



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Estudio de la activación de los canales TRP de fotorreceptores de *Drosophila* por lípidos derivados del Diacilglicerol

Memoria para optar al título de Bioquímico
Marcelo Sepúlveda Maldonado

PATROCINANTE

Daniela Seelenfreund, PhD
Dpto. de Bioquímica
y Biología Molecular
Fac. Cs. Qcas. y Farmacéuticas
Universidad de Chile

DIRECTORES

Juan Bacigalupo, PhD
Ricardo Delgado, MSc
Laboratorio de Fisiología Celular
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Santiago, Chile

2010

Patientia vincit omnia

Dedicado a todos los que hicieron posible este trabajo. A mi familia, mi polola, amigos, tutores y miembros del laboratorio. Sin su apoyo y soporte este trabajo no existiría. Sin ustedes, no sería la persona que hoy presenta su memoria de título.

Especialmente dedicado a todos los que están por empezar su propio camino en la ciencia: “la paciencia lo vence todo”

Agradecimientos

Este trabajo contó con el financiamiento del Instituto milenio MIDEPLAN ICM-P05-001-F, y del proyecto FONDECYT 1100730 (RD).

Índice

Índice de figuras	iii
Índice de Tablas	iii
Abreviaturas / Símbolos.....	iv
Resumen.....	vi
Summary	viii
1. Introducción	1
1.1 Sistema visual y fototransducción en <i>Drosophila melanogaster</i>	1
1.2 Canales TRP y fototransducción.....	3
1.3 Canales activados por lípidos	6
1.4. Canales TRP activados por PUFAs	8
2. Hipótesis.....	14
3. Objetivos	14
3.1 Objetivo general	14
3.2 Objetivos específicos	14
4. Materiales y Métodos	15
4.1 Materiales.....	15
4.1.1 Material biológico.....	15
4.1.2 Reactivos	15
4.1.3 Material de vidrio y capilares	15
4.1.4 Equipos y materiales complementarios.....	16
4.1.5 Programas computacionales	16
4.2 Métodos	17
4.2.1 Mantenición de las moscas	17
4.2.2 Capilares y micropipetas	17

4.2.3 Estación de registro de patch clamp	18
4.2.4 Soluciones	18
4.2.5 Alícuotas de PUFAs	19
4.2.6 Purga con N ₂ y almacenamiento de alícuotas.....	19
4.2.7 Circuito para estímulos de luz de 50 ms	20
4.2.8 Disección y disgregación de omatidios	21
4.2.9 Electrofisiología	21
4.2.10 Análisis estadístico	22
5. Estrategia experimental	23
5.1 Disección y disgregación de retina de mosca	24
5.2 Formulación de soluciones de registro	24
5.2.1 Soluciones con iones divalentes y sin iones divalentes	25
5.2.2 Solución intracelular y extracelular modificada	25
5.2.3 Solución intracelular A + B	27
5.2.4 Solución intracelular y extracelular equilibradas en osmolaridad y pH	28
5.2.5 Soluciones con baja concentración de Ca ²⁺	28
5.3 Parches escindidos de rabdómeros	30
5.3.1 Capilares y electrodos de vidrio	30
5.4 Modalidad de experimentos	31
5.4.1 PUFAs aplicados por el electrodo de registro y registro de 14	31
5.4.2 Ensayo de escalas de potencial	32
5.4.3 Escala de potencial y registros continuos con pulso de luz	32
5.4.4 Registros continuos a potencial constante	35
5.4.5 Ensayos con lípidos aplicados con una pipeta externa	37
5.5 Análisis de los Registros	38
6. Resultados	39
6.1 Registros de canal único de parches escindidos de rabdómeros	39
6.2 Respuesta dosis dependiente en registros de canal único	41
6.3 Tiempo de inicio de la respuesta.....	43

7. Discusión	45
8. Proyecciones	48
9. Conclusiones	50
10. Bibliografía	51

Índice de figuras

Figura 1: Omatidios del ojo compuesto de <i>Drosophila melanogaster</i>	2
Figura 2: Fototransducción en <i>Drosophila melanogaster</i>	3
Figura 3: Estructura de tres ácidos grasos poliinsaturados	6
Figura 4: Relación entre la estructura química y la deformación de una bicapa lipídica	7
Figura 5: Activación del canal TRPL recombinante por LNA en células S2	9
Figura 6: Parche escindido de membrana rabdomérica	10
Figura 7: Montaje para desplazar el oxígeno con flujo de N ₂	20
Figura 8: Estrategia experimental	23
Figura 9: Protocolo experimental con pulsos de luz	34
Figura 10: Protocolo experimental de registro continuo	36
Figura 11: Comparación de registros expuestos a LA a 10, 25 y 35 μM	40
Figura 12: Comparación de registros expuestos a LNA a 10, 25 y 35 μM	41
Figura 13: Dispersión del nPo de la actividad inducida por LNA y LA, en función	42

Índice de Tablas

Tabla 1: nPo del canal TRP según la concentración de PUFAs.....	43
Tabla 2: Tiempo de inicio de la actividad inducida por PUFAs	44

Abreviaturas / Símbolos

AA	Ácido araquidónico.
Ca ²⁺	Ion calcio.
cGMP	guanosín monofosfato cíclico.
Cl ⁻	Ion cloruro.
DAG	diacilglicerol.
DAGL	diacilglicerol lipasa.
DGK	diacilglicerol quinasa.
EA	Estallido de actividad o “burst”.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ERG	<u>E</u> lectro <u>r</u> etinograma.
GsMTx-4	Toxina derivada de la tarántula chilena (<i>Grammostola rosea</i>), Inhibidora de canales catiónicos activados por estiramiento.
Hz	Hertz, unidad de frecuencia.
IP ₃	inositol trifosfato.
K ⁺	Ion potasio.
LA	Ácido linoleico.
LNA	Ácido linolénico.
LPC	Lisofosfatidilcolina.
MAG	monoacilglicerol.
mOsm	miliosmoles, 10 ⁻³ osmoles.
MscL	“ <u>m</u> echanosensitive <u>c</u> hannel of <u>l</u> arge-conductance”, canales mecanosensibles de gran conductancia
mV	milivolts, 10 ⁻³ volts.
MΩ	mega ohm, 10 ⁶ Ohms.
N ⁺	Ion sodio.
NaAsp	Aspartato de sodio.
Nipagin	Metil parabeno. Utilizado como antifúngico

nPo	Fracción de tiempo abierto de una población de canales.
OCB	“ <u>O</u> pen <u>C</u> hannel <u>B</u> lock”, bloqueo del canal abierto.
pA	Picoamperes, 10^{-12} Amperes.
PAC	ácido fosfatídico,
PC	fosfatidilcolina.
PIP ₂	fosfatidilinositol-4,5-bifosfato.
PKC	proteína quinasa C.
PLC	fosfolipasa C.
Po	Fracción de tiempo abierto de un canal.
pS	picosiemens, 10^{-12} Siemens.
PUFAs	“ <u>P</u> olyunsaturated <u>F</u> atty <u>A</u> cids”, ácidos grasos poliinsaturados.
SOCs	“ <u>S</u> ore <u>O</u> perated <u>C</u> hannels”, canales operados por reservas internas
TREK	“ <u>T</u> WIK-related <u>K</u> ⁺ channel”, canal de K ⁺ relacionado con TWIK.
TRAAK	“ <u>T</u> WIK-related <u>AA</u> -stimulated <u>K</u> ⁺ channel”, canal relacionado con TWIK activado por ácido araquidónico.
TWIK	“ <u>T</u> andem pore domain <u>w</u> eak <u>i</u> nward <u>r</u> ectifying <u>K</u> ⁺ channel”, canales de K ⁺ de mantención de potencial de reposo mecanosensitivos
TRP	“ <u>T</u> ransient <u>R</u> eceptor <u>P</u> otential”, canales de potencial de receptor transitorio.
TRPL	“ <u>T</u> ransient <u>R</u> eceptor <u>P</u> otential- <u>L</u> ike”, canales tipo TRP.
V	Volts.
mV	milivolts, 10^{-6} Volts.
Vp	Voltaje de pipeta.
μl	microlitro, 10^{-6} litros.
μM	micromolar, 10^{-6} molar.
μs	microsegundo, 10^{-6} segundos.

Resumen

Los sistemas biológicos de transducción de señales comparten mecanismos celulares conservados en diversos organismos. El estudio de los sistemas visuales de insectos, como el de la mosca *Drosophila melanogaster*, ha permitido comprender otros sistemas de transducción de señales así como el origen evolutivo de la visión en vertebrados. El modelo de *Drosophila melanogaster* es ampliamente utilizado gracias a la facilidad para realizar análisis genéticos y estudios funcionales.

Cada ojo compuesto del sistema visual de *Drosophila melanogaster*, está constituido por aproximadamente 800 omatidios, los cuales a su vez están constituidos por ocho células fotorreceptoras. En ellas existe una especialización de la membrana celular que corresponde al rabadómero, donde ocurre el proceso de fototransducción. La cascada de fototransducción se inicia con la absorción de un fotón de luz por la rodopsina y termina con la activación de los canales TRP y TRPL, los cuales han sido identificados como los canales de la respuesta a la luz. La evidencia recopilada hasta la fecha, sugiere que el diacilglicerol (DAG) y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) derivados de la metabolización del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) podrían ser los agonistas de los canales TRP. A pesar de los numerosos esfuerzos realizados en los últimos 20 años, la relación entre el mecanismo de activación de los canales TRP y los productos metabólicos de la vía de transducción de la fosfolipasa C (PLC), aún no está clara.

La incorporación de PUFAs en una membrana lipídica altera el perfil de presiones internas de la bicapa e inducen cambios en su curvatura. Este fenómeno se observa cuando se incorporan moléculas diferentes a las que constituyen la membrana, y depende de parámetros como el largo y número de las insaturaciones de las cadenas alifáticas o el volumen y la carga de sus cabezas polares. Los canales mecanosensibles como TREK ("*TWIK-related K⁺ channel*", canal de K⁺ relacionado con TWIK) y MscL ("*mechanosensitive channel of large-conductance*", canales mecanosensibles de gran conductancia), los cuales son sensibles a lípidos, responden a estos estímulos de forma indirecta en respuesta a cambios en la tensión originados

por la inclusión de lípidos en la membrana donde se aloja el canal. Con estos antecedentes, nos propusimos determinar si la activación de los canales TRP por los lípidos de membrana provenientes del metabolismo del PIP_2 , es función de su concentración y el número de insaturaciones en la cadena alifáticas.

Para este estudio se realizaron ensayos electrofisiológicos en parches escindidos de membrana rabdomérica, obtenidos de omatidios parcialmente disociados. Se probó el efecto de los PUFAs derivados del metabolismo del DAG sobre las corrientes unitarias del canal TRP, considerando el largo de las cadenas y el número de insaturaciones. En un principio estudiamos el ácido linoleico (LA; 18:2), el ácido linolénico (LNA; 18:3) y el ácido araquidónico (AA; 20:4) debido a que estos tres lípidos poseen el mismo número de carbonos en la cadena alifática, pero se diferencian en el número de insaturaciones.

De los resultados obtenidos, se observa un aumento en la actividad de los canales, que depende de la concentración de los PUFAs, así como una correlación entre el incremento del número de insaturaciones en la cadena alifática y el nivel de activación de los canales. A igual concentración de LNA (3 insaturaciones) se aprecia un mayor nPo (fracción de tiempo abierto para uno o más canales) que con LA (2 insaturaciones). Además, se observó una latencia en el inicio de la respuesta, al igual a lo que ocurre en la activación de canales mecanosensibles inducidos por lípidos.

Para finalizar este estudio, se requiere de un mayor número de observaciones que permitan validar estadísticamente los resultados.

Summary

“TRP channel from *Drosophila* photoreceptors activated by lipids derived from DAG”

Biological signal transduction systems share conserved cell mechanisms among species. The study of visual systems of insects like *Drosophila melanogaster*, has allowed us to understand other signal transduction systems, such as the origin of the vertebrate visual system. The *Drosophila melanogaster* model is widely used because it is amenable to genetic and functional analysis.

The *Drosophila melanogaster* compound eye is composed by approximately 800 ommatidia, each containing eight photoreceptor cells. The cells possess a cellular membrane specialization known as rhabdomere, where the phototransduction cascade takes place. The phototransduction process begins with the photon absorption by rhodopsine, which at the end of this cascade activates the TRP and TRLP channels. Current evidence suggests that diacylglycerol (DAG) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) derived from phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) metabolism correspond to the agonists of the TRP channels. Despite numerous efforts in the last twenty years, the relationship between PIP₂ metabolic products and TRP channel activation is still unclear.

The addition of PUFAs to the lipid membrane changes the lateral pressure in the bilayer and induces changes in its curvature. This phenomenon can be observed when other molecules are introduced, which differ from those that form the membrane in size and number of saturations of the aliphatic chains or the volume and charge of the polar heads. Ion channels which are involved in mechanosensitive transduction, such as TREK (TWIK-related K⁺ channel) and MscL (Mechanosensitive channel of large-conductance) are lipid sensitive. They respond indirectly to changes in lateral pressure originated by the incorporation of lipids near the channel.

Based on this knowledge of the behavior of lipid-sensitive channels, we proposed to find out if the TRP channel activation, mediated by PIP₂ metabolites, is a function of their concentration and aliphatic chain saturations.

For this study, electrophysiological tests were performed on excised patches obtained from partially dissociated ommatidia. The effect of PUFAs, derived from the DAG metabolism, was tested on single channel currents of the TRP channel. Initially we tested linoleic acid (LA, 18:2), linolenic acid (LNA, 18:3) and arachidonic acid (AA, 20:4), because these lipids share the aliphatic chain but differ in the number of saturations.

In these experiments an increase of channel activity, which depends of the PUFA concentration, can be noticed. Furthermore, a correlation between the number of saturations and the channel activation level can be observed. At equal LA and LNA concentrations, a large nPo (open probability for more than one channel) can be observed on the former, which supports the hypothesis that TRP channel activation depends on the concentration and unsaturation degree of the incorporated lipids. In addition, in these experiments a latency period at the beginning of the response was observed, which is similar to the response to lipids, which induce mechanosensitive channel activation.

Finally, to conclude this study it is necessary to record a larger number of observations, in order to validate these results.

1. Introducción

1.1 Sistema visual y fototransducción en *Drosophila melanogaster*

Los sistemas biológicos de transducción de señales comparten mecanismos celulares conservados en los diversos organismos. El estudio del sistema visual de insectos como modelo de transducción de señales ha permitido comprender la organización y origen evolutivo de los sistemas visuales en vertebrados (Arendt, 2003). Además, permite entregar una mayor comprensión de otros sistemas de transducción de señales (Hardie, 2007).

Entre los sistemas visuales de insectos más estudiados se encuentra el de la mosca *Drosophila melanogaster*, gracias a la facilidad para realizar análisis genéticos y estudios funcionales en esta especie modelo (Hardie, 2008). Cada ojo compuesto de *Drosophila melanogaster* está constituido por aproximadamente 800 omatidios (figura 1A y 1B), los cuales constituyen la unidad estructural y funcional de su sistema visual. A su vez, cada uno de ellos está constituido por ocho células fotorreceptoras, que se agrupan de manera paralela (figura 1C) con sus rabdómeros hacia el interior de los omatidios. El rabdómero corresponde a una especialización de la membrana celular, que da lugar a un ribete de microvellosidades que se dispone a lo largo de cada célula fotorreceptora (figura 1D). Aquí acontece el proceso de fototransducción.

La fototransducción es el mecanismo por medio del cual la energía contenida en un fotón se transduce en cambios en el potencial de membrana de los fotorreceptores. En la figura 2 se muestra un esquema con las enzimas que se postula participan en la fototransducción en *Drosophila*. El proceso de transducción comienza con la absorción de la luz que induce la fotoisomerización de la rodopsina e involucra una proteína G, al igual que en los vertebrados. En estos últimos sin embargo, la proteína G induce la hidrólisis de guanosín monofosfato cíclico (**cGMP**), el cual actúa como el mensajero secundario que desencadena la respuesta a la luz. En la fototransducción de los fotorreceptores de *Drosophila*, la proteína G (tipo Gq) media la activación de la fosfolipasa C (**PLC**) que metaboliza lípidos de la membrana. La PLC hidroliza el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (**PIP₂**) de la membrana del rabdómero y

genera diacilglicerol (**DAG**) e inositol trifosfato (**IP₃**) (Katz y Minke, 2009). Se postula que el DAG o los ácidos grasos poliinsaturados (**PUFAs**, "*Polyunsaturated Fatty Acids*", figura 3) derivados de su metabolismo inducen la generación del potencial de receptor que despolariza la célula fotorreceptora, debido a la apertura de canales catiónicos no selectivos que son miembros de la familia TRP ("*Transient Receptor Potential*") o canales de potencial de receptor transitorio. (Hardie, 2008). Se postula que el DAG y los PUFAs activan los canales TRP y TRPL por un mecanismo hasta ahora desconocido.

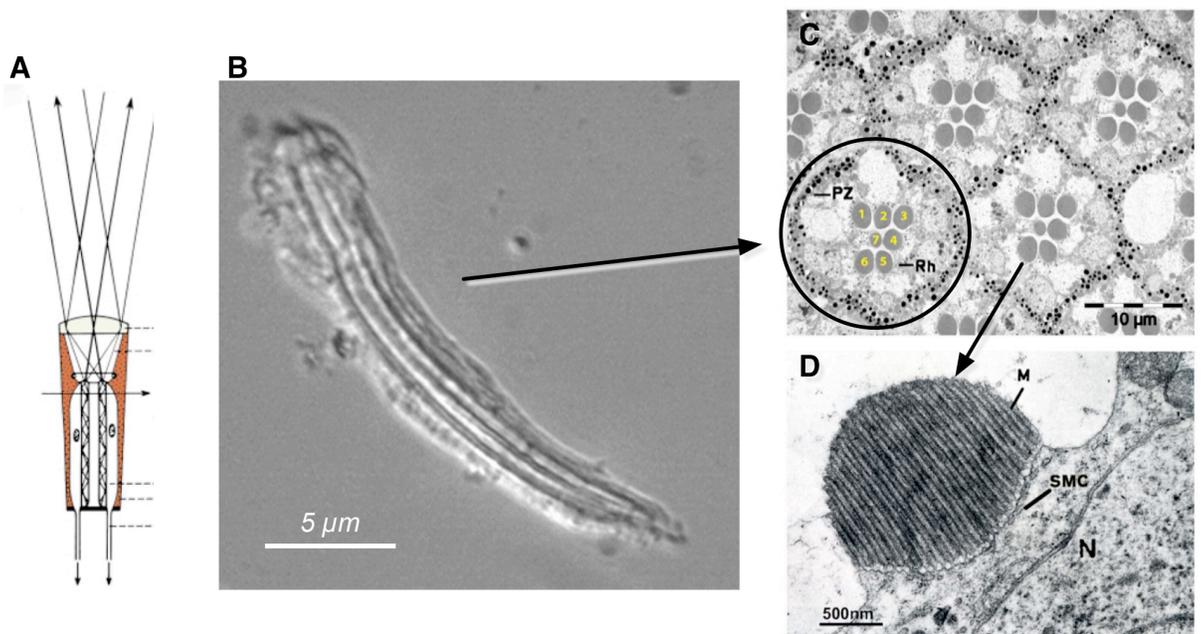


Figura 1: Omatidios del ojo compuesto de *Drosophila melanogaster*

- a) Esquema de un omatidio (modificado de Katz y Minke, 2009).
- b) Fotografía de un omatidio disociado obtenida con óptica de Nomarsky (modificado de Delgado y Bacigalupo, 2009).
- c) Microfotografía electrónica del corte transversal de un omatidio. Se indican las células pigmentadas accesorias de los omatidios (PZ) y en un color más oscuro y numerados, los rabdómeros (Rh) y sus respectivas células fotorreceptoras. Nótese que sólo se aprecian 7, ya que los fotorreceptores 7 y 8 están superpuestos y no se extienden a lo largo de todo el omatidio.
- d) Ampliación del rabdómero. Se aprecian las microvellosidades que componen al rabdómero (M), y el núcleo de las células fotorreceptoras (N). (modificado de Katz y Minke, 2009; citado de Minke y Selinger, 1996).

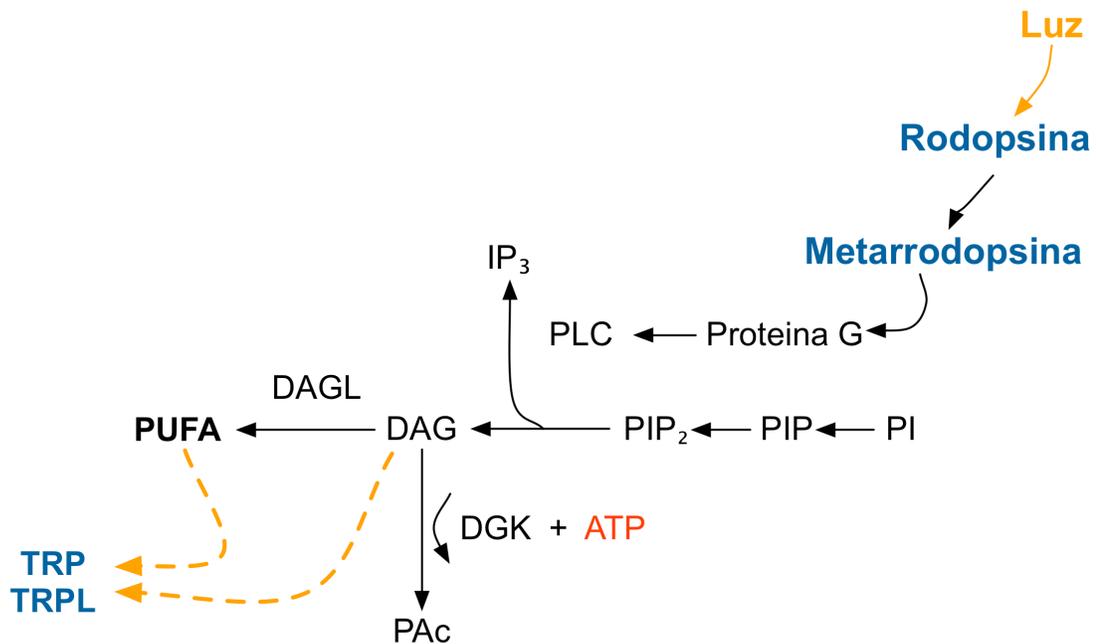


Figura 2: Fototransducción en *Drosophila melanogaster*

La cascada de fototransducción se inicia con la absorción de un fotón de luz por parte de la rodopsina. La fotoisomerización la vuelve catalíticamente activa y se conoce como metarrodopsina. La metarrodopsina induce el cambio de afinidad de una proteína G (Tipo Gq), la cual intercambia guanósín difosfato (GDP) por guanósín trifosfato (GTP), lo que la activa. La proteína G, activa a la fosfolipasa C (**PLC**) (codificada por el gen *norpA*). La PLC hidroliza al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (**PIP₂**) de las membranas en inositol trifosfato (**IP₃**) y diacilglicerol (**DAG**). El DAG puede ser utilizado como sustrato para sintetizar ácido fosfatídico (**PAC**) a través de la DAG quinasa (**DGK**) o continuar por la vía de la fototransducción. Por un mecanismo que aún no se ha resuelto, el DAG es metabolizado por la diacilglicerol lipasa (**DAGL**) la cual se cree que está codificada en el gen *inaE*. Los productos metabólicos del DAG son ácidos grasos poliinsaturados (**PUFAs**) y monoacilgliceroles (**MAG**).

1.2 Canales TRP y fototransducción

Se han descrito 13 miembros de la familia TRP en *Drosophila*, los cuales en su mayoría cumplen un rol en la fisiología sensorial (Montell, 2005). El canal TRP (Hardie, 1992) y el canal homólogo en función TRPL ("Transient Receptor Potential-Like", canales tipo TRP) (Phillips y col., 1992) fueron identificados como los únicos canales dependientes de luz presentes en las microvellosidades (Niemeyer y cols., 1996). Se sabe que los canales TRP y TRPL presentan 6 dominios de transmembrana y

requieren de 4 subunidades para dar lugar a un canal funcional (Phillips y col., 1992). En los rhabdómeros el canal TRP es 10 veces más numeroso que el canal TRPL y su aporte a la conductancia dependiente de la luz en el fotorreceptor es la más significativa (Reuss y cols., 1997). A pesar de los numerosos esfuerzos realizados en los últimos 20 años, la relación entre el mecanismo de activación de los canales TRP y los productos metabólicos de la vía de transducción de la PLC, aún no está clara y es foco de controversia.

El estudio de cepas mutantes que presentan defectos en la respuesta a la luz, ha permitido identificar numerosas enzimas que participan en la fototransducción, entre esas, aquellas implicadas en el metabolismo de los lípidos que se relacionan con la apertura de los canales TRP en la fototransducción. Un paso crucial en esta descripción fue la obtención de las mutantes hipomorfas *norpA*. Los fotorreceptores de las mutantes *norpA* presentaban una severa disminución en la enzima PLC y no respondían a la luz en los ensayos de ERG (Electroretinograma) (Bloomquist y cols., 1988). Se propuso entonces que los productos metabólicos de la PLC, DAG e IP₃, serían los responsables de la apertura de los canales en la fototransducción. Sin embargo, la respuesta a la estimulación con luz de los fotorreceptores de moscas mutantes nulas para el gen *InsP₃R1*, las cuales carecían de receptores de IP₃, no mostraban alteraciones en la respuesta a la luz (Acharya y cols., 1997), por lo que se descartó la participación del IP₃ a través de un mecanismo de SOCs ("Store Operated Channels", o canales operados por reservas internas) en la fototransducción, como fue propuesto por otros autores (Hardie y Minke, 1993; Vaca y cols., 1994; Hu y Schilling, 1995; Wes y cols., 1995)

La evidencia presentada, llevó a pensar que el DAG y los ácidos grasos poliinsaturados derivados de la metabolización del PIP₂ podrían ser mensajeros de la fototransducción (figura 3). En un principio se descartó la posibilidad que el DAG tuviera un rol en la apertura de los canales TRP, argumentando que su acción más conocida es la activación de la proteína quinasa C (**PKC**), que se demostró que participa en el proceso de adaptación a la luz pero no necesariamente en la excitación (Hardie y cols., 1993). La participación de DAG como agonista se refuerza con los estudios realizados en las mutantes nulas del gen *rdgA*, las cuales carecían de la DAG quinasa (**DGK**) y era capaz de mantener constitutivamente activos los canales de

fototransducción, provocando la degeneración de la retina en *Drosophila* por acumulación de Ca^{2+} intracelular (Raghu y cols., 2000). La participación de DAG también se ha observado en canales que pertenecen a la misma subfamilia, como el hTRPC6 y hTRPC3, los cuales son activados directamente por esta molécula (Hofmann, 1999).

La participación de los PUFAs en la fototransducción sugería la actividad metabólica de una diacilglicerol lipasa (**DAGL**). Uno de los primeros intentos para identificar la DAGL que participaría en la fototransducción, fueron los estudios realizados en la cepas mutantes *Rolling Blackout* (*rbo*). La mutante termosensible *rbo* presenta en sus fotorreceptores pérdida reversible de la activación por luz. Por su homología con otras lipasas, RBO fue calificada como una lipasa asociada a membrana, sin embargo la acumulación de PIP_2 y la disminución de DAG después del bloqueo condicional de esta enzima, permitieron concluir que ella es requerida para la mantención de la actividad de la PLC y no corresponde a una supuesta DAGL de los fotorreceptores (Huang y cols., 2004). Más recientemente, la identificación de la mutante hipomorfa *inaE*, que muestra alteraciones en la respuesta a la luz, permitió identificar un gen que codifica una proteína homóloga a una DAGL. El producto de este gen posee una elevada identidad de secuencia con las DAG lipasas conocidas en mamíferos, es expresada en fotorreceptores de mosca y la proteína codificada por este gen presenta actividad lipasa en ensayos *in vitro*. En dichos ensayos se mostró que el mecanismo de la metabolización del DAG podría no sólo producir PUFAs, sino también monoacilglicérols (MAG) (Leung y cols., 2008).

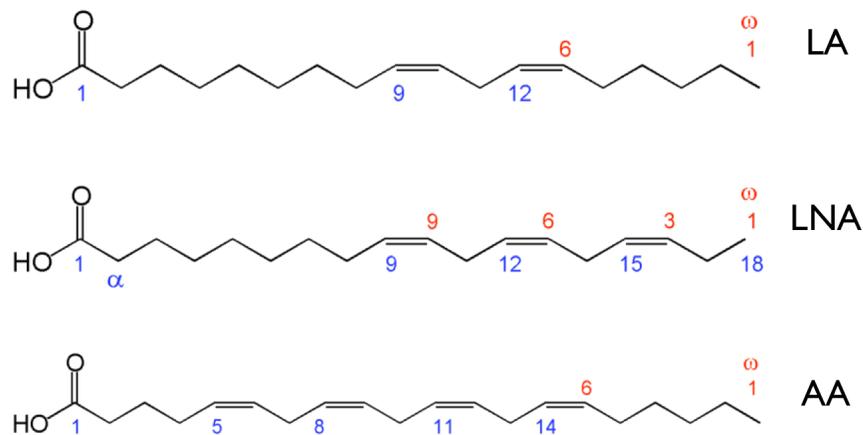


Figura 3: Estructura de tres ácidos grasos poliinsaturados

Estructura química de 3 PUFAs. Ácido linoleico (LA, 18:2), ácido linolénico (LNA, 18:3) y ácido araquidónico (AA, 20:4). Estos ácidos grasos poseen cadenas alifáticas con un largo similar, pero se diferencian en el número de insaturaciones.

1.3 Canales activados por lípidos

La activación de canales iónicos por lípidos de membrana y sus productos metabólicos, ha sido descrita en otros canales asociados a sistemas de transducción de señales, como los canales mecanosensibles (Carrasco y Mérida, 2007; Kung 2005), entre otros.

La incorporación de lípidos cuya rotación está limitada por sus dobles enlaces confiere una forma geométrica distinta a los lípidos que constituyen la membrana celular, alterando las propiedades mecánicas de la membrana, tales como la fluidez, el grosor y la curvatura. Estos cambios en la tensión de la membrana alteran la función de los canales incluidos en ella, de la misma manera que ocurre al estirar la membrana plasmática. El cambio del grosor de la membrana provocado por la inclusión de lípidos de cadenas alifáticas con distinto largo al de la membrana donde se aloja el canal, induce desajustes hidrofóbicos (*“hydrophobic mismatch”*) entre los residuos hidrofóbicos del canal y la membrana, que pueden comprimir o expandir el perfil de presión lateral sobre el canal, que finalmente terminan por reacomodar al canal en la membrana (figura 4), tal como se ha descrito en los canales mecanosensibles de bacterias MscL (*“mechanosensitive channel of large-conductance”*, canales mecanosensibles de gran conductancia; Perozo y cols., 2002).

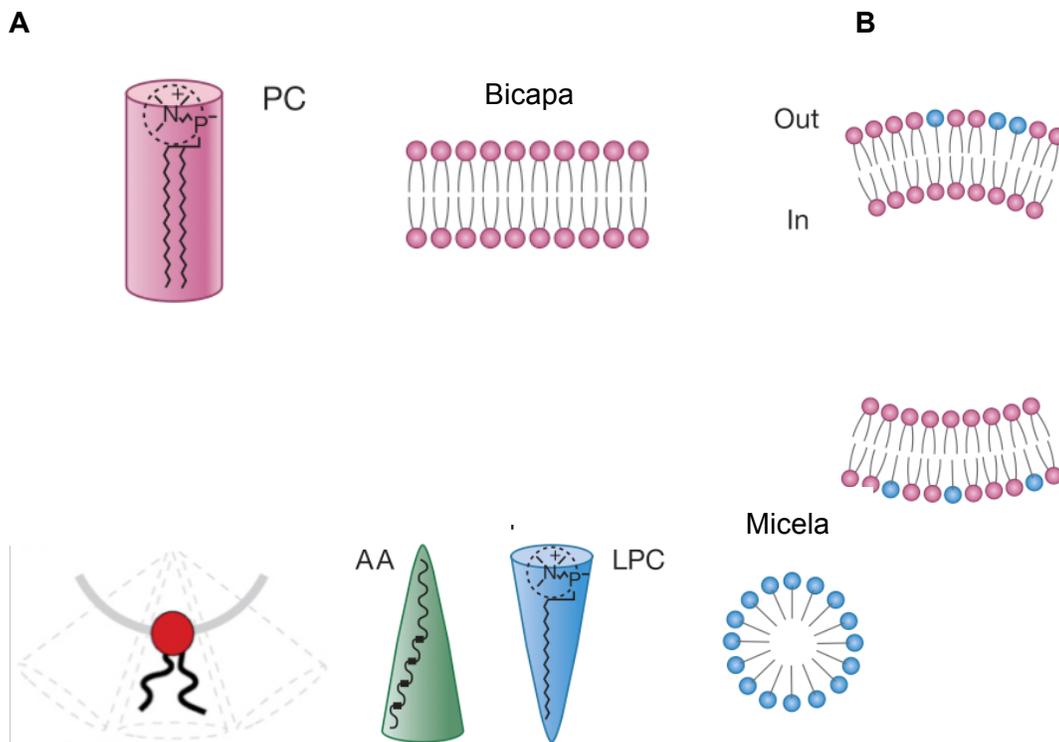


Figura 4: Relación entre la estructura química y la deformación de una bicapa lipídica

A) Diferencias entre la estructura química de los grupos radicales que confieren una deformación característica sobre la membrana. Representación de la forma geométrica que adquieren los diferentes lípidos en una bicapa, debido a sus características químicas, como la restricción de rotación por dobles enlace, volumen de la cabezas polares y la carga. También se representa el tipo de ordenamiento que poseen al estar puros. **AA:** ácido araquidónico, **PC:** fosfatidilcolina y **LPC:** lisofosfatidilcolina **B)** Deformación que ejercen al incluirse en una bicapa de carácter plano por el lado extracelular “out” y por el lado intracelular “in”. (Modificado de Carrasco y Mérida, 2007; Modificada de Kung, 2005).

La íntima relación entre los canales mecanosensibles y los PUFAs se puede apreciar en otros canales mecanorreceptores, como los de la familia TREK (“*TWIK-related K^+ channel*”, canal de K^+ relacionado con TWIK) y TRAAK (“*TWIK-related \underline{AA} -stimulated K^+ channel*”, canal relacionado con TWIK activado por ácido araquidónico), que corresponden a canales de K^+ mecanosensibles modulados por lípidos (Fink M y

cols., 1996; Patel y cols., 1998; Maingret y cols., 1999). Se demostró que entre lípidos de igual número de carbonos en la cadena alifática, aquellos que poseen un mayor número de insaturaciones ejercen un mayor efecto activador, y que derivados de lisofosfatidilcolina (**LPC**; figura 4), según la naturaleza de la cabeza polar en cuanto a volumen y carga, ejercen un efecto de activación diferencial sobre el canal (Patel y cols., 2001). Estos resultados muestran que la incorporación de moléculas de naturaleza lipídica en la membrana modulan la actividad de canales mecanosensibles, al igual que los cambios de tensión en la membrana, como se ha descrito en otros modelos de proteínas de membrana (Lundbaek, 2010). La regulación de la actividad mediada por lípidos de membrana se ha descrito en canales iónicos de diversos orígenes y familias, como canales de Cl⁻ de membranas apicales del epitelio respiratorio (Anderson y Welsh, 1990), canales de K⁺ de musculatura lisa en ranas (Ordway y cols., 1995), la familia de canales de K⁺ TREK (Patel y cols., 2001) y TRAAK (Maingret y cols., 1999), los canales MscL en bacterias (Perozo y cols., 2002). También se ha descrito en miembros de la familia TRP (Carrasco y Mérida, 2007), entre los cuales se incluyen TRPV4, TRPA1 (Kung, 2005), TRPC2 en dendritas de neuronas vomeronasales de ratón (Lucas P y cols., 2003), TRPC6 (Zhang y Saffen, 2001; Spassova, 2006), hTRPC6 y hTRPC3 (Hoffman y cols., 1999) entre otros.

El hecho que estos canales compartan la sensibilidad a la incorporación de lípidos en la membrana y una homología estructural, nos permite establecer un nexo entre la sensibilidad mecánica y química de dichos canales.

1.4. Canales TRP activados por PUFAs

Si la inclusión de lípidos a la membrana que contienen los canales TRP y TRPL altera tanto la torsión de la bicapa como el desapareamiento hidrofóbico, ambos fenómenos podrían converger en un cambio conformacional de la proteína, que podría activarlos. Para corroborar esta afirmación, es necesario ver el efecto directo de los PUFAs sobre los canales TRP y si la actividad observada se relaciona con las mediciones hechas en canales mecanosensibles.

Para estudiar el efecto de activación en canales únicos, se emplea el método de *patch clamp*, el cual permite estudiar en condiciones de voltaje controlado las

corrientes de los canales únicos inducidas por un agonista. El método consiste en asilar la membrana circunscrita por la punta una micropipeta de vidrio sobre la superficie de la célula para luego escindir un parche de membrana (“*excised patch*”) y así realizar registros electrofisiológicos de los canales contenidos en la membrana aislada.

Estudios de parches escindidos de membranas de células S2 transfectadas con el gen que codifica este canal TRPL permitieron demostrar que ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido araquidónico (**AA**) y el ácido linoléico (**LNA**), actúan como activadores de este canal, sugiriéndolos como posibles agonistas de los canales TRP en el proceso de fototransducción (figuras 5; Chyb y cols., 1999). La figura 5 muestra que el LNA produce un efecto de activación dependiente de la concentración de LNA en parches escindidos. Sin embargo, en dicho trabajo no fue posible caracterizar las corrientes de canales únicos, o corrientes unitarias, en respuesta a los PUFAs en el canal de las células fotorreceptoras de *Drosophila*, dejando la pregunta abierta de cómo estos ácidos grasos son capaces de activar a estos canales en sus membranas nativas.

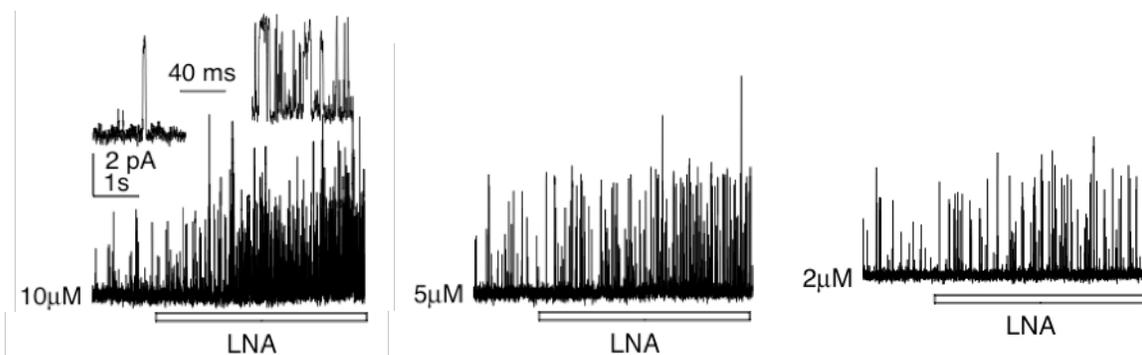


Figura 5: Activación del canal TRPL recombinante por LNA en células S2

Registros de parches escindidos de canales TRPL transfectados en células S2, mantenidos a un potencial de 60 mV. En este trabajo se probó el efecto activador a diferentes concentraciones de LNA (10, 5 y 2 μM), entre otros PUFAs. Se estima que hay hasta 3 canales por cada registro. (Modificado de Chyb y cols., 1999)

Mediante una técnica de disgregación mecánica suave de los omatidios, se logró acceder a los rabadómeros, de modo que fue posible hacer parches escindidos de la membrana conteniendo intacta la estructura de algunos de los componentes de la

fototransducción (figura 6. Delgado y Bacigalupo, 2009). Este método de disgregación desarrollado en nuestro laboratorio permitió obtener registros de canal único de los canales TRP y en TRPL de rabdómeros. A partir de los resultados obtenidos, un parche aislado podría contener los canales dependientes de luz y las enzimas asociadas a este proceso. Gracias a esto, se estableció que los canales que podían responder a los estímulos de luz, TRP y TRPL, poseen conductancias de 70 pS y 11 pS, respectivamente. Del mismo modo se comprobó que el DAG, el LNA y el AA tienen un efecto activador sobre canales presentes en parches escindidos de rabdómero de *Drosophila*, cuando se suministran por el lado intracelular o extracelular de la membrana (Delgado y Bacigalupo, 2009).

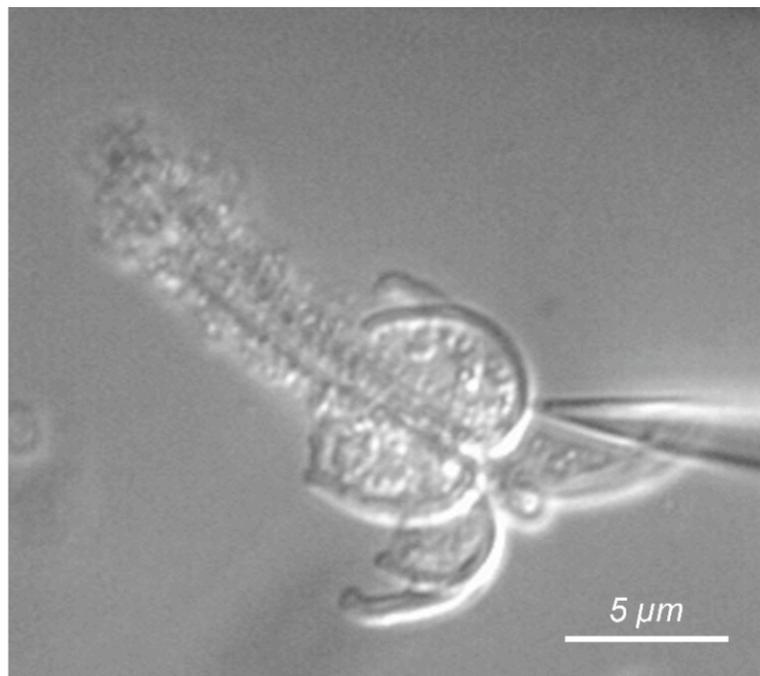


Figura 6: Parche escindido de membrana rabdómica

Microfotografía de omatidio obtenida con óptica de Nomarsky. El omatidio parcialmente disociado expone la membrana rabdómica de uno de sus fotorreceptores, el cual es contactado por la punta de la micropipeta. Se puede apreciar que pese al daño sufrido por las células fotorreceptoras, los rabdómeros se conservan en buenas condiciones para realizar un parche escindido (“*excised patch*”) (Delgado y Bacigalupo, 2009)

La regulación de los canales TRP por DAG y los PUFAs reportados en la literatura no establece si dicha interacción es alostérica o si estos lípidos inducen una modificación

del entorno lipídico del canal (Christensen y Corey, 2007). Se ha propuesto que el mecanismo de regulación está íntimamente relacionado con las propiedades biofísicas de la membrana (Chyb y cols., 1999), ya que la escisión de parches conserva la respuesta al DAG y PUFAs (Delgado y Bacigalupo, 2009) y, por el momento, se desconoce si existe algún sitio de interacción en la estructura de la proteína con dichas moléculas (Katz y Minke, 2009). Se ha visto además que el canal TRPL puede ser regulado por estímulos tales como la presión osmótica y toxinas que modulan a canales de membrana (Parnas y cols., 2009). Se ha propuesto que los efectos de los PUFAs sobre el canal TRP de *Drosophila* ocurriría por un mecanismo de la remoción del bloqueo del canal abierto por cationes divalentes (“*Open Channel Block*”, OCB). Estas observaciones se explican en el contexto de un efecto inespecífico de los PUFAs incluidos en la membrana, que causaría un cambio conformacional sobre el canal, por el cual perdería su afinidad por el catión divalente que bloquea el poro. Estos resultados, junto con el bloqueo de la activación por lípidos con veneno de tarántula (GsMTx-4), utilizado como un inhibidor de canales catiónicos activados por estiramiento, permitió apreciar un nuevo rol de los PUFAs en la regulación del canal TRPL. Sin embargo, la actividad inducida por PUFAs en los canales TRP y TRPL en los experimentos de parches escindidos de rabadómeros (Delgado y Bacigalupo, 2009) y el incremento en la conductancia en el canal TRPL al ser estimulado por LA (Parnas y cols., 2009), nos hace suponer que la remoción del OCB no es el único efecto de los PUFAs sobre los canales TRP y TRPL. Estos efectos no ocurrirían por una acción directa sobre el canal, sino por el cambio de las propiedades biofísicas de la membrana que lo rodea (Parnas y cols., 2009). La idea que los canales TRP y TRPL están regulados por cambios en su entorno lipídico, de forma similar a los canales mecanosensibles, como se sugiere en el trabajo de Parnas, es coherente con las propiedades fisicoquímicas que confieren el DAG y los PUFAs a las membranas biológicas (Carrasco y Mérida, 2007).

La evidencia presentada hasta aquí nos lleva a pensar que el papel del DAG o los PUFAs en la respuesta a la luz podría ser explicado por un cambio de las propiedades de la membrana, que finalmente activan los canales TRP y TRPL. Para continuar esta investigación, es necesario caracterizar la actividad inducida en los canales TRP y TRPL por los lípidos de membrana, correlacionando las propiedades

fisicoquímicas de estas moléculas. El número de insaturaciones, el largo de las cadenas de carbono y el tamaño de la cabeza polar y su consiguiente forma geométrica, son parámetros que inducirían una deformación en la membrana y un cambio de la curvatura en una bicapa lipídica. (Rawicz W y cols., 2000; Szule y cols., 2002; Phillips y cols., 2009).

Para poder establecer comparaciones entre los efectos de los diversos lípidos, se debe estudiar cómo sus diversas propiedades fisicoquímicas alteran el comportamiento de los canales iónicos. En primer lugar, los ácidos grasos pueden ser clasificados según la estereoquímica de sus insaturaciones. Las cadenas que presentan insaturaciones de tipo *cis*-, como el ácido oleico, linoleico, linolénico y araquidónico (figura 3), son capaces de aumentar la fluidez de la membrana mientras que aquellos que poseen insaturaciones de tipo *trans*-, como el ácido eláidico o el esteárico, no cambian su fluidez (Karnovsky y cols., 1982; Rawicz y cols., 2000). Los ácidos grasos saturados, introducen una menor distorsión en la membrana. Por esta razón, se esperaría que ejercieran un menor efecto en la activación de los canales TRP o TRPL. El largo de la cadena afecta en menor grado la elasticidad de una bicapa (Rawicz y cols., 2000), sin embargo, ejerce profundos cambios en la respuesta de algunos canales de membrana. Al disminuir el largo de las cadenas de los lípidos de membrana, algunos canales como el MscL se vuelven más sensibles a los cambios de presión, bajando el umbral de estimulación. Esto se explica por los cambios en el desapareamiento hidrofóbico entre el canal y la membrana, que fuerzan un reordenamiento de la proteína y favorecen su estado abierto (Perozo y cols., 2002). Además de las propiedades de la cadena alifática, se ha descrito que cabezas polares de carga positiva o negativa en otros canales mecanosensibles, orientan su distribución a lo largo de la bicapa con un consecuente cambio selectivo en la tensión de la membrana. Las moléculas anfipáticas de carácter aniónico tienden a incluirse en la cara externa de la membrana y podrían ejercer un efecto contrario a las moléculas anfipáticas de carácter catiónico, las cuales se alojarían en su cara interna. Como se ha observado en el canal MscL (Perozo y cols., 2002) y también en los canales TREK (Patel y cols., 2001), la disposición asimétrica de los lípidos de membrana constituye una propiedad fundamental en la conformación de una bicapa. El incremento en el volumen de las cabezas polares también aumenta la actividad final de los canales,

pues cambia la geometría de la molécula y su distribución sobre la membrana (Patel y cols., 2001; Kung, 2005).

Dado los antecedentes presentados en esta memoria, propongo estudiar el efecto de lípidos con distinto grado de insaturación sobre el canal TRP en las mutantes nulas *trp*³⁰² de *Drosophila melanogaster*. En estas mutantes estudiaremos las corrientes unitarias del canal TRP, cuya presencia contribuye en un 90% de la actividad de los fotorreceptores.

2. Hipótesis

Los lípidos de membrana provenientes del metabolismo del PIP₂ aumentan la actividad del canal TRP de las microvellosidades de los fotorreceptores de *Drosophila melanogaster*, dependiendo de su concentración en la membrana.

3. Objetivos

En este trabajo se propusieron los siguientes objetivos.

3.1 Objetivo general

Estudiar los cambios en la actividad del canal TRP inducidos por la incorporación lípidos a la membrana rabadómica, en fotorreceptores de *Drosophila melanogaster*.

3.2 Objetivos específicos

- 1.- Probar el efecto de los lípidos de membrana como DAG, PUFAs y sus isómeros *cis* y *trans*, sobre la actividad del canal TRP en parches escindidos de rabadómeros de las moscas mutantes *trpl*³⁰².
- 2.- Cuantificar y comparar la acción de LA y LNA sobre la fracción de tiempo abierto del canal TRP de *Drosophila melanogaster*.
- 3.- Cuantificar y comparar la acción de LA y LNA sobre el tiempo de inicio de la actividad del canal TRP de *Drosophila melanogaster*.

4. Materiales y Métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Material biológico

Cepas de *Drosophila melanogaster*

Se utilizó la cepa mutante nula para los canales TRPL: *trpl*³⁰². Estas cepas fueron gentilmente donadas por los Dres. Roger C. Hardie, de la Universidad de Cambridge (Cambridge, Inglaterra) y Craig Montell, de la Universidad de Johns Hopkins (Baltimore, Maryland, EE.UU.). Se mantuvieron dos cepas de distinto origen como control de la mutación estudiada.

4.1.2 Reactivos

Cayman Chemicals Co. (Ann Arbor, Michigan, EE.UU.): ácido linoleico, ácido alfa linolénico, ácido araquidónico.

Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, EE.UU.): ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico, ATP-Mg²⁺ (>95%, origen bacteriano).

4.1.3 Material de vidrio y capilares

Warner Instruments Inc. (Hamden, Connecticut, EE.UU.): Capilares de vidrio borosilicato de pared delgada (nº catálogo 64-0777).

Hilgenberg GmbH. (Malsfeld, Alemania): capilares de vidrio Hilgenberg (nº catálogo 1403710).

Kimble Chase Co. (Vineland, Nueva Jersey, EE.UU.): Tubo capilar para medición de punto de fusión KIMAX.

Supelco (Bellefonte, Pensilvania, EE.UU.): Viales ámbar con fondo cónico de 5 ml y tapas atornilladas con septas de Teflón/silicona (nº catálogo 29370-U).

Sutter instrument Co. (Novato, California, EE.UU.): Capilares de tres barriles (nº catálogo 3BF100-75-10)

4.1.4 Equipos y materiales complementarios

Advanced Instruments Inc. (Norwood, Massachusetts, EE.UU.): Osmómetro modelo 3250

Axon Instruments Inc. (Sunnyvale, California, EE.UU.): Amplificador Axopatch-1D.

David Kopf Instruments (Tujunga, California, EE.UU.): Estirador de pipetas vertical modelo 700C.

Hung Chang (Seúl, Korea): Osciloscopio 20mHz de doble canal, modelo 3502.

Kodak (Rochester, Nueva York, EE.UU.): Filtro de densidad neutra (N.D. 2,0; N° 96).

Narishige (Tokio, Japón): Micromanipulador de tres ejes MMO-203, estirador de pipetas vertical modelo PC-10.

Nikon (Tokio, Japón): Lámpara modelo TE2-PS (100W), microscopio invertido Eclipse TE2000-S, Lente Objetivo de inmersión (aceite) 100X (n° catálogo MRH02902).

Photonic Optische Geräte GmbH & Co. (Viena, Austria): Lámpara de luz fría por fibra óptica de dos brazos, PL2000 (100W).

P+L Electrónica S.A. (Santiago, Chile): Incubadora programable BioRef

Reichert (Viena, Austria): Lupa Nr 249.409.

Scientific Solution Inc. (Mentor, Ohio, EE.UU.): Tarjeta de adquisición Lab Master DMA.

Sutter Instrument Co. (Novato, California, EE.UU.): Estirador de pipetas horizontal modelo P-97

Laboratorio de Fisiología Celular (Fac. de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile): Diseño y construcción de jaula de Faraday, picospritzer y circuito de estimulación por luz (modificado por Marcelo Sepúlveda).

4.1.5 Programas computacionales

Axon Instruments, Inc (Sunnyvale, California, EE.UU.): Programa de adquisición pClamp 9.2, 6.0 y 5.5.

Chris Patton (<http://www.stanford.edu/~cpatton/>): MAXCHELATOR 32.

4.2 Métodos

4.2.1 *Mantenición de las moscas*

Alimento para moscas (1 litro)

NaNO₃ 4,2 g; K₂HPO₄ 1,2 g; KCl 0,57 g; MgSO₄ 0,57 g; FeSO₄ 0,0125 g; agar 10 g; sémola 60 g; levadura 10 g; azúcar 43 g; Nipagin 1,56 g.

El alimento se preparó en agua destilada caliente, donde se agregan todos los ingredientes excepto el NIPAGIN, el cual se agregó al final cuando la mezcla está tibia. El alimento recién preparado fue distribuido en porciones de 30 ml en frascos de vidrio estériles con tapones de gasa y algodón, los cuales fueron previamente esterilizados a 180 °C durante 2 hrs. Una vez que el alimento se enfrió, los frascos estaban listos para mantener moscas.

Mantenición de las cepas *trpI*³⁰²

Las cepas se mantuvieron en los frascos de vidrio (rotulados con la fecha en que fueron transferidas) a 18 °C con ciclos de luz de 12 horas en una incubadora programable. Después de 3 semanas se cambiaron a frascos con alimento fresco. De estos mismos frascos se tomaron las moscas para los experimentos.

4.2.2 *Capilares y micropipetas*

Se estiraron los capilares con el puller horizontal modelo P-97. Se utilizaron capilares pequeños (80 mm de largo) de aproximadamente 1 mm de diámetro exterior y 0,8 mm de diámetro interior n° catálogo 64-0777 (Warner Instruments Inc.) y N° catálogo 1403710 (Hilgenberg GmbH). La resistencia de las micropipetas se mantuvo entre 50 y 100 MΩ.

4.2.3 Estación de registro de patch clamp

Los registros de corrientes de canal único en parches escindidos (*“inside out”*) del rabdómero se obtuvieron con la técnica de *patch clamp*. Nuestra estación de registro está conformada por un estante de hierro (*“rack”*) y una jaula de Faraday en una mesa aislada de vibraciones. En el *rack* se montó el amplificador Axopatch-1D, que permite aplicar los potenciales requeridos a la membrana y registrar las corrientes generadas por los canales, el osciloscopio donde se visualizó los registros y la tarjeta de adquisición LabMaster asociada a un PC, que digitaliza los registros analógicos para guardarlos en el computador. Además incluyó un Picospritzer de 5 válvulas manuales conectado con la red de presión de gas (N₂).

Sobre una mesa se situó una plancha de hierro sostenida por cinco cámaras neumáticas, para amortiguar vibraciones de la mesa. Alrededor de la mencionada plancha se instaló una jaula de Faraday, para blindar al amplificador de la radiación electromagnética que pudiera interferir con los registros. Al interior de la jaula de Faraday se instaló el microscopio de campo invertido Eclipse TE2000-S conectado con una lámpara modelo TE2-PS, el *Holder* del amplificador, el cual fue montado en un micromanipulador hidráulico MMO-203 y fijado a la mesa. La jaula de Faraday junto con los componentes del *rack*, se conectaron a tierra mediante alambres de cobre, para minimizar el ruido en los registros.

4.2.4 Soluciones

Solución intracelular: NaAsp 108 mM; NaCl 12 mM; HEPES 10 mM; L-prolina 51 mM; sacarosa 2,5 mM; ATP 2 mM, pH 7,15.

Solución extracelular: NaCl 120 mM; HEPES 10 mM; L-prolina 53 mM; sacarosa 2,5 mM, pH 7,15

La osmolaridad entre la solución de pipeta y la del baño se ajustó de manera que la diferencia no fuera mayor al 5%, ya que existe evidencia de que el canal TRPL se activa con una diferencia de 100 mOsm (Parnas, 2009).

El electrodo de referencia de Ag⁺ / AgCl se conectó con la solución de la cámara con un puente de agar salino, para minimizar el potencial de juntura y evitar el contacto

directo del electrodo de plata con la solución intracelular de la cámara. Para esto, se preparó una solución de agar al 7% con solución intracelular, en un tubo Eppendorf de 2 ml (35 mg de agar con 500 μ l de solución intracelular)

4.2.5 Alícuotas de PUFAs

Se prepararon soluciones ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como solución stock disueltas en alcohol a 10 mM ó 5 mM y posteriormente diluidas en una nueva alícuota a 100 μ M con solución extracelular o intracelular dependiendo del diseño experimental. Los lípidos ensayados fueron ácido linoleico (**LA**), ácido linolénico (**LNA**) y ácido araquidónico (**AA**). Los reactivos se manipularon y almacenaron según las especificaciones del fabricante.

4.2.6 Purga con N₂ y almacenamiento de alícuotas

Para preservar las alícuotas y prevenir la oxidación de los lípidos, las alícuotas se prepararon de la siguiente forma: La solución madre se almacenó en viales de vidrio ámbar de 5 ml con tapas atornilladas y septas de Teflón/silicona. Estas septas poseen la cualidad de resellar una vez perforadas con una aguja. Para purgar el oxígeno de la solución, las septas se perforaron con dos agujas de jeringas Hamilton, una para la entrada del flujo de nitrógeno humectado y otra para la salida del aire desplazado (figura 7). Para humectar el flujo de nitrógeno, se burbujeó un matraz de 25 ml la misma solución madre, el cual se selló de manera que permitiera la salida del gas humectado por una manguera de salida. El burbujeo del gas humectado se realizó desde el fondo de la solución durante 15 minutos en hielo. Una vez terminado este procedimiento, se retiraron ambas agujas y se inyectó el volumen necesario de PUFAs para alcanzar la concentración stock, con una jeringa Hamilton de 10 μ l.

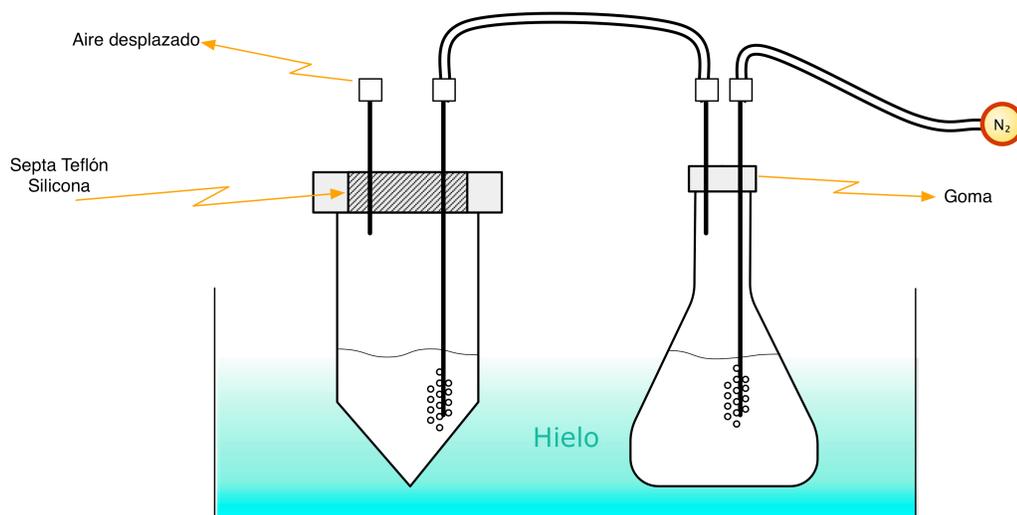


Figura 7: Montaje para desplazar el oxígeno con flujo de N_2

Este sistema consiste en generar un flujo humectado de N_2 , mediante el burbujeo de la misma solución usada para la alícuota de PUFAs. La salida de gas de N_2 humectado se conecta a una manguera, la cual termina en una aguja. Esta aguja se introduce a través de la septa hasta el fondo del vial, mientras una segunda aguja atraviesa la septa pero no se sumerge en la solución. Se permite un burbujeo suave de la solución con el flujo de N_2 humectado durante 15 minutos en hielo, donde se desplazará el oxígeno por la aguja de salida. Este proceso de purga de oxígeno se realiza antes de mezclar las soluciones con los lípidos.

4.2.7 Circuito para estímulos de luz de 50 ms

Se construyó un circuito conectado a un LED de alta intensidad, para generar estímulos de 50 ms de forma analógica. La calibración de los pulsos de luz se realizó mediante una sonda unida al amplificador y por la medición de los pulsos generados con el pClamp 9.2. Los pulsos de voltaje tienen una duración proporcional a la resistencia variable del circuito. El circuito se alimentó con 4 pilas AA de 1,2 V recargables, para evitar el ruido de la fuente de poder conectada a la red eléctrica. En los registros adquiridos, fue fácilmente identificable el momento en que se aplicaron los estímulos ya que se genera una espiga artificial en el registro. Se cronometró y anotó el tiempo del estímulo de luz según el protocolo.

4.2.8 Disección y disgregación de omatidios

Se anestesiaron moscas *Drosophila melanogaster* adultas de la cepa *trpl*³⁰² con CO₂ para luego disectar sus ojos. Los ojos aislados se suspendieron en una cámara de 500 µl con solución intracelular sin cationes divalentes, para así facilitar la separación de los omatidios. La retina se disgregó suavemente con un alambre de tungsteno de punta fina para lograr abrir una fracción de los omatidios, de modo que estos expongan parcialmente sus rabdómeros (Delgado y Bacigalupo, 2009). La disección y disgregación se realizó a temperatura ambiente asistido con una lupa e iluminado con luz fría, en menos de 10 minutos. Se dejaron reposar los omatidios en la misma cámara donde se disgregó la muestra, unos minutos antes de proceder con los ensayos electrofisiológicos.

4.2.9 Electrofisiología

La visualización de los rabdómeros se realizó bajo el microscopio de campo invertido, con un lente objetivo de contraste de fase 100 X (de inmersión). En la preparación de omatidios disociados se buscó aquellos que presentaran sus fotorreceptores parcialmente disociados y que conservaran su membrana sin daños (“blebs” o irregularidades de la membrana producto del proceso de disgregación). Aquellos que cumplieron estas condiciones, se les acercó la punta de una pipeta de registro con solución extracelular filtrada para hacer *patch clamp*. Una vez establecido el sello, se retiró la pipeta con el parche de membrana (parche escindido) y se procedió a estimular con potenciales de membrana ente los -40 y +60 mV, y simultáneamente se registró la actividad de los canales con los programas pClamp 6.0 ó 5.5. En caso de que no se observara actividad de canales, se expuso brevemente la pipeta de registro al aire, para así destruir alguna posible vesícula que impidiera el registro. Una vez en la solución, un tercio de los parches lograba presentar actividad mientras el resto se destruía. Los datos se adquirieron con una frecuencia de muestreo de 50 µs y se filtraron a 5000 Hz.

En los parches escindidos se ensayaron los ácidos grasos poliinsaturados

(PUFAs) en un rango de concentración entre 5 – 35 μ M, diluidos en la solución de pipeta que contacta el lado extracelular. Esta metodología aprovecha la capacidad de estos compuestos de atravesar la membrana. Como método alternativo, se procedió a utilizar una pipeta de registro con solución extracelular y una segunda pipeta de tres cañones, con tres concentraciones diferentes de PUFAs disueltas en solución intracelular. Esta pipeta se acopló a un Picospritzer con 3 salidas analógicas para controlar de forma manual los estímulos de solución con PUFAs.

Al final de cada experimento, se evaluó si se formaba una vesícula de membrana o un parche escindido bien constituido. Para esto se expuso brevemente la pipeta de registro al aire y se evaluó si el sello resistía al volver a entrar a la solución. En caso de resistir, había una alta posibilidad de que fuera un vesícula de membrana, lo cual era considerado en las notas del registro. Adicionalmente, al final de cada experimento se evaluó el potencial leído por el electrodo después de romper el parche, para verificar que no hubiera diferencia de potencial entre los electrodos de registro y de referencia al final de cada experimento. Finalmente, los registros fueron filtrados digitalmente a 2000 Hz descartando los valores por sobre esta frecuencia (Filtro Bessel de 8 polos) y se analizaron en el programa pClamp 9.2. Con este programa, se determinó el nPo y la latencia de la respuesta.

4.2.10 Análisis estadístico

Las poblaciones de registros fueron agrupadas según la condición experimental. Para establecer las comparaciones se calculó la media y desviación estándar de las poblaciones. Para eliminar valores extremos, se utilizó el test de Dixon. Se demostró la diferencia estadística entre las medias de las poblaciones de datos de LA y LNA mediante un test de ANOVA de dos vías.

5. Estrategia experimental

Con el fin de caracterizar la respuesta biológica de los lípidos ensayados sobre el canal TRP, se propuso la siguiente estrategia experimental (figura 8):

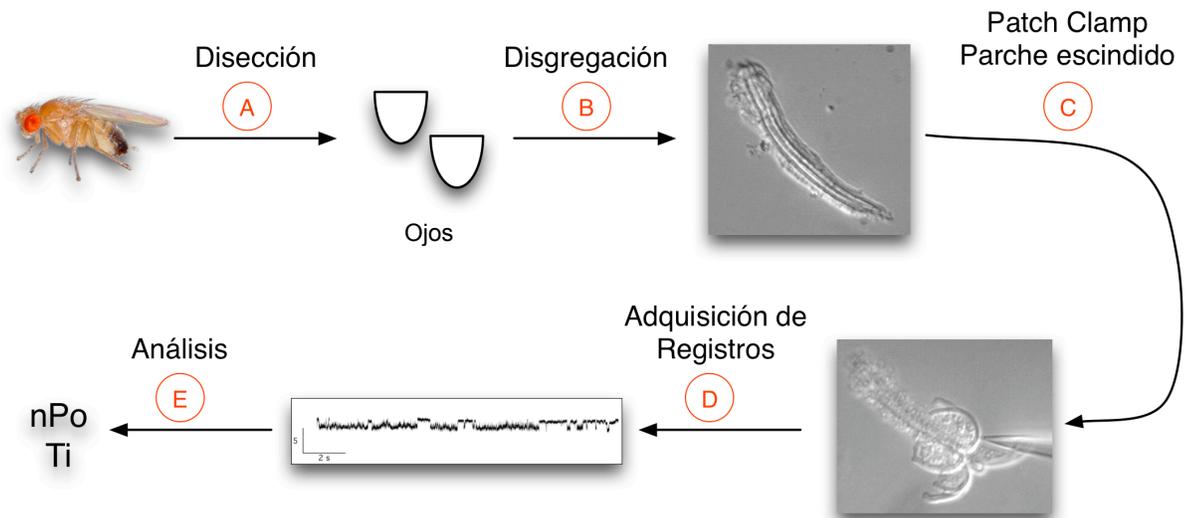


Figura 8: Estrategia experimental

En este esquema se detalla paso a paso la metodología seguida para los experimentos realizados en esta memoria. **A)** La disección de los ojos de *Drosophila*. **B)** La disgregación de la retina y separación de los omatidios. **C)** Lograr parches escindidos de membrana rabdomérica. **D)** Adquisición de registros según el protocolo experimental. **E)** Análisis de los registros según los parámetros estudiados.

Esta estrategia experimental se divide en 5 etapas. En cada una de ellas influyeron en su desempeño múltiples factores, los cuales presentaron sus propias dificultades. A lo largo del desarrollo de este trabajo se realizaron diversos ajustes de la metodología aplicada, debido a que las primeras aproximaciones experimentales no lograron conseguir los objetivos planteados. Los ajustes de los protocolos se pueden dividir en tres partes: Los parámetros de los electrodos utilizados que influye directamente en la formación del sello y parche escindido (paso **C**), la formulación de las soluciones de registro que involucra la viabilidad de las células (paso **B**) y los protocolos

experimentales de los ensayos electrofisiológicos que repercuten directamente en los tipos de registros (continuos, escalas o rampas de potenciales) y sus análisis (paso **D** y **E**).

Finalmente se hizo una variación en el protocolo (5.3.5), pero los registros con esta metodología fueron preliminares.

5.1 Disección y disgregación de retina de mosca

El proceso de disección de ojos de mosca y disgregación de las retinas (pasos **A** y **B**) fue uno de los primeros pasos en ser resueltos. De estos dos primeros pasos depende si se encuentran omatidios disociados y la calidad de los rabdómeros a estudiar. Es importante recalcar que por cada preparación, con un promedio de cuatro ojos disgregados, difícilmente se encontraron más de 3 células fotorreceptoras con los rabdómeros expuestos, aptos para realizar los registros.

5.2 Formulación de soluciones de registro

La formulación de soluciones intracelulares y extracelulares utilizadas para los experimentos electrofisiológicos, fueron los protocolos que más requirieron de modificaciones a lo largo de la memoria debido a dos razones: La primera fue mejorar la sobrevivencia de las células al estrés de la disgregación mecánica (paso **B**), ya que con esto conseguiría mejorar las probabilidades de encontrar omatidios parcialmente abiertos que expusieran los rabdómeros, considerando la dificultad natural para obtener omatidios que expusieran sus rabdómeros. La segunda razón fue adecuar las soluciones a los requisitos de los experimentos, los cuales también fueron cambiando según las necesidades. El orden lógico de los cambios de soluciones van de la mano con los protocolos experimentales (paso **D**) y los objetivos de los registros (paso **E**).

5.2.1 Soluciones con iones divalentes y sin iones divalentes

En un principio, para obtener células más viables y que pudieran sobrevivir al proceso de disgregación, se trabajó con solución intracelular normal con iones divalentes. Si bien estaba demostrado que la presencia de los iones divalentes eran capaces de bloquear al canal, se prefirió experimentar con una solución ya probada en omatidios para entrenar el proceso de disgregación y después realizar futuras modificaciones (Delgado y Bacigalupo, 2009). Se optó trabajar con un stock de 100 ml de solución sin iones divalentes y al final se agregaba las soluciones de $MgCl_2$ y $CaCl_2$, al momento de realizar los ensayos. A la solución extracelular se le suprimió los cationes divalentes y se agregó 2 mM de ATP para metabolizar el DAG presente en las membranas por acción de la DGK (Hardie y cols., 2002), tal como estaba establecido en el trabajo de Delgado y Bacigalupo (2009).

Solución intracelular con iones divalentes:

NaCl 120 mM; KCl 5 mM; $MgSO_4$ 8 mM; $CaCl_2$ 1,5 mM; L-prolina 25 mM; sacarosa 2,5 mM; HEPES 10 mM y ATP 2 mM, pH 7,15.

Solución extracelular sin iones divalentes:

NaCl 120 mM; KCl 5 mM; L-prolina 25 mM; sacarosa 2,5 mM; HEPES 10 mM, pH 7,15.

Después de haber completado la fase de aprendizaje se trabajó con soluciones sin iones divalentes de forma simétrica. En un principio se obtuvo parches, pero las células obtenidas estaban muy dañadas y seguían con poca separación de los rbdómeros. A raíz de estas observaciones se decidió modificar las soluciones suprimiendo los iones divalentes, con el objeto de mejorar las probabilidades de obtener registros de membrana rbdomérica, bajo la premisa de mejorar la posibilidad de encontrar los omatidios abiertos.

5.2.2 Solución intracelular y extracelular modificada

Luego de varias observaciones e intentos con las soluciones sin iones divalentes, se decidió hacer una nueva solución para trabajar con los rbdómeros. En

primer lugar se buscó simplificar las soluciones en cuanto a los iones presentes en la cámara y la pipeta, lo cual en teoría, permitiría una mejor interpretación de los resultados. Luego se formuló la solución mínima requerida para realizar registros de parches escindidos en membranas rantoméricas.

En un principio se suprimió la sacarosa, la L-prolina y el K^+ . Al suprimir el ión potasio, el único catión de las soluciones es el Na^+ . Al evitar un segundo catión, se puede descartar la interferencia en cuanto a la selectividad del canal y evitar interferencia por corriente de otros posibles canales catiónicos que no sean el canal TRP. Bajo esta perspectiva, se buscó asegurar que el Cl^- no interfiriera en los registros. Para evitar esto, se incorporó una gradiente de concentración de Cl^- 10 veces mayor en la pipeta (120 mM de Cl^-) respecto la cámara (12 mM de Cl^-). Con esta gradiente se pudo establecer el potencial de inversión del Cl^- a -58 mV. Si se aplica un potencial de V_p de 58 mV, se esperaría que una corriente de Cl^- fuera suprimida y a un $V_p = 0$ mV, se esperaría que la gradiente de cloruro fuera suficiente para producir una corriente de salida. Para lograr esta gradiente, se agregó en la solución intracelular aspartato de sodio, como anión no permeable.

Solución Intracelular modificada 12 mM Cl^- :

NaAsp 108 mM; NaCl 12 mM; HEPES 10 mM; 2 mM ATP, pH 7,15.

Solución extracelular modificada 120 mM Cl^- :

NaCl 120 mM; HEPES 10 mM, pH 7,15

Los resultados obtenidos con estas soluciones no fueron los esperados, ya que después de la disgregación mecánica, las células no estaban en buenas condiciones para ser registradas. De los pocos registros que se logró hacer, la mayoría de los sellos se rompían a los pocos minutos de aplicar el potencial. Este defecto en la solución se atribuyó a la baja osmolaridad de las soluciones, la cual estaba cerca de los 230 mOsm. Se optó por aumentar la osmolaridad a 290 mOsm, ya que los omatidios se mantienen en esta solución por casi una hora, desde que se disgregan hasta que se realizan los experimentos. Se continuó con los ajustes anteriores, salvo que se restituyó la L-prolina y la sacarosa para aumentar la osmolaridad.

5.2.3 Solución intracelular A + B

De las observaciones anteriores se deduce que la baja osmolaridad podría ser perjudicial para conservar la integridad de las células fotorreceptoras. Sin embargo, una ligera baja en la osmolaridad podría favorecer la exposición de los rabadómeros, como se aprecia en la solución sin iones divalentes (con menos de 270 mOsm). Por esto se formuló una solución de cámara que estuviera compuesta en dos partes: Una para la disgregación de omatidios a baja osmolaridad y otra para agregar a la cámara y poder registrar con osmolaridad normal y ATP. La solución para disgregar omatidios (solución A) constituiría el 80% del volumen, mientras que el 20% restante sería agregado con el ATP al momento de registrar. La L-prolina agregada a la solución B y a la nueva solución extracelular fue determinada experimentalmente, para que la suma de la solución A y la solución B resultaran en una solución de 290 mOsm a pH 7,15.

Solución intracelular A:

NaAsp 108 mM; NaCl 12 mM; HEPES 10 mM, pH 7,15.

Solución intracelular B:

L-prolina 51 mM; sacarosa 2,5 mM; ATP 2 mM.

Solución extracelular:

NaCl 120 mM, HEPES 10 mM, L-prolina 53 mM, sacarosa 2,5 mM, pH 7,15.

Con estas soluciones no se obtuvieron registros estables. A esto se suma que los valores de pH medidos al mezclar la soluciones A y B variaba en cada experimento. Por estas dificultades, pese a mantener los omatidios disociados estables, se optó por descartar la solución de cámara compuesta (solución A + B)

Finalmente, se decidió volver a la formulación tradicional de una única solución intracelular o de cámara. Para este nuevo ajuste, se conservó el aumento de L-prolina para la solución intracelular y extracelular, debido a la mejora para obtener parches escindidos y preservar la integridad de las membranas.

5.2.4 Solución intracelular y extracelular equilibradas en osmolaridad y pH

Para evitar los problemas de reproducibilidad y baja de pH como los observados en la solución de cámara compuesta (solución A + solución B), se agregó ATP 2 mM a una nueva solución intracelular sin iones divalentes, a la cual se agregó L-prolina 51 mM y luego se ajustó el pH. Para poder almacenar la solución y evitar la hidrólisis del ATP producto de la temperatura, se procedió a congelar la solución en alícuotas de 1 mL. Se optó por congelar y arriesgar a que parte del ATP se hidrolice, antes que perder el control sobre el pH (4.2.4 Soluciones).

Al probar estas soluciones, se pudo observar una mejora considerable en la calidad de las membranas y su turgencia, lo cual lleva a pensar que tanto el pH como la osmolaridad juegan un rol importante en la conservación de las membranas en nuestra preparación. Esta mejora también nos permitió obtener parches aislados más estables, lo que permitió aumentar la duración de los registros. Finalmente, esta fue la solución utilizada en la mayoría de los experimentos presentados en esta tesis.

5.2.5 Soluciones con baja concentración de Ca^{2+}

Después de acumular un número considerable de registros, se constató que la actividad registrada en ellos, en su mayoría estaba constituido por transiciones incompletas y poco definidas. Una posible causa fue que el Ca^{2+} contaminante en el agua, el cual no supera los 20 μ M, podría ser suficiente para bloquear al canal abierto (OCB), antagonizando la acción de los PUFAs. Como se demostró en el trabajo de Parnas, el aumento de la concentración de Ca^{2+} es capaz de bloquear el canal TRPL, aún en presencia de PUFAs (Parnas y cols., 2009).

Para esto se formularon soluciones con 100 nM de Ca^{2+} libre tamponado con EDTA, contemplando la presencia de ATP, Mg^{2+} y un quelante de cationes divalentes como EDTA. Para ésto se formuló una solución tamponada para Ca^{2+} , que tendría 100 nM de Ca^{2+} libre y sería capaz de quelar el exceso de calcio contaminante del agua y mantenerlo por efecto del tamponamiento de la solución en un el rango de 100 nM. Se cálculo el $CaCl_2$ necesario para la solución tamponada con el programa MAXCHELATOR 32 para determinar el Ca^{2+} libre teórico en presencia de ATP, Mg^{2+} y

EDTA. El CaCl_2 fue agregado en forma de solución 100 μM . Para estas soluciones se suprimió la gradiente de cloruro.

Solución de Intracelular, $[\text{Ca}^{2+}]$ libre 100 nM:

NaCl 120 mM; HEPES 10 mM; L-prolina 51 mM; sacarosa 2,5 mM; ATP- Mg^{2+} 2 mM; EDTA 1,25 mM; 36,5 μl de CaCl_2 100 μM , pH 7,15.

Solución de extracelular, $[\text{Ca}^{2+}]$ libre 100 nM:

NaCl 120 mM; HEPES 10 mM; L-prolina 51 mM; sacarosa 2,5 mM; EDTA 1,25 mM; 232,5 μl de CaCl_2 100 μM , pH 7,15.

Para probar si el Ca^{2+} contaminante de las soluciones era el responsable de la inestabilidad de los registros, se procedió a utilizar una segunda pipeta conectada a un Picospritzer para exponer a parches escindidos de membrana rabdomérica a soluciones de prueba (ver 5.2.5).

Para esto, la disgregación de los omatidios fue hecha en solución extracelular sin agregar iones divalentes (solución que contiene sólo el calcio contaminante, estimado entre 0 y 20 μM), ya que al probar la disgregación de los omatidios en solución de Ca^{2+} 100 nM, fue muy difícil establecer el sello y encontrar membranas aptas para hacer los parches. Esto se debió posiblemente a que las membranas celulares no resistieron bien la baja concentración de calcio. La pipeta de registro contenía una solución de Ca^{2+} 100 nM con los PUFAs a probar. Una vez obtenido el parche escindido, se posicionó la segunda pipeta enfrentando al lado intracelular del parche y se aplicó un puff de solución intracelular bajo en Ca^{2+} de esta pipeta por la duración del registro, para así establecer una condición tanto del lado intracelular como extracelular del parche de 100 nM de Ca^{2+} .

Los registros obtenidos por este método no demostraron tener una mejor definición en las transiciones de los canales, lo cual, considerando la mayor complejidad de este procedimiento, nos llevó a descartar este método y volver a las soluciones formuladas en 5.2.4.

5.3 Parches escindidos de rbdómeros

La formación de parches escindidos (etapa **C**) es crítica para los experimentos requeridos para este trabajo. Esta etapa está principalmente determinada por la práctica y buena calidad de las micropipetas para lograr registros de canal único.

5.3.1 Capilares y electrodos de vidrio

Para lograr estudiar canales únicos en membranas rbdoméricas, originalmente se estiraron capilares con dos estiradores verticales de pipetas diferentes: Vertical Pipette puller modelo 700C y PC-10. Para esto fue necesario fijar la temperatura del primer y segundo estiramiento y la distancia a elongar en el primer estiramiento, para obtener las micropipetas de punta muy fina y resistencia de punta entre 50 y 100 M Ω . En un comienzo se utilizó el puller modelo 700C, pero no fue posible obtener micropipetas de más de 20 M Ω , lo que significa que el diámetro de la punta es demasiado grande para registros de microvellosidades.

Por esto, se cambió al estirador vertical PC-10, capaz de estirar capilares más angostos y con mayor reproducibilidad. Junto con este cambio, se utilizaron capilares de vidrio pequeños de aproximadamente 0,8 mm de diámetro interior y aproximadamente 1 mm de diámetro exterior. Los primeros capilares de borosilicato utilizados fueron de marca Hilgenberg (Nº catálogo 1403710) y finalmente se utilizó los capilares Warner (Nº catálogo 64-0777). Con estos últimos se logró obtener micropipetas de un promedio de 70 M Ω , que permitían una buena adhesión a las membranas rbdoméricas. Sin embargo, los parámetros utilizados requerían de altas temperaturas, las cuales no son recomendadas para el cuidado del filamento del puller. La deformación de un filamento cambia la capacidad de calentar de forma homogénea y altera los parámetros de estiramiento de pipetas, lo que obliga a buscar nuevos parámetros para mantener la reproducibilidad de las micropipetas. Otra dificultad observada de los estiradores verticales es que el electrodo que queda sujeto por arriba del filamento en el segundo estiramiento, en ocasiones estaba desformado. Esto se debió a que el electrodo que se estira por arriba del filamento en el segundo estiramiento, está expuesto al calor del filamento por más tiempo, lo que en algunos

casos terminaba por deformar la micropipeta, alargarla o incluso alterar la resistencia de las pipetas.

5.4 Modalidad de experimentos

Una vez resueltas las dificultades para obtener parches escindidos de membranas rabdoméricas, fue necesario ajustar el protocolo experimental (etapa **D**) para estudiar el fenómeno (etapa **E**). Junto con el cambio de las soluciones, los cambios más importantes realizados en estos experimentos fueron los parámetros de los registros. Por parámetros de los registros se entiende el tiempo registrado, la forma en que se estimularon los parches y los rangos de potencial aplicados.

5.4.1 PUFAs aplicados por el electrodo de registro y registro de 14 segundos

Los primeros experimentos realizados se basaban en la propiedad de los PUFAs de ser activos tanto por la cara intracelular como la extracelular de la membrana. Por esto, se aplicaron los PUFAs directamente desde el electrodo de registro para así iniciar la estimulación con los lípidos en el momento en que se estableciera el contacto entre la membrana el electrodo. Los primeros registros que se realizaron fueron ensayos de prueba de 14 segundos, utilizando el programa FETCHEX 5.5 de pClamp. Se aplicaron potenciales de electrodo (V_p) en el rango de -90 a +90 mV.

Esta metodología demostró no ser eficiente, ya que fue necesario esperar varios minutos antes de observar una diferencia en la actividad de los canales, y cuando esto ocurrió, consistió en un grupo de eventos separados por períodos silentes de actividad. Por otra parte, el momento en que ocurría un grupo de eventos, estos podían extenderse durante más de 50 segundos, perdiendo la posibilidad de registrarlos en una ventana de tiempo tan pequeña, sin tener que parcelar en varios registros ni perder puntos entre éstos. Dado que los eventos eran esporádicos y muchos de ellos tenían una duración superior a 14 segundos, existían dos opciones: Hacer registros más cortos probando una amplia escala de potenciales o hacer registros más largos y probar por separado los distintos potenciales, para así tener la posibilidad razonable de hallar actividad de los canales. Se optó por la primera

alternativa, de esta forma se pudo ensayar varios potenciales en un sólo barrido al momento de observar actividad de canales por el osciloscopio. Nuestro objetivo inicial era realizar curvas corriente/voltaje de los canales estimulados a distintas concentraciones de PUFAs. Se debe agregar que análisis posteriores determinaron que los registros tomados en ventanas de tiempo de 14 segundos eran muy breves para medir la cinética, aparte que no permitían apreciar con facilidad los cambios en el tiempo por los potenciales probados.

5.4.2 Ensayo de escalas de potencial

Debido a las dificultades mencionadas para probar el rango deseado de potenciales para establecer la relación corriente/voltaje en los periodos de actividad del canal, se optó por usar un protocolo de familias de pulsos. Para esto, se configuró el programa Clampex 5.5, que permite entregar los potenciales requeridos. Se configuró un protocolo de nueve barridos de 1,5 segundos separados por 250 ms a 0 mV. El primer pulso fue de -70 a -80 mV, y los siguientes se incrementaron en 20 mV por barrido hasta alcanzar 80 mV en el último.

El principal problema de estos registros fue su baja resolución, donde la frecuencia de muestreo disminuyó de 50 μ s a 100 μ s. A frecuencias de muestreo más bajas se observó que los eventos perdían resolución, volviendo los estados de transición más imprecisos. La poca claridad de los eventos, se suma a la baja probabilidad de encontrar los canales abiertos en los 9 barridos del experimento, donde muy pocos registros alcanzaron este objetivo. A las dificultades anteriores, se suma que los intervalos de tiempo cortos por barrido impiden hacer un análisis de P_o concluyente debido al número insuficiente de eventos. Por esta razón se optó por cambiar la forma de realizar los experimentos, buscando combinar lo mejor de los dos métodos previos para determinar el P_o .

5.4.3 Escala de potencial y registros continuos con pulso de luz

Con la intención de mejorar el diseño experimental, probamos qué elementos podrían estar generando dificultades en los registros. En primer lugar, debido a la poca duración de los parches observados en los registros anteriores, se disminuyó la

magnitud de los potenciales aplicados en los experimentos para evitar dañar las membranas, cambiando el rango de los V_p aplicados de -80 a +80 mV, a -60 a +40 mV. Por otra parte, se estudió la posibilidad que la luz del microscopio pudiera estar afectando la capacidad de respuesta de los parches. Si bien las membranas aparte de estar escindidas de la célula fotorreceptora, se encontraban en presencia de ATP, lo cual inhibe la respuesta a la luz (Delgado y Bacigalupo, 2009), se verificó que los parches expuestos a solución intracelular con ATP, en presencia de luz ambiental o en oscuridad se comportaran de la misma forma. Tal como se esperaba, en los registros de parches escindidos, no se observaron cambios por la presencia de luz ambiental. Como control de los experimentos, se intentó probar los efectos de la luz ambiental en los registros adosados a la célula, pero en estas condiciones no se obtuvo respuesta. Probablemente la intensidad de la luz era muy elevada y muy prolongada como para generar un efecto controlado y reproducible en el experimento.

Para confirmar esta suposición, se decidió registrar como control a la célula adosada a la pipeta en oscuridad y luego estimular con un pulso manual de luz de un intervalo de tiempo e intensidad reproducible (figura 9). Para este propósito se construyó un circuito capaz de entregar pulsos de luz de 50 ms activándolo manualmente. La luz producida por el LED fue atenuada en dos unidades logarítmicas por un filtro de densidad neutra. Con la precaución de controlar el tiempo y la intensidad, conseguimos generar un estímulo reproducible. A estos controles de célula adosada, siguieron los registros de parche escindido, los cuales se realizaron por un periodo de 6 minutos a $V_p = +40$ mV. Con esto se logró estimular los parches y facilitar la incorporación de lípidos en la membrana, evitando dañar los sellos por valores de potencial excesivos.

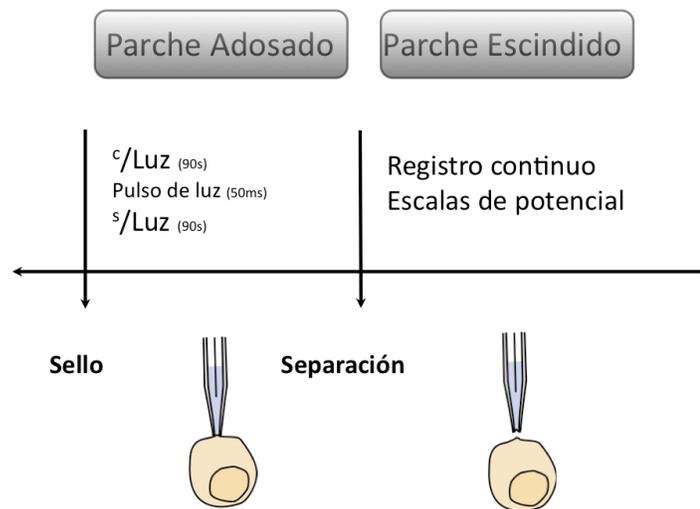


Figura 9: Protocolo experimental con pulsos de luz

El protocolo consiste en registrar un control de la activación de los canales por luz, al registrar con la pipeta adosada a la célula, para luego escindir el parche y realizar registro continuo durante unos 300 segundos y escala de potenciales para graficar la curva I/V del canal.

Los experimentos con pulsos de luz, mientras el electrodo estaba adosado a la célula, no dieron resultados, excepto en un caso donde se aprecia una actividad retardada respecto al estímulo. Esto se puede deber al estado de la célula fotorreceptora después de la disgregación, el efecto de los PUFAs en el mismo electrodo de registro y a la diferencia con las soluciones utilizadas en el trabajo de Delgado y Bacigalupo (2009), donde había K^+ tanto intracelular como extracelular. Por otra parte, mientras se realizan controles de estimulación por luz, uno pierde la posibilidad de estudiar otros fenómenos relevantes al inicio del experimento, como por ejemplo el determinar el tiempo que demora el inicio de la actividad inducida por los lípidos. Es por esto que se decidió eliminar el pulso de luz sobre la célula adosada, para estudiar directamente los parches escindidos y así registrar el tiempo de incorporación de los lípidos y sus efectos inmediatos.

5.4.4 Registros continuos a potencial constante

Los resultados obtenidos por la aproximación anterior obligó a favorecer los análisis de fracción de tiempo abierto (P_o) y tiempo de inicio de la respuesta por los PUFAs por sobre los controles de estimulación por luz. Por esto se suprimieron los registros controles, con el electrodo adosado a la célula, para así priorizar los registros continuos a potencial constante en rangos de 3 a 6 minutos. Estos registros tendrían prioridad por sobre las escalas de voltajes de barridos cortos. Además, con el fin de reducir el tiempo de registro y aumentar la eficiencia en cuanto a probar un número mayor de potenciales diferentes en una ventana de tiempo, se probó cambiar el protocolo de escalas de potencial por una rampa de potencial, ya que el primero tomaba más tiempo en registrar un número finito de potenciales mientras el segundo barre de forma continua el rango de potencial deseado en un tiempo muy breve (figura 10).

Este cambio gradual del potencial sobre los canales permitiría reducir aún más el tiempo de registro. Sin embargo, la baja fracción de tiempo abierto y frecuencia de muestreo no eran compatibles con las rampas. Por esto, los registros adquiridos con distintos potenciales se realizaron con una duración de hasta seis minutos.

Estos registros de larga duración, permitieron abrir una nueva dimensión en los análisis, que fue el estudiar los estallidos de actividad (EA) y el inicio de la respuesta. Pese a la continua estimulación con los PUFAs en el electrodo de registro, el canal no se encuentra siempre activo, lo que dificultó las mediciones de P_o . El estudio del número de EA (“*burst*”), su duración y su actividad (P_o) por registro nos proporciona una información hasta ahora ignorada. Por otra parte, al suprimir el control con pulsos de luz y definir el tiempo de inicio del registro con la escisión del parche, se puede determinar la latencia de la respuesta para los diferentes PUFAs a distintas concentraciones.

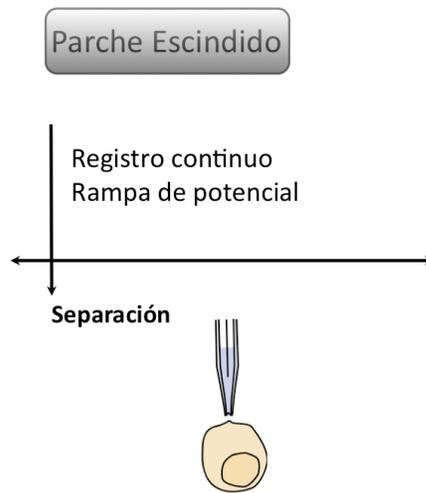


Figura 10: Protocolo experimental de registro continuo

El protocolo consiste en registrar el parche escindido y realizar registro continuo durante unos 180 segundos a V_p de -40 a +60 mV. Se probaron también rampas de potencial cuando existían eventos de alta actividad.

Pese a todas las ventajas expuestas, el problema de esta aproximación experimental es que, al estar los parches siempre expuestos a un estímulo a través de la pipeta de registro, no se puede llevar a cabo un registro control de la actividad de los canales en el mismo parche sin los PUFAs. Tampoco se puede estudiar si existe una saturación de la respuesta, inactivación de los canales, o si el mismo parche se deteriora y pierde efectividad en la respuesta. Pero, por sobre todo lo mencionado, el problema más serio es la variación del P_o de los registros obtenidos y las múltiples transiciones registradas en un mismo parche. Esto nos hace sospechar que existe una gran variación en el número de canales por parche, pese a que cada experimento está registrado con el mismo tipo de pipeta. Esta variabilidad impide hacer estudios de P_o concluyentes.

5.4.5 Ensayos con lípidos aplicados con una pipeta externa

El problema de igualar el número de canales y la ausencia de controles por parche, llevó a idear un tipo de experimento que permitiera registrar la actividad de un parche escindido en un estado basal y luego sobre el mismo parche registrar los efectos de las diferentes concentraciones de PUFAs sobre la actividad (un antes y un después), para así poder comparar la actividad de la misma población de canales (nPo) con distintos estímulos. Al conservar el número de canales en diferentes condiciones experimentales, podemos calcular el cambio en el Po del canal. Para lograr esto se cambió la estrategia experimental, teniendo por separado un electrodo de registro y una pipeta de tres cañones con tres concentraciones de lípidos diferentes. Esta pipeta presentadora de agonistas fue controlada mediante un Picospritzer con 3 salidas reguladas manualmente. De esta forma se pudo realizar un control del parche escindido y luego probar los diferentes estímulos en el tiempo de registro. Con esta configuración también se pudo realizar registros viables a bajas concentraciones de Ca^{2+} , como se explica más arriba en la formulación de las soluciones (5.2.5).

Condiciones del registro

Pipeta de estímulo: Solución intracelular sin iones divalentes + PUFAs + ATP 2 mM

Pipeta de registro: Solución extracelular sin iones divalentes

Solución de la cámara: Solución intracelular sin iones divalentes

Pese a las dificultades técnicas que conlleva la coordinación de dos pipetas sobre un mismo parche y su frecuente ruptura al ser sometido a la presión del baño de solución, se logró hacer registros para dos de los PUFAs estudiados (AA y LNA) a tres concentraciones diferentes sobre el mismo parche. Sin embargo, es necesario aumentar el número de registros de estos experimentos para poder afirmar que existe una diferencia en las nPo registradas en los tres estímulos crecientes en concentración y si existe un efecto de saturación a la respuesta de los PUFAs.

5.5 Análisis de los Registros

Con el fin de esclarecer las diferencias entre los efectos obtenidos por los PUFAs, se procedió cuantificar los siguientes parámetros:

a) *Inicio de la respuesta*: Se contó el tiempo desde que se escinde el parche de la membrana rabdomérica hasta que se observa la primera actividad del canal. En la mayoría de los casos, este tiempo era superior a dos minutos.

b) *Picos y eventos*: Mediante un histograma de distribución de la amplitud de los niveles de corrientes, se determinó cuáles son los niveles más estables en el registro en los distintos potenciales.

c) *Curva I/V*: A partir de los eventos de los histogramas anteriores se graficó la magnitud de las conductancia en relación a los potenciales probados.

d) *nPo*: Se define como la fracción de tiempo abierto para uno o más canales, donde “n” es el número de canales en el parche. Se optó por esta interpretación, dado que en muchos registros no se pudo determinar el número total de canales que permite determinar la fracción de tiempo abierto de canales unitarios (Po).

e) *Estallido de actividad (EA)*: Debido a que los registros no presentaron una actividad constante, sino más bien esporádica, se optó por trabajar con los estallidos de actividad: Agrupación de eventos individuales que se repiten en una ventana de tiempo, distinguibles de la actividad continua y la actividad de eventos individuales aislados. Se midió la duración y el número de EA por registro. De acuerdo a su duración, se clasificaron en estallidos largos y cortos. Se calculó el nPo de los estallidos de actividad utilizando una ventana de tiempo mínimo de 10 segundos.

De los análisis propuestos, sólo la fracción del tiempo abierto de la población de canales (nPo) y los tiempos de inicio de la actividad pudieron ser estudiados de forma satisfactoria. Debido a la alta dispersión de las fracciones de tiempo abierto obtenida de los EA, y la dispersión de las amplitudes de corriente registradas a distintos potenciales, se excluyeron las curvas I / V y los EA.

Finalmente, los análisis estadísticos realizados fueron la media y dispersión de los grupos de datos. En caso de que hubieran valores extremos (“*outliers*”), se trabajó con el método de Dixon para descartar esos puntos.

6. Resultados

Los experimentos realizados en esta memoria de título tuvieron por objetivo determinar una relación entre la dosis y la respuesta de agonistas propuestos del canal TRP y relacionar la eficiencia de estos compuestos con el número de insaturación de la cadena alifática. Para estos análisis se agruparon los resultados de las dos metodologías más productivas, que fueron los ensayos con PUFAs en la solución del electrodo de registro y la aplicación de PUFAs por medio de una segunda pipeta por el lado intracelular de los parches escindidos. Los resultados aquí expuestos, comparan los niveles de activación inducidos por LA y LNA. Con AA se logró realizar únicamente experimentos exploratorios.

6.1 Registros de canal único de parches escindidos de rabadómeros

El primer objetivo fue obtener registros de canal único de membranas rabadoméricas en las cuales se ensayó los efectos de LA y LNA, en un rango de concentración entre 2 y 35 μM . Los registros de LA a concentraciones por debajo de 10 μM presentaron amplitudes de corriente difíciles de distinguir del ruido. En base a este antecedente, para las comparaciones entre LA y LNA se seleccionaron registros a 10, 25 y 35 μM .

En los registros de LA (figura 11) y LNA (figura 12), se observa un incremento en el nPo, a medida que aumenta la concentración de PUFA. Para el caso de LA y LNA se aprecia que a igual concentración, LNA presentan mayores amplitudes de corrientes. Este último punto es difícil de probar ya que se desconoce el número de canales por parche, y por ende, se desconoce el número de transiciones y niveles posibles en cada registro. Pese a esta dificultad, la mayoría de los registros reflejan esta tendencia.

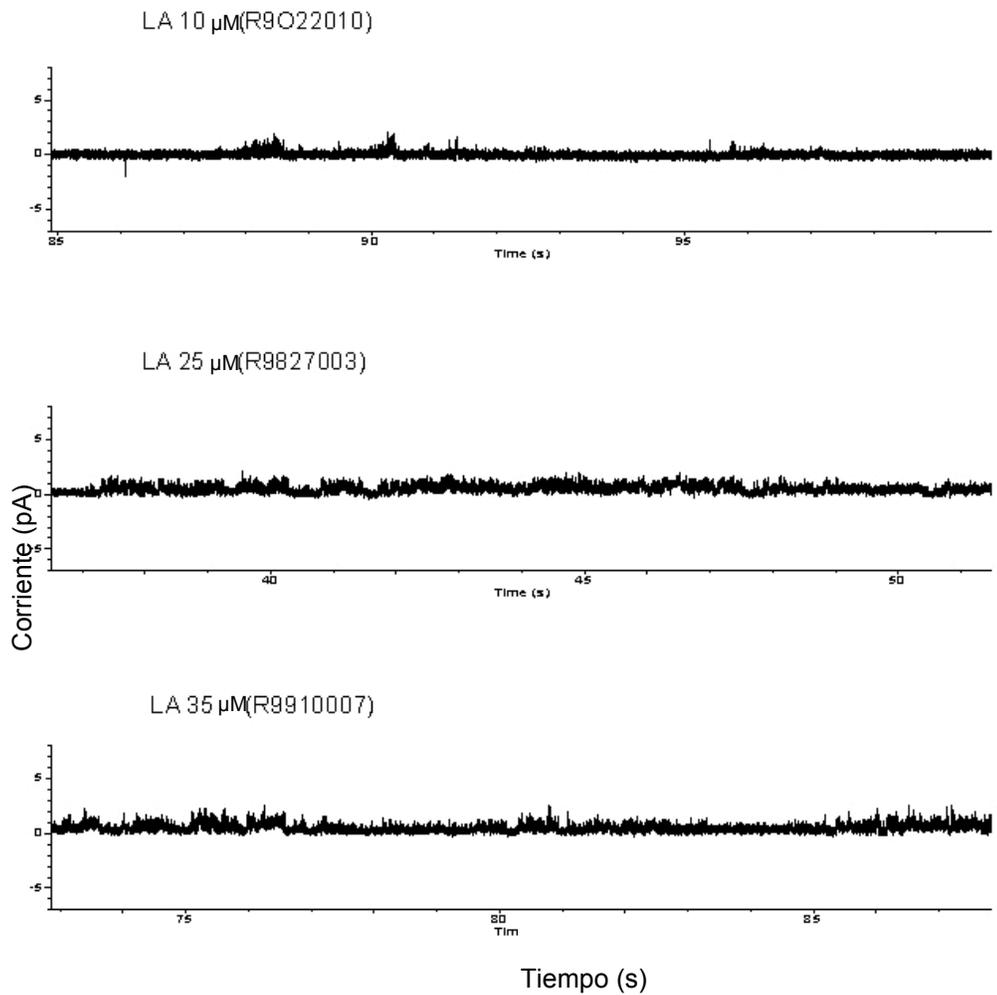


Figura 11: Comparación de registros expuestos a LA a 10, 25 y 35 μM
 Trazos representativos de los registros de parches escindidos expuestos a LA. En 0 pA se establece la línea base del registro, donde el o los canales están cerrados. Todos los eventos por sobre el 0 son efecto de la conducción de los canales TRP.

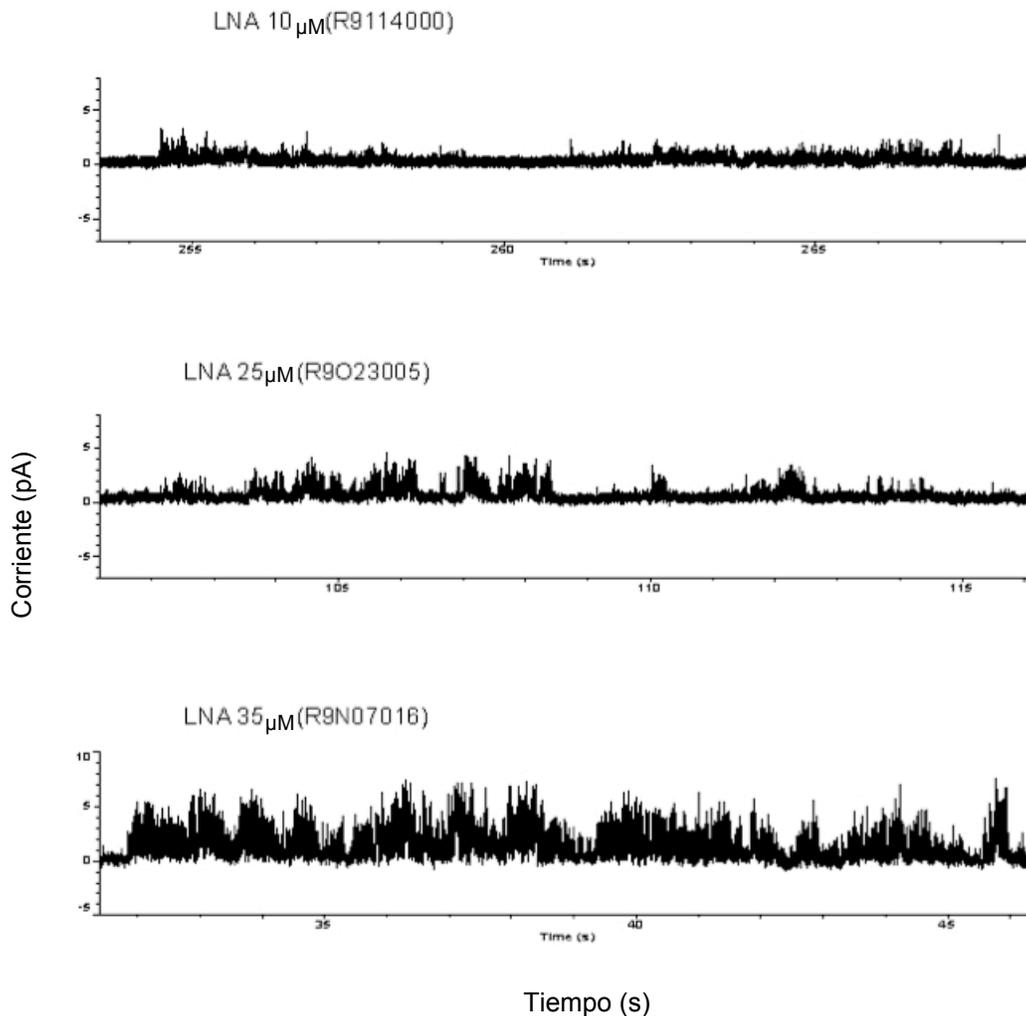


Figura 12: Comparación de registros expuestos a LNA a 10, 25 y 35 μM

Trazos representativos de los registros de parches escindidos expuestos a LNA. En 0 pA se establece la línea base del registro, donde el o los canales están cerrados. Todos los eventos por sobre el 0 son efecto de la conducción de los canales TRP.

6.2 Respuesta dosis dependiente en registros de canal único

De 52 experimentos elegidos por su actividad, se seleccionaron 16 parches expuestos LNA y 8 expuestos a LA, los cuales fueron utilizados para realizar los estudios de nPo (fracción de tiempo abierto para uno o más canales) y la latencia de la actividad.

Los registros seleccionados para las condiciones de LNA y LA mostraron un incremento en el nPo respecto a la concentración y al número de insaturaciones de los lípidos aplicados. Si bien la dispersión de los registros no permitió establecer una dosis dependencia con una significancia estadística entre los distintos agonistas, los registros activados por LNA presentan un mayor nPo a igual concentración que el LA, por lo cual resulta ser un mejor agonista (tabla 1). Esta observación apoya la idea que hay un efecto de la estructura molecular de estos lípidos, donde la mayor activación la ejerce el ácido graso con más insaturaciones. El gráfico de la figura 13 presenta la relación entre el nPo respecto a la concentración de LA y LNA (figura 13 A y B).

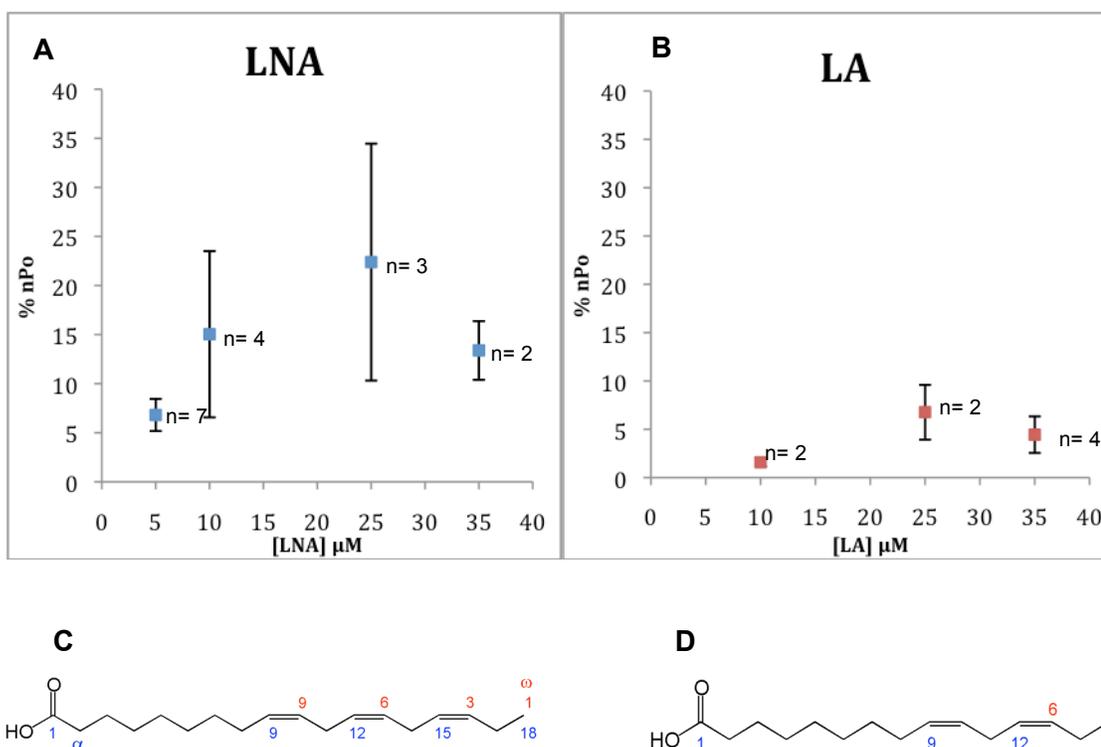


Figura 13: Dispersión del nPo de la actividad inducida por LNA y LA, en función de su concentración

A) Gráfico de nPo y rango de concentración de LNA en μM . **B)** Gráfico de nPo y rango de concentración de LA en μM . **C)** Estructura química del LNA (C18:3). **D)** Estructura química del LA (C18:2). “n” representa el número de experimentos por punto y el error estándar (SE) se representa en forma de barras.

Debido a la baja dispersión en sus puntos a 25 μM (n= 2) y 35 μM (n= 4), la tendencia más clara en el aumento de actividad se aprecia en los registros obtenidos en LA. Los registros de LNA, pese a tener una mayor dispersión, poseen valores de nPo superiores a los alcanzados por LA. Esta tendencia se puede ver al comparar el nPo de LNA a 5 μM (n= 7), en el cual los valores obtenidos son sólo igualados por LA a 25 μM (n= 2) ó 35 μM (n= 4) de LA.

Esta afirmación apoyaría la hipótesis de que la estructura química de los PUFAs, a nivel de insaturaciones en la cadena alifática, pueden modular en forma diferencial la activación de los canales TRP en los parches de membrana rdbomérica de la misma forma que esperaríamos a que modularan un canal mecanosensible.

Tabla 1: nPo del canal TRP según la concentración de PUFAs

PUFAs [μM]	% nPo	SE	N
LNA 5	6,8	4,0	7
LNA 10	15,0	14,7	4
LNA 25	22,4	17,0	3
LNA 35	13,4	2,9	2
LA 10	1,5	0,4	2
LA 25	6,7	2,8	2
LA 35	4,4	3,3	4

PUFAs [μM]: Lípido aplicado y concentración. **% nPo:** Porcentaje de la fracción de tiempo abierto para uno o más canales **SE:** Error estándar. **N:** Número de experimentos por condición

6.3 Tiempo de inicio de la respuesta

Una característica común en los registros obtenidos fue la latencia en el tiempo de inicio de la respuesta. Estos tiempos fueron similares para ambos ácidos grasos, la cual disminuyó según la concentración de PUFAs aplicada (tabla 2). Sin importar la metodología de estimulación, la latencia de la actividad observada fue en promedio superior a 120 segundos. Si bien para establecer con propiedad dichas diferencias será necesario un grupo de valores más robusto.

Tabla 2: Tiempo de inicio de la actividad inducida por PUFAs

[PUFAs] μM	Ti (s)	SE	N
LNA 5	357,5	142,9	6
LNA 10	378,8	123,8	4
LNA 25	327,9	182,6	2
LNA 35	124,7	155,2	2
LA 10	367,8	181,6	4
LA 25	160,5	4,8	3
LA 35	381,1	119,5	5

PUFAs [μM]: Lípido aplicado y concentración. **Ti (s):** Latencia de la respuesta. **SE:** Error estándar. **N:** Número de experimentos por condición

7. Discusión

En este trabajo se estudió el cambio de actividad inducida en el canal TRP por dos ácidos grasos con igual número de carbonos y diferentes grados de insaturación. La evidencia presentada en este trabajo concuerda con los resultados de otros investigadores en los canales TRP (Chyb y cols., 1999; Parnas y cols., 2009) y con las observaciones realizadas en canales mecanosensibles activados por PUFAs. En estos últimos canales, el número de insaturaciones de la cadena alifática juega un rol importante en su activación (Patel y cols., 2001).

Si bien se observa un aumento en la actividad de canales de los parches escindidos a medida que se incrementa la concentración y el número de insaturaciones de los PUFAs aplicados, los resultados obtenidos no permitieron medir los cambios de actividad en función de la fracción de tiempo abierto de canal único (P_o), para evaluar de forma cuantitativa la modulación ejercida por estos PUFAs. Esto se debió a la dificultad para precisar el número de canales en cada parche, las transiciones incompletas donde no fue posible establecer con claridad un estado abierto definido y su actividad irregular en el tiempo. Estas características nos permitieron estudiar sólo el nP_o de los registros, donde la variación del número de canales en los parches ejerce un efecto considerable en este parámetro, lo cual se refleja en la dispersión de los datos presentados. Sin embargo los resultados muestran una visible diferencia entre la activación de los parches por LA y LNA, así como una tendencia al incremento en la actividad en función de la concentración de lípidos, especialmente en el caso del LA. La similitud de los valores obtenidos a 25 y 35 μM de LNA sugiere que se ha alcanzado la saturación de la curva. Sin embargo, se requieren más puntos para corroborar esta afirmación.

La dispersión en los datos, exigió adoptar una aproximación experimental diferente, donde los lípidos fueron presentados por medio de una segunda pipeta por el lado intracelular. La posibilidad de trabajar con pulsos controlados de los agonistas a estudiar, nos permite determinar con claridad el tiempo en que el parche entra en contacto con los PUFAs y poder ensayar múltiples concentraciones de lípidos en un

mismo parche, manteniendo el número de canales. Esto es crucial ya que al realizar un estudio de dosis respuesta se pueden obtener valores normalizados por el mismo número de canales y comparar la situación control antes de que sean aplicado los agonistas.

Pese a estas medidas, la amplitud de las corrientes observadas en los diferentes ensayos no fueron claras. Además del número indeterminado de canales, en los experimentos realizados con LA y LNA se aprecian transiciones incompletas que no alcanzan a resolverse. Esto nos hace suponer que la frecuencia de los eventos registrados es mayor a la frecuencia de recolección de las muestras de nuestros experimentos. Las transiciones graduadas e incompletas observadas en los registros y la demora en la respuesta observada a cada agonista probado también puede deberse a un mecanismo similar al observado en los canales mecanosensibles, como es el caso de los canales MscL activados por lípidos descrito por el grupo de Perozo (2002). En dicho trabajo, las membranas expuestas a altas concentraciones de lisofosfatidilcolina (LPC, 3 μ M para el caso del canal MscL) presentan un menor nivel de activación que el estado abierto alcanzado por la diferencias de presión, además de un inicio tardío en la respuesta medido en minutos. A esto se suma las observaciones hechas por el grupo de Minke con el canal TRP, donde las células transfectadas con este canal son capaces de bloquear la respuesta al LA cuando se expone a la toxina de tarántula GsMTx-4, un inhibidor de canales mecanosensibles. (Minke y cols., 2009).

Si bien la latencia de la actividad observada en los registros contradice el modelo de un mecanismo de transducción rápido como la visión (Hardie, 2008), los PUFAs son capaces de activar los mismos parches de membranas rabadoméricas que presentan una activación por la luz (Delgado y Bacigalupo, 2009), así como son capaces de activar canales mecanosensibles como el canal MscL (Perozo y cols., 2002). Esta paradoja podría explicarse si se considera que en el proceso natural de transducción, la transformación de los lípidos que están en el entorno del canal son los que inducen su apertura, mientras que la metodología utilizada introduce una variable adicional que es el tiempo que toma la incorporación del lípido disuelto en la membrana.

Las observaciones experimentales aquí recopiladas junto a los antecedentes, permiten proponer que el efecto de los PUFAs no sólo tienen un papel regulador sobre

el canal TRP de fotorreceptores de *Drosophila*, como fue propuesto por el grupo Minke durante el estudio de la liberación del OCB (*open channel block*), sino también un efecto en su activación dependiente de la concentración y el número de insaturaciones. Sin embargo, aún queda por resolver cuál es el mecanismo por el cual los PUFAs son capaces de activar al canal TRP.

8. Proyecciones

En este trabajo logramos recopilar observaciones que parecen ser congruentes con la hipótesis de que los PUFAs modulan la actividad del canal TRP, al igual que los canales mecanorreceptores sensibles a lípidos. Sin embargo, no fue posible llegar a confirmar ni descartar la hipótesis con los resultados obtenidos. Es por esto que propongo nuevos experimentos teniendo en cuenta los ya realizados y considerando nuevas formas de controlar y minimizar los problema encontrados.

En primer lugar, para normalizar el número de canales se debe continuar con el método de tener una segunda pipeta para poder aplicar un pulso al parche escindido por el lado intracelular con la solución de PUFAs. Las ventajas de tener un número conocido de canales en las distintas condiciones experimentales es poder establecer con claridad las condiciones del canal ante las distintas condiciones experimentales.

Un posible control para los parches escindidos es corroborar que los canales registrados son sensibles a cambios de presión osmóticas, como fue descrito por el grupo de Parnas (2009). Para esto se induciría un cambio de osmolaridad entre la solución intracelular y extracelular, ya que esto favorecerá la apertura del canal sin incorporar otros compuestos que puedan saturar la respuesta o ser lavados de la membrana. En caso de no trabajar con pulsos de luz, los cambios de osmolaridad prometen ser un buen control para corroborar que los canales en el parche son los canales TRP. Así se podría probar un estímulo control, de forma rápida y que no incorpore moléculas a la membrana.

Paralelo a esto, se podría evaluar el uso de otras moléculas aparte de las ya propuestas como posibles agonistas derivados del metabolismo del PIP_2 y, así probar la activación e inhibición por lípidos que favorezcan la curvatura de la membrana, como Lisofosfatidil etanolamida (LPE) y la Lisofosfatidilcolina (LPC) (Patel y cols., 2001). Una vez establecida la curvas de dosis respuesta para el LA, LNA y AA, se podría trabajar con sus isómeros *trans* y otros derivados como los monoacilgliceroles (MAG). Aparte de la activación, se podría buscar agonistas que permitan estabilizar el estado abierto

del canal o que reviertan el efecto de activación, como se expone en el trabajo del grupo de Perozo (Perozo y cols., 2002).

Una vez lograda la apertura del canal, se puede probar con inhibidores de canales mecanosensibles, como el GsMTx-4 (Minke y cols., 2009) y así observar si en parches de membrana rabadomérica se logra inhibir por completo la respuesta alcanzada por la distorsión de membrana o, si es sólo una inhibición parcial.

Finalmente, si los estados de apertura son definidos con claridad, el paso siguiente sería comprobar si existe sólo un cambio de sensibilidad de apertura del canal, una remoción del bloqueo del canal como propone el grupo de Minke, o si también existe activación del canal al exponer a un parche de membrana rabadomérica a DAG y PUFAs. Establecer esta diferencia nos permitiría comparar el comportamiento del canal TRP en su membrana nativa con otros canales mecanosensibles que son sensibles a lípidos.

9. Conclusiones

En este trabajo se logró cumplir los siguientes objetivos:

1.- Se logró obtener parches escindidos de rabdómeros y de ellos se realizaron registros de canal único del canal TRP.

2.- Se logró establecer que el nPo de los canales activados con LNA es mayor que aquellos activados con LA. Este efecto es dependiente de la concentración, pese a que no se pudo validar estadísticamente la relación entre la concentración y la actividad.

3.- Se aprecia una latencia en la actividad inducida por LA y LNA, de como mínimo 2 minutos, pero no se logró establecer una diferencia en la latencia de ambos PUFAs.

10. Bibliografía

Acharya JK, Jalink K, Hardy RW, Hartenstein V y Zuker CS (1997) InsP₃ receptor is essential for growth and differentiation but not for vision in *Drosophila*. *Neuron* 18: 881-887.

Anderson MP y Welsh MJ (1990) Fatty acids inhibit apical membrane chloride channels in airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(18): 7334-7338

Arendt D (2003) Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int. J. Dev. Biol.* 47: 563-571.

Bloomquist J, Shortridge RD, Schneuwly S, Perdew M, Montell C, Steller H, Rubin G y Pak WL (1988) Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, *norpA*, and its role in phototransduction. *Cell* 54: 723-733

Carrasco S y Mérida I (2007) Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem. Sci.* 32(1): 27-36

Christensen AP y Corey DP (2007) TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation?. *Nature Revi. Neurosci.* 8(7): 510-521

Chyb S, Raghu P y Hardie RC (1999) Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature* 397: 255-259

Delgado R y Bacigalupo J (2009) Unitary Recordings of TRP and TRPL Channels From Isolated *Drosophila* Retinal Photoreceptor Rhabdomeres: Activation by Light and Lipids. *J Neurophysiol* 101: 2372-2379.

Fink M, Duprat F, Lesage F, Reyes R, Romey G, Heurteaux C y Lazdunski M (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J.* 15(24), 6854–6862.

Hardie RC (2007) TRP channels and lipids: from *Drosophila* to mammalian physiology. *J.Physiol.* 578: 9-24

Hardie RC y Minke B (1992) The *trp* gene is essential for light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8: 643-651

Hardie RC, Peretz A, Suss-Toby E, Rom-Glas A, Bishop SA, Selinger Z y Minke B (1993) Protein kinase C is required for light adaptation in *Drosophila* photoreceptors. *Nature* 363: 634-637.

Hardie RC y Minke B (1993) Novel Ca²⁺ channels underlying transduction in *Drosophila* photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca²⁺ mobilization. *Trends Neurosci.* 16(9): 371-376.

- Hardie RC y Postma M** (2008) Phototransduction in microvillar photoreceptors of *Drosophila* and other invertebrates. Elsevier, The Senses: A Comprehensive Reference 1: 77-130.
- Hardie RC, Martin F, Cochrane GW, Juusola M, Georgiev P y Raghu P** (2002) Molecular Basis of Amplification in *Drosophila* Phototransduction: Roles for G Protein, Phospholipase C, and Diacylglycerol Kinase. *Neuron* 36 689–701.
- Hoffman T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T y Schultz G** (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397: 259-263.
- Hu Y y Schilling WP** (1995) Receptor-mediated activation of recombinant Trpl expressed in Sf9 insect cells. *Biochem. J.* 305: 605-611.
- Huang F , Matthies H, Speese S, Smith M y Broadie K** (2004) Rolling blackout, a newly identified PIP₂-DAG pathway lipase required for *Drosophila* phototransduction. *Nat Neurosci.* 7 (10): 1070-1078
- Karnovsky MJ, Kleinfeld AM, Hoover RL, Dawidowicz EA, McIntyre DE, Salzman EA y Klausner RD** (1982) Lipid domains in membranes. *Ann. NY Acad. Sci.* 401: 61-75.
- Katz B y Minke B** (2009) *Drosophila* Photoreceptors and Signaling Mechanisms. *Front. Cell. Neurosci.* 3: 1-18
- Kung C** (2005) A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature* 436: 647-654.
- Leung H, Tseng-Crank J, Kim E, Mahapatra C, Shino S, Zhou Y y An L** (2008) DAG Lipase Activity Is Necessary for TRP Channel regulation in *Drosophila* Photoreceptors. *Neuron* 58 (6): 884-896
- Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T y Zufall F** (2003) A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40: 551-561
- Lundbaek JA, Collingwood SA, Ingólfsson HI, Kapoor R y Andersen OS** (2010) Lipid bilayer regulation of membrane protein function: gramicidin channels as molecular force probes. *J. R. Soc. Interface* 7: 373-395
- Minke B y Selinger Z** (1996) The roles of trp and calcium in regulating photoreceptor function in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6(4):459-466.
- Maingret F, Fosset M, Lesage F, Lazdunski M y Honoré E** (1999) TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺ channel. *J Biol. Chem.* 274: 1381-1387.
- Montell C** (2005) TRP channels in *Drosophila* photoreceptor cells. *J.Physiol.* 567: 45-51.

- Niemeyer BA, Suzuki E, Scott K, Jalink K y Zuker CS** (1996) The *Drosophila* light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. *Cell* 85: 651-659.
- Ordway RW, Petrou S, Kirber MT, Walsh JV y Singer JJ** (1995) Stretch activation of a toad smooth muscle K⁺ channel may be mediated by fatty acids. *J. Physiol.* 484(2): 331-337.
- Parnas M, Katz B, Lev S, Tzarfaty V, Dadon D, Gordon-Shaag A y Metzner H** (2009) Membrane lipid modulations remove divalent open channel block from TRP-like and NMDA channels. *J. Neurosci.* 29(8): 2371–2383
- Patel AJ, Honoré E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F y Lazdunski M** (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J.* 17(15): 4283–4290
- Patel AJ, Lazdunski M, Honoré E** (2001) Lipid and mechano-gated 2P domain K⁺ channels. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13(4): 422-427
- Perozo E, Kloda A, Cortes DM y Martinac B** (2002) Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. *Nat Struct Biol* 9(9): 696-703
- Phillips AM, Bull A y Kelly LE** (1992) Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the TRP phototransduction gene. *Neuron* 8: 631-642
- Phillips R, Ursell T, Wiggins P y Sens P** (2009) Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature* 459: 379-385
- Raghu P, Usher K, Jonas S, Chyb S, Polyanovsky A y Hardie RC** (2000) Constitutive activity of the light-sensitive channels TRP and TRPL in the *Drosophila* diacylglycerol kinase mutant, *rdgA*. *Neuron* 26(1): 169-179.
- Rawicz W, Olbrich KC, McIntosh T, Needham D y Evans E** (2000) Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J* 79(1): 328-339
- Reuss H, Mojet MH, Chyb, S y Hardie RC** (1997) *In vivo* analysis of the *Drosophila* light-sensitive channels, TRP and TRPL. *Neuron* 19: 1249-1259
- Spassova MA, Hewavitharana T, Xu W, Soboloff J y Gill DL** (2006) A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(44): 16586-16591
- Szule JA, Fuller NL y Rand RP** (2002) The effects of acyl chain length and saturation of diacylglycerols and phosphatidylcholines on membrane monolayer curvature. *Biophys. J.* 83(2): 977-984
- Vaca L, Sinkins WG, Hu Y, Kunze DL y Schilling WP** (1994) Activation of recombinant *trp* by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am. J. Physiol.* 267 C1501–C1505.

Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G y Montell C (1995) TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(21): 9652-9656.

Zhang L y Saffen D (2001) Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca²⁺ channel isoforms. Molecular structures and functional characterization. J. Biol. Chem. 276: 13331-13339