsos cuadrados de 1 a 5 mV. Las corrientes eléctricas de la plancha de MTs fueron obtenidas aplicando diferentes protocolos de voltaje, incluidos el protocolo libre o *gap-free* a diferentes potenciales, trenes de 1500 ms de pulsos entre ± 40 mV desde un potencial basal de cero mV y rampas de 100 y 500 ms dentro del mismo rango de voltaje. Los parches de muy alta resistencia también

fueron sometidos a trenes de voltaje entre ± 100 mV. Las señales eléctricas fueron adquiridas y filtradas a 10 kHz, digitalizadas y almacenadas como se describiera anteriormente (sección 3.3.3).

3.3.3.5.2. Adquisición de Datos de los haces de MTs y CPs

Los haces de MTs y CPs fueron identificados en sus respectivas preparaciones. Para la obtención de datos, una pipeta de *patch* fue aproximada a la preparación formando un “parche suelto” por presión positiva suave de la punta sobre la superficie. La resistencia del sello fue observada aplicando un pulso cuadrado de 1 mV. Para los haces de MTs y CPs se aplicó un protocolo de distintos potenciales estables (*gap-free*), y, además, para los haces de MTs, fueron aplicados trenes de pulsos de 1500 ms a diferentes potenciales desde 0 mV y rampas de 1500 ms al mismo rango de voltaje. Las señales eléctricas fueron adquiridas y filtradas a 10 kHz, digitalizadas y almacenadas como se describiera anteriormente (sección 3.3.3).

3.3.3.6. Otros análisis de corrientes

A menos que se indique lo contrario, los trazados eléctricos mostrados en el presente trabajo fueron datos sin filtrar. Las corrientes promedio a diversos potenciales fueron obtenidas mediante la integración del trazado de corriente por un segundo, y se expresaron como la media $\pm$ EE, donde (*n*) representaba el número de experimentos analizados para una condición dada. Los espectros de frecuencia de los datos sin filtrar fueron obtenidos mediante la transformada de Fourier con una subrutina de Clampfit 10.0. Los ciclos límite fueron construidos mediante la aproximación del tiempo de retraso (τ) de los trazados sin filtrar, donde el tiempo de retraso τ se eligió arbitrariamente a $2f$, donde f fue la frecuencia de muestreo de la adquisición de datos. Los diagramas tridimensionales de espacio de fase fueron realizados en Sigmaplot 10.0.

3.3.4. Técnica de Reconstitución de Canales en Bicapas Lipídicas

Para estudiar las corrientes iónicas a través de las membranas obtenidas de células LLC-PK1, productos de Co-IP y CPs fue empleado el método de reconstitución de canales en bicapas lipídicas (Álvarez, 1986), previamente utilizado en nuestro laboratorio (González-Perrett, 2001; Raychowdury, 2005). Esta técnica posee ciertas ventajas con respecto a otras como la del parche de membrana, particularmente para el estudio de canales iónicos purificados directamente de tejidos o aquellos localizados en membranas poco accesibles por otros métodos. Además, la técnica de reconstitución de canales en bicapas lipídicas puede actuar de forma complementaria a la de patch clamp, brindando información de importancia. Para ello, un sistema de dos compartimientos (hemicámaras *cis* y *trans*) fue utilizado, conteniendo soluciones iónicas y están separados por un orificio y conectados mediante electrodos a un sistema que permitieron la fijación de voltaje (Fig. 13). El orificio que separa ambos compartimientos fue “pintado” con una mezcla de lípidos que formaba una bicapa lipídica (BLM, del inglés *bilipid membrane*). Para estos experimentos fueron utilizados los lípidos 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) y 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (POPE, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, EEUU) en una relación 7:3 respectivamente. La mezcla fue extendida sobre la abertura lateral de 150 μm de diámetro de una cubeta de poliestireno (CP13-150, Warner Instruments Corp, Hamden, CT, EEUU) utilizando un capilar de vidrio no heparinizado cerrado a fuego. Posteriormente, la cubeta fue insertada en una cámara para bicapas de cloruro de polivinilo (modelo BCH-13, Warner Instruments Corp.), definiendo así dos compartimientos acuosos separados por la bicapa formada. Ambos compartimientos fueron llenados con soluciones electrolíticas apropiadas de tal modo que ambas caras de la BLM quedaron bañadas por las soluciones *cis* y *trans*, respectivamente. Una vez llenados ambos compartimientos, una nueva capa de lípidos fue depositada sobre el orificio de tal modo de resellar el mismo. Posteriormente, la muestra a estudiar fue “pintada” sobre los lípidos con otra varilla de vidrio. El método fue por deposición de liposomas conteniendo el canal de interés sobre la BLM. En su defecto, la preparación con canales fue sonicada con los lípidos

previo a “pintar” la membrana. El potencial de membrana fue fijado en el lado *cis* con referencia al compartimiento *trans* mediante un circuito amplificador. Los contactos eléctricos fueron realizados a través de electrodos de Ag/AgCl. Las señales eléctricas se obtuvieron usando el conversor corriente-voltaje con una resistencia de retroalimentación de 10 G Ω , implementado desde el amplificador operacional de “parche de membrana” (*patch clamp*) MARK V (desarrollado por el Departamento de Fisiología de la Universidad de Yale, CT, EEUU). Las señales de salida fueron filtradas con un filtro de pasos bajos tipo Bessel de ocho polos (Frequency Devices, Haverill, MA, EEUU) con una frecuencia de corte de 1 kHz (-3 dB) y observadas en la pantalla de un osciloscopio (Nicolet 310). Simultáneamente, las mismas fueron almacenadas en una computadora mediante una interfase analógico-digital (A/D) utilizando el programa pCLAMP 5.5.1 (Molecular Devices, San Jose, CA, EEUU). Previo a la inserción de canales en la bicapa, las condiciones de ruido electrónico del sistema fueron evaluadas mediante el registro de la corriente basal a través de la membrana lipídica pura durante 5 minutos, que no difirió de cero pA.

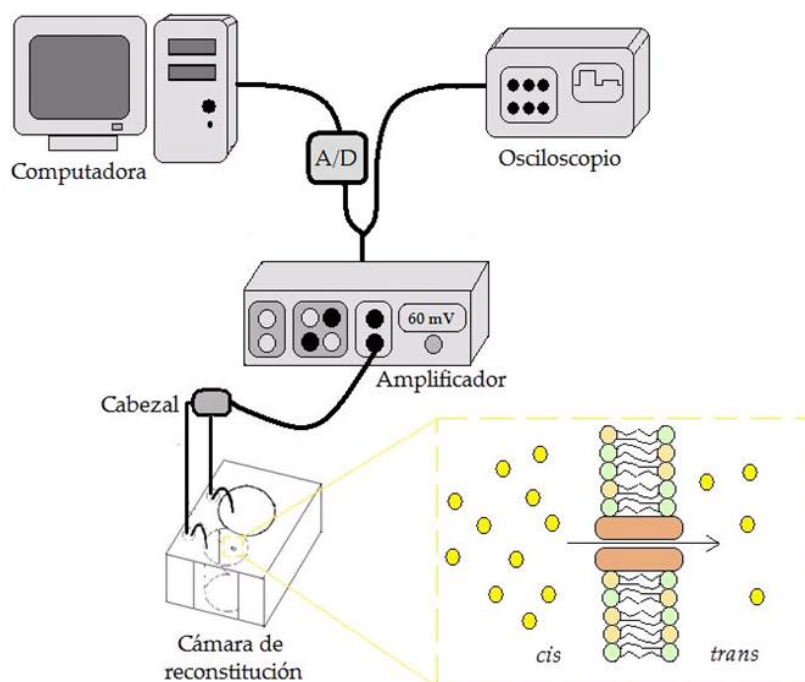


Figura 13. Diseño del instrumental utilizado para la reconstitución de canales iónicos. Las hemi-cámaras (*cis* y *trans*) que componen la cámara de reconstitución están conectadas a electrodos de Ag/AgCl conectados al amplificador, convertidor i/V de alta impedancia de entrada. Mediante un sistema analógico-digital, la señal es digitalizada y enviada a una computadora para ser almacenada y posteriormente analizada. La señal es observada en tiempo real mediante un osciloscopio conectado en paralelo con el circuito.

3.4. Análisis Estadístico

Los gráficos, la comparación de corrientes en los experimentos de BLM y *patch clamp* y los ajustes de curvas I/V de corrientes de canal, fueron realizados mediante el software SigmaPlot 11.0 (Jandel Scientific, Corte Madera, CA, EEUU). Los valores medios de los datos fueron expresados como la media $\pm$ EE (error estándar) para cada condición, donde “n” representaba el número de experimentos realizados. El desvío estándar fue calculado como sigue:

$$DE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (12)$$

Donde x_i corresponde a cada observación individual “i”, $\bar{X}$ es la media aritmética, y n es el número total de datos. El EE fue calculado de la siguiente manera:

$$EE = \frac{DE}{\sqrt{n}} \quad (13)$$

El análisis estadístico para evaluar la posible co-localización de PC2 y CaSR a partir de la marcación de la ROI (ver sección 2.2.1) fue realizado con ANOVA de una vía, estableciendo una significancia estadística de $p < 0,05$, con posterior prueba *post-hoc* de Tukey.

Los histogramas de frecuencia de probabilidad de apertura fueron analizados con el software Clampfit 10.7 y luego graficados con Sigmaplot.

Capítulo cuatro

Resultados

4.1. Co-localización de CaSR y PC2

Estudios previos del laboratorio (Dai, 2017) demostraron por medio de la técnica de patch-clamp en células LLC-PK1, una relación funcional entre la actividad de canal de la PC2 y la concentración externa de Ca^{2+} . Esto llevó a la demostración de la presencia del CaSR en estas células. Por ello, en la presente Tesis exploramos la posible co-localización de ambas proteínas, mediante la técnica de inmunocitoquímica (ver sección 3.2.1) realizando la marcación en células confluentes expuestas a distintas concentraciones de Ca^{2+} externo (Fig. 14). Esto permitió comenzar a visualizar la relación existente entre el canal y el receptor.

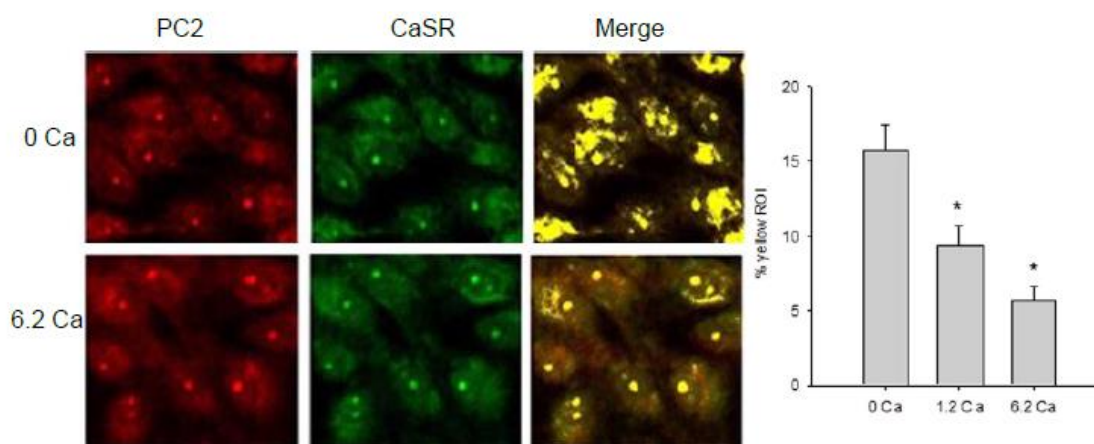


Figura 14. Co-inmunomarcación de PC2 y CaSR a distintas concentraciones de Ca^{2+} en células LLC-PK1. (a) Las células LLC-PK1 expuestas a distintas concentraciones de Ca^{2+} externo, fueron fijadas y marcadas con los anticuerpos anti-PC2 y anti-CaSR (rojo y verde, respectivamente). La co-inmunomarcación (amarillo) indica co-localización de ambas proteínas. Se observa una relación inversa entre el Ca^{2+} externo y la PC2 co-localizada. (b) Gráfico de barras que muestra el porcentaje de co-localización (amarillo) en ROI para distintas concentraciones de Ca^{2+} externo. * $p < 0,05$ con respecto a la condición en 0 Ca^{2+} .

La co-inmunomarcación confirmó que ambas proteínas estarían asociadas en un mismo complejo (o cercanas la una a la otra), ofreciendo la hipótesis de la existencia de un complejo CaSR-PC2, que estaría regulado por la concentración de Ca^{2+} extracelular y, por ende, posiblemente, la cantidad de Ca^{2+} intracelular. La relación entre el porcentaje de co-localización del canal y el receptor respecto del Ca^{2+} extracelular fue inversamente proporcional, mostrando mayor porcentaje de co-

localización en las células expuestas a 0 Ca^{2+} y menor en la exposición a 6,2 Ca^{2+} (Fig. 14).

4.2. PC2 y CaSR en la Membrana Celular

Para confirmar la presencia de ambos, el canal PC2 y el CaSR en la membrana celular, y también poder estudiar su modulación bajo distintas condiciones, se realizaron experimentos de reconstitución membranas plasmáticas aisladas de células LLC-PK1 confluyentes (ver sección 3.3.4). Para estos ensayos se utilizó un gradiente de KCl, con 150 mM en la cámara *cis* y 15 mM en la *trans* (gradiente de K^+), en condiciones libre de Ca^{2+} (EGTA 1 mM) con agregado de Ca^{2+} en el lado *trans* que emula el exterior celular (Fig. 15).

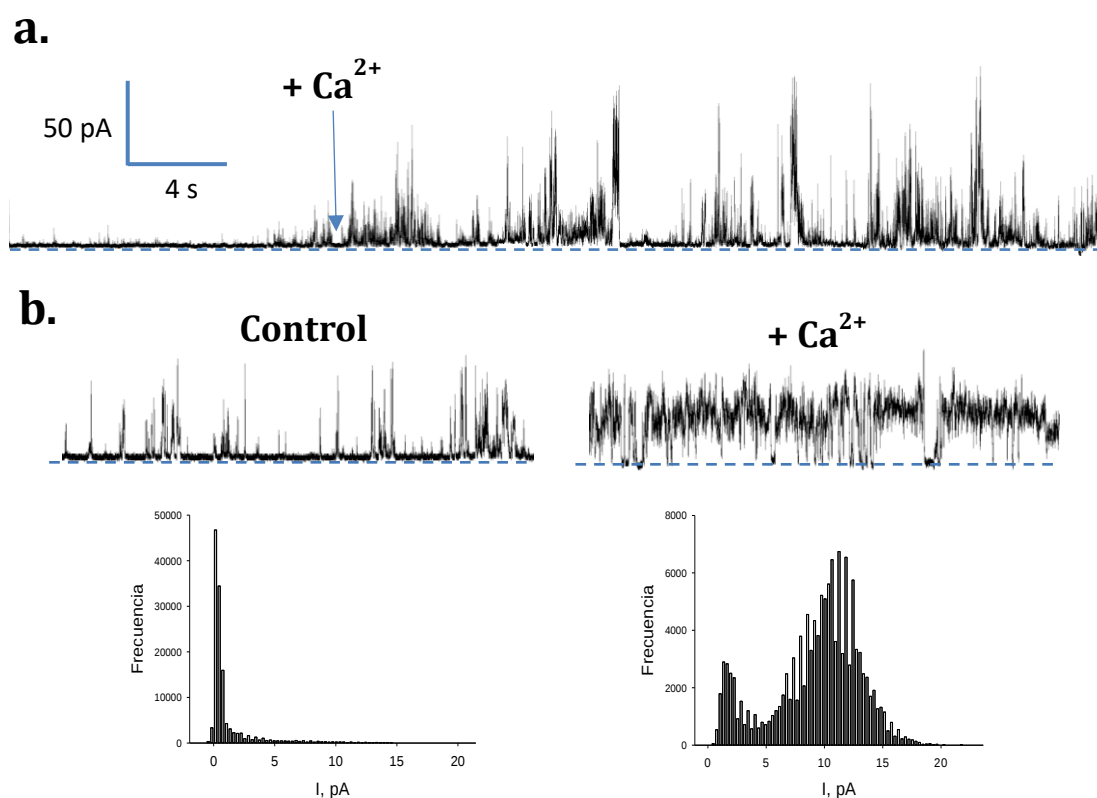


Figura 15. Efecto del Ca^{2+} en membranas de LLC-PK1. (a) Trazado representativo en gradiente de KCl en el cual se observa un aumento de la corriente de la membrana reconstituída luego del agregado de Ca^{2+} a la cámara *trans* para alcanzar una concentración de 10 mM. ($n = 3$). (b) Aumento de la probabilidad de apertura de los canales luego del agregado de Ca^{2+} . Debajo de cada trazado, se encuentran los respectivos histogramas de corrientes de los canales, donde se tuvo en cuenta sólo los niveles, cerrado y abierto.

En los trazados, se observó que el agregado de Ca^{2+} (10 mM) al compartimiento *trans* incrementó las corrientes de canales catiónicos de la membrana celular. Sin embargo, estos datos no permiten confirmar que las corrientes activadas correspondieran a la actividad de PC2 en la membrana ni que la estimulación fuese mediada a través del CaSR.

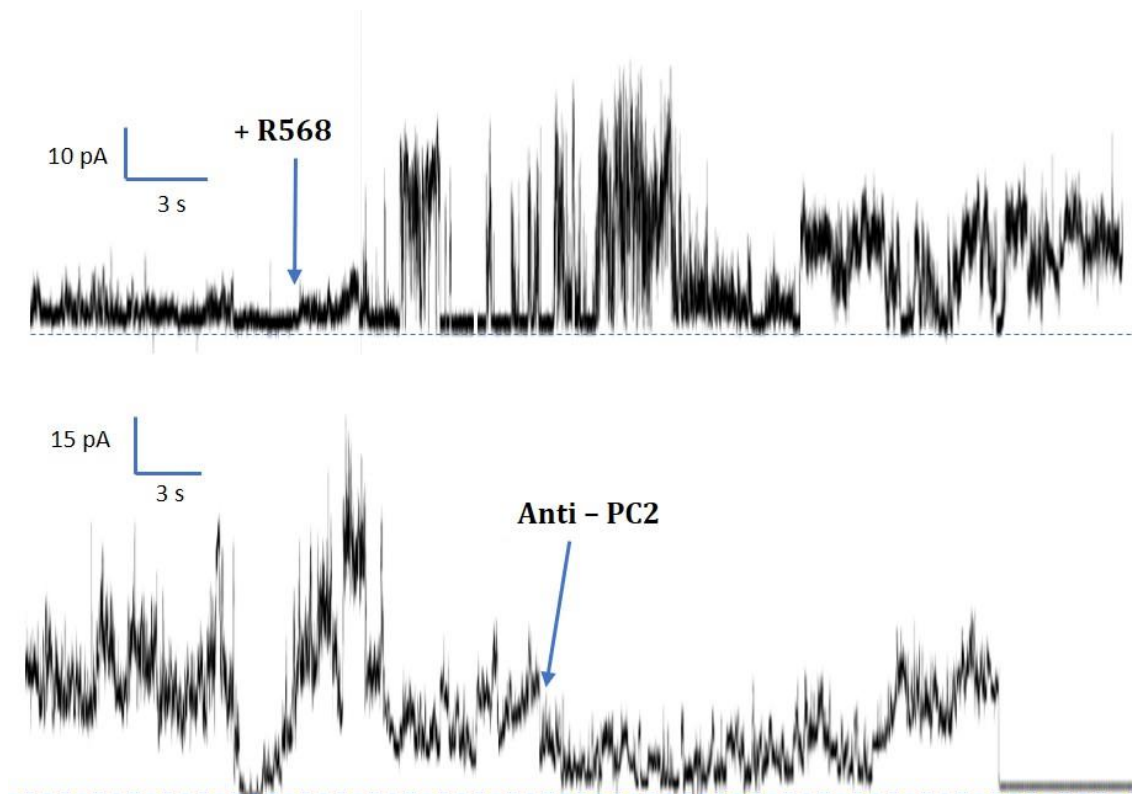


Figura 16. Efecto del agonista R568 en las corrientes de membrana. Corrientes catiónicas representativas de la membrana plasmática de células LLC-PK1. Los trazados muestran actividad espontánea de canal único que se incrementa por el agregado del agonista R568 (5 μM , *trans*). Además, estas corrientes fueron completamente inhibidas por el anticuerpo anti-PC2 (*cis*). Datos representativos de $n = 4$ experimentos.

Utilizando nuevamente membranas celulares de LLC-PK1 reconstituídas en BLM (Fig. 16), se realizó en la hemicámara *trans* el agregado de R568, un agonista calcimimético específico del CaSR (Hofer, 2003), hasta una concentración final de 5 μM . Estos experimentos permitieron observar un aumento de las corrientes catiónicas inducidas por R568, indicando una regulación por el CaSR (Fig. 16, *panel superior*).

Para evaluar si las corrientes inducidas por CaSR correspondían a la PC2, se agregó en la hemicámara *cis* el anticuerpo anti-PC2 (1:200), reportado previamente como inhibidor del canal (González-Perret, 2001). Este agregado produjo una completa inhibición de las corrientes, sugiriendo así que las mismas pertenecían a la PC2 (Fig. 16, *panel inferior*).

Estos resultados confirman los datos obtenidos por patch clamp (Dai, 2017) donde la membrana plasmática responde al agregado de Ca^{2+} al lado externo de la célula, con la activación corrientes catiónicas. El efecto del anticuerpo anti-PC2 sobre las corrientes activadas por el agonista del CaSR, R568, demostró que estas corrientes están mediadas por el canal PC2.

4.3. Complejo Estructural CaSR-PC2

4.3.1. Co-Inmunoprecipitación

Para establecer la existencia de una conexión estructural entre el CaSR y la PC2, se realizaron co-inmunoprecipitaciones en condiciones no desnaturizante de tal manera que todas las proteínas asociadas a un complejo con la proteína de interés precipitarán con ella. En este caso, siendo las proteínas de interés CaSR y PC2, se realizó la técnica utilizando anticuerpos específicos para cada una de las proteínas. A partir de ahora llamado Co-IP CaSR para el eluido con el anticuerpo anti-CaSR y Co-IP PC2 para el eluido con anti-PC2 (sección 3.2.7). Los lisados celulares se obtuvieron con pre-incubación en 0 mM Ca^{2+} y en 6,2 mM Ca^{2+} . A partir de estas eluciones, se realizaron diferentes maniobras para comprobar la existencia del complejo estructural.

Es de notar que dichas co-inmunoprecipitaciones se realizaron con células LLC-PK1 de tipo salvaje (*wild type*), sin sobreexpresión de ninguna de las proteínas estudiadas, por lo que, una de las dificultades de la técnica fue la cantidad de proteína extraída en cada elución. Sin embargo, es importante remarcar que estos resultados fueron obtenidos con las proteínas intrínsecas de la célula.

4.3.2. Detección por *Dot Blotting*

Los primeros resultados preliminares para la detección de la presencia de las proteínas asociadas en cada elución proteica se obtuvieron utilizando la técnica de *dot blot* (Fig. 17).

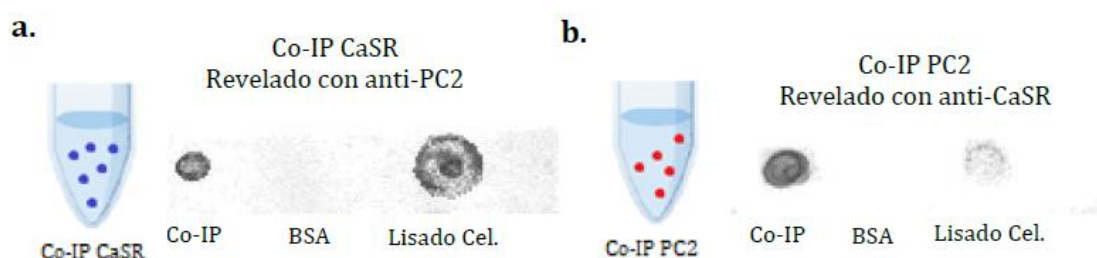


Figura 17. Dot Blot de los productos de Co-IP. (a) Dot Blot de Co-IP CaSR revelado con anticuerpo anti-PC2. **(b)** Dot Blot de Co-IP PC2 revelado con anticuerpo anti-CaSR. Ambos Dot-Blots tienen como control negativo BSA y como control positivo lisado celular de LLC-PK1 ($n = 2$, para cada condición experimental).

Además, fue posible evaluar si existía una mayor co-localización del receptor y el canal al realizarse las Co-IP a distintas concentraciones de Ca^{2+} . Para ello, se realizaron *dot blots* con la misma concentración de proteína de la Co-IP PC2 en ambas condiciones de Ca^{2+} y se reveló con anticuerpo anti-CaSR (Fig 18).

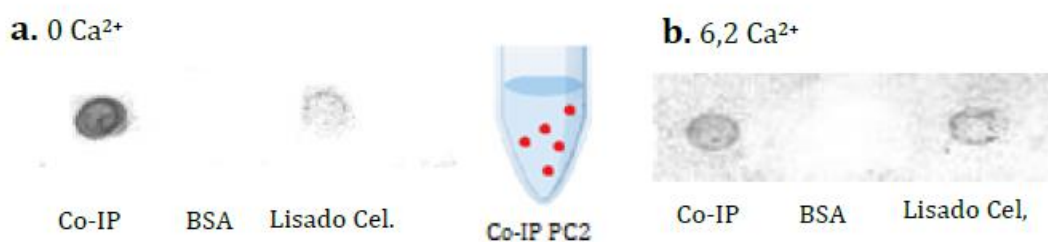


Figura 18. Dot Blot de Co-IP PC2 a distintas concentraciones de Ca^{2+} . (a) Co-IP PC2 en condiciones de 0 Ca^{2+} . **(b)** Co-IP PC2 en condiciones de 6,2 Ca^{2+} . Ambos Dot Blots se revelaron utilizando anticuerpo anti-CaSR. Se utilizó BSA como control negativo y lisado de celular de LLC-PK1 como control positivo ($n = 2$, para cada condición experimental).

Estos resultados permitieron determinar cualitativamente que el acoplamiento del CaSR al canal sería mayor en 0 Ca^{2+} , como también se había observado previamente con la técnica de ICQ (ver sección 4.1).

4.3.3. Detección por *Western Blotting*

Si bien los primeros resultados podrían indicar la existencia del complejo PC2-CaSR, la técnica de *Dot Blot* es poco específica. Para aumentar la especificidad se realizó un WB con la Co-IP CaSR. Para esta técnica, se realizó una electroforesis SDS-page, es decir, en condiciones desnaturalizantes, para separar las proteínas por peso molecular. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa realizándose la inmunodetección con anticuerpo anti-PC2 para detectar el canal co-inmunoprecipitado con el CaSR.

Los resultados del WB (Fig. 19) demuestran que, junto con el receptor, precipita el canal PC2, confirmando la existencia de una conexión estructural entre ambos.

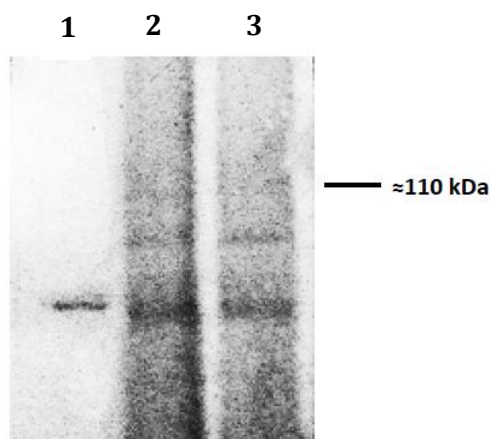


Figura 19. WB de la Co-IP CaSR revelada con anticuerpo anti-PC2. En la primera calle se observa el marcador de tamaño molecular de 75 kDa. En las calles 2 y 3 se encuentran los eluidos de la Co-IP de CaSR, donde se encuentra la banda de aproximadamente de 110 kDa que corresponde a la PC2. Las otras dos bandas que se pueden apreciar de menor peso molecular son características de los revelados con anti-PC2 (González-Perret, 2001).

4.3.4. Análisis de las Co-IP en BLM

Una vez confirmada la existencia del canal PC2 en las proteínas acopladas a CaSR, se quiso determinar la posible actividad eléctrica del complejo, para lo cual, las muestras de Co-IP se reconstituyeron en un sistema de BLM con el fin de estudiar la regulación del CaSR sobre la PC2, permitiendo la confirmación de ambas conexiones, tanto estructural como funcional, al igual que lo observado en membranas celulares de LLC-PK1 (ver sección 4.2).

En primer lugar, se observó la presencia de actividad espontánea de canales catiónicos, que fueron caracterizados para cada una de las eluciones de Co-IP (CaSR eluido por PC2, y PC2 eluido por CaSR). En ambos casos la reconstitución se hizo en un gradiente de KCl *cis:trans* 150:15 mM y 10 μ M de CaCl₂ simétrico, donde se registraron corrientes espontáneas a distintos potenciales.

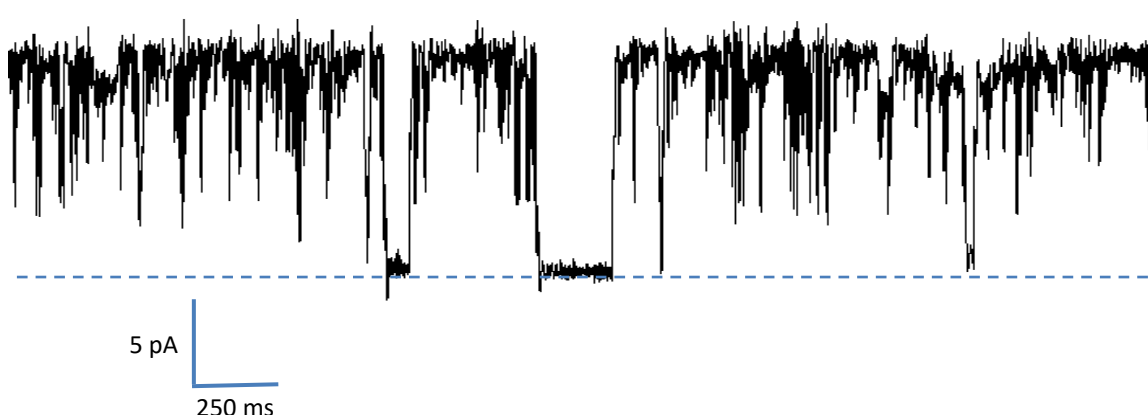


Figura 20. Muestras de Co-IP CaSR reconstituídas en BLM. Trazado representativo de la Co-IP CaSR reconstituída en gradiente de KCl (150 mM *cis*, 15 mM *trans*) mostrando corrientes catiónicas espontáneas.

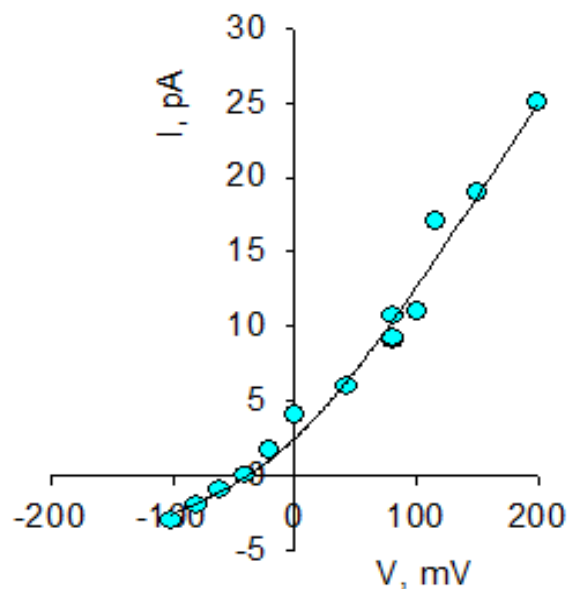


Figura 21. Curva I/V de corrientes espontáneas de Co-IP CaSR. Curva realizada con los promedios de corrientes para cada voltaje ($n = 3$). Se muestran el ajuste de GHK en línea sólida. La g observada es de 128 ± 11 pS con V_{rev} de -46 mV.

En la Co-IP CaSR, los trazados mostraron la presencia de actividad espontánea de canales catiónicos (Fig. 20) que permitieron la realización de una curva I/V ajustando los datos mediante la ecuación de GHK. La conductancia observada para este canal fue 128 ± 11 pS ($n = 3$), que bien podría corresponder con la g de la PC2, y observándose un V_{rev} de -46 mV (Fig. 21).

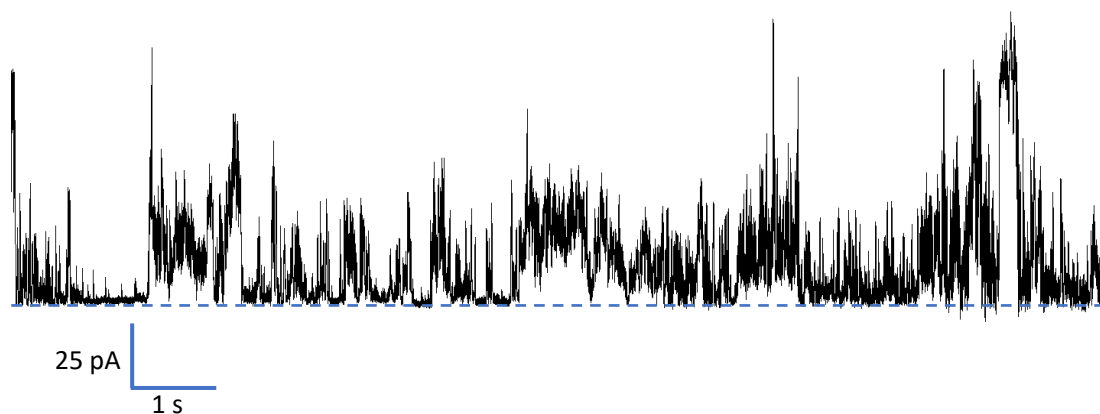


Figura 22. Muestras de Co-IP PC2 reconstituídas en BLM. Trazado representativo de la Co-IP PC2 reconstituída en gradiente de KCl (150 mM cis, 15 mM trans) mostrando corrientes catiónicas espontáneas.

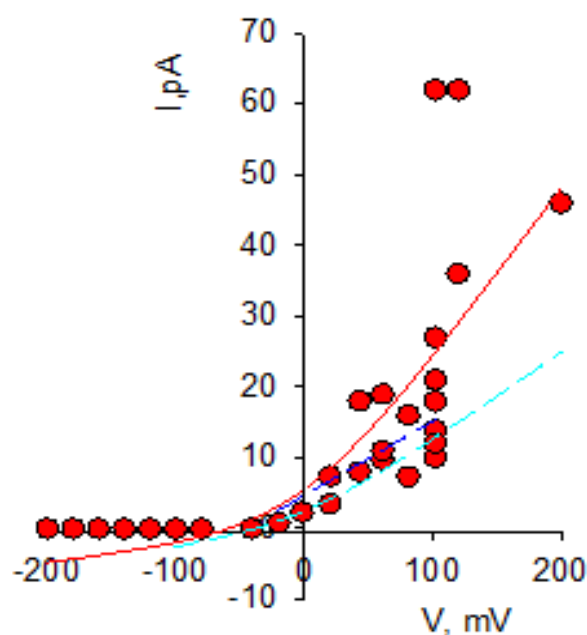


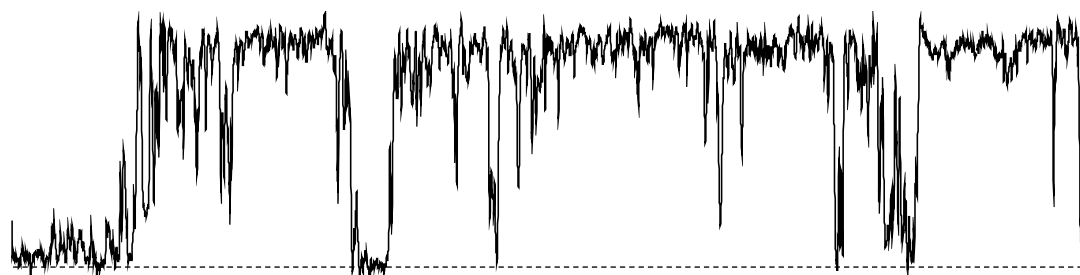
Figura 23. Curva I/V de corrientes espontáneas de Co-IP PC2. La curva fue realizada con los promedios de corrientes para cada voltaje ($n = 3$). La línea roja representa el ajuste con la ecuación GHK con su respectiva g de 205 ± 42 pS y un V_{rev} de -65 mV. En azul se observa un ajuste lineal para las corrientes de menor intensidad del cual resultó una g de 104 ± 28 pS. La línea celeste entrecortada representa el ajuste de la Co-IP CaSR.

En cambio, la Co-IP PC2 presentó varios fenotipos de canales catiónicos espontáneos (Fig. 22) los cuales no mostraron actividad de corriente a potenciales negativos. Por esto, se realizó un ajuste mediante la ecuación GHK, obteniéndose una g de 205 ± 42 pS ($n = 3$), y un V_{rev} -65 mV. Para los canales que manifestaron corrientes de menor intensidad se realizó un ajuste lineal, obteniéndose una g de 104 ± 28 pS ($n = 3$) (Fig 23).

4.3.4.1. Efecto del Anticuerpo Anti-PC2 en la Co-IP CaSR

Para verificar la presencia de PC2 en la Co-IP CaSR, así como la regulación del canal por el receptor, se agregó el anticuerpo anti-PC2 al compartimiento *cis* para observar si existían cambios en las corrientes espontáneas.

Control



+ anti-PC2

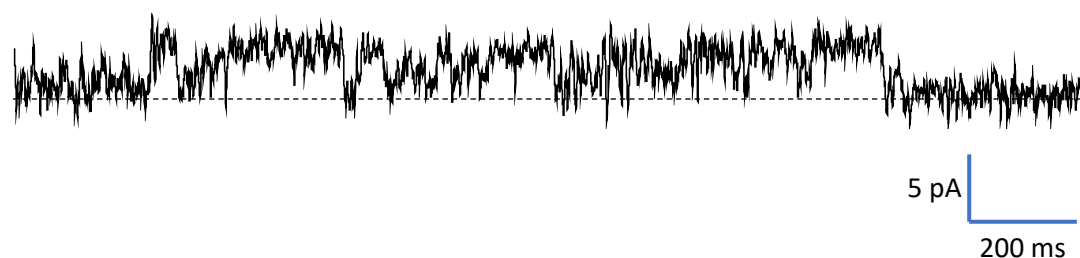


Figura 24. Efecto del anticuerpo anti-PC2 en las corrientes de la Co-IP CaSR. Trazados representativos de corrientes espontáneas de Co-IP CaSR en gradiente de KCl, antes (panel superior) y después (panel inferior) del agregado de anticuerpo anti-PC2 (1:1000, $n = 3$).

Se comprobó que parte de las corrientes de la Co-IP CaSR pertenecían al canal PC2, ya que luego del agregado del anticuerpo anti-PC2 las mismas se inhibieron casi por completo (Fig. 24). Esto también se evidenció calculando las corrientes medias de cada registro, donde las corrientes control fueron, en promedio del 90% luego de dos agregados del anticuerpo anti-PC2.

4.3.4.2. Efecto de la Activación del CaSR en la Co-IP PC2

Para comprobar la presencia de ambas proteínas de interés en el material de elución (Co-IP PC2), el eluyente se mezcló con la mezcla lipídica (7:3 POPC:POPE) y se reconstituyó en presencia de gradiente de KCl (150 mM *cis*, 15 mM *trans*). La

reconstitución de dicho material permitió observar corrientes catiónicas espontáneas como se viera previamente y como era esperable. Para comprobar la presencia de CaSR, se agregó el agonista calcimimético R568 del lado *trans*, lo cual no produjo ningún efecto (datos no mostrados). Dado que los *dot blots* evidenciaron la presencia del receptor, una posibilidad fue que, al estar acoplado a proteína G, sea necesario el agregado de GTP. Se realizó con dicha muestra un control en presencia de 0,6 mM GTP, que tampoco mostró cambios en las corrientes, sin embargo, al agregarse 50 μ M R568 (*trans*) se observó un incremento de la corriente de al menos un 300% ($n = 3$) en el material de la Co-IP de PC2 (Fig. 25).

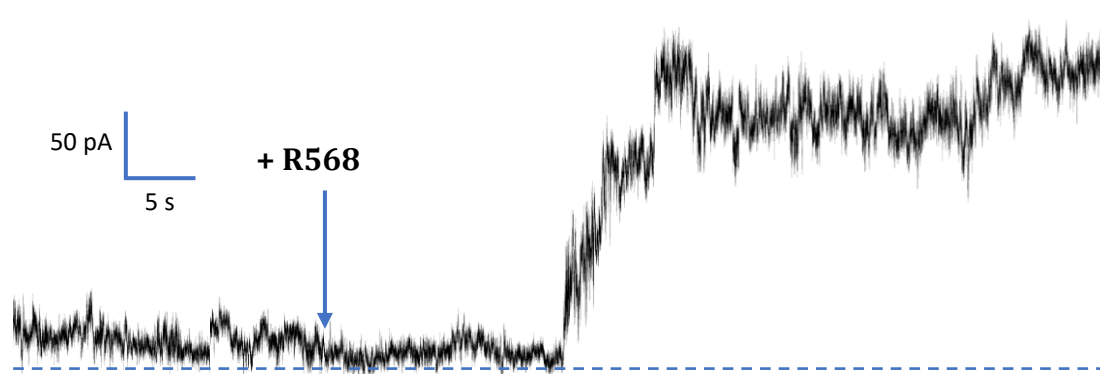


Figura 25. Efecto del R568 en la Co-IP PC2. Experimento representativo mostrando que las corrientes espontáneas que se observaron en la reconstitución en BLM de la Co-IP PC2, se incrementaron por el agregado del agonista del CaSR, el calcimimético R568 en presencia, pero no ausencia de GTP del lado *cis* ($n = 3$).

4.4. Presencia del CaSR en CPs de las Células LLC-PK1

Es conocida la presencia del canal PC2 en el CP donde regula varias funciones del CP, como la entrada de Ca^{2+} en la organela (Tsiokas, 2009) y la longitud ciliar (Dai, 2017). La pérdida de función del canal se considera uno de los acontecimientos primarios en la formación de quistes en la PQRAD (Nauli, 2003), por lo que se consideró importante conocer la regulación del canal en el CP.

Como demostramos previamente para la membrana celular, parte de la regulación de la PC2 estaría mediada por el CaSR. Los siguientes experimentos se realizaron con el objetivo de conocer si esta regulación ocurre también en el CP.

4.4.1. Co-Inmunocitoquímica de CaSR y CP

Para identificar el CP en las células LLC-PK1, las mismas se fijaron e inmunotrataron con anticuerpo anti- α -tubulina acetilada para detectar el CP y, a continuación, se marcaron también con anticuerpo anti-CaSR. Con las imágenes obtenidas se exploró la posibilidad de identificar si el receptor se encontraba presente en el CP (Fig. 26).

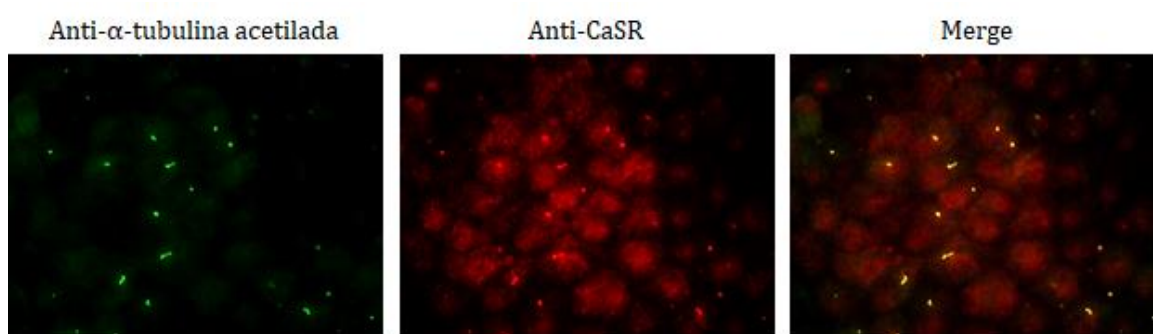


Figura 26. Marcación del CaSR en el CP de las células LLC-PK1. Células marcadas con anticuerpo anti- α -tubulina acetilada (verde, panel izquierdo) para detectar el CP. Identificación del CaSR en rojo (panel medio) y la superposición de ambas imágenes, donde se observó en amarillo la presencia de CaSR en el CP (20x).

La inmunomarcación confirmó la presencia del CaSR en el CP, donde se esperaría que regule la PC2 como en la membrana plasmática y, por lo tanto, estaría involucrado en mecanismos de señalización molecular y eléctrica asociados al Ca^{2+} en dicha organela.

4.4.2. Efecto Funcional del CaSR en el CP

Con el fin de estudiar la función del CaSR en el CP, los mismos se extrajeron de las células LLC-PK1, como fue descrito anteriormente en la sección 3.2.5, y se reconstituyeron en un sistema de BLM.

En los experimentos de reconstitución en BLM, se observaron corrientes de canal único en membranas de CP, como fuera previamente reportado por nuestro grupo (Raychowdhury, 2005). Dichas corrientes se incrementaron luego del agregado del

agonista R568, 50 μ M (Fig. 27), consistente con la activación de CaSR. Además, se confirmó que el aumento de dichas corrientes se debía al CaSR, ya que el posterior agregado de ketamina (1,25 mM, *cis*), un conocido inhibidor del receptor (Kudoh, 1999), logró la completa inhibición de las corrientes (Fig. 28).

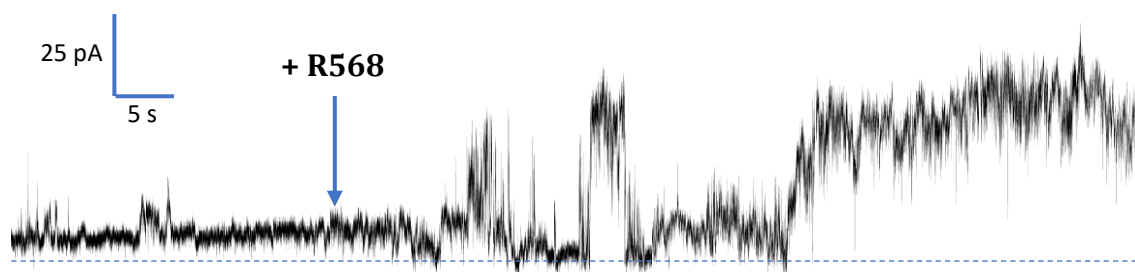


Figura 27. Efecto del agonista R568 en membranas ciliares. Experimento representativo ($n = 3$) donde se observa el efecto estimulador del agonista del CaSR, R568, 50 μ M, en la activación de corrientes catiónicas espontáneas en la membrana del CP.

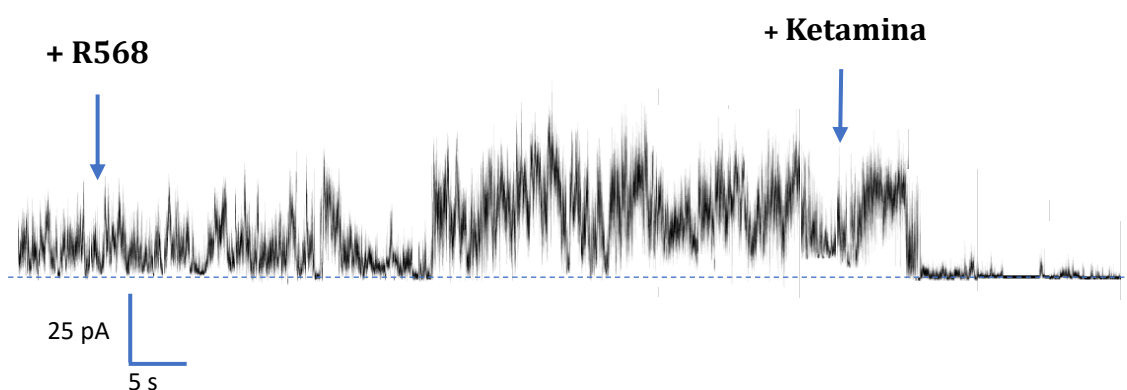


Figura 28. Efecto del inhibidor ketamina en membranas ciliares. Trazado representativo del efecto de ketamina, Las corrientes ciliares incrementadas por el agregado (trans) de R568, 50 μ M, fueron completamente inhibidas con ketamina (1,25 mM, *cis*), inhibidor del receptor ($n = 3$).

4.5. Señalización Eléctrica a Través del Citoesqueleto

Como fuera detallado en la Introducción, es sabido que el citoesqueleto forma parte de la regulación y señalización de los canales iónicos (Jamney, 1998). Sin embargo, todavía no se conoce de qué manera llega esta señalización dirigida por el citoesqueleto a través de la célula.

Parte de la actividad de nuestro laboratorio, consiste en buscar los mecanismos por los cuales el citoesqueleto, en particular, los MTs, regulan los canales iónicos. Es importante remarcar un nuevo paradigma de la función de los MTs, que ya no se considerían sólo parte de la estructura de la célula, sino que tendrían también una función más compleja en la transmisión señales eléctricas (Priel, 2006; Cantero, 2016). Por ello, parte del presente trabajo de tesis consistió en estudiar las señales eléctricas producidas por distintas estructuras de MTs.

4.5.1. Actividad Eléctrica de Haces de MTs

Aparte de la transmisión y amplificación eléctrica de los MTs aislados (Priel, 2006; 2008), trabajos recientes del laboratorio, demostraron que las planchas de MTs aislados de cerebro mamífero generaban oscilaciones eléctricas muy características con una frecuencia fundamental en el orden de los 29 Hz (Cantero, 2016).

En la presente Tesis, se determinó la actividad eléctrica de los haces de MTs de cerebro de rata, utilizando la técnica descrita para las planchas de MTs (Cantero, 2016) con una variante en la configuración del parche (parche suelto, ver sección 3.3.3.2) que ya se ha utilizado en numerosas ocasiones para explorar la actividad de canales iónicos y el comportamiento eléctrico en diversas preparaciones excitables (Almers, 1984; Forti, 1997; Marrero, 2003). El circuito equivalente de la configuración experimental se muestra en la Fig. 29, donde se espera que la fuerza electromotriz real, es decir, el potencial aplicado (V_{cmd} , voltaje de comando) en la superficie del haz de MTs se reduzca en un factor relacionado con el circuito divisor de voltaje, entre la pipeta, el sello y las resistencias intrínsecas del contacto con los MTs. En estos estudios, no se hizo ningún intento para corregir el potencial aplicado, excepto llevar el potencial de la punta a 0 mV antes de acercarse a la muestra.

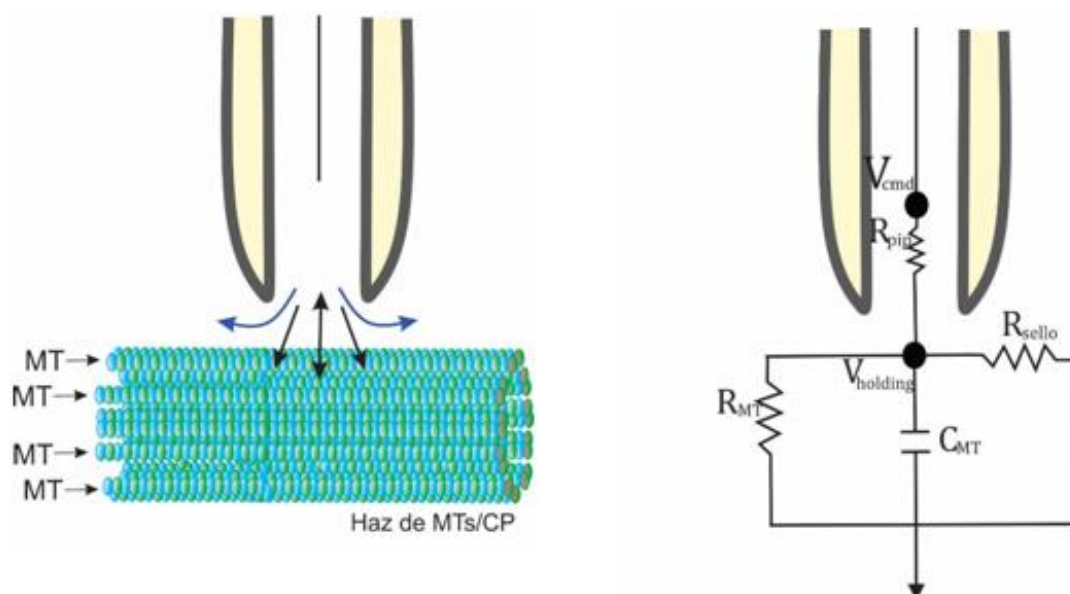


Figura 29. Configuración experimental para estudiar las oscilaciones eléctricas de los haces de MTs. Izquierda, esquema de la configuración de “parche suelto” para el estudio de las propiedades eléctricas de los haces de MTs de cerebro de rata. Las flechas azules curvadas desde la punta de la pipeta indican la corriente de fuga que modifica la magnitud del potencial eléctrico aplicado ($V_{holding}$) desde el amplificador. Derecha, esquema del circuito de parche suelto aplicado a la superficie del haz de MT. Se muestran las resistencias de la pipeta (R_{pip}), de la superficie del parche (R_{MT}) y del sello (R_{sello}). C_{MT} representa los componentes capacitivos de la superficie de los MTs. El $V_{holding}$ (voltaje de comando, V_{cmd}) y el potencial de la punta de la pipeta (V_{pip}) son diferentes de los esperados para la configuración de parche suelto.

Los experimentos en haces de MTs que se identificaron por inmunocitoquímica (Fig. 30), se realizaron en condiciones iónicas simétricas, con una solución conteniendo KCl 140 mM. Los parches en los haces de MTs solo incrementaron la resistencia de sellado de $20,3 \pm 1,3 \text{ M}\Omega$ a $53,25 \pm 7,59 \text{ M}\Omega$, $n = 25$, mediana $36 \text{ M}\Omega$ y un rango de 11,4 a $170 \text{ M}\Omega$, en contraste con la alta resistencia del sello que generalmente se obtiene con las planchas de MTs (Cantero, 2016).

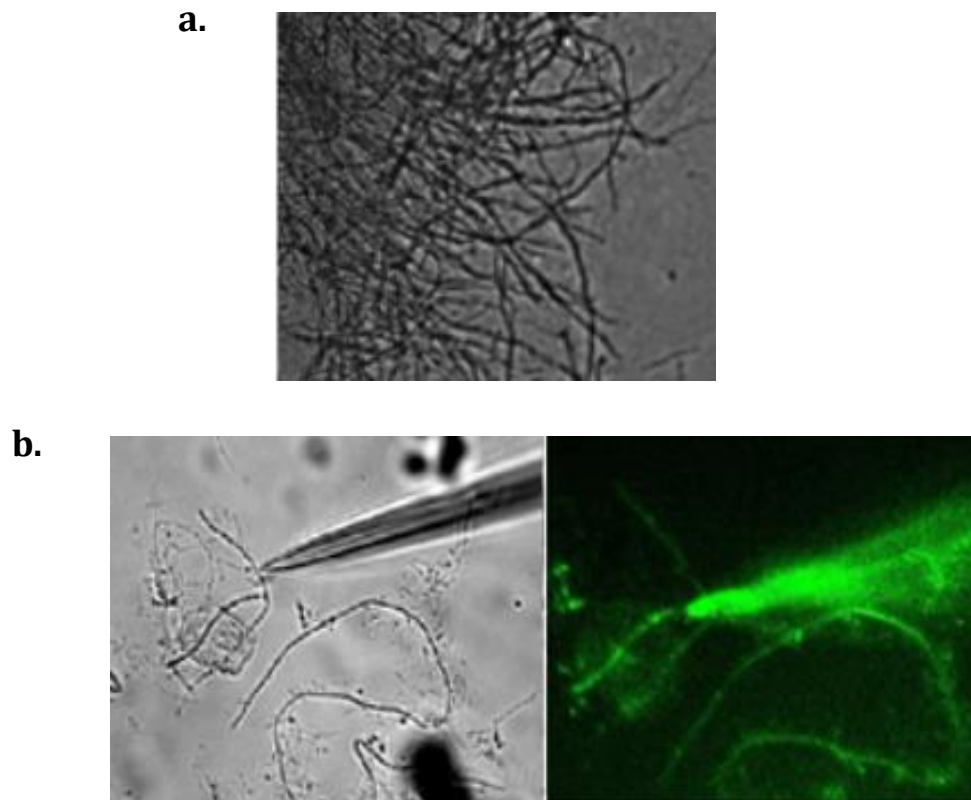


Figura 30. Preparación de haces de MTs. **(a)** Muestra de haces de MTs de cerebro de rata observados bajo DIC (20x). **(b)** Haz de MTs observado bajo DIC (20x) en contacto con una pipeta de patch clamp para registrar las corrientes intrínsecas. A la derecha, mismo haz de MTs marcado con anticuerpo anti-tubulina y anticuerpo secundario, y observado con filtro FITC (20x). Se puede observar en esta imagen la pipeta de patch sobre el haz de MTs.

Los haces de MTs mostraron actividad eléctrica espontánea consistente con oscilaciones que respondían directamente a la magnitud y polaridad del estímulo eléctrico (Fig. 31). Estas oscilaciones fueron altamente similares a las obtenidas previamente en láminas de MTs de vaca y rata (Cantero, 2016), aunque se pudieron observar algunas diferencias interesantes.

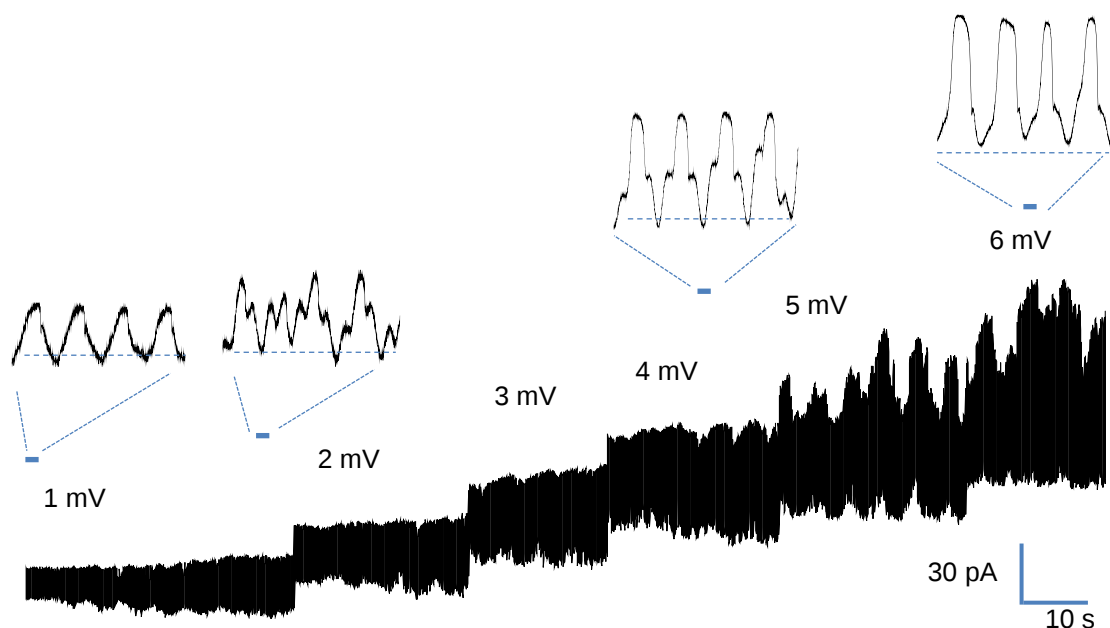


Figura 31. Oscilaciones eléctricas de un haz de MTs a distintos voltajes. Registros representativos de las oscilaciones espontáneas a distintos voltajes de un haz de MTs de cerebro de rata. Trazados representativos de $n = 25$ experimentos.

Mediante el espectro de Fourier, se observó sólo una vez (Fig. 32, *panel izquierdo*) una frecuencia fundamental de 29 Hz similar a la de planchas de MTs de vaca y rata descrita previamente por Cantero y cols, (2016). Sin embargo, en las distintas repeticiones de los experimentos con haces de MTs, la frecuencia fundamental se mantuvo en 39 Hz (Fig. 32, *panel derecho*).

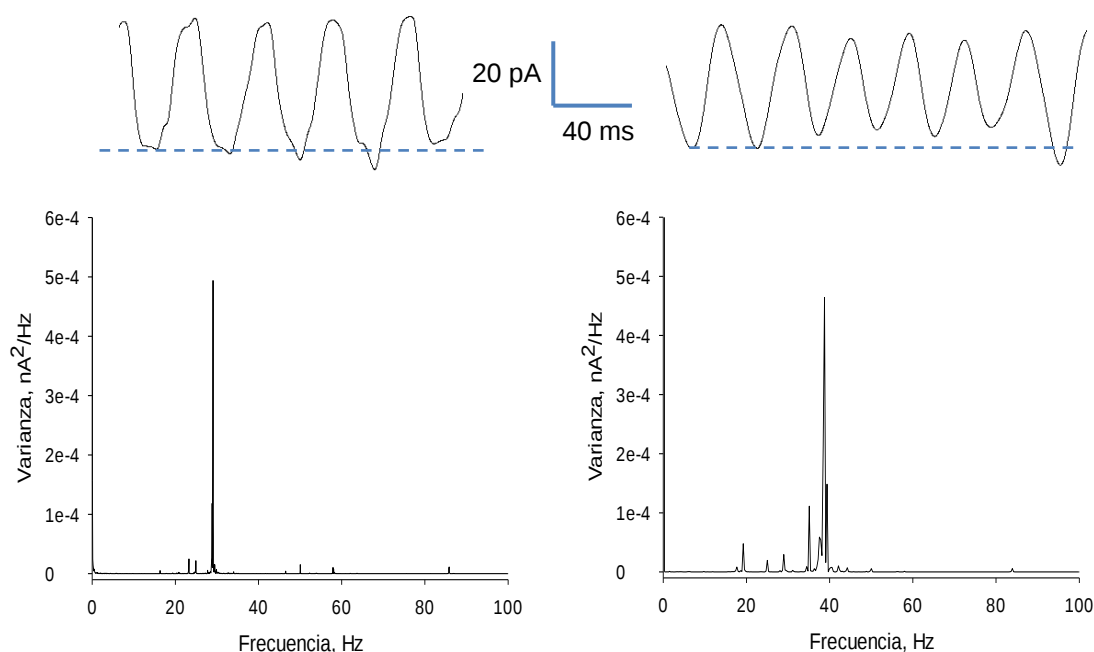


Figura 32. Diferentes oscilaciones en haces de MTs. En el panel izquierdo de la figura podemos ver un trazado representativo de las ondas de 29 Hz, con su respectivo espectro de Fourier. A la derecha encontramos las oscilaciones alrededor de 39 Hz que fueron las mayormente encontradas en haces de MTs de cerebro de rata. Datos representativos de $n = 25$ experimentos.

La actividad eléctrica intrínseca del haz de MTs se confirmó mediante el análisis espectral de Fourier de las corrientes antes y después del acoplamiento y posterior inhibición con 10 μ M Taxol (estabilizador de MTs) de las oscilaciones (Fig. 33).

Visiblemente, la pipeta no unida mostró un espectro de ruido blanco, mientras que los espectros con el haz de MTs unido a la pipeta muestran los picos esperados de las frecuencias relevantes en el comportamiento oscilatorio. En los diagramas de Poincaré (Fig. 33, *panel derecho*) se pudo observar que luego del agregado de taxol, se redujeron notablemente las corrientes, perdiéndose el régimen oscilatorio (Fig. 33).

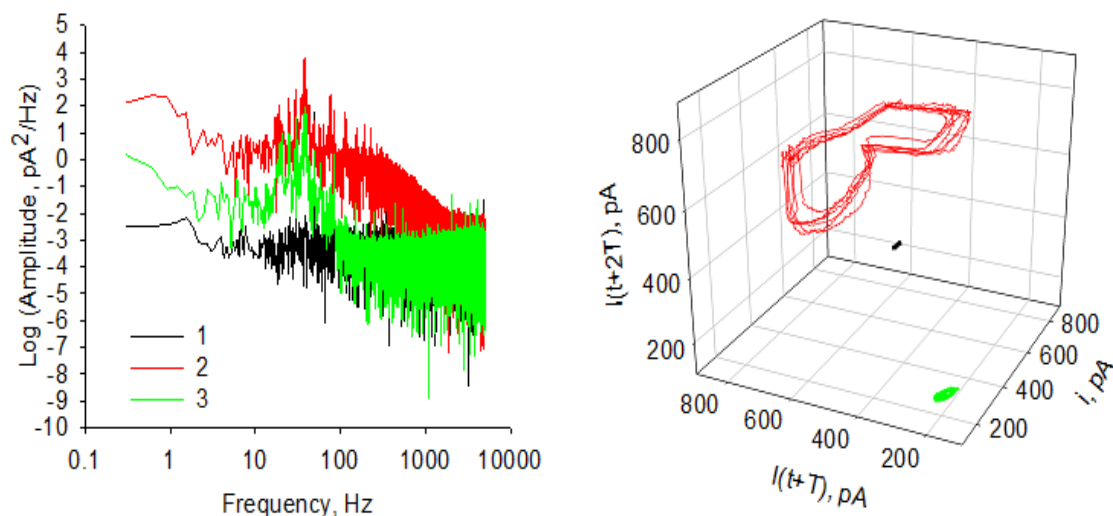


Figura 33. Inhibición de las oscilaciones por Taxol. Izquierda. Espectros de frecuencias de Fourier obtenidos de (1) trazado de corriente sin filtrar de una pipeta flotando libre antes del parche, (2) luego del parche al haz de MTs, y (3) la misma muestra luego del agregado de Taxol ($10 \mu\text{M}$). Derecha, representación de fases en 3D de trazados que dieron lugar a los espectros mostrados en el panel de la izquierda, indicando ciclos límite para la muestra acoplada en condiciones control, y su gran reducción luego del agregado de Taxol. Se mantiene el código de colores en ambos paneles. El tiempo de retraso para la primera y segunda derivadas adoptadas para las representaciones de fase fue de 1 mseg.

4.5.2. Señales Eléctricas de MTs y CPs de Células LLC-PK1

4.5.2.1. Señales Eléctricas de los MTs de Células LLC-PK1

Debido a la frondosa actividad eléctrica que observáramos en las distintas estructuras de MTs de cerebro, propusimos explorar las señales eléctricas de MTs extraídos de las células epiteliales LLC-PK1 dada la prominente red de MTs que presenta esta línea celular y obtener la posibilidad de extrapolar dicha información al axonema del CP.

Los MTs se aislaron de capas confluentes de células LLC-PK1 con el método descrito en la sección 3.2.3. Para estudiar electrofisiológicamente los MTs de estas células, se prepararon planchas similares a las utilizadas previamente con MTs de cerebros (Cantero, 2016, Fig. 34) y se identificaron con anticuerpo anti α -tubulina.

Se utilizó un equipo de *patch clamp*, con el que se realizaron parches con alta resistencia del orden de los $G\Omega$.

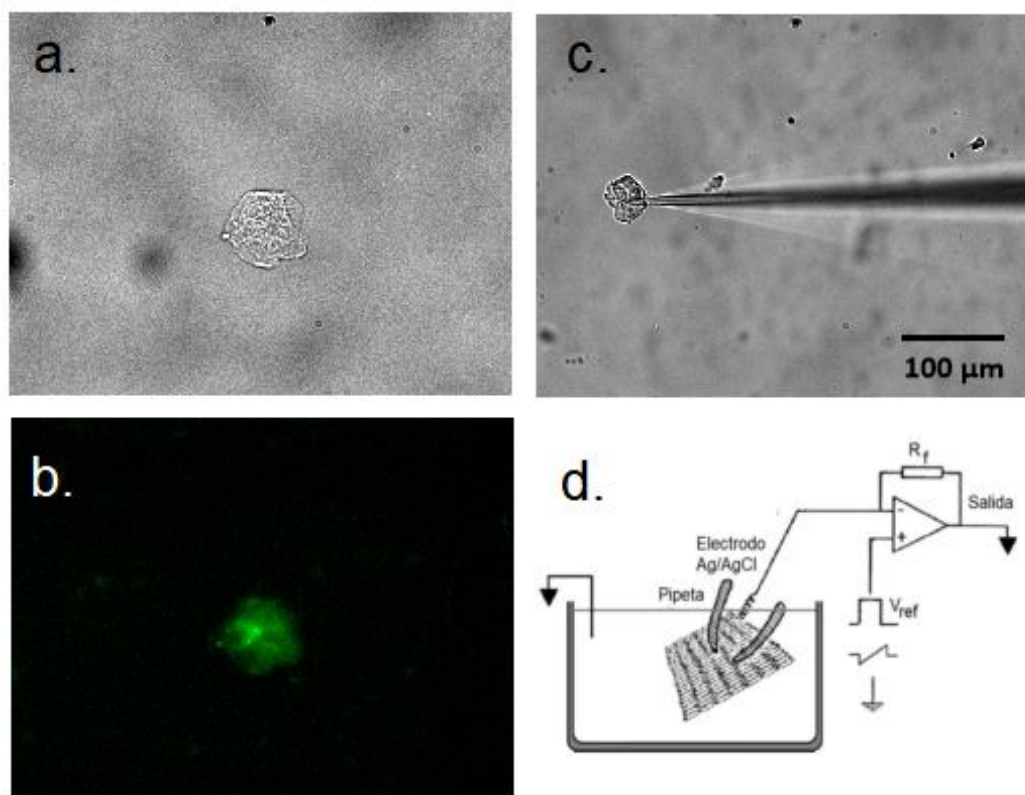


Figura 34. Obtención de señales eléctricas de planchas de MTs de células LLC-PK1. (a) Planchas de MTs de células LLC-PK1 observadas en DIC (40x). **(b)** La misma muestra fue marcada con anticuerpo anti- α -tubulina, confirmando la presencia de MTs (40x). **(c)** Plancha de MTs de LLC-PK1 con una pipeta de patch adosada para obtener señales eléctricas. **(d)** Configuración utilizada para tomar las señales eléctricas de las planchas de MTs (reproducida de Cantero, 2016).

Las planchas de MTs mostraron oscilaciones espontáneas que variaron en amplitud dependiendo de los distintos voltajes aplicados mediante el protocolo *gap-free* (Fig. 35).

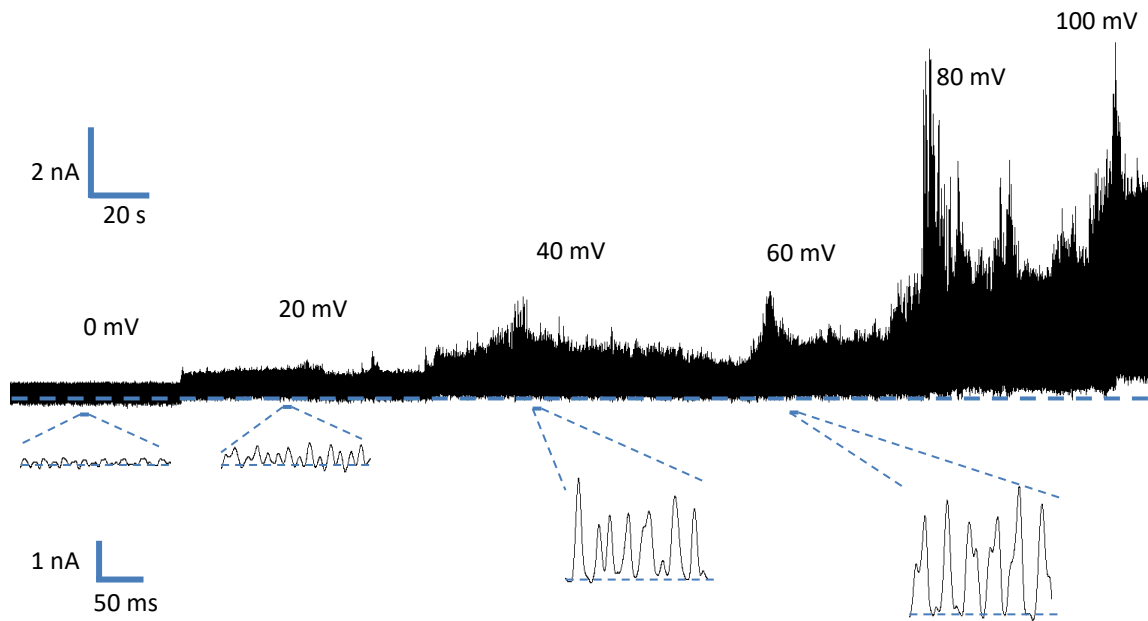


Figura 35. Señales eléctricas de planchas de MTs de células LLC-PK1. Trazado representativo ($n = 4$) de oscilaciones espontáneas de las planchas de MTs a distintos voltajes aplicados. Se muestran, además, ampliaciones de las oscilaciones en cada uno de los voltajes, observándose una mayor amplitud de corrientes y trazados más caóticos a potenciales altos.

Además, se pudo observar una cierta asimetría en la respuesta al voltaje (Fig. 36, *panel izquierdo*) que se hizo evidente en la representación de espacio de fases tridimensional, diagrama de Poincaré, mostrando ciclos límite monoperiódicos (Fig. 36, *panel derecho*).

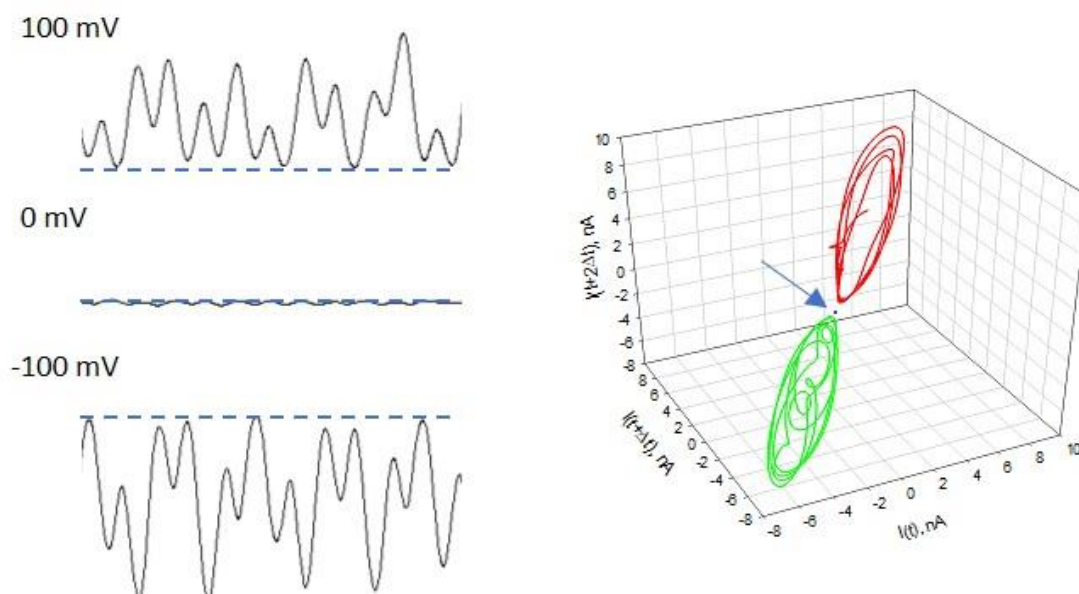


Figura 36. Representación de diagrama de fases en 3D y ciclos límite monoperiódicos. En el panel de la izquierda, podemos observar oscilaciones de una plancha de MTs de las células LLC-PK1 a tres voltajes, 100, 0 y -100 mV, respectivamente. Dichos registros se muestran también en un diagrama de Poincaré (derecha), observándose ciclos límite que ponen en evidencia el régimen oscilatorio de la señal eléctrica (rojo, azul y verde para cada uno de los voltajes, respectivamente). La flecha muestra la ausencia de oscilaciones a 0 mV.

4.5.2.2. Señales Eléctricas del CP de Células LLC-PK1

El CP es una organela sensorial que transduce varios tipos de señales a la célula. Una de las teorías más recientes es que el CP actuaría como antena eléctrica (Cai, 2017) dada la presencia de varios tipos de canales en la membrana ciliar. Aún más, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron la regulación de la PC2 ciliar por MTs (Li, 2006). Sin embargo, al presente no se conoce cómo dicha organela transmite estas señales ciliares al interior celular. A partir de la información eléctrica obtenida tanto de las planchas de MTs como de los haces de MTs, una manera de transmitir estas señales podría ocurrir a través de su axonema, ya que el mismo está formado por MTs de α -tubulina acetilada (Fig. 37).

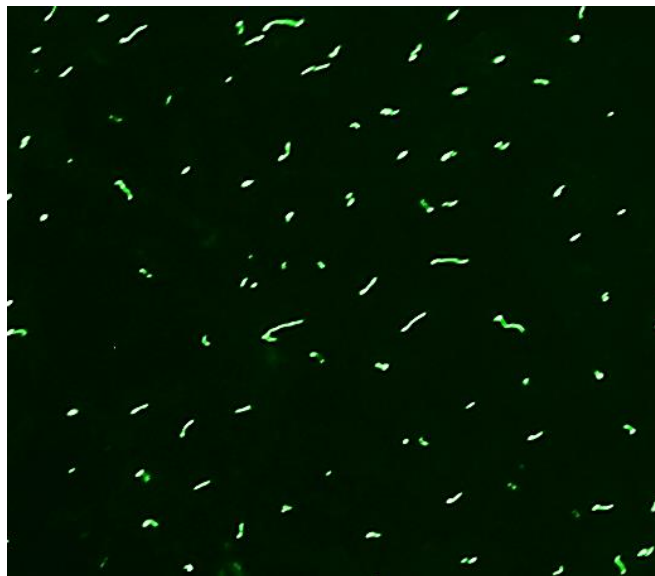


Figura 37. Marcación de los CPs en células LLC-PK1. Inmunomarcación de CPs con anticuerpo anti α -tubulina acetilada en verde, para evidenciar el axonema ciliar formado por MTs (20x).

4.5.2.2.1. Señales Eléctricas de CPs Permeabilizados

Con el fin de explorar la existencia de actividad eléctrica en el axonema ciliar, los CPs se permeabilizaron con Tritón X-100 (3%) durante una hora para exponer su axonema de MTs y se utilizó la técnica de parche suelto como se describiera para los experimentos en haces de MTs.

Se observaron oscilaciones eléctricas espontáneas a distintos voltajes en los CPs permeabilizados. En análisis de los datos en el dominio de las frecuencias por medio de espectros de Fourier para estas oscilaciones mostró un pico evidente de frecuencia a 92 Hz, que difiere de las observadas en otras preparaciones de células de LLC-PK1 y MTs aislados de cerebro (Fig. 38).

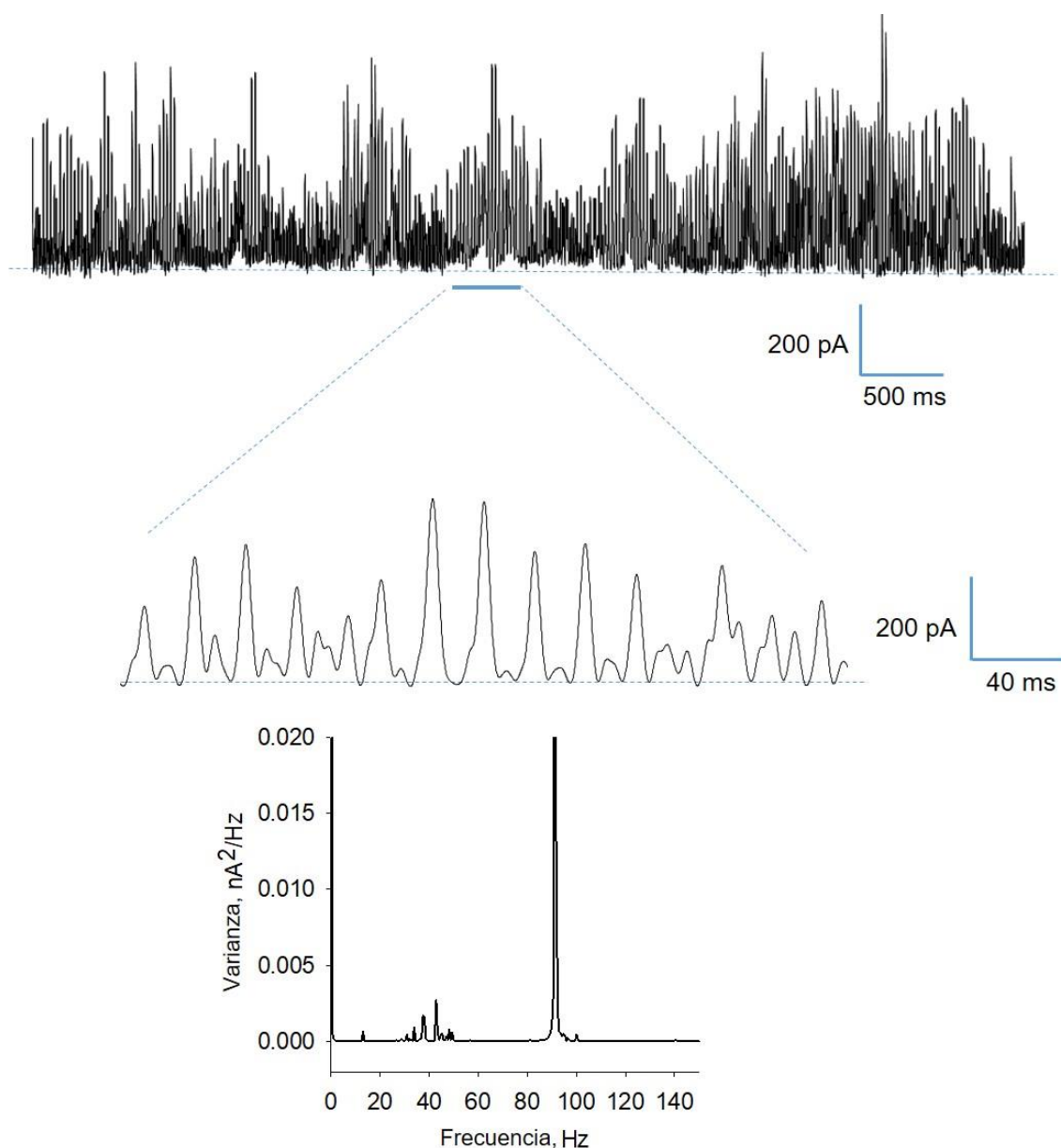


Figura 39. Oscilaciones eléctricas espontáneas en CPs de células LLC-PK1 permeabilizados. En el panel superior observamos un trazado representativo de corrientes espontáneas a 45 mV, obtenido en presencia KCl 140 mM tanto en la pipeta como el baño, con previa incubación de los CPs en 3% de Tritón X-100 durante una hora. Datos representativos de $n = 3$ experimentos. En el panel inferior, observamos parte del mismo trazado expandido en la escala de tiempo. A la derecha se encuentra su respectivo espectro de frecuencias evidenciando una frecuencia fundamental en 92 Hz.

4.5.2.2.2 Señales Eléctricas Sobre la Superficie del CP Intacto

Se realizaron también experimentos de *patch clamp* en configuración de parche suelto sobre CPs intactos para obtener señales eléctricas de los canales junto con el axonema ciliares. Los CPs fueron identificados por DIC e inmunomarcación con α -tubulina acetilada y estudiados con una pipeta de *patch* (Fig. 40a-c). Es importante hacer notar que estos experimentos se realizaron sin el agregado de Tritón X-100, por lo que llamaremos a estos CPs “no permeabilizados”. Sin embargo, al haberse preservado hasta su utilización en freezer, no se puede asegurar que la membrana ciliar esté intacta. Los experimentos realizados con CPs aislados mostraron corrientes características de canales iónicos insertos en la membrana junto con las oscilaciones eléctricas pertenecientes al axonema ciliar.

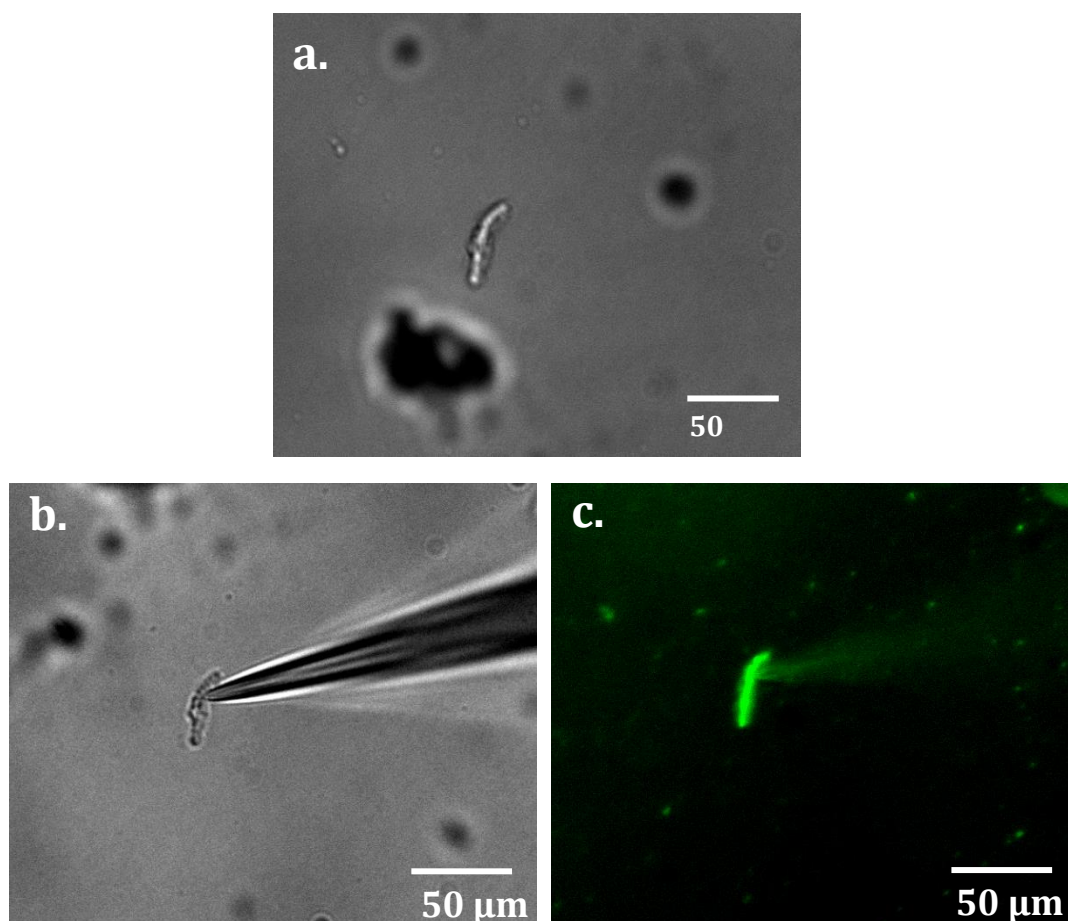


Figura 39. Patch Clamping de CPs. (a) Identificación de CPs por DIC bajo microscopio invertido. **(b)** Pipeta de *patch* adosada al CP para el registro de corrientes. **(c)** Marcación del CP evidenciado en a y b con anticuerpo anti α -tubulina acetilada. Nótese la punta de la pipeta sobre el CP en la figura.

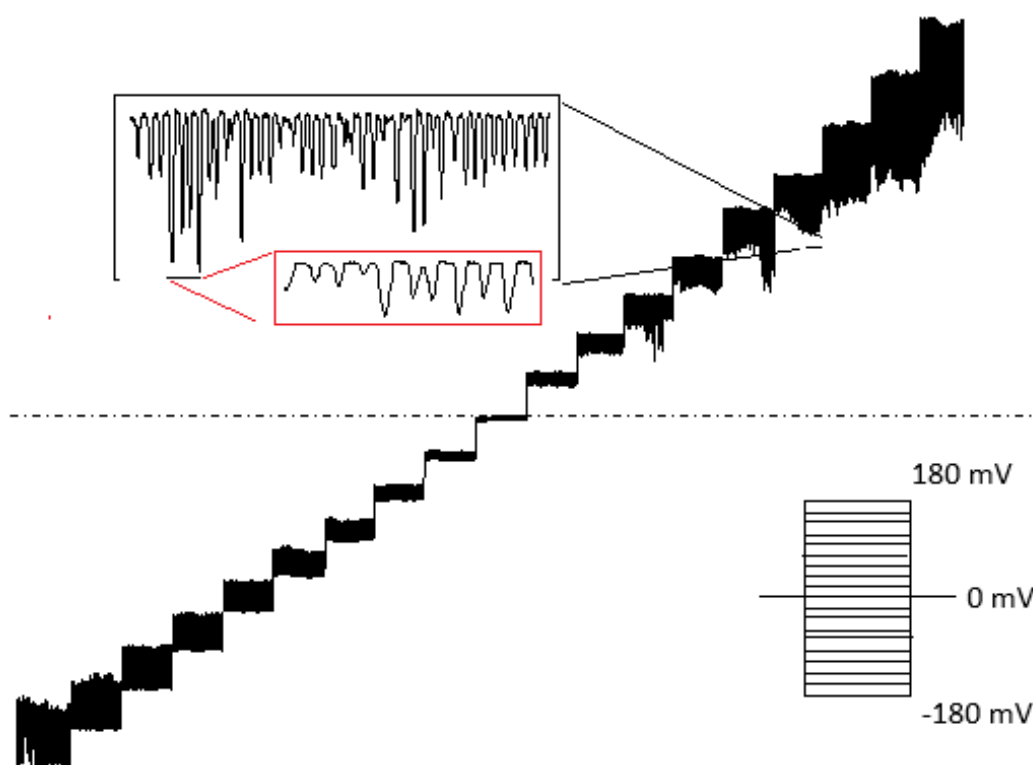


Figura 40. Corrientes oscilatorias en CPs aislados de células LLC-PK1 a diferentes voltajes. Se muestran las oscilaciones obtenidas luego de aplicar pulsos de voltaje en saltos de 20 mV, entre ± 180 mV. La ampliación muestra el registro a 100 mV expandido. Datos representativos de $n = 6$ experimentos.

A diferentes voltajes entre ± 180 mV, los CPs no permeabilizados presentaron oscilaciones similares a las que se observaron previamente en los CPs permeabilizados, pertenecientes al axonema ciliar (Fig. 40).

En esta preparación fue posible observar tanto la actividad de canales presentes en la membrana ciliar como las oscilaciones previamente observadas en los MTs del axonema ciliar (Fig. 41). El espectro de Fourier evidenció una frecuencia de 39 Hz observada en los haces de MTs de rata y vaca y, además, la frecuencia de 92 Hz, observada previamente en los CPs permeabilizados.

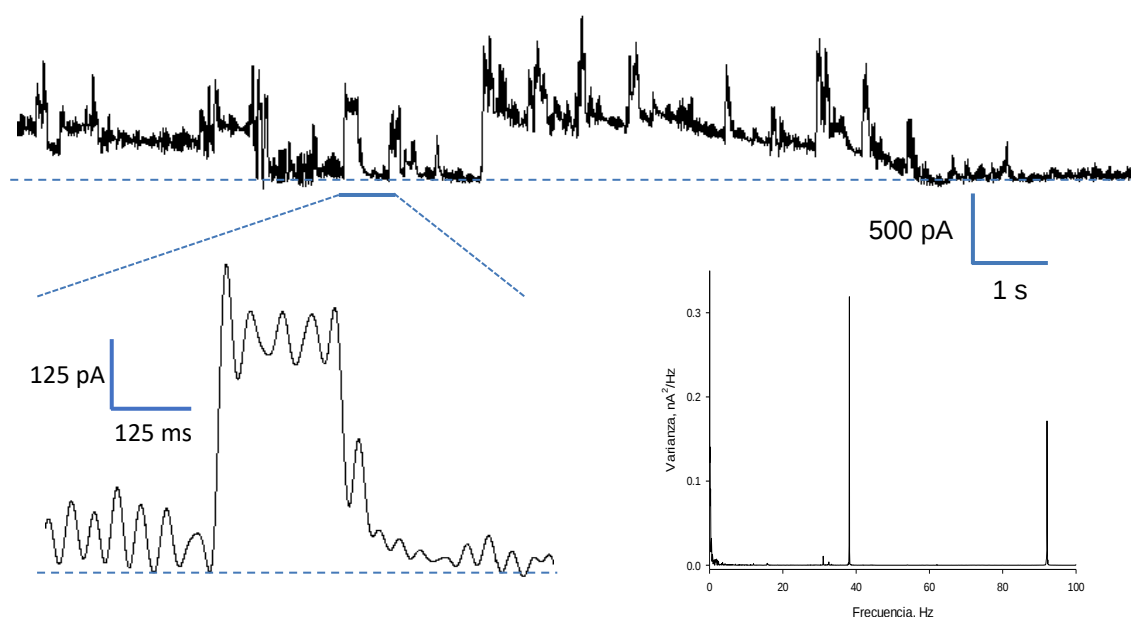


Figura 41. Corrientes de canales presentes en el CP de células LLC-PK1. En el panel superior, se muestra un trazado representativo de corriente a 40 mV en presencia KCl 140 mM en la pipeta y baño ($n = 6$), filtrado con Bessel 8-pole con un umbral de 120 Hz. Abajo, se muestra el mismo trazado expandido, con su respectivo espectro de Fourier a la derecha. En el mismo, se evidencian las frecuencias características de 39 Hz y 92 Hz.

4.5.2.2.3. Efecto del Agonista del CaSR sobre el CP

A continuación, para confirmar la existencia de una membrana ciliar capaz de interactuar con el axonema, se condujeron experimentos de *patch clamp* en CPs intactos expuestos a agonistas para la activación de receptores ciliares. En primera instancia, se exploró la regulación por el CaSR ciliar como se confirmara previamente en el presente trabajo. Para ello, se realizó el agregado del agonista R568 (50 μ M) a los CPs no permeabilizados, con una solución de 140 mM de KCl en la pipeta y 150 mM de NaCl en el baño. Los parches mostraron actividad espontánea de canales previo al agregado del ligando, observándose luego no sólo un incremento en la magnitud de las corrientes, sino que también la probabilidad de apertura de los canales (Fig. 42).

Control

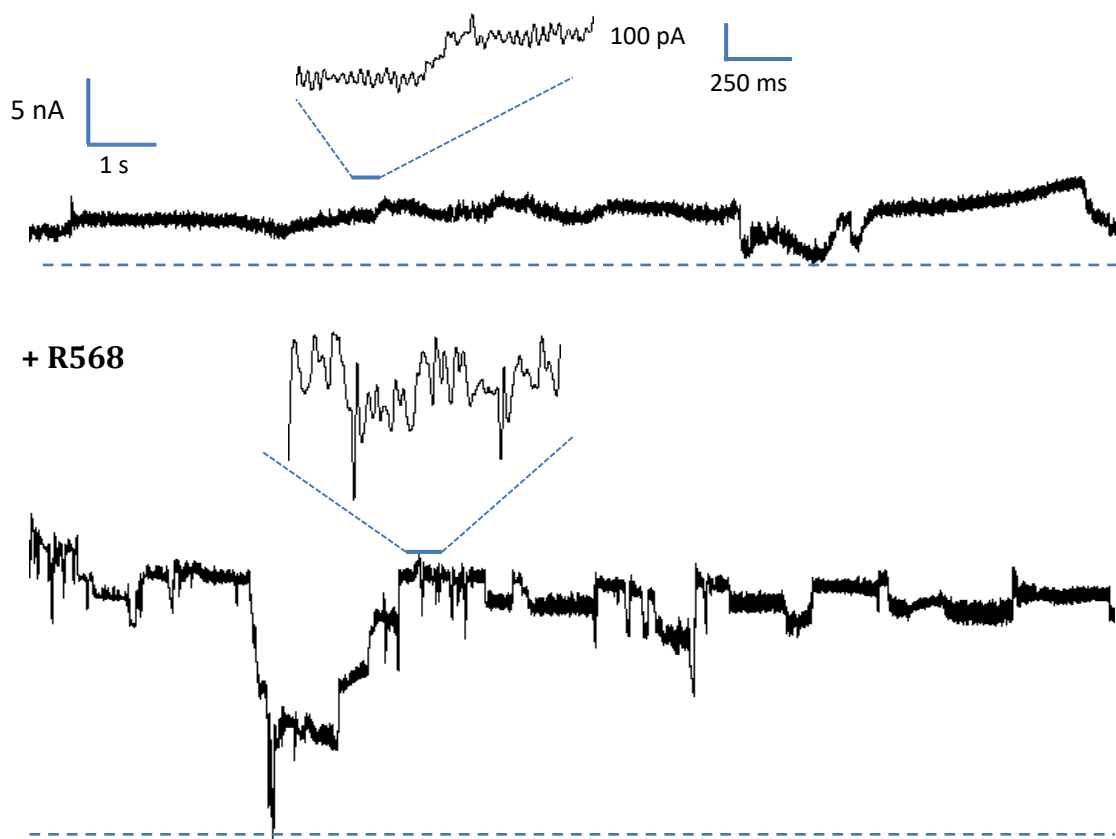


Figura 42. Efecto del agonista del CaSR, R568, sobre las corrientes del CP. Registro representativo de “parche suelto” con una solución de alto KCl en la pipeta y alto NaCl en el baño. En el panel superior se puede observar la corriente espontánea del CP a 200 mV. En el panel inferior, se observa la actividad de canales que fue incrementada con el agregado del agonista. Datos son representativos de $n = 5$ experimentos.

Por otro lado, al inicio del experimento, observamos oscilaciones de baja amplitud con las frecuencias esperadas de 39 Hz y 92 Hz. Sin embargo, cuando realizamos el mismo espectro de frecuencias luego del agregado de R568, esta última frecuencia disminuyó casi por completo, incrementándose la de 39 Hz y con la aparición de una nueva de 76 Hz, además de frecuencias con valores menores que representan las aperturas estocásticas de los canales iónicos provocadas por la activación del CaSR (Fig. 43).

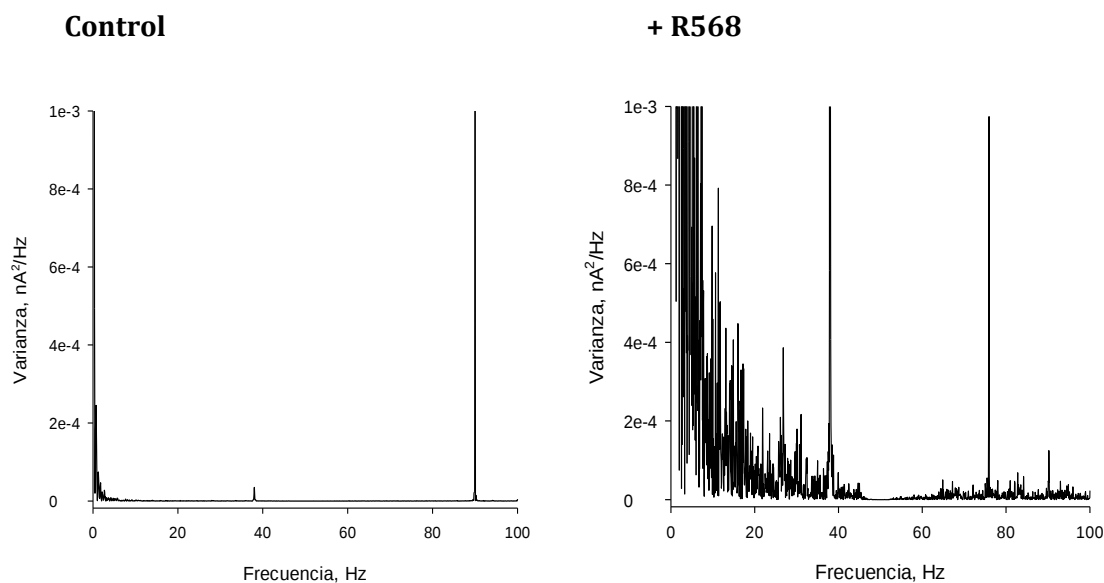


Figura 43. Espectros de Fourier antes y después del agregado de R568. Izquierda, en la condición control, observamos el espectro donde se visualizan las frecuencias de 39 y 92 Hz. Derecha, observamos el espectro del mismo experimento, luego del agregado de R568, donde podemos encontrar la frecuencia de 39 Hz, una de 76 Hz y frecuencias menores que indican la apertura de canales iónicos, y con la desaparición del pico en 92 Hz.

4.5.2.2.4. Efecto de la Vasopresina sobre el CP

Finalmente, se exploró también el efecto de la hormona arginina vasopresina (AVP), ligando del receptor V2R epitelial. Dicho receptor se encuentra en el CP, donde regula la actividad del canal PC2 (Raychowdhury, 2009). Para ello, en experimentos realizados en presencia de KCl (140 mM) en la pipeta y el baño, donde se agregó AVP a una concentración de 20 μ M.

Estos experimentos, demostraron que el agregado de AVP incrementó la actividad de canales en los CPs (Fig. 44). Por otro lado el espectro de Fourier mostró un aumento en la frecuencia fundamental de 39 Hz, observándose además, frecuencia menores, demostrándose la activación de canales iónicos (Fig. 45).

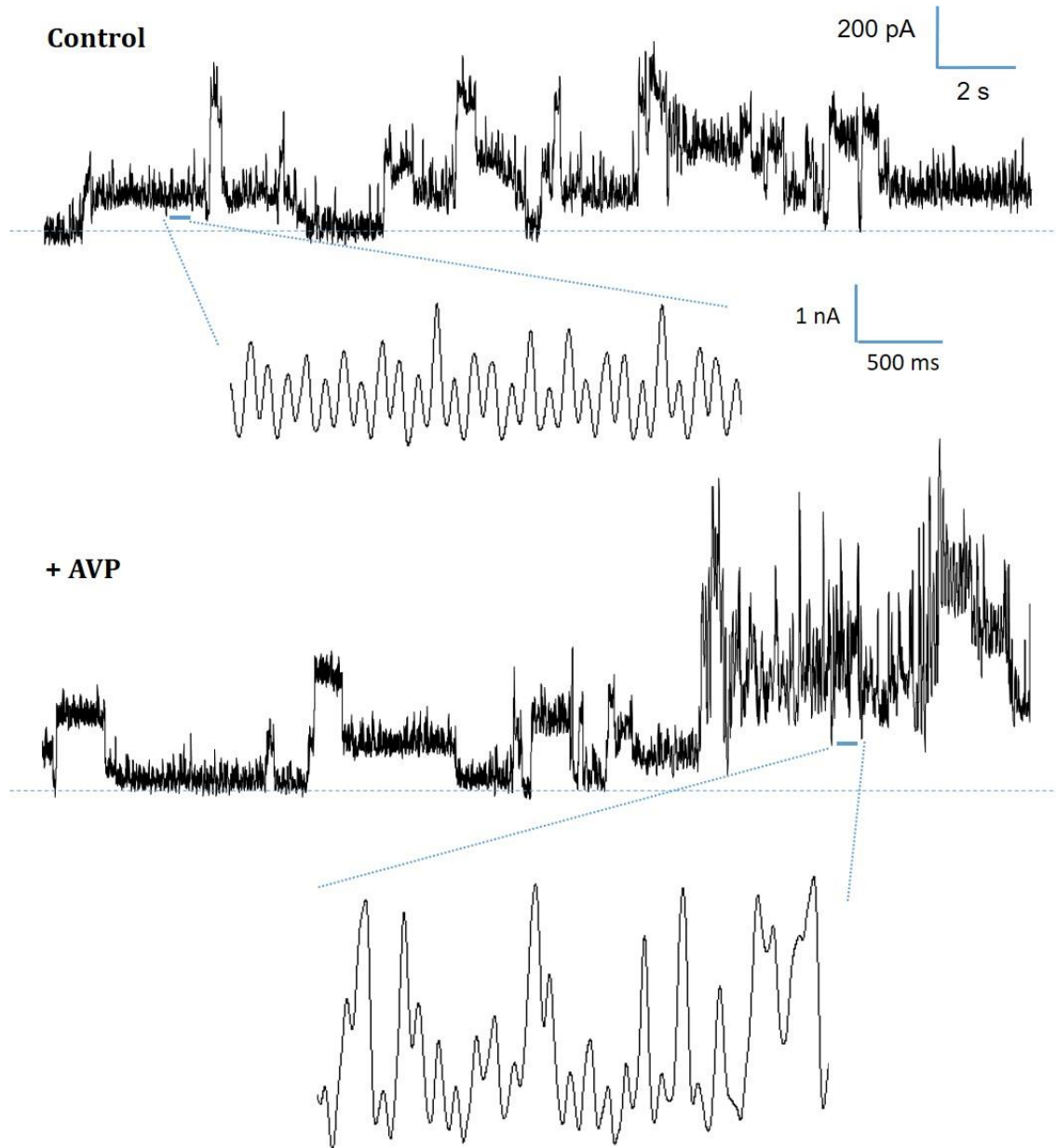


Figura 44. Efecto del AVP sobre canales y oscilaciones del CP. En el panel superior observamos un registro representativo en condiciones de alto KCl simétrico. Se observan claramente transiciones de corriente de canales iónicos y oscilaciones eléctricas. El agregado de 20 μ M AVP evidencia un aumento en las corrientes ciliares ($n = 4$).

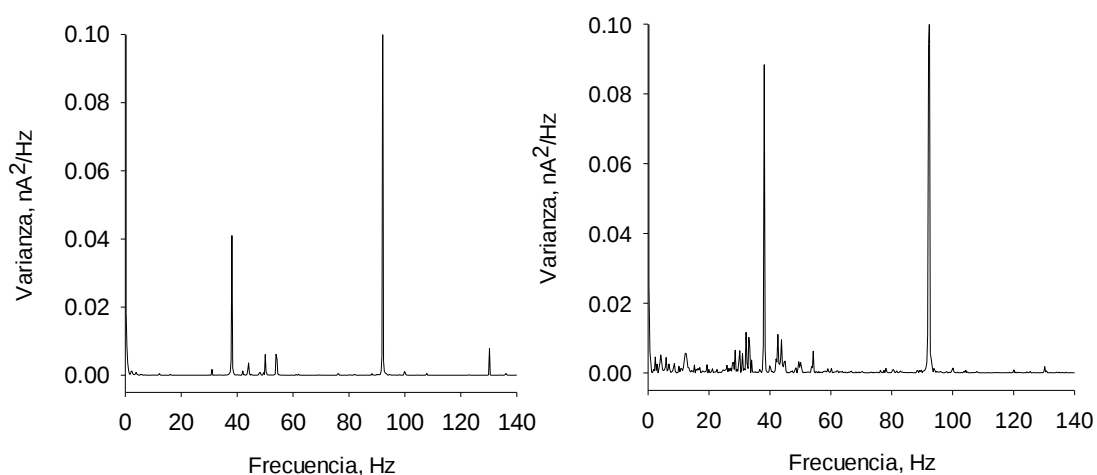


Figura 45. Espectro de Fourier antes y después del agregado de AVP. (a) Espectro de frecuencia antes del agregado de AVP. **(b)** Espectro de frecuencia antes del agregado de 20 μ M AVP. Ambos espectros permiten identificar las frecuencias fundamentales de 39 y 92 Hz. El agregado de AVP incrementa la frecuencia de 39 Hz, sumando, además, frecuencias de menor magnitud consistentes a la activación y/o incremento de corrientes de canales iónicos.

*Capítulo cinco***Discusión**

5.1 Introducción

El presente trabajo de Tesis está inserto en el interés que por décadas ha tenido nuestro laboratorio sobre el rol que tienen los canales iónicos en distintas enfermedades conocidas como Canalopatías. Estos estudios han descripto nuevos mecanismos de regulación de canales por segundos mensajeros y particularmente elementos del citoesqueleto.

La PQRAD es un trastorno hereditario, reconocido como una ciliopatía, enfermedad causada por una disfunción del CP (Badano, 2006; Braun, 2017). Esta enfermedad, que genera una prevalente enfermedad renal, afecta a otros órganos, considerándosela como una enfermedad sistémica. La PQRAD está causada por mutaciones en los genes *PKD1* o *PKD2*, que codifican las proteínas transmembranales PC1 y PC2, respectivamente. La PC1, que se requeriría para la respuesta del CP inducida por flujo (Nauli, 2003), tiene características estructurales de receptor y/o molécula de adhesión, y co-localiza con PC2 en la membrana ciliar. PC1 es al presente un receptor huérfano, cuyos estímulos o ligandos endógenos se desconocen, aunque se especula con que podría ser mecánicamente sensible, respondiendo directamente a la flexión ciliar inducida por flujo y/o ligandos químicos del filtrado renal. PC2 es un canal TRP prototípico, catiónico no selectivo, con permeabilidad al Ca^{2+} (González-Perret, 2001; Cantero, 2013). Se ha observado que la interacción funcional entre PC1 y PC2 es mediada por sus respectivas colas carboxi-terminales, lo que estaría asociado a la patología de la enfermedad (Xu, 2003). Al presente hemos identificado varios estímulos que activan PC2, incluidos cambios en voltaje, pH, estrés oxidativo, Ca^{2+} intracelular, shock hipo-osmótico, elementos del citoesqueleto, y ligandos como el Ca^{2+} externo y la hormona antidiurética arginina-vasopresina (AVP) (González-Perret, 2002; Montalbetti, 2005a y 2008; Raychowdury, 2009; Cantero 2013 y 2015; Dai, 2017).

PC2 tiene una sofisticada regulación por elementos del citoesqueleto, tanto de actina como de MTs (Li, 2005 y 2006; Montalbetti, 2005a y b; Chen, 2008; Wang, 2012; Cantero, 2015a), lo que ofrece una novedosa regulación por Ca^{2+} en particular, dado

que actuaría a través de proteínas Ca^{2+} -sensibles del citoesqueleto. A nivel celular, la PQRAD está asociada a una reducción del Ca^{2+} intracelular y aumento del AMPc, con la consecuente activación de la proteína quinasa A (PKA), lo que hace que las células principales del túbulo colector del riñón, entre otras, se encuentren bajo el efecto tónico de la AVP a través de su receptor V2 renal. Una interrupción en los mecanismos de señalización por Ca^{2+} y AMPc activarían las vías de proliferación celular, produciendo un aumento de la secreción de fluidos e inflamación intersticial (Chebib, 2016). Actualmente, no hay cura para la enfermedad, que solo es clínicamente atendible a través del manejo sintomático de sus muchas complicaciones. Recientemente se han encontrado fármacos que disminuyen la progresión de la enfermedad en modelos animales y ensayos clínicos (Torres, 2012; Happé, 2014; Chebib, 2016). El antagonista del receptor de vasopresina V2 (V2R), tolvaptán, parece retrasar la progresión de la PQRAD (Torres, 2012). Se ha observado también que en modelos animales murinos de PQRAD, los calcimiméticos, moduladores alostéricos específicos del CaSR, inhiben el crecimiento de quistes por un aumento del Ca^{2+} intracelular. Por lo tanto, además del V2R, se ha propuesto al CaSR como una posible diana terapéutica en PQRAD (Gattone, 2003; Wang, 2009; Chen, 2011). Los estudios de la presente Tesis, permiten expandir nuestro conocimiento sobre dichos mecanismos de señalización, particularmente en su interacción con la PC2 ciliar.

5.2 Señalización Celular por CaSR y su Interacción con la PC2 en Células Epiteliales Renales

A pesar de lo mucho que se sabe sobre la estructura y función de la PC2, todavía se desconoce cómo este canal produce la cascada de señales asociadas por Ca^{2+} que estarían modificadas en la PQRAD. PC2 se ha localizado en diferentes ubicaciones celulares (Foggensteiner, 2000) incluida la membrana plasmática (Ong, 1999; Luo, 2003), el RE (Ong, 1999; Koulén, 2002) y el CP (Cai, 1999; Köttgen, 2005; Raychowdhury, 2005). En particular, la PC2 ciliar sería uno de los elementos clave en la respuesta mecano-sensorial de los epitelios renales al flujo de fluidos (Nauli, 2003), y cuya integridad puede prevenir la formación de quistes (Singla, 2006).

Estudios previos de nuestro laboratorio determinaron que la PC2 se localiza y funciona como canal en el CP de las células epiteliales renales LLC-PK1 (Raychowdhury, 2005), y que está regulada por la producción de AMPc local inducida por activación del V2R de localización ciliar (Raychowdhury, 2009). Esta función de la PC2 tendría también un papel relevante en el transporte de Ca^{2+} y regulación de la longitud ciliares (Perez PL, Scarinci N, Cantiello HF, Cantero MR, *manuscrito en revisión*). Un aspecto de la regulación de la función celular por PC2 es que la actividad del canal estaría asociada al aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} (Nauli, 2003), lo que por restricciones geométricas y electrodifusionales del lumen del CP, no podría ser mediado por su actividad ciliar. Por esto, se debe invocar la presencia de una conductancia celular al Ca^{2+} , mediada por canales Ca^{2+} -permeables, incluida PC2, residentes en la membrana plasmática, y que serían activados por la PC2 ciliar y/u otras señales celulares. Los estudios de esta Tesis contribuyen a demostrar un nuevo mecanismo de señalización por Ca^{2+} iniciado por un mecanismo sensor al Ca^{2+} extracelular, con la consecuente activación de la PC2 endógena, que por primera vez demostramos en la membrana plasmática de las células LLC-PK1 (Dai, 2017).

Es interesante observar, sin embargo, que estudios previos de nuestro laboratorio determinaron que la función de la PC2 aislada no se ve afectada por el Ca^{2+} extracelular, sino por un mecanismo de retroalimentación mediado por el flujo de dicho ion a través del canal, y la unión reguladora del mismo a proteínas acopladas al citoesqueleto de actina (Cantero, 2015a), controladas por una región de almacenamiento local de Ca^{2+} (Cantero, 2013). Los mecanismos reguladores de la PC2 asociados al Ca^{2+} externo eran al momento desconocidos. El hecho de que PC2 en sí no respondía a concentraciones variables de Ca^{2+} externo, invocaba la existencia de otros mecanismos “detectores” del Ca^{2+} extracelular.

Por lo tanto, uno de los objetivos fundamentales del trabajo que precede a esta Tesis, fue evaluar si los cambios en la concentración de Ca^{2+} externo modificaban la conductancia celular de las células epiteliales renales LLC-PK1, y si esta contribución podría estar asociada a la expresión endógena de la PC2 (Dai, 2017). Estudios previos que habían intentado determinar las corrientes de PC2 en células

epiteliales, sólo lograron hacerlo por sobre-expresión del gen (Ma, 2005). Por medio de la metodología de *patch clamp* de células LLC-PK1 del tipo salvaje, observamos que una concentración extracelular alta de Ca^{2+} (6,2 mM) incrementaba sistemáticamente la conductancia celular respecto de la concentración de Ca^{2+} “normal” (1,2 mM). Por el contrario, una reducción en la concentración del Ca^{2+} externo (<100 nM Ca^{2+}), reducía las mismas (Dai, 2017). Para demostrar si esta regulación por Ca^{2+} externo estaba asociada a la actividad de la PC2, las mismas mediciones se realizaron en células dializadas con un anticuerpo anti-PC2 dirigido contra el extremo carboxi-terminal del canal, que bloquea la actividad de la PC2 en las células LLC-PK1 (Raychowdhury, 2005). El anticuerpo activo inhibió las corrientes estimuladas por alto Ca^{2+} externo, pero no así el anticuerpo desnaturalizado por calor sugiriendo que el cambio de conductancia estaría mediado por la actividad del canal. Esta contribución fue confirmada por inactivación del gen PKD2 por silenciamiento con ARN de interferencia (ARNi), como se determinara anteriormente (Wang, 2011). Los estudios de PCR cuantitativa y análisis de transferencia por Western Blot que se hicieron en colaboración con el grupo de la Dra. Dai para nuestro trabajo (Dai, 2017), mostraron que el ARNi PC2-específico logró una inhibición del 50% del producto génico, también de acuerdo con un estudio anterior (Wang, 2011). Esta reducción en el producto génico de PC2 provocó la inhibición completa de las corrientes estimuladas por Ca^{2+} externo. Sin embargo, la conductancia total de las células tratadas con ARNi fue aun menor a la obtenida en condiciones libres de Ca^{2+} externo, lo que sugeriría una contribución de PC2 no relacionada al mismo. El silenciamiento del gen *PKD2* permitió solidificar la evidencia de que el efecto estimulador del alto Ca^{2+} externo sobre la conductancia celular, es mediado en gran parte por corrientes de PC2 (Dai, 2017).

A continuación, iniciamos estudios para determinar cuál podría ser el mecanismo “sensor” de la concentración de Ca^{2+} extracelular en las células LLC-PK1. Uno de los posibles mecanismos de activación sería el receptor de detección de Ca^{2+} , CaSR (Hofer, 2003; Magno, 2011), que responde a concentraciones extracelulares de Ca^{2+} en el rango de 0,5-10 mM, y se ha observado en varias secciones del nefrón mamífero (Riccardi, 1998; Hofer, 2003). Para determinar si el efecto estimulador del Ca^{2+} externo estaba asociado al CaSR, se evaluaron varios agonistas y antagonistas del

misimo. Los agonistas del receptor espermina (Cheng, 2004; Squires, 2000) y gentamicina (Ward, 2005) y el agonista calcimimético R568 (Bonomini, 2012; Pipino, 2014), produjeron un aumento de las corrientes en las células LLC-PK1, consistente con la activación del receptor. Una comprobación adicional para la regulación de PC2 mediada por el CaSR se logró mediante la inhibición de las corrientes catiónicas estimuladas con alto Ca^{2+} externo por diálisis intracelular con ketamina (Dai, 2017). Este fármaco es un conocido anestésico asociado con su capacidad para bloquear los receptores NMDA. De hecho, la ketamina exhibe un efecto inhibitorio en una amplia variedad de canales iónicos y otros efectos moleculares (Wu, 2014), y está asociada a una disminución del Ca^{2+} intracelular en diferentes modelos celulares (Wu, 2014; Kudoh, 1999). Su función está asociada también con la inhibición del CaSR, en lugar de cambios en la liberación de Ca^{2+} intracelular (Kudoh, 1999). El mecanismo molecular del efecto inhibitorio de la ketamina sobre las corrientes mediadas por PC2 es actualmente desconocido, siendo los posibles blancos de acción el canal, o la vía de señalización de CaSR, incluido el propio receptor, las proteínas G asociadas y/o sus metabolitos fosfolípidos, lo que requerirá futuras investigaciones para su elucidación.

El CaSR de las células LLC-PK1 se identificó por inmunocitoquímica, donde además se observó una co-localización con la PC2 de una manera dependiente del Ca^{2+} externo. Los datos demostraron que tanto el CaSR como la PC2 co-localizan en el CP, por lo que debería existir cierta conexión con la señalización mediada por dicha organela. En realidad, el efecto estimulante del alto Ca^{2+} externo sobre las corrientes de PC2 se asoció no sólo con un aumento de la conductancia celular contribuida por este canal, sino además por la ubicación de la PC2 en la membrana plasmática.

Curiosamente, uno de los hallazgos más interesantes de los presentes estudios fue la Ca^{2+} -dependencia de la co-localización de CaSR y PC2 intracelulares. Se observó que la co-localización fue más prominente en las células en ausencia de Ca^{2+} externo, reduciéndose progresivamente con el incremento en la concentración extracelular de Ca^{2+} . Esto sería consistente con una mayor redistribución de PC2 en la membrana plasmática. Se podría postular que una interacción CaSR-PC2 intracelular se proyecte y probablemente se extienda a la membrana plasmática, lo que ayudaría a

explicar el efecto del Ca^{2+} externo en las corrientes celulares completas mediadas por PC2. Un posible escenario para la interacción funcional entre ambas proteínas supondría conllevar la disociación del complejo provocada por alto Ca^{2+} externo, lo que generaría un aumento de la inserción de la PC2 funcional a la membrana plasmática y un aumento en las corrientes celulares mediadas por el canal. En este escenario, existiría una retroalimentación positiva entre el Ca^{2+} externo y el Ca^{2+} citosólico. Esto no lo hemos probado todavía y debemos postular también cómo llega la “señal” del alto Ca^{2+} externo a los sitios de almacenado del complejo CaSR-PC2.

El CaSR es un miembro de la superfamilia de GPCR, cuya activación está acoplada a las proteínas G, G_q y G_i , que provocan tanto la activación de fosfolipasas como la movilización posterior del Ca^{2+} intracelular, así como proteínas asociadas a la reducción del AMPc intracelular e inhibición de los eventos de señalización asociados (Gerbino, 2005). El CaSR se expresa en varios segmentos del nefrón, incluida la membrana apical del túbulo proximal, donde se observó que tanto el Ca^{2+} luminal como el agente calcimimético R568 modifican la secreción de protones dependiente de Na^+ y la reabsorción de líquidos (Capasso, 2013). La activación del CaSR, ya sea por hipercalcemia o mutaciones, da como resultado una pérdida de sal y agua clínicamente significativas con producción de hipotensión (Huang, 2010).

Los estudios de la regulación por Ca^{2+} externo de las células renales epiteliales LLC-PK1 nos permitieron descubrir la existencia de un complejo estructural que contendría tanto al CaSR como la PC2. Es interesante que a partir de la co-inmunoprecipitación con sendos anticuerpos, confirmamos el acoplamiento entre ambos, que por los estudios en células (Dai, 2017), sugerirían su Ca^{2+} -dependencia. Lo más importante es que obtuvimos actividad eléctrica de canales consistentes con PC2, y posiblemente de otros canales eluidos en el complejo, dado que la inhibición con anticuerpo anti-PC2 mostró corrientes residuales (Fig. 21), que estarían asociadas a otros canales. Al presente qué otros componentes eluyen con el complejo CaSR-PC2 es desconocido, aunque el requerimiento de GTP “intracelular” (*cis*) en los estudios de reconstitución sugieren que la proteína(s) G trimérica(s) sería(n) parte del mismo. Estudios independientes que no incluimos en el presente

trabajo (Scarinci et al, *en preparación*) confirmaron la presencia de α -actinina en el complejo eluido con anticuerpo anti-PC2, lo que es consistente con el hecho de que esta proteína de asociación a actina, también se acopla específicamente a la PC2 para regular su función (Li, 2005). Dado que la actina no es de esperarse abunde en el CP, es probable que, en su mayoría, los datos obtenidos por co-IP, hayan sido de material de la membrana celular, y/o el citoplasma. Sin embargo, es interesante el hallazgo del CaSR en el CP, por lo que quizá el citoesqueleto de actina esté involucrado en la disociación del complejo en presencia de alto Ca^{2+} externo, donde podría estar libre de ser transferido del citosol a ese compartimiento.

Como dijéramos, al presente los pasos moleculares que unen la activación de CaSR con la estimulación de la PC2 aún no están completamente definidos, aunque nuestros resultados son consistentes con un mecanismo que implica tanto la regulación del tráfico de PC2, como la actividad del canal en la membrana plasmática. Esto concuerda con evidencia previa que muestra que el CaSR interactúa con, e inactiva, el canal epitelial rectificante de K^+ Kir4.1 (Capasso, 2013), que contribuye a la conductancia basolateral en el nefrón distal. Nuestros datos de co-localización sugieren que la regulación por CaSR de la función del canal PC2 puede tener una función directa en la regulación del potencial de reposo, lo que es esperado de los canales TRP, como el influjo de Ca^{2+} en las células epiteliales renales una vez residente en la membrana celular (Lev, 2010). Esto también concuerda con nuestros hallazgos que indican que un aumento en la conductancia celular mediada por PC2, está asociado con un cambio en el potencial de reversión hacia valores más despolarizantes, lo que es consistente con la no-selectividad catiónica monovalente del canal (Dai, 2017).

Cómo afectaría este tipo de regulación celular requerirá más investigaciones. Es interesante notar, por ejemplo, que el grupo de Torres no observó ningún efecto del agonista calcimimético R568, en el desarrollo de quistes en dos modelos genéticos de enfermedad renal poliquística (Wang, 2009), a pesar que el R568 tiene efectos farmacológicos sobre la función renal y el metabolismo mineral (Ward, 2002). Para explicar estos resultados, se hipotetizó que el efecto hipercalcémico del fármaco por activación del CaSR en el asa gruesa ascendente de Henle y en el túbulo contorneado

distal (Wang, 1996; Wang, 1997) sería necesario para el reciclaje de K^+ durante la activación del cotransportador de Na-K-2Cl y la reabsorción paracelular pasiva de Ca^{2+} . Una contribución al transporte celular de Ca^{2+} por la PC2 sería relevante en este contexto, ya que este canal puede ayudar a regular la homeostasis iónica tanto de K^+ como de Ca^{2+} en las células epiteliales renales.

Para comprobar la correlación entre PC2 y el CaSR en los distintos compartimientos celulares, exploramos la inmuno-colocalización de ambos en el CP, lo que fue confirmado en células LLC-PK1 confluyentes. A partir de estos estudios hicimos preparaciones de membrana celular y CP, para su posterior reconstitución. Estos estudios nos permitieron comprobar parte del mecanismo de activación del sistema, que incluye tanto a la PC2, como al CaSR. En membranas plasmáticas, pudimos observar que el R568 (y/o Ca^{2+} externo), activaban corrientes catiónicas que son inhibidas por anticuerpos anti-PC2. Datos similares se obtuvieron con membranas de CPs, por lo que ambos compartimientos celulares expresarían el mismo complejo CaSR -PC2.

Los experimentos de parche suelto sobre la superficie del CP, proveyeron otra información trascendente, dado que el agregado de R568 al baño, produjo cambios dramáticos en la actividad de canales presentes en la membrana ciliar. Basados en el hecho que la superficie del parche estaría (parcialmente) aislada a la solución del baño, se podría concluir, que la(s) señal(es) provocada(s) por el agonista del CaSR, se transmitirían a otras partes del CP, específicamente el área de registro. El hecho de que el agente calcimimético R568 produjera los efectos nombrados anteriormente sugiere una conexión entre los canales ciliares (incluida PC2 observada en los experimentos de reconstitución de membranas ciliares), y el CaSR, al que el agente se acopla del lado extracelular.

El desarrollo de los estudios para entender los mecanismos moleculares de la PQRAD ha llevado a encontrar una conexión entre la PC2 y las estructuras ciliares. La enfermedad poliquística renal se ha asociado con una disfunción ciliar y, particularmente, con proteínas asociadas a MTs (Morgan, 1998, Murcia, 2000, Pazour, 2002, Hou, 2002, Yoder, 2002). Las proteínas ciliares disfuncionales,

incluidas cistina (Hou 2002) y polaris, que se localizan en el cuerpo basal ciliar y el axonema microtubular (Yoder, 2002) respectivamente, modifican la función ciliar. Otros estudios han contribuido a determinar una relación entre la disfunción ciliar y los MTs. El tratamiento de los ratones homocigotos *cpk/cpk* con el estabilizador microtubular paclitaxel (taxol) (Woo, 1997), por ejemplo, modera la progresión de la enfermedad quística renal observada en estos animales, lo que sugiere que la capacidad de promover el ensamblaje de los MTs puede regular la formación de quistes en el riñón del ratón. Los ratones *Orpk*, que expresan una polaris disfuncional, generan poliquistosis renal y presentan cilios acortados, defectos de simetría izquierda-derecha (Murcia, 2000) y mayor abundancia de PC2 ciliar (Pazour, 2002). Varios estudios han implicado aún más la función de la PC2 ciliar en las propiedades sensoriales de esta organela en células epiteliales renales (Nauli, 2003). Los CPs están claramente involucrados en la transducción de señales asociadas a la entrada de Ca^{2+} y la activación celular (Praetorius, 2003). En resumen, una interacción PC2-MTs en el compartimiento ciliar podría ser un componente clave de una señalización defectuosa en las enfermedades quísticas.

Estudios previos de nuestro laboratorio determinaron por primera vez que la PC2 ciliar está bajo el control de un componente clave de la maquinaria axonémica, los MTs ciliares (Li, 2006). En ese estudio, con el uso de membranas ciliares de células epiteliales renales reconstituidas en un sistema BLM, se observó que el agregado de tubulina más GTP estimulaba la actividad de PC2, mientras que el tratamiento con el agente despolimerizador de MTs, colchicina, inhibía la actividad del canal. Curiosamente, la PC2 aislada como producto de traducción *in vitro* no tuvo tal efecto. La evidencia sugirió que la interacción funcional sería entre MTs preformados y el canal. Los datos también indicarían que la tubulina microtubular no interactúa directamente con la PC2. Más bien, se requeriría un complejo estructural que involucra proteínas motoras, incluidos los componentes quinesina-2, KIF3A y KIF3B, que actúan como enlaces moleculares entre la PC2 y el axonema. Esto fue confirmado por la presencia de dicho complejo molecular, donde el extremo carboxi-terminal de la PC2 estaba directamente asociado con las regiones carboxi-terminales de KIF3A y KIF3B (Li, 2006). Dado que PC2 permea Ca^{2+} , que es un fuerte agente despolimerizador de MTs (Karr, 1980), podría preverse un escenario en el

que la regulación de la función de la PC2 en el compartimento ciliar por la quinesina-2 ayudaría a separar el canal de la maquinaria del axonema. Si bien esta hipótesis requerirá confirmación experimental, es consistente con la posibilidad de que la entrada de Ca^{2+} mediada por la PC2 al compartimento ciliar, sería un factor que contribuye a la remodelación de su estructura. El hallazgo de la regulación por CaSR de canales ciliares está de acuerdo con interacciones dinámicas entre los MTs del axonema y los canales iónicos, incluidos los de las membranas excitables (Johnson, 1994; Unno, 1999), y los canales cuya estructura puedan parecerse a la de la PC2 (Howarth, 1999; Goswami, 2004). Un estudio reciente, por ejemplo, determinó que la tubulina se une al receptor vanilloide del canal TRP (TRPV1) de una manera Ca^{2+} -dependiente (Goswami, 2004).

5.3 Actividad Eléctrica del CP. Conexión Entre Axonema y Canales Iónicos

Los cilios son organelas sensoriales que sobresalen de la superficie de las células eucariotas, y que están cubiertas por una membrana que difiere en propiedades de la membrana plasmática. El citoesqueleto ciliar, o axonema, consiste de nueve dobletes de MTs (9 + 0) que mantienen su morfología elongada. Los cilios móviles, llamados flagelos en algunas especies, contienen, además, dos MTs centrales únicos dentro del anillo de dobletes (9 + 2). Los brazos de motores moleculares como la dineína en los cilios móviles, inducen el deslizamiento de los MTs de los dobletes adyacentes. Los cilios son considerados como antenas celulares capaces de detectar distintos estímulos externos, tanto químicos, como mecánicos, osmóticos, lumínicos y gravitacionales (Pazour, 2003, Singla, 2006, Berbari, 2009, Satir, 2010). Se considera que la morfología del cilio permite mejorar la capacidad celular para detectar estímulos débiles y/o inusuales, como el flujo de líquido a través de los túbulos renales. Si bien estamos más familiarizados con la función mecánica de los cilios móviles como el movimiento de los espermatozoides o el moco del tracto respiratorio en mamíferos, existe un creciente interés en los CPs dado que desempeñan papeles de señalización cruciales en las células eucariotas (Bloodgood, 2010; 2012). Este resurgimiento del interés en los CPs se debe, en gran parte, a la

identificación de las ciliopatías (Badano, 2006; Braun, 2016), defectos genéticos que son síndromes del desarrollo humano que surgen de la falla tanto en el ensamblado o la realización de funciones de señalización en CPs o cilios móviles. Casi todas las células del cuerpo humano poseen un único CP inmóvil, cuyas funciones de señalización son cruciales para el desarrollo normal (Schneider, 2005; Fliegauf, 2006; Clement, 2009; McDermott, 2010; Amador-Arjona, 2011).

Debido a que los cilios están altamente conservados en su estructura y funciones sensoriales, ha sido posible conocer varias de las funciones de los cilios en organismos modelo, como el protozoo ciliado *Chlamydomonas*, o el nematodo *Caenorhabditis elegans*, que comparten similitudes con los cilios mamíferos. El consenso actual es que ya sean móviles o no los cilios responden a estímulos mecánicos y químicos ambientales para enviar dichas señales al cuerpo celular. Por lo tanto, la función de antena de los cilios para la información extracelular es que se convertiría en señales eléctricas a través de la activación y/o regulación de canales iónicos de la membrana ciliar, y particularmente cambios en las concentraciones de iones, especialmente Ca^{2+} , en el lumen ciliar. Estos cambios, a su vez, afectan la motilidad y la capacidad de las vías de señalización entre los cilios y el cuerpo celular para llevar a cabo la transducción de señales. Lo cierto es que, en la actualidad, no existe información precisa sobre los mecanismos que generan y propagan la señalización del cilio al cuerpo celular.

Los estudios proteómicos indican que el cilio es complejo en cuanto a su composición de proteínas estructurales y de señalización, incluidas receptores; componentes de sistemas de transducción de señales como las proteínas G, ciclasas y quinasas; y canales iónicos, que controlan el flujo de corriente a través de la membrana ciliar (Mayer, 2009; Yano, 2013). Existe una amplia variedad de canales ciliares (para un resumen reciente, ver Kleene, 2012), incluidos los canales voltaje-activados, algunos permeables al Ca^{2+} , canales de K^{+} , y canales TRP, generalmente catiónicos no selectivos permeables al Ca^{2+} . Algunos, como los canales activados por nucleótidos cíclicos de los cilios olfatorios y los canales de Ca^{2+} voltaje-activados (Ca_v) de protistas ciliados, se encuentran casi exclusivamente en la membrana ciliar.

Las actividades de estos canales iónicos ciliares pueden inducir o responder a mecanismos de transducción de señales localizados en los cilios.

Las funciones sensoriales de los cilios de los protistas ciliados como el *Paramecium* se han conocido por mucho tiempo (Kung, 1975; Saimi, 1987; Preston, 1990). Este protista ciliado provee un ejemplo de señalización ciliar eléctrica asociada a su comportamiento natatorio. En base a observaciones comportamentales (Machemer, 1979) se demostró que las conductancias iónicas ciliares y el potencial de membrana controlan tanto la frecuencia como la dirección de los latidos ciliares (Brehm 1978; Machemer, 1979; Kutomi 2012). Por ejemplo, los estímulos que hiperpolarizan la célula aumentan los latidos ciliares hacia la parte posterior de la célula, aumentando la velocidad de natación, mientras que los estímulos despolarizantes tienen el efecto opuesto. La despolarización por encima de un umbral inicia un potencial de acción de Ca^{2+} por apertura de canales del tipo Ca_v exclusivos de la membrana ciliar (Dunlap, 1977; Machemer 1979). El aumento resultante en el Ca^{2+} intraciliar invierte la dirección de nado de los cilios, lo que hace que la célula retroceda. Un canal de K^+ activado por Ca^{2+} (K_{Ca}) devuelve el potencial de membrana al nivel de reposo (Brehm, 1978). El Ca^{2+} que activa el canal K_{Ca} proviene de los canales Ca_v ciliares (Satow, 1980). La eliminación genética del canal de Ca^{2+} ciliar imposibilita al protozoo para moverse hacia atrás (Kung, 1975).

Otro aspecto de la actividad de los canales iónicos ciliares es que produce cambios en el potencial de membrana que, a su vez, afectan las vías de transducción de señales. Los segundos mensajeros resultantes tienen efectos secundarios sobre la motilidad ciliar. Por ejemplo, la hiperpolarización estimula la actividad de la adenilil ciclasa tanto de los cilios como del cuerpo celular (Schultz, 1992; Schultz, 1997). El AMPc producido en los cilios modifica la dirección y frecuencia del latido ciliar, haciendo que la célula avance rápidamente hacia adelante (Hamasaki, 1991; Noguchi, 2004). Schultz y cols. (1992) identificaron una asociación entre la conductancia de K^+ hiperpolarizante y la producción de AMPc. Esta conexión demostró que la ciclasa y el canal eran dominios de una misma proteína (Weber, 2004; Yano, 2013). Todos los genes de adenilil ciclasa en *Paramecium* codifican para

estas proteínas, que tienen un dominio amino-terminal de canal y una región carboxi-terminal con un dominio enzimático (Yano, 2013).

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la PC2 se encuentra en el CP de las células epiteliales renales LLC-PK1 (Raychowdhury, 2005), donde estaría regulado por la producción de AMPc local, en este caso mediada por un efecto ciliar del V2R (Raychowdhury, 2009). Esta regulación es importante, dado que las señales que conducen a la fosforilación por PKA, regulan la actividad de la PC2 (Cantero, 2015b). Es interesante observar que el *Paramecium* también expresa un ortólogo de la PC2 en su membrana ciliar, aunque la evidencia no permite concluir al momento que sea un mecanorreceptor Ca^{2+} -permeable (Valentine, 2012).

El aumento de la concentración celular de AMPc tiene un papel importante en la progresión de la enfermedad quística renal (Torres, 2009). La estimulación del V2R por la hormona antidiurética AVP es el principal regulador de la actividad de adenilil ciclasa que a su vez es la fuente de producción de AMPc en la nefrona distal. Una codificación deficiente en el gen PKD1, produce una PC1 defectuosa, que se ha asociado con una señalización excesiva de vasopresina y una antidiuresis inapropiada en ratones (Ahrabi, 2007). Se ha observado el aumento de los niveles de AMPc en los riñones quísticos de varios modelos de roedores. También se pueden aumentar los valores de AMPc por disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular causada por mutaciones en PC1 o PC2, a través de la regulación negativa de la fosfodiesterasa dependiente de Ca^{2+} (PDE1) y estimulación de la adenilil ciclasa 6 (AC6) inhibible por Ca^{2+} (Torres, 2009). A su vez, el aumento de AMPc estimula la proliferación y crecimiento de células poliquísticas. La importancia de la vía V2R-AMPc en la mediación de la enfermedad quística renal se ha demostrado en modelos animales de PQRAD, motivando el uso del tolvaptán (Devuyst, 2013).

Quizá uno de los modelos más estudiados de la relación entre canales ciliares y nucleótidos cíclicos en la función sensorial, es la retina de los vertebrados, donde la luz se detecta mediante fotorreceptores conocidos como conos y bastones cuyo segmento externo es un cilio fotosensible altamente especializado. En la oscuridad, o durante la adaptación a niveles de luz constante, el segmento exterior mantiene

una concentración de GMPc suficiente para mantener abiertos canales que permiten el ingreso tanto de Ca^{2+} como de Na^{+} al segmento externo, mientras que el K^{+} sale del fotorreceptor en el segmento interno. El efecto neto es mantener el potencial de membrana celular en un estado relativamente despolarizado. Cuando suficiente luz incide en el segmento exterior, se reduce la entrada de Ca^{2+} y Na^{+} , por lo que se produce una hiperpolarización celular que induce la activación de una proteína G heterotrimérica (transducina) que, a su vez, activa una fosfodiesterasa GMPc-dependiente, que hidroliza enzimáticamente el GMPc intracelular, reduciendo la entrada de Ca^{2+} y Na^{+} en el segmento exterior (Nikonov, 2000).

Recientemente los CPs renales han recibido especial atención por su posible rol en la génesis de enfermedades quísticas renales. Las mutaciones en las proteínas ciliares como PC1 y PC2 causan PQRAD (Bissler, 2005). En el riñón, los CPs se extienden hacia el lumen de los túbulos renales donde el filtrado renal, destinado a convertirse en orina, fluye a través de los túbulos, pasa por estos cilios y, en el proceso, los desvía. Esta estimulación mecánica inicia señales eléctricas en el CP renal. La desviación del cilio induce un aumento de Ca^{2+} celular (Praetorius, 2001). Se hipotetiza que esta respuesta requeriría por lo menos una estructura ciliar normal, Ca^{2+} externo y al menos tres proteínas ciliares: PC1, PC2 y TRPV4 (Nauli, 2003, Praetorius, 2003, Köttgen, 2008). PC2 y TRPV4 son miembros de la familia TRP y se sabe que permean Ca^{2+} . Recientemente se demostró directamente que, durante la deflexión, los niveles de Ca^{2+} aumentan dentro del propio cilio (Jin, 2013; Su, 2013).

La evidencia de una señalización eléctrica a partir de canales en el CP renal es clara. En estudios previos de nuestro laboratorio (Raychowdhury, 2005) se obtuvieron registros de CPs aislados. Más recientemente, también se han podido registrar canales iónicos desde un único CP intacto tanto mientras estaba unido a la célula o después de su desprendimiento (Kleene, 2012; DeCaen, 2013; Delling, 2013). Los registros eléctricos directos de los CPs permitieron identificar corrientes catiónicas no selectivas espontáneamente activas en las membranas ciliares de varias líneas celulares derivadas del epitelio pigmentario de la retina humana, el epitelio renal y de fibroblastos embrionarios de ratón (DeCaen, 2013).

Muchos detalles de la respuesta mecanosensible de los CPs renales aún no han sido resueltos (Hofherr, 2011). La PC1, que se requiere para la respuesta a la flexión del CP inducida por flujo, tiene características estructurales de un receptor o molécula de adhesión que colocaliza con la PC2 en la membrana ciliar. La PC1 es, sin embargo, un receptor huérfano pudiendo ser mecánicamente sensible, en respuesta a la flexión ciliar inducida por el flujo de filtrado renal. También podría responder a ligandos químicos en el filtrado. Además, se han identificado muchos estímulos que activan a la PC2, incluidos el Ca^{2+} intracelular, cambios en voltaje o el pH, factor de crecimiento epidérmico, fibrocistina, bradiquinina y agonistas muscarínicos, shock hipo-osmótico, Ca^{2+} externo, calor y AVP. Dado que cada canal TRP funcional es un tetrámero (Zhang, 2009), sus subunidades no siempre son idénticas. En el cilio renal, se ha demostrado que la PC2 se combina con TRPV4 (Köttgen, 2008) y TRPC1 (Bai, 2008; Zhang, 2009) para formar canales heteroméricos. La subunidad α del canal epitelial de Na^+ (ENaC) se encuentra en el cilio, y la AVP activa un canal ciliar similar al ENaC (Raychowdhury, 2009). Finalmente, el canal de Ca^{2+} voltaje-activable $\text{Cav}_{1.2}$ y el receptor de dopamina tipo 5 se han encontrado en los CPs renales. La activación del receptor provoca un aumento en el Ca^{2+} ciliar mediado por $\text{Cav}_{1.2}$ (Jin, 2013).

Una pregunta central y aun sin responder (Kleene, 2014) es cómo la geometría extrema del cilio, sea móvil o inmóvil, contribuye a la eficiencia en la detección y la amplificación de señales. El largo ciliar, así como el número de cilias por célula, apunta directamente a la maximización de la sensibilidad a estímulos externos. En el caso de la respuesta odorífera por ejemplo, la unión a odorante en la región distal del cilio (es decir, la región más alejada del cuerpo celular) podría ser transducida de manera eficiente al tener canales cercanos al receptor odorífero. Sin embargo, las corrientes de los canales localizados distalmente se atenuarían a medida que son conducidas a lo largo del cilio hacia el cuerpo celular, como si fuera una conducción tipo cable, lo que también se aplica a la conducción nerviosa y muscular. La gran relación superficie/volumen del cilio permite grandes fluctuaciones en las concentraciones iónicas ciliares. En el contexto de revelar los mecanismos ciliares de la PQRAD, Delling y cols. (2013), encontraron que el CP estaría eléctricamente

separado del soma, siendo el potencial de membrana ciliar en reposo de -18 mV, comparado con -54 mV del potencial de membrana celular. Además, y a pesar que el movimiento de Ca^{2+} entre la célula y el CP era aparentemente eficiente, la concentración ciliar de Ca^{2+} era también distinta (500-600 nM), unas cinco veces mayor que la célula, de sólo 100 nM. Durante una respuesta fuerte, tanto el Ca^{2+} como el Na^{+} ingresan a través de cientos de canales ciliares, por lo que se pueden alcanzar rápidamente altas concentraciones dentro del pequeño volumen ciliar. El Ca^{2+} alcanzaría al menos una concentración 100 μM durante la respuesta odorífera (Delgado, 2004).

Concomitante con la pregunta al respecto de la morfología y geometría del CP, continúa sin responderse la pregunta central sobre la función ciliar, cómo hacen las señales generadas por estímulos externos, y qué gatilla la función de receptores y canales ciliares, para hacer llegar esa información esencial al cuerpo celular. Sin duda, asumimos que la información llega, aunque no necesariamente está ligada en forma lineal a cambios en propiedades intensivas como la concentración de iones celulares. De hecho, un cilio único, por más permeabilidad al Ca^{2+} que tenga, difícilmente pueda producir un cambio en la concentración celular del ión, como se ha observado por la activación de PC2 en varios modelos celulares (Fig. 46).

Oscilaciones eléctricas a través de distintas estructuras de MTs

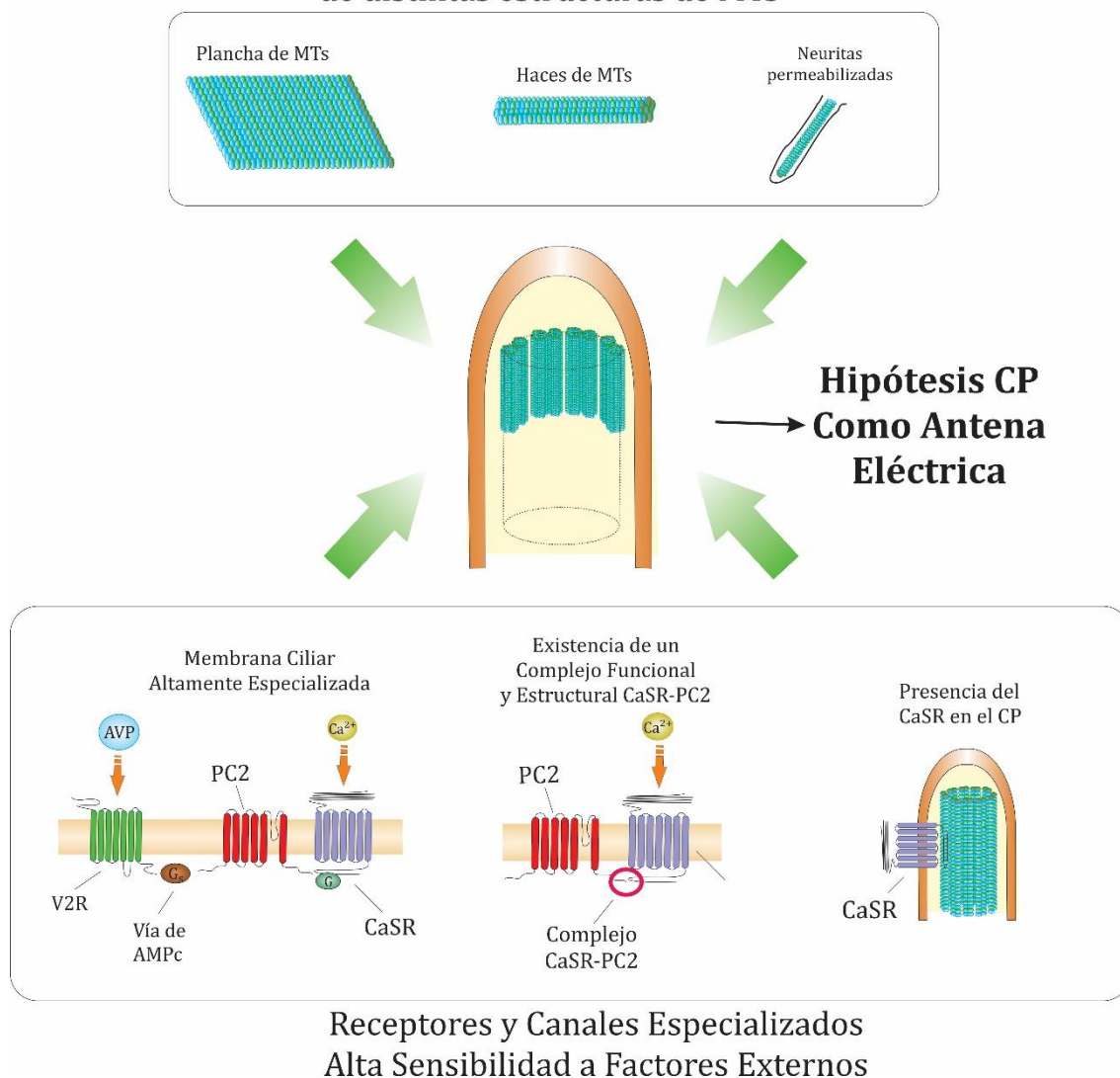


Figura 46. Esquema de los estudios que llevan a la postulación de hipótesis del CP como antena eléctrica. Panel Superior, Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que las láminas 2D y los haces de MTs de cerebro, como así las neuritas permeabilizadas de neuronas de hipocampo, generan y propagan oscilaciones eléctricas. Panel Central, el axonema ciliar es una superestructura de MTs distribuidos en nueve dobletes, que como fuera confirmado en esta Tesis, tienen las mismas propiedades eléctricas que otras estructuras, por lo que se esperaría que las señales eléctricas fueran generadas en su seno, y propagadas al cuerpo celular. Panel Inferior, estudios de esta Tesis y previos del nuestro y otros laboratorios, nos permiten confirmar que los receptores de AVP V2R, y Ca^{2+} , CaSR, están en la membrana ciliar, y regulan no sólo la actividad de canales ciliares, sino también (y/o por su intermedio), la actividad eléctrica del axonema ciliar.

Desde hace años nuestro laboratorio ha llevado adelante una línea de trabajo orientada a la exploración de la posibilidad de que los polímeros lineales del citoesqueleto, los filamentos de actina y los MTs, son capaces de conducir señales

eléctricas. Esto fue demostrado tanto para actina (Lin, 1993), como para MTs (Priel, 2006 y 2008). Si bien esta evidencia ofrecía una posibilidad de que los elementos del citoesqueleto pudiesen conducir señales eléctricas similares a las esperadas en líneas de transmisión eléctrica, no ha sido hasta hace poco (Cantero, 2016) que pudimos empezar a desglosar los detalles moleculares de estas señales eléctricas. Para ello, en trabajos previos de nuestro laboratorio utilizamos láminas 2D de MTs cerebrales, que nos permitieron identificar la generación de ondas eléctricas oscilatorias (Cantero, 2016). Este tipo de señales permitiría explicar el concepto de que los MTs son transistores capaces de formar líneas de transmisión que permiten amplificar la actividad eléctrica dentro de la célula (Priel, 2006). Más recientemente, pudimos comprobar ondas eléctricas similares en otras estructuras, incluidos los haces de MTs cerebrales, permitiéndonos postular que este mecanismo de señalización sería importante en la función celular, lo que pudimos comprobar en neuronas de hipocampo en cultivo (Cantero, 2018) dando más solidez a este postulado.

Hasta el momento de la presente Tesis, toda la información al respecto de las oscilaciones microtubulares, habían sido logradas con MTs de origen cerebral y/o neural. En la presente Tesis, pudimos extender por primera vez esta información a MTs de origen epitelial. Logramos extraer MTs de las células epiteliales renales LLC-PK1, y demostrar no solo que podíamos formar láminas 2D, sino que también pudimos observar oscilaciones eléctricas similares a las observadas en el cerebro. Esta es la primera demostración de que las oscilaciones eléctricas se producen independientemente de la naturaleza excitatoria, o función celular. Las oscilaciones eléctricas de los MTs serían un fenómeno universal del citoesqueleto eucariota.

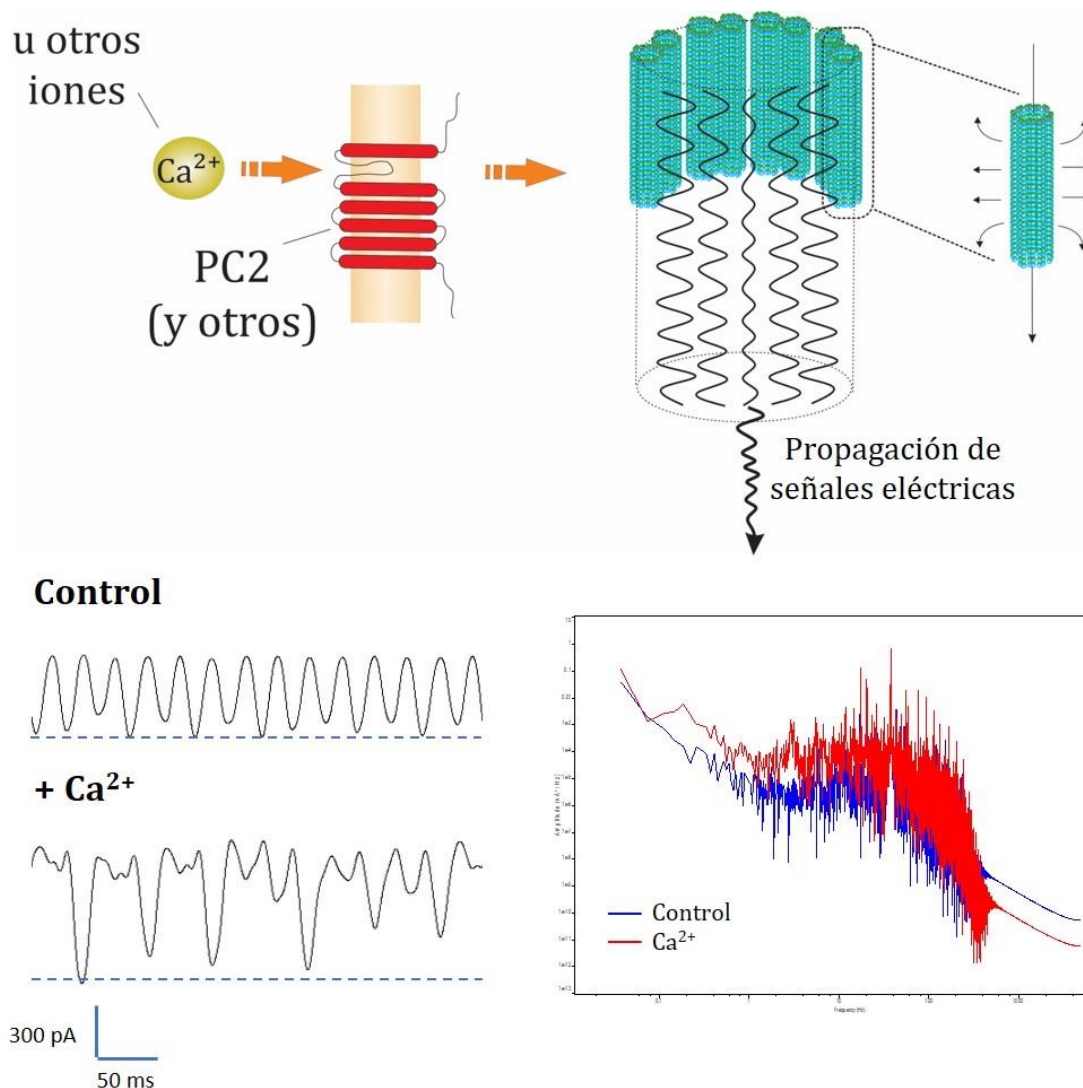


Figura 47. Modelo de transmisión eléctrica ciliar regulada por Ca^{2+} . Los nueve dobletes de MTs que conforman el axonema ciliar (derecha) tendrían propiedades oscilatorias que se sincronizan con la concentración local de iones, particularmente Ca^{2+} , que a su vez estaría en control de canales iónicos específicos como PC2, y su regulación por señales regulatorias de segundos mensajeros, incluidos el Ca^{2+} mismo, y el AMPc generado por la activación por V2R. Es importante hacer notar que la actividad eléctrica del cilio sería tanto más robusta con la actividad de todos los MTs participantes. En condiciones ambientales como el flujo luminal renal, donde un “lado” del cilio recibiese más estímulo que otro, condicionaría la onda propagada. Si bien esta hipótesis debe ser confirmada, datos preliminares, como se observa en los registros en la parte inferior (izquierda), y sus respectivos espectros de frecuencia (derecha), muestran que efectivamente, el agregado de Ca^{2+} externo al CP no permeabilizado, modifica el patrón oscilatorio del axonema.

En un giro inesperado, pudimos también avanzar con los mecanismos de señalización asociados a las estructuras del citoesqueleto y canales en el CP de las células epiteliales. Para confirmar la funcionalidad de la co-localización del CaSR con

la PC2 en el CP de las células epiteliales, hemos agregado el agonista calcimimético R568 a membranas ciliares, y luego a cilios aislados estudiados por la técnica de *patch clamp*, observando que éste activaría canales catiónicos ciliares (Fig. 47). Por otro lado, se realizó también el agregado de AVP, activando canales ciliares a través del V2R. Lo sorprendente de estos experimentos fue encontrar que, además de la actividad conductiva de los canales en el CP, se observaban también oscilaciones eléctricas, con propiedades de amplitud y frecuencias similares a las previamente observadas en MTs cerebrales (Cantero, 2016). Este hallazgo, ofrece una nueva evidencia, única, que el CP, funcionaría en un sentido estricto, como una antena eléctrica, lo que permitiría congregar los varios estudios previos con los experimentos de esta Tesis. Probamos la conexión de receptores ciliares (CaSR y V2R), con canales ciliares (PC2 y otros), con el axonema ciliar (MTs), ofreciendo postular la posibilidad de la existencia de un nuevo mecanismo de señalización celular, la transmisión de oscilaciones eléctricas generadas en el CP, a la función celular (Fig. 48).

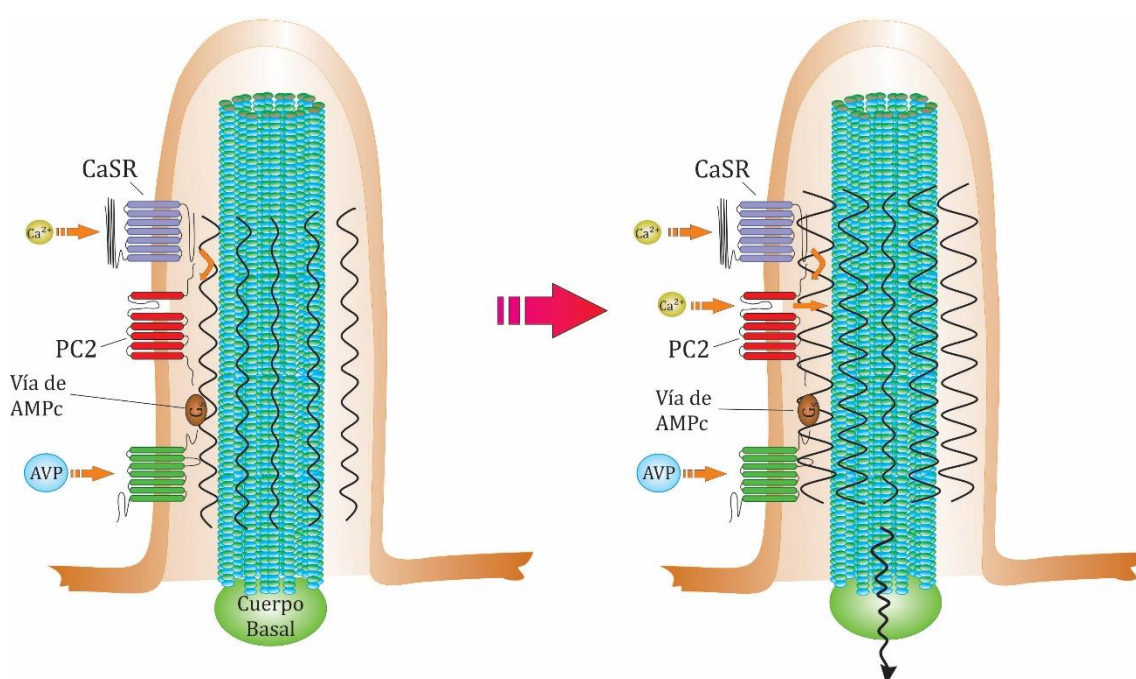


Figura 48. Modelo del CP funcional como antena eléctrica. La actividad de canales presentes en la membrana ciliar, inducida por receptores presentes en la misma, y junto con la conexión de dichas proteínas al axonema ciliar, se propone al CP como una antena eléctrica. El CP transmitiría las oscilaciones eléctricas hacia el resto de la célula a partir de los cambios en su entorno.

Capítulo seis

Conclusiones

El presente trabajo de Tesis ha contribuido a evidenciar una importante relación entre las señales de Ca^{2+} y la regulación del canal PC2 en las células epiteliales renales. En el transcurso del mismo, pudimos obtener importantes nuevas evidencias que trascienden la información acerca de los mecanismos moleculares asociados a la enfermedad PQRAD, origen de los estudios. A saber:

- Demostramos la presencia del receptor sensor de Ca^{2+} (CaSR) en células de epitelio renal, el modelo LLC-PK1 y el efecto regulador del mismo sobre la actividad del canal PC2, lo que permite avanzar sobre las teorías de la interacción entre mecanismos de señalización en la regulación de la homeostasis iónica en células renales.
- Determinamos la existencia de un complejo CaSR-PC2 inédito, que sería esencial en los mecanismos de regulación celular mediados por Ca^{2+} externo, siendo esta una conexión tanto estructural como funcional.
- Demostramos la presencia del CaSR en el CP de las células epiteliales renales LLC-PK1 y su regulación de canales ciliares, siendo relevante para entender la génesis y desarrollo de ciliopatías como la PQRAD.
- Obtuvimos evidencia de la actividad eléctrica de los MTs epiteliales. Hasta el presente trabajo, la observación de oscilaciones eléctricas en microtúbulos, sólo había sido confirmada en MTs de origen neuronal.
- Determinamos la actividad oscilatoria eléctrica del CP de las células epiteliales, producto de las oscilaciones intrínsecas de los MTs del axonema ciliar, y la regulación de esta manifestación eléctrica por la actividad de canales y receptores, incluídos CaSR y V2R, ciliares.

El trabajo de esta Tesis permitió comprobar que el CP (y por extensión, probablemente cilios y flagelos en general), es una antena eléctrica, lo que abre una nueva dimensión en los mecanismos de señalización celular.

*Capítulo siete***Bibliografía**

Ahrabi AK, Terryn S, Valenti G, Caron N, Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, Nielsen S, Horie S, Verbavatz JM, Devuyst O. PKD1 haploinsufficiency causes a syndrome of inappropriate antidiuresis in mice. *J Am Soc Nephrol*; 18(6):1740-53, 2007.

Almers W, Roberts WM, Ruff RL. Voltage clamp of rat and human skeletal muscle: measurements with an improved loose patch technique. *J Physiol*; 347: 751-768, 1984.

Amador-Arjona A, Elliott J, Miller A, Ginbey A, Pazour GJ, Enikolopov G, Roberts AJ, Terskikh AV. Primary cilia regulate proliferation of amplifying progenitors in adult hippocampus: implications for learning and memory. *J Neurosci*; 31(27): 9933-9944, 2011.

Amos LA. Microtubule structure and its stabilisation. *Org Biomol Chem*; 2: 2153-2160, 2004.

Antrobus R, Borner GHH. Improved elution conditions for native co-immunoprecipitation. *PLoS ONE* 6(3): e18218, 2011.

Arnaout MA. Molecular genetics and pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Annu Rev Med*; 52: 93-123, 2001.

Athenstaedt H. Pyroelectric and piezoelectric properties of vertebrates. *Ann NY Acad Sci*; 238: 268, 1974.

Awata H, Huang C, Handlogten ME, Miller RT. Interaction of the calcium-sensing receptor and filamin, a potential scaffolding protein. *J Biol Chem*; 276(37): 34871-3489, 2001.

Badano JL, Katsanis N. Life without centrioles: cilia in the spotlight. *Cell*; 125(7): 1228-1230; 2006.

Bai CX, Giamarchi A, Rodat-Despoix L, Padilla F, Downs T, Tsiokas L, Delmas P. Formation of a new receptor-operated channel by heteromeric assembly of TRPP2 and TRPC1 subunits. *EMBO Rep*; 9(5): 472-479, 2008.

Bai M. Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction. *Cell Signal*; 16(2): 175-186, 2004.

Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98: 10037-10041, 2001.

Barnett MP. Molecular systems to process analog and digital data associatively, en: *Proceedings of Third Molecular Electronic Device Conference*. Editor Carter F. (Naval Research Laboratory, Washington, DC), 1987.

Berberi NF, O'Connor AK, Haycraft CJ, Yoder BK. The primary cilium as a complex signaling center. *Curr Biol*; 19(13): R526-R535, 2009.

Bissler JJ, Dixon BP. A mechanistic approach to inherited polycystic kidney disease. *Pediatr Nephrol*; 20(5): 558-566, 2005.

Bloodgood RA. Sensory reception is an attribute of both primary cilia and motile cilia. *J Cell Sci*; 123(Pt 4): 505-509, 2010.

Bloodgood RA. The future of ciliary and flagellar membrane research. *Mol Biol Cell*; 23(13): 2407-11, 2012.

Bonomini M, Giardinelli A, Morabito C, Di Silvestre S, Di Cesare M, Di Pietro N, Sirolli V, Formoso G, Amoroso L, Mariggiò MA, Pandolfi A. Calcimimetic R-568 and its enantiomer S-568 increase nitric oxide release in human endothelial cells. *PLoS One*; 7(1): e30682, 2012.

Brailov I, Bancila M, Brisorgueil MJ, Miquel MC, Hamon M, Vergé D. Localization of 5-HT(6) receptors at the plasma membrane of neuronal cilia in the rat brain. *Brain Res*; 872(1-2): 271-275, 2000.

Braun DA, Hildebrandt F. Ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 9(3). pii: a028191, 2017.

Braun JJ, Noblet V, Kremer S, Molière S, Dollfus H, Marion V, Goetz N, Muller J, Riehm S. Value of MRI olfactory bulb evaluation in the assessment of olfactory dysfunction in Bardet-Biedl syndrome. *Clin Genet*; 90(1): 79-83, 2016.

Bray JJ, Fernyhough P, Bamberg JR, Bray D. Actin depolymerizing factor is a component of slow axonal transport. *J Neurochem*; 58(6): 2081-2087, 1992.

Brehm P, Eckert R. An electrophysiological study of the regulation of ciliary beating frequency in *Paramecium*. *J Physiol*; 283: 557-568, 1978.

Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*; 366(6455): 575-580, 1993.

Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev*; 81(1): 239-297, 2001.

Cai Y, Anyatonwu G, Okuhara D, Lee KB, Yu Z, Onoe T, Mei CL, Qian Q, Geng L, Witzgall R, Ehrlich BE, Somlo S. Calcium dependence of polycystin-2 channel activity is modulated by phosphorylation at Ser812. *J Biol Chem*; 279(19): 19987-19989, 2004.

Cai S, Bodle JC, Mathieu PS, Amos A, Hamouda M, Bernacki S, McCarty G, Lobo EG. Primary cilia are sensors of electrical field stimulation to induce osteogenesis of human adipose-derived stem cells. *FASEB J*; 31(1): 346-355, 2017.

Cantero MR, Cantiello HF. Calcium transport and local pool regulate polycystin-2 (TRPP2) function in human syncytiotrophoblast. *Biophys J*; 105: 365-375, 2013.

Cantero MR, Cantiello HF. Polycystin-2 (TRPP2) Regulation by Ca^{2+} is effected and diversified by actin-binding proteins. *Biophys J*; 108: 2191-2200, 2015a.

Cantero MR, Velázquez IF, Streets AJ, Ong ACM, Cantiello HF. The cAMP signaling pathway and direct protein kinase a phosphorylation regulate polycystin-2 (TRPP2) channel function. *J Biol Chem*; 290: 23888-23896, 2015b.

Cantero MR, Perez PL, Smoler M, Villa Etchegoyen C, Cantiello HF. Electrical oscillations in two-dimensional microtubular structures. *Sci Rep*; 6: 27143, 2016.

Cantero MR, Villa Etchegoyen C, Perez PL, Scarinci N, Cantiello HF. Bundles of brain microtubules generate electrical oscillations. *Sci Rep*; 8(1):11899, 2018.

Cantero MR, Perez PL, Scarinci N, Cantiello HF. Two-dimensional brain microtubule structures behave as memristive devices. *Sci Rep*; 9: 12398, 2019.

Cantiello HF, Patenaude C, Zaner K. Osmotically induced electrical signals from actin filaments. *Biophys J*; 59: 1284-1289, 1991a.

Cantiello HF, Stow JL, Prat AG, Ausiello DA. Actin filaments regulate epithelial Na^+ channel activity. *Am J Physiol*; 261(5 PT 1): C882-C888, 1991b.

Cantiello HF, Montalbetti N, Timpanaro GA, González-Perrett S. Polycystin-2 as a signal transducer. *Adv Exp Med Biol*; 559: 235-244, 2004.

Capasso G, Geibel PJ, Damiano S, Jaeger P, Richards WG, Geibel JP. The calcium sensing receptor modulates fluid reabsorption and acid secretion in the proximal tubule. *Kidney Int*; 84(2): 277-284, 2013.

Carpenter EJ, Huzil JT, Ludueña RF, Tuszynski JA. Homology modeling of tubulin: influence predictions for microtubule's biophysical properties. *Eur Biophys J*; 36(1): 35-43, 2006.

Chang W, Pratt S, Chen TH, Bourguignon L, Shoback D. Amino acids in the cytoplasmic C terminus of the parathyroid Ca^{2+} -sensing receptor mediate efficient cell-surface expression and phospholipase C activation. *J Biol Chem*; 276(47): 44129-44136, 2001.

Chaponnier C, Yin HL, Stossel TP. Reversibility of gelsolin/actin interaction in macrophages. Evidence of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent pathways. *J Exp Med*; 165(1): 97-106, 1987.

Chauvet V, Qian F, Boute N, Cai Y, Phakdeekitacharoen B, Onuchic LF, Attié-Bitach T, Guicharnaud L, Devuyst O, Germino GG, Gubler MC. Expression of PKD1 and PKD2 transcripts and proteins in human embryo and during normal kidney development. *Am J Pathol*; 160(3): 973-83, 2002.

Chebib FT, Torres VE. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Core Curriculum 2016. *Am J Kidney Dis*; 67(5): 792-810, 2016.

Chen NX, Moe SM, Eggleston-Gulyas T, Chen X, Hoffmeyer WD, Bacallao RL, Herbert BS, Gattone VH 2nd. Calcimimetics inhibit renal pathology in rodent nephronophthisis. *Kidney Int*; 80(6): 612-619, 2011.

Chen XZ, Li Q, Wu Y, Liang G, Lara CJ, Cantiello HF. Submembraneous microtubule cytoskeleton: interaction of TRPP2 with the cell cytoskeleton. *FEBS J*; 275(19): 4675-4683, 2008.

Cheng SX, Geibel JP, Hebert SC. Extracellular polyamines regulate fluid secretion in rat colonic crypts via the extracellular calcium-sensing receptor. *Gastroenterology*; 126(1): 148-58, 2004.

Chiolerio A, Draper TC, Mayne R, Adamatzky A. On resistance switching and oscillations in tubulin microtubule droplets. *J Colloid Interface Sci*; 560: 589-595, 2019.

Chua, L. Memristor-The missing circuit element. *IEEE Trans Circuit Theory*; 18: 507-519, 1971.

Clapham DE, Runnels LW, Strubing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*; 2(6): 387-396, 2001.

Clement CA, Kristensen SG, Møllgård K, Pazour GJ, Yoder BK, Larsen LA, Christensen ST. The primary cilium coordinates early cardiogenesis and hedgehog signaling in cardiomyocyte differentiation. *J Cell Sci*; 122(Pt 17): 3070-3082, 2009.

Colquhoun D, Sigworth FJ. Fitting and statistical analysis of single channel records. Chapter 11, en *Single-Channel Recording*. Editores Sakmann B y Neher E. Plenum Press, New York, 1983.

Corey DP, Stevens CF. Science and technology of patch- recordings electrodes, in *Single-Channel Recording*, ed Sackman B and Neher E; 53-58, New York, 1983.

Dai XQ, Perez PL, Soria G, Scarinci N, Smoler M, Morsucci DC, Suzuki K, Cantero MR, Cantiello HF. External Ca^{2+} regulates polycystin-2 (TRPP2) cation currents in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Exp Cell Res*; 350(1): 50-61, 2017.

Dalgaard OZ. Bilateral polycystic disease of the kidneys; a follow-up of two hundred and eighty-four patients and their families. *Acta Med Scand Suppl*; 328: 1-255, 1957.

DeCaen PG, Delling M, Vien TN, Clapham DE. Direct recording and molecular identification of the calcium channel of primary cilia. *Nature*; 504(7479): 315-318, 2013.

Delgado R, Bacigalupo J. 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(11): 2975-2980, 2004.

Delling M, DeCaen PG, Doerner JF, Febvay S, Clapham DE. Primary cilia are specialized calcium signalling organelles. *Nature*; 504(7479): 311-314, 2013.

Delmas P. Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. *Cell*; 118(2): 145-148, 2004a.

Delmas P, Padilla F, Osorio N, Coste B, Raoux M, Crest M. Polycystins, calcium signaling, and human diseases. *Biochem Biophys Res Com*; 322(4): 1374-1383, 2004b.

Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Ann Rev Cell Dev Biol*; 13: 83-117, 1997.

Downing KH, Jontes J. Projection map of tubulin in zinc-induced sheets at 4Å resolution. *J Struct Biol*; 109: 152-159, 1992.

Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*; 280(5360): 69-77, 1998.

Dujovne I, van den Heuvel M, Shen Y, de Graaff M, Dekker C. Velocity modulation of microtubules in electric fields. *Nano Lett*; 8(12): 4217-4220, 2008.

Dunlap K. Localization of calcium channels in *Paramecium caudatum*. *J Physiol*; 271(1): 119-133, 1977.

Dustin P. *Microtubules*, 2da Edición, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York & Tokyo, 1984.

Eisenman G, Dani JA. An introduction to molecular architecture and permeability of ion channels. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*; 16: 205-226, 1987.

Emmons SW, Somlo S. Signal transduction. Mating, channels and kidney cysts. *Nature*; 401(6751): 339-340, 1999.

Fliegauf M, Omran H. Novel tools to unravel molecular mechanisms in cilia-related disorders. *Trends Genet*; 22(5): 241-245, 2006.

Fliegauf M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(11): 880-93, 2007.

Foggensteiner L, Bevan AP, Thomas R, Coleman N, Boulter C, Bradley J, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Klinger K, Sandford R. Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the PKD2 gene. *J Am Soc Nephrol*; 11(5): 814-827, 2000.

Forti L, Bossi M, Bergamaschi A, Villa A, Malgaroli A. Loose-patch recordings of single quanta at individual hippocampal synapses. *Nature*; 388: 874-878, 1997.

Fourest-Lieuvin A. Purification of tubulin from limited volumes of cultured cells. *Protein Expr Purif*; 45(1): 183-190, 2006.

Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The Gprotein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63: 1256-1272, 2003.

Freedman H, Rezanian V, Priel A, Carpenter E, Noskov SY, Tuszynski JA. Model of ionic currents through microtubule nanopores and the lumen. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*; 81(5 Pt 1): 051912, 2010.

Gallagher AR, Germino GG, Somlo S. Molecular advances in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*; 17: 118-130, 2010.

García-Sáinz JA, Romero-Ávila MT, Molina-Munoz T, García-Pasquel MJ. G-protein -coupled receptor-receptor tyrosine kinase crosstalk. Regulation of receptor sensitivity and roles of autocrine feedback loops and signal integration. *Curr Signal Transd Ther*; 3: 174-182, 2008.

Garrett JE, Capuano IV, Hammerland LG, Hung BC, Brown EM, Hebert SC, Nemeth EF, Fuller F. Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. *J Biol Chem*; 270: 12919-12925, 1995.

Gattone VH, Wang X, Harris PC, Torres VE. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nature Med*; 9: 1323-1326, 2003.

Gerbino A, Ruder WC, Curci S, Pozzan T, Zaccolo M, Hofer AM. Termination of cAMP signals by Ca^{2+} and $\text{G}(\alpha)_i$ via extracellular Ca^{2+} sensors: a link to intracellular Ca^{2+} oscillations. *J Cell Biol*; 171(2): 303-312, 2005.

Goldman DE. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J Gen Physiol*; 27(1): 37-60, 1943.

González-Perret S, Kim K, Ibarra C, Damiano AE, Zotta E, Batelli M, Harris PC, Reisin IL, Arnaout A, Cantiello HF. Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca^{2+} -permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98(3): 1182-1187, 2001.

González-Perrett, Batelli M, Kim K, Essafi M, Timpanaro G, Moltabetti N, Reisin IL, Arnaout MA, Cantiello HF. Voltage dependence and pH regulation of human polycystin-2-mediated cation channel activity. *J Biol Chem*; 277(28): 24959-24966, 2002.

Goswami C, Dreger M, Jahnel R, Bogen O, Gillen C, Hucho F. Identification and characterization of a Ca^{2+} -sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. *J Neurochem*; 91(5): 1092-103, 2004.

Hamasaki T, Barkalow K, Richmond J, Satir P. cAMP-stimulated phosphorylation of an axonemal polypeptide that copurifies with the 22S dynein arm regulates microtubule translocation velocity and swimming speed in *Paramecium*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88(18): 7918-7922, 1991.

Hameroff SR. Coherence in the Cytoskeleton: Implications for Biological Information Processing. En *Biological Coherence and Response to External Stimuli*. Editor Fröhlich H. Springer-Verlag, 1988.

Happé H, Peters DJ. Translational research in ADPKD: lessons from animal models. *Nat Rev Nephrol*; 10(10): 587-601, 2014.

Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2da Edición, Sinauer, Sunderland, MA, 1992.

Hobson SA, Wright J, Lee F, McNeil SE, Bilderback T, Rodland KD. Activation of the MAP kinase cascade by exogenous calcium-sensing receptor. *Mol Cell Endocrinol*; 200: 189-198, 2003.

Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol*; 108(1): 37-77, 1949.

Hoenderop JGJ, Nilius B, Bindels RJM. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev*; 85: 373-422, 2005.

Hofer AM, Brown EM. Extracellular calcium sensing and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 4: 530-538, 2003.

Hofherr A, Köttgen M. TRPP channels and polycystins. *Adv Exp Med Biol*; 704: 287-313, 2011.

Hou X, Mrug M, Yoder BK, Lefkowitz EJ, Kremmidiotis G, D'Eustachio P, Beier DR, Guay-Woodford LM. Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest*; 109(4): 533-540, 2002.

Huang C, Hujer KM, Wu Z, Miller RT. The Ca^{2+} -sensing receptor couples to G $\alpha_{12/13}$ to activate phospholipase D in Madin-Darby canine kidney cells. *Am J Physiol Cell Physiol*; 286(1): C22-C30, 2004.

Huang C, Wu Z, Hujer KM, Miller RT. Silencing of filamin A gene expression inhibits Ca^{2+} -sensing receptor signaling. *FEBS Lett*; 580: 1795-1800, 2006.

Huang C, Sindic A, Hill CE, Hujer KM, Chan KW, Sassen M, Wu Z, Kurachi Y, Nielsen S, Romero MF, Miller RT. Interaction of the Ca^{2+} -sensing receptor with the inwardly rectifying potassium channels Kir4.1 and Kir4.2 results in inhibition of channel function. *Am J Physiol Renal Physiol*; 292: F1073-F1081, 2007.

Huang C, Miller RT. Novel Ca receptor signaling pathways for control of renal ion transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens*; 19(1): 106-112, 2010.

Hull RN, Cherry WR, Weaver GW. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In vitro*; 12(10): 670-677, 1976.

Howarth FC, Calaghan SC, Boyett MR, White E. Effect of the microtubule polymerizing agent taxol on contraction, Ca^{2+} transient and L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *J Physiol*; 516(Pt 2): 409-419, 1999.

- Ivy DD, Shaffer EM, Johnson AM, Kimberling WJ, Dobin A, Gabow PA. Cardiovascular abnormalities in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*; 5(12): 2032-2036, 1995.
- Jamney PA. The cytoskeleton and cell signaling: Component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev*; 78(3): 763-781, 1998.
- Jin X, Mohieldin AM, Muntean BS, Green JA, Shah JV, Mykytyn K, Nauli SM. Cilioplasm is a cellular compartment for calcium signaling in response to mechanical and chemical stimuli. *Cell Mol Life Sci*; 71(11): 2165-2178, 2013.
- Johnson BD, Byerly L. Ca^{2+} channel Ca^{2+} -dependent inactivation in a mammalian central neuron involves the cytoskeleton. *Pflugers Arch*; 429(1):14-21, 1994.
- Karr TL, Kristofferson D, Purich DL. Calcium ion induces endwise depolymerization of bovine brain microtubules. *J Biol Chem*; 255(24): 11853-11856, 1980.
- Kleene NK, Kleene SJ. A method for measuring electrical signals in a primary cilium. *Cilia*; 1. pii: 17, 2012.
- Kleene SJ, Van Houten JL. Electrical signaling in motile and primary cilia. *Bioscience*; 64(12): 1092-1102, 2014.
- Kifor O, MacLeod RJ, Diaz R, Bai M, Yamaguchi T, Yao T, Kifor I, Brown EM. Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. *Am J Physiol Renal Physiol*; 280: F291-F302, 2002.
- Kim J, Kato M, Beachy PA. Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothened in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*; 106: 21666-21671, 2009.
- Kim T, Kao MT, Hasselbrink EF, Meyhöfer E. Nanomechanical model of microtubule translocation in the presence of electric fields. *Biophys J*; 94(10): 3880-3892, 2008.
- Köttgen M, Walz G. Subcellular localization and trafficking of polycystins. *Pflügers Arch*; 451: 286-293. 2005.
- Köttgen M, Buchholz B, Garcia-Gonzalez MA, Kotsis F, Fu X, Doerken M, Boehlke C, Steffl D, Tauber R, Wegierski T. TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex. *J Cell Biol*; 182: 437-447, 2008.
- Koulen P, Cai Y, Geng L, Maeda Y, Nishimura S, Witzgall R, Ehrlich BE, Somlo S. Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol*; 4: 191-197, 2002.
- Kudoh A, Matsuki A. Ketamine inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate production depending on the extracellular Ca^{2+} concentration in neonatal rat cardiomyocytes. *Anesth Analg*; 89(6): 1417-1422, 1999.

Kung C. Genetic dissection of the excitable membrane of *Paramecium*. *Genetics*; 79: (Suppl): 423-431, 1975.

Kutomi O, Hori M, Ishida M, Tominaga T, Kamachi H, Koll F, Cohen J, Yamada N, Noguchi M. Outer dynein arm light chain 1 is essential for controlling the ciliary response to cyclic AMP in *Paramecium tetraurelia*. *Eukaryot Cell*; 11(5): 645-653, 2012.

Lal S, Scarinci N, Perez PL, Cantero MR, Cantiello HF. Lipid bilayer-atomic force microscopy combined platform records simultaneous electrical and topological changes of the TRP channel Polycystin-2 (TRPP2). *PLOS One*; 13(8): e0202029, 2018.

Latorraca NR, Venkatakrishnan AJ, Dror RO. GPCR Dynamics: Structures in motion. *Chem Rev*; 117: 139–15, 2016.

Lee JH, Gleeson JG. The role of primary cilia in neuronal function. *Neurobiol disease*; 38(2): 167-172, 2010.

Lee, SH, Somlo S. Cyst growth, polycystins, and primary cilia in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Res Clin Pract*; 33(2): 73-78, 2014.

Lev S, Zeevi DA, Frumkin A, Offen-Glasner V, Bach G, Minke B. Constitutive activity of the human TRPML2 channel induces cell degeneration. *J Biol Chem*; 285(4): 2771-2782, 2010.

Li H, DeRosier J, Nicholson WV, Nogales E, Downing KH. Microtubule structure at 8Å resolution. *Structure*; 10: 1317–1328, 2002b.

Li Q, Liu Y, Zhao W, Chen XZ. The calcium-binding EF-hand in Polycystin-L is not a domain for channel activation and ensuing inactivation. *FEBS Lett*; 516: 270-278, 2002a.

Li Q, Dai Y, Guo L, Liu Y, Hao C, Wu G, Basora N, Michalak M, Chen XZ. Polycystin-2 associates with tropomyosin-1, an actin microfilament component. *J Mol Biol*; 325: 949-962, 2003.

Li Q, Montalbetti N, Shen PY, Dai XQ, Cheeseman CI, Karpinski E, Wu G, Cantiello HF, Chen XZ. Alpha-actinin associates with polycystin-2 and regulates its channel activity. *Hum Mol Genet*; 14(12): 1587-1603, 2005.

Li Q, Montalbetti N, Wu Y, Ramos A, Raychowdhury MK, Chen XZ, Cantiello HF. Polycystin-2 cation channel function is under the control of microtubular structures in primary cilia of renal epithelial cells. *J Biol Chem*, 281(49): 37566-37575, 2006.

Lin EC, Cantiello HF. A novel method to study the electrodynamic behavior of actin filaments. Evidence for cable-like properties of actin. *Biophys J*; 65(4): 1371-1378, 1993.

Lourdel S, Paulais M, Cluzeaud F, Bens M, Tanemoto M, Kurachi Y, Vandewalle A, Teulon J. An inward rectifier K channel at the basolateral membrane of the mouse

distal convoluted tubule: similarities with Kir4-Kir5.1 heteromeric channels. *J Physiol*; 538: 391-404, 2002.

Luo Y, Vassilev PM, Li X, Kawanabe Y, Zhou J. Native polycystin 2 functions as a plasma membrane Ca^{2+} -permeable cation channel in renal epithelia. *Mol Cell Biol*; 23(7): 2600-2607, 2003.

Ma R, Li WP, Rundle D, Kong J, Akbarali HI, Tsiokas L. PKD2 functions as an epidermal growth factor-activated plasma membrane channel. *Mol Cell Biol*; 25(18):8285-98, 2005.

Machemer H, Ogura A. Ionic conductances of membranes in ciliated and deciliated *Paramecium*. *J Physiol*; 296: 49-60, 1979.

Magno AL, Ward BK, Ratajczak T. The calcium-sensing receptor: a molecular perspective. *Endocr Rev*; 32: 3-30, 2011.

Margolis RL, Wilson L. Microtubule treadmills—possible molecular machinery. *Nature*; 293(5835): 705-711, 1981.

Marrero HG, Lemos JR. Loose-patch clamp currents from the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Pflügers Arch*; 446: 702-713, 2003.

Masyuk AI, Gradilone SA, Banales JM, Huang BQ, Masyuk TV, Lee SO, Splinter PL, Stroope AJ, Larusso NF. Cholangiocyte primary cilia are chemosensory organelles that detect biliary nucleotides via P2Y₁₂ purinergic receptors. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*; 295(4): G725-734, 2008.

Mayer U, Küller A, Daiber PC, Neudorf I, Warnken U, Schnölzer M, Frings S, Möhrle F. The proteome of rat olfactory sensory cilia. *Proteomics*; 9(2): 322-334, 2009.

McDermott KM, Liu BY, Tlsty TD, Pazour GJ. Primary cilia regulate branching morphogenesis during mammary gland development. *Curr Biol*; 20(8): 731-737, 2010.

Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. Lateral transport of *Smoothed* from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *J Cell Biol*; 187: 365-374, 2009.

Minke B, Wu C, Pak WL. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature*; 258: 84-87, 1975.

Minke B. The history of the *Drosophila* TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *J Neurogenet*; 24(4): 216-233, 2010.

Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Deltas CC, Peters DJ, Somlo S. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science*; 272(5266): 1339-1342, 1996.

Moczydlowski E. Single channel enzymology. Chapter 4. In *Ion Channel Reconstitution*, Editor Miller C, Plenum Press, New York, 1986.

- Montalbetti N, Li Q, González-Perrett S, Semprine J, Chen XZ, Cantiello HF. Effect of hydro-osmotic pressure on polycystin-2 channel function in the human syncytiotrophoblast. *Pflügers Arch*; 451(1): 294-303, 2005a.
- Montalbetti N, Li Q, Timpanaro GA, González-Perrett S, Dai XQ, Chen XZ, Cantiello HF. Cytoskeletal regulation of calcium-permeable cation channels in the human syncytiotrophoblast: role of gelsolin. *J Physiol*; 566(Pt 2): 309-325, 2005b.
- Montalbetti N, Li Q, Wu Y, Chen XZ, Cantiello HF. Polycystin-2 cation channel function in the human syncytiotrophoblast is regulated by microtubular structures. *J Physiol*; 579(Pt 3): 717-728, 2007.
- Montalbetti N, Cantero MR, Dalghi MG, Cantiello HF. Reactive oxygen species inhibit polycystin-2 (TRPP2) cation channel activity in term human syncytiotrophoblast. *Placenta*; 29(6): 510-518, 2008.
- Montell C. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*; 90: re1, 2001.
- Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*; 2: 1313-1323, 1989.
- Morgan WA, Dingg Y, Bach PH. The relationship between sodium chloride concentration and bile acid cytotoxicity in cultured kidney cells. *Ren Fail*; 20(3): 441-450, 1998.
- Murcia NS, Richards WG, Yoder BK, Mucenski ML, Dunlap JR, Woychik RP. The Oak Ridge Polycystic Kidney (orpk) disease gene is required for left-right axis determination. *Development*; 127(11): 2347-2355, 2000.
- Narayanan D, Bulley S, Leo MD, Burris SK, Gabrick K.S, Boop FA, Jaggar JH. Smooth muscle cell transient receptor potential polycystin-2 (TRPP2) channels contribute to the myogenic response in cerebral arteries. *J Physiol*; 591: 5031-5046, 2013.
- Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet*; 33: 129-137, 2003.
- Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*; 260: 799-802, 1976.
- Nikonov S, Lamb TD, Pugh EN Jr. The role of steady phosphodiesterase activity in the kinetics and sensitivity of the light-adapted salamander rod photoresponse. *J Gen Physiol*; 116(6): 795-824, 2000.
- Nilius B, Weidema F, Prenen J, Hoenderop JG, Vennekens R, Hoefs S, Droogmans G, Bindels RJ. The carboxyl terminus of the epithelial Ca^{2+} channel ECaC1 is involved in Ca^{2+} dependent inactivation. *Pflügers Arch*; 445: 584-588, 2003.

Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*; 12(3): 218, 2011.

Nogales E, Sharon GW, Downing KH. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*; 391: 199–203, 1998.

Noguchi M, Kurahashi S, Kamachi H, Inoue H. Control of the ciliary beat by cyclic nucleotides in intact cortical sheets from *Paramecium*. *Zoolog Sci*; 21(12): 1167–1175, 2004.

Northup JK, Sternweis PC, Gilman AG. The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Resolution, activity and properties of the 35,000 dalton (beta) subunit. *J Biol Chem*; 258: 11361–11368, 1983.

Ong AC, Ward CJ, Butler RJ, Biddolph S, Bowker C, Torra R, Pei Y, Harris PC. Coordinate expression of the autosomal dominant polycystic kidney disease proteins, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue. *Am J Pathol*; 154(6): 1721–1729, 1999.

Owsianik G, D'hoedt D, Voets T, Nilius B. Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*; 156: 61–90, 2006a.

Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B. Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol*; 68: 685–717, 2006b.

Pazour GJ, Baker SA, Deane JA, Cole DG, Dickert BL, Rosenbaum JL, Witman GB, Besharse JC. The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance. *J Cell Biol*; 157(1): 103–113, 2002.

Pazour GJ and Bloodgood RA. Targeting proteins to the ciliary membrane. *Curr Top Dev Biol*; 85: 115–149, 2008.

Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiol Rev*; 59: 94–123, 1995.

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews Mol Cell Biol*; 3: 639–650, 2002.

Pipino C, Di Tomo P, Mandatori D, Cianci E, Lanuti P, Cutrona MB, Penolazzi L, Pierdomenico L, Lambertini E, Antonucci I, Sirolli V, Bonomini M, Romano M, Piva R, Marchisio M, Pandolfi A. Calcium sensing receptor activation by calcimimetic R-568 in human amniotic fluid mesenchymal stem cells: correlation with osteogenic differentiation. *Stem Cells Dev*; 23(24): 2959–2971, 2014.

Plotnikova OV, Pugacheva EN, Golemis EA. Primary cilia and the cell cycle. *Methods Cell Biol*; 94: 137–160, 2009

Praetorius HA, Frokiaer J, Nielsen S, Spring KR. Bending the primary cilium opens Ca^{2+} -sensitive intermediate-conductance K^{+} channels in MDCK cells. *J Membr Biol*; 191(3): 193–200, 2003.

Praetorius HA, Spring KR. A physiological view of the primary cilium. *Annu Rev Physiol*; 67: 515-529, 2005.

Prassanawar SS, Panda D. Tubulin heterogeneity regulates functions and dynamics of microtubules and plays a role in the development of drug resistance in cancer. *Biochem J*; 476(9): 1359-1376, 2019

Prat AG, Holtzman EJ, Brown D, Cunningham CC, Reisin IL, Kleyman TR, McLaughlin M, Jackson GR Jr, Lydon J, Cantiello HF. Renal epithelial protein (Apx) is an actin cytoskeleton-regulated Na⁺ channel. *J Biol Chem*; 271(30): 18045-18053, 1996.

Preston RR. Genetic dissection of Ca²⁺-dependent ion channel function in *Paramecium*. *Bioessays*; 12(6): 273-281, 1990.

Priel A, Ramos AJ, Tuszynski JA, Cantiello HF. A biopolymer transistor: electrical amplification by microtubules. *Biophys J*; 90(12): 4639-4643, 2006.

Priel A, Ramos AJ, Tuszynski JA, Cantiello HF. Effect of calcium on electrical energy transfer by microtubules. *J Biol Phys*; 34(5): 475-485, 2008.

Raychowdhury MK, Ibarra C, Damiano A, Jackson GR Jr, Smith PR, McLaughlin M, Prat AG, Ausiello DA, Lader AS, Cantiello HF. Characterization of Na⁺-permeable cation channels in LLC-PK1 renal epithelial cells. *J Biol Chem*; 279(19): 20137-20146, 2004.

Raychowdhury MK, McLaughlin M, Ramos A, Montalbetti N, Bouley R, Ausiello DA, Cantiello HF. Characterization of single channel currents from primary cilia of renal epithelial cells. *J Biol Chem*; 280: 34718-34722, 2005.

Raychowdhury MK, Ramos AJ, Zhang P, McLaughlin M, Dai XQ, Chen XZ, Montalbetti N, Cantero MR, Ausiello DA, Cantiello HF. Vasopressin receptor mediated functional signaling pathway in primary cilia of renal epithelial cells. *Am J Physiol*; 296(1): F87-F97, 2009.

Registro Latinoamericano de Diálisis y Trasplante Renal. Sociedad Latinoamericana de Nefrología e Hipertensión, Comité de Registro; <http://www.slanh.org/SLANH-GENERAL/registros.html>; Montevideo, Uruguay, 1994.

Rey O, Young SH, Yuan J, Slice L, Rozengurt E. Amino acid-stimulated Ca²⁺ oscillations produced by the Ca²⁺-sensing receptor are mediated by a phospholipase C/inositol 1,4,5-trisphosphate-independent pathway that requires G12, Rho, filamin-A, and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*; 280: 22875-22882, 2005.

Riccardi D, Hall AE, Chattopadhyay N, Xu JZ, Brown EM, Hebert SC. Localization of the extracellular Ca²⁺/polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am J Physiol*; 274(3): F611-F622, 1998.

- Rodbell M, Birnbaumer L, Krans HMJ, Pohl SL. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role for guanyl nucleotides in glucagon action. *J Biol Chem*; 246: 1877-1882, 1971.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka, BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*; 459:356-363, 2009.
- Saimi Y, Kung C. Behavioral genetics of *Paramecium*. *Annu Rev Genet*; 21:47-65, 1987.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 New York, 1989.
- Satarić MV, Žakula RB, Zeković S, Pokorný J, Fiala J. The change of microtubule length caused by endogenous AC fields in cell. *BioSystems*; 39: 127-133, 1996.
- Satarić MV, Ilić DI, Ralević N, Tuszynski JA. A nonlinear model of ionic wave propagation along microtubules. *Eur Biophys J*; 38: 637-647, 2009.
- Satir P, Pedersen LB, Christensen ST. The primary cilium at a glance. *J Cell Sci*; 123(Pt 4): 499-503, 2010.
- Satow Y, Kung C. Ca-induced K⁺-outward current in *Paramecium tetraurelia*. *J Exp Biol*; 88: 293-303, 1980.
- Shelanski M, Gaskin F, Cantor C. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*; 70:765-768, 1973.
- Sheng S, Li J, McNulty KA, Kieber-Emmons T, Kleyman TR. Epithelial sodium channel pore region. Structure and role in gating. *J Biol Chem*; 276(2): 1326-1334, 2001.
- Shi X, Sun X. Regulation of paclitaxel activity by microtubule-associated proteins in cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*; 80(5): 909-917, 2017.
- Schneider L, Clement CA, Teilmann SC, Pazour GJ, Hoffmann EK, Satir P, Christensen ST. PDGFR α signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr Biol*; 15(20): 1861-1866, 2005.
- Schultz JE, Jantzen HM. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases from cilia of *Paramecium tetraurelia*: partial purification and characterization. *FEBS Lett*; 116(1): 75-78, 1980.
- Schultz JE, Klumpp S, Benz R, Schürhoff-Goeters WJ, Schmid A. Regulation of adenylyl cyclase from *Paramecium* by an intrinsic potassium conductance. *Science*; 255(5044): 600-603, 1992.
- Schultz JE, Guo Y, Kleefeld G, Völkel H. Hyperpolarization- and depolarization-activated Ca²⁺ currents in *Paramecium* trigger behavioral changes and cGMP formation independently. *J Membr Biol*; 156(3): 251-259, 1997.

Singla V, Reiter JF. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science*; 313(5787): 629-633, 2006.

Smajilovic S, Tfelt-Hansen J. Calcium acts as a first messenger through the calcium-sensing receptor in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*; 75(3): 457-467, 2007.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*; 150(1):76-85, 1985.

Squires PE, Harris TE, Persaud SJ, Curtis SB, Buchan AM, Jones PM. The extracellular calcium-sensing receptor on human beta-cells negatively modulates insulin secretion. *Diabetes*; 49(3): 409-417, 2000.

Smith PR, Saccomani G, Joe EH, Angelides KJ, Benos DJ. Amiloride-sensitive sodium channel is linked to the cytoskeleton in renal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88(16): 6971-6975, 1991.

Stephens RE, Edds KT. Microtubules: structure, chemistry and function. *Physiol Rev*; 56(4): 709-777, 1976.

Su S, Phua SC, DeRose R, Chiba S, Narita K, Kalugin PN, Katada T, Kontani K, Takeda S, Inoue T. Genetically encoded calcium indicator illuminates calcium dynamics in primary cilia. *Nat Methods*; 10(11): 1105-1107, 2013.

Sutters M, Germino GG. Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular genetics and pathophysiology. *J Lab Clin Med*; 141: 91-101, 2003.

Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int*; 76:149-168, 2009.

Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Grantham JJ, Higashihara E, Perrone RD, Krasa HB, Ouyang J, Czerwiec FS; TEMPO 3:4 Trial Investigators. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*; 367(25): 2407-2418, 2012.

Tsiokas L, Kim S, Ong EC. Cell biology of polycystin-2. *Cell Signal*; 19: 444-453, 2009.

Unno T, Komori S, Ohashi H. Microtubule cytoskeleton involvement in muscarinic suppression of voltage-gated calcium channel current in guinea-pig ileal smooth muscle. *Br J Pharmacol*; 127(7): 1703-1711, 1999.

Valente EM, Rosti RO, Gibbs E, Gleeson JG. Primary cilia in neurodevelopmental disorders. *Nat Rev Neurol*; 10(1): 27-36, 2014.

Valentine MS, Rajendran A, Yano J, Weeraratne SD, Beisson J, Cohen J, Koll F, Van Houten J. Paramecium BBS genes are key to presence of channels in cilia. *Cilia*; 1(1):16, 2012.

- Voets T, Nilius B. TRP makes sense. *J Membr Biol*; 192(1): 1-8, 2003.
- Wang Q, Dai XQ, Li Q, Wang Z, Cantero Mdel R, Li S, Shen J, Tu JC, Cantiello HF, Chen XZ. Structural interaction and functional regulation of polycystin-2 by filamin. *PLoS One*; 7(7): e40448, 2012.
- Wang W, Lu M, Balazy M, Hebert SC. Phospholipase A2 is involved in mediating the effect of extracellular Ca^{2+} on apical K^{+} channels in rat TAL. *Am J Physiol*; 273(3 Pt 2): F421-F429, 1997.
- Wang X, Harris PC, Somlo S, Batlle D, Torres VE. Effect of calcium-sensing receptor activation in models of autosomal recessive or dominant polycystic kidney disease. *Nephrol dial transplant*; 24(2): 526-534, 2009.
- Wang Y, Simonson MS. Voltage-insensitive Ca^{2+} channels and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases propagate signals from endothelin-1 receptors to the c-fos promoter. *Mol Cell Biol*; 16(10): 5915-5923, 1996.
- Ward DT, Riccardi D. Renal physiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Pflügers Arch*; 445(2): 169-176, 2002.
- Ward DT. Calcium receptor-mediated intracellular signalling. *Cell Calcium*; 35(3): 217-228, 2004.
- Ward DT, Maldonado-Pérez D, Hollins L, Riccardi D. Aminoglycosides induce acute cell signaling and chronic cell death in renal cells that express the calcium-sensing receptor. *J Am Soc Nephrol*; 16(5): 1236-1244, 2005.
- Weber JH, Vishnyakov A, Hambach K, Schultz A, Schultz JE, Linder JU. Adenylyl cyclases from *Plasmodium*, *Paramecium* and *Tetrahymena* are novel ion channel/enzyme fusion proteins. *Cell Signal*; 16(1): 115-125, 2004.
- Wheatley DN. Primary cilia in normal and pathological tissues. *Pathobiol*; 63(4): 222-238, 1995.
- Wise A, Gearding K, Reese S. Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov Today*; 7(4): 235-246, 2002.
- Woo DD, Tabancay AP Jr, Wang CJ. Microtubule active taxanes inhibit polycystic kidney disease progression in cpk mice. *Kidney Int*; 51(5): 1613-1618, 1997.
- Wood MW, VanDongen HM, VanDongen AM. Structural conservation of ion conduction pathways in K channels and glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92(11): 4882-4886, 1995.
- Wu YQ, Liang T, Huang H, Zhu YZ, Zhao PP, Xu CM, Liu L, Shi XT, Hu Y, Huang L, Zhou CH. Ketamine inhibits proliferation of neural stem cell from neonatal rat hippocampus in vitro. *Cell Physiol Biochem*; 34(5): 1792-1801, 2014.

- Xu GM, González-Perrett S, Essafi M, Timpanaro GA, Montalbetti N, Arnaout MA, Cantiello HF. Polycystin-1 activates and stabilizes the polycystin-2 channel. *J Biol Chem*; 278(3): 1457-1462, 2003.
- Yamamoto S, Shimizu S. Targeting TRPM2 in ROS-Coupled Diseases. *Pharmaceuticals*; 9(3): 57, 2016.
- Yano J, Rajendran A, Valentine MS, Saha M, Ballif BA, Van Houten JL. Proteomic analysis of the cilia membrane of *Paramecium tetraurelia*. *J Proteomics*; 78: 113-122, 2013.
- Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol*; 13(10): 2508-2516, 2002.
- Zhang M, Breitwieser GE. High affinity interaction with filamin A protects against calcium-sensing receptor degradation. *J Biol Chem*; 280: 11140-11146, 2005.
- Zhang P, Luo Y, Chasan B, González-Perrett S, Montalbetti N, Timpanaro GA, Cantero MR, Ramos AJ, Goldmann WH, Zhou J, Cantiello HF. The multimeric structure of polycystin-2 (TRPP2): Structural-functional correlates of homo- and hetero-multimers with TRPC1. *Hum Mol Genet*; 18(7): 1238-1251, 2009.
- Zhang X. Molecular sensors and modulators of thermoreception. *Channels (Austin)*; 9(2): 73-81, 2015.
- Zhao R, Zhou M, Li J, Wang X, Su K, Hu J, Ye Y, Zhu J, Zhang G, Wang K, Du J, Wang LC, Shen B. Increased TRPP2 expression in vascular smooth muscle cells from high-salt intake hypertensive rats: The crucial role in vascular dysfunction. *Mol Nutr Food Res*; 59: 365-372, 2015.
- Zhou J. Polycystins and primary cilia: primers for cell cycle progression. *Annu Rev Physiol*; 71: 83-113, 2009.