

UCH-FC
Biotecnología
R 788
C-1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

“Estudios del canal de cloruro tipo ClC-2 presente en fotorreceptores de
Drosophila melanogaster”

Entregado a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por
Carolina Angélica Rosas Saavedra

Septiembre, 2009
Santiago – Chile

Directores de Seminario de Título:
Dr. Ricardo Delgado Arriagada
Dr. Juan Bacigalupo Vicuña



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

**“ESTUDIOS DEL CANAL DE CLORURO TIPO CIC-2 PRESENTE EN
FOTORRECEPTORES DE *Drosophila melanogaster*”**

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular**

CAROLINA ANGÉLICA ROSAS SAAVEDRA

Directores Seminario de Título

Dr. Ricardo Delgado Arriagada

Handwritten signature of Ricardo Delgado Arriagada in blue ink, positioned above a horizontal line.

Dr. Juan Bacigalupo Vicuña

Handwritten signature of Juan Bacigalupo Vicuña in blue ink, positioned above a horizontal line.

Comisión de Evaluación

Dr. Julio Alcayaga Urbina
Presidente Comisión

Handwritten signature of Julio Alcayaga Urbina in blue ink, positioned above a horizontal line.

Dr. Daniel Wolff Fernández
Evaluador

Handwritten signature of Daniel Wolff Fernández in red ink, positioned above a horizontal line.

Santiago de Chile, 08 de Septiembre de 2009.

Biografía



Nacida y criada en este bello país, Chile, mi vida toda ha transcurrido en su capital. Comencé mi educación en un colegio católico, el “Sta. Teresita”, donde creo que aprendí todo lo que debía saber acerca de principios, valores y lo importante que es estar en un colegio donde los recreos eran largos, para aprovechar de jugar a “las naciones” o al “elástico”, lejos lo mejor en mi infancia fue jugar. Con mi hermano, el Javier, pasábamos tardes enteras inventando historias, jugando a la pelota, etc.

Ya adolescente, en el año 1995 ingresé al Liceo de niñas Javiera Carrera, en donde me integré al curso 8^oF y en el cual permanecí hasta 4^o medio, el “cuarto F”. El Liceo, un establecimiento educacional donde la gran cantidad de alumnas lo hace un lugar de fuerte exigencia y alta competencia (SIMCE, puntajes P.A.A.(hoy PSU =)) fue donde surgió mi interés por entrar a la Universidad... es que yo quería vivir todo lo que me contaban que se hacía en la U, tener profesores muy “especiales”, otros “genios”, compañeros de todo tipo, algunos un poco “especiales” también; como alguien me dijo alguna vez, yo quería “hacer Universidad”. Así es que entré a la U de Chile, obviamente!, y a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, es que ya el nombre daba miedo, era todo un desafío...una carrera que quise desde que la conocí, desde que supe de ella...o desde que ella supo de mí...Bueno, lamentablemente tengo menos de una página para resumir lo irresumible, para decir que mi paso por esta Universidad, estudiar en la facultad de Ciencias, significó una lección de vida gigante....digo, megagigante!. Significó estudiar mil veces más que en el colegio, conocí los “rojos”, los “morados” y también los 7!....recuerdo que los quise enmarcar, sobre todo el de una prueba de Físicoquímica. Conocí el amor, el de verdad, el “de mentiras”, el de amigo, el de compañeros, el de familia. Conocí la emoción de jugar fútbol femenino por el equipo de la Facultad, tuve el honor de ser una de las fundadoras y de vivir clasificaciones, despedidas, y algunos amistosos que con tanta emoción a veces no eran tan “amistosos”. En fin, tuve la oportunidad de convertirme en una persona distinta.

En el año 2009 comienza otra etapa en mi vida, se cierran ciclos, se abren otros, todo lo emocionante comienza otra vez!

Agradecimientos

A todos quienes estuvieron, a quienes fueron parte de esta experiencia y la convirtieron en una de las más enriquecedoras.

Sin duda la mejor historia para mis nietos es ésta, mi tesis. Gracias a ustedes, porque podré contarla.

Quiero agradecer y destacar el apoyo otorgado por todos quienes trabajan para que la Ciencia en nuestro país avance y se desarrolle. Al proyecto Fondecyt 1040772 y MIDEPLAN P05-001-F.

A mis grandes amigos y amigas: Denita Miranda., Cindy Georgi., Dani Vargas., Ori Flores., "Pez" Pezzoli., Felipe Vargas, Felipe Vilches, David Weinstein.

A mis queridos amigos y compañeros de laboratorio, de universidad, de carretes, de salsa, de la vida.

Al gran equipo de fútbol femenino de la Facultad de Ciencias, a mis D.T. 's, a mi otro gran equipo de fútbol femenino, "Fresa Salvaje".

A mis profesores, en especial a mi tutor y mi guía, el Dr. Ricardo Delgado. A mi querida profe Cecilia Vergara, por todas las lecciones de vida transmitidas. A mi profesor Juan Bacigalupo, por su compromiso. A los doctores: Alcayaga, Wolff, Stange, Handford, Norambuena, Allende y Glavic. Muchas gracias por la dedicación, la disposición; gracias por enseñarme y sobretodo por lo excelentes profesionales que son.

A mi abuelita, mi partner, por regalome siempre. A mis hermanos: Javier, Cristian y Jessica por su cariño y preocupación. A mis padres, por toda su entrega.

En especial quiero agradecer a mi madre, por su sabiduría, su amistad y su apoyo incondicional. Ella es mi cómplice, la que me ha enseñado a ser libre y a nunca dejar de luchar (te amo!).

Al que está "allá arriba", al que como científica puedo decir que es mi gran pregunta y mi gran respuesta...por darme la alegría de conocer a todas aquellas personas que son especiales para mí.

Índice de Materias

| Materia | Página |
|---|--------|
| Lista de Tablas y Figuras | viii |
| Abreviaturas y Símbolos | ix |
| Resumen | xi |
| Summary | xiii |
| Introducción | |
| I. La familia de canales CIC. | 2 |
| 1. Características estructurales de los canales CIC. | 2 |
| 2. Control de la actividad de los canales CIC. | 5 |
| 3. Localización y función de la familia de canales CIC. | 5 |
| II. Los canales de cloruro tipo CIC-2. | 8 |
| 1. Canales tipo CIC-2 en fotorreceptores de <i>Drosophila</i> . | 9 |
| <hr/> | |
| Materiales y Métodos | |
| 1. Disociación de omatidios aislados de <i>Drosophila</i> . | 18 |
| 2. Registros electrofisiológicos. | 18 |
| 3. Western Blots. | 20 |
| 4. Inmunofluorescencia. | 20 |
| 5. Soluciones. | 24 |
| Resultados | |
| I. Estudio de corrientes macroscópicas tipo CIC-2 en omatidios del ojo de <i>Drosophila</i> . | 25 |
| 1. Corrientes macroscópicas activadas por potencial en omatidios de <i>Drosophila</i> . | 25 |
| 2. Modulación por luz. | 34 |
| II. Inmunoreactividad de la retina de <i>Drosophila</i> a anticuerpos anti CIC-2 de rata. | 37 |
| 1. Western Blot. | 37 |
| 2. Inmunofluorescencia de secciones de retina de <i>Drosophila</i> en distintos estadios de desarrollo. | 40 |

| | Página |
|--|---------------|
| Discusión | |
| I. Corrientes macroscópicas tipo CIC-2. | 50 |
| II. Inmunoreactividad. | 59 |
| 1. Análisis de Western Blot. | 59 |
| 2. Inmunofluorescencia de secciones de retina de <i>Drosophila</i> . | 60 |
| Bibliografía | 64 |

Lista de Tablas y Figuras

| | | Página(s) |
|-------------------|---|-----------|
| Tabla 1 | Desarrollo pupal de <i>Drosophila melanogaster</i> . | 21 |
| Tabla 2 | Porcentaje de registro de corrientes tipo I, II y III detectadas en omatidios de pupas tardías de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizando la técnica de <i>patch-clamp</i> en configuración de célula completa (whole-cell) establecida con las metodologías de succión y parche perforado con nistatina. | 33 |
| Figura i | Estructura de un canal CIC de bacteria. | 4 |
| Figura ii | Sistema visual de <i>Drosophila</i> . | 11 |
| Figura iii | Eventos que ocurren durante la transducción visual en los fotorreceptores de <i>Drosophila</i> . | 12 |
| Figura iv | Formación de los fotorreceptores de <i>Drosophila</i> . | 16 |
| Figura 1 | Clasificación de corrientes registradas en omatidios de pupas de <i>Drosophila melanogaster</i> empleando la técnica de <i>patch-clamp</i> en configuración de célula completa. | 27-28 |
| Figura 2 | Clasificación de corrientes registradas en omatidios de pupas de <i>Drosophila</i> empleando las técnicas de <i>patch-clamp</i> en configuración de célula completa y parche perforado con nistatina. | 30-31 |
| Figura 3 | Corrientes de rectificación de entrada voltaje-dependientes registradas en fotorreceptores de <i>Drosophila</i> de la cepa silvestre WOR en condiciones de oscuridad y en presencia de luz. | 35-36 |
| Figura 4 | <i>Western blot</i> de proteínas contenidas en la retina y en el cuerpo de <i>Drosophila</i> . | 39 |
| Figura 5 | Inmunohistoquímica de secciones de retina de <i>Drosophila</i> en distintos estadios de desarrollo. | 42-43 |
| Figura 6 | Inmunohistoquímica de secciones de retina de <i>Drosophila</i> en distintos estadios de desarrollo. | 45-46 |
| Figura 7 | Inmunohistoquímica de secciones de retina de <i>Drosophila</i> en distintos estadios de desarrollo. Distribución subcelular de la señal fluorescente indicando la detección de la proteína CIC-2 por el anticuerpo primario anti CIC-2 de rata. | 48-49 |

Abreviaturas y Símbolos

Abreviatura / Símbolo

| | |
|------------------|---|
| τ | Constante de tiempo. |
| μm | Micrómetro, 10^{-6} metros. |
| μM | Micromolar, 10^{-6} Molar. |
| 9-AC | Acido 9-Antraceno Carboxílico. |
| Å | Amstrong, 10^{-10} metros. |
| ATP | Adenosín-5'-trifosfato. |
| BSA | Seroalbúmina de bovino. |
| Cl^- | Ión cloruro. |
| DIDS | Ácido-4,4-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico. |
| DPC | Ácido difenilamino-2-carboxílico. |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético. |
| EGTA | Ácido etilenglicol-bis-(β -aminoetileter)-N,N,N,N'-tetraacético. |
| E_{rev} | Potencial de inversión. |
| GTP | Guanosín -5'- trifosfato. |
| HCO_3^- | Ión bicarbonato. |
| HEPES | Ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'- [2-etanosulfónico]. |
| I | Corriente. |
| K^+ | Ión potasio. |

Abreviatura / Símbolo

| | |
|-----------------|----------------------------------|
| kDa | Kilodalton, 10^3 Dalton. |
| LNA | Ácido Linolénico. |
| M | Molar (moles/litro de solución). |
| mM | Milimolar, 10^{-3} Molar. |
| MOhm | Megaohms, 10^6 Ohm. |
| ms | Milisegundos. |
| mV | Milivolts, 10^{-3} Volts. |
| Na ⁺ | Ión sodio. |
| nA | Nano Amperes, 10^{-9} Amperes. |
| nM | Nanomolar, 10^{-9} Molar. |
| NaAsp | Aspartato de sodio. |
| pA | Picoamperes, 10^{-12} Amperes. |
| PBS | Tampón salino de fosfato. |
| RNA | Ácido Ribonucleico. |
| s | Segundos. |
| Tris | Tris-hidroximetil-aminometano. |
| D.E. | Desviación Estándar. |
| V | Volts. |
| V _h | Potencial de mantención. |

Resumen

Los miembros de la superfamilia CIC de canales de cloruro dependientes de potencial se han identificado en vertebrados e invertebrados. A pesar de la amplia divergencia evolutiva de los organismos en los que se expresan, existe un elevado grado de conservación de los genes *CIC*. En mamíferos se han descrito nueve subfamilias de canales CIC; entre las que se encuentra la subfamilia CIC-2. Estas proteínas-canales están distribuidas en diversos tejidos. El rol fisiológico de la subfamilia de canales CIC-2 no ha sido establecido con claridad. En los fotorreceptores de *Drosophila melanogaster* se expresa un canal de cloruro rectificador de entrada ortólogo al canal tipo CIC-2 de mamíferos, el cual presenta rectificación de entrada y se activa a potenciales hiperpolarizantes.

El objetivo de la presente Memoria de Título fue reunir nuevos antecedentes que puedan ayudar a develar el rol fisiológico de este canal en los fotorreceptores de *Drosophila melanogaster*. Experimentos electrofisiológicos e inmunohistoquímicos permitieron profundizar en la caracterización de CIC-2 presente en este organismo.

Se registraron corrientes en respuesta a pulsos de voltaje utilizando la técnica de *patch-clamp* en configuración de célula completa. Se observó que solo una fracción de las células presentó corrientes con las características de activación y desarrollo temporal previamente descritas para CIC-2, mientras que tales características fueron heterogéneas en el resto de los fotorreceptores estudiados. De acuerdo a esta observación, los registros de corriente obtenidos se agruparon en tres categorías: tipo I, tipo II y tipo III, incluyendo en el tipo I aquellas corrientes cuya cinética de activación y desarrollo

temporal fueron semejantes a las corrientes tipo CIC-2 previamente descritas en *Drosophila*. El efecto de la luz se probó en células donde se registraron corrientes del tipo I, las que no fueron afectadas por el estímulo luminoso. Sin embargo, considerando el número de observaciones realizadas ($n = 3$), no es posible descartar que la luz tenga un efecto sobre esta corriente.

En *Drosophila* se han identificado dos tipos de ARN mensajeros, correspondientes a las variantes de empalme del gen *CIC-2*, una de las cuales se expresa exclusivamente en la cabeza de la mosca. Con el fin de identificar aquella proteína que podría estar más directamente relacionada con las corrientes de cloruro tipo CIC-2 registradas en los omatidios de la mosca, se realizaron experimentos de *western blot* donde se verificó la presencia de la proteína asociada a la variante de empalme del gen *CIC-2* que únicamente se expresa en la cabeza de la mosca. Paralelamente, empleando técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal, se determinó que en la etapa de larva III esta proteína no se expresa, sin embargo ésta muestra un patrón de expresión continuo durante todo el desarrollo pupal. El estudio también mostró su localización en la membrana plasmática extrarabdomérica de las células fotorreceptoras de individuos adultos y de pupas.

Summary

Members of the voltage-dependent ClC chloride channel superfamily have been identified both in vertebrates and invertebrates. Nevertheless, in spite of the wide evolutionary divergence of the organisms in which they are expressed, there is a high degree of conservation of *ClC* genes. In mammals, there are nine ClC subfamilies, including the ClC-2 subfamily. These proteins are widely distributed in a variety of tissues and their physiological role has not been clearly established. An inward rectifier chloride channel orthologous to the mammalian ClC-2 is expressed in *Drosophila melanogaster*. This channel exhibits inward rectification and is activated by hyperpolarization.

The aim of this work was to find new evidence that might lead to unravel the physiological role of this channel in *Drosophila melanogaster* photoreceptors.

Immunohistochemistry techniques and electrophysiological experiments allowed us to deepen in the characterization of the ClC-2 chloride channels present in photoreceptors of the above mentioned organism. We recorded currents in response to voltage pulses by means of the *patch clamp* technique, in its whole cell modality. We observed that only a fraction of the cells displayed the activation and time course of ClC-2 currents previously described, while these features were heterogeneous in the rest of the photoreceptors cells. Accordingly, we grouped the cells in three categories: type I, type II and type III. Type I comprised photoreceptors whose currents were similar than the *Drosophila* ClC-2 current previously described. We tested the effect of light only on a few type I currents from photoreceptors cells ($n = 3$); there was no effect of light in

any of them. However, the sample size was insufficient to rule out a light effect over this kind of current.

In *Drosophila*, two mRNAs types corresponding to different splice variants of the *CIC* gene have been identified. One of them expresses exclusively in the fly head. With the purpose of identify the protein that more directly would be related to the CIC-2 chloride currents recorded in the fruit fly ommatidium, *western blot* assays verified the CIC-2 protein corresponding to that head-expressed splice variant. In parallel, by immunofluorescence techniques and confocal microscopy we determined that larval III stage does not express the protein, whereas it shows a continuous expression pattern throughout the pupal stage. Our study also showed that CIC-2 localizes in the extra-rhabdomeral plasma membrane of photoreceptor cells, both in pupa and adult.

Introducción

Las células, eucariontes y procariontes, están delimitadas por una membrana de naturaleza lipídica que actúa como barrera de permeabilidad selectiva. El intercambio de iones con el medio extracelular es llevado a cabo directa o indirectamente gracias a la presencia de proteínas integrales de membrana tales como bombas, transportadores y canales de iones presentes en estas membranas. Mecanismos similares también operan en los procesos de intercambio que ocurren en las membranas que delimitan los compartimentos intracelulares del citoplasma.

Los canales de iones son proteínas integrales de membrana capaces de establecer interacción con iones específicos, de manera que éstos son transportados a través de la membrana. Los canales de iones Na^+ , K^+ , Ca^{++} o Cl^- forman poros a través de la membrana plasmática permitiendo el paso de éstos impulsados por su gradiente electroquímico.

El flujo iónico que ocurre a través de la mayoría de los canales iónicos es regulado por diversos parámetros celulares. La apertura de un canal puede ser inducida por señales físicas, como el potencial eléctrico, o por señales químicas. Según la naturaleza eléctrica del ión que los canales conduzcan, éstos pueden clasificarse en catiónicos o aniónicos.

Considerando que el ión cloruro es el anión más abundante en los organismos, la mayor parte de los canales aniónicos corresponden a canales selectivos a cloruro.

I. La familia de canales CIC.

De acuerdo a su homología estructural, los canales de cloruro han sido agrupados en las siguientes clases:

- Los canales CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator).
- Los canales de cloruro activados por calcio (CICA).
- Los receptores activados por ligandos, tales como glicina y ácido γ -aminobutírico (GABA).
- Los canales de cloruro dependientes de potencial de la familia CIC.

La familia de los canales de cloruro CIC fue identificada luego de clonar y expresar en ovocitos de *Xenopus* el gen que codifica para la proteína CIC-0 presente en membranas del órgano eléctrico de la raya marina *Torpedo marmorata* (Jentsh y col., 1990). Del análisis de la secuencia génica, la proteína posee 805 aminoácidos y varios dominios transmembrana. Actualmente se sabe que los canales CIC se expresan tanto en procariontes como en eucariontes (Iyer y col., 2002).

1. Características estructurales de los canales CIC.

La cristalización de la proteína CIC de bacterias ha proporcionado información valiosa acerca de la topología y estructura de los canales CIC (Dutzler y col., 2002). Éstos están compuestos de aproximadamente 18 hélices alfa que en su mayoría no alcanzan a atravesar completamente la membrana plasmática (**Fig. i A**). Utilizando diversas aproximaciones ha sido posible determinar que la secuencia peptídica que cruza completamente la membrana lo hace unas 10 a 12 veces y que estas hélices alfa estarían orientadas de manera inclinada respecto al plano de la membrana celular, con los extremos amino y carboxilo orientados hacia el citoplasma.

En eucariontes, la región citoplasmática carboxilo terminal contiene dos dominios CBS (cystathionine β -synthase) cuya función hasta ahora se desconoce. Sin embargo, se ha sugerido que éstos probablemente participan en la activación y localización subcelular de algunos tipos de canales CIC (Schwappach y col., 1998; Estévez y col., 2004; García-Olivares y col., 2008).

Estructuralmente los canales CIC están configurados como homodímeros (**Fig. i B**), donde cada monómero aporta con un poro (Dutzler y col., 2002; Dutzler, 2004). Cada monómero consiste de dos mitades repetidas que atraviesan la membrana con orientaciones opuestas. Esta arquitectura antiparalela define un filtro de selectividad en un poro con forma de reloj de arena. Tres sitios de unión dentro del filtro de selectividad estabilizan a los iones por interacciones con los dipolos de las hélices alfa y por interacciones químicas con átomos de nitrógeno y grupos hidroxilo de ciertos residuos de aminoácidos. Aunque se desconocen más detalles moleculares, es muy probable que la mayoría de los residuos de aminoácidos que forman parte del poro de un canal tipo CIC estén conservados en distintas especies.

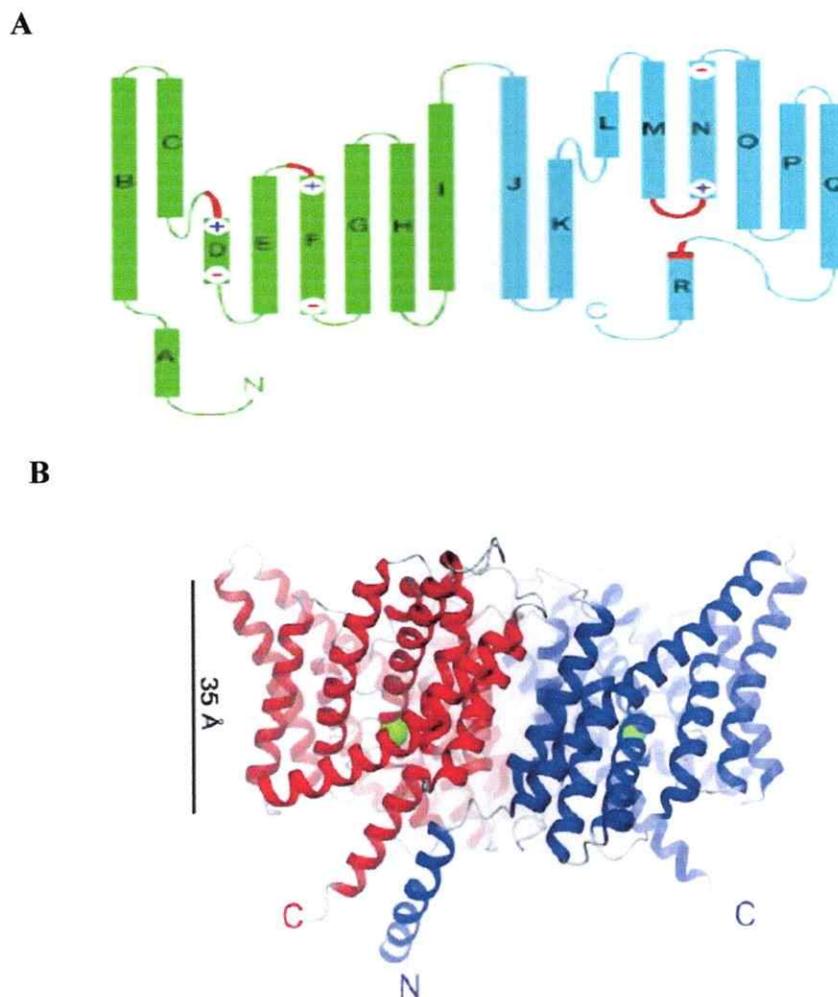


Fig i. Estructura de un canal CIC de bacteria.

A. Esquema de la estructura de una subunidad del canal StCIC (de *Salmonella typhimurium*), formada por 18 hélices α (cilindros A-R) divididas en dos mitades (indicadas en cian y verde), orientadas en forma antiparalela en la membrana, con la región extracelular arriba y la región intracelular hacia abajo. En rojo se indican los segmentos que forman parte del filtro de selectividad y los símbolos + y - indican la carga parcial y la orientación de los dipolos de las hélices alfa involucrados en la coordinación del ión cloruro.

B. Representación en cintas de la estructura tridimensional del dímero del canal StCIC. Vista lateral desde el interior de la membrana, donde se muestran las dos subunidades (en rojo y azul) y el ión cloruro (en verde) en el filtro de selectividad. La línea vertical indica el espesor aproximado de la membrana celular. (Modificado de Dutzler y col., 2002).

2. Control de la actividad de los canales CIC.

Los canales CIC son activados por el voltaje de membrana y algunos son modulados por otros estímulos tales como pH (Hanke y Miller, 1983), fosforilación (Furukawa y col., 2002), variaciones en la concentración de Cl^- extracelular (Pusch y col., 1995) o por variaciones del volumen celular (Gründer y col, 1992; Huber y col, 2004).

La activación voltaje-dependiente es una característica cuya magnitud e incluso la dirección del efecto de activación varían fuertemente entre homólogos e incluso entre las distintas subfamilias de canales CIC.

3. Localización y función de la familia de canales CIC.

Miembros de la superfamilia CIC de los canales de cloruro activados por potencial se han identificado en plantas, levaduras, eubacterias, arqueobacterias y varios animales vertebrados e invertebrados. A pesar de que la expresión de los canales CIC ocurre en organismos con una amplia divergencia evolutiva, existe un elevado grado de conservación de los genes *Clc*.

En mamíferos se han descrito 9 diferentes isoformas de CIC, cuyas propiedades electrofisiológicas de selectividad aniónica, dependencia de voltaje de activación y forma de la relación I versus V de las corrientes macroscópicas permiten diferenciar a cada una de estas isoformas.

Las isoformas de los canales CIC descritas hasta ahora se han clasificado en 3 subfamilias:

- 1) CIC-1, CIC-2, ClCKa/ClCK1 y ClCKb/K2 (Estas dos últimas isoformas expresadas predominantemente en riñón).
- 2) CIC-3, CIC-4 y CIC-5.
- 3) CIC-6 y CIC-7 (Canales CIC localizados en membranas intracelulares)

Gran parte de lo que se conoce de la función fisiológica de los canales CIC proviene del estudio de alteraciones asociadas a ciertas patologías de origen genético detectadas en humanos. La mutación del gen que codifica para el canal CIC-1, principalmente expresado en músculo esquelético, está asociada a miotonías hereditarias en cabras y ratones, además de humanos (Steinmeyer y col., 1991; Koch y col., 1992). Esta asociación fue clave en la determinación de CIC-1 como el principal canal iónico involucrado en la restauración del potencial de reposo de membrana del músculo esquelético. Igualmente, la identificación de mutaciones de CIC-Kb causantes del síndrome de Bartter, una nefropatía hereditaria, demostró que este canal es un componente crítico del mecanismo de concentración de orina en el riñón (Simon y col., 1997). ClCKa también ha sido relacionado a funciones de concentración urinaria, puesto que ratones *knocked-out* para el gen presentan diabetes insípida nefrogénica (Matsumura y col., 1999).

Los canales CIC-2 se expresan ubicuamente. Sin embargo, a pesar de ello el rol fisiológico de esta subfamilia de canales CIC-2 no se ha establecido con claridad. Evidencias experimentales sugieren que CIC-2 estaría involucrado en procesos como el

transporte transepitelial o el control de la concentración intracelular de cloruro en neuronas que expresan receptores de GABA (Smith y col., 1995; Staley y col., 1996). En humanos, mutaciones en el gen CIC-2 se han asociado a epilepsias idiopáticas (Niemeyer y col., 2004). En células de Sertoli y de Leydig de ratón se han detectado corrientes de Cl^- de rectificación de entrada correspondientes a la expresión del gen CICn2. La interrupción de la expresión de este gen produce una degeneración post natal severa de células fotorreceptoras en la retina y de espermatocitos primarios y espermatogonias en los testículos, lo que sugiere un rol clave en el desarrollo y mantención de las funciones de ciertos epitelios (Bösl y col., 2001). En ratón, mutaciones knock-out para CIC-3 presente en endosomas y vesículas sinápticas producen una degeneración severa de hipocampo y retina (Stobrawa y col., 2001). Así mismo, mutaciones en CIC-5 se han asociado a la enfermedad de Dent, un desorden hereditario caracterizado por la aparición de cálculos renales y proteinuria (Lloyd y col., 1996); ambos síntomas son consecuencia de una disminución de la endocitosis en el túbulo proximal. Probablemente, al igual que CIC-3, CIC-5 proporciona una vía de “desvío eléctrico” para el transporte electroneutro de ácido por la H^+ -ATPasa, bomba de protones con la que colocaliza, siendo importante para la acidificación eficiente de los endosomas y para la endocitosis apical en las células del túbulo proximal (Günther y col., 1998).

Mutaciones en CIC-7 son reconocidas como causantes de osteopetrosis, detectada inicialmente en un modelo de ratón y luego verificada en humanos (Kornak y col., 2001).

II. Los canales de cloruro tipo CIC-2.

Los canales tipo CIC-2 son activados por hiperpolarización del potencial de membrana, cambios en el volumen celular y acidificación extracelular. Presentan una secuencia de selectividad de iones haluro $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$.

En sistemas de expresión heterólogos como ovocitos de *Xenopus* u otros tipos de células transfectadas, las corrientes CIC-2 tienen una activación lenta para potenciales hiperpolarizantes (Jordt y Jentsch, 1997; Park y col., 1998). En ovocitos, por ejemplo, la activación de las conductancias CIC-2 no se satura incluso a -180 mV, y necesita más de 20s para alcanzar el estado estacionario (Thiemann y col., 1992). El umbral de activación a un voltaje determinado depende del sistema de expresión. En *Xenopus*, una activación importante se aprecia entre -60 mV y -80 mV (Thiemann y col., 1992), mientras que en otras células transfectadas es posible detectar activación entre -30 mV y -40 mV (Jordt y Jentsch, 1997; Park y col., 1998). La velocidad y cinética de activación varían considerablemente dependiendo de la técnica experimental y el tipo celular, lo cual puede ser reflejo de una fuerte dependencia de la temperatura y la modulación por factores celulares no descritos.

Similar a lo que ocurre en CIC-0 y CIC-1, la activación de CIC-2 también se ve afectada por la concentración aniónica extracelular, cuyo aumento promueve el cierre del canal (Pusch y col., 1999). Además del efecto del voltaje y la concentración aniónica extracelular, CIC-2 es activado por variaciones de volumen celular inducidas por hipotonicidad tanto en ovocitos de *Xenopus* como en otros tipos celulares (Gründer y col., 1992; Furukawa y col., 1998). La disminución del pH extracelular igualmente

activa al canal CIC-2. El cierre de éste en una condición de pH superior a 7,4 sugiere la importancia del grado de acidez del medio como regulador fisiológico (Pusch y col., 1994; Jordt y Jentsch., 1997; Furukawa y col., 1998).

Las mediciones de conductancia de registros de canal único son consistentes con análisis de ruido realizados previamente, y revelan valores de 2 a 3 pS (Weinreich y Jentsch, 2001). En relación a fármacos bloqueadores de canales de cloruro, DIDS (1 mM) tiene un efecto de inhibición débil sobre la corriente tipo CIC-2 (35,3% de inhibición a -90 mV en neuronas disociadas de rata), al igual que 9-AC (1 mM) o difenilcarboxilato (DPC) (1mM) (31% y 28% de inhibición respectivamente, a -160 mV en ovocitos de *Xenopus*) (Thiemann y col., 1992; Clark y col., 1998; Furukawa y col., 1998). Un poco más eficiente es el efecto de NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid) (0,5 mM) que bloquea entre un 80% y un 90% de la corriente de cloruro (Furukawa y col., 1998). Cd^{+2} y Zn^{+2} también tienen efectos inhibitorios, aunque poco específicos (Chesnoy-Marchais y Fritsch, 1994; Clark y col., 1998; Schwiebert y col., 1998; Blaisdell y col., 2000).

1. Canales tipo CIC-2 en fotorreceptores de *Drosophila*.

Ugarte y col. (2005) reportaron la expresión en los fotorreceptores de *Drosophila* de un canal de cloruro rectificador de entrada ortólogo al canal tipo CIC-2 de mamíferos. Este canal exhibe las características farmacológicas y de selectividad iónica que distinguen a las corrientes de este tipo de otras corrientes aniónicas de rectificación de entrada (Ugarte y col., 2005). El canal posee una conductancia de 4,4 pS (registrado en

NaCl, 120 mM), es activado por potenciales hiperpolarizantes, inhibido por zinc y 9-AC y es insensible al bloqueo por DIDS (Ugarte y col., 2005).

Complementariamente, análisis de *western blot* empleando un anticuerpo anti CIC-2 de rata permitieron determinar, en la retina de *Drosophila* la presencia de una proteína reactiva de masa molecular similar a la reportada previamente para la proteína CIC-2. Análisis de inmunohistoquímica empleando el mismo anticuerpo revelaron la existencia de proteínas reactivas en la región sináptica y en la membrana plasmática de los fotorreceptores.

Utilizando la técnica de *patch-clamp*, mediante registros de corriente unitaria en parche escindido (*inside-out*), así como registros de corrientes macroscópicas en configuración de célula completa (*whole-cell*), se demostró que estos canales son modulados por un ácido graso, el ácido linolénico (LNA) (Ugarte y col., 2005).

Se sabe que el LNA, junto con el ácido araquidónico, activa o modula a los canales TRP y TRPL, los cuales participan en el proceso de fototransducción que se lleva a cabo en las células fotorreceptoras de la *Drosophila* (Chyb y col., 1999; Delgado y Bacigalupo, 2009). Este proceso comienza con la activación por luz de la molécula de rodopsina y desencadena la cascada de señalización que promueve la formación de estos ácidos grasos (LNA y ácido araquidónico), los cuales son claves en la generación de la respuesta al estímulo luminoso.

En *Drosophila*, la fototransducción ocurre en los ojos compuestos constituidos por aproximadamente 800 unidades llamadas omatidios (Fig. ii). Cada omatidio está compuesto de 20 células, incluyendo 8 neuronas fotorreceptoras. A su vez, cada célula

fotorreceptora contiene una especialización de la membrana plasmática conocida como rabdomero, formado por aproximadamente 60.000 microvellosidades, que son los equivalentes funcionales de los discos en los segmentos externos de los bastones, donde está contenida la rodopsina y la maquinaria involucrada en la cascada de transducción visual (Fig. iii).

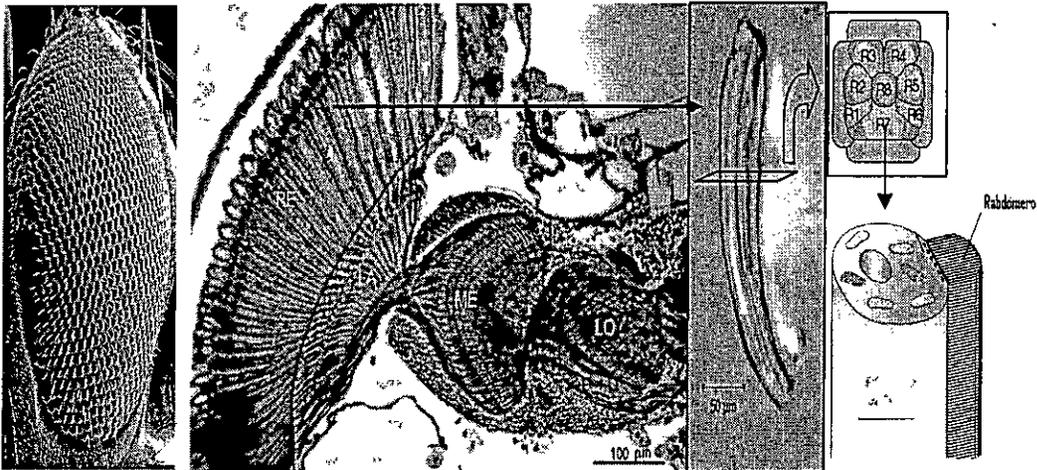


Fig. ii. Sistema visual de *Drosophila*. El ojo compuesto de mosca está formado por aproximadamente 800 omatidios, cada uno de los cuales contiene 8 fotorreceptores (R1-R8). RE: Retina, LA: Lámina, ME: Médula, LO: Lóbulo Óptico. (Modificado de Hardi y Raghu, 2001.)

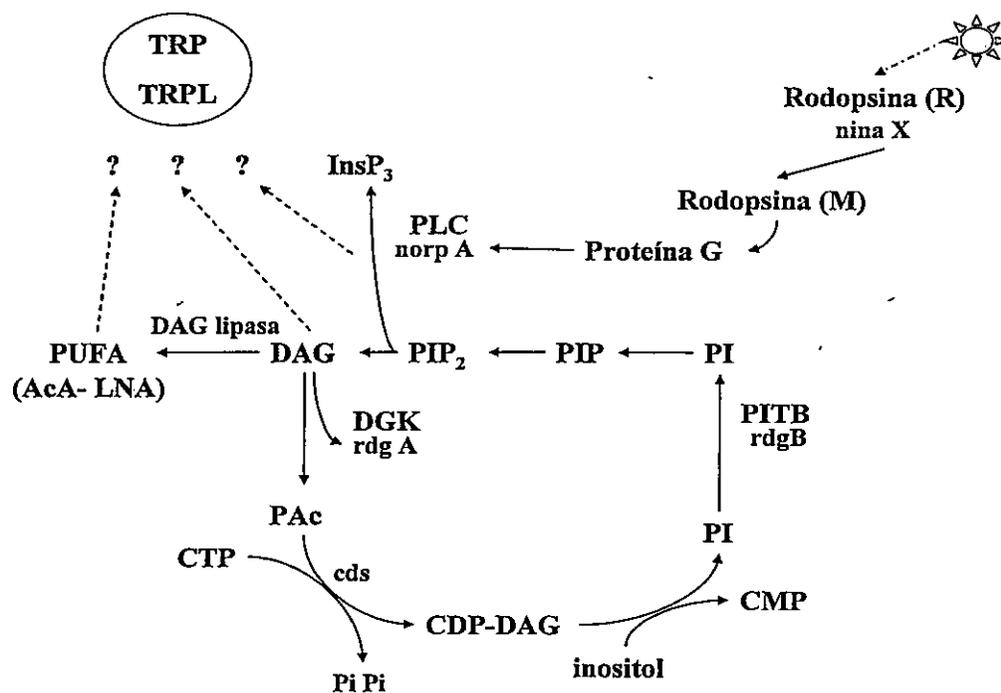
Fototransducción en *Drosophila*

Fig. iii. Eventos que ocurren durante la transducción visual en los fotorreceptores de *Drosophila*. La cascada de transducción visual se inicia con la absorción de un fotón de luz que causa un cambio conformacional en la molécula de rodopsina (R) y activa sus propiedades catalíticas. La rodopsina activa (M) (metarodopsina) cataliza la activación de una proteína G, que intercambia GDP por GTP. La proteína G activa cataliza la activación de la fosfolipasa C (PLC), codificada por el gen *norpA*. PLC hidroliza PIP_2 en IP_3 y DAG, siendo este último el potencial precursor de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). El sodio y el calcio extracelular entran a la célula a través de las conductancias activadas por luz TRP y TRPL, causando la despolarización de las células fotorreceptoras.

El fenómeno de fototransducción, que comienza con la activación de la molécula de rodopsina, desencadena la producción de IP_3 , diacilglicerol (DAG) y sus derivados, los cuales promueven la generación de la respuesta al estímulo luminoso en la membrana rabdomérica. Entre los derivados de DAG se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), que incluyen al ácido araquidónico y al ácido linolénico (LNA). Éstos activan o modulan a los canales TRP y TRPL, los cuales participan en la

transducción visual (Chyb y col., 1999; Delgado y Bacigalupo 2009). Considerando que los fotorreceptores de *Drosophila* tienen una citoarquitectura muy particular, donde el soma de la neurona es una estructura larga y angosta cuyo diámetro no supera los 2 μm , es razonable sugerir que la luz también podría modular la actividad de los canales tipo CIC-2 descritos en *Drosophila* (Ugarte y col., 2005) a través del ácido linolénico (LNA) generado (posiblemente en el rabdómero) durante la fototransducción, el cual difundiría hasta alcanzar este tipo de canales presentes en la membrana no rabdómica.

La fototransducción es un proceso que se lleva a cabo en fotorreceptores maduros, es decir durante estadios avanzados en el desarrollo de *Drosophila*, por lo tanto durante la organogénesis del ojo se requiere una regulación precisa y coordinada de eventos de proliferación celular, apoptosis, especificación, determinación de forma y polaridad celular. Cualquier defecto en la biogénesis y diferenciación de los fotorreceptores tiene impacto en la transducción visual que en ellos ocurre.

La especificación y diferenciación de las células fotorreceptoras de *Drosophila* comienza en el tercer estadio larval a partir de células del disco imaginal de ojo, luego del avance del surco morfogenético, una indentación dorso-ventral visible en la superficie del epitelio que demarca la frontera entre los fotorreceptores en desarrollo y aquellas células indiferenciadas (Fig. iv A). Posterior al paso del surco morfogenético, las células fotorreceptoras son reclutadas secuencialmente en cada uno de los omatidios en formación. Estas células exhiben una pronunciada polaridad apico-basal y se encuentran estrechamente conectadas por la zónula adherens (ZA). Cada fotorreceptor se distingue por el orden en el que es reclutado y por su posición en el omatidio. Cada

célula es reclutada por la señalización inductiva de células vecinas. R8 es especificado primero, luego siguen R2/5, R3/4, R1/6 y R7 (Fig. iv A)

La expresión coordinada de factores de transcripción, inducida por la activación reiterada de vías de señalización como Ras y Notch, es clave en la especificación de los diferentes tipos de células fotorreceptoras (Freeman, 1997; Cooper y Bray, 2000; Tomlinson y Struhl, 2001).

Entre los factores de transcripción expresados específicamente en los diferentes tipos de fotorreceptores se encuentran: *atonal* y *sens*, que se expresan en R8; *rough (ro)*, en R2, R3, R4 y R5; *seven-up (svp)*, en R3, R4, R1 y R6; *barH1*, en R1 y R6; *spalt (sal)*, en R3, R4, R7 y R8; y *pros*, en R7. La combinación de estos factores de transcripción específicos de cada célula finalmente establece las diferencias entre cada tipo de fotorreceptor.

Luego de la especificación temprana en el disco imaginal, los ojos se desarrollan durante la vida pupal del insecto. Es posible definir los distintos estadios pupales en relación con eventos puntuales que ocurren en la morfogénesis de los fotorreceptores (Fig. iv B). Al comenzar el desarrollo de la pupa, un conjunto de células accesorias, conocidas como células del cono, hacen contacto entre sí rodeando completamente a los fotorreceptores, empaquetados en ese momento con uniones célula-célula. Una consecuencia directa de lo anterior es la rotación en 90 grados de la porción apical de la membrana del fotorreceptor, alineándose de este modo con el eje próximo-distal de la retina en desarrollo. Durante el desarrollo pupal subsecuente las células de la retina sufren cambios morfogénicos importantes, con un incremento de hasta 10 veces en la

longitud de éstas a lo largo del eje próximo-distal. Paralelo al incremento de longitud, ocurre la formación del rabdomero. Así, la formación del ojo funcional compuesto depende de dos procesos claves. Primero, la agrupación óptima de células que conformarán el omatidio, relacionada con una correcta determinación del número y posición de las células en la retina. Segundo, la especificación, que en la morfogénesis y en el desarrollo del ojo es un aspecto estrictamente regulado, y se encuentra fuertemente relacionado con el apropiado establecimiento y mantención de la polaridad ápico-basal.

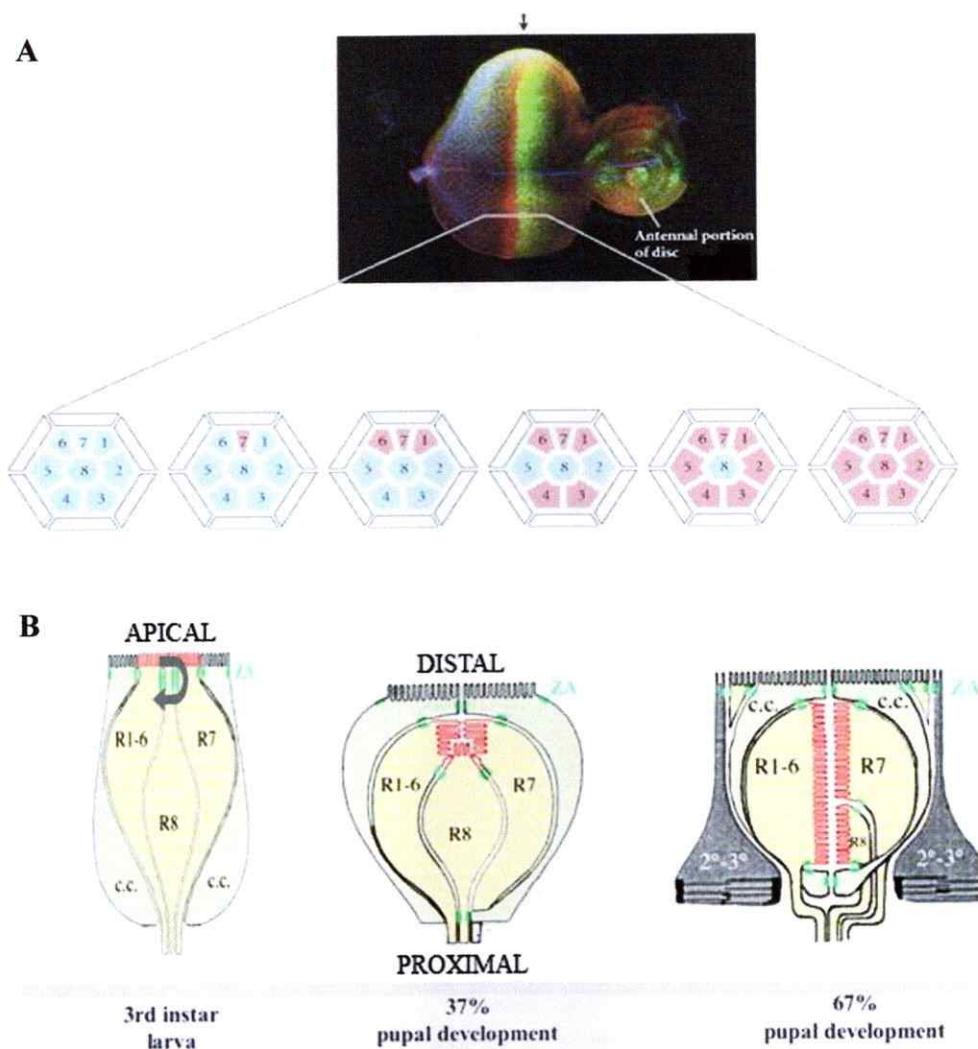


Fig. iv. Formación de los fotorreceptores de *Drosophila*. **A. Especificación y diferenciación de los fotorreceptores en el tercer estadio larval.** De derecha a izquierda: Reclutamiento secuencial de cada tipo de fotorreceptor a medida que avanza el surco morfogénico en el disco imaginal de ojo (flecha). Posterior al avance del surco morfogénico, R8 es el primero en ser reclutado. El resto de los fotorreceptores es incorporado progresivamente al conjunto de células que forman el omatidio (hexágonos en celeste). **B. Morfogénesis de fotorreceptores.** Durante este proceso los polos apicales de las células epiteliales giran noventa grados, de manera que la membrana apical de cada fotorreceptor se posiciona frente al polo apical del resto de los fotorreceptores. Adicionalmente se desarrolla el rabdómero, un conjunto de microvellosidades de la membrana apical que forman el organelo sensible a la luz. ZA: Zónula Adherens. c.c: Células del cono (Modificado de Longley y Ready, 1995).

Aunque se ha sugerido la importancia fisiológica de los canales ClC-2 en fotorreceptores de vertebrados basados en la progresiva degeneración retinal de ratones *knock-out* para ClC-2 (Bösl y col., 2001), la relevancia de este canal en la fisiología de los fotorreceptores de *Drosophila* aún es desconocida.

El presente trabajo de Memoria de Título tiene como objetivo general aportar nuevos antecedentes que permitan conocer el rol fisiológico del canal de cloruro ClC-2 en la fisiología de los fotorreceptores de *Drosophila* empleando distintas técnicas electrofisiológicas y moleculares.

Utilizando la técnica de *patch-clamp*, que permite la detección de corrientes a través de la membrana de la célula, se obtuvieron registros de corrientes para el estudio del efecto de la presencia de luz en la regulación de corrientes de entrada tipo ClC-2 activadas por potencial. Paralelamente, mediante la utilización de técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal, se determinó el patrón de expresión de la proteína ClC-2 durante el desarrollo del sistema visual de *Drosophila*.

Materiales y Métodos

1. Disociación de omatidios aislados de *Drosophila*.

Los registros electrofisiológicos se efectuaron en fotorreceptores de omatidios de moscas *Drosophila melanogaster* de la cepa de ojos blancos White Oregon-R (WOR) en estado de pupa tardía. Se extrajeron aproximadamente 6-8 ojos, los que fueron depositados en una placa que contenía una solución extracelular compuesta de (en mM): 20 NaCl, 100 NaAsp, 1,5 CaCl₂, 5 KCl, 8 MgSO₄, 0,2 LaCl₃, 25 prolina, 2,5 sacarosa y 10 HEPES, pH 7,15. El lantano presente en la solución extracelular fue empleado como bloqueador de las conductancias de luz, TRP y TRPL (Nathan y col., 1988). La preparación de omatidios aislados se obtuvo por disociación mecánica de las retinas, separándolas con la punta de un electrodo de tungsteno. Esta preparación se mantuvo a una temperatura cercana a los 20°C durante aproximadamente 40 minutos, tiempo durante el cual se realizaron los registros.

2. Registros electrofisiológicos.

El estudio de corrientes macroscópicas tipo CIC-2 se realizó por medio de la técnica de *patch-clamp* en modalidad de célula completa (*whole-cell*) (Hamill y col., 1981) utilizando un amplificador Axopatch-1D (Axon Instruments, Union city, CA).

Las micropipetas de registro fueron confeccionadas con capilares de borosilicato (Kimble Glass, Inc., Vineland, New Jersey) utilizando un estirador horizontal (Sutter Instrument Co., Model P-87, CA) programado para obtener pipetas con resistencias de 4-5 M Ω . Estas pipetas fueron llenadas con una solución intracelular compuesta por (en

mM): 124 CsCl, 10 EGTA, 0,1 CaCl₂, 5 TEA-Cl, 0,5 NaGTP, 2 MgATP y 10 HEPES, pCa 8; pH 7,15. Las sales CsCl y TEA-Cl contenidas en la solución intracelular fueron utilizadas para bloquear conductancias de salida de potasio (Hille, 1967).

En los registros de corrientes obtenidos con la técnica *patch-clamp* de parche perforado en configuración célula completa (*whole-cell*), se empleó nistatina (Sigma-Aldrich, Inc.) diluida en DMSO 100% a una concentración final en la solución intracelular de 200µg/mL.

Las corrientes fueron registradas en respuesta a una serie de pulsos cuadrados de potencial, comenzando en -140 mV hasta alcanzar los 60 mV (80 mV en experimentos de parche perforado con nistatina), luego de incrementos sucesivos en 20 mV cada 1s, y desde un potencial mantenido (V_h) de -70 mV. En los experimentos donde se empleó estimulación con luz, la serie de pulsos cuadrados de potencial comenzó en -120 mV y alcanzó los 20 mV. Los protocolos de pulsos fueron comandados por un PC utilizando las aplicaciones del software PCLAMP (Axon Instruments, Inc.): CLAMPEX (versión 5.5.1) del software PCLAMP5, para la adquisición de datos y CLAMPFIT (versión 6.0.5.4) para el análisis de éstos.

En los experimentos donde se empleó estimulación con luz, la preparación fue iluminada con luz blanca. Los estímulos fueron generados por una ampollita halógena blanca de 100 W y la duración de éstos fue controlada manualmente. La intensidad de los estímulos también se ajustó manualmente respecto a la intensidad de luz máxima proporcionada por la fuente de luz del equipo de microscopía. En todos los registros realizados este ajuste correspondió a la mitad de la intensidad máxima del equipo.

3. *Western Blots*.

En los experimentos de *western blots* se empleó un homogenizador de vidrio para preparar un extracto total de 70 retinas de *Drosophila melanogaster* en una solución tampón de homogenización que contenía (en mM): 50 TrisHCl pH 7,5, 50 NaCl, 1 EGTA e inhibidores de proteasas (Dil 1:1000) (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, Cod.: P8340).

El homogenizado fue centrifugado a 4.000 x g durante 5 minutos a 4°C y el sobrenadante fue sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % en proporción 38:1 de acrilamida/bisacrilamida. Las proteínas presentes en el gel fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Hybond-ECL, Germany), las que fueron incubadas primero con PBS 5% leche, para bloquear, y luego con el anticuerpo anti CIC-2 de rata (Dil. 1:100) (Alomone Labs. Ltd., Jerusalén, Israel). Posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Dil. 1:2000).

Las proteínas inmunoreactivas fueron detectadas por quimioluminiscencia (Amersham, ECL, UK) en una película fotosensible (Fuji Photo Film Co. Ltd., Japón).

4. *Inmunofluorescencia*.

Los estudios de inmunohistoquímica realizados en las retinas de *Drosophila* de la cepa de ojos blancos White Oregon-R (WOR) se llevaron a cabo en los siguientes estadios de desarrollo: Adulto, pupa 75% d.p., pupa 36% d.p., pupa 24% d.p. y larva III.

El porcentaje de desarrollo pupal (% d.p.) fue definido como la fracción, ponderada por 100, entre el tiempo de desarrollo de la pupa al momento de la selección

y el tiempo total de duración del período de desarrollo pupal en individuos crecidos a una temperatura de 18°C, esto es, 8 días.

La tabla 1 resume el tiempo de desarrollo transcurrido correspondiente a cada porcentaje de desarrollo pupal previo a la selección de individuos utilizados para llevar a cabo los ensayos de inmunofluorescencia.

| | 24% d.p. | 36% d.p. | 75% d.p. | Eclosión |
|-------|----------|----------|----------|----------|
| Horas | 46 | 69 | 144 | 192 |
| Días | 2 | 3 | 6 | 8 |

Tabla 1 Desarrollo pupal de *Drosophila melanogaster*. Tiempo de duración de cada estadio de desarrollo pupal, expresado como porcentaje de desarrollo pupal (% d.p.), calculado en base al tiempo total de duración de éste, que culmina inmediatamente antes del momento de la eclosión de los individuos crecidos a una temperatura de 18°C.

Los cortes de retina de mosca adulta fueron obtenidos a partir de cabezas enteras seccionadas en un vibrátomo (TED PELLA, Inc. Modelo 1000 plus, PELCO 102), ajustado para obtener rebanadas de aproximadamente 200 µm de espesor.

Las preparaciones de retinas de individuos en estadio pupal fueron obtenidas de acuerdo a protocolos de disección de sistema visual descritos previamente (Walther y Pichaud, 2007), cuyos procedimientos son específicos para cada etapa de desarrollo pupal mencionada más arriba.

La disección de discos imaginales antena-ojo de larva III se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito previamente por Wolff (Wolff, 2000). Brevemente: Las larvas fueron sumergidas en PBS, previamente refrigerado, para efectuar todo el procedimiento de disección de discos imaginales antena-ojo. Empleando pinzas se inmovilizó aproximadamente un tercio de la longitud del animal para luego tomar y

enganchar la base de la boca con un segundo par de pinzas. Finalmente, el extremo anterior, donde se enganchó la boca de la larva, fue estirado para apartar del resto del cuerpo los discos imaginales unidos al cerebro.

Todas las preparaciones del sistema visual fueron visualizadas con una lupa (Olympus, MVX10) y con un microscopio de contraste de fase (Nikon, ECLIPSE TE2000-S), utilizando las imágenes de estereoscópica y microscopía como referencia para la ubicación de las principales estructuras anatómicas. Indistintamente del estadio de desarrollo estudiado, las preparaciones de retina fueron fijadas en paraformaldehído 4% durante 5 minutos. Luego de 3 lavados sucesivos de 5 minutos cada uno con PBS, las muestras fueron incubadas con solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con anticuerpo primario anti CIC-2 (Dil. 1:100) (Alomone Labs. Ltd., Jerusalén, Israel) en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Para la identificación de rabdomeros se incubó simultáneamente con el marcador actínico faloidina acoplada a rodamina (dil 1:10) (Molecular Probes, Eugene, OR) durante los últimos 10 minutos de incubación con el anticuerpo primario. Luego de 3 lavados sucesivos de 5 minutos cada uno con PBS, se procedió a incubar con anticuerpo secundario (Dil 1:500) (Donkey anti-rabbit / Alexa Fluor 594, Invitrogen) en PBS-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se utilizó PBS para lavar 3 veces más durante 5 minutos cada vez. El montaje de las muestras se llevó a cabo sumergiéndolas en fluoromount G (Electron Microscopy Sciences) sobre cubreobjetos (MARIENFELD, 24x50mm, Alemania). Las muestras montadas fueron igualmente cubiertas con cubreobjetos y selladas por los bordes con barniz para uñas y cinta adhesiva translúcida.

Las preparaciones montadas fueron visualizadas con un microscopio empleando microscopía de fluorescencia confocal (Zeiss, model Axiovert 135M, Germany). Las señales de fluorescencia fueron detectadas luego de estimular con luz de dos longitudes de onda diferentes, 488 nm y 543 nm, de modo de identificar, respectivamente, al anticuerpo anti CIC-2 (fluorescencia verde) y al marcador de membrana rabdomeral, faloidina (fluorescencia roja).

5. Soluciones.

1. Electrofisiología:

Solución extracelular con baja concentración de cloruro (mM): 20 NaCl, 100 NaAsp, 1,5 CaCl₂, 5 KCl, 8 MgSO₄, 0,2 LaCl₃, 25 prolina, 2,5 sacarosa y 10 HEPES. pH 7,15.

Solución intracelular (mM): 124 CsCl, 10 EGTA, 0,1 CaCl₂, 5 TEA-Cl, 0,5 NaGTP, 2 MgATP y 10 HEPES. pCa 8; pH 7,15.

2. Western Blots:

Tampón de homogenización (mM): 50 TrisHCl pH 7,5, 50 NaCl, 1 EGTA e inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail: 4-(2 aminoethyl) benzene sulfonyl fluoride (AEBSF), pepstatin A, E-64, bestatin, leupeptin and aprotinin. Sigma-Aldrich, Cod.: P8340. Dil:1:1000).

Tampón de muestra: 15 % p/v glicerol, 125 mM Tris HCl pH 6,8, 5 mM Na₂EDTA, 2 % p/v SDS, 0,1 % p/v azul de bromofenol, 1 % v/v 2-mercaptoetanol.

Tampón de corrida: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1 % p/v SDS.

Tampón de transferencia: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,5 % p/v dodecilsulfato de sodio (DSD), 20 % v/v metanol.

Tampón de fosfato (PBS): 130 mM NaCl / 10 mM Na₂HPO₄, 130 mM NaCl / 10 mM NaH₂PO₄.

3. Inmunofluorescencia:

Solución de bloqueo (%): 2 BSA, 10 Donkey serum, 5 leche en polvo descremada, 0,1 Tritón X-100 en PBS.

Resultados

El objetivo general de esta memoria de título es avanzar en la caracterización del canal CIC-2 presente en los fotorreceptores de *Drosophila*, junto con examinar su papel en el proceso de fototransducción. Con el propósito de estudiar el efecto de la estimulación con luz sobre la actividad de las corrientes de cloruro tipo CIC-2 detectadas en la membrana plasmática de los fotorreceptores de *Drosophila*, se realizaron experimentos electrofisiológicos usando la técnica de *patch-clamp*.

I. Estudio de corrientes macroscópicas tipo CIC-2 en omatidios del ojo de *Drosophila*.

1. Corrientes macroscópicas activadas por potencial en omatidios de *Drosophila*.

Según se ha descrito anteriormente (Ugarte y col., 2005), las corrientes CIC-2 evocadas en los fotorreceptores de *Drosophila* por una serie de pulsos cuadrados hiperpolarizantes se desarrollan con un curso temporal de activación lento ($\tau \approx 310 \pm 184$ ms, promedio \pm D.E., a -130 mV, $n = 21$), sin presentar inactivación durante un pulso de potencial de 2 s de duración.

Durante el desarrollo de la presente memoria de título se realizaron aproximadamente 68 registros de corrientes evocadas utilizando un protocolo de pulsos de voltaje similar al descrito en la literatura y en análogas condiciones de temperatura y composición de soluciones. Al observar la cinética de desarrollo de las corrientes registradas se detectó que sólo una fracción de ellas (24 %) se ajustaba a los parámetros cinéticos que caracterizan a las conductancias tipo CIC-2 descritas más arriba, mientras que el resto pudo ser clasificado en dos grupos adicionales.

Sobre la base del curso temporal con el que se desarrollaron las corrientes en respuesta a potenciales hiperpolarizantes y despolarizantes, la totalidad de los registros obtenidos se clasificó en los tres tipos que se muestran en la Figura 1. Las corrientes del tipo I ($n = 16$), a potenciales hiperpolarizantes, muestran un desarrollo acorde con la cinética descrita previamente por Ugarte y col. (2005) para corrientes de rectificación de entrada tipo CIC-2. Las corrientes del tipo II se inactivan cuando se hiperpolariza el fotorreceptor, invierten a un potencial cercano a los 0 mV y se desarrollan gradualmente sin alcanzar un estado estable durante los pulsos de potencial despolarizante aplicados. Las corrientes del tipo III presentan rectificación de entrada y una activación rápida. Éstas se mantienen hasta que se restituye el potencial de mantención, sin que se observe inactivación durante el tiempo de aplicación del pulso de potencial hiperpolarizante.

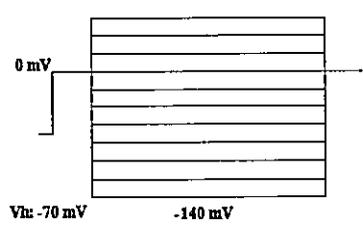
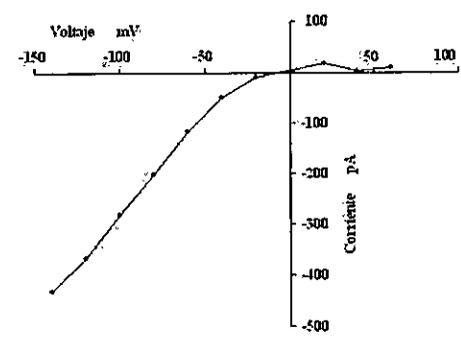
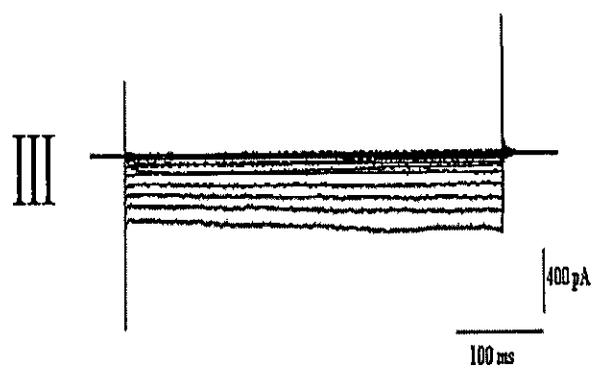
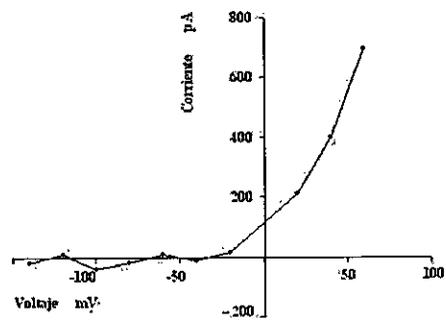
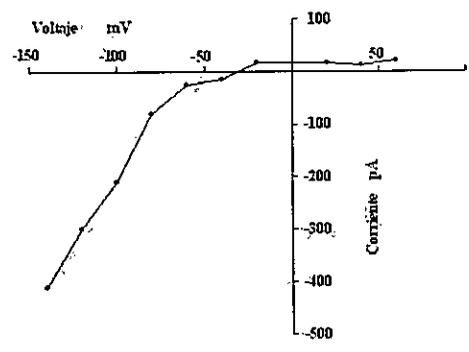
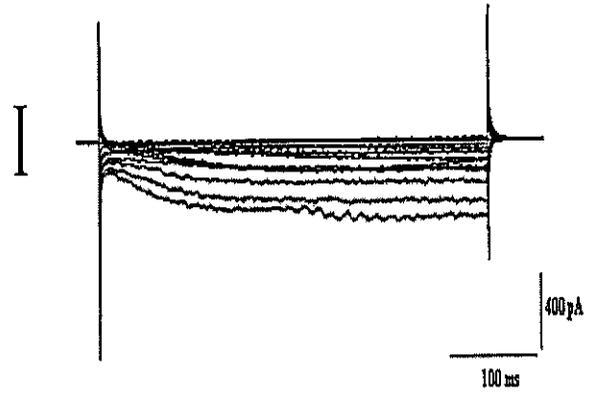


Figura 1. Clasificación de corrientes registradas en omatidios de pupas de *Drosophila melanogaster* empleando la técnica de patch-clamp en configuración de célula completa. Izquierda: Registros representativos de los tipos de corrientes obtenidos en omatidios de pupas tardías de *Drosophila* agrupadas de acuerdo al curso temporal de la corriente dado por su cinética de activación y desarrollo. El protocolo de estimulación empleado ha sido descrito previamente en la literatura para el registro de corrientes tipo CIC-2 de *Drosophila*. V_h : -70mV , n : 68. Los trazos de corrientes fueron generados por saltos de voltaje entre -140mV y 60mV en condiciones de cloruro asimétrico. **Derecha:** Curvas de corriente versus voltaje correspondiente a los registros de corrientes macroscópicas mostrados a la izquierda. Las curvas fueron construidas a partir del promedio de las corrientes registradas durante los últimos 122 ms de duración de cada pulso de potencial.

Considerando que sólo en las corrientes que se clasificaron como de Tipo I se observaron las características de activación y desarrollo temporal que describen a las corrientes CIC-2 registradas en los fotorreceptores de la *Drosophila*, y considerando además que las corrientes de tipo II y III no han sido descritas anteriormente, se realizaron registros de corrientes totales evocadas por voltaje utilizando la modalidad de parche perforado con nistatina para minimizar un posible efecto de diálisis del citoplasma del fotorreceptor, así como para minimizar el efecto de resellado del parche o ruptura del sello al momento de establecer la condición de registro de célula completa de la manera convencional (es decir, penetrando la célula mediante un pulso de succión o mediante un pulso de 'alto' voltaje (zap, $\sim 1V$) a través de la membrana celular bajo la punta de la pipeta).

La Figura 2 muestra ejemplos de los registros obtenidos utilizando la técnica de parche perforado con nistatina, con la que igualmente se obtuvieron los tres tipos de corriente observados en células bajo la condición de registro convencional. Solo una fracción de los registros de corrientes presentó la cinética de desarrollo de la corriente tipo CIC-2 en respuesta a potenciales hiperpolarizantes, el resto correspondió a corrientes con las características del tipo II o III obtenidos previamente.

En los tres tipos de registros mencionados anteriormente se detectó un componente de salida de la corriente en respuesta a potenciales despolarizantes que también pudo ser apreciado en las respectivas curvas I-V construidas. A partir de éstas se determinó el potencial de inversión de la corriente para cada tipo el cual resultó ser cercano a cero en todos los casos, sugiriendo fuertemente la presencia de más de una clase de conductancia en cada uno.

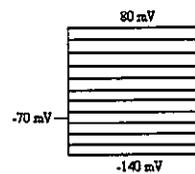
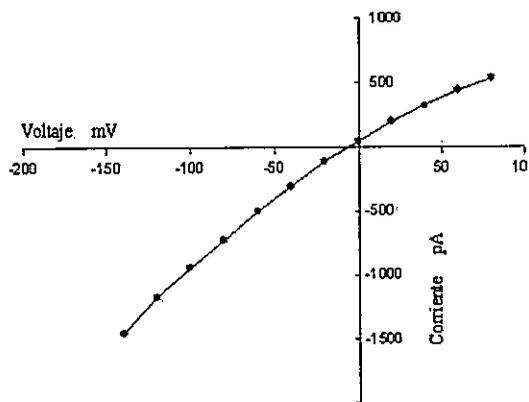
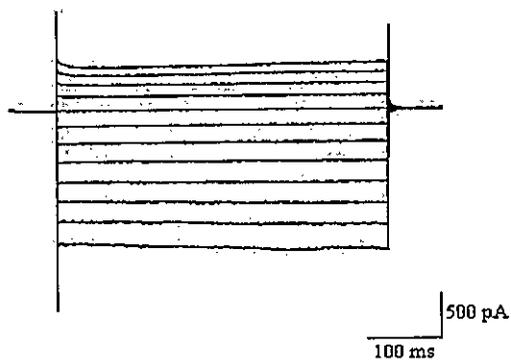
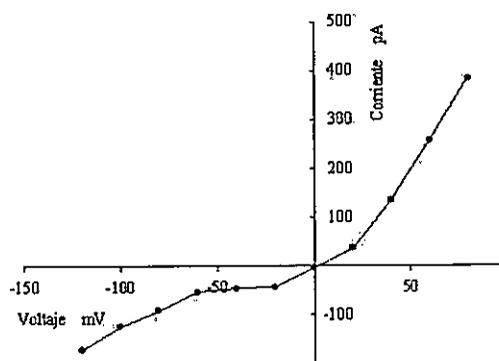
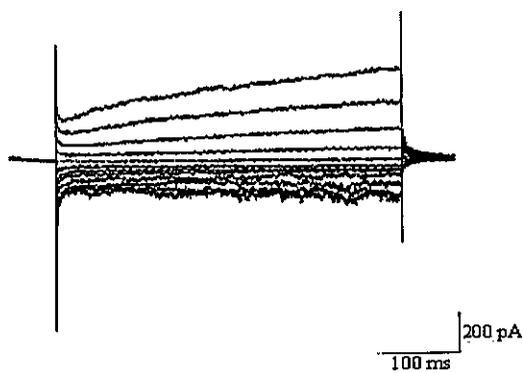
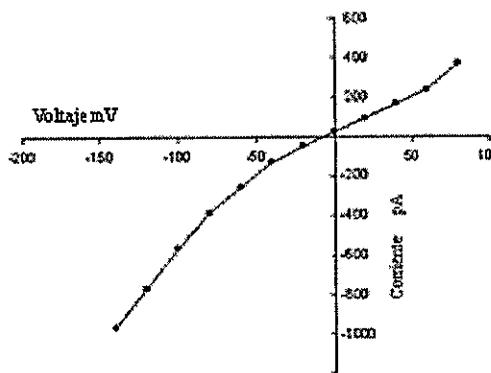
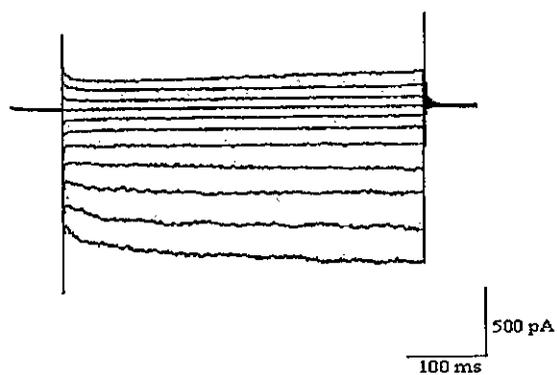


Figura 2. Clasificación de corrientes registradas en omatidios de pupas de *Drosophila* empleando las técnicas de patch-clamp en configuración de célula completa y parche perforado con nistatina. Izquierda. Registros representativos de los tipos de corriente obtenidos utilizando la técnica de parche perforado con nistatina y un protocolo de estimulación, descrito previamente en la literatura, para el registro de corrientes tipo CIC-2 de *Drosophila*. *Vh*: -70 mV, n: 11. Los trazos de corriente fueron generados por saltos de voltaje entre -140mV y 80mV en condiciones de cloruro asimétrico. Sol. Interna: CsCl 124mM, TEA-Cl 5mM. Sol. Externa: LaCl₃ 200μM. **Derecha.** Curvas de corriente vs. voltaje correspondiente a los registros de corrientes macroscópicas mostradas a la izquierda. Las curvas fueron construidas a partir del promedio de las corrientes registradas durante los últimos 122ms de duración de cada pulso de potencial.

Interesantemente, empleando el mismo criterio de clasificación, la proporción de registros de cada tipo de corriente fue similar al comparar ambas metodologías utilizadas, como se resume en la tabla N°2. De un total de 11 células registradas con la técnica de parche perforado con nistatina, aproximadamente el 27% correspondió a corrientes del tipo I, mientras que aproximadamente el 60 % restante correspondió a las corrientes tipo II y III.

| <i>Método</i> | | I | II | III | Otras | Total |
|-------------------------|-------------------------|----------|-----------|------------|-------|-------|
| <i>Succión y zap</i> | n (omatidios) | 16 | 14 | 18 | 20 | 68 |
| | % Registro | 24 | 21 | 27 | 28 | 100 |
| <i>Método</i> | | I | II | III | Otras | Total |
| <i>Parche perforado</i> | n (omatidios) | 3 | 3 | 3 | 2 | 11 |
| | % Registro | 27 | 27 | 27 | 19 | 100 |

Tabla 2. Porcentaje de registro de corrientes tipo I, II y III detectadas en omatidios de pupas tardías de Drosophila melanogaster utilizando la técnica de patch-clamp en configuración de célula completa (whole-cell) establecida con las metodologías de succión y parche perforado con nistatina. Las corrientes fueron evocadas utilizando un protocolo de estimulación descrito previamente en la literatura para el registro de corrientes tipo CIC-2 de Drosophila. Cada columna señala el tipo de corriente obtenido y el respectivo porcentaje de registro según la metodología de detección de corrientes empleada, es decir, patch-clamp convencional (succión y zap) (68 omatidios) o de parche perforado con nistatina (11 omatidios).

2. Modulación por luz.

La Figura 3 muestra registros representativos de una familia de corrientes de rectificación de entrada ($n = 3$) evocadas por una serie de pulsos cuadrados de potencial y registradas en omatidios de pupas tardías de *Drosophila* mantenidos en oscuridad (Fig. 3A, panel izquierdo) y después de la estimulación con luz blanca durante 33 segundos (Fig. 3A, panel derecho).

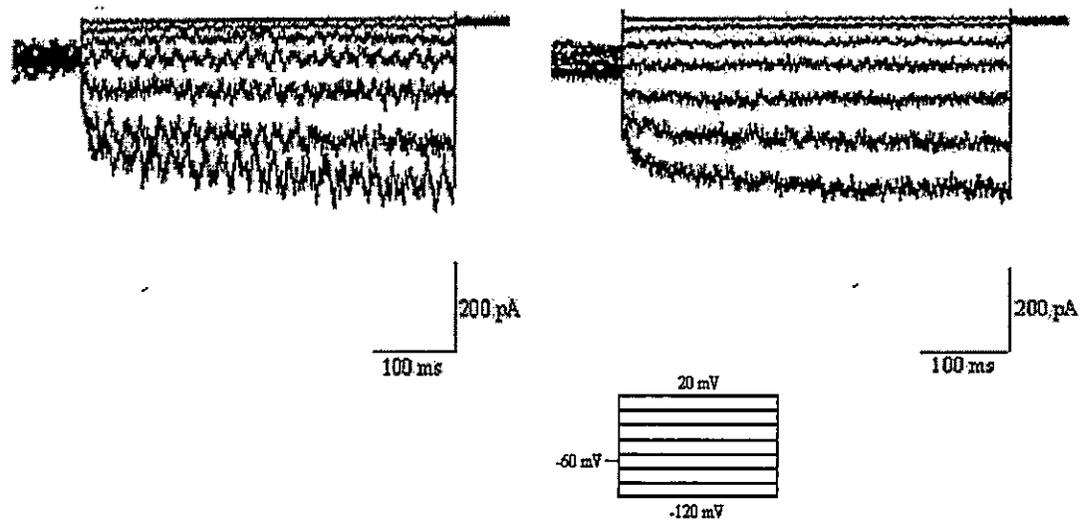
La Figura 3B muestra las curvas de corriente relativa versus voltaje construidas utilizando las amplitudes promedio de las corrientes registradas al término de cada pulso de potencial durante un intervalo de 122 ms ($n=3$) en condiciones de oscuridad (Fig. 3B, triángulos) y en presencia de luz (Fig. 3B, círculos).

Para cada célula estudiada, los valores de amplitud promedio de corriente fueron calculados por el programa CLAMPFIT (versión 6.0.5.4) a partir de valores de amplitudes de corriente detectados durante los últimos 122 ms de duración que tiene cada pulso de potencial. A partir de estos valores se obtuvo la dispersión de datos y los parámetros estadísticos de la Figura 3.

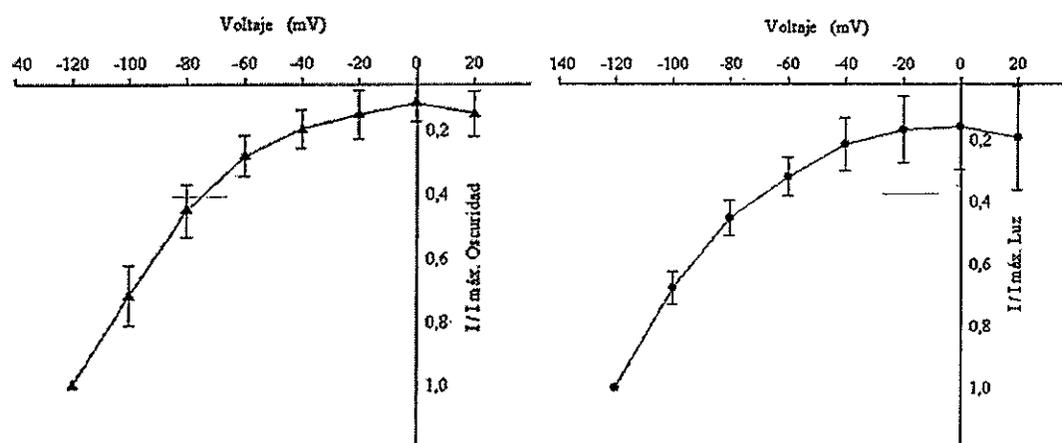
El gráfico de la Figura 3C muestra superpuestas ambas curvas normalizadas, ($I/I_{\text{máx}}$ vs. voltaje) señaladas en la Figura 3B para cada condición.

Al observar el curso temporal de las corrientes obtenidas se aprecia que, ni la cinética de activación, ni la amplitud de las corrientes registradas o el desarrollo temporal de éstas, tanto en oscuridad como en presencia de luz, muestran diferencias aparentes entre sí. Estos resultados sugieren que no habría un efecto de modulación por luz sobre las corrientes estudiadas.

A



B



C

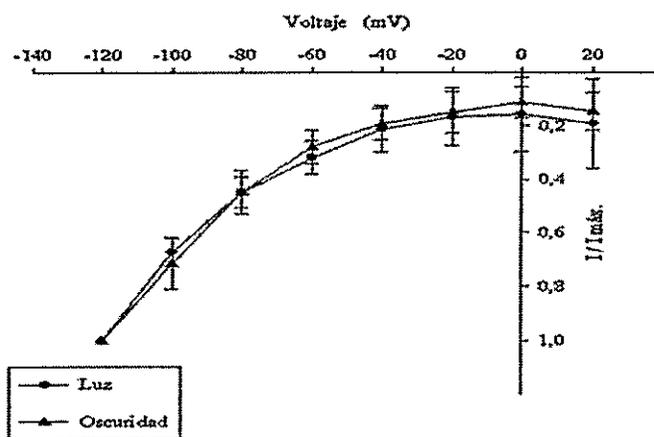


Figura 3. Corrientes de rectificación de entrada voltaje-dependientes registradas en fotorreceptores de *Drosophila* de la cepa silvestre WOR en condiciones de oscuridad y en presencia de luz. A. Experimentos patch-clamp, en configuración célula completa (whole-cell), para el registro de corrientes macroscópicas tipo CIC-2 activadas por un protocolo de pulsos cuadrados de potencial en condiciones de cloruro asimétrico y en presencia de La^{+3} (200 μM) en la solución extracelular. Los trazos de corriente fueron generados por saltos de voltaje entre -120 mV y 20 mV; inicialmente en condiciones de oscuridad (panel izquierdo) y luego en presencia de luz blanca (panel derecho), transcurridos 33 segundos de exposición. **B.** Curvas de corriente (relativa a la corriente máxima, registrada a -120 mV) versus voltaje construidas a partir de las amplitudes promedio de las corrientes registradas al término de cada pulso de potencial durante un intervalo de 122 ms, en condiciones de oscuridad (triángulos) ($n = 3$) y luego en presencia de luz (círculos) ($n = 3$). **C.** Superposición de las curvas corriente-voltaje mostradas en B ($n = 3$).

II. Inmunoreactividad de la retina de *Drosophila* a anticuerpos anti-CIC-2 de rata.

1. *Western Blot*.

En el año 2006, se identificaron en *Drosophila* dos variantes de empalme del gen CIC-2. Una de estas variantes se expresa en la cabeza y en el resto del cuerpo de la mosca, mientras que la otra se expresa sólo en la cabeza (Flores y col., 2006).

Con el objetivo de identificar la proteína obtenida a partir de la traducción de la variante de empalme expresada únicamente en la cabeza de *Drosophila*, se realizaron experimentos de *western blot* empleando extractos totales de proteínas obtenidas a partir de cuerpos de individuos cuya cabeza fue separada previamente; así también se emplearon extractos totales de proteínas de retinas de *Drosophila*, teniendo en cuenta que el sistema visual de la mosca comprende gran parte del volumen total de la cabeza. El anticuerpo policlonal utilizado reconoce una secuencia peptídica altamente conservada en los canales CIC-2 que está presente sólo en el extremo carboxilo terminal de la proteína asociada a la variante de empalme detectada únicamente en la cabeza del animal. La Figura 4 muestra que el anticuerpo anti CIC-2 de rata reconoce una proteína de aproximadamente **82 kDa** en el extracto de retinas de *Drosophila* (Fig. 4, carril 1).

La incubación con anticuerpo primario del extracto obtenido a partir de cuerpos de moscas cuya cabeza fue escindida previamente no presenta señal alguna que dé cuenta de la presencia de proteína reactiva (Fig. 4, carril 2). Del mismo modo, no se distinguió señal en ambos tipos de extracto cuando la incubación se realizó sólo con anticuerpo secundario (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que la banda

correspondiente a la proteína reactiva en el extracto de retinas da cuenta de la detección específica, por parte del anticuerpo primario anti CIC-2 de rata, de una proteína que se expresaría exclusivamente en la cabeza de *Drosophila*, siendo altamente probable que ésta corresponda al producto traduccional de la variante de empalme del gen CIC-2 identificada exclusivamente en esta zona.

La transferencia de proteínas desde el gel a la membrana de nitrocelulosa utilizada fue verificada empleando azul de Coomassie y rojo de Ponceau, por lo que se descarta que la ausencia de bandas en preparaciones de extractos de proteínas a partir de cuerpos de moscas, previa escisión de las cabezas, se deba a una transferencia fallida a la membrana.

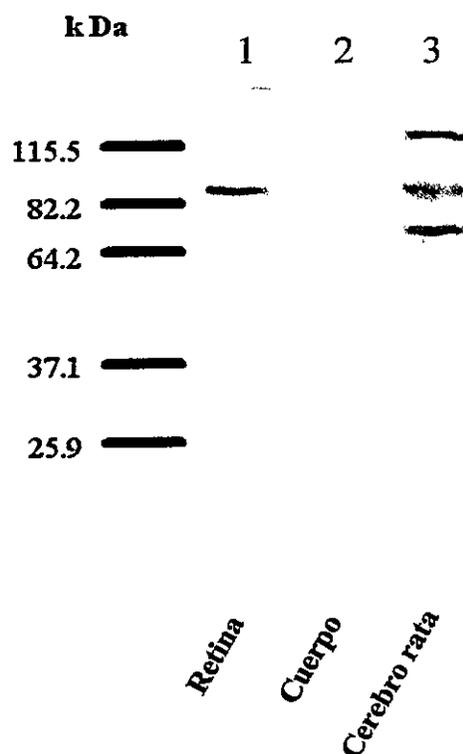


Figura 4. Western blot de proteínas contenidas en la retina y en el cuerpo de *Drosophila*. El análisis de Western blot muestra que un anticuerpo policlonal anti CIC-2 de rata (1:200) reconoce una proteína correspondiente a una banda de ~ 82 kDa en el extracto de retinas de *Drosophila* (carril 1). La banda no fue detectada en preparaciones de extractos de proteínas de cuerpos de moscas cuyas cabezas fueron apartadas previamente (carril 2). Tampoco se detectó marca alguna en las preparaciones respectivas cuando éstas fueron incubadas sólo con anticuerpo secundario (1:2000) (Datos no mostrados). Una muestra de extracto de membranas de cerebro de rata fue incubada simultáneamente con anticuerpo primario como control positivo (carril 3).

4. Inmunofluorescencia de secciones de retina de *Drosophila* en distintos estadios de desarrollo.

Considerando la heterogeneidad de las corrientes de entrada registradas, y que los omatidios empleados en los registros *patch-clamp* fueron obtenidos de pupas de moscas no sincronizadas, nos interesó conocer el patrón de expresión, durante el desarrollo de *Drosophila*, de la proteína CIC-2 expresada principalmente en la cabeza, de manera de evaluar si existe una correlación entre el tipo de corriente registrada y el estadio de desarrollo de la mosca. Con este objetivo se realizaron experimentos de inmunofluorescencia empleando el anticuerpo primario anti-CIC-2 de rata (utilizado en los experimentos de *western blot*) y moscas crecidas sincronizadamente.

Paralelamente se determinó la distribución subcelular de la proteína reconocida por este anticuerpo en preparaciones de retinas de individuos en distintas etapas del desarrollo. La selección de los estadios de desarrollo de *Drosophila melanogaster* de la cepa de ojos blancos White Oregon-R fue la siguiente: Larva III, pupa 24 %, pupa 36 %, pupa 75 % y adulto. Esta selección de estadios pretendió abarcar gran parte del ciclo de desarrollo del animal a fin de determinar el momento a partir del cual comienza a detectarse expresión.

La Figura 5 muestra fotomicrografías de fluorescencia de cortes ópticos de 1 μ m de espesor, obtenidas con microscopía confocal, donde se detectó inmunoreactividad en los siguientes estadios de desarrollo: Adulto, pupa 75 %, pupa 36 % y pupa 24 %. Los discos imaginales de ojo del estadio de larva III no fueron inmunoreactivos.

En preparaciones de rebanadas de cabezas de individuos adultos se detectó inmunoreactividad tanto en el soma de los fotorreceptores (retina, Re) como en la porción distal de los axones, conocida con el nombre de lámina (La), que corresponde a la estructura del sistema visual donde los terminales de los fotorreceptores R1-R6 hacen sinapsis con neuronas monopolares.

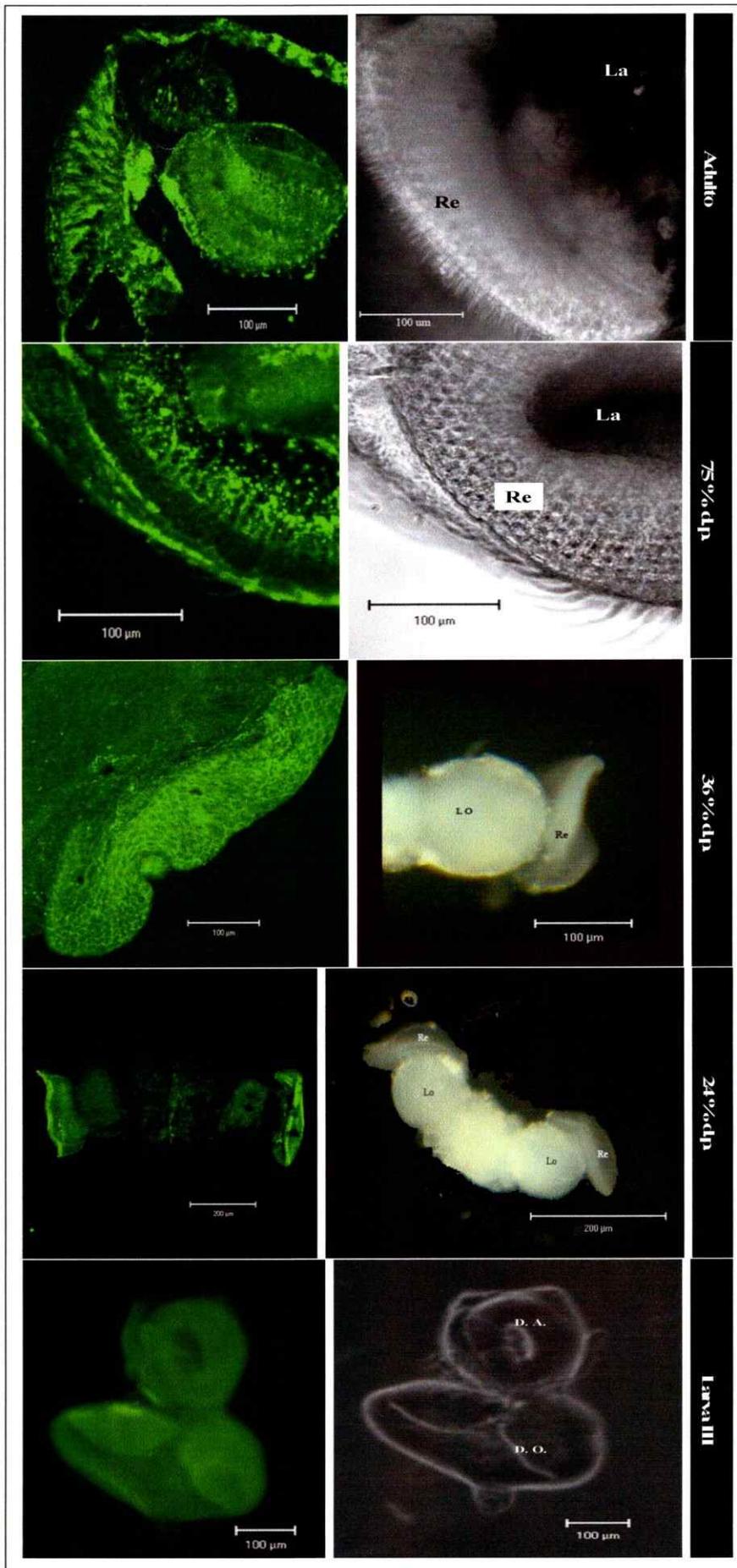


Figura 5. Inmunohistoquímica de secciones de retina de *Drosophila* en distintos estadios de desarrollo. Izquierda: Micrografías de fluorescencia confocal correspondientes a secciones del sistema visual de *Drosophila* en los siguientes estadios de desarrollo (hacia abajo): Adulto, pupa 75 % d.p., pupa 36 % d.p., pupa 24 % d.p. y larva III. En verde se señala la inmunoreactividad al anticuerpo anti CIC-2. **Derecha:** Imágenes de microscopía de contraste de fases y estereoscópica (36 % d.p. y 24 % d.p.) de preparaciones de retina y discos imaginales ojo-antena de *Drosophila* a partir de las cuales fueron obtenidas las imágenes de microscopía de fluorescencia confocal alineadas a la izquierda. **d.p.:** desarrollo pupal, **Re:** Retina, **Lo:** Lóbulo óptico, **La:** Lámina, **D.A.:** Disco imaginal de Antena, **D.O.:** Disco imaginal de Ojo.

La Figura 6 muestra las imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de la Figura 5, esta vez junto a las respectivas imágenes de preparaciones del sistema visual incubadas sólo con anticuerpo secundario como control negativo de la señal de fluorescencia.

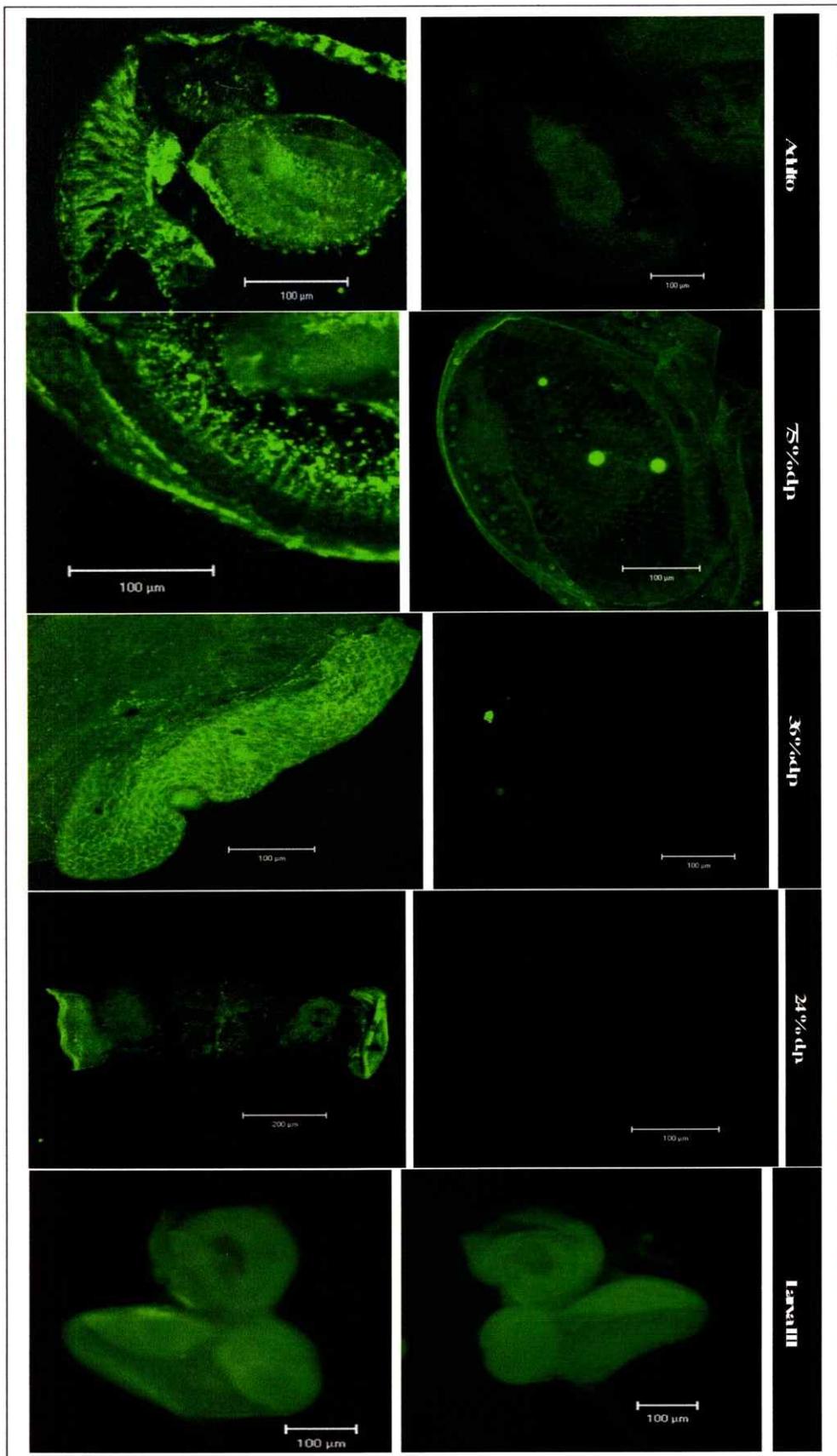


Figura 6. Inmunohistoquímica de secciones de retina de *Drosophila* en distintos estadios de desarrollo. Izquierda: Micrografías de fluorescencia confocal correspondientes a secciones del sistema visual de *Drosophila* en los siguientes estadios de desarrollo (hacia abajo): Adulto, pupa 75 % d.p., pupa 36 % d.p., pupa 24 % d.p. y larva III. En verde se señala la inmunoreactividad al anticuerpo anti CIC-2. **Derecha:** Imágenes de fluorescencia con microscopía confocal de secciones del sistema visual correspondientes a los estadios de desarrollo mencionados anteriormente, esta vez incubando sólo con anticuerpo secundario como control negativo. d.p.: desarrollo pupal.

La Figura 7 indica la distribución subcelular de la marca fluorescente observada en las figuras 5 y 6, señalando la detección de la proteína CIC-2 por el anticuerpo primario. En preparaciones de retinas de individuos adultos, la señal se localiza en la membrana plasmática extrarabdomérica de los fotorreceptores. En el estadio de desarrollo 75% d.p. se observa la distribución de señal fluorescente para CIC-2 a lo largo del conjunto de fotorreceptores que forman los ommatidios en la retina de *Drosophila*. De acuerdo a la localización de la señal fluorescente del marcador de membrana rabdomérica, faloidina (no se muestra en la figura), la mayor intensidad de marca verde, que podría confundirse con una localización del canal en el rabdomero, correspondería a regiones donde se unen los bordes extrarabdoméricos de aquellos fotorreceptores que se agrupan para formar cada ommatidio. En los estadios de desarrollo pupal 36% d.p. y 24% d.p. analizados, la señal se distribuye hacia los bordes de las células que componen el epitelio retinal.

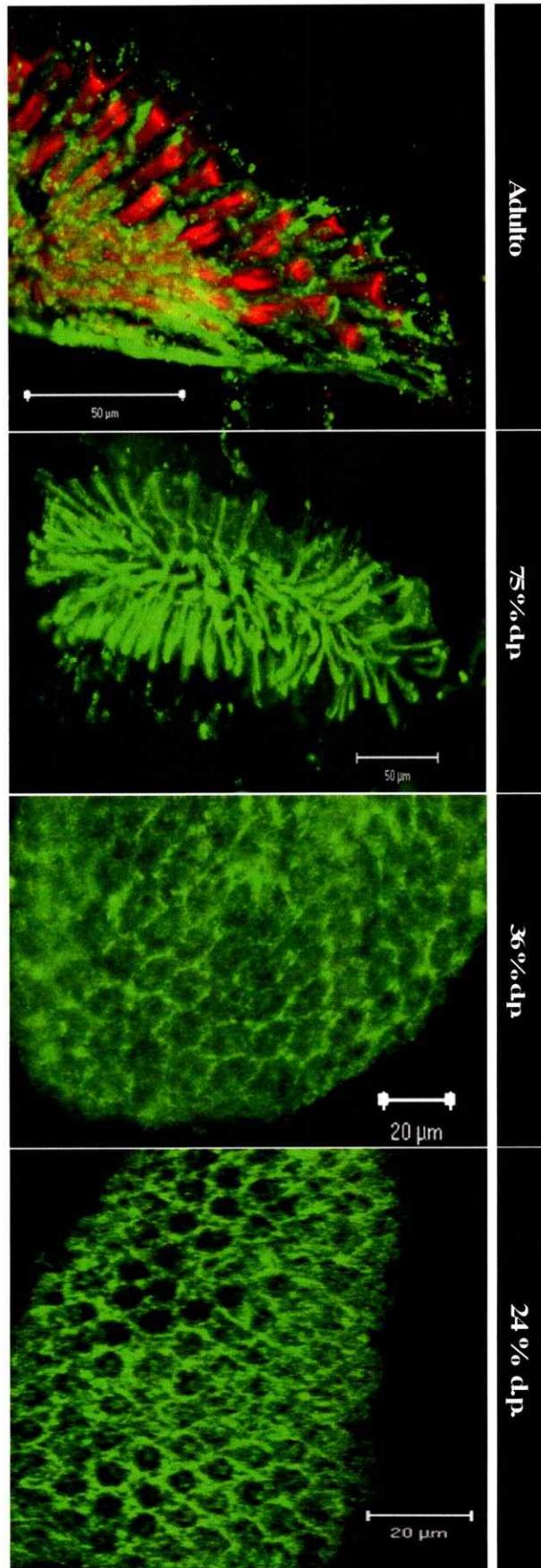


Figura 7. Inmunohistoquímica de secciones de retina de *Drosophila* en distintos estadios de desarrollo. Distribución subcelular de la señal fluorescente indicando la detección de la proteína CIC-2 por el anticuerpo primario anti CIC-2 de rata. Micrografías de fluorescencia confocal correspondientes a secciones de retinas de *Drosophila* en los siguientes estadios de desarrollo (hacia abajo): Adulto, pupa 75 % d.p., pupa 36 % d.p., pupa 24 % d.p. En verde se señala la inmunoreactividad al anticuerpo anti CIC-2 y en rojo, la localización de faloidina, marcador de la membrana rabadomérica (adulto).

En los estadios adulto y pupa 75% d.p., la señal fluorescente se localiza en la membrana plasmática extrarabadomérica de los fotorreceptores. En estadios de pupa más tempranos (36% d.p. y 24% d.p.), la señal se distribuye hacia los bordes celulares. d.p.: desarrollo pupal.

Discusión

El presente trabajo de memoria de título tuvo como objetivo general profundizar en la caracterización del canal tipo ClC-2 presente en *Drosophila melanogaster*, empleando técnicas electrofisiológicas y de inmunohistoquímica.

I. Corrientes macroscópicas tipo ClC-2.

Los canales de cloruro tipo ClC-2, pertenecientes a la superfamilia ClC de los canales de cloruro dependientes de voltaje, se asocian a corrientes de rectificación de entrada activadas por potenciales hiperpolarizantes que se desarrollan en intervalos de tiempo del orden de los milisegundos, de manera que constituyen conductancias de activación lenta que se estabilizan en el tiempo.

De acuerdo a las observaciones realizadas en este estudio se determinó que además de las corrientes de entrada tipo ClC-2 detectadas a potenciales hiperpolarizantes, descritas previamente en fotorreceptores de *Drosophila*, se registraron otros tipos de corrientes activadas por voltaje, en las condiciones de registro empleadas para la detección de corrientes tipo ClC-2, cuyas cinéticas de activación y desarrollo difieren de estas últimas, de manera que fueron agrupadas y clasificadas como corrientes tipo I, II y III.

Las corrientes tipo ClC-2 obtenidas en oscuridad en respuesta a una serie de pulsos de voltaje hiperpolarizantes descritas en *Drosophila* (Ugarte y col., 2005), dan lugar al desarrollo de corrientes con un curso temporal de activación lenta (τ : 310 ± 184 ms, promedio \pm D.E. a -130 mV, $n = 21$) y no presentan inactivación en el intervalo de 2

s, tiempo que dura cada pulso de potencial al cual la célula fue sometida. El amplio rango de valores que tiene el curso temporal de activación de la corriente (τ), ilustrado por el valor de desviación estándar (184 ms) informada por Ugarte (2005), que supera a la mitad del valor promedio de τ , sería indicativo de que en la determinación del promedio de la constante de activación descrita pudieron haberse incluido aquellas corrientes cuyo curso temporal pudo corresponder al tipo de corriente II o III, reportados en esta memoria de título.

Flores y col. (2005) reportaron que las corrientes del canal tipo ClC-2 de *Drosophila* expresado en un sistema heterólogo presentan un curso temporal complejo a -130 mV descrito por tres procesos exponenciales con las constantes de tiempo: τ_1 : 600 ms; τ_2 : 80 ms y τ_3 : 10 ms. Ponderados por la amplitud relativa de cada componente, se obtiene un valor de activación del orden de los 142 ms, curso temporal de desarrollo más rápido que el valor obtenido por Ugarte y col. (2005) para el mismo tipo de corriente (310 ms). Estos resultados apoyarían la idea de que las corrientes estudiadas por Ugarte y col. (2005) habrían contenido otros tipos de corrientes en las condiciones experimentales descritas para la detección de corrientes ClC-2. Es probable que en el estudio publicado por estos autores no hayan sido notorias las diferencias en las corrientes que aquí se reportan, posiblemente porque no se emplearon protocolos de registros donde fueran aplicados potenciales despolarizantes. Esto hubiera permitido diferenciar más acuciosamente aquellas corrientes de rectificación de entrada tipo ClC-2 de aquellas tipo I, II o III, identificadas en el presente trabajo.

En las condiciones iónicas utilizadas durante los registros electrofisiológicos, el potencial de inversión determinado de las curvas I vs.V obtenidas se encontró alrededor de 0 mV. Sin embargo, considerando las concentraciones de Cl^- de las soluciones intra y extracelular, el potencial de inversión calculado utilizando la ecuación de Nernst es de +38 mV, de modo que esta diferencia establece una incerteza en la selectividad de las corrientes aquí catalogadas como corrientes de Cl^- . Una explicación para esta inconsistencia es que dado que la corriente de Cl^- rectifica y se activa sólo a potenciales hiperpolarizados, es probable que el potencial de inversión que se obtiene de las curvas I vs.V se deba a un componente de corriente no específica que predomina cuando la corriente de Cl^- aquí estudiada se inactiva. Adicionalmente, los fotorreceptores tienen una alta tasa metabólica y por consiguiente una alta producción de ácido endógeno. Una gran cantidad de dióxido de carbono y bicarbonato se generan de la fosforilación oxidativa, a partir de la reacción de hidratación reversible de dióxido de carbono ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) catalizada por la anhidrasa carbónica. La acumulación del anión bicarbonato (HCO_3^-) en los fotorreceptores de *Drosophila* también podría ser causante del desplazamiento del potencial de inversión de las curvas I vs.V. Sin embargo, la salida de HCO_3^- , en conjunto con los iones Cl^- desde la célula aumentaría la amplitud de la corriente de entrada, de modo que el potencial de inversión probablemente se desplazaría hacia potenciales más positivos, al contrario de lo que se observa en las curvas I vs.V de las corrientes aquí estudiadas.

En neuronas maduras la concentración de bicarbonato es regulada por sistemas encargados de mantener la homeostasis iónica. Se ha reportado que transportadores de

Cl^- tales como el cotransportador K^+/Cl^- o el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ modulado por Na^+ alteran el potencial de equilibrio del Cl^- (Jentsch y Günther, 1997; Jarolimek et al., 1999). En *Drosophila* se ha reportado y caracterizado un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ acoplado a cationes cuyo ARN mensajero fue identificado durante todo el desarrollo, detectándose principalmente en el sistema nervioso central (Romero y col., 2000). Interesantemente, en oocitos de *Xenopus* donde este intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ fue expresado en forma heteróloga se registraron despolarizaciones medidas como una corriente de entrada tras alterar la concentración extracelular de Cl^- o HCO_3^- , de modo de aumentar el gradiente electroquímico de uno de estos iones. No obstante, no se descartó la posibilidad de que se tratara de corrientes endógenas del sistema de expresión o de una corriente de fuga a través de este tipo de intercambiador.

— La posibilidad de que un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ modulado por sodio (Na^+) esté presente en células fotorreceptoras de *Drosophila*, a pesar de no tratarse de un transportador electrogénico, podría ser parte de los factores que pudieran alterar el potencial de equilibrio de Cl^- determinado de las curvas I vs. V construidas a partir de los registros de las corrientes que aquí se describen.

Las diferentes formas adoptadas por las curvas de activación y desarrollo temporal de las corrientes de entrada registradas fueron el criterio con el que éstas se agruparon en los tipos I, II y III, siendo las corrientes de tipo I aquellas con una cinética de activación más lenta, cuyo desarrollo no presentó inactivación en el tiempo. En el caso de las corrientes tipo II y III la activación fue más rápida y sólo las corrientes tipo II presentaron inactivación rápida en respuesta a potenciales hiperpolarizantes.

Teniendo en cuenta que el criterio de clasificación empleado para agrupar las corrientes tipo I, II y III obtenidas en esta memoria de título se basó principalmente en la determinación del desarrollo temporal de la respuesta de la célula a un protocolo de pulsos de potencial, podríamos estar, no obstante, en presencia de más de un componente de la corriente en cada caso, considerando que en los tipos I, II y III se detectó una salida de corriente a potenciales despolarizantes, en circunstancias donde se esperó registrar sólo corrientes de rectificación de entrada en las condiciones iónicas utilizadas. Un criterio adicional que permita caracterizar los registros de corriente obtenidos sería determinar la magnitud de las conductancias a partir de las curvas I vs. V de cada familia de corrientes macroscópicas.

Otro de los antecedentes que nos hace suponer la existencia de más de un tipo de corriente es la determinación de un potencial de inversión de la corriente de Cl^- distinto al que predice la ecuación de Nernst

En mamíferos, los canales de Cl^- activados por voltaje tipo ClC-2 como los tipo ClC-3 han sido localizados en el cerebro (Thiemann y col., 1992). En neuronas piramidales de hipocampo de rata, la presencia de una corriente rectificadora de entrada activada por voltaje ha sido asociada a la expresión del ARN mensajero de ClC-2 detectado en esa porción del cerebro (Smith y col., 1995). Registros de *patch-clamp* realizados en configuración de célula completa para la detección de corrientes tipo ClC-2 y ClC-3 en esta clase de células interesantemente se asemejan a los registros en fotorreceptores de *Drosophila* obtenidos durante la presente memoria de título.

Por otra parte, en los estudios electrofisiológicos realizados en neuronas piramidales de hipocampo en cerebro de rata, la curva I vs. V de rectificación de entrada activada por potenciales hiperpolarizantes se superpone a aquella correspondiente al componente de salida asociado a corrientes del tipo ClC-3 (Rossow y col., 2006). Adicionalmente, el desarrollo temporal de este tipo de corrientes de Cl⁻ en respuesta a potenciales despolarizantes, es similar al desarrollo temporal del componente de salida de los tipos de corriente I y III.

Independientemente del tipo de corriente registrada en nuestro estudio (tipo I, II o III), a potenciales hiperpolarizantes se distingue un componente de entrada, mientras que a potenciales despolarizantes, un componente de salida.

De acuerdo a los antecedentes mencionados anteriormente, queda para un trabajo posterior determinar si existe expresión de ClC-3 en fotorreceptores de *Drosophila*.

Dado que las corrientes registradas en los fotorreceptores durante el desarrollo de esta memoria fueron clasificadas en los mismos tres tipos (I, II y III), independiente de la forma en que se obtuvo la condición de célula completa, y dado que la proporción de cada una parece coincidir entre ambas metodologías, se puede aseverar que la diálisis del citoplasma no determinó la ocurrencia del tipo de corriente. Queda para un trabajo posterior investigar si existe correlación entre el tipo de corriente y el tipo de fotorreceptor que está siendo registrado, pues se conoce que los ocho fotorreceptores que conforman el omatidio son diferentes en términos moleculares. Por ejemplo, difieren en el tipo de rodopsina que expresan (Wernet y col., 2003; Earl y Britt, 2006), de manera que es razonable suponer que también puede existir una expresión diferencial del canal

de cloruro tipo CIC-2 descrito en *Drosophila*. Este razonamiento podría dar explicación a la detección aleatoria de uno u otro tipo de corriente en los experimentos de *patch-clamp* aquí descritos, donde la marcación para identificar cada fotorreceptor puede ser difícil de lograr sin que la estabilidad de la membrana se vea afectada en un registro posterior. Sin embargo, a modo de estrategia experimental que acote el estudio de estas corrientes, sería interesante realizar registros *patch-clamp* en mutantes de *Drosophila melanogaster* cuyos omatidios presenten sólo algunos de los 8 tipos de fotorreceptores (Mollereau y col., 2001).

Es importante mencionar que los porcentajes de registro de corrientes tipo I, II o III fueron determinados en base al número total de veces en que se logró obtener la configuración de célula completa, donde existió un bajo porcentaje de registro de corrientes cuyas características no formaron parte del criterio de clasificación usado para identificar las corrientes tipo I, II o III, correspondientes a corrientes cuyas características aparentemente se asociaban a más de un tipo o bien obedecían a oportunidades donde las amplitudes de corrientes no fueron detectables.

En las células donde se estudió el efecto de la estimulación con luz, la corriente no se vio afectada, según muestra la figura 3. Sin embargo, dado el escaso número de observaciones realizadas para determinar el efecto de la luz sobre las corrientes de entrada aquí analizadas, no podemos aseverar que la luz no tenga un efecto sobre los otros tipos de corriente detectados, en particular sobre el tipo CIC-2 descrito previamente en *Drosophila* (Ugarte y col., 2005).

Observaciones previas realizadas en nuestro laboratorio demostraron que el ácido linolénico (LNA) modula la actividad del canal de cloruro tipo CIC-2 presente en fotorreceptores de *Drosophila* (Ugarte y col., 2005). Por otro lado, se ha demostrado que el LNA, junto al ácido araquidónico, activa o modula las conductancias de luz TRP o TRPL, las cuales participan en la transducción visual (Chyb y col., 1999; Delgado y Bacigalupo, 2009). Se postula que estos ácidos grasos se producen durante la transducción del estímulo luminoso en los fotorreceptores de la *Drosophila*. Por consiguiente, dado que el soma de estos fotorreceptores es una estructura larga y angosta cuyo diámetro no supera los 2 μm , es razonable pensar que los ácidos grasos producidos en el rabadómero durante la fototransducción pueden difundir hasta alcanzar la membrana no rabadomérica, donde se localizan los canales de cloruro aquí estudiados, modulando su actividad. En base a lo anterior, es lógico suponer que la luz también podría tener un efecto modulador a través de la activación de corrientes por LNA. Sin embargo, también es posible que la tasa de difusión de este metabolito sea menor que su tasa de metabolización, de manera que no alcance concentraciones que permitan detectar un efecto de modulación evidente. Resultados anteriores, obtenidos de registros electrofisiológicos en parches aislados de membrana plasmática en configuración parche escindido (*inside-out*) y aquellos obtenidos del registro de corrientes macroscópicas, demuestran que el ácido linolénico (LNA) efectivamente modula la actividad del canal de cloruro tipo CIC-2 presente en fotorreceptores de *Drosophila* (Ugarte y col., 2005). Sin embargo, en el caso de las corrientes macroscópicas registradas en configuración de célula completa (*whole-cell*), la exposición al metabolito fue más inmediata, pues la cámara que contenía los fotorreceptores fue perfundida con una solución con LNA, cuya

concentración no presentaría variaciones significativas como las que se espera encontrar en una condición fisiológica donde la concentración del ácido graso dependerá de una condición más dinámica entre la tasa de síntesis y metabolización de éste.

Adicionalmente, también es posible que la incapacidad de detectar un efecto de modulación por luz en este estudio se haya debido a que el tiempo durante el cual la preparación fue sometida a oscuridad, previo a la estimulación con luz, no fue suficiente como para restablecer el estado basal de la corriente, el cual podría haber sido alterado por la exposición a luz durante la etapa de disección de retina y el establecimiento del resto de las condiciones de registro. Como consecuencia de este paradigma experimental, los parámetros cinéticos que caracterizan a las corrientes tipo CIC-2 resultarían ser similares en condiciones de luz y oscuridad.

Los análisis de datos de registros de experimentos de modulación por luz fueron presentados como amplitudes de corrientes en relación a la corriente máxima registrada, vs. voltaje. Al observar las curvas I vs. V sin normalizar previamente, no se observó un aumento importante de la amplitud del conjunto de corrientes de rectificación de entrada registradas luego de la estimulación con luz blanca. No obstante, sería importante realizar experimentos de modulación por luz donde se determinen las constantes de activación y de desarrollo de la corriente de modo de conocer el efecto de la luz sobre algunos de estos parámetros cinéticos.

II. Inmunoreactividad.

1. Análisis de *Western blot*.

Flores y col. (2006), utilizando la técnica de RT-PCR, identificaron en *Drosophila melanogaster* los ARNs mensajeros de dos variantes de empalme del gen CIC-2. Una de estas variantes se expresa en la cabeza y en el resto del cuerpo de la mosca, mientras que la otra se expresa sólo en la cabeza.

Considerando que la detección de la expresión del gen tipo CIC-2 de *Drosophila* fue realizada a nivel de transcripción, uno de los objetivos específicos de la presente memoria de título fue la identificación de la proteína obtenida a partir de la traducción de aquella variante de empalme detectada exclusivamente en la cabeza de *Drosophila*.

Dado que los genes CIC se hallan conservados en una amplia variedad de especies, se realizaron experimentos de *western blot* utilizando un anticuerpo policlonal anti CIC-2 de rata cuyo epítoto sólo está presente en la secuencia aminoacídica correspondiente a la variante de empalme que únicamente se expresa en la cabeza del animal. Se detectó en el extracto de retinas de *Drosophila* una banda de proteínas de una masa molecular de ~ 82 kDa similar a la de proteínas CIC-2 de mamíferos (Pusch y Jentsch, 1994; Schwieberg y col., 1998) y similar al valor de masa molecular obtenido por Ugarte y col. (2005) para CIC-2 expresado en fotorreceptores de *Drosophila*. Este resultado también es consistente con lo publicado por Flores y col. (2006), donde el valor de masa molecular fue estimado a partir del tamaño de los amplicones, obtenidos por RT-PCR, de la variante de empalme del gen CIC-2 exclusiva de la cabeza de la mosca.

2. Inmunofluorescencia de secciones de retina de *Drosophila*.

Con el propósito de conocer el patrón de expresión de la proteína CIC-2 durante el desarrollo de *Drosophila*, considerando que sólo una fracción de las corrientes registradas presentó algunas de las características cinéticas propias de las corrientes tipo CIC-2 al emplear omatidios de pupas de moscas no sincronizadas previamente, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia con el anticuerpo primario anti-CIC-2 de rata (*western blot*).

Dado que el patrón de expresión obtenido fue continuo durante el desarrollo pupal de *Drosophila* queda pendiente averiguar si existe algún mecanismo de regulación de la actividad de CIC-2 por factores localizados diferencialmente en los fotorreceptores que conforman el omatidio (R1-R8); esto podría explicar en parte la detección de corrientes con distintos parámetros cinéticos de activación y desarrollo. Con el mismo objetivo, sería interesante conocer el patrón de expresión durante el desarrollo de la variante de empalme del gen CIC-2 presente en la cabeza como en el resto del cuerpo de la mosca.

Es interesante destacar que en los fotorreceptores de *Drosophila* existen proteínas que comienzan su expresión a partir de estadios tempranos en el desarrollo de la mosca. Sin embargo, en algunos casos la función que éstas desempeñan puede cambiar a través del desarrollo, involucrando distintos procesos biológicos y/o fisiológicos en cada estadio. Es el caso de la rodopsina (Kumar y Ready, 1995); ésta participa directamente en la cascada de transducción visual en etapas avanzadas del

desarrollo de fotorreceptores, y presenta una función estructural clave en la formación de este tipo de células en etapas tempranas.

Se ha informado que en la retina de rata, anticuerpos específicos anti-CIC-2 identificaron una proteína en la membrana de células bipolares de bastones así como también en capas sinápticas, lo que sugirió, junto a otros resultados obtenidos, el rol de CIC-2 en la mantención de la homeostasis de Cl^- en neuronas cuyos canales de Cl^- son activados por ligandos (Enz y col., 1999). Coincidentemente, en *Drosophila*, los anticuerpos anti CIC-2 empleados identificaron este tipo de canal tanto en la membrana plasmática de los fotorreceptores como en regiones sinápticas del sistema visual.

Dado que la expresión de los canales de la familia CIC es ubicua, y considerando que en *Drosophila* una de las variantes de empalme del gen de CIC-2 se expresa exclusivamente en la cabeza, es probable que la expresión de CIC-2 esté vinculada a procesos de desarrollo retinal en mosca, tal como se ha descrito para otros tipos de epitelio cuyo desarrollo se altera al anular la expresión de CIC-2 (Bösl y col, 2001).

Aunque se ha sugerido la importancia fisiológica de los canales CIC-2 en fotorreceptores de vertebrados, basados en la progresiva degeneración retinal de ratones *knock-out* para CIC-2, la relevancia de este canal en la fisiología de fotorreceptores de *Drosophila* aún es desconocida. En otros fotorreceptores de invertebrados y otros tipos celulares, hay evidencias que sugieren que las conductancias rectificadoras de entrada evitan una hiperpolarización excesiva que podría ser dañina para las células (Phillips y al., 1992; Wang y al., 2005). En tales casos, la rectificación de entrada confina el potencial de reposo en oscuridad a un rango cercano al potencial de equilibrio para el

potasio (K^+). Esto podría ser lo que ocurre en los fotorreceptores de *Drosophila*, donde un rectificador de entrada como CIC-2 tendería a despolarizar la célula en respuesta a una hiperpolarización de la membrana, proporcionando un mecanismo de retroalimentación negativa que tienda a reducir esta condición, la cual puede ser generada por procesos electrogénicos como los de la Na^+/K^+ ATPasa en su actividad de restituir los gradientes de concentración de Na^+ y K^+ .

Con el objetivo de conocer la importancia fisiológica de CIC-2 en el funcionamiento de los fotorreceptores de *Drosophila*, considerando que se trata de un organismo modelo ideal para la manipulación genética y molecular, sería interesante lograr el desarrollo de cepas mutantes empleando transposones o elementos-P con los cuales alterar o anular la expresión de CIC-2 ya sea temporal o espacialmente (de manera tejido-específica). De este modo, sería posible conocer más-en-detalle aquellas corrientes generadas por el canal tipo CIC-2 de *Drosophila*. Adicionalmente sería posible contar con controles negativos más apropiados para la realización de nuevos experimentos de inmunohistoquímica.

En síntesis, en el presente trabajo de Seminario de Título se encontró que además de las corrientes tipo CIC-2 descritas previamente en los fotorreceptores de la *Drosophila*, estas células presentan otras corrientes que se activan cuando se hiperpolariza la membrana, cuyas propiedades de activación y curso temporal difieren de las tipo CIC-2, y representan aproximadamente el 60 % del total de las corrientes registradas (n = 6, parche perforado; n = 32, succión y zap). De acuerdo a la similitud de sus características cinéticas, éstas fueron clasificadas en dos grupos: tipo II y tipo III.

Adicionalmente, se estudió el efecto de la luz en aquellas corrientes con características cinéticas similares a las corrientes tipo CIC-2. En células que presentaron este tipo de corrientes, no se detectaron alteraciones importantes de las propiedades de activación y desarrollo que evidenciaran un efecto de modulación por el estímulo luminoso.

Finalmente, con el propósito de determinar la localización de la proteína asociada a las corrientes de cloruro tipo CIC-2, registradas en los ommatidios de la mosca, se realizaron experimentos de *western blot* donde se verificó la presencia de una proteína que se localiza en la membrana plasmática extrarabdomérica de las células fotorreceptoras de individuos adultos y de pupas. Adicionalmente, por medio de metodologías de inmunofluorescencia y microscopía confocal, se realizó un estudio para determinar el patrón de expresión de la proteína asociada a la corriente tipo CIC-2 durante el desarrollo. Se encontró que dicha proteína no se expresa en larvas en etapa III, mientras que la expresión es continua durante todos los estadios de desarrollo pupal analizados.

Queda para un trabajo posterior realizar estudios adicionales de la corriente tipo CIC-2, así como también realizar una caracterización de las otras corrientes encontradas en el presente Seminario de Título, de manera de lograr develar el rol fisiológico de este canal de cloruro en los fotorreceptores de *Drosophila melanogaster*.

Bibliografía

- Blaisdell, C.J., Edmonds, R.D., Wang, X.T., Guggino, S. y Zeitlin, P.L. 2000. pH-regulated chloride secretion in fetal lung epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **278**: L1248-L1255.
- Bösl, M.R., Stein, V., Hubner, C., Zdebik, A.A., Jordt, S., Mukhopadhyay, A.K., Davidoff, M.S., Holstein, A. y Jentsch, T.J. 2001. Male germ cells and photoreceptors, both depending on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl⁻ channel disruption. *The EMBO journal* **20** (6): 1289-1299.
- Chesnoy-Marchais, D. y Fritsch, J. 1994. Activation of hyperpolarization and atypical osmosensitivity of a Cl⁻ current in rat osteoblastic cells. *J Membr Biol* **140**: 173-188.
- Chyb, S., Raghu, P. y Hardie, R.C. 1999. Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature* **397**: 255-259.
- Clark, S., Jordt, S.E., Jentsch, T.J. y Mathie, A. 1998. Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J Physiol (Lond)* **506**: 665-678.
- Cooper, E.C. y Yeh Jan, L. 1999. Ion channel genes and human neurological disease: Recent progress, prospects, and challenges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **96**: 4759-4766.
- Cooper, M.T. y Bray, S.J. 2000. R7 photoreceptor specification requires Notch activity. *Curr. Biol* **10**: 1507-1510.
- Delgado, R and Bacigalupo J. 2009. Unitary recordings of TRP and TRPL channels from isolated *Drosophila* retinal photoreceptor rhabdomeres: Activation by light and lipids. *Journal of Neurophysiology* **101**: 2372-2379.
- Dutzler A., Campell, E.B., Cadene, M., Chait, B.T. y Mackinnon, R. 2002. 3.0 Å X-ray structure of a CIC chloride channel reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature.* **415** (6869): 287-294.
- Dutzler, R. 2004. Structural basis for ion conduction and gating in CIC chloride channels. *FEBS Letters* **564** (3): 229-233.
- Earl, J.B. and Britt, S.G. 2006. Expression of *Drosophila* rhodopsins during photoreceptor cell differentiation: Insights into R7 and R8 cell subtype commitment. 2006. *Gene Expression Patterns* **6**: 687-694.
- Enz, R., Ross, B.J. and Cutting, G.R. 1999. Expression of the voltage-gated-chloride channel CIC-2 in rod bipolar cells of the rat retina. *The Journal of Neuroscience.* **19** (22): 9841-9847.
- Estévez, R., Pusch, M., Ferrer-Costa, C., Orozco, M. y Jentsch, T.J. 2004. Functional and structural conservation of CBS domains from CIC chloride channels. *J Physiol.* **557** (Pt 2): 363-378.
- Flores, C.A., Niemeyer, M.I., Sepúlveda, F.V. y Cid, P. 2006. Two splice variants derived from a *Drosophila Melanogaster* candidate CIC gene generate CIC-2 type Cl⁻ channels. *Molecular Membrane Biology* **23** (2): 149-156.

- Freeman, M. 1997. Cell determination strategies in the *Drosophila* eye. *Development* **124**: 261-270.
- Furukawa, T., Ogura, T., Katayama, Y. y Hiraoka, M. 1998. Characteristics of rabbit ClC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* **274**: C500-C512.
- Furukawa, T., Ogura, T., Zheng, Y., Tsuchiya, H., Nakaya, H., Katayama, Y. y Inagaki, N. 2002. Phosphorylation and functional regulation of ClC-2 chloride channels expressed in *Xenopus* oocytes by M cyclin-dependent protein kinase. *Journal of Physiology* **540** (3): 883-893.
- García-Olivares, J., Alekov, A., Boroumand, M.R., Begemann, B., Hidalgo, P., Fahlke, C. 2008. Gating of human ClC-2 chloride channels and regulation by carboxy-terminal domains. *Journal of Physiology* **586** (22): 5325-5336.
- Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M. y Jentsch, T.J. 1992. Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* **360**: 59-762.
- Günther, W., Lüchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A. y Jentsch, T.J. 1998. ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc. Natl Acad Sci USA (PNAS)* **(95)**: 8075-8080.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. y Sigworth, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**: 85-100.
- Hanke, W. y Miller, C. 1983. Single chloride channels from *Torpedo electroplax*. Activation by protons. *J Gen Physiol* **82**: 25-45.
- Hardie, R.C. 1991. Voltage-sensitive potassium channels in *Drosophila* photoreceptors. *The Journal of Neuroscience.* **11** (10): 3079-3095.
- Hardie, R.C. y Raghu, P. 2001. Visual transduction in *Drosophila*. *Nature.* **413**: 186-193.
- Hille, B. 1967. The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. *The Journal of General Physiology* **50**: 1287-1302.
- Huber, S.M., Duranton, C., Henke, G., Van de Sand, C., Heussler, V., Shumilina, E., Sandu, C.D., Tanneur, V., Brand, V., Kasinathan, R.S., Lang, K.S., Kremsner, P.G., Hübner, C.A., Rust, M.B., Dedek, K., Jentsch, T.J. y Lang, F. 2004. *Plasmodium* induces swelling-activated ClC-2 anion channels in the host erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry.* **279** (40): 41444-41452.
- Iyer, R., Iverson, T.M., Accardi, A. y Miller, C. 2002. A biological role for prokaryotic ClC chloride channels. *Nature* **419**: 715-718.
- Jarolimek, W., Lewen, A., Misgeld, U. 1999. A furosemide-sensitive K⁺-Cl⁻ cotransporter counteracts intracellular Cl⁻ and depletion in cultured rat midbrain neurons. *Journal of Neuroscience* **19**: 4695-4704.
- Jentsch, T.J, Steinmeyer, K. y Schwarz, G. 1990. Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature (Lond)* **348**: 510-514.
- Jentsch, T.J. and Günther, W. 1997. Chloride channels: an emerging molecular picture. *Bio Essays* **19**: 117-126.

- Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F. y Zdebik, A.A. 2002. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev.* **82**: 503-568.
- Jordt, S.E. y Jentsch, T.J. 1997. Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. *EMBO J* **16**: 1582-1592.
- Koch, M.C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K.H. y Jentsch, T.J. 1992. The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* **257**: 797-800.
- Kornak, U., Kasper, D., Bösl, M.R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G. y Jentsch T.J. 2001. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* **104**: 205-215.
- Kumar, J.P. y Ready, D.F. 1995. Rhodopsin plays an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor development. *Development* **121**: 4359-4370.
- Lloyd, S.E., Pearce, S.H., Fisher, S.E., Steinmeyer, K., Schwappach, B., Scheinman, S.J., Hardign, B., Bolino, A., Devoto, M., Goodyer, P., Rigden, S.P., Wrong, O., Jentsch, T.J., Craig, I.W. y Thakker, R.V. 1996. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* **379**: 445-449.
- Longley, R.L., Jr. y Ready, D.F. 1995. Integrins and the development of three-dimensional structure in the *Drosophila* compound eye. *Developmental Biology* **171**: 415-433.
- Matsumura Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S.B., Hayama, A., Morimoto, T., Liu, W., Arisawa, M., Sasaki, S. y Marumo, F. 1999. Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the ClC-K1 chloride channel. *Nat Genet* **21**: 95-98.
- Mindell, J.A. y Maduke, M. 2001. Protein family review: ClC chloride channels. *Genome Biology*, **2** (2): reviews3003.1-3003.6.
- Mollereau, B., Dominguez, M., Webel, R., Colley, N.J., Keung, B., Celisk, J.F. and Desplan, C. 2001. Two-step process for photoreceptor formation in *Drosophila*. *Nature* **412**: 911-913.
- Montell, C. 2005. TRP channels in *Drosophila* photoreceptor cells. *J. Physiol.* **567**: 45-51.
- Nathan, R.D., Kanai, K., Clark, R.B. y Giles, W. 1988. Selective block of calcium current by lanthanum in single bullfrog atrial cells. *The Journal of General Physiology* **91**: 549-572.
- Niemeyer, M.I., Yusef, Y.R., Cornejo, I., Flores, C., Sepúlveda, F.V. y Cid, L.P. 2004. Functional evaluation of human ClC-2 chloride channel with idiopathic generalized epilepsies. *Physiol Genomics* **19**: 74-83.
- Park, K., Arreola, J., Begenisich, T. y Melvin, J.E. 1998. Comparison of voltage-activated Cl⁻ channels in rat parotid acinar cells with ClC-2 in a mammalian expression system. *J Membr Biol* **163**: 87-95.
- Pauli, B.U., Abdel-Ghany M., Cheng, H.C., Gruber, A.D., Archibald, H.A. y Elble, R.C. 2000. Molecular characteristics and functional diversity of ClCA family members. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **27**: 901-905.
- Phillips, C.L., Bacigalupo, J., O'Day, P.M. 1992. Inward rectification in *Limulus* ventral photoreceptors. *Vis. Neurosci.* **8**: 19-25.

- Pusch, M. y Jentsch, T.J. 1994. Molecular physiology of voltaje-gated chloride channels. *Physiol. Rev.* **74**: 813-827.
- Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A. y Jentsch, T.J. 1995. Gating of the voltage-dependent chloride channel CIC-0 by the permeant anion. *Nature* **373**: 527-531.
- Pusch, M., Jordt, S.E., Stein, V. y Jentsch, T.J. 1999. Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *J Physiol (Lond)* **515**: 341-353.
- Raghu, P., Usher, K., Jonas, S., Chyb, S., Polyanovsky, A. y Hardie, R.C. 2000. Constitutive activity of the light-sensitive channels TRP and TRPL in the *Drosophila* diacylglycerol kinase mutant, *rdgA*. *Neuron* **26**: 169-179.
- Ranganathan, R., Harris, W.A. y Zuker, C.S. 1991. The molecular genetics of invertebrate phototransduction. *Trends in neurosciences.* **11 (14)**: 486-493.
- Romero, M.F., Henry, D., Nelson, S., Harte, P.J., Dillon, A.K. and Sciortino C.M. 2000. Cloning and characterization of a Na⁺-Driven Anion Exchanger (NDAE1). A new bicarbonate transporter. *The Journal of Biological Chemistry* **275 (32)**: 24552-24559.
- Rossow, C.F., Duan, D., Hatton, W.J., Britton, F., Hume, J.R. and Horowitz, B. 2006. Functional role of amino terminus in CIC-3 chloride channel regulation by phosphorylation and cell volume. *Acta Physiol.* **187**: 5-19.
- Schwappach, B., Stobrawa, S., Hechenberger, M., Steinmeyer, K. y Jentsch, T.J. 1998. Golgi localization and functionally important domains in the NH₂ and COOH terminus of the yeast CIC putative chloride channel Gef1p. *J Biol Chem* **273**: 15110-15118.
- Schwiebert, E.M., Cid-Soto, L.P., Stafford, D., Carter, M., Blaisdell, C.J., Zeitlin, P.L., Guggino, W.B. y Cutting, G.R. 1998. Analysis of CIC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3879-3884.
- Simon, D.B., Bindra, R.S., Mansfield, T.A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., Rodríguez-Soriano, J., Morales, J.M., Sanjad, S.A., Taylor, C.M., Pilz, D., Brem, A., Trachtman, H., Griswold, W., Richard, G.A., John E. y Lifton, R.P. 1997. Mutations in the chloride channel gene, *CICNKB*, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet* **17**: 171-178.
- Smith, R.L., Clayton, G.H., Wilcox, C.L., Escudero, K.W. y Staley, K.J. 1995. Differential expression of an inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neurons: a potential mechanism for cell-specific modulation of postsynaptic inhibition. *Journal of Neuroscience* **15**: 4057-4067.
- Staley, K., Smith, R., Schaack, J., Wilcox, C. y Jentsch, T.J. 1996. Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CIC-2 chloride channel. *Neuron* **17(3)**: 543-551.
- Steinmeyer, K., Klocke, R., Ortland, C., Gronemeier, M., Jockusch, H., Gründer, S. y Jentsch, T.J. 1991. Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature* **354**: 304-308.

- Stobrawa, S.M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A.A., Bösl, M.R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A., Jahn, R. y Jentsch, T.J. 2001. Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* **29**: 185-196.
- Thiemann A., Gründer, S., Pusch, M. y Jentsch, T.J. 1992. A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* **356**: 57-60.
- Tomlinson, A. y Struhl, G. 2001. Delta/Notch and Boss/Sevenless signals act combinatorially to specify the *Drosophila* R7 photoreceptor. *Mol. Cell.* **7**: 487-495.
- Tulk, B.M., Schlesinger, P.H., Kapadia, S.A. y Edwards J.C. 2000. Clc-1 functions as a chloride channel when expressed and purified from bacteria. *J Biol Chem* **275**: 26986-26993.
- Ugarte, G., Delgado, R., O'Day, P.M., Farjah, F., Cid, L.P., Vergara, C. y Bacigalupo, J. 2005. Putative ClC-2 Chloride Channel Mediates Inward Rectification in *Drosophila* Retinal Photoreceptors. *J. Membrane Biol.* **207**: 151-160.
- Walther, R.F. y Pichaud, F. 2007. Immunofluorescent staining and imaging of the pupal and adult *Drosophila* visual system. *Nature Protocols.* **Vol.1 No.6**: 2626-2642.
- Wang, T., Xu, H., Oberwinkler, J., Gu, Y., Hardie, R.C., Montell, C. 2005. Light activation, adaptation, and cell survival functions of the Na⁺/Ca⁺ exchanger CalX. *Neuron* **45**: 367-378.
- Weinreich, F. y Jentsch, T.J. 2001. Pores formed by single subunits in mixed dimers of different ClC chloride channels. *J Biol Chem* **276**: 2347-2353.
- Wernet, M.F., Labhart, T., Baumann, F., Mazzoni, E.O., Pichaud, F. and Desplan, C. 2003. Homothorax switches function of *Drosophila* photoreceptors from color to polarized light sensors. *Cell* **115**: 267-279.
- Wolff, T. 2000. Histological techniques for the *Drosophila* eye. Part I: Larva and pupa. *En* Sullivan, W., Ashburner, M. y Scott Hawley, R (eds.). *Drosophila* Protocols. pp: 201-227. CSHL Press. New York.
- Zuker, C.S. 1996. The biology of vision in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 571-576.