

00591



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

"CORRIENTES IÓNICAS EN NEURONAS VINCULADAS
AL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA
EN *Drosophila melanogaster*"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A
GABRIEL ALBERTO GASQUE MARTÍNEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DEL Dr. ALBERTO DARZON

CUERNAVACA, MOR.

2005



m346575



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Gerardo Alberto
Gregorio Martínez
FECHA: 04/08/2005
FIRMA: [Firma]

Vosotras, las familiares,
inevitables golosas,
vosotras, moscas vulgares,
me evocáis todas las cosas....

Antonio Machado

A mi familia:

Claudia

Wilma

Alberto

Leonardo

Fernanda

Mil gracias

PRESENTACIÓN

Este trabajo se realizó, en su mayor parte, en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Alberto Darszon, con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM.

Parte de este trabajo se realizó en el Centro de Estudios Científicos de Chile, bajo la dirección del Dr. Pedro Labarca.

Los resultados de esta investigación se presentaron parcialmente en los siguientes congresos nacionales:

XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Puerto Vallarta, Jal. 3-8 Nov. 2002. Gasque G, Reynaud E, Labarca P y Darszon A. Corrientes de K^+ en neuronas de los cuerpos fungiformes de *Drosophila melanogaster*.

XLVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Boca del Río, Ver. 1-5 Ago, 2004. Gasque G, Labarca P, Reynaud E, y Darszon A. Shal codifica la corriente tipo A principal en las neuronas de los cuerpos fungiformes de *Drosophila* y Shaker segrega a un subconjunto de estas células.

E internacionales:

47th Annual Meeting of the Biophysical Society. San Antonio, TX. Mar. 1-6, 2003
Gasque G, Reynaud E, Labarca P and Darszon A. K^+ currents in *Drosophila* mushroom body neurons: the contribution of Shaker.

10th European Symposium on *Drosophila* Neurobiology, Neuchatel, Switzerland, Sept. 4-7, 2004. Gasque G, Labarca P, Reynaud E and Darszon A. Shal is the major A-type current in the *Drosophila* mushroom body intrinsic neurons and Shaker segregates to a subset of these cells.

La tesis se presenta en dos secciones: el manuscrito principal y los artículos preparados con parte de los resultados de la investigación (Apéndice I):

Gasque G, Labarca P, Reynaud E, Darszon A (2005) Shal and Shaker differential contribution to the K⁺ currents in the *Drosophila* mushroom body neurons. *J Neurosci* **25**(9):2348-2358

Gabriel Gasque, Pedro Labarca, Alberto Darszon (2005) Colesterol-depleting compounds modulate K⁺ currents in *Drosophila* Kenyon cells. *Submitted*

Agradezco:

Al Dr. Alberto Darszon por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, y embarcarse conmigo en este proyecto de investigación. Agradezco su continuo interés y consejos.

Al Dr. Pedro Labarca, su energía y pasión por la Ciencia.

A los miembros del Comité Tutorial, Drs. Martha Vázquez y Gabriel Cota, su precisión mecánica: siempre supieron cuando y donde apretar las tuercas.

A los miembros del Jurado, Drs. Omar Pantoja, Mario Zurita, Froylán Gómez, Arturo Hernández, Jean Louis Charli y Enrique Reynaud.

A los Drs. Claudia Treviño, Ricardo Félix, Enrique Reynaud, Mario Zurita, Omar Pantoja, Chris Wood por su cercana interacción siempre enriquecedora.

A los que me padecieron durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Alberto Darszon: Yuyú, Takuya, Carlos, Daniel, Nacho, Laura, Blanca, Lucía, Gisela, Esmeralda, Carmen, José Luis, Délany, Carolina, Doña Francis, Sr. Juan, Mary Paz, Tony, Juan José, Irene, Pablo, Priscila, Yuri.

A los miembros del laboratorio del Dr. Pedro Labarca: Ricardo, Carlos, Carolina y Ramón.

Sin Claudia Sánchez este trabajo no podría haberse realizado, pues uno no puede vivir sin corazón.

Que esta tesis sea además un abrazo cariñoso y de infinito agradecimiento a los compañeros de viaje: Jimena, Ricardo, Liliana, Nora, Rocío, Pavel, Mariana, Viviana, Elia, Selene, Alejandro.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	
<i>Aprendizaje y memoria en Drosophila melanogaster</i>	5
<i>Los Cuerpos Fungiformes</i>	6
<i>El canal de K⁺ Shaker y el aprendizaje asociativo olfativo</i>	9
<i>Canales inactivantes de K⁺ y aprendizaje en otras especies</i>	10
<i>Importancia de la modulación de canales de K⁺</i>	12
<i>Modulación de canales de K⁺ por el contenido de esteroides en la membrana plasmática</i>	13
OBJETIVOS	
<i>Objetivo general</i>	14
<i>Objetivo específicos</i>	15
METODOLOGÍA	
<i>Líneas de moscas Drosophila</i>	15
<i>Análisis de RT-PCR</i>	20
<i>Expresión de dShal recombinante</i>	21
<i>Registros electrofisiológicos en músculos de larvas</i>	21
<i>Preparación de neuronas de los Cuerpos Fungiformes para registros electrofisiológicos</i>	22
<i>Inmunocitoquímica de los cultivos neuronales</i>	24
<i>Registros electrofisiológicos en las neuronas</i>	25
<i>Adquisición y análisis de datos</i>	27
RESULTADOS	
<i>RT-PCR de los canales de K⁺ dependientes de voltaje de los Cuerpos Fungiformes</i>	29
<i>Propiedades de la corriente tipo A en las neuronas de los Cuerpos Fungiformes</i>	29
<i>Las corrientes de K⁺ de las neuronas de los Cuerpos Fungiformes son diferencialmente sensibles a una toxina específica para Shal</i>	32
<i>Análisis de la inactivación en estado estacionario</i>	34

<i>Las neuronas de los Cuerpos Fungiformes sh^{KS133}</i>	
<i>carecen de un componente de inactivación rápida</i>	36
<i>El componente resistente a 4-aminopiridina</i>	39
<i>Modulación de las corrientes de K⁺ por el contenido de esteroides</i>	
<i>en la membrana plasmática</i>	39
DISCUSIÓN	
<i>Corrientes de célula completa en neuronas disociadas</i>	
<i>de los Cuerpos Fugiformes de larva</i>	46
<i>La contribución de Shal a la corriente total</i>	49
<i>La contribución de Shaker a la corriente total</i>	50
<i>Otros canales de K⁺ dependientes de voltaje</i>	53
<i>Especulación sobre el papel de las neuronas de los Cuerpos Fungiformes</i>	
<i>durante el aprendizaje olfativo</i>	55
<i>Modulación de los canales de K⁺ dependientes de voltaje</i>	
<i>por el contenido de esteroides en la membrana plasmática</i>	57
PERSPECTIVAS	59
REFERENCIAS	60
APÉNDICE I	71

RESUMEN

Los canales iónicos dependientes de voltaje determinan las propiedades del potencial de acción (PA) en las neuronas. La modulación de las propiedades intrínsecas de la membrana de las neuronas puede alterar profundamente el desenvolvimiento y la dinámica de las redes neuronales y representa un importante mecanismo celular de la plasticidad del comportamiento que ha recibido poca atención en los estudios de memoria y aprendizaje. Los canales selectivos a K^+ al abrirse estabilizan el potencial de membrana acercándolo al potencial de equilibrio del K^+ y alejándolo del umbral de disparo del PA. En las células excitables la función de todos los tipos de canales selectivos para K^+ se relaciona con esta estabilización. Estos canales establecen el potencial de reposo, mantienen cortos los PAs, terminan los períodos de actividad intensa, dan temporalidad a los espacios entre las espigas en las neuronas que disparan repetitivamente y, en general, disminuyen la eficiencia de los estímulos excitatorios.

Los canales de K^+ se han relacionado en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* con el aprendizaje asociativo olfativo. Shaker, un canal de K^+ dependiente de voltaje (Kv), se expresa enriquecidamente en los Cuerpos Fungiformes (MBs, por sus siglas en inglés), los cuales son el locus celular de la memoria olfativa en insectos. Mutaciones en el gene *shaker* alteran la excitabilidad, la transmisión y plasticidad sináptica, y el aprendizaje olfativo. Sin embargo, se desconoce la relación directa entre fallas en el canal Shaker y la fisiología de las neuronas de los MBs (NMBs). En este trabajo se emplearon herramientas genéticas, farmacológicas y biofísicas para establecer la contribución de Shaker a la corriente de K^+ de las NMBs disociadas. Se encontró que los transcritos para cuatro genes que codifican para canales Kv, *shaker*, *shal*, *shab* y *shaw*, se expresan en los MBs. De estos cuatro, sólo *shal* y *shaker* conducen una corriente inactivante tipo A. Los datos electrofisiológicos muestran que la

ausencia de canales Shaker funcionales modifica los valores de los potenciales medios de inactivación ($V_{1/2}$) en un subgrupo de NMBs, indicando la segregación de Shaker a un subconjunto de las mismas (~28%). En este mismo sentido, se encontró que aproximadamente el 20% de las NMBs que carecen de canales Shaker funcionales muestran corriente más pequeñas con cinéticas de inactivación más lentas. Más aún, sólo un subconjunto de NMBs (~24%) mostró resistencia a una toxina específica para Shal, aunque todas fueron sensibles a un bloqueador general de corrientes tipo A. Este subconjunto de neuronas que despliega la corriente resistente a la toxina, tiene también valores de $V_{1/2}$ despolarizados atribuidos previamente a los canales Shaker. Los resultados obtenidos proveen la primera evidencia que la función alterada de los canales Shaker perturba la fisiología de las NMBs en *Drosophila*, e indican que estas deficiencias segregan exclusivamente a una fracción de los somas de estas células. Los datos descritos permiten concluir que Shal es el conductor principal de la corriente somática tipo A en las NMBs.

Adicionalmente, se estudió la modulación de los canales Kv por el contenido de esteroides en la membrana plasmática. Los esteroides son componentes ubicuos de las membranas de los eucariotas y son determinantes en la formación de balsas lipídicas. Las balsas lipídicas, a su vez, participan en la distribución y función de las proteínas de membrana. Los datos muestran que la corriente de inactivación lenta conducida putativamente a través de canales Shab, se modula fuertemente por los esteroides. La corriente aumenta su amplitud y modifica su cinética. Los datos sugieren que la modulación de los canales Kv por el colesterol depende de una poza de este esteroide que se intercambia rápidamente con los compuestos capaces de sustraer colesterol de la membrana.

ABSTRACT

Voltage-dependent ion channels shape both the firing properties of neurons and their synaptic integration within neuronal networks that drive neuronal plasticity associated with the emergence of new behaviors. Modulation of intrinsic membrane properties of neurons can profoundly change network dynamics and performances, and may represent an important cellular mechanism for behavioral plasticity, one that has received less attention in learning and memory studies. When K^+ channels open they stabilize the membrane potential, drawing the membrane potential towards the K^+ equilibrium potential and farther from the firing threshold. In excitable cells, the function of all types of K^+ channels is related to this stabilization. K^+ channels set the resting potential, keep fast action potentials, terminate periods of intense activity, time the interspike intervals during repetitive firing, and in general lower the effectiveness of excitatory inputs.

Shaker, a voltage-dependent K^+ channel (Kv), is enriched in the mushroom bodies (MBs), the locus of olfactory learning in *Drosophila*. Mutations in the *shaker* locus are known to alter excitability, neurotransmitter release, synaptic plasticity, and olfactory learning. However, a direct link of Shaker channels to MB intrinsic neuron (MBN) physiology has not been documented. I found that transcripts for *shab*, *shaw*, *shaker*, and *shal*, among which only Shaker and Shal have been reported to code for A-type currents, are present in the MBs. The electrophysiological data showed that the absence of functional Shaker channels modifies the distribution of half-inactivation voltages ($V_{1/2}$) in the MBNs, indicating a segregation of Shaker channels to only a subset (~28%) of their somata. In accordance to these data, I found that ~20% of MBNs lacking functional Shaker channels displayed dramatically slowed-down outward current inactivation times and reduced peak-current amplitudes. Furthermore, whereas all MBNs were sensitive to a nonspecific A-type current blocker, a subset of neurons (~24%) displayed little

sensitivity to a Shal-specific toxin. This subset of neurons displaying toxin-insensitive outward currents had more depolarized $V_{1/2}$ values attributable to Shaker channels. My findings provide the first direct evidence that altered Shaker channel function disrupts MBN physiology in *Drosophila*. Surprisingly, the experimental data also indicate that Shaker channels segregate to a minor fraction of MB neuronal somata (20-30%), and that Shal channels contribute the somatic A-type current in the majority of MBNs.

Additionally, I show that the Kv channels expressed by the MBNs are up-modulated by compounds that remove sterols from the plasma membrane. Sterols are ubiquitous components of the eukaryotic plasma membrane and promote the formation of lipid rafts in membranes. Protein partition in and out of lipid rafts regulates their sorting and function, and might enhance interactions between them by increasing their local concentrations. Modulation by cholesterol of the *Drosophila* Kv channels seems to rely on a fast-exchanging sterol-pool, which more strongly affects the slowly inactivating current. These results provide the first evidence that sterols influence the operation of voltage-dependent ion channels in *Drosophila* neurons and strengthen the importance of lipid rafts in this biological model.

INTRODUCCIÓN

Aprendizaje y memoria en Drosophila melanogaster.

Las moscas de la fruta *Drosophila melanogaster* pueden aprender muchas cosas. Pueden aprender a escapar de un olor específico que se les presentó previamente junto con un choque eléctrico (Quinn et al., 1974). Adicionalmente, las moscas hambrientas pueden aprender a moverse hacia la fuente de un olor que se asoció previamente con una recompensa de azúcar (Tempel et al., 1983). Las moscas también pueden aprender referencias visuales, táctiles, propioceptivas y espaciales (Davis, 1996; Wolf et al., 1998; Liu et al., 1999). Los machos pueden aprender a atenuar su cortejo después de haber experimentado el rechazo de una hembra previamente apareada (McBride et al., 1999).

La memoria olfativa persiste por diferentes periodos de tiempo dependiendo del régimen específico de entrenamiento (Beck et al., 2000). El entrenamiento con la recompensa de azúcar parece producir memorias más duraderas que los entrenamientos equivalentes con castigo eléctrico. Empleando dos ciclos de entrenamiento, la memoria del reforzamiento negativo (castigo eléctrico) decae en 4-6 h; en tanto que la memoria del reforzamiento positivo (recompensa de azúcar) se aprecia aún después de 24 h. Cuando ambos reforzamientos se utilizan, el comportamiento es linealmente aditivo (Tempel et al., 1983). Es notable que entrenamientos repetitivos con intervalos de descanso (entrenamiento espaciado) pueden producir memorias que duran varios días (Tully et al., 1994b). Esta necesidad aparente del entrenamiento espaciado es similar al proceso requerido para la formación de memorias de muy largo plazo en otras especies, incluida la humana (Ebbinghaus, 1885; Kogan et al., 1997).

Los Cuerpos Fungiformes

Los Cuerpos Fungiformes (MBs, por sus siglas en inglés) son estructuras específicas en el cerebro de la mosca conformadas por ~2,500 neuronas intrínsecas (NMBs) o células de Kenyon cuyos somas residen en la corteza dorso-posterior de cada lóbulo cerebral (Figura 1). Los cálices de los MBs, localizados por debajo de los cuerpos neuronales, delimitan los campos dendríticos de las NMBs. Los axones de las NMBs, que posiblemente inervan regiones premotoras en el *protocerebro lateral* (Armstrong et al., 1998; Ito et al., 1998), proyectan anteriormente a través del pedúnculo y se ramifican hacia los lóbulos dorsales α y α' , y hacia los lóbulos medios β , β' , y γ (Crittenden et al., 1998; Lee et al., 1999).

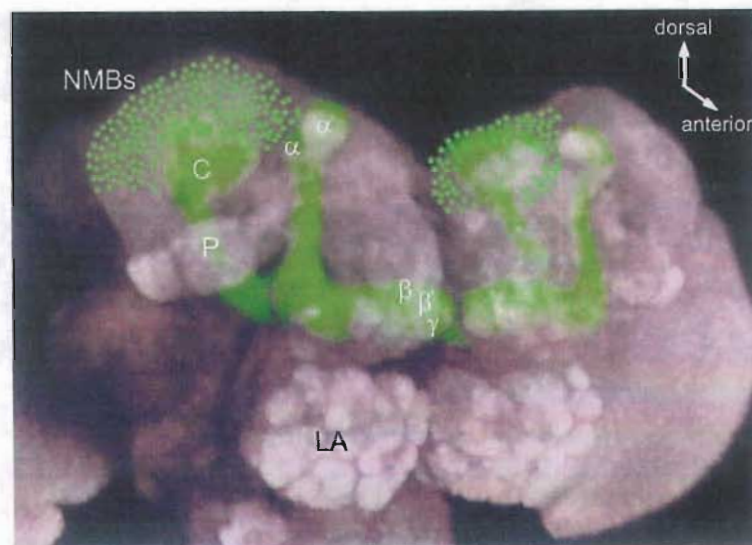
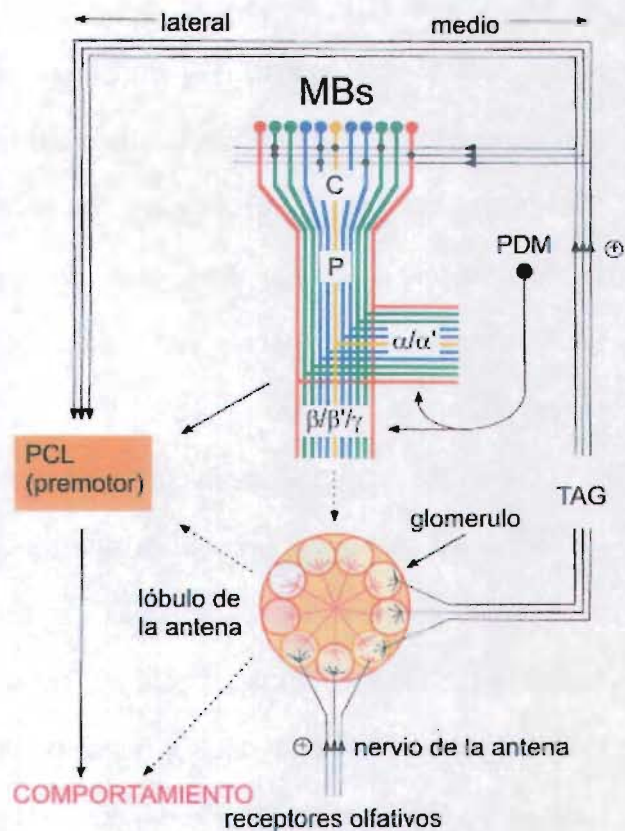


Figura 1. Proyección de los Cuerpos Fungiformes (MBs), en verde, sobre una reconstrucción tridimensional de un cerebro de *Drosophila*. Los somas de las neuronas de los MBs (NMBs) se localizan en la corteza dorso-posterior de cada lóbulo cerebral. Los cálices (C) contienen los campos dendríticos de las NMBs. El pedúnculo (P) es la fibra de axones de las NMBs que proyecta anteriormente antes de ramificarse en los lóbulos α , α' , β , β' y γ . Modificado de Zars et al. (2000).

Las NMBs son neuronas olfativas de tercer nivel. La innervación hacia y desde los MBs los sitúa en un *locus* adecuado para integrar la información sensorial y producir

nuevos comportamientos coherentes con la experiencia olfativa. Los olores se detectan inicialmente en las *neuronas receptoras olfativas* del tercer segmento de la antena y de las papilas maxilares (Stocker, 1994) (Figura 2). Los axones de las neuronas receptoras se proyectan a través del nervio de la antena hacia el lóbulo de la antena, donde forman sinapsis colinérgicas dentro de los glomérulos con las dendritas de dos clases de neuronas: las *neuronas de proyección colinérgicas* y las *interneuronas GABAérgicas*. Los axones de las neuronas de proyección, a su vez, transmiten la información olfativa a través del *tracto antenoglomerular (TAG)* a regiones premotoras en el *protocerebro lateral (PCL)* y hacia las dendritas de las NMBs (Ito et al., 1998) (Figura 2). Se piensa que las respuestas innatas (no condicionadas) a los olores emergen de la estimulación directa a los elementos premotores; en tanto que las respuestas condicionadas, a través de una vía moduladora que involucra a las NMBs (Hammer, 1997).

Figura 2. El sistema olfativo de *Drosophila* (el esquema que se muestra corresponde a un solo hemisferio). Las abreviaturas son las mismas que en la figura 1. Los olores se detectan inicialmente en las *neuronas receptoras olfativas*, localizadas en la antena. Los axones de las neuronas receptoras se proyectan a través del nervio de la antena hacia el lóbulo de la antena, donde forman sinapsis con las neuronas en los glomérulos. Los axones de las neuronas de proyección localizadas en el lóbulo de la antena transmiten la información olfativa a través del *tracto antenoglomerular (TAG)* a regiones premotoras en el *protocerebro lateral (PCL)* y hacia las dendritas de las NMBs, localizadas en el cáliz (C). Las neuronas del par dorsal medio (PDM) inervan los lóbulos ipsilaterales de los MBs. Modificado de Rosav et al. (2001).



La evidencia recabada en la literatura indica que el aprendizaje olfativo en *Drosophila melanogaster* depende de la actividad de los MBs (revisado en Roman y Davis, 2001). La destrucción genética o farmacológica de los MBs conduce a severas deficiencias en la capacidad de las moscas para aprender, aunque permanece intacta la percepción de los estímulos sensoriales empleados durante el entrenamiento (Heisenberg et al., 1985; de Belle y Heisenberg, 1994). Diversos genes requeridos para el aprendizaje asociativo olfativo se expresan preferentemente en los MBs (Roman y Davis, 2001). Adicionalmente, el gene *amnesiac*, que se identificó en ensayos de aprendizaje (Quinn et al., 1979), se expresa específicamente en un par de neuronas llamadas dorsomedias que proyectan hacia e inervan profusamente los lóbulos ipsilaterales de los MBs (Waddell et al., 2000) (Figura 2).

Además del análisis de las diversas mutantes del aprendizaje y la memoria, dos estudios de ganancia de función indican que los MBs son los sitios en los que ocurre y se consolida el aprendizaje olfativo. La expresión restringida a los MBs de una proteína Gas constitutivamente activa elimina parcialmente la memoria temprana, probablemente porque interfiere con la señalización de los receptores acoplados a proteínas G en los MBs (Connolly et al., 1996). Adicionalmente, la deficiencia en la memoria de corto plazo de la mutante *rutabaga (rut)*, que carece de una adenilato ciclasa sensible a Ca^{2+} /Calmodulina, se rescata por la expresión dirigida a los MBs de un transgene *rut* silvestre (Zars et al., 2000).

Aunque es convincente la evidencia de que los MBs median el aprendizaje relativo a los olores en *Drosophila* -y en general aquellos que dependen de señales químicas-, no todos los paradigmas de aprendizaje se afectan por la destrucción selectiva genética o farmacológica de estas estructuras. Los MBs son dispensables para el aprendizaje visual, táctil y motor (Wolf et al., 1998). Sin embargo, las NMBs se requieren para la generalización del contexto en una tarea operante en un simulador de

vuelo, sugiriendo que estas células también son integradoras superiores de la información visual (Liu et al., 1999). Adicionalmente, se ha recabado evidencia que indica que los MBs desempeñan otras funciones neuronales que no están relacionadas con el aprendizaje y la memoria olfativa. Por ejemplo, estudios realizados en moscas carentes de MBs, ya sea como resultado de mutaciones que afectan su desarrollo o por tratamientos farmacológicos, mostraron que las NMBs son supresoras de la actividad locomotora (Martin et al., 1998).

Aunque se ha obtenido valiosa información de estudios conductuales y moleculares en *Drosophila*, el conocimiento de las bases fisiológicas del aprendizaje olfativo es escaso. La información disponible sobre las propiedades fisiológicas de las NMBs se ha derivado esencialmente de trabajos en neuronas disociadas. Los primeros estudios de *patch-clamp* empleando esta aproximación experimental revelaron que las NMBs expresan conductancias de K^+ que pueden inhibirse por AMP cíclico (cAMP) (Wright y Zhong, 1995). Los canales de K^+ dependientes de cAMP están restringidos a un subconjunto de NMBs. Interesantemente, el número de NMBs que expresan estas corrientes sensibles a cAMP es notablemente menor en la mutante *dunce* (Delgado et al., 1998). Este hallazgo es de relevancia en vista de evidencia previa que mostró que diversos componentes de la cascada del cAMP, incluida la fosfodiesterasa *Dunce*, se expresan en los MBs y se requieren para el condicionamiento olfativo (Roman y Davis, 2001).

El canal de K^+ Shaker y el aprendizaje asociativo olfativo.

Cowan y Siegel (1986) aportaron la primera evidencia de que los canales iónicos son relevantes para el aprendizaje asociativo olfativo en las moscas. Ellos encontraron que una mutante *shaker* es deficiente en este tipo de aprendizaje. El gene *shaker* codifica para la subunidad α -formadora del poro- de un canal de K^+ dependiente de

voltaje (Kv) sensible a 4-aminopiridina (4-AP) que, por empalme alternativo (*alternative splicing*), da origen a una corriente de activación e inactivación rápida conocida como tipo A o a una corriente que no se inactiva rápidamente (Iverson et al., 1988; Timpe et al., 1988; Iverson y Rudy, 1990; Stocker et al., 1990). Además, los estudios de inmunohistoquímica revelaron que los canales Shaker se localizan preferentemente en la neuropila de los MBs (Schwarz et al., 1990; Rogero et al., 1997). Sin embargo, la evidencia mencionada hasta ahora no se ha complementado con estudios que documenten la existencia de una correlación electrofisiológica con el defecto de *shaker* en las NMBs. En el caso de la abeja, las neuronas disociadas de los MBs expresan una corriente tipo A cuyas propiedades biofísicas y modulación por K^+ externo son semejantes a las de Shaker (Pelz et al., 1999). En *Drosophila*, la presencia de corrientes tipo A es aparente en registros de patch-clamp en NMBs disociadas agudamente (Wright y Zhong, 1995) o en cultivo primario (Delgado et al., 1998), pero la identidad de los componentes moleculares que la conducen se desconoce.

Canales inactivantes de K^+ y aprendizaje en otras especies.

La modulación de canales Kv que conducen una corriente tipo A se ha relacionado con la memoria y el aprendizaje en otras especies. El molusco *Hermisenda* (Figura 3) muestra fototaxis positiva, la cual puede reducirse o eliminarse si la presencia del estímulo luminoso se aparea con una rotación hacia la fuente de luz (revisado en Zhang y Linden, 2003). Este aprendizaje persiste por semanas y es mediado por una proyección



Figura 3. *Hermisenda crassicornis*

inhibitoria desde el fotorreceptor hacia el circuito neuronal motor que media la rotación fototáctica. Cuando la luz y la rotación se aparean, ocurre una reducción en la corriente tipo A del fotorreceptor (y en la corriente de K^+ activada por Ca^{2+}) que incrementa la excitabilidad de su membrana y, por consecuencia, incrementa también la inhibición al circuito neuromotor.

Los conejos pueden aprender a cerrar su párpado/membrana nictitante en respuesta a un tono, si éste se presenta previamente junto con un pulso de aire o una estimulación eléctrica alrededor del ojo. Después del entrenamiento, la excitabilidad de la membrana de las células de Purkinje localizadas en un área identificada del lóbulo cerebelar HVI correlaciona con la fuerza del condicionamiento. Parte de este incremento en la excitabilidad de la membrana incluye una disminución en la hiperpolarización transitoria y en la post-hiperpolarización (*afterhyperpolarization*) que se observan cuando se inyecta una corriente depolarizante a las células de Purkinje (Schreurs et al., 1998). En células no condicionadas, tales fenómenos se mimetizan mediante la aplicación de 4-AP, lo que sugiere que durante el incremento de la excitabilidad asociado al aprendizaje participan canales Kv que conducen una corriente tipo A (Schreurs et al., 1998).

En vertebrados, algunas corrientes de K^+ tipo A dependen de una subunidad auxiliar como la $\beta 1.1$ (Pongs et al., 1999). La subunidad $\beta 1.1$ se asocia con subunidades α Kv 1 y puede conferir inactivación rápida a canales que por si mismos no son inactivantes rápidos. La expresión de la subunidad $\beta 1.1$ se restringe al cerebro y es más prominente en el hipocampo y en el estriado (Rhodes et al., 1996; Butler et al., 1998). Estudios realizados en ratones que carecen de la subunidad $\beta 1.1$ muestran que en las células piramidales de la región CA1 del hipocampo la corriente tipo A dependiente de $\beta 1.1$ regula la post-hiperpolarización y el ensanchamiento de los potenciales de acción (PA) que depende de la frecuencia de disparo. Los ratones

deficientes en la subunidad $\beta 1.1$ muestran plasticidad sináptica normal en la región CA1. Sin embargo, son deficientes para aprender en protocolos conductuales que dependen de esta estructura, tales como el aprendizaje en el laberinto de agua de Morris y en la prueba de transmisión social de la comida. Estos resultados sugieren que la subunidad $\beta 1.1$ de los canales Kv contribuye a ciertos tipos de aprendizaje y memoria (Giese et al., 1998).

La potenciación de larga duración (LTP, por sus siglas en inglés) es un incremento prolongado en la fuerza de las conexiones sinápticas, dependiente de la actividad; y se piensa que es uno de los mecanismos que subyacen al aprendizaje y la memoria (Bliss y Collingridge, 1993). En rebanadas de hipocampo de rata la inducción de la LTP va acompañada de un incremento en la excitabilidad de las dendritas. Estos cambios favorecen la propagación reversa de los PAs a la región dendrítica con un consecuente aumento en el influjo de Ca^{2+} . El aumento en la excitabilidad se explica por un corrimiento hacia valores más negativos de la curva de inactivación de una corriente tipo A (Frick et al., 2004). Estos resultados sugieren que la inducción de plasticidad sináptica de larga duración se acompaña de una vía paralela de memoria, almacenada en el estado funcional de los canales Kv dendríticos.

Importancia de la modulación de canales de K^+ .

Los canales de K^+ estabilizan el potencial de membrana, pues al abrirse lo acercan al potencial de equilibrio del K^+ y lo alejan del umbral de disparo del PA. En las células excitables la función de todos los tipos de canales de K^+ está relacionada con esta estabilización. Los canales de K^+ establecen el potencial de membrana, mantienen cortos los potenciales de acción, terminan los períodos de actividad intensa, determinan el tiempo entre los PAs en las neuronas que disparan repetitivamente y, en general, bajan la eficiencia de las entradas excitatorias. Como los canales de K^+ juegan un papel

fundamental en la excitabilidad de las células y en sus patrones de disparo, no es sorprendente que su probabilidad de apertura sea a menudo regulada por otras señales celulares. En la literatura pueden encontrarse ejemplos del control fisiológicamente relevante de la actividad de los canales Kv por segundos mensajeros y proteínas cinasas (revisado en Hille, 1992). A continuación se describe la modulación de canales de K^+ por el contenido de esteroides en la membrana plasmática (MP).

Modulación de canales de K^+ por el contenido de esteroides en la membrana plasmática.

Los esteroides son componentes ubicuos de la membrana celular de los eucariotas. Las células de mamífero producen su propio colesterol o lo reciben de lipoproteínas (Simons y Ikonen, 2000). La *Drosophila* no puede sintetizar colesterol y requiere de una fuente dietética. Sin embargo, la *Drosophila* acumula esteroides en sus membranas a un nivel comparable con el de las membranas de los mamíferos (Rietveld et al., 1999). Se sabe que los esteroides afectan varias funciones de las proteínas de membrana, ya sea indirectamente modulando las propiedades biofísicas de la bicapa lipídica, o como un cofactor mediante una interacción directa con la proteína (Burger et al., 2000). Los esteroides promueven una separación de fases en las membranas y, por tanto, juegan un papel importante en la formación de microdominios lipídicos, que se conocen genéricamente como balsas lipídicas (*lipid rafts*) (Brown y London, 2000). La partición dentro y fuera de las balsas participa en la distribución y regulación de las proteínas de membrana (Ikonen, 2001). Además, las balsas lipídicas se relacionan con el establecimiento de la polaridad en diversas células, incluidas las neuronas (Tsui-Pierchala et al., 2002) y en la traducción de señales (Brown y London, 2000; Simons y Toomre, 2000). La localización de proteínas en las balsas lipídicas podría potenciar su interacción al aumentar la concentración local de las mismas (Brown y London, 2000; Simons y Toomre, 2000).

Varios estudios han demostrado que cambios en la razón molar colesterol/fosfolípido en las membranas celulares modulan la actividad de un número de canales iónicos. La elevación del colesterol reduce el tiempo medio de apertura del canal del antibiótico gramicidina (Lundbaek et al., 1996), disminuye la probabilidad de apertura del canal de K^+ sensible a Ca^{2+} de gran conductancia (Bolotina et al., 1989; Chang et al., 1995), inhibe la corriente de Ca^{2+} tipo L (Jennings et al., 1999), y suprime la activación de una corriente aniónica regulada por el volumen celular (Levitan et al., 2000). La modulación del canal de K^+ sensible a Ca^{2+} correlaciona en el músculo cardíaco con perturbaciones en la contractibilidad, excitabilidad y propiedades de conducción inducidas por el colesterol (Saini et al., 2004). El enriquecimiento de las células con colesterol resulta en una disminución significativa de una corriente de K^+ de rectificación entrante ($K_{ir,2}$), al disminuir el número de canales activos (Romanenko et al., 2002). Aunque en la mayoría de los casos la actividad de los canales iónicos disminuye con un aumento del colesterol en la membrana, un incremento del esteroles puede también elevar la actividad de los canales, como se ha mostrado para el receptor de acetilcolina (Burger et al., 2000). Cambios en los niveles de colesterol en la membrana modifican la sensibilidad al voltaje de los canales de Ca^{2+} tipo N (Lundbaek et al., 1996) y de los canales de K^+ rectificadores tardíos Kv1.5 y Kv2.1 (Martens et al., 2000; Martens et al., 2001).

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar las corrientes de K^+ presentes en las NMBs; así como posibles mecanismos de modulación de las mismas.

Objetivos específicos

1. Establecer un sistema que permita el estudio de las corrientes de K⁺ en las NMBs;
2. Estudiar biofísica y farmacológicamente las corrientes de K⁺ inactivantes presentes en las NMBs;
3. Evaluar la participación de Shaker en las corrientes de K⁺ de las NMBs, incorporando herramientas genéticas;
4. Estudiar la modulación de las corrientes de K⁺ presentes en las NMBs por el contenido de esteroides en la MP.

METODOLOGÍA

Líneas de moscas Drosophila.

Es técnicamente imposible aislar una preparación pura de NMBs debido a la pequeña región que ocupan en el cerebro de la mosca (ver Figura 5). Sin embargo, el uso de líneas transgénicas que expresan proteínas reporteras exclusiva o preferentemente en las NMBs permite identificarlas en dispersiones de cerebros completos. De esta manera se han realizado estudios electrofisiológicos en las neuronas disociadas e identificadas (Wright y Zhong, 1995; Delgado et al., 1998; Su y O'Dowd, 2003). Para tal fin se generó la línea transgénica 7A2-Gal4, con los protocolos establecidos (Rubin y Spradling, 1983; Pirrotta, 1988). El gene Gal4 codifica para un factor de transcripción de levadura que activa la transcripción de los genes cuyo promotor es un UAS (*Upstream Activating Sequence*). La construcción 7A2 se obtuvo mediante la clonación de un fragmento de 10 kb que incluye el sitio de inicio de la transcripción del gene *fruitless (fru)* en el vector pPTGAL. Este fragmento está flanqueado por sitios Sall y se clonó en el sitio BamHI de pPTGAL, hecho compatible después de una reacción de inserción de dos pares de base (Figura 4).

Objetivos específicos

1. Establecer un sistema que permita el estudio de las corrientes de K⁺ en las NMBs;
2. Estudiar biofísica y farmacológicamente las corrientes de K⁺ inactivantes presentes en las NMBs;
3. Evaluar la participación de Shaker en las corrientes de K⁺ de las NMBs, incorporando herramientas genéticas;
4. Estudiar la modulación de las corrientes de K⁺ presentes en las NMBs por el contenido de esteroides en la MP.

METODOLOGÍA

Líneas de moscas Drosophila.

Es técnicamente imposible aislar una preparación pura de NMBs debido a la pequeña región que ocupan en el cerebro de la mosca (ver Figura 5). Sin embargo, el uso de líneas transgénicas que expresan proteínas reporteras exclusiva o preferentemente en las NMBs permite identificarlas en dispersiones de cerebros completos. De esta manera se han realizado estudios electrofisiológicos en las neuronas disociadas e identificadas (Wright y Zhong, 1995; Delgado et al., 1998; Su y O'Dowd, 2003). Para tal fin se generó la línea transgénica 7A2-Gal4, con los protocolos establecidos (Rubin y Spradling, 1983; Pirrotta, 1988). El gene Gal4 codifica para un factor de transcripción de levadura que activa la transcripción de los genes cuyo promotor es un UAS (*Upstream Activating Sequence*). La construcción 7A2 se obtuvo mediante la clonación de un fragmento de 10 kb que incluye el sitio de inicio de la transcripción del gene *fruitless (fru)* en el vector pPTGAL. Este fragmento está flanqueado por sitios Sall y se clonó en el sitio BamHI de pPTGAL, hecho compatible después de una reacción de inserción de dos pares de base (Figura 4).

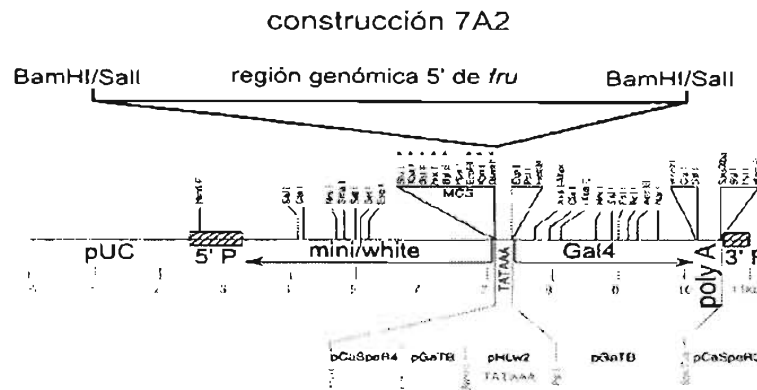


Figura 4. La construcción 7A2 se generó clonando un fragmento de 10 kb que incluye el sitio de inicio de la transcripción del gene *fruitless* (*fru*) en el vector pPTGAL. En las moscas transgénicas, la inserción del transposón ocurrió en el segundo cromosoma.

El patrón de expresión de Gal4 se observó después de cruzar a las moscas transgénicas resultantes con moscas transgénicas UAS-GFP y la línea 7A2 se seleccionó por su capacidad de inducir la expresión específica de Gal4 en los MBs desde las larvas del primer instar hasta el adulto (Figura 5, Figura 6, Figura 7). Como la construcción 7A2 contiene un fragmento de 10 kb que incluye el sitio de inicio de la transcripción del gene *fru*, se examinó la correlación entre la expresión de GFP en la línea 7A2-Gal4/UAS-GFP y el patrón de expresión endógeno de Fru. La expresión de Gal4 en 7A2 no correlaciona con la inmunohistoquímica de Fru (los datos no se muestran), ni con aquella reportada empleando recombinación homóloga de Gal4 sobre el gene *fru* (Stockinger et al., 2005).

Para todos los experimentos se obtuvieron larvas tardías del tercer instar a partir de la cruce de machos de la línea homociga 7A2-Gal4 y hembras homocigas para un transgene UAS-GFP, localizado en el segundo cromosoma (Figura 8). Para un genotipo mutante *shaker*, se emplearon hembras $sh^{133};UAS-GFP$ en la cruce (Figura 8). La línea $sh^{133};UAS-GFP$ se obtuvo a partir de las líneas $w^{1118}/UAS-GFP$ y $sh^{133}/+$ mediante un esquema de 6 cruces (Figura 9). sh^{133} es un alelo antimórfico en el cual la sustitución de

Figura 5. Las neuronas GFP+ en la línea 7A2-Gal4/UAS-GFP identifican a las NMBs *in vivo*. **A**, El cerebro de adulto que se muestra se disecó en PBS, fijó en paraformaldehído al 4% y aplanó ligeramente con un cubreobjetos. A la izquierda se muestra una imagen de campo claro de un cerebro completo y a la derecha, una proyección confocal de máxima intensidad de la misma preparación. El cerebro está orientado con la cara anterior hacia enfrente y la dorsal hacia arriba. **B**, Los cerebros de las larvas del tercer instar se trataron como en A y se montaron con el ganglio ventral hacia abajo. A la izquierda se muestra una imagen de campo claro de un cerebro completo y a la derecha, la proyección confocal. La escala es la misma que en A. El recuadro muestra una magnificación del cerebro de la larva. Dos lóbulos dorsales (flechas) y dos lóbulos medios (cabezas de flecha) se marcan con GFP. Las neuronas en el *par intercerebral* también expresan GFP (asterisco).

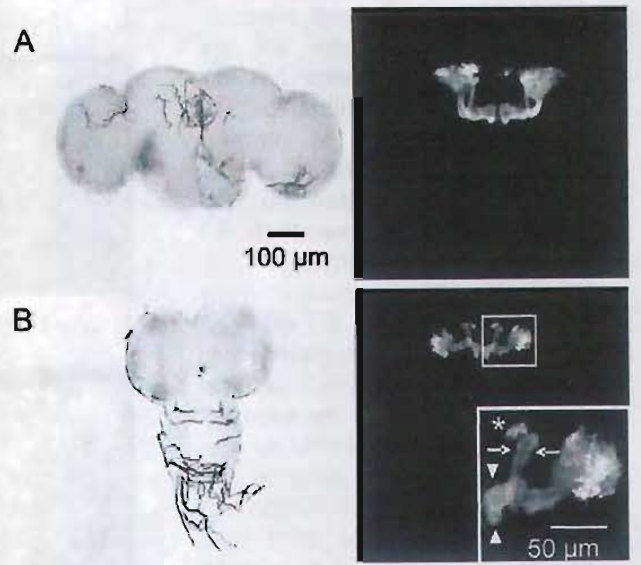


Figura 6. La expresión de GFP en las NMBs requiere de la trampa de *enhancer* (*enhancer trap*) 7A2. Los cerebros de larvas del tercer instar se trataron y montaron como se describe en la Figura 5. **A**, Línea 7A2-Gal4/UAS-GFP. **B**, Línea parental UAS-GFP/UAS-GFP. Se desconoce si la expresión enriquecida de Gal4 en las NMBs depende del fragmento de *fru* en la construcción 7A2 o de un *enhancer* endógeno atrapado por esta construcción. Sin embargo, el patrón de expresión de Gal4 no se relaciona con el patrón de expresión endógeno de *fru*.

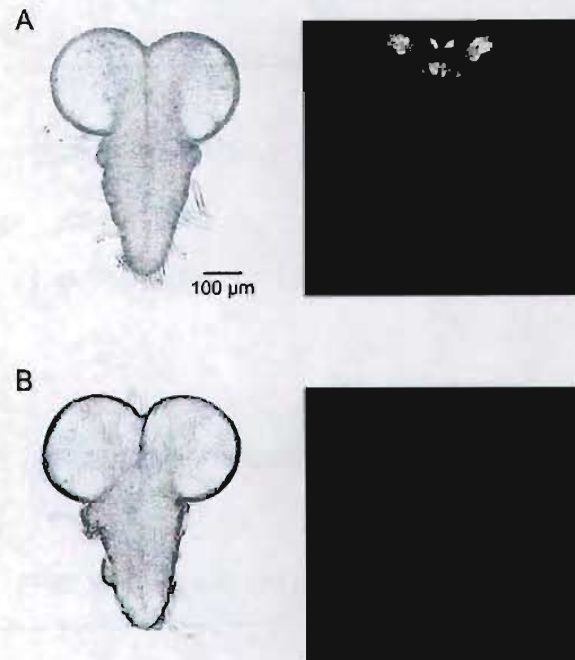
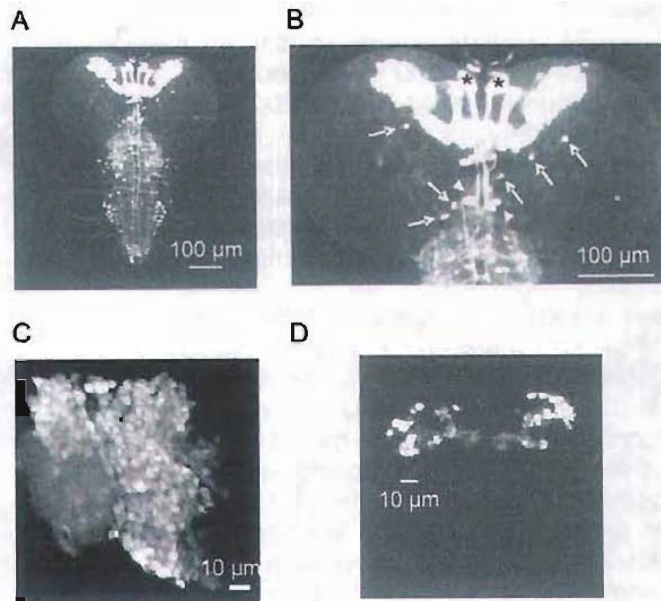


Figura 7. **A**, El mismo cerebro mostrado en la Figura 6A se sobreexpuso para revelar células que expresan GFP débilmente. Se pueden observar en el ganglio ventral varias células que expresan GFP. La identidad de estas neuronas no se investigó. El ganglio ventral se removió de los cerebros que se emplearon para los experimentos de RT-PCR y electrofisiología, disminuyendo así la contaminación de células fluorescentes que no provienen de los MBs. **B**, Amplificación de los lóbulos cerebrales mostrados en A. Las flechas indican somas de neuronas fuera de los MBs que expresan GFP. En esta preparación contabilizamos 12 (las cabezas de flecha indica conjuntos



de 3 neuronas), más las neuronas del *par intercerebral* (asteriscos). **C**, Alta resolución de los somas de las NMBs y del cáliz. Esta imagen revela que la señal de GFP detectada en la región de los MBs proviene de una expresión distribuida en un gran número de NMBs y no de una expresión intensa restringida a un subconjunto particular. **D**, Un cerebro de larva del primer instar (10-14 hrs después de salir del huevo) que muestra expresión de GFP en las NMBs. También se tiñeron neuronas en el ganglio ventral pero no se muestran en esta imagen.

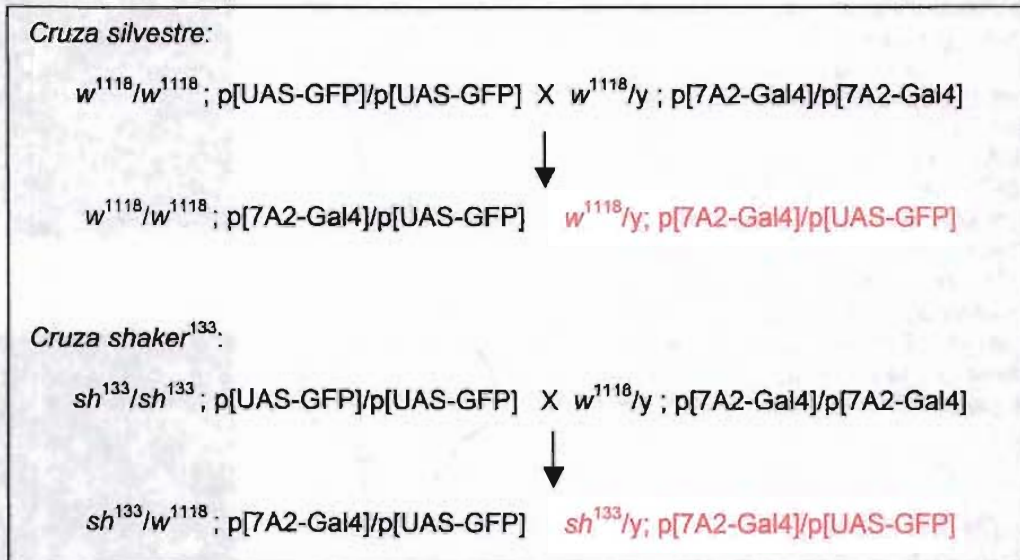


Figura 8. Cruzas para la obtención de las larvas que se emplearon en los experimentos de RT-PCR y electrofisiología (en rojo).

de un residuo de valina por un aspartato en el filtro de selectividad produce una proteína incapaz de conducir iones (Lichtinghagen et al., 1990).

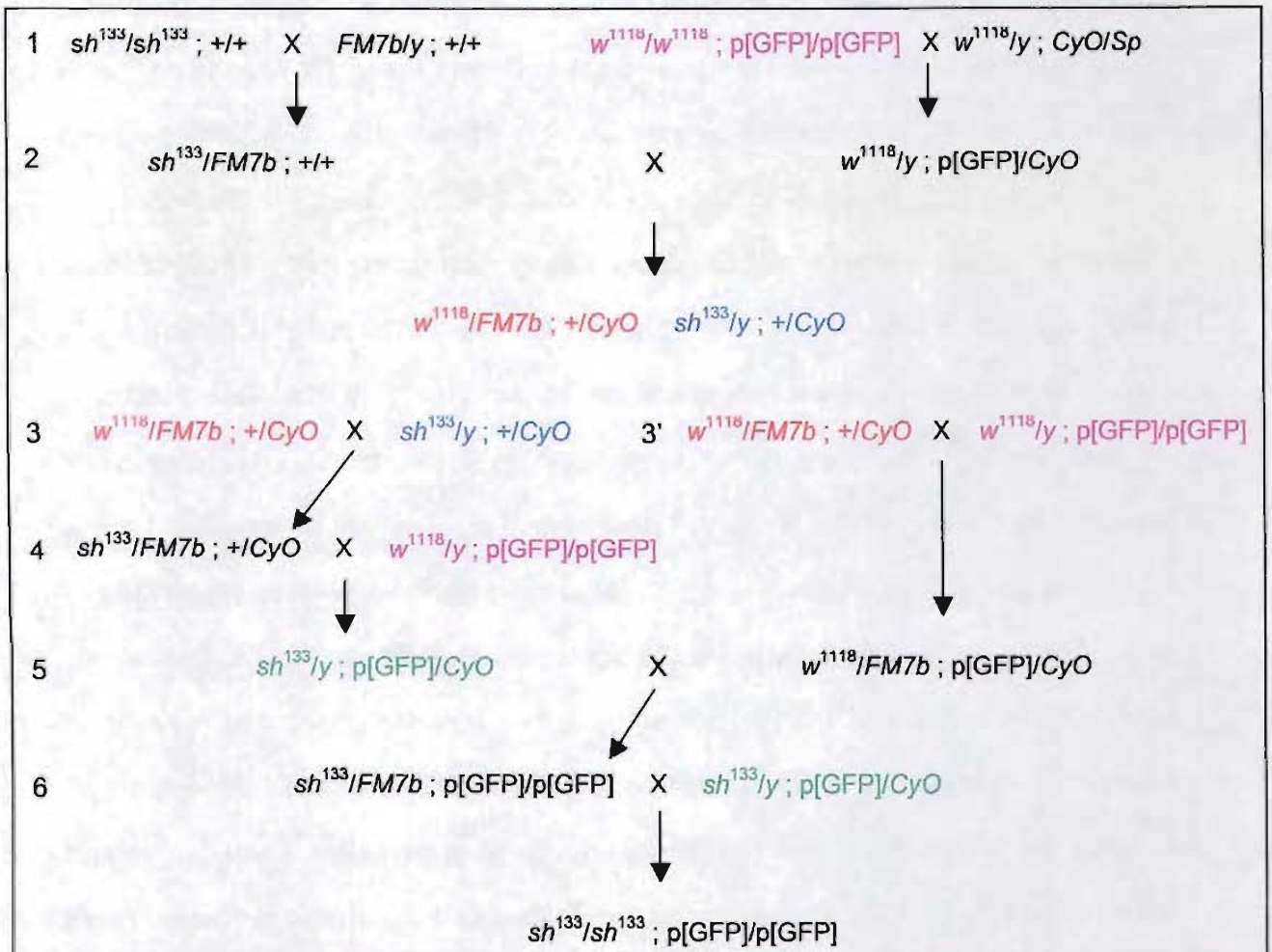


Figura 9. Esquema de cruces para la obtención de la línea $sh^{133};UAS-GFP$. $p[GFP]$ es un transposón que contiene la construcción UAS-GFP y un gene w^+ para la complementación del color de ojos. Las líneas sh^{133} y $FM7b$ fueron proporcionadas por el Dr. Pedro Labarca, del Centro de Estudios Científicos en Chile. Las líneas UAS-GFP ($w^{1118};p[GFP]$) y $w^{1118};CyO/Sp$ fueron proporcionadas por el Dr. Enrique Reynaud. La progenie de la cruce 2 se empleó en las cruces 3 y 3', de acuerdo al código de color. La progenie de la cruce 4 se empleó en las cruces 5 y 6 de acuerdo al código de color.

Todas las líneas empleadas se alimentaron con comida estándar compuesta de (en g/l): 21 de levadura, 9 de agar, 48.8 de dextrosa, 21 de sacarosa, 60 de harina de maíz. Se agregaron 4 ml de ácido propiónico por l de medio.

Análisis de RT-PCR.

Mediante experimentos de RT-PCR se buscó en la región de los MBs los RNA mensajeros que codifican para los miembros de la familia Kv: *shaker*, *shal*, *shab* y *shaw*.

Entre 15 y 18 cerebros de larvas se disecaron en PBS y los ganglios ventrales y discos imagales se removieron. El tejido neural se dispersó según lo descrito por Wu et al. (1983). Los lóbulos cerebrales se incubaron por 25 min en 1 ml de PBS + tripsina (0.0125 %, tipo III; Sigma) a 37°C. Después de dos lavados en medio de Schneider para *Drosophila* (Gibco) suplementado con 20% de suero fetal bovino (Gibco) inactivado por calor y 50 µg/ml de gentamicina, el tejido se resuspendió en 180 µl de un medio definido para *Drosophila* (DDM) modificado a partir de O'Dowd (1995). El DDM está compuesto de Ham's F-12 DMEM (alta glucosa) (Irvine Scientific) suplementado con 0.6 mg/ml de NaHCO₃, 24.8 mM HEPES, 100 µg/ml de transferrina, 50 µg/ml de insulina, 100 µM putrescina, 20 ng/ml de progesterona y 30 nM selenita de sodio. El tejido tripsinizado se pasó 50 veces a través de la punta de una pipeta Pasteur pulida con fuego. Después de la disociación, la suspensión se colocó en un portaobjetos con pozos y se examinó en búsqueda de cúmulos de células que expresasen GFP (GFP+) (Figura 13A). Entre 4 y 5 cúmulos se succionaron con una pipeta de patch-clamp cuya punta se rompió previamente (Figura 13B), se depositaron en un tubo Eppendorf y se procesaron para síntesis de cDNA empleando el *kit* Cell-to-cDNA (No. Cat. 1722, Ambion), según las instrucciones del fabricante. Dos µl del cDNA se emplearon como templado para cada PCR. Los oligonucleótidos cebadores con secuencia 5'-GCCGAAGAGGAGGATA-3' y 5'-CTGGCAAATATGGACAAC-3' (T_m = 51°C) se utilizaron para amplificar un amplicón de 535 pb común a todos los transcritos alternativos reportados para *shaker*. Para *shal*, se emplearon los oligos 5'-AAGCACGAATGCCTCACC-3' y 5'-GAAGACAAGGAAGCCCAGTT-3' (T_m = 57°C), en busca de un fragmento de 666 pb. Los oligos 5'-GCAGCATTGTCTCCTTCCATC-3' y 5'-TCTCCATCACGCCTCCCTC-3'

($T_m = 58^\circ\text{C}$) se diseñaron para amplificar una región de 651 pb de la isoforma larga y una de 560 pb de la isoforma corta de *shab*. Para *shaw*, se utilizaron los oligos 5'-GACTATTGGCGTGGTTTCGG-3' y 5'-GAAGTCGTTGTGCGGATTGG-3' ($T_m = 56^\circ\text{C}$; 562 pb). Dos μl de cada PCR se reamplificaron bajando la temperatura de alineamiento 5°C . Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron para asignar la identidad de los mismos. Los controles negativos se trataron de la misma manera, pero la Transcriptasa Reversa se omitió durante la reacción de síntesis del cDNA. Bajo esta condición no se observaron productos de PCR.

Expresión de dShal recombinante.

Ovocitos VI de *Xenopus laevis* se prepararon según lo descrito (Espinosa et al., 1999). El mRNA de *shal* se sintetizó *in vitro* a partir de una clona obsequiada por el Dr. L. Salkoff (Washington University, St. Louis, MO) y se inyectó a los ovocitos a una concentración de 1 ng/nl en un volumen de ~ 50 nl. Estos se incubaron a 18°C durante 6 d en solución ND-96 (en mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 2 piruvato de Na^+ , 5 HEPES, pH 7.6) + 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. Las corrientes se registraron en ND-96 a $\sim 20^\circ\text{C}$ con un amplificador de voltaje de 2 microelectrodos (GeneClamp 500B, Axon Instruments). Los electrodos tuvieron una resistencia de 0.4-0.9 $\text{M}\Omega$ después de llenarlos con una solución de KCl 3 M. La corriente de fuga se sustrajo en línea con un protocolo P/4, y los datos se filtraron y adquirieron a 1 kHz y 5 kHz, respectivamente.

Registros electrofisiológicos en músculos de larvas.

Para todos los experimentos se emplearon las fibras musculares longitudinales ventrolaterales No. 6 de los segmentos A2 y A3 de las larvas tardías de tercer instar (Bate, 1993). La preparación fue idéntica a la descrita previamente (Jan y Jan, 1976). Las larvas se disecaron y mantuvieron en solución salina HL3 (Stewart et al., 1994)

hasta el inicio de los experimentos electrofisiológicos. Esta solución está compuesta de (en mM): 70 NaCl, 5 KCl, 1.5 CaCl₂, 20 MgCl₂, 10 NaHCO₃, 5 trehalosa, 115 sacarosa, 5 HEPES (pH 7.2), y se desarrolló para incrementar la estabilidad morfológica y fisiológica de los músculos de *Drosophila* a temperatura ambiente. Las corrientes de K⁺ de los músculos de las larvas se registraron mediante la técnica de fijación de voltaje con 2 microelectrodos, desde un potencial de mantenimiento de -65 mV, empleando un amplificador Warner OC-725 o uno Dagan CA-1. Durante los experimentos se empleó una solución salina externa sin Ca²⁺ para eliminar las corrientes entrantes de Ca²⁺ así como las corrientes salientes dependientes de Ca²⁺. Esta solución se compone de (en mM): 130 NaCl, 5 KCl, 18 MgCl₂, 36 sacarosa, 0.5 EGTA, 5 HEPES (pH 7.2). Se adicionó una alta concentración de Mg²⁺ para evitar los problemas asociados a los cambios de potencial de superficie y deterioro de la membrana causados por la falta de Ca²⁺ extracelular (Wu y Haugland, 1985). Las corrientes se filtraron a 2 kHz y digitalizaron a 10 kHz. Los componentes lineales de las corrientes se sustrajeron en línea con un protocolo P/4. Los electrodos se llenaron con una solución de KCl 3 M. La resistencia de la punta de los electrodos de voltaje estuvo en el rango de 10-20 MΩ, y de 5-10 MΩ, para los de corriente.

Preparación de neuronas de los Cuerpos Fungiformes para registros electrofisiológicos.

Las neuronas disociadas de los cerebros de larvas se obtuvieron tratando los cerebros igual a como se describió en *Análisis de RT-PCR* con la excepción de que las células disociadas se sembraron en 2 cubreobjetos de 12 mm de diámetro (Bellco), situados en una caja de Petri. Se permitió que las neuronas se sedimentaran durante 1 h antes de llenar la caja de Petri con 2 ml de DDM. Las células se mantuvieron a 23-24°C durante 3-24 h antes de iniciar los experimentos electrofisiológicos. Las NMBs se

identificaron en los cubreobjetos como células GFP+ pequeñas (~5 μm) (Figura 10). Cuando las células disociadas se mantuvieron en cultivo por más horas (hasta 72) fue posible apreciar el desarrollo de neuritas en las células GFP+ (Figura 11), lo que sugiere su identidad neuronal. Un conteo de al menos 10 campos aleatorios en 5 cultivos independientes arrojó un promedio de $4.6 \pm 0.6\%$ NMBs GFP+. Este valor es comparable con estimados previos realizados en estudios independientes en diferentes líneas transgénicas que expresan un gene reportero en los MBs (Wright y Zhong, 1995; Delgado et al., 1998; Su y O'Dowd, 2003) y con la fracción de NMBs en el sistema nervioso central (Ito et al., 1998).

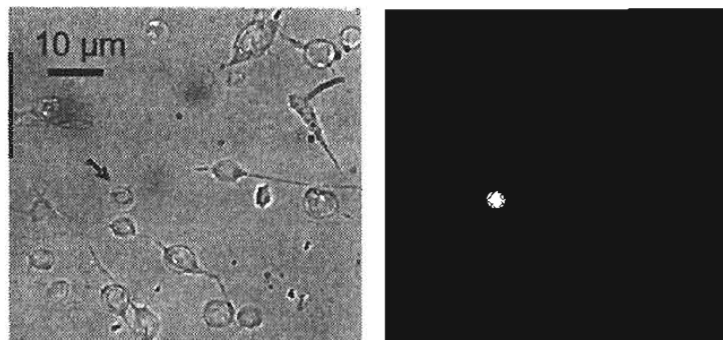


Figura 10. Disociación aguda de cerebros de larvas de tercer instar 7A2-Gal4/UAS-GFP. La fotografía que se muestra se tomó a las 12 h después de la dispersión. Las NMBs se identifican por la expresión de GFP (flecha). La imagen de la izquierda es de campo claro; la de la derecha, de epifluorescencia.

El examen visual con una resolución de 1 μm de 183 células GFP+, arrojó una moda de 5 μm de diámetro. La capacitancia celular promedió 0.42 ± 0.01 pF ($n = 116$). Asumiendo una forma esférica y una capacitancia específica de 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, la capacitancia promedio de las células equivale a un diámetro de 3.6 μm . Ambos estimados son muy cercanos al tamaño documentado para las NMBs *in vivo* (3.9 μm) (Wang et al., 2001).

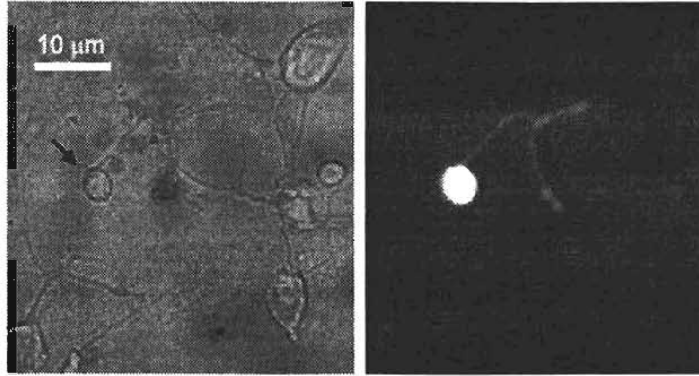


Figura 11. Disociación de cerebros de larvas de tercer instar 7A2-Gal4/UAS-GFP. La fotografía que se muestra se tomó a las 72 h después de la dispersión. La imagen de la izquierda es de campo claro; la de la derecha, de epifluorescencia.

Inmunocitoquímica de los cultivos neuronales.

Para verificar la identidad neuronal de las células disgregadas de los cerebros de las larvas, los cultivos primarios se tiñeron con un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la proteína ELAV de *Drosophila* (anticuerpo 9F8A9, Developmental Studies Hybridoma Bank de la Universidad de Iowa). La proteína ELAV se expresa en las neuronas durante todas las etapas del desarrollo de la *Drosophila* pero no en los neuroblastos progenitores ni en la glia (Robinow y White, 1988).

Las células una vez sedimentadas en los cubreobjetos se fijaron en paraformaldehído al 4% disuelto en una solución de Na_2HPO_4 0.1M (pH 7.4). Después de 30 min a temperatura ambiente, las neuronas se permeabilizaron por 10 min con tritón al 0.1% en una solución TN (Tris-HCl 0.1M / NaCl 0.3 M, pH7.4). Previo a la exposición con los anticuerpos, las neuronas se bloquearon por 1 h con 3% de BSA en TN (TNB). Posteriormente, las neuronas se incubaron de manera secuencial durante 1 h con los anticuerpos primario y secundario en TNB. El anticuerpo primario se usó a una dilución 1:100. El anticuerpo secundario acoplado a rodamina (cabra anti-ratón, Santa Cruz Biotechnology, No. Cat. sc-2084), a una dilución 1:200.

La figura 12 muestra que la mayoría de las células dispersadas ($89 \pm 1\%$, $n = 2$) de los cerebros de las larvas son neuronas, pues se tiñen con el anticuerpo anti-ELAV (rojo). Además, por el mismo criterio, todas las células GFP+, que se consideran provienen de los MBs, son neuronas.

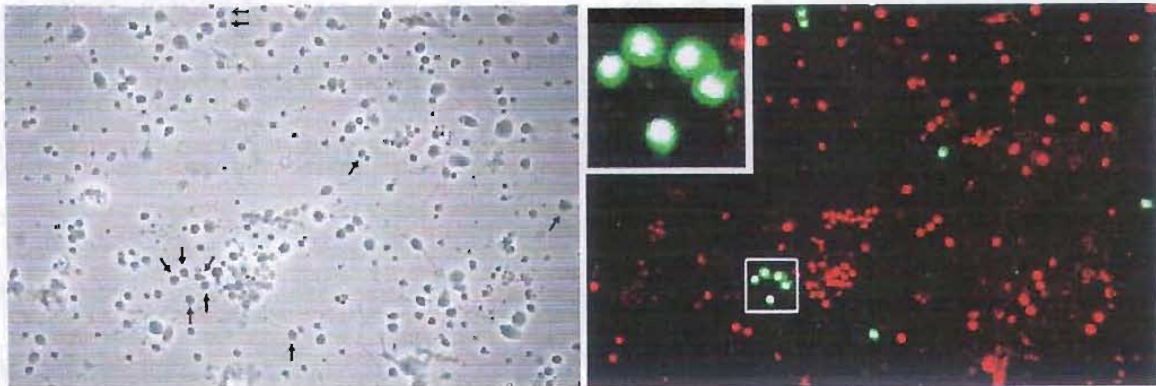


Figura 12. Los cultivos de neuronas disociadas se tiñen con un anticuerpo anti-ELAV. La imagen de la izquierda es de campo claro; la de la derecha, de microscopía confocal. Todas las células GFP+ (flechas en la imagen de la izquierda y color verde en la imagen de la derecha) son también ELAV+ (rojo). La co-tinción se ve en blanco (recuadro).

Registros electrofisiológicos en las neuronas.

Los cubre-objetos que contenían las neuronas se colocaron en una cámara de registro montada en un microscopio invertido equipado con epifluorescencia. La cámara se perfundió con una solución salina compuesta de (en mM): 140 NaCl, 3 KCl, 1 CaCl₂, 4 MgCl₂, 5 HEPES (pH 7.2 con NaOH, osmolaridad de 290-292 mOsm). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22-25°C). Las pipetas de patch-clamp (4-7 MΩ) se pulieron con calor y llenaron con una solución interna compuesta de (en mM): 140 KCl, 2 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 1.1 EGTA, 10 HEPES (pH 7.2 con KOH, osmolaridad de 288-290 mOsm). En algunos experimentos el KCl de la pipeta se sustituyó por una concentración equimolar de CsCl, para bloquear los canales Kv, y en tales casos el pH se ajustó a 7.2 con CsOH. Los potenciales de unión líquida se cancelaron antes de establecer el sello de alta resistencia, y la capacitancia de la pipeta

se compensó antes de entrar a la configuración de célula completa. Durante las sesiones de registro las células se fijaron a un potencial de mantenimiento de -70 mV. La capacitancia celular se evaluó integrando la corriente promedio en respuesta a 5 pulsos consecutivos hiperpolarizantes de 5 mV. La compensación de la resistencia en serie (R_s) se ajustó a 60-70%. Se descartaron para análisis los experimentos en los cuales la resistencia de acceso (R_i) fue $< 1.0 \text{ G}\Omega$ y/o la $R_s > 30 \text{ M}\Omega$. Por lo tanto, los errores durante las sesiones de registro, inducidos por las corrientes más grandes que se registraron ($\approx 780 \text{ pA}$) no superaron los 3.3 mV. La 4-AP, quinidina, albúmina (BSA) y colesteril-3-sulfato (C3S) se compraron de Sigma. La metil β -ciclodextrina (M β CD), de Aldrich. La 4-AP, la BSA y la M β CD se diluyeron a la concentración apropiada en la solución salina externa y perfundieron a la cámara de registro. La quinidina (100 mM) y el C3S (50 mM) se prepararon como solución madre en etanol y DMSO, respectivamente, y se mantuvieron a -70°C . Los complejos de M β CD-C3S se prepararon según lo descrito por Christian et al. (1997). Brevemente, los reactivos se mezclaron en la solución externa de registro a concentraciones equimolares, se agitaron brevemente en un Vortex, y se sonicaron durante 3 min. La solución se incubó en agitación toda la noche a 37°C . La Phrixotoxina-2 (PaTx2) (Alomone) se mantuvo congelada por menos de 2 meses como solución madre 10X y se descongeló según se requiera. Después de diluirla a la concentración apropiada se aplicó a la solución externa en la cámara de registro del músculo o de los ovocitos, o mediante presión (~ 10 psi) directamente al soma de la neurona bajo fijación de voltaje. La PaTx2 se aplicó con una pipeta de $\sim 5 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro conectada a un picospritzer (General Valve Corporation) y colocada a $\sim 20 \text{ }\mu\text{m}$ de la neurona blanco.

Adquisición y análisis de datos.

A las células se les controló el potencial de membrana usando un amplificador Axopatch 200 (Axon Instruments). Las señales se filtraron con un filtro pasa-bajos a 5 kHz y el intervalo de muestreo se ajustó a 40 μ s por punto, excepto para las corrientes capacitativas, que se filtraron a 10 kHz y digitalizaron a 100 kHz. Los datos se adquirieron con el programa Clampex6 (Axon Instruments) y se analizaron con el programa Clampfit8 (Axon Instruments). La R_i se evaluó antes de cada protocolo de voltaje empleando un pulso hiperpolarizante de 30 mV desde el potencial de mantenimiento. El cálculo de R_i se empleó para corregir linealmente todos los registros. A menos que se especifique lo contrario, la membrana se mantuvo a -100 mV durante 1 s antes de cualquier protocolo de voltaje para remover la inactivación de los componentes inactivantes de la corriente.

Los datos de inactivación en estado estacionario se obtuvieron con un protocolo de prepulsos de 1 s desde -100 mV hasta -20 mV en incrementos de 5 ó 10 mV. Los canales que permanecieron disponibles para abrirse después del prepulso se estimularon con un pulso a +40 mV. La corriente al pico se graficó como función del potencial del prepulso (V_p) y los puntos resultantes se ajustaron a una distribución sencilla de Boltzmann. Se ha observado que la sensibilidad al potencial de los canales dependientes de voltaje cambia durante los experimentos electrofisiológicos en la configuración de célula completa; posiblemente por la difusión de polianiones desde el citoplasma hacia el interior de la pipeta (Baker y Salkoff, 1990; Hardie, 1991). Para minimizar los cambios inducidos por la configuración de célula completa en la sensibilidad de los canales Kv al potencial, todos los datos en estado estacionario reportados en esta tesis se tomaron durante los primeros 2 min después de establecer la configuración de célula completa.

En nuestro análisis de constantes temporales de inactivación, la fase decreciente de la corriente inducida por un pulso de 80 ms a +40 mV se ajustó a una sumatoria de términos exponenciales más una línea base. El número óptimo de coeficientes se determinó con una confianza del 99.9% de acuerdo a la estadística para los modelos anidados (Horn, 1987). Brevemente, sean $F(t)$ y $G(t)$ dos modelos para explicar el decaimiento de la corriente macroscópica durante la inactivación, la suma de los errores al cuadrado para cada modelo se define como:

$$SSE_f = \min \sum [x_i - E(x_i/\theta)]^2, \text{ para el modelo } F$$

y

$$SSE_g = \min \sum [x_i - E(x_i/\beta)]^2, \text{ para el modelo } G$$

En las ecuaciones los valores x_i , desde $i = 1, \dots, n$, son los datos experimentales, y $E(x_i/\theta)$ es el *valor esperado* de x_i predicho, por ejemplo, por el modelo F dado el conjunto de parámetros θ . Se asume que los residuos alrededor de los *valores esperados* son independientes y están normalmente distribuidos. Los parámetros θ y β son los que minimizan SSE durante la regresión. Si el modelo F es una sub-hipótesis del modelo G , entonces la estadística T se define como:

$$T = (SSE_f - SSE_g) / SSE_g \cdot (n - k_g) / k_f$$

T tiene una distribución de F con k_f y $n - k_g$ grados de libertad. El valor de T se puede comparar con los valores tabulados para la distribución de F al nivel deseado de confiabilidad.

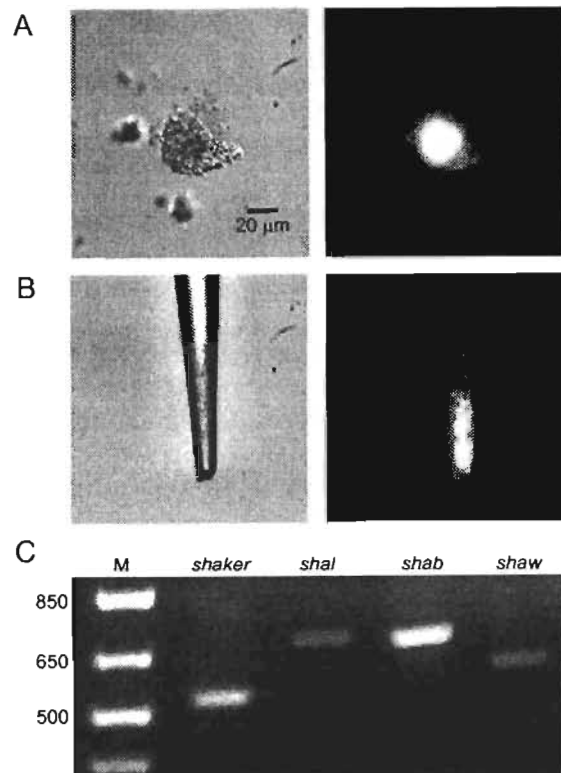
Los datos se presentan como promedio \pm error estándar de la media, a menos que se especifique lo contrario. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

RT-PCR de los canales de K⁺ dependientes de voltaje en los Cuerpos Fungiformes.

Se buscaron transcritos que codifican para canales Kv en los MBs por RT-PCR y se encontró la expresión de *shaker*, *shal*, *shab* y *shaw* (Figura 13). Este resultado sugiere que tanto *shaker* como *shal* podrían conducir la corriente somática tipo A en las NMBs. Para investigar esta interrogante, se estudiaron mediante la técnica de patch-clamp en la configuración de célula completa las propiedades de la corriente inactivante de K⁺ en las NMBs disociadas de moscas silvestres (*wt*) y de una mutante *shaker*.

Figura 13. Los MBs expresan transcritos de *shaker*, *shal*, *shab* y *shaw*. De la dispersión de cerebros de larvas del tercer instar se recuperaron grupos de células GFP+ derivadas de los MBs que se usaron para preparar cDNA. Uno de estos grupos se muestra antes (A) y después (B) de que se succionara dentro de una pipeta. La columna de la izquierda muestra imágenes de campo claro, mientras que la de la derecha muestra el mismo campo iluminado con epifluorescencia y observado a través de filtros para FITC. C, El cDNA preparado con 4-5 grupos de células GFP+ se empleó para PCRs y los productos se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. M, marcador de peso molecular en pb. La intensidad de las bandas no es cuantitativa

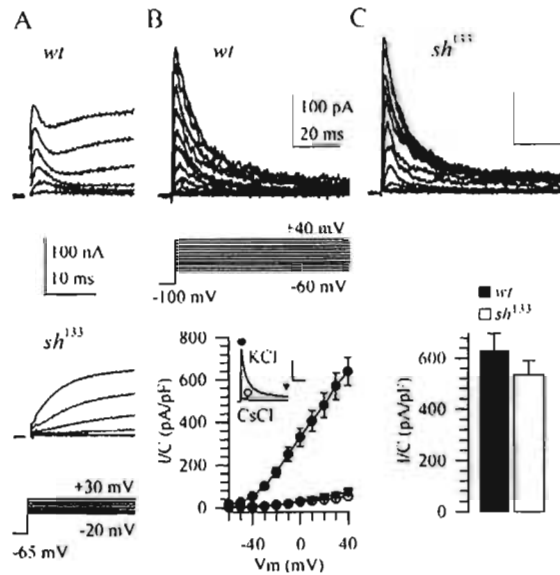


Propiedades de la corriente tipo A en las neuronas de los Cuerpos Fungiformes.

Para entender como los 4 canales que se encontraron en los experimentos de RT-PCR se combinan para dar forma a la corriente registrada en las NMBs, se realizó una disección biofísica, genética y farmacológica de la misma. Una línea mutante

shaker se obtuvo al cruzar machos homocigos $w^{1118}/y;7A2-Gal4$ con hembras homocigas $shaker^{133};UAS-GFP$ (Figura 8). Sólo la progenie macho (que se denominará simplemente sh^{133}) se empleó para registros electrofisiológicos y se comparó con machos controles *wt*. El alelo sh^{133} es ideal para investigar la contribución de Shaker a la corriente tipo A, porque codifica una proteína no funcional que, aunque se expresa, es incapaz de conducir iones (Lichtinghagen et al., 1990). El fenotipo de las líneas empleadas se verificó registrando los canales Kv en los músculos ventrolaterales No. 6 de las larvas, donde Shaker es el único canal que conduce la corriente tipo A (Wu y Haugland, 1985). Los músculos *wt* expresaron una corriente inactivante prominente. Por el contrario, la línea sh^{133} careció de la corriente tipo A (Figura 14A). A continuación se registraron las corrientes iónicas en NMBs disociadas. En experimentos iniciales, las 17 células registradas mostraron una corriente saliente con un prominente componente inactivante (Figura 14B). La corriente total se conduce exclusivamente por canales Kv pues se bloqueó cuando el K^+ interno se sustituyó por Cs^+ equimolar (Figura 14B) o cuando se expuso a una mezcla de quinidina (100 μM) y 4-AP (2.5-10 mM) (Figura 21A). Para investigar que contribución tiene el canal Shaker en el componente inactivante de la corriente, se realizaron registros electrofisiológicos en NMBs derivadas de la línea sh^{133} y se compararon con aquellos obtenidos en la línea *wt*. Sorprendentemente, la eliminación genética del canal Shaker no modificó notablemente ni la amplitud ni la forma (cinética) de las corrientes de las NMBs (Figura 14B, C). Las clonas de *shaker* expresadas en ovocitos de *Xenopus* codifican para un rectificador tardío (Iverson y Rudy, 1990; Stocker et al., 1990) o para una corriente tipo A (Iverson et al., 1988; Timpe et al., 1988). Se ha sugerido que Shaker conduce corrientes no inactivantes en neuronas embrionarias de *Drosophila* tratadas con citocalacina para detener la citoquinesis (Saito et al., 1993). Sin embargo, en la mayoría de células de

Figura 14. Shal domina la corriente saliente inactivante en las NMBs de *Drosophila*. **A**, Corrientes de K⁺ registradas en las fibras musculares longitudinales ventrolaterales No. 6 de los segmentos A2 y A3 de larvas del tercer instar *wt* y *sh*¹³³. Cada trazo representa el promedio de 6 músculos diferentes en 4 preparaciones (para *wt*) o el promedio de 18 músculos diferentes en 11 preparaciones (para *sh*¹³³). El protocolo de estimulación se muestra debajo de los trazos de corrientes. Los incrementos son de 10 mV. **B**, Los trazos superiores son corrientes representativas registradas en NMBs *wt* disociadas agudamente. El protocolo de estimulación se muestra debajo de los trazos de corrientes. Los incrementos fueron de 10 mV. El potencial de mantenimiento fue de -70 mV. Pulsos hiperpolarizantes de 1 s a -100 mV precedieron cada pulso depolarizante. La grafica I-V (normalizada por la capacitancia celular) muestra la corriente al pico (●), la corriente registrada 80 ms después de iniciar el pulso depolarizante (▼), y la corriente al pico cuando el KCl interno se reemplazó por CsCl (○). Cada punto representa el promedio de 17 neuronas (para los registros con KCl) u 8 neuronas (para los registros de CsCl). El inserto muestra el trazo promedio de 8 corrientes (a +40 mV) registradas consecutivamente con KCl o CsCl en la pipeta. Las barras de calibración tienen la misma escala que arriba. **C**, Los trazos superiores son corrientes representativas registradas en NMBs *sh*¹³³ disociadas agudamente, inducidas por el protocolo de voltaje descrito en B. Las barras de calibración tienen la misma escala que en B. La grafica inferior muestra la densidad promedio de corriente al pico, a la cual se restó el componente sostenido. Los valores son 624 ± 67 pA/pF, para *wt*, y 533 ± 56 pA/pF, para *sh*¹³³. En ambos genotipos, *n* = 33.

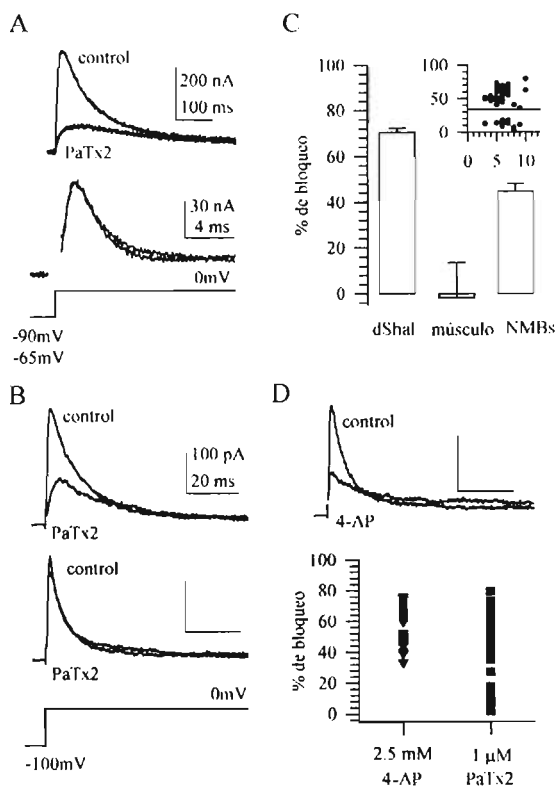


Drosophila incluyendo los músculos de las larvas, y las neuronas y los fotorreceptores de pupa (Baker y Salkoff, 1990; Hardie, 1991), se ha descrito que Shaker conduce corrientes tipo A. Ya que la corriente no inactivante registrada en las NMBs resistió el bloqueo por 4-AP -que bloquea las clonas de Shaker-, se infirió que cualquier efecto de la mutación en el gene *shaker* debería afectar principalmente la corriente al pico. Sin embargo, la densidad de la corriente al pico (corriente entre capacitancia celular), disminuyó sólo 15% en *sh*¹³³ respecto a *wt*, y tal diferencia no fue estadísticamente significativa (*wt*, 624 ± 67 pA/pF (*n* = 33); *sh*¹³³, 533 ± 56 pA/pF (*n* = 33); prueba de *t* de Student) (Figura 14C). De estos resultados se concluye que otros canales deben ser los contribuyentes principales a la corriente inactivante de las NMBs.

Las corrientes de K⁺ de las neuronas de los Cuerpos Fungiformes son diferencialmente sensibles a una toxina específica para Shal.

En el esquema más sencillo, si Shaker no contribuye el componente principal de inactivación rápida en las NMBs, Shal lo hace (Wei et al., 1990). Para confirmar que Shal es el componente principal de la corriente inactivante en las NMBs, se aplicó una toxina específica para el canal Shal, PaTx2, a las NMBs *wt*. PaTx2 bloquea específicamente los canales Kv4.2 y Kv4.3 de mamífero (Diochot et al., 1999), con una IC₅₀ = 650 nM (hoja técnica de Alomone). Los canales Kv4.2 y Kv4.3 son homólogos al producto del gene *shal* de *Drosophila* y conducen una corriente tipo A cuando se expresan en un sistema heterólogo (Diochot et al., 1999). Aunque está documentado que la PaTx2 no bloquea los homólogos de *shaker* en mamífero expresados en ovocitos de *Xenopus* (Diochot et al., 1999), sus efectos sobre los canales Shaker y Shal de *Drosophila* se desconocen. Por lo tanto, se analizó el efecto de la toxina sobre los canales Shaker de *Drosophila* registrando la corriente tipo A en los músculos longitudinales ventrolaterales de las larvas del tercer instar, y sobre el canal Shal recombinante de *Drosophila* expresado en ovocitos de *Xenopus*. La PaTx2 (1 μM) no tuvo un efecto sobre la amplitud de la corriente Shaker en los músculos de las larvas (porcentaje de bloqueo = 0 ± 15%, *n* = 4), y bloqueó notablemente la corriente Shal recombinante (porcentaje de bloqueo = 70 ± 2%, *n* = 4) (Figura 15A, C). En las NMBs, la PaTx2 bloqueó un componente tipo A en la mayoría de las neuronas examinadas (31/41). Este componente corresponde al 45 ± 3% (*n* = 41) de la corriente al pico y Shal debe contribuir a él (Figura 15B, C). No obstante, 10 NMBs fueron prácticamente insensibles al bloqueo, y su corriente al pico se inhibió en una fracción menor al 15% (Figura 15B, D).

Figura 15. Las corrientes de K⁺ tipo A en las NMBs son diferencialmente sensibles a una toxina específica para Shal. **A**, Trazos superimpuestos que corresponden a corrientes control y corrientes expuestas a PaTx2 1 μM registradas en ovocitos que expresan dShal recombinante (trazos superiores) o corrientes Shaker registradas en las fibras musculares No. 6 de larvas del tercer instar (trazos inferiores). **B**, Trazos superimpuestos de corrientes de K⁺ registradas en dos NMBs diferentes antes y después de la exposición a PaTx2 1 μM. En una neurona sensible a la toxina (trazos superiores), el componente bloqueado es una corriente de activación e inactivación rápida. La neurona inferior es insensible a la toxina. Las barras de calibración tienen la misma escala que arriba. **C**, Resumen de los resultados presentados en A (*n* = 4, para dShal y Shaker muscular) y B (*n* = 41). El recuadro muestra el porcentaje de bloqueo de la corriente al pico por PaTx2 1 μM como función del tiempo después de la disociación (en h). La línea indica el bloqueo más bajo por 4-AP. **D**, Los trazos superimpuestos muestran una corriente de K⁺ antes y después de la exposición a 4-AP 2.5 mM. La calibración es la misma que en B. La gráfica inferior muestra la eficiencia de bloqueo por 4-AP y PaTx2 en cada célula examinada.



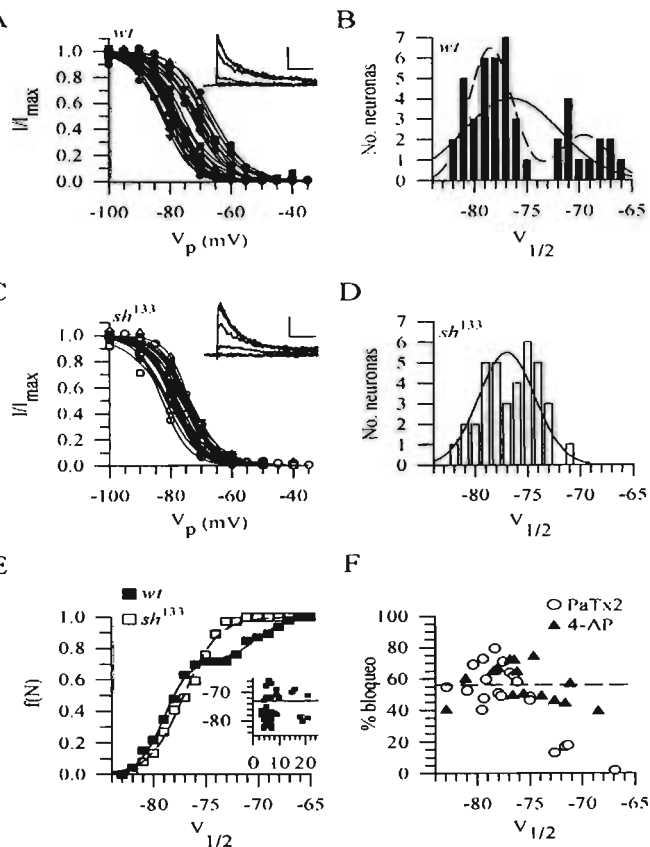
Se consideró la posibilidad de que la resistencia a la PaTx2 reflejara la ausencia del componente tipo A en ese subconjunto de neuronas. Para aclarar este punto se probó un bloqueador de corrientes tipo A, 4-AP, que inhibe igualmente a los canales Shaker que a los canales Shal. Se observó que todas las neuronas examinadas (*n* = 25) mostraron sensibilidad a la 4-AP; es decir, expresaban una corriente tipo A (Figura 15D). Más aún, en la mayoría de las NMBs en la que la corriente tipo A es dominada por el componente sensible a PaTx2, el porcentaje de bloqueo por la toxina es igual al porcentaje de bloqueo por la 4-AP ($55 \pm 3\%$ vs. $55 \pm 2\%$, respectivamente). Este resultado es consistente con la idea de que en tales neuronas Shal contribuye con la mayor parte de la corriente tipo A. Siguiendo esta lógica, el subconjunto de neuronas

que mostraron escasa sensibilidad a PaTx2 pero cuya corriente se bloqueó por 4-AP debe representar un subconjunto de NMBs donde Shaker es el principal contribuyente de la corriente tipo A.

Análisis de la inactivación en estado estacionario.

Para probar esta hipótesis se analizaron algunos parámetros biofísicos de las corrientes registradas en las NMBs. El primero fue la inactivación en estado estacionario, que por simplicidad se modeló empleando una distribución de Boltzmann sencilla. El análisis de la inactivación en estado estacionario de una muestra de 46 NMBs *wt* y 37 NMBs *sh*¹³³ mostró que los valores promedio de los potenciales medios de inactivación ($V_{1/2}$) en ambas poblaciones no fueron diferentes (*wt*, -76.4 ± 0.7 mV; *sh*¹³³, -77.0 ± 0.4 mV). Sin embargo, se advirtió que el rango de $V_{1/2}$ en *wt* era más amplio (de -83.0 a -66.0 mV) que en *sh*¹³³ (de -83.0 a -71.0 mV), y comparando sus desviaciones estándar (SD) con la prueba de *F* se verificó que la de *wt* excedía a la de *sh*¹³³ (*wt*, 4.6; *sh*¹³³, 2.7; $p < 0.005$). El incremento en la SD de la población *wt* se debe a una sub-población de neuronas con $V_{1/2} > -73$ mV que está ausente de la población *sh*¹³³ y, por lo tanto, es dependiente de la presencia de canales Shaker funcionales (Figura 16). Esta subpoblación representa el 28% de la población total y coincide con la fracción de neuronas que mostraron resistencia a la PaTx2 (24%). Esta coincidencia apoya la hipótesis de que en la mayoría de las NMBs (70-80%) Shal domina la corriente tipo A. Esta corriente es sensible a PaTx2 y presenta un $V_{1/2} < -73$ mV. Por otro lado, el conjunto de neuronas restantes, que son resistentes a PaTx2 o se inactivan a $V_{1/2} > -73$ mV, debe expresar Shaker como el componente principal de la corriente inactivante.

Figura 16. Los canales Shaker agregan un componente depolarizado a la corriente inactivante en un subconjunto de NMBs. **A**, Los datos de inactivación de estado estacionario de 46 neuronas *wt* se obtuvieron midiendo la corriente al pico inducida por un pulso a +40 mV (recuadro) después de los prepulsos condicionantes (V_p) indicados en el eje x . Los datos se normalizaron a la corriente máxima y se ajustaron a una distribución sencilla de Boltzmann. El $V_{1/2}$ promedió -76.4 ± 4.6 mV (\pm SD). **B**, El histograma muestra que las NMBs *wt* pueden dividirse en 2 grupos de acuerdo con su $V_{1/2}$. El tamaño del *bin* es 1 mV. La línea continua muestra la función Gaussiana graficada empleando el promedio y la SD experimentales. La línea punteada muestra la optimización de la función Gaussiana. La optimización arrojó los siguientes valores: $V_{1/2} = -78.0$ mV para el componente mayoritario (72% de la muestra) y $V_{1/2} = -70.0$ mV para el componente minoritario. **C**, Los da-



tos de inactivación en estado estacionario de 37 NMBs *sh¹³³* se obtuvieron y analizaron de la misma manera que se describió para *wt*. $V_{1/2}$ promedió -77.0 ± 2.7 mV (\pm SD). **D**, El histograma de $V_{1/2}$ para *sh¹³³* se construyó igual que en B. La línea continua muestra la función Gaussiana descrita por el valor empírico del promedio y su SD. **E**, Las distribuciones de $V_{1/2}$ para *wt* y *sh¹³³* se muestran en forma cumulativa para enfatizar el hecho de que mientras la muestra *sh¹³³* se distribuye normalmente, la muestra *wt* se aleja de la distribución normal. Las líneas continuas son distribuciones de Boltzmann graficadas con los valores obtenidos de las optimizaciones de las funciones Gaussianas en B y D. El recuadro muestra los valores de $V_{1/2}$ *wt* (en mV) graficados como función del tiempo después de la disociación (en h). La línea indica -73 mV. **F**, Sensibilidad de la corriente a PaTx2 y 4-AP graficada como función del $V_{1/2}$. La línea punteada muestra al bloqueo promedio por 4-AP ($56 \pm 3\%$). La calibración en A y C es 100 pA y 20 ms.

Se examinó esta hipótesis de manera más detallada analizando la inactivación en estado estacionario de los conjuntos de neuronas que presentaron sensibilidad o resistencia a la PaTx2. Si la corriente resistente a la toxina se conduce por canales Shaker, el mismo subgrupo de neuronas que muestran resistencia deben exhibir valores depolarizados de $V_{1/2}$. En 20 neuronas la configuración de célula completa se pudo

mantener suficiente tiempo (> 4 min) para investigar ambos parámetros. En 16 de estas células, el bloqueo por PaTx2 fue mayor al 40% y estas mismas neuronas exhibieron $V_{1/2} < -75$ mV (Figura 16F). Las 4 neuronas en las que la toxina tuvo un efecto pequeño sobre la amplitud de la corriente mostraron $V_{1/2}$ depolarizados ($V_{1/2} > -74$ mV). Este resultado se adecua con la idea de que Shaker segrega a un subconjunto pequeño de NMBs en donde contribuye con una corriente tipo A que es resistente a PaTx2 y que se inactiva a potenciales depolarizados.

La observación de que Shaker segrega en las moscas *wt* a un subconjunto de NMBs disociadas pudiera deberse a la incorporación de nuevos canales Shaker en las neuritas que crecen y maduran en las neuronas disociadas después de la axotomía que se realiza durante la dispersión de los cerebros. Si este fuese el caso, la sensibilidad a la toxina y la inactivación en estado estacionario variaría como función del tiempo que las neuronas pasan en cultivo. Específicamente, se observaría que la resistencia a la PaTx2 y los valores depolarizados de $V_{1/2}$ segregarían a las neuronas más viejas. Como se puede apreciar en los recuadros de las Figuras 15C y 16E, este no es el caso, haciendo esta explicación alternativa poco probable.

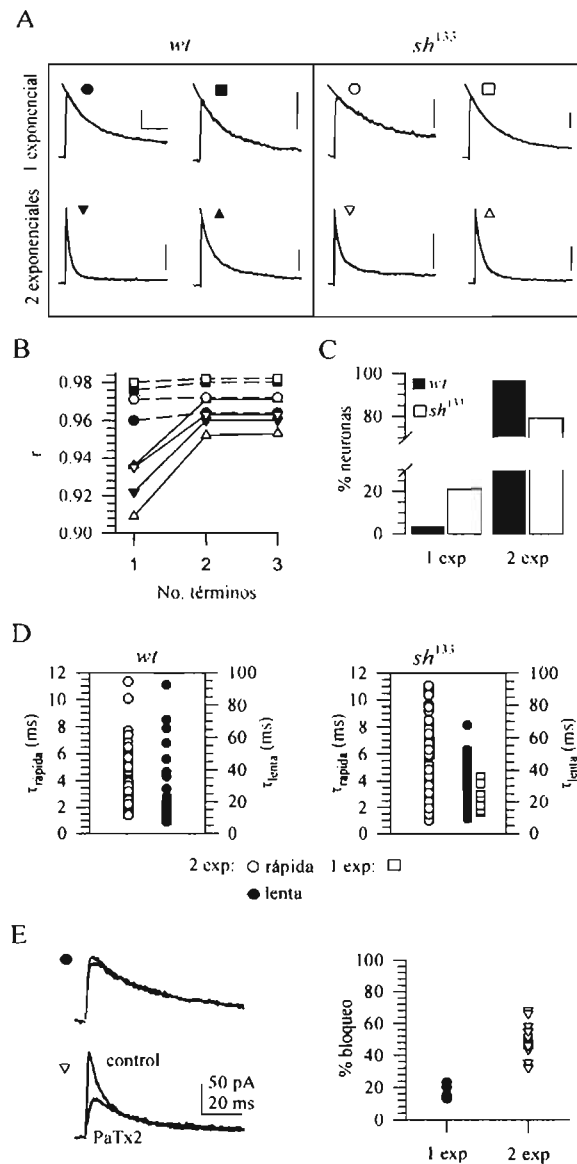
Las neuronas de los Cuerpos Fungiformes sh^{133} carecen de un componente de inactivación rápida.

Si en el subconjunto de NMBs donde Shaker se expresa este canal constituye el componente principal de la corriente tipo A, entonces en la línea mutante sh^{133} debe existir un subconjunto de neuronas de similar tamaño en el cual la cinética de inactivación se vea modificada. En concreto, la contribución de la constante rápida de inactivación debe disminuir. Se probó esta hipótesis analizando la cinética de inactivación en una muestra de 60 NMBs *wt* y 61 NMBs sh^{133} . La fase decreciente de la corriente se ajustó a una suma de exponenciales y el número óptimo de términos en la

sumatoria se determinó con una estadística para modelos anidados (Horn, 1987) (Figura 17A, B). El 97% de las neuronas *wt* requirieron de dos exponenciales para ajustar su inactivación (Figura 11C). En esta mayoría de neuronas la constante de tiempo del componente rápido de inactivación promedió 4.6 ± 0.3 ms; y el lento, 22.0 ± 2.0 ms (Figura 17D). La muestra *sh*¹³³ mostró un exceso de neuronas cuyo curso temporal de inactivación se ajustó adecuadamente a una sola exponencial (12/61, $p < 0.005$, prueba de χ^2) (Figura 17C). En estas neuronas la constante de tiempo fue de 19.0 ± 2.0 ms, y es igual, dentro del error, a la constante de tiempo lenta de las *wt*, pero es significativamente mayor que la constante de tiempo rápida ($p < 0.0005$, prueba de *t* de Student) (Figura 17D). Además, la densidad de corriente al pico en las NMBs *sh*¹³³ que carecen del componente rápido de inactivación (432 ± 82 pA/pF, $n = 12$) es menor que la corriente promedio *wt* (602 ± 46 pA/pF, $n = 60$). La diferencia (32%) es marginalmente significativa ($p = 0.052$, prueba de *t* de Student). En conjunto, los resultados presentados permiten concluir que en la mutante *sh*¹³³, un subconjunto de NMBs carece del componente de inactivación rápida de la corriente asociada al gene *shaker*. En las NMBs *wt*, Shaker conduce una corriente tipo A insensible a PaTx2 y que contribuye a la inactivación de estado estacionario con un componente que se inactiva a potenciales más despolarizados (> -73 mV). Notablemente, el subgrupo minoritario de neuronas *sh*¹³³ que muestran corrientes de K⁺ que se inactivan a lo largo de una sola exponencial fueron resistentes al bloqueo por PaTx2 (bloqueo $< 23\%$) (Figura 17E). Esto es indicativo de que existe un subconjunto de NMBs que expresan pocos (si es que alguno) canales Shal de inactivación rápida. En las moscas *wt*, este subgrupo de neuronas expresa Shaker como el componente principal de la corriente somática tipo A.

En la mayoría de neuronas *sh*¹³³, aquellas cuyas corrientes se inactivaron a lo largo de dos exponenciales, las constantes de tiempo de los componentes rápido y lento promediaron 5.7 ± 0.5 y 27.0 ± 2.0 ms, respectivamente (Figura 17D). El compo--

Figura 17. Shaker contribuye un componente de inactivación rápida en un subconjunto de NMBs. **A**, Los ajustes exponenciales a las corrientes transitorias de 4 NMBs *wt* y 4 *sh*¹³³ se muestran superimpuestos sobre los trazos de corriente. La calibración, en todos los trazos, es de 100 pA y 20 ms. **B**, La gráfica muestra el mejoramiento del coeficiente de correlación (*r*) como función del incremento de términos en la función exponencial que ajusta los trazos de corriente mostrados en A. Algunas de las corrientes *wt* y *sh*¹³³ se ajustan a 1 sola exponencial (■,●,□,○), en tanto que otras requieren de dos términos (▲,▼,△,▽). Los símbolos se relacionan con las corrientes en A. **C**, Distribución de las NMBs *wt* (*n* = 60) y *sh*¹³³ (*n* = 61) según el número de exponenciales que se requirieron para el ajuste adecuado. La diferencia entre la distribución *wt* y la *sh*¹³³ es estadísticamente significativa (*p* < 0.005, χ^2). **D**, Distribución de las constantes de tiempo rápida y lenta de 58 y 49 NMBs *wt* y *sh*¹³³, respectivamente, cuyas corrientes se ajustaron a 2 exponenciales. Los cuadrados en el panel derecho muestran la distribución de las constantes de tiempo de las 12 neuronas *sh*¹³³ cuya inactivación se ajustó a 1 sola exponencial. **E**, Los trazos de la izquierda muestran ejemplos de corrientes de K⁺ *sh*¹³³ que se inactivan a lo largo de 1 (superior) ó 2 (inferior) exponenciales, antes y después de la exposición a PaTx2 1 μ M. El panel derecho muestra los resultados obtenidos en 22 neuronas *sh*¹³³.



mente rápido contribuye 64% de la densidad de corriente al pico. En este subconjunto de neuronas *sh*¹³³, la densidad de corriente al pico (595 ± 48 pA/pF, *n* = 49) es muy similar a la densidad de corriente en la población de neuronas *wt*. Estas neuronas representan la mayoría de NMBs en las cuales Shal es el único responsable de conducir la corriente somática tipo A. En las neuronas *sh*¹³³ que exhiben corrientes que se inactivan con dos exponenciales, el componente de inactivación rápida se elimina al agregar PaTx2, a un nivel comparable que en las neuronas *wt* (Figura 17E).

El componente resistente a 4-aminopiridina.

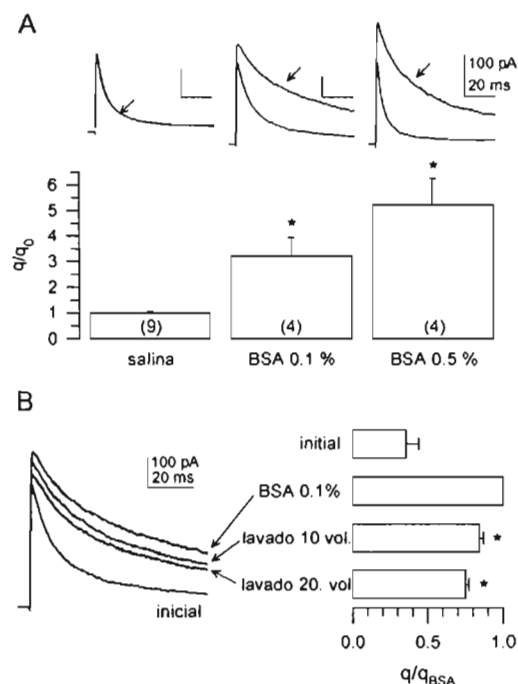
La corriente de inactivación lenta que permanece después de la aplicación de 4-AP se asemeja ligeramente a la reportada previamente en: cultivos de neuronas larvarias (Solc y Aldrich, 1988), miotubos embrionarios (Zagotta et al., 1988), botones sinápticos tipo III de larva (Martinez-Padron y Ferrus, 1997) y fotorreceptores (Hardie, 1991). Esta corriente se conoce como K_D y probablemente la codifica *shab* (Tsunoda y Salkoff, 1995a, b). La corriente resistente a 4-AP se inactiva más rápido que K_D y no se realizaron experimentos para determinar su identidad sin ambigüedad. Sin embargo, por exclusión, se estima que *Shab* es el contribuyente principal. Esto se debe a que esta corriente es resistente a 4-AP, pero se bloquea por quinidina, y permanece en el genotipo *sh*¹³³; es poco probable entonces que sea conducida por canales *Shal* o *Shaker*. Por otro lado, aunque los transcritos para *shaw* se encontraron en los MBs, se puede pensar que las corrientes documentadas no contienen corrientes *Shaw*. Esto se debe a que se restó el componente lineal estimado para cada célula según su resistencia de entrada. Los canales *Shaw* registrados en neuronas embrionarias o expresados en ovocitos presentan una sensibilidad pobre al voltaje y funcionan, más bien, como corrientes de fuga (Wei et al., 1990; Tsunoda y Salkoff, 1995b); por lo tanto, estarían excluidos de los registros al restar el componente lineal. Por último, la corriente de inactivación lenta fue resistente a 4-AP, pero los canales *Shaw*, nativos y recombinantes, son muy susceptibles del bloqueo por 4-AP (Wei et al., 1990; Tsunoda y Salkoff, 1995b).

Modulación de las corrientes de K^+ por el contenido de esteroides en la membrana plasmática.

En pruebas iniciales se observó que la BSA modificaba consistentemente la amplitud y cinética de la corriente total de K^+ . Se profundizó en dichas observaciones y

se cuantificó el efecto de la BSA sobre la corriente. Se estimó la carga (q) transferida por los canales de K^+ durante 80 ms, integrando la corriente inducida por un pulso a +40 mV, y se calculó la razón de q después y antes (q_0) de perfundir una solución con BSA. La perfusión con soluciones de BSA, pero no la perfusión de solución control, incrementó significativamente la q transferida por los canales de K^+ de una manera dependiente de la concentración de BSA (Figura 18A, q/q_0 promedió 3.2 ± 0.7 , en 0.1% BSA, y 5.2 ± 1.0 , en 0.5% BSA).

Figura 18. La BSA incrementa la carga transferida por los canales Kv. **A**, Los trazos superimpuestos muestran corrientes de K^+ (a +40 mV) antes y después (flecha) de perfundir soluciones con diferentes concentraciones de BSA (izquierda, 0%; centro, 0.1 %; derecha, 0.5%). Las barras de calibración aplican a todos los trazos. La gráfica inferior muestra la razón de la carga promedio transferida por los canales Kv en presencia (q) y ausencia de BSA (q_0). Los paréntesis indican el número de células. * $p < 0.05$ vs. solución salina, ANOVA de 1 vía seguida del algoritmo de Scheffe para comparaciones múltiples. **B**, Los trazos superimpuestos de la izquierda son corrientes a +40 mV registradas en una sola NMBs en ausencia (inicial), presencia (0.1% BSA) y después de lavar la BSA (lavado 10 y 20 vol.). La gráfica de la derecha muestra los datos promedio normalizados por la carga registrada durante la exposición a BSA (q_{BSA}). * $p < 0.01$ vs. carga inicial, t de Student pareada.



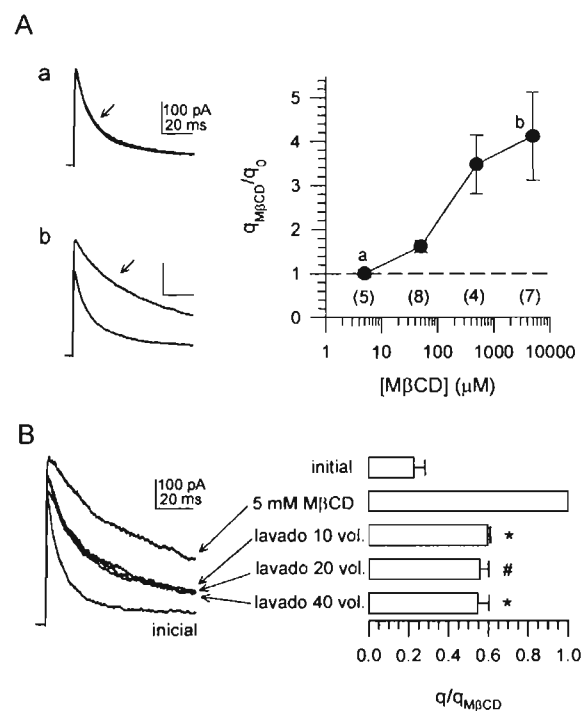
El efecto de la BSA sobre las corrientes de K^+ fue sólo parcialmente reversible. En tres diferentes células que se trataron con 0.1% de BSA, el lavado intenso posterior al tratamiento (entre 10 y 20 volúmenes de la cámara de registro) fue incapaz de restablecer la amplitud y cinética original de la corriente (Figura 18B). La disminución promedio del efecto de la BSA fue de $25 \pm 2\%$.

Como se ha reportado que la BSA es capaz de sustraer colesterol y otros lípidos de la membrana (Visconti et al., 1999), aún durante exposiciones cortas (Smani et al., 2004), se investigó esta hipótesis. Los cambios en el contenido lipídico de la membrana podrían explicar las modificaciones observadas en las corrientes de K^+ de las NMBs, pues ciertos lípidos son determinantes de la inactivación de los canales Kv (Oliver et al., 2004). Se analizó si otro compuesto capaz de remover lípidos de la MP, pero de naturaleza química diferente, mimetizaría los efectos de la BSA sobre la corriente de K^+ . Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos hidrosolubles formados por 6-8 moléculas de glucosa, que aumentan la solubilidad de sustancias no polares al incorporarlas en su cavidad hidrofóbica (Ohtani et al., 1989; Kilsdonk et al., 1995; Yancey et al., 1996). El número de unidades de glucosa determina la dimensión de la cavidad hidrofóbica en la cual las moléculas huéspedes de tamaño adecuado y baja polaridad pueden acomodarse en un rápido equilibrio (Ohtani et al., 1989; Yancey et al., 1996). Las β -CDs son heptasacáridos que prefieren extraer colesterol de la MP que a otros lípidos (Ohtani et al., 1989) y se han usado repetidamente para agotar el colesterol de la MP de manera precisa y reproducible (Yancey et al., 1996; Levitan et al., 2000; Martens et al., 2000; Martens et al., 2001).

Después de establecer la configuración de célula completa y registrar la corriente control, la cámara de registro se perfundió con M β CD. Se observó que la M β CD induce una modificación de la cinética y amplitud de la corriente de K^+ muy similar a la producida por BSA (Figura 19A). El incremento en la carga transferida es dependiente de la dosis en el rango entre 5 μ M y 5 mM. A una concentración de 5 mM, q/q_0 promedió 4.1 ± 1.0 ($p < 0.05$ vs. perfusión con solución salina, ANOVA de 1 vía seguida del algoritmo de Scheffe para comparaciones múltiples). El incremento de la carga fue sólo parcialmente reversible, aún después de un lavado extensivo de la M β CD

(hasta 40 volúmenes de la cámara de registro) (Figura 19B). La recuperación máxima lograda por el lavado de la M β CD promedió $45 \pm 6\%$. Debido a que la M β CD es altamente hidrofílica y no penetra en la membrana lipídica (Ohtani et al., 1989), la explicación más probable para estos resultados es que la M β CD remueve rápidamente esteroides de la MP y que la célula sólo puede reemplazarlos pobremente durante la sesión de registro.

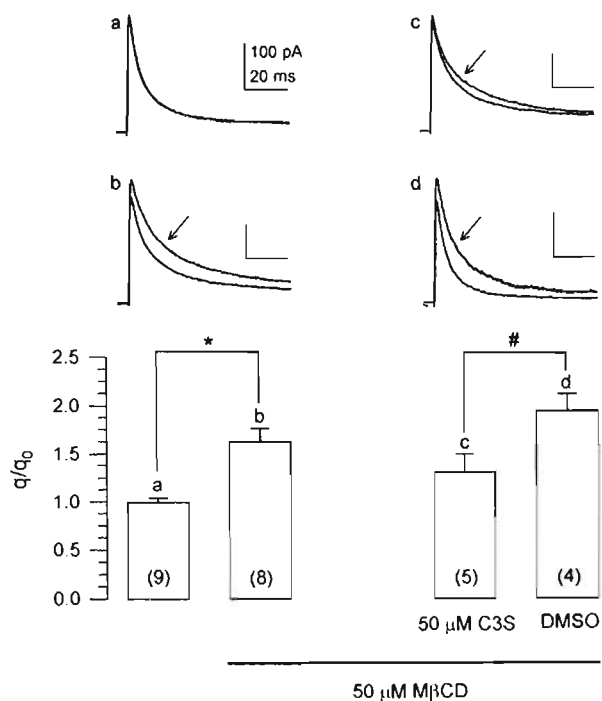
Figura 19. La M β CD aumenta la carga transferida por los canales Kv. Los trazos superimpuestos de la izquierda muestran corrientes de K⁺ (a +40 mV) registradas antes y después de perfundir M β CD 5 μ M (superior) ó 5 mM (inferior). Ambos trazos comparten las barras de calibración. La gráfica de la derecha muestra la razón de la carga promedio transferida por los canales Kv en presencia (q) y ausencia (q_0) de concentraciones crecientes de M β CD. Los paréntesis indican la n . **B**, Los trazos superimpuestos de la izquierda muestran corrientes registradas en una sola NMBs a +40 mV en ausencia (inicial), presencia (5 mM M β CD) o después de lavar la M β CD (lavados de 10, 20 y 40 volúmenes). La gráfica de la derecha ilustra los datos promedio de 4 experimentos normalizados por la carga transferida por los canales Kv en presencia de M β CD. *, $p < 0.05$; # $p < 0.01$ vs. carga inicial, t de Student pareada.



Se ha propuesto que los complejos de M β CD-colesterol sirven como donadores de colesterol hacia la MP (Christian et al., 1997), y pueden revertir el efecto de las CDs libres en las corrientes aniónicas reguladas por el volumen celular (Levitan et al., 2000) y en los canales de K⁺ rectificadores entrantes (Romanenko et al., 2002). Se prepararon complejos M β CD-colesterol preincubado la M β CD con concentraciones equimolares de C3S y se probó su efecto sobre la corriente total de K⁺. Los complejos M β CD-C3S

incrementan ligeramente la carga transferida por los canales de K^+ , pero en una proporción menor que la M β CD libre (Figura 20). Perfundir la cámara de registro con 50 μ M M β CD ó 50 μ M M β CD + 0.05% DMSO induce un incremento de la carga que es estadísticamente superior al que ocurre cuando se perfunde sólo con solución salina o con 50 μ M M β CD que se ha preincubado con C3S equimolar, respectivamente. En conclusión, la preincubación con el análogo de colesterol inhibe la capacidad de la M β CD de retirar esteroides de la MP.

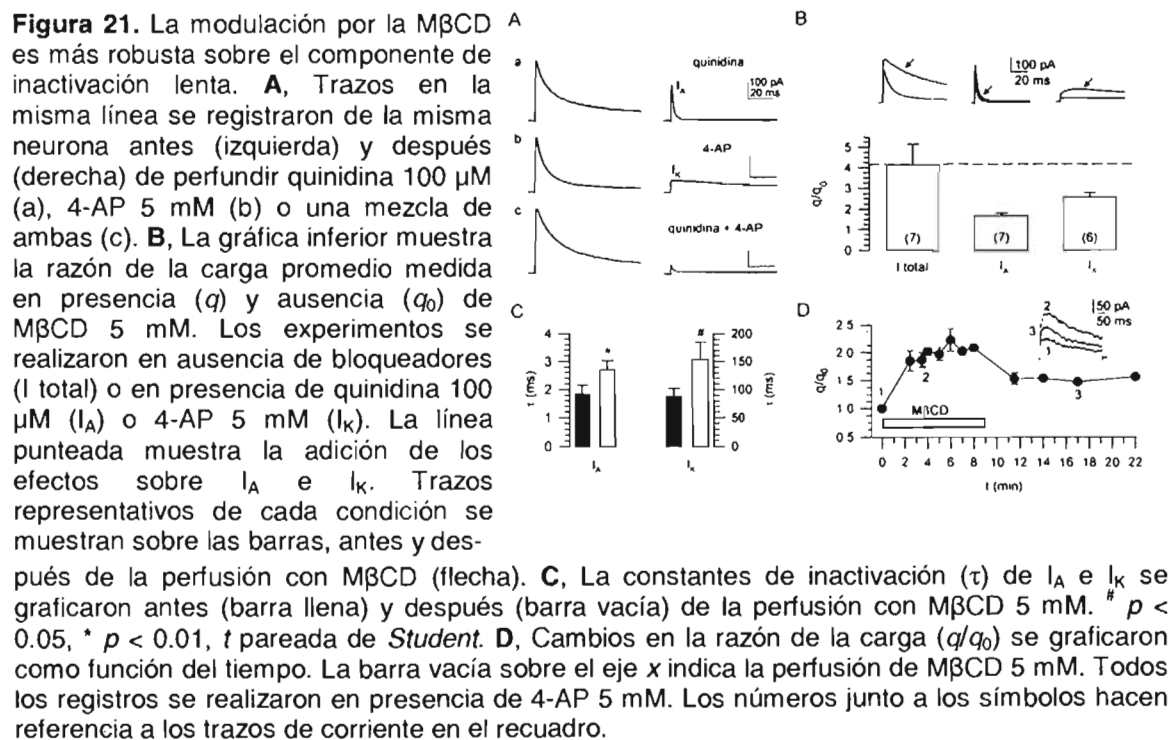
Figura 20. La preincubación de M β CD con el análogo de colesterol C3S inhibe su capacidad de modular los canales Kv. Los trazos superimpuestos muestran corrientes registradas a +40 mV antes y después (flechas) de perfundir solución salina control (a) o M β CD (b,c,d). Las letras de los trazos corresponden a las letras en las barras de la gráfica inferior. En c, la M β CD se preincubó con una concentración equimolar de C3S. En d, la M β CD se preincubó con DMSO al 0.05%. Los paréntesis indican la *n*. * $p < 0.005$; # $p < 0.05$, *t* de Student.



Del análisis presentado es claro que los compuestos que retiran esteroides de la MP modulan las corrientes de K^+ en las NMBs de *Drosophila*. La reversibilidad de esta modulación es solamente parcial aún después de un lavado intensivo, indicando que las células no pueden reestablecer la composición o distribución original de lípidos

rápida. Finalmente, los efectos de la M β CD sobre la corriente de K⁺ se bloquean parcialmente al preincubar la CD con un análogo del colesterol, C3S.

Es aparente, además, que el aumento de la carga de la corriente de K⁺ inducido por la M β CD es mediado por un efecto diferencial sobre la amplitud de la corriente y sobre su cinética (ver Figuras 18 y 19). La corriente total de K⁺ en las NMBs se compone de una corriente de inactivación rápida tipo A contribuida principalmente por Shal, y una corriente de inactivación lenta, probablemente contribuida por Shab. Ambos componentes pueden disecarse farmacológicamente. La quinidina (100 μ M) bloquea el componente lento, despejando la corriente rápida (Figura 21Aa). Por el contrario, 4-AP (5 mM) bloquea la corriente rápida y revela el componente lento (Figura 21Ab). Después de aislar cada componente se perfundió la cámara con M β CD 5 mM. La modulación por la liberación de esteroides es más fuerte sobre el componente lento que sobre el componente rápido (Figura 21B). La razón q/q_0 a M β CD 5 mM promedió 1.7 ± 0.1 , para la corriente tipo A, y 2.6 ± 0.2 , para la corriente lenta.



La liberación de esteroides modifica claramente la cinética de la corriente. Después de agregar quinidina ó 4-AP, la corriente resistente se ajustó a una sola exponencial, por simplicidad. Las constantes de tiempo asociadas a tales términos exponenciales se compararon antes y después de la perfusión con M β CD. Para la corriente rápida y la corriente lenta, la velocidad de inactivación disminuyó después de la liberación de esteroides de la MP (Figura 21C). En ausencia de M β CD, la corriente tipo A se inactivó con una constante de tiempo promedio de 2.8 ± 0.3 ms, y la liberación de esteroides la aumentó a 3.7 ± 0.5 ms. La corriente lenta se inactivó a lo largo de una constante de tiempo que promedió 87.0 ± 15.0 ms. Cuando se aplicó M β CD a la solución externa, la constante de tiempo aumentó a 154.0 ± 31.0 ms.

Finalmente se analizó el desarrollo temporal de la modulación de la corriente de inactivación lenta por la liberación de esteroides mediada por M β CD. Inmediatamente después de terminar la perfusión de M β CD, el incremento de la carga fue máximo ($q/q_0 = 1.8 \pm 0.2$), y no cambió durante el tiempo que la M β CD permaneció en el baño (q/q_0 al final, 2.1 ± 0.0). Cuando la solución del baño se reemplazó nuevamente con la solución salina control, la carga disminuyó parcialmente y se mantuvo en un estado constante durante el resto del experimento. Este valor fue $53 \pm 1\%$ mayor que la corriente inicial. En conclusión, la liberación de esteroides por BSA o M β CD incrementa la carga transferida por los canales Kv en las NMBs de *Drosophila* mediante una fuerte modulación de la corriente de inactivación lenta (Shab) y un aumento menos claro de la corriente tipo A (Shal).

DISCUSIÓN.

Los canales iónicos expresados en la MP de las neuronas definen su excitabilidad (Hille, 1992). La modulación de las propiedades intrínsecas de la

membrana neuronal puede afectar profundamente la actividad y la dinámica de los circuitos (Harris-Warrick y Marder, 1991) y, por lo tanto, representa un locus molecular de la plasticidad del comportamiento de los animales (Byrne y Kandel, 1996). Unos 145 genes que codifican para subunidades α y subunidades accesorias de canales iónicos se identificaron en el genoma de *Drosophila* (Littleton y Ganetzky, 2000). De este vasto repertorio, cada célula expresa un conjunto de canales iónicos que le proveen de propiedades particulares de excitabilidad (Hille, 1992). En este trabajo se presenta un estudio de los canales Kv que expresan las NMBs de *Drosophila*.

Corrientes de célula completa en neuronas disociadas de los Cuerpos Fungiformes de larva.

Aunque aún no es posible aislar una preparación pura de NMBs de *Drosophila* debido a la pequeña región que ocupan en el cerebro, el empleo de líneas transgénicas que expresan β -Galactosidasa o GFP exclusiva o preferentemente en las NMBs ha permitido identificarlas en dispersiones del cerebro completo (Wright y Zhong, 1995; Delgado et al., 1998; Su y O'Dowd, 2003). Esta aproximación experimental ha abierto la puerta a la caracterización electrofisiológica de las NMBs que son requeridas para el aprendizaje y la memoria olfativa en la mosca de la fruta. Es muy importante resaltar, que la expresión de estas proteínas reporteras no parece alterar las propiedades de las corrientes que hasta ahora se han reportado en las neuronas marcadas (Wright y Zhong, 1995; Su y O'Dowd, 2003).

En este trabajo se emplearon NMBs de cerebros de larva marcadas con GFP para caracterizar los canales Kv. El aprendizaje asociativo olfativo no es exclusivo de adultos. La *Drosophila* no sólo es capaz de aprender en el estadio de larva (Aceves-Piña y Quinn, 1979), sino que el entrenamiento olfativo de las larvas también depende

de la integridad de los MBs (Heisenberg et al., 1985). Una mutación en el gene *dunce*, que se expresa preferentemente en los MBs de larvas y adultos (Nighorn et al., 1991), perturba el aprendizaje en ambas etapas del desarrollo (Aceves-Piña y Quinn, 1979). Más aún, cuando se emplea el paradigma de entrenamiento adecuado, las moscas adultas pueden recordar lo que se les enseñó como larvas (Tully et al., 1994a), aún cuando durante la metamorfosis ocurre un importante rearrreglo de la neuropila de los MBs (Armstrong et al., 1998; Lee et al., 1999). Entre diversos marcadores moleculares de los MBs, el patrón general de expresión de Shaker se conserva durante el desarrollo (Nighorn et al., 1991; Rogero et al., 1997; Crittenden et al., 1998). Varias de estas proteínas se han relacionado con el aprendizaje y la memoria olfativa (Roman y Davis, 2001). En conclusión, existe la fuerte sugerencia que los MBs sirven las mismas funciones en larvas y en adultos. Más importante aún es el hecho de que las NMBs de las larvas emplean la misma maquinaria molecular para sustentar la plasticidad del comportamiento y que los cambios neuronales que ocurren en la larva como resultado del aprendizaje pueden permanecer hasta el estado adulto.

Los resultados descritos muestran que las células de los MBs expresan cuatro genes que codifican para canales Kv. Debido a que los cúmulos de células aislados de los MBs y empleados para los experimentos de RT-PCR contienen neuronas y glia, probablemente en una razón de 10:1 (Klambt et al., 2001), no se puede determinar que tipo celular es responsable de la señal. Sin embargo, estos datos son consistentes con los resultados electrofisiológicos y apoyan la siguiente conclusión: Shal es la principal corriente somática tipo A en las NMBs; los canales Shaker somáticos se segregan en un subconjunto de las NMBs disociadas (20-30%), y la ausencia de canales Shaker funcionales modifica significativamente el perfil de la corriente en estas neuronas.

Debido a que al tiempo en que se llevaron a cabo los experimentos electrofisiológicos las NMBs disociadas no desarrollaron neuritas apreciables, los

canales registrados son esencialmente canales somáticos. La capacitancia celular promedió 0.42 ± 0.1 pF y corresponde a una esfera de $3.6 \mu\text{m}$ de diámetro, asumiendo $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ de capacitancia específica. Este tamaño es aproximadamente el mismo que el reportado para los somas de las NMBs en cerebro intactos (Wang et al., 2001). Por lo tanto se excluye la posibilidad de una contribución significativa de corrientes axonales en los datos reportados. No se puede descartar la posibilidad de que la expresión de canales iónicos en los axones de las NMBs sea diferente de la que se reporta en este trabajo. De hecho, Shaker parece ser el contribuyente principal de la corriente tipo A registrada de NMBs disociadas de abeja, que han desarrollado arborizaciones dendríticas y axonales (Pelz et al., 1999).

En *Drosophila* existen cinco genes cuyos productos codifican para canales de la familia Kv. El producto del gene *shal* (Wei et al., 1990), y varias de las variantes de empalme de *shaker* (Iverson et al., 1988; Timpe et al., 1988) producen corrientes tipo A cuando se expresan en ovocitos de *Xenopus*. Shab se comporta como un rectificador tardío y Shaw opera como un canal de fuga (Wei et al., 1990; Covarrubias et al., 1991; Tsunoda y Salkoff, 1995a, b). Un segundo miembro de la subfamilia *shaw*, *shawl*, se clonó recientemente, pero no se realizaron estudios de expresión para caracterizar la corriente que conduce (Hodge et al., 2005). En general, la identidad en la secuencia peptídica de estos 5 canales en la región transmembranal es mayor al 50% (Butler et al., 1989).

En vertebrados, un canal Kv formado por una subunidad α que por si misma conduce una corriente sostenida, puede comportarse como un canal tipo A cuando se le asocia una subunidad accesoria β (Pongs et al., 1999). Sin embargo, la única subunidad β de *Drosophila* (Littleton y Ganetzky, 2000), Hyperkinetic (Hk), carece del dominio de bola inactivante de la subunidad $\beta 1$ de vertebrados y es, por tanto, incapaz de

restablecer la inactivación tipo N a una mutante del canal Shaker (Chouinard et al., 1995). Ya que faltan experimentos de co-expresión de *Hk* con *shab* y *shaw*, y no se han reportado variante inactivantes de estos canales, la posibilidad de que estas subunidades α conduzcan una corriente tipo A no puede descartarse pero parece improbable.

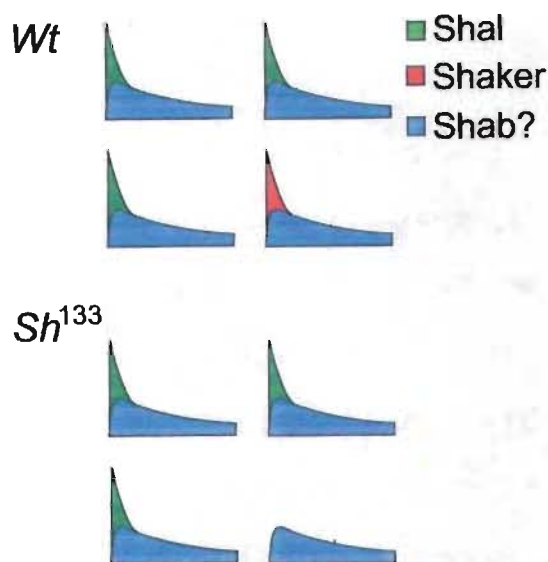
La contribución de Shal a la corriente total.

En nuestro sistema Shal es el principal contribuyente a la corriente tipo A (Figura 22). Esta puede verse como una estrategia general de las neuronas ya que en diversos sistemas, incluidos neuronas embrionarias, de larva y de pupa de *Drosophila*, Shal codifica para la corriente somática (Solc et al., 1987; Baker y Salkoff, 1990; Tsunoda y Salkoff, 1995b; Song et al., 1998; Baro et al., 2000). En las células *sh*¹³³ la corriente saliente se inactivó con un potencial medio de ~ -77 mV. Desde su primera caracterización, Connor y Stevens (1971) propusieron que las corrientes tipo A que se activan a potenciales hiperpolarizados sirven para determinar los tiempos entre los disparos en las neuronas que generan PAs repetitivos. En las neuronas gigantes de *Drosophila*, derivadas de cultivos de neuronas embrionarias tratadas con citocalacina, la 4-AP incrementa la frecuencia de disparo y disminuye la latencia de inicio de los PA (Zhao y Wu, 1997). Estudios genéticos mostraron que el efecto de la 4-AP en el patrón de disparo de las neuronas centrales de *Drosophila* se debía al bloqueo de Shal (Tsunoda y Salkoff, 1995b). Por lo tanto es probable que Shal determine la capacidad de frecuencia de las NMBs.

La contribución de Shaker a la corriente total.

Se han descrito tres categorías morfológicas de NMBs asociadas con cinco diferentes conjuntos de lóbulos (Crittenden et al., 1998; Lee et al., 1999). Dos tipos de neuronas se ramifican para dar origen a un lóbulo vertical y a uno medio (α/β y α'/β' , res

Figura 22. El canal Kv Shaker segrega a los somas de un subconjunto de NMBs. En el modelo se resumen los datos obtenidos en la tesis. En todas las neuronas analizadas se observó un componente de inactivación lenta, sensible a quinidina y resistente a 4-AP y PaTx2, posiblemente codificado por canales Shab (azul). Además de la corriente de inactivación lenta se observa una corriente de inactivación rápida que en el ~75% de las NMBs se conduce por canales Shal, sensibles a 4-AP y a PaTx2 (verde). En el ~25% restante, la corriente de inactivación rápida se conduce por canales Shaker somáticos (rojo). Estos canales muestran valores de $V_{1/2}$ 10 mV más depolarizados que los canales Shal y son sensibles a 4-AP pero resistentes a PaTx2. En la muestra de las neuronas sh^{133} sólo las neuronas que deberían expresar Shaker se ven modificadas. Las corrientes de estas neuronas mutantes son menores en amplitud y pierden el componente rápido de inactivación codificado por Shaker.



pectivamente). El tercer tipo proyecta al lóbulo medio γ . Nuestros resultados indican que Shaker somático se expresa funcionalmente en un conjunto restringido de neuronas que representan el 20-30% del total (Figura 22). Este valor es una cota inferior, pues es posible que no se haya detectado una contribución muy pequeña en el resto de las células. Aún falta establecer si es que acaso Shaker se expresa en uno de los subconjuntos morfológicos ya descritos. La hibridación *in situ* fue incapaz de distinguir una expresión diferencial de los transcritos de *shaker* en las NMBs (Pongs et al., 1988; Tseng-Crank et al., 1991), y los mensajeros de este canal parecen ausentes en los cerebros de las larvas, probablemente porque su expresión es muy baja (Tseng-Crank

et al., 1991). Sin embargo, se ha reportado la localización diferencial de otras proteínas relacionadas al aprendizaje y la memoria de las moscas en los tres tipos de NMBs, incluyendo receptores metabotrópicos, enzimas relacionadas al cAMP y proteínas de adhesión (Crittenden et al., 1998). Una expresión proteica heterogénea en subconjuntos de NMBs seguramente implica una diversidad funcional. Diversos estudios han abordado esta hipótesis. La feminización selectiva de subcompartimentos definidos de los MBs mostró la división funcional de las NMBs durante el cortejo (O'Dell et al., 1995). Además, empleando la mutante *alpha-lobes-absent*, que carece ya sea de los dos lóbulos verticales o de los tres lóbulos medios, se mostró en estudios de condicionamiento olfativo que los lóbulos verticales, pero no los medios, se requieren para la memoria de largo plazo (Pascual y Preat, 2001). Por otro lado, al interferir con la transmisión sináptica en los lóbulos α/β se bloqueó la recuperación de la memoria (McGuire et al., 2001), pero la expresión de un transgene *rutabaga* en las neuronas γ fue suficiente para restablecer la capacidad de aprendizaje olfativo en las mutantes *rutabaga* (Zars et al., 2000). Una mutación en el locus *shaker* interfiere con el condicionamiento olfativo (Cowan y Siegel, 1986); por lo tanto, su segregación neuronal debe reflejar los circuitos neuronales relevantes para este comportamiento.

La presencia de Shaker en un subconjunto de NMBs tiene un impacto importante en las propiedades de la corriente total de las neuronas que lo expresan. En este conjunto de neuronas, Shaker es el principal contribuyente a la corriente somática de inactivación rápida ($\tau \approx 5$ ms) y corre el potencial medio de inactivación en estado estacionario unos +10 mV. El subgrupo de neuronas que expresa Shaker tiene un $V_{1/2}$ de -69 mV, en tanto que en las corrientes dominadas por Shal el $V_{1/2}$ promedia -78 mV. Esta contribución es fisiológicamente relevante porque, como se mencionó, una mutante *shaker* se desenvuelve pobremente en protocolos de condicionamiento olfativo

que dependen de los MBs (Cowan y Siegel, 1986). En los axones, Shaker repolariza el potencial de acción (Tanouye y Ferrus, 1985). La falta de Shaker produce transmisión sináptica defectuosa (Jan et al., 1977) e inhibe el desarrollo de plasticidad sináptica en la unión neuromuscular (Delgado et al., 1994). Los mismos mecanismos que subyacen la transmisión sináptica defectuosa en las sinapsis periféricas pueden ocurrir en el sistema nervioso central y podrían explicar el fenotipo conductual de la mutante *shaker*. Sin embargo, la corriente dependiente de Shaker que se reporta en este trabajo destaca porque se inactiva a potenciales 30 mV más hiperpolarizados que aquellos reportados para Shaker muscular y recombinante (Wu y Haugland, 1985; Wei et al., 1990). Un valor similar de $V_{1/2}$ se reportó para canales Shaker somáticos en los fotorreceptores de *Drosophila* (Hardie, 1991). En estas células, la inactivación de Shaker provee a la membrana con un incremento en la ganancia que permite amplificar la razón señal-ruido de las señales graduadas de potencial (Niven et al., 2003). Está aún por establecerse si las corrientes Shaker juegan un papel similar en las NMBs.

La modulación de canales iónicos en el contexto de la memoria y el aprendizaje es de suma importancia (Byrne y Kandel, 1996). La fosforilación dependiente de PKA de los canales Shaker, en un dominio C-terminal conservado en todas las isoformas probadas funcionalmente, induce una aceleración de la inactivación que se refleja en un decremento neto de la amplitud (Drain et al., 1994). El metabolismo del cAMP es central para los procesos celulares que subyacen al aprendizaje y la memoria en *Drosophila* (Roman y Davis, 2001) y es lógico suponer que los canales Shaker pudieran estar dentro de esta cascada de señalización. Wright y Zhong (1995) reportaron que un subconjunto de NMBs expresa una corriente de inactivación rápida que se inhibe por análogos permeables del cAMP. Un estudio comparativo de la modulación en neuronas *wt* y *sh*¹³³ podría ayudar a determinar el papel jugado por Shaker en el componente de la corriente que es inhibido por cAMP.

Los resultados presentados en esta tesis contribuyen a esclarecer una paradoja que ha permanecido largo tiempo alrededor del gene *shaker*. Por un lado, la eliminación de este gene no es letal, ni a nivel del organismo ni a escala celular. Sin embargo, el gene *shaker* es aparentemente esencial para toda la vida metazoa, pues está presente en todos los animales, tanto vertebrados como invertebrados y está altamente conservado (Littleton y Ganetzky, 2000). ¿Qué ventaja comparativa confiere entonces el gene *shaker*? Según nuestros resultados el canal codificado por el gene *shaker* se expresa funcionalmente en los somas de un subconjunto de NMBs. Los MBs son “centros neuronales superiores” encargados de asociar olores con diversos estímulos ambientales. La implicación de este estudio es que aspectos sutiles del comportamiento superior son elementos esenciales en el juego de la selección natural y que deben existir algunos genes, como *shaker*, que han evolucionado específicamente para modular finamente estos procesos y no como elementos esenciales de la sobrevivencia celular o del organismo.

Otros canales de K⁺ dependientes de voltaje.

En el genoma de *Drosophila* existen únicamente 5 genes que codifican para canales homólogos a la familia Kv de mamíferos: *shaker*, *shal*, *shab* y dos genes *shaw* (Littleton y Ganetzky, 2000; Hodge et al., 2005). Sin embargo, otros canales selectivos para K⁺ que no pertenecen a la familia Kv también son regulados por el voltaje. Dos de los mejor estudiados son el producto del gene *ether-à-go-go* (*eag*) y el producto del gene *slowpoke* (*slo*).

El canal Eag pertenece a una subfamilia de tres genes, cada uno con una copia en el genoma de *Drosophila*, que se expresan en células excitables (Ganetzky et al., 1999; Littleton y Ganetzky, 2000; Bauer y Schwarz, 2001). La proteína Eag tiene mayor similitud con los canales catiónicos operados por nucleótidos cíclicos, que con la familia

Kv (la identidad de aminoácidos en el núcleo hidrofóbico de las proteínas es < 20%), pero no requieren de nucleótidos cíclicos para su activación. Estudios de expresión en ovocitos de *Xenopus* demostraron que los canales Eag son dependientes de voltaje, rectificadores salientes y altamente selectivos para K⁺ (Robertson et al., 1996). Notablemente, las corrientes Eag muestran un componente rápido de inactivación que se hace evidente a potenciales mayores a 0 mV, y son sensibles al bloqueo por quinidina (IC₅₀ ≈ 0.4 mM), pero insensible a 4-AP (IC₅₀ ≈ 100 mM). Ambas propiedades son compartidas con la corriente resistente a 4-AP que permanece en la mutante *sh*¹³³ y que se había sugerido se conducía por canales Shab. Sin embargo, una característica notable de los canales Eag es que son altamente permeables a Cs⁺, con una razón de permeabilidad P_K/P_{Cs} = 0.42 (Ludwig et al., 1994), por lo que es poco probable que canales Eag conduzcan la corriente de inactivación lenta descrita en las NMBs.

El gene *slo* codifica para un canal de K⁺ activado por Ca²⁺ que se expresa en los somas y axones de las NMBs (Becker et al., 1995). La similitud de aminoácidos entre Slo y los canales de la familia Kv se limita a los segmentos transmembranales S4, que constituye el núcleo del sensor de voltaje, y S5, que forma parte del poro (Atkinson et al., 1991). A una determinada concentración intracelular de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) la probabilidad de apertura del canal depende del voltaje, mostrando una fuerte rectificación saliente (Adelman et al., 1992). Dado el hecho de los anticuerpos contra Slo tiñen fuertemente el cáliz y el pedúnculo de los MBs (Becker et al., 1995), es posible proponer que sus corrientes deben registrarse en las NMBs. Sin embargo varias evidencias hacen posible pensar que las corrientes de K⁺ reportadas en este trabajo son carentes de corrientes Slo. Por un lado, la actividad de los canales Slo es absolutamente dependiente de la [Ca²⁺]_i, aún a potenciales > +50 mV. A +40 mV el canal Slo recombinante expresado en ovocitos de *Xenopus* tiene un umbral de activación de [Ca²⁺]_i ≈ 3 μM (Adelman et al., 1992). La solución interna de la pipeta que se empleó en este trabajo tiene las

siguientes concentraciones nominales de Ca^{2+} , Mg^{2+} , y EGTA: 0.1 mM, 2 mM y 1.1 mM, lo que implica una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre de aproximadamente 20 nM (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcS.htm>). Dado que las NMBs disociadas no presentan canales de Ca^{2+} funcionales, es posible suponer que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre permanece constante durante las sesiones de registro y, por tanto, los canales Slo no se activarían. Finalmente, los canales Slo recombinantes presentan una inactivación menor al 10% durante una depolarización de 5 s a +80 mV, por lo que es poco probable que una corriente Slo contribuya a la corriente de inactivación lenta de las NMBs.

Especulación sobre el papel de las neuronas de los Cuerpos Fungiformes durante el aprendizaje olfativo.

La evidencia presentada en la introducción de esta tesis sugiere que las NMBs son los sitios donde los estímulos sensoriales (olores y choque eléctrico) se asocian de tal manera que el animal aprende que la presencia de uno de los estímulos (el olor) anticipa la presentación del otro (el choque eléctrico). Se propone que muchas de las moléculas implicadas en el aprendizaje olfativo por los estudios de genética molecular median los cambios fisiológicos dentro de las NMBs que subyacen la formación de esta memoria olfativa (Dubnau y Tully, 2001; Roman y Davis, 2001). Sin embargo no existen suficientes datos sobre la plasticidad de las propiedades fisiológicas de las NMBs para proponer un modelo que describa la cascada de eventos que desencadenan la adquisición de un nuevo aprendizaje.

Se estima que uno de los eventos iniciales debe ser la activación de la adenilato ciclasa codificada por el gene *rut*. Dado que esta enzima se activa tanto por proteínas G como por Ca^{2+} /Calmodulina.(Levin et al., 1992), podría funcionar dentro de las NMBs como un detector de coincidencia de la información olfativa y de la información del

reforzador. Se desconoce sin embargo la vía que lleva la información del estímulo no condicionado hasta los MBs y el tipo de neurotransmisor que utiliza.

La activación de la enzima Rut aumentaría los niveles de cAMP y mediante acción directa del segundo mensajero o a través de la activación de la proteína cinasa A (PKA) podría modificar la excitabilidad de las NMBs o la movilización de vesículas sinápticas, como ocurre en la sinapsis neuromuscular (Kuromi y Kidokoro, 2000). Se ha reportado que los somas de las NMBs expresan canales de K^+ que se inhiben en la presencia de análogos permeables de cAMP (Wright y Zhong, 1995; Delgado et al., 1998). En principio, la disminución de las corrientes de K^+ induciría un incremento en la excitabilidad neuronal y probablemente un ensanchamiento en el PA que induciría una potenciación en la liberación de neurotransmisor al alcanzar el terminal sináptico.

Es sumamente interesante el hecho que la interrupción de la transmisión sináptica desde los MBs bloquea la manifestación o llamado de la memoria (*memory retrieval*), pero no la adquisición del aprendizaje (Dubnau et al., 2001). Esto implica que para la formación y almacenamiento de la memoria no se requiere que la información “salga” de los MBs y apoya un modelo en el que las dendritas de las NMBs son los sitios donde ocurren las modificaciones fisiológicas que sustentan la plasticidad neuronal asociada al aprendizaje olfativo. Recientemente se describió en mamífero que los mismos mecanismos que desencadenan la LTP en el hipocampo inducen un incremento en la excitabilidad de las dendritas de las neuronas hipocámpales. Estos cambios favorecen la propagación reversa de los potenciales de acción a la región dendrítica con un consecuente aumento en el influjo de Ca^{2+} . El aumento en la excitabilidad parece deberse a la inactivación de una corriente tipo A similar a la conducida por canales Shal o Shaker (Frick et al., 2004). Estos resultados sugieren que la inducción de plasticidad sináptica de larga duración en rebanadas de hipocampo se acompaña de una vía paralela de memoria, almacenada en el estado funcional de los

canales Kv inactivantes dendríticos. En principio, cambios en la excitabilidad de la membrana podrían modificar la dinámica de los circuitos neuronales en una manera equivalente a como la modificarían cambios en la eficiencia sináptica entre las neuronas que forman el circuito (Destexhe y Marder, 2004). Es posible entonces que mecanismos de codificación similares ocurran en las dendritas o somas de las NMBs durante la adquisición y establecimiento de la memoria olfativa.

Modulación de los canales de K⁺ dependientes de voltaje por el contenido de esteroides en la membrana plasmática.

No es sorprendente que los canales iónicos, proteínas diseñadas para contender con la impermeabilidad de la MP, sean dependientes funcionalmente de los lípidos constituyentes de la membrana misma. Sin embargo, aún no es claro si la modulación dependiente de esteroides de los canales de K⁺ ocurre por interacciones directas proteína-lípido, o indirectamente a través de un mecanismo de señalización. En *Drosophila*, el ergosterol es el esteroide más abundante (Rietveld et al., 1999), y puede adquirirse directamente de una dieta suplementada con levadura (Smith et al., 1996). En conjunto los esteroides representan 18% mol en relación con los fosfolípidos, que son niveles similares a aquellos encontrados en los vertebrados (Rietveld et al., 1999). Debido a que el ergosterol es aún más efectivo que el colesterol en organizar las cadenas acilo (Urbina et al., 1995), estos niveles deben bastar para inducir la formación de la fase de líquido ordenado. En mezclas binarias de fosfolípidos individuales con esteroides, los dominios lipídicos en la fase de líquido ordenado co-existen con un estado más desordenado de los lípidos que se empaquetan más relajadamente (Brown y London, 2000). Los lípidos en la fase de líquido ordenado se pueden aislar como membranas insolubles a detergentes no iónicos y se les conoce como balsas lipídicas (Brown y London, 2000; Simons y Toomre, 2000). La asociación de los canales a las balsas

podría servir para conjuntar moléculas de señalización con los canales iónicos. Los canales de vertebrado Kv2.1 y Kv1.5 se asocian con diferentes tipos de balsas y se modulan por β -CDs (Martens et al., 2000; Martens et al., 2001).

El tratamiento de las células con β -CDs retira colesterol de la MP. En varias líneas celulares de mamífero se observaron dos pozas cinéticas de colesterol, en términos del eflujo inducido por CDs. Los tiempos medio de liberación de colesterol de la poza rápida (20-50 % del colesterol total) promedian 20 s (Yancey et al., 1996). El eflujo de colesterol de la poza lenta ocurre con un tiempo medio entre 18 y 35 min (Yancey et al., 1996). Las mismas dos pozas se observaron en membranas artificiales (Yancey et al., 1996); por lo tanto, no dependen de estructuras específicas de la MP que requieren proteínas, como las caveolas. Debido a que en nuestros experimentos se desarrolló un efecto estable de la BSA y de la M β CD en menos de 2 min, la modulación de las corrientes de K⁺ reportada en este trabajo depende, más probablemente, de la poza que se intercambia rápidamente.

El requerimiento de colesterol de las células va más allá de la formación de balsas lipídicas. La liberación aguda de colesterol elimina la asociación de *snares* requerida para la exocitosis, bloquea la formación de vesículas endocíticas recubiertas de clatrina, y deslocaliza el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP2) de la MP (Edidin, 2003). El PIP2 es un regulador principal del citoesqueleto de actina (Caroni, 2001), que a su vez juega un papel importante en el funcionamiento de los canales de K⁺. El desensamble de los filamentos endógenos de actina activa los canales Kv en las neuronas bipolares de la retina (Maguire et al., 1998), e incrementa el grado de inactivación conferida por la subunidad β a canales Shaker del tipo rectificador tardío (Jing et al., 1997). Además, el PIP2 es un determinante clave de la inactivación tipo N de los canales Kv, pues interacciona directamente con el dominio de bola de las

subunidades α y β (Oliver et al., 2004). Aún se necesita implementar los experimentos para elucidar el mecanismo a través del cual la liberación de esteroides modula los canales de K^+ en las NMBs de *Drosophila*.

En conjunto, la evidencia indicando que la asociación de los receptores metabotrópicos de glutamato de *Drosophila* con balsas lipídicas modula su afinidad por el ligando (Eroglu et al., 2003) y los resultados presentados en este trabajo, enfatizan el importante papel que los dominios lipídicos ricos en esteroides tienen en la fisiología neuronal de *Drosophila*.

PERSPECTIVAS

Con los datos obtenidos se han establecido los cimientos para plantearse las siguientes interrogantes y experimentos a largo plazo.

1. Establecer líneas mutantes *shal* y *shab* para investigar su contribución a la corriente de K^+ en las NMBs, así como su importancia en el aprendizaje y la memoria olfativa;
2. Confirmar la distribución de canales iónicos propuesta con base en nuestros experimentos electrofisiológicos con el empleo de anticuerpos contra los canales Kv. El desarrollo de anticuerpos permitiría, además, investigar la localización subcelular de los canales. La distribución subcelular de los canales vertería información relativa a su función. Así, los canales somáticos y dendríticos participarían principalmente en el procesamiento de las entradas sinápticas, en tanto los canales axonales en la conducción del PA. Los canales que se expresan exclusivamente en las terminales nerviosas controlarían el influjo de Ca^{2+} inducido por el PA y, por consiguiente, la liberación de neurotransmisor.

3. Es imperante mostrar si la distribución de canales observada en las neuronas disociadas ocurre *in vivo*. Para tal función es necesario establecer una preparación que permita el registro *in situ* de las corrientes iónicas en las NMBs;
4. Es necesario investigar el mecanismo a través del cual los esteroides modulan la actividad de los canales Kv en las NMBs. El PIP2 y el citoesqueleto de actina son dos buenos candidatos para iniciar estas investigaciones. Ambos son accesibles experimentalmente.
5. Investigar de que manera la expresión somática de un tipo de canal inactivante (Shal o Shaker) inhibe la expresión del otro.

REFERENCIAS

- Aceves-Piña EO, Quinn WG (1979) Learning in normal and mutant *Drosophila* larvae. Science 206:93-96.
- Adelman JP, Shen KZ, Kavanaugh MP, Warren RA, Wu YN, Lagrutta A, Bond CT, North RA (1992) Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. Neuron 9:209-216.
- Armstrong JD, de Belle JS, Wang Z, Kaiser K (1998) Metamorphosis of the mushroom bodies; large-scale rearrangements of the neural substrates for associative learning and memory in *Drosophila*. Learn Mem 5:102-114.
- Atkinson NS, Robertson GA, Ganetzky B (1991) A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. Science 253:551-555.
- Baker K, Salkoff L (1990) The *Drosophila* Shaker gene codes for a distinctive K⁺ current in a subset of neurons. Neuron 4:129-140.
- Baro DJ, Ayali A, French L, Scholz NL, Labenia J, Lanning CC, Graubard K, Harris-Warrick RM (2000) Molecular underpinnings of motor pattern generation: differential targeting of shal and shaker in the pyloric motor system. J Neurosci 20:6619-6630.
- Bate M (1993) The mesoderm and its derivatives. In: The Development of *Drosophila melanogaster* (Bate M, Martínez Arias A, eds), pp 1013-1090. Plainview: CHSL Press.

3. Es imperante mostrar si la distribución de canales observada en las neuronas disociadas ocurre *in vivo*. Para tal función es necesario establecer una preparación que permita el registro *in situ* de las corrientes iónicas en las NMBs;
4. Es necesario investigar el mecanismo a través del cual los esteroides modulan la actividad de los canales Kv en las NMBs. El PIP2 y el citoesqueleto de actina son dos buenos candidatos para iniciar estas investigaciones. Ambos son accesibles experimentalmente.
5. Investigar de que manera la expresión somática de un tipo de canal inactivante (Shal o Shaker) inhibe la expresión del otro.

REFERENCIAS

- Aceves-Piña EO, Quinn WG (1979) Learning in normal and mutant *Drosophila* larvae. *Science* 206:93-96.
- Adelman JP, Shen KZ, Kavanaugh MP, Warren RA, Wu YN, Lagrutta A, Bond CT, North RA (1992) Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron* 9:209-216.
- Armstrong JD, de Belle JS, Wang Z, Kaiser K (1998) Metamorphosis of the mushroom bodies; large-scale rearrangements of the neural substrates for associative learning and memory in *Drosophila*. *Learn Mem* 5:102-114.
- Atkinson NS, Robertson GA, Ganetzky B (1991) A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science* 253:551-555.
- Baker K, Salkoff L (1990) The *Drosophila* Shaker gene codes for a distinctive K⁺ current in a subset of neurons. *Neuron* 4:129-140.
- Baro DJ, Ayali A, French L, Scholz NL, Labenia J, Lanning CC, Graubard K, Harris-Warrick RM (2000) Molecular underpinnings of motor pattern generation: differential targeting of shal and shaker in the pyloric motor system. *J Neurosci* 20:6619-6630.
- Bate M (1993) The mesoderm and its derivatives. In: *The Development of Drosophila melanogaster* (Bate M, Martínez Arias A, eds), pp 1013-1090. Plainview: CHSL Press.

- Bauer CK, Schwarz JR (2001) Physiology of EAG K⁺ channels. *J Membr Biol* 182:1-15.
- Beck CD, Schroeder B, Davis RL (2000) Learning performance of normal and mutant *Drosophila* after repeated conditioning trials with discrete stimuli. *J Neurosci* 20:2944-2953.
- Becker MN, Brenner R, Atkinson NS (1995) Tissue-specific expression of a *Drosophila* calcium-activated potassium channel. *J Neurosci* 15:6250-6259.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bolotina V, Omelyanenko V, Heyes B, Ryan U, Bregestovski P (1989) Variations of membrane cholesterol alter the kinetics of Ca²⁺(+)-dependent K⁺ channels and membrane fluidity in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 415:262-268.
- Brown DA, London E (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275:17221-17224.
- Burger K, Gimpl G, Fahrenholz F (2000) Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell Mol Life Sci* 57:1577-1592.
- Butler A, Wei AG, Baker K, Salkoff L (1989) A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. *Science* 243:943-947.
- Butler DM, Ono JK, Chang T, McCaman RE, Barish ME (1998) Mouse brain potassium channel beta1 subunit mRNA: cloning and distribution during development. *J Neurobiol* 34:135-150.
- Byrne JH, Kandel ER (1996) Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci* 16:425-435.
- Caroni P (2001) New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *Embo J* 20:4332-4336.
- Chang HM, Reitstetter R, Mason RP, Gruener R (1995) Attenuation of channel kinetics and conductance by cholesterol: an interpretation using structural stress as a unifying concept. *J Membr Biol* 143:51-63.
- Chouinard SW, Wilson GF, Schlimgen AK, Ganetzky B (1995) A potassium channel beta subunit related to the aldo-keto reductase superfamily is encoded by the *Drosophila* hyperkinetic locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6763-6767.
- Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res* 38:2264-2272.

- Connolly JB, Roberts IJ, Armstrong JD, Kaiser K, Forte M, Tully T, O'Kane CJ (1996) Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in *Drosophila* mushroom bodies. *Science* 274:2104-2107.
- Connor JA, Stevens CF (1971) Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J Physiol* 213:31-53.
- Covarrubias M, Wei AA, Salkoff L (1991) Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K⁺ current systems. *Neuron* 7:763-773.
- Cowan TM, Siegel RW (1986) *Drosophila* mutations that alter ionic conduction disrupt acquisition and retention of a conditioned odor avoidance response. *J Neurogenet* 3:187-201.
- Crittenden JR, Skoulakis EM, Han KA, Kalderon D, Davis RL (1998) Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learn Mem* 5:38-51.
- Davis RL (1996) Physiology and biochemistry of *Drosophila* learning mutants. *Physiol Rev* 76:299-317.
- de Belle JS, Heisenberg M (1994) Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263:692-695.
- Delgado R, Latorre R, Labarca P (1994) Shaker mutants lack post-tetanic potentiation at motor end-plates. *Eur J Neurosci* 6:1160-1166.
- Delgado R, Davis R, Bono MR, Latorre R, Labarca P (1998) Outward currents in *Drosophila* larval neurons: dunce lacks a maintained outward current component downregulated by cAMP. *J Neurosci* 18:1399-1407.
- Destexhe A, Marder E (2004) Plasticity in single neuron and circuit computations. *Nature* 431:789-795.
- Diochot S, Drici MD, Moinier D, Fink M, Lazdunski M (1999) Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of Ito1 in cardiac electrogenesis. *Br J Pharmacol* 126:251-263.
- Drain P, Dubin AE, Aldrich RW (1994) Regulation of Shaker K⁺ channel inactivation gating by the cAMP-dependent protein kinase. *Neuron* 12:1097-1109.
- Dubnau J, Tully T (2001) Functional anatomy: from molecule to memory. *Curr Biol* 11:R240-243.
- Dubnau J, Grady L, Kitamoto T, Tully T (2001) Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* 411:476-480.

- Ebbinghaus H (1885) Retention as a function of repeated learning. In: *Memory*, pp 81-89. New York: Dover.
- Edidin M (2003) The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32:257-283.
- Eroglu C, Brugger B, Wieland F, Sinning I (2003) Glutamate-binding affinity of *Drosophila* metabotropic glutamate receptor is modulated by association with lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10219-10224.
- Espinosa F, Lopez-Gonzalez I, Serrano CJ, Gasque G, de la Vega-Beltran JL, Trevino CL, Darszon A (1999) Anion channel blockers differentially affect T-type Ca(2+) currents of mouse spermatogenic cells, alpha1E currents expressed in *Xenopus* oocytes and the sperm acrosome reaction. *Dev Genet* 25:103-114.
- Frick A, Magee J, Johnston D (2004) LTP is accompanied by an enhanced local excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nat Neurosci* 7:126-135.
- Ganetzky B, Robertson GA, Wilson GF, Trudeau MC, Titus SA (1999) The eag family of K+ channels in *Drosophila* and mammals. *Ann N Y Acad Sci* 868:356-369.
- Giese KP, Storm JF, Reuter D, Fedorov NB, Shao LR, Leicher T, Pongs O, Silva AJ (1998) Reduced K+ channel inactivation, spike broadening, and after-hyperpolarization in *Kvbeta1.1*-deficient mice with impaired learning. *Learn Mem* 5:257-273.
- Hammer M (1997) The neural basis of associative reward learning in honeybees. *Trends Neurosci* 20:245-252.
- Hardie RC (1991) Voltage-sensitive potassium channels in *Drosophila* photoreceptors. *J Neurosci* 11:3079-3095.
- Harris-Warrick RM, Marder E (1991) Modulation of neural networks for behavior. *Annu Rev Neurosci* 14:39-57.
- Heisenberg M, Borst A, Wagner S, Byers D (1985) *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet* 2:1-30.
- Hille B (1992) *Ion channels of excitable membranes*, 2nd Edition. Sunderland, MA: Sinauer.
- Hodge JJ, Choi JC, O'Kane C J, Griffith LC (2005) Shaw potassium channel genes in *Drosophila*. *J Neurobiol*.
- Horn R (1987) Statistical methods for model discrimination. Applications to gating kinetics and permeation of the acetylcholine receptor channel. *Biophys J* 51:255-263.

- Ikonen E (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 13:470-477.
- Ito K, Suzuki K, Estes P, Ramaswami M, Yamamoto D, Strausfeld NJ (1998) The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem* 5:52-77.
- Iverson LE, Rudy B (1990) The role of the divergent amino and carboxyl domains on the inactivation properties of potassium channels derived from the Shaker gene of *Drosophila*. *J Neurosci* 10:2903-2916.
- Iverson LE, Tanouye MA, Lester HA, Davidson N, Rudy B (1988) A-type potassium channels expressed from Shaker locus cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5723-5727.
- Jan LY, Jan YN (1976) Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *J Physiol* 262:189-214.
- Jan YN, Jan LY, Dennis MJ (1977) Two mutations of synaptic transmission in *Drosophila*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 198:87-108.
- Jennings LJ, Xu QW, Firth TA, Nelson MT, Mawe GM (1999) Cholesterol inhibits spontaneous action potentials and calcium currents in guinea pig gallbladder smooth muscle. *Am J Physiol* 277:G1017-1026.
- Jing J, Peretz T, Singer-Lahat D, Chikvashvili D, Thornhill WB, Lotan I (1997) Inactivation of a voltage-dependent K⁺ channel by beta subunit. Modulation by a phosphorylation-dependent interaction between the distal C terminus of alpha subunit and cytoskeleton. *J Biol Chem* 272:14021-14024.
- Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoudt GW, Bangerter FW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH (1995) Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* 270:17250-17256.
- Klamt C, Hummel T, Granderath S, Schimmelpfeng K (2001) Glial cell development in *Drosophila*. *Int J Dev Neurosci* 19:373-378.
- Kogan JH, Frankland PW, Blendy JA, Coblenz J, Marowitz Z, Schutz G, Silva AJ (1997) Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr Biol* 7:1-11.
- Kuromi H, Kidokoro Y (2000) Tetanic stimulation recruits vesicles from reserve pool via a cAMP-mediated process in *Drosophila* synapses. *Neuron* 27:133-143.

- Lee T, Lee A, Luo L (1999) Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* 126:4065-4076.
- Levin LR, Han PL, Hwang PM, Feinstein PG, Davis RL, Reed RR (1992) The *Drosophila* learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca²⁺/Calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell* 68:479-489.
- Levitan I, Christian AE, Tulenko TN, Rothblat GH (2000) Membrane cholesterol content modulates activation of volume-regulated anion current in bovine endothelial cells. *J Gen Physiol* 115:405-416.
- Lichtinghagen R, Stocker M, Wittka R, Boheim G, Stuhmer W, Ferrus A, Pongs O (1990) Molecular basis of altered excitability in Shaker mutants of *Drosophila melanogaster*. *Embo J* 9:4399-4407.
- Littleton JT, Ganetzky B (2000) Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* 26:35-43.
- Liu L, Wolf R, Ernst R, Heisenberg M (1999) Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. *Nature* 400:753-756.
- Ludwig J, Terlau H, Wunder F, Bruggemann A, Pardo LA, Marquardt A, Stuhmer W, Pongs O (1994) Functional expression of a rat homologue of the voltage gated ether a go-go potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the *Drosophila* channel and its mammalian counterpart. *Embo J* 13:4451-4458.
- Lundbaek JA, Birn P, Girshman J, Hansen AJ, Andersen OS (1996) Membrane stiffness and channel function. *Biochemistry* 35:3825-3830.
- Maguire G, Connaughton V, Prat AG, Jackson GR, Jr., Cantiello HF (1998) Actin cytoskeleton regulates ion channel activity in retinal neurons. *Neuroreport* 9:665-670.
- Martens JR, Sakamoto N, Sullivan SA, Grobaski TD, Tamkun MM (2001) Isoform-specific localization of voltage-gated K⁺ channels to distinct lipid raft populations. Targeting of Kv1.5 to caveolae. *J Biol Chem* 276:8409-8414.
- Martens JR, Navarro-Polanco R, Coppock EA, Nishiyama A, Parshley L, Grobaski TD, Tamkun MM (2000) Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts. *J Biol Chem* 275:7443-7446.
- Martin JR, Ernst R, Heisenberg M (1998) Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem* 5:179-191.

- Martinez-Padron M, Ferrus A (1997) Presynaptic recordings from *Drosophila*: correlation of macroscopic and single-channel K⁺ currents. *J Neurosci* 17:3412-3424.
- McBride SM, Giuliani G, Choi C, Krause P, Correale D, Watson K, Baker G, Siwicki KK (1999) Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 24:967-977.
- McGuire SE, Le PT, Davis RL (2001) The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* 293:1330-1333.
- Nighorn A, Healy MJ, Davis RL (1991) The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila dunce* gene is concentrated in the mushroom body neuropil. *Neuron* 6:455-467.
- Niven JE, Vahasoyrinki M, Kauranen M, Hardie RC, Juusola M, Weckstrom M (2003) The contribution of Shaker K⁺ channels to the information capacity of *Drosophila* photoreceptors. *Nature* 421:630-634.
- O'Dell KM, Armstrong JD, Yang MY, Kaiser K (1995) Functional dissection of the *Drosophila* mushroom bodies by selective feminization of genetically defined subcompartments. *Neuron* 15:55-61.
- O'Dowd DK (1995) Voltage-gated currents and firing properties of embryonic *Drosophila* neurons grown in a chemically defined medium. *J Neurobiol* 27:113-126.
- Ohtani Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K, Pitha J (1989) Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem* 186:17-22.
- Oliver D, Lien CC, Soom M, Baukrowitz T, Jonas P, Fakler B (2004) Functional conversion between A-type and delayed rectifier K⁺ channels by membrane lipids. *Science* 304:265-270.
- Pascual A, Preat T (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294:1115-1117.
- Pelz C, Jander J, Rosenboom H, Hammer M, Menzel R (1999) IA in Kenyon cells of the mushroom body of honeybees resembles shaker currents: kinetics, modulation by K⁺, and simulation. *J Neurophysiol* 81:1749-1759.
- Pirrotta V (1988) Vectors for P-mediated transformation in *Drosophila*. *Biotechnology* 10:437-456.

- Pongs O, Kecskemethy N, Muller R, Krah-Jentgens I, Baumann A, Kiltz HH, Canal I, Llamazares S, Ferrus A (1988) Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *Embo J* 7:1087-1096.
- Pongs O, Leicher T, Berger M, Roeper J, Bähring R, Wray D, Giese KP, Silva AJ, Storm JF (1999) Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel beta subunits. *Ann N Y Acad Sci* 868:344-355.
- Quinn WG, Harris WA, Benzer S (1974) Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:708-712.
- Quinn WG, Sziber PP, Booker R (1979) The *Drosophila* memory mutant amnesiac. *Nature* 277:212-214.
- Rhodes KJ, Monaghan MM, Barrezueta NX, Nawoschik S, Bekele-Arcuri Z, Matos MF, Nakahira K, Schechter LE, Trimmer JS (1996) Voltage-gated K⁺ channel beta subunits: expression and distribution of Kv beta 1 and Kv beta 2 in adult rat brain. *J Neurosci* 16:4846-4860.
- Rietveld A, Neutz S, Simons K, Eaton S (1999) Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J Biol Chem* 274:12049-12054.
- Robertson GA, Warmke JM, Ganetzky B (1996) Potassium currents expressed from *Drosophila* and mouse eag cDNAs in *Xenopus* oocytes. *Neuropharmacology* 35:841-850.
- Robinow S, White K (1988) The locus elav of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Dev Biol* 126:294-303.
- Rogero O, Hammerle B, Tejedor FJ (1997) Diverse expression and distribution of Shaker potassium channels during the development of the *Drosophila* nervous system. *J Neurosci* 17:5108-5118.
- Roman G, Davis RL (2001) Molecular biology and anatomy of *Drosophila* olfactory associative learning. *Bioessays* 23:571-581.
- Romanenko VG, Rothblat GH, Levitan I (2002) Modulation of endothelial inward-rectifier K⁺ current by optical isomers of cholesterol. *Biophys J* 83:3211-3222.
- Rosay P, Armstrong JD, Wang Z, Kaiser K (2001) Synchronized neural activity in the *Drosophila* memory centers and its modulation by amnesiac. *Neuron* 30:759-770.
- Rubin GM, Spradling AC (1983) Vectors for P element-mediated gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 11:6341-6351.

- Saini HK, Arneja AS, Dhalla NS (2004) Role of cholesterol in cardiovascular dysfunction. *Can J Cardiol* 20:333-346.
- Saito M, Zhao ML, Wu CF (1993) Irregular activity in the giant neurons from Shaker mutants suggests that the Shaker locus may encode non-A-type K⁺ channel subunits in *Drosophila*. *Ann N Y Acad Sci* 707:392-395.
- Schreurs BG, Gusev PA, Tomsic D, Alkon DL, Shi T (1998) Intracellular correlates of acquisition and long-term memory of classical conditioning in Purkinje cell dendrites in slices of rabbit cerebellar lobule HVI. *J Neurosci* 18:5498-5507.
- Schwarz TL, Papazian DM, Carretto RC, Jan YN, Jan LY (1990) Immunological characterization of K⁺ channel components from the Shaker locus and differential distribution of splicing variants in *Drosophila*. *Neuron* 4:119-127.
- Simons K, Ikonen E (2000) How cells handle cholesterol. *Science* 290:1721-1726.
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-39.
- Smani T, Zakharov SI, Csutora P, Leno E, Trepakova ES, Bolotina VM (2004) A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol* 6:113-120.
- Smith SJ, Crowley JH, Parks LW (1996) Transcriptional regulation by ergosterol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16:5427-5432.
- Solc CK, Aldrich RW (1988) Voltage-gated potassium channels in larval CNS neurons of *Drosophila*. *J Neurosci* 8:2556-2570.
- Solc CK, Zagotta WN, Aldrich RW (1987) Single-channel and genetic analyses reveal two distinct A-type potassium channels in *Drosophila*. *Science* 236:1094-1098.
- Song WJ, Tkatch T, Baranauskas G, Ichinohe N, Kitai ST, Surmeier DJ (1998) Somatodendritic depolarization-activated potassium currents in rat neostriatal cholinergic interneurons are predominantly of the A type and attributable to coexpression of Kv4.2 and Kv4.1 subunits. *J Neurosci* 18:3124-3137.
- Stewart BA, Atwood HL, Renger JJ, Wang J, Wu CF (1994) Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions. *J Comp Physiol [A]* 175:179-191.
- Stocker M, Stuhmer W, Wittka R, Wang X, Muller R, Ferrus A, Pongs O (1990) Alternative Shaker transcripts express either rapidly inactivating or noninactivating K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8903-8907.

- Stocker RF (1994) The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res* 275:3-26.
- Stockinger P, Kvitsiani D, Rotkopf S, Tirian L, Dickson BJ (2005) Neural circuitry that governs *Drosophila* male courtship behavior. *Cell* 121:795-807.
- Su H, O'Dowd DK (2003) Fast synaptic currents in *Drosophila* mushroom body Kenyon cells are mediated by alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors and picrotoxin-sensitive GABA receptors. *J Neurosci* 23:9246-9253.
- Tanouye MA, Ferrus A (1985) Action potentials in normal and Shaker mutant *Drosophila*. *J Neurogenet* 2:253-271.
- Tempel BL, Bonini N, Dawson DR, Quinn WG (1983) Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1482-1486.
- Timpe LC, Schwarz TL, Tempel BL, Papazian DM, Jan YN, Jan LY (1988) Expression of functional potassium channels from Shaker cDNA in *Xenopus* oocytes. *Nature* 331:143-145.
- Tseng-Crank J, Pollock JA, Hayashi I, Tanouye MA (1991) Expression of ion channel genes in *Drosophila*. *J Neurogenet* 7:229-239.
- Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM, Jr. (2002) Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci* 25:412-417.
- Tsunoda S, Salkoff L (1995a) The major delayed rectifier in both *Drosophila* neurons and muscle is encoded by Shab. *J Neurosci* 15:5209-5221.
- Tsunoda S, Salkoff L (1995b) Genetic analysis of *Drosophila* neurons: Shal, Shaw, and Shab encode most embryonic potassium currents. *J Neurosci* 15:1741-1754.
- Tully T, Cambiazo V, Kruse L (1994a) Memory through metamorphosis in normal and mutant *Drosophila*. *J Neurosci* 14:68-74.
- Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M (1994b) Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79:35-47.
- Urbina JA, Pekerar S, Le HB, Patterson J, Montez B, Oldfield E (1995) Molecular order and dynamics of phosphatidylcholine bilayer membranes in the presence of cholesterol, ergosterol and lanosterol: a comparative study using ²H-, ¹³C- and ³¹P-NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1238:163-176.
- Visconti PE, Ning X, Fornes MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS (1999) Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 214:429-443.

- Waddell S, Armstrong JD, Kitamoto T, Kaiser K, Quinn WG (2000) The amnesiac gene product is expressed in two neurons in the *Drosophila* brain that are critical for memory. *Cell* 103:805-813.
- Wang Y, Wright NJ, Guo H, Xie Z, Svoboda K, Malinow R, Smith DP, Zhong Y (2001) Genetic manipulation of the odor-evoked distributed neural activity in the *Drosophila* mushroom body. *Neuron* 29:267-276.
- Wei A, Covarrubias M, Butler A, Baker K, Pak M, Salkoff L (1990) K⁺ current diversity is produced by an extended gene family conserved in *Drosophila* and mouse. *Science* 248:599-603.
- Wolf R, Wittig T, Liu L, Wustmann G, Eydin D, Heisenberg M (1998) *Drosophila* mushroom bodies are dispensable for visual, tactile, and motor learning. *Learn Mem* 5:166-178.
- Wright NJ, Zhong Y (1995) Characterization of K⁺ currents and the cAMP-dependent modulation in cultured *Drosophila* mushroom body neurons identified by lacZ expression. *J Neurosci* 15:1025-1034.
- Wu CF, Haugland FN (1985) Voltage clamp analysis of membrane currents in larval muscle fibers of *Drosophila*: alteration of potassium currents in Shaker mutants. *J Neurosci* 5:2626-2640.
- Wu CF, Suzuki N, Poo MM (1983) Dissociated neurons from normal and mutant *Drosophila* larval central nervous system in cell culture. *J Neurosci* 3:1888-1899.
- Yancey PG, Rodriguez WV, Kilsdonk EP, Stoudt GW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH (1996) Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J Biol Chem* 271:16026-16034.
- Zagotta WN, Brainard MS, Aldrich RW (1988) Single-channel analysis of four distinct classes of potassium channels in *Drosophila* muscle. *J Neurosci* 8:4765-4779.
- Zars T, Fischer M, Schulz R, Heisenberg M (2000) Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* 288:672-675.
- Zhang W, Linden DJ (2003) The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nat Rev Neurosci* 4:885-900.
- Zhao ML, Wu CF (1997) Alterations in frequency coding and activity dependence of excitability in cultured neurons of *Drosophila* memory mutants. *J Neurosci* 17:2187-2199.

APÉNDICE 1

Shal and Shaker Differential Contribution to the K⁺ Currents in the *Drosophila* Mushroom Body Neurons

Gabriel Gasque,¹ Pedro Labarca,² Enrique Reynaud,¹ and Alberto Darszon¹

¹Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México, and ²Centro de Estudios Científicos, Casilla 1469, Valdivia, Chile

Shaker, a voltage-dependent K⁺ channel, is enriched in the mushroom bodies (MBs), the locus of olfactory learning in *Drosophila*. Mutations in the *shaker* locus are known to alter excitability, neurotransmitter release, synaptic plasticity, and olfactory learning. However, a direct link of Shaker channels to MB intrinsic neuron (MBN) physiology has not been documented. We found that transcripts for *shab*, *shaw*, *shaker*, and *shal*, among which only Shaker and Shal have been reported to code for A-type currents, are present in the MBs. The electrophysiological data showed that the absence of functional Shaker channels modifies the distribution of half-inactivation voltages ($V_{1/2}$) in the MBNs, indicating a segregation of Shaker channels to only a subset (~28%) of their somata. In harmony with this notion, we found that approximately one-fifth of MBNs lacking functional Shaker channels displayed dramatically slowed-down outward current inactivation times and reduced peak-current amplitudes. Furthermore, whereas all MBNs were sensitive to 4-aminopyridine, a nonspecific A-type current blocker, a subset of neurons (~24%) displayed little sensitivity to a Shal-specific toxin. This subset of neurons displaying toxin-insensitive outward currents had more depolarized $V_{1/2}$ values attributable to Shaker channels. Our findings provide the first direct evidence that altered Shaker channel function disrupts MBN physiology in *Drosophila*. To our surprise, the experimental data also indicate that Shaker channels segregate to a minor fraction of MB neuronal somata (20–30%), and that Shal channels contribute the somatic A-type current in the majority of MBNs.

Key words: learning; memory; mushroom bodies; Shaker; K⁺ channels; *Drosophila*

Introduction

Olfactory learning in *Drosophila melanogaster* depends on the structural and physiological integrity of the mushroom bodies (MBs) (Roman and Davis, 2001). In the fruit fly brain, MBs are specific structures composed of ~2500 MB intrinsic neurons (MBNs) or Kenyon cells, which receive inputs from olfactory and other sensory organs and send outputs to premotor brain regions (Stocker, 1994; Ito et al., 1998). Therefore, MBs are suited to integrate sensory experiences to bring about new behaviors in coherence with previous experience. Chemical ablation or mutations that alter the MB structure lead to the loss of associative olfactory learning (Heisenberg et al., 1985; de Belle and Heisenberg, 1994). Genes required for associative olfactory learning are preferentially expressed in the MBs (Roman and Davis, 2001). Although important information has been obtained from behavioral and molecular studies of olfactory learning in *Drosophila*,

the physiological basis of this process in the fly brain is essentially unknown. The available information on the physiological properties of MBNs has been derived essentially from studies on either acutely dissociated neurons or in primary culture (Wright and Zhong, 1995; Delgado et al., 1998).

Early evidence that ion channels are relevant to associative olfactory learning in the fruit fly was provided by Cowan and Siegel (1986), who found that this process is deficient in a *shaker* mutant. The *shaker* gene codes for voltage-dependent K⁺-selective channels (VDKCs) that, through alternative splicing, give rise to either rapidly inactivating A-type currents or noninactivating currents, both of which are blocked by 4-aminopyridine (4-AP) (Iverson et al., 1988; Timpe et al., 1988; Iverson and Rudy, 1990; Stocker et al., 1990). Immunohistochemistry studies revealed that Shaker channels are preferentially expressed in the MB neuropil (Schwarz et al., 1990; Rogero et al., 1997), suggesting that they play an important role in MB physiology. Shaker channels are important to membrane repolarization, and the lack of Shaker function alters excitability, neurotransmitter release, and synaptic plasticity (Jan et al., 1977; Tanouye et al., 1981; Delgado et al., 1994).

Although the available information favors a role for Shaker in MB function, we lack direct evidence documenting a physiological correlate to the *shaker* defect in MBNs of *Drosophila*. Here, we took advantage of an enhancer-detector fly line expressing green fluorescent protein (GFP) in the *Drosophila* MBs and combined the reverse transcriptase (RT)-PCR, patch-clamp recordings, and

Received June 18, 2004; revised Dec. 27, 2004; accepted Jan. 20, 2005.

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico to A.D. and E.R. and Howard Hughes Medical Institute to P.L. G.G. is a CONACYT and Dirección General de Estudios de Posgrado doctoral fellow. We thank X. Alvarado, A. Saralegui, R. Hernández, and E. López for technical support; L. Salkoff for kindly providing plasmids containing *dshal* clone; F. Tejedor for fly lines used initially; R. Felix and C. Wood for comments on this manuscript; and O. Pantoja for facilities to record recombinant *dshal*.

Correspondence should be addressed to A. Darszon, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, México. E-mail: darszon@ibt.unam.mx.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4384-04.2005

Copyright © 2005 Society for Neuroscience 0270-6474/05/252348-11\$15.00/0

genetic and pharmacological inquiries to determine the identity of the VDKCs operating in MBs and to assess the contribution of Shaker channels to the A-type conductance. The results obtained reveal the following: (1) MBs express four genes coding for VDKCs, among which only *shaker* and *shal* code for A-type currents; (2) Shal channels are the main contributors to the somatic A-type current in the MBs; (3) Shaker channels conduct the A-type current in ~25% of dissociated MBNs; and (4) the absence of functional Shaker channels significantly modifies the whole-cell K^+ current profile of the *shaker*-expressing MBNs.

Materials and Methods

Fly stocks. The 7A2-Gal4 transgenic strain was generated using standard *Drosophila* gene transfer procedures (Rubin and Spradling, 1983; Pirrotta, 1988). The 7A2 construct was generated by cloning a 10 kb fragment that includes the transcription initiation site of the *fruitless* (*fru*) gene into the pPTGAL vector (Sharma et al., 2002). This fragment is flanked by *Sall* sites and was cloned into the *Bam*HI site of pPTGAL rendered compatible after a 2 bp fill-in reaction (for a detailed map of the construct, see supplemental material, available at www.jneurosci.org). The pattern of expression was observed after crossing the resulting transgenic fly lines with upstream activating sequence (UAS)-GFP transgenic fly lines, and 7A2 was selected for its capacity to drive enriched expression of Gal4 into the MBs at several developmental stages (Fig. 1A, B). The 7A2 expression had no correlation with the endogenous expression of *fru*. For additional experiments, wandering male third-instar larvae were obtained from the mating of males from the homozygous line 7A2-Gal4 and females homozygous for a UAS-GFP transgene in the second chromosome ($w^{1118}; p[w+mC] = UAS-EGFP[5a.2]$; Bloomington Stock Center, Bloomington, IN). Additional information about the lines used in this study is provided in the supplemental material (available at www.jneurosci.org). For a *shaker*-mutant genotype, the GFP insertion on the second chromosome was transferred to a sh^{KS133} background, and female $sh^{KS133}; UAS-GFP$ were used for mating. sh^{KS133} is an antimorphic allele in which the substitution of a valine for an aspartate residue in the selectivity filter yields a nonconducting protein (Lichtinghagen et al., 1990) (see Fig. 3A).

RT-PCR analysis. Fifteen to 18 larval brains were dissected in PBS, and ventral ganglia and imaginal discs were removed. Neuronal tissue was dispersed according to the study by Wu et al. (1983). Cerebral lobes were incubated for 25 min in 1 ml of PBS containing trypsin (0.0125%, type III; Sigma, St. Louis, MO) at 37°C. After two washes in Schneider's *Drosophila* medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 20% of heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen) and 50 μ g/ml gentamicin (Invitrogen), the tissue was resuspended in 180 μ l of a modified *Drosophila* defined medium (DDM) (O'Dowd, 1995). Trypsinized tissue was passed 50 times through the tip of a beveled pipette. After achieving cell dissociation, the suspension was placed on a multiwell slide and inspected for clusters of GFP+ cells (see Fig. 2A). Four to five clusters were taken up into a broken-tipped patch pipette (see Fig. 2B), released into an Eppendorf (Eppendorf Scientific, Westbury, NY) tube, and processed for cDNA synthesis using the Cell-to-cDNA kit (Ambion, Austin, TX), according to the instructions of the manufacturer. A total of 2 μ l of the cDNA solution was used as template for each PCR. Primers 5'-GCCGAGGAGGAGGATA-3' and 5'-CTGGCAAATATGGACAAC-3' were used to amplify a region of 535 bp common to all reported alternative transcripts of the *shaker* gene. Primers 5'-AAGCAGCAATGCC-TCACC-3' and 5'-GAAGACAAGGAAGCCAGTT-3' were designed to amplify a 666 bp fragment of the *shal* transcripts. Primers 5'-GCAGCATTGTCCTTCATC-3' and 5'-TCTCCATCAGCCTC-CCTC-3' were used to amplify a region of 651 bp of the long isoform of *shab* and a region of 560 bp of the short isoform. Primers 5'-GAC-TATTGGCGTGGTTTCGG-3' and 5'-GAAGTCGTGTGCGGATTGG-3' were used to amplify the *shaw* transcripts (562 bp). A total of 2 μ l of each PCR was reamplified, lowering the temperature of annealing 5°C. PCR products were purified and sequenced to verify their molecular identity. Negative controls were treated equally, but reverse transcriptase

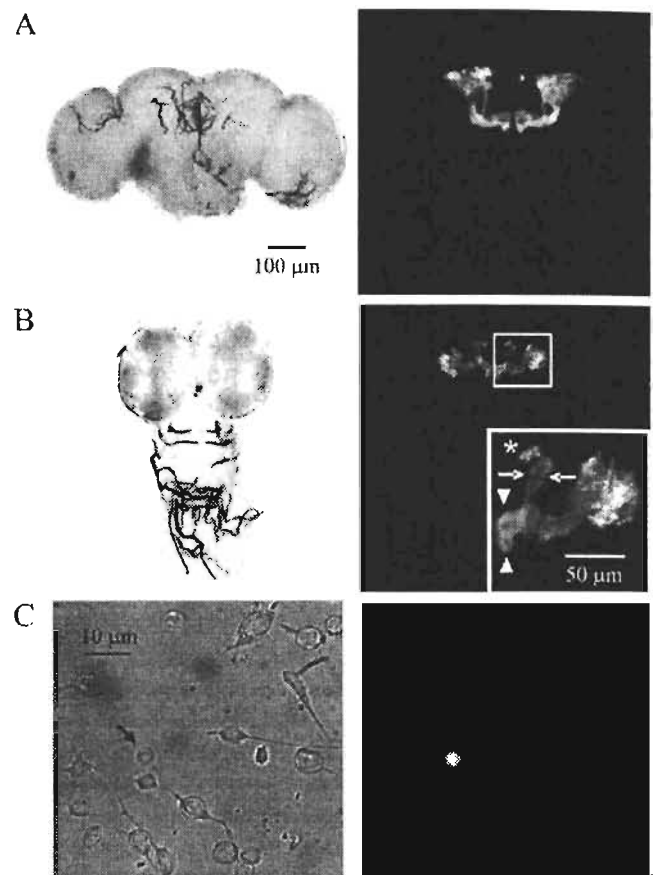


Figure 1. GFP+ neurons in the 7A2-Gal4/UAS-GFP line identify MBNs *in vivo* and *in vitro*. **A**, Adult brains were dissected in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde, and slightly flattened by a glass coverslip. A bright-field image of a whole mount is shown at the left, whereas a maximal intensity confocal projection of the same preparation is shown at the right. The brain is oriented with the anterior face up and dorsal at the top. **B**, Larval brains were treated in the same manner as the adult brains and mounted with the ventral ganglion down. A bright-field image is at the left, whereas the confocal projection is at the right. Scaling is the same as in **A**. The inset shows a higher magnification of the larval brain. Two dorsally projecting lobes (arrows) and two medially projecting lobes (arrowheads) were stained. Neurons in the *par intercerebralis* are also marked (asterisk). **C**, In acutely dissociated larval brains, MBNs are identified as small GFP+ neurons (arrow). The image at the left is a bright-field view of a 7A2-Gal4/UAS-GFP dissociated brain within 12 h after plating. The image at the right shows the same field under epifluorescence illumination and viewed via FITC filters.

was omitted in the RT reaction. Under these conditions, no PCR products were observed.

Expression of recombinant Drosophila Shal channels. Stage VI *Xenopus* oocytes were prepared as described previously (Espinosa et al., 1999). *Shal* mRNA was synthesized *in vitro* from a clone of *dshal2* (a gift from L. Salkoff, University of Washington, St. Louis, MO) and injected (50 nl) into the oocytes at a concentration of ~1 ng/ml. Oocytes were incubated at 18°C for 6 d in ND-96 (in mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 sodium piruvate, 5 HEPES, pH 7.6) saline solution containing 50 μ g/ml gentamicin before electrophysiological examination. Currents were recorded in ND-96 at ~20°C with a two-electrode voltage-clamp amplifier (GeneClamp 500B; Axon Instruments, Union City, CA). The electrodes had a resistance of 0.4–0.9 M Ω when filled with 3 M KCl. Leak currents were subtracted using a P/4 protocol, and the data were filtered at 1 kHz and acquired at 5 kHz.

Larval muscle recordings. The ventral lateral longitudinal fiber 6 of segments A2 and A3 of wandering third instar larvae was used for all experiments (Bate, 1993). The larval preparation was identical to that described previously (Jan and Jan, 1976). Larvae were dissected and kept in hemolymph-like 3 saline solution (Stewart et al., 1994) until electro-

physiological examination. This solution was developed to increase the morphological and physiological stability of *Drosophila* muscles at room temperature. K^+ currents of the larval muscles were recorded using the two-electrode voltage-clamp methodology from a holding potential of -65 mV. To eliminate the inward Ca^{2+} currents as well as the Ca^{2+} -dependent outward currents, a Ca^{2+} -free saline solution bathed the muscles during the experiments. This solution contained the following (in mM): 130 NaCl, 5 KCl, 18 $MgCl_2$, 36 sucrose, 0.5 EGTA, 5 HEPES, pH 7.2. High Mg^{2+} concentration was used to circumvent the problems of muscle surface potential change and membrane leakage increase caused by a Ca^{2+} -free solution (Wu and Haugland, 1985). Currents were filtered at 2 kHz and digitized at 10 kHz. Either a Warner OC-725 (Warner Instruments, Hamden, CT) or a Dagan CA-1 (Dagan, Minneapolis, MN) voltage-clamp amplifier was used. The linear components of the elicited currents were on-line subtracted using a P/4 protocol. Electrodes were filled with 3 M KCl. Tip resistances of voltage and current electrodes were in the range of 10–20 M Ω and 5–10 M Ω , respectively.

MB neuronal preparation for electrophysiological recordings. Dissociated larval neurons were obtained by treating larval brains exactly as described above (RT-PCR analysis) with the exception that the dissociated cells were plated on two 12 mm coverslips (Bellco Glass, Vineland, NJ) located in a Petri dish and allowed to settle for 1 h before flooding the dish with 2 ml of DDM. Cells were kept at 23–24°C for 2–24 h before electrophysiological examination. MBNs were identified on the coverslips as small-size GFP+ cells (Fig. 1C). A count of at least 10 random fields in five independent cultures yielded an average of $4.6 \pm 0.6\%$ GFP+ MBNs, comparable with previous estimates obtained in independent studies made with different transgenic lines expressing a reporter gene in the MBs (Wright and Zhong, 1995; Delgado et al., 1998; Su and O'Dowd, 2003) and with the fraction of MBNs in the CNS (Ito et al., 1998). Visual examination at 1 μ m resolution of 183 GFP+ cells yielded a modal size of 5 μ m. Cell capacitance averaged 0.42 ± 0.01 pF ($n = 116$). Assuming spherical shape and a specific cell capacitance of 1 μ F/cm², average cell capacitance corresponds to a diameter of 3.6 μ m. Both estimates are in close agreement with the documented size of *Drosophila* MBNs *in vivo* (3.9 μ m) (Wang et al., 2001).

Electrophysiological recordings from neurons. The coverslip containing the cells was placed in a recording chamber mounted on an inverted microscope endowed with epifluorescence, and the chamber was superfused with an external saline solution composed of the following (in mM): 140 NaCl, 3 KCl, 1 $CaCl_2$, 4 $MgCl_2$, 5 HEPES, pH 7.2, with NaOH (osmolarity of 290–292). Experiments were done at room temperature (22–25°C). The patch pipettes were polished and filled with an internal solution composed of the following (in mM): 140 KCl, 2 $MgCl_2$, 0.1 $CaCl_2$, 1.1 EGTA, 10 HEPES, pH 7.2, with KOH (osmolarity of 288–290; resistances of 4–7 M Ω). To block VDCCs, in some experiments, the KCl in the pipette solution was replaced for an equimolar concentration of CsCl and, in such cases, the pH was adjusted to pH 7.2 with CsOH. Junction potentials were cancelled immediately before the establishment of a high-resistant seal, and the pipette capacitance was compensated before achieving the whole-cell configuration. During the recording session, the cells were kept at a holding potential of -70 mV. Cell capacitance was determined integrating the average current elicited by five consecutive 5 mV hyperpolarizing pulses. Series resistance compensation was used at 60–70%. Experiments in which the input resistance was <1.0 G Ω or the series resistance higher than 30 M Ω were discarded. Thus, the clamp error during the recording of the largest currents obtained (~ 780 pA) amounted to <3.3 mV. 4-AP was purchased from Sigma, diluted at the appropriate concentration in the external saline solution, and superfused to the recording chamber. Phrixotoxin-2 (PaTx2; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) was kept frozen for <2 months as 10 X stock aliquots and thawed immediately before use. After dilution in the appropriate recording solution, the toxin was bath applied to the muscle- or oocyte-recording chamber or pressure ejected (~ 10 psi) directly to the soma of the patch-clamped neuron. PaTx2 was delivered from a ~ 5 μ m diameter pipette connected to a Picospritzer II (General Valve Corporation, Fairfield, NJ) positioned ~ 20 μ m from the target neuron. Only visually confirmed toxin ejection was considered.

Data acquisition and analysis. Cells were voltage clamped using an

Axopatch 200 amplifier (Axon Instruments). Except for the capacitive currents that were filtered at 10 kHz and digitized at 100 kHz, signals were low-pass filtered at 5 kHz, and the sampling interval was set to 40 μ s/point. Data points were acquired and further analyzed with pClamp6 software. Input resistance was evaluated before each voltage paradigm using a 30 mV hyperpolarizing voltage step from the holding potential. The calculated input resistance was then used to leak-subtract all records linearly. Unless otherwise stated, the membrane was held at -100 mV for 1 s before any voltage protocol to remove inactivation from inactivating components of the current.

Steady-state inactivation data were obtained with a 1 s prepulse protocol ranging from -100 to -20 mV in 5 or 10 mV increments. The current remaining after the prepulse was elicited by a jump to $+40$ mV. The peak current was plotted as a function of the prepulse potential (V_p) and the resulting points fitted to a single Boltzmann distribution. To avoid changes in the voltage-operating range of VDCCs induced by whole-cell configuration (Baker and Salkoff, 1990; Hardie, 1991), all of the steady-state data reported here were taken within 2 min of establishing the whole-cell recording mode.

In our analysis of inactivation time constants, the decaying phase of the current elicited by an 80 ms depolarizing pulse to $+40$ mV was fitted to a sum of exponential terms plus a base line. The optimal number of coefficients was determined with a confidence of 99.9% according to the theory of nested models (Horn, 1987).

Data are presented as mean \pm SEM, unless otherwise stated. Differences were treated as statistically significant when $p < 0.05$.

Results

RT-PCR analysis of voltage-dependent K^+ channels in the mushroom bodies

A Shaker-like current has been postulated to be the major component of the A-type current in honeybee MBNs in primary culture (Pelz et al., 1999). The presence of A-type currents is apparent in patch-clamp recordings from *Drosophila* MBNs acutely dissociated (Wright and Zhong, 1995) and in primary culture (Delgado et al., 1998). However, the identity of the ion channel(s) contributing to the A-type current of *Drosophila* MBNs has not been determined.

We searched for transcripts coding for VDCCs in the MBs by RT-PCR and found expression of *shaker*, *shal*, *shab*, and *shaw* (Fig. 2C). This result suggests that either *shaker* or *shal* could encode the somatic A-type current in MBNs. To address this issue, we investigated the properties of inactivating outward K^+ currents in these acutely dissociated neurons in control *wt* flies and in a *shaker* mutant using whole-cell recordings.

Properties of A-type currents in mushroom body neurons

A *shaker*-mutant line was obtained by mating homozygous $w^{1118}/y;7A2-Gal4$ males with homozygous $sh^{K51.33};UAS-GFP$ females. Only male offspring (called $sh^{K51.33}$) were used for electrophysiological recordings and compared with control male *wt* neurons ($w^{1118}/y;7A2-Gal4/UAS-GFP$). The $sh^{K51.33}$ allele is an ideal model to investigate the contribution of Shaker to A-type currents, because it codes for a nonfunctional protein that, although expressed, is unable to conduct ions (Lichtinghagen et al., 1990). We checked the phenotype of our lines by recording VDCCs in the larval ventrolateral muscle 6, where Shaker provides all of the A-type current component (Wu and Haugland, 1985). Figure 3A documents that control muscles expressed a prominent A-type current. In contrast, the A-type current was absent in the $sh^{K51.33}$ line. We next recorded outward currents in acutely dissociated MBNs. These cells were identified as small (~ 5 μ m diameter) GFP+ cells (Fig. 1C) (for additional information, see Materials and Methods). A preliminary screening of such cells revealed the presence of robust, inactivating outward currents in all 17 neu-

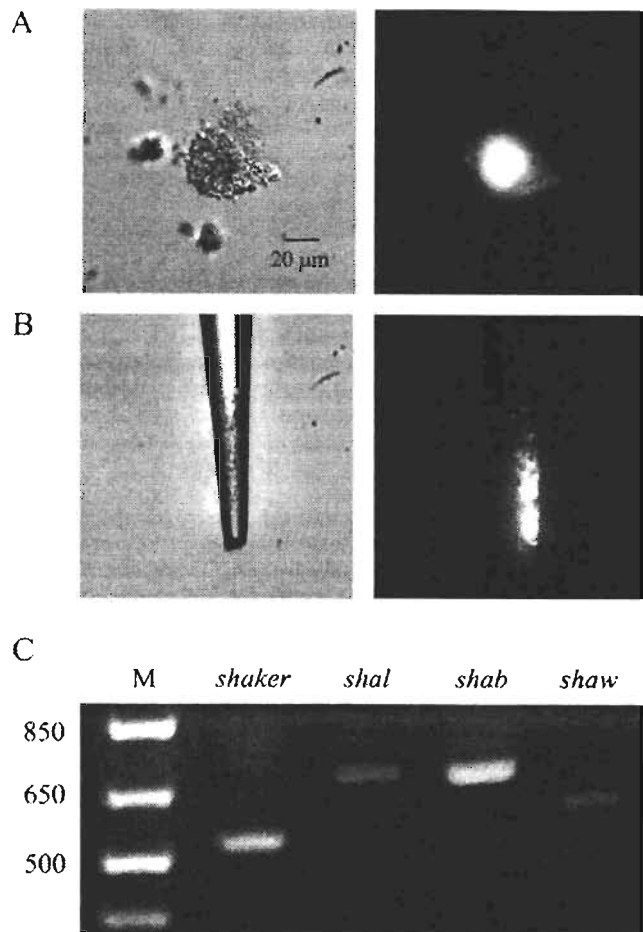


Figure 2. Mushroom bodies express transcripts for *shaker*, *shal*, *shab*, and *shaw* channels. Clusters of GFP⁺ cells derived from the MBs recovered from the dispersal of larval brains were used for cDNA preparation. One of those clusters is shown before (**A**) and after (**B**) it had been taken up into a broken-tipped pipette. The left column depicts bright-field views, whereas the right column shows the same fields under epifluorescence illumination and viewed via FITC filters. **C**, cDNA prepared from four to five clusters of GFP⁺ cells was subjected to a double PCR run, and the expected products were resolved in a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. M, Molecular weight marker in bp. The intensity of the bands in the gel is not quantitative.

rons tested. A representative recording is shown in Figure 3B. Such whole-cell currents were carried by K⁺ ions, because they were absent when Cs⁺ replaced K⁺ in the internal solution (Fig. 3B, inset) and were completely blocked by a mixture of 4-AP (2.5–10 mM) and quinidine (100 μM) (data not shown). The bottom part of Figure 3B illustrates the average currents elicited by depolarizing pulses from –60 to +40 mV in 10 mV increments at the peak (filled circles), at the end of the depolarizing pulse (inverted triangles) and in experiments in which K⁺ was replaced by Cs⁺ in the internal solution (open circles). The relative contribution of the noninactivating component that remained at the end of the depolarizing pulse varied from neuron to neuron, ranging from 0 to 78 pA at +40 mV. It averaged 60 ± 10 pA/pF when normalized by cell capacitance and represented only a minor fraction of the current density (9%). Because we were only interested in investigating the properties of inactivating outward currents, in additional analysis, the contribution of the noninactivating outward current component was subtracted. All of the MBNs tested lacked inward currents. This was confirmed in studies where Cs⁺ replaced internal K⁺, a condition that

should increase the prominence of Na⁺- and Ca²⁺-inward currents (Fig. 3B, inset). Similar results were reported by Wright and Zhong (1995) and Delgado et al. (1998). Therefore, all recordings of K⁺-carried outward currents were performed in the absence of Na⁺- or Ca²⁺-channel blockers.

At +40 mV, *wt* outward currents, normalized by cell capacitance, averaged 624 ± 67 pA/pF (*n* = 33) (Fig. 3C, bottom). Similar to results obtained in a different transgenic line expressing *lacZ* in MBNs (Wright and Zhong, 1995), the range of peak outward current density was broad, extending from 180 to 1917 pA/pF.

When we compared the recordings from *wt* and *sh^{K5133}* MBNs, we were surprised to find that genetic removal of functional Shaker channels did not cause a dramatic modification in the whole-cell current profile or a significant decrease in the current density. The top traces in Figure 3C are representative whole-cell currents obtained from a *sh^{K5133}* neuron; they are visually indistinguishable from the control (Fig. 3B). The bottom graph in Figure 3C shows average peak current density values at +40 mV obtained from 33 *wt* neurons and 33 *sh^{K5133}* neurons. *Shaker* clones encode either a delayed rectifier (Iverson and Rudy, 1990; Stocker et al., 1990) or a rapidly activating and inactivating current (Iverson et al., 1988; Timpe et al., 1988) when expressed in *Xenopus* oocytes. In cell division-arrested embryonic *Drosophila* neurons, noninactivating currents were attributed to the Shaker channels (Saito et al., 1993). However, in most *Drosophila* cells, including larval muscles (Wu and Haugland, 1985), pupal neurons (Baker and Salkoff, 1990), and pupal photoreceptors (Hardie, 1991), Shaker A-type currents have been described. Because the noninactivating current recorded from MBNs remained in the presence of Shaker-blocking 4-AP (see below), we inferred that any effects of the mutation at the *shaker* locus would mostly affect peak current. However, peak outward current density was diminished by only 15% in *sh^{K5133}* relative to *wt*, and the current amplitude difference was not significant at *p* < 0.05 (*sh^{K5133}*, 533 ± 56 pA/pF; *wt*, 624 ± 67 pA/pF; one-tail Student's *t* test). This result would seemingly point to Shaker being only a minor contributor to somatic A-type currents in MBNs in *Drosophila*. Alternatively, it is conceivable that somatic Shaker channels might segregate to a subset of these neurons. In additional work, we performed pharmacological and biophysical studies to differentiate between these two alternatives.

Comparison of the blockade of A-type currents by a *Shal*-specific toxin and by the A-type current blocker 4-AP

In the most parsimonious scheme, if Shaker does not conduct the somatic A-type current in the *Drosophila* MBNs, *Shal* does. To confirm this hypothesis, we analyzed the blocking effect of a *Shal*-specific toxin, PaTx2 (Alomone Labs), over the whole-cell current of *wt* MBNs. PaTx2 specifically blocks the mammalian VD-KCs Kv4.2 and Kv4.3 (Diochot et al., 1999), with an IC₅₀ value of 650 nM (Alomone Labs technical sheet). The Kv4.2 and Kv4.3 channels are homologous to the *shal* gene of *Drosophila* and yield an A-type current in heterologous systems (Diochot et al., 1999). Although it is documented that PaTx2 does not block mammalian *shaker*-like channels expressed in *Xenopus* oocytes (Diochot et al., 1999), the toxin has not been tested on *Drosophila* *Shal* or *Shaker* channels. Therefore, we decided to analyze the blockade of PaTx2 on recombinant *Drosophila* *Shal* (d*Shal*) channels expressed in *Xenopus* oocytes and *Drosophila* *Shaker* channels recorded in larval muscles. The top traces in Figure 4A show recombinant d*Shal* K⁺ current expressed in *Xenopus* oocytes before and after exposure to 1 μM PaTx2. The average blockade

was $70 \pm 2\%$ ($n = 4$) (Fig. 4C). The bottom traces in Figure 4A show the Shaker A-type current recorded from larval muscles at the same potential. In this case, it is clear that PaTx2 had no effect on transient current amplitude (Fig. 4C).

In 76% of tested MBNs, PaTx2 blocked a rapidly inactivating outward current component (Fig. 4B, top traces). The extent of blockade averaged $45 \pm 3\%$ ($n = 41$) (Fig. 4C), and this effect was reversed after toxin washout. The above result led us to conclude that *shal* is functionally expressed in the somata of these neurons where it contributes significantly to the A-type current. Additionally, inspection of the extent of blockade of outward currents by PaTx2 in 41 MBNs revealed that not all neurons were equally sensitive to the toxin (Fig. 4B, compare top and bottom traces). In fact, in 10 neurons, the toxin had only little effect on peak current amplitude (Fig. 4D, bottom). This observation led us to suspect the presence of a subset of MBNs in which expression of Shal might be less conspicuous or even absent. Therefore, we compared the extent of PaTx2-mediated blockade of A-type currents to that produced by 4-AP, a K^+ channel blocker for both Shaker and Shal currents (Iverson et al., 1988; Wei et al., 1990). Figure 4D (top traces) shows a representative example of the blocking effect of 4-AP on outward current in MBNs. The bottom plot in Figure 4D shows that, in contrast to PaTx2, the extent of 4-AP block was quite homogeneous (average block, $55 \pm 3\%$; $n = 26$), revealing that the 4-AP-sensitive outward current contributes more or less evenly to the inactivating current in these cells. Moreover, in the PaTx2-sensitive MBN subset (31 of 41), the extent of block by 4-AP and by PaTx2 was equal (55 ± 3 vs $55 \pm 2\%$, respectively). Thus, we conclude that in such neurons, the somatic type-A current is contributed mostly by Shal. On such grounds, it would follow that the subset of neurons that were relatively resistant to PaTx2, but in which the A-type current was blocked by 4-AP, represents a subset of neurons in which the somatic A-type current is dominated by Shaker.

Analysis of the steady-state inactivation of outward currents in mushroom body neurons

In additional work, we analyzed the biophysical properties of outward currents in MBNs. We focused first on the steady-state inactivation, which for simplicity was modeled with a single Boltzmann distribution. This analysis, in a sample of 46 *wt* and 37 *sh^{KSI33}* MBNs, yielded average midpoint voltage of inactivation ($V_{1/2}$) values that were not significantly different (*wt*, -76.4 ± 4.6 mV; *sh^{KSI33}*, -77.0 ± 2.7 mV; \pm SD). However, we noted that the range of $V_{1/2}$ values in *wt* was broader (-83.0 to -66.0 mV) than in *sh^{KSI33}* (-83.0 to -71.0 mV), and an *F* test comparison

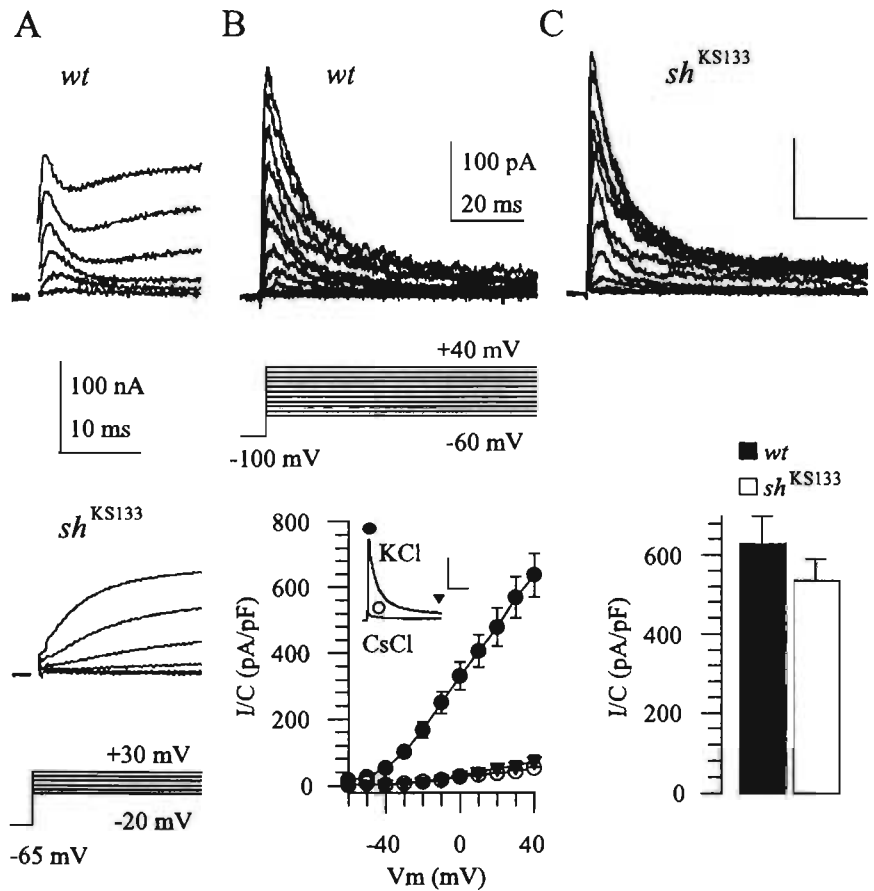


Figure 3. Shal dominates inactivating outward K^+ current in the *Drosophila* MBNs. **A**, K^+ currents recorded from the ventral lateral longitudinal fiber 6 of segments A2 and A3 of *wt* or *sh^{KSI33}* wandering third-instar larvae, elicited by the voltage protocol shown below. Voltage increments were of 10 mV. Each trace represents average currents from six different muscles in four different preparations (for *wt*) or average currents from 18 different muscles from 11 different larvae (for *sh^{KSI33}*). *sh^{KSI33}* muscles lack prominent inactivating outward current contributed by Shaker channels. **B**, Top traces are representative control outward currents recorded from acutely dissociated *wt* MBNs, elicited by the voltage protocol shown below. Voltage increments were of 10 mV. Holding potential was -70 mV. Depolarizing pulses were preceded by a 1 s prepulse to -100 mV. Bottom graph shows average *I-V* plots (normalized by cell capacitance) of peak current (●), noninactivating current recorded after 80 ms of depolarization onset (▼), and peak current when internal KCl was replaced by equimolar CsCl (○). For details of the recording solutions, see Materials and Methods. Each point represents the average of 17 neurons (for KCl records) or eight neurons (for CsCl records). The inset shows average current traces of eight consecutive neurons registered with either KCl or CsCl in the pipette. Calibration values are as described at the top. **C**, Top traces are representative outward currents recorded from acutely dissociated *sh^{KSI33}* MBNs, elicited by the same voltage protocol as in **B**. Calibration values have the same dimensions as in **B**. The bottom plot depicts average peak current density, in which the sustained component has been subtracted, of 33 *wt* and 33 *sh^{KSI33}* neurons. Values are 624 ± 67 and 533 ± 56 pA/pF, respectively.

of the SDs of the two samples revealed that, at $p < 0.005$, they were significantly different. Moreover, the steady-state inactivation curves in *wt* segregated into two groups: one with $V_{1/2}$ values more negative than -75 mV and another with $V_{1/2}$ values more positive than -72 mV (Fig. 5A). This impression was strengthened when we inspected the frequency distribution of $V_{1/2}$ data, grouping neurons according to their $V_{1/2}$ values using 1 mV intervals (Fig. 5B). As seen, the distribution strongly suggests that the *wt* sample segregates into two groups: one with a $V_{1/2} \approx -79$ mV and the other with a more depolarized $V_{1/2} \approx -70$ mV. The χ^2 test showed that a single Gaussian function constructed with the experimentally derived mathematical average and SD values was insufficient to account for the distribution of $V_{1/2}$ measurements (Fig. 5B, continuous line). In contrast, the distribution was well fitted by two Gaussian functions (Fig. 5B, discontinuous line) yielding $V_{1/2} = -78.0$ mV for a major component of the

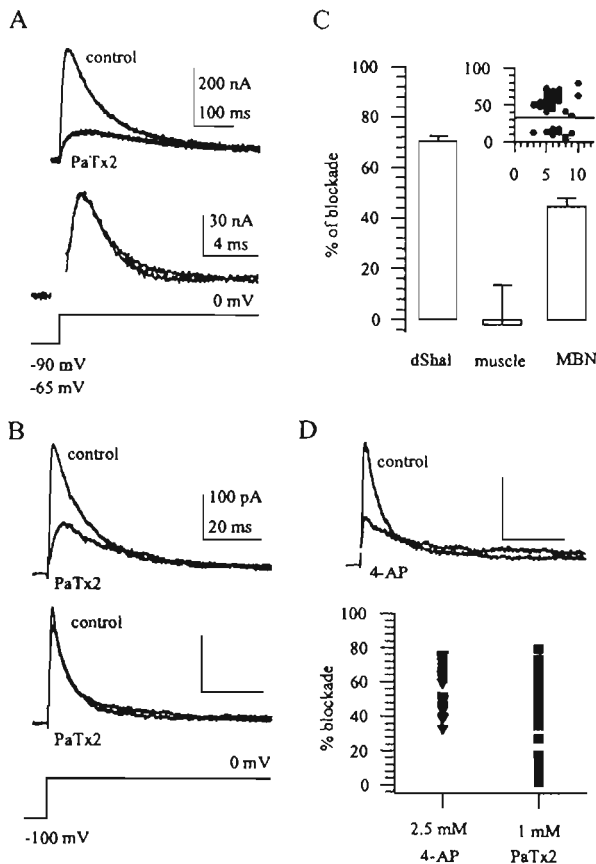


Figure 4. A-type K^+ currents of the MBNs are differentially sensitive to a Shal-specific toxin. PaTx2 specificity was tested on the recombinant dShal channels expressed in *Xenopus* oocytes and in Shaker currents recorded in the ventral lateral longitudinal muscles of third-instar larvae. **A**, Superimposed control and PaTx2-exposed currents recorded from Shal-expressing oocytes (top) and muscle fibers (bottom). PaTx2 ($1 \mu\text{M}$) removed a significant fraction of the dShal currents but did not significantly block muscular Shaker channels. **B**, Superimposed traces of K^+ currents before and after exposure to $1 \mu\text{M}$ PaTx2 recorded from two different MBNs. In a toxin-sensitive cell (top traces), the blocked component is a rapid-activating rapid-inactivating current. The neuron recorded at the bottom was almost insensitive to the toxin. Calibration values have the same dimensions as in the top traces. **C**, Summary of the results described in **A** ($n = 4$, for both recombinant dShal and muscular Shaker channels) and **B** ($n = 41$). The inset shows the percentage blockade by $1 \mu\text{M}$ PaTx2 of the peak current recorded in the dissociated MBNs as a function of time after plating (in hours). The line indicates the lowest blockade achieved by 4-AP. **D**, The top graph shows superimposed traces of K^+ current recorded from a MBN before and after exposure to 2.5 mM 4-AP, a general blocker of A-type currents. Calibration dimensions are the same as in **B**. The bottom plot shows the blockade efficiency of 4-AP and PaTx2 in each cell tested. The extent of 4-AP blockade was quite even ($55 \pm 3\%$), whereas blockade by PaTx2 was broader, stronger, and almost equal to 4-AP blockade in approximately two-thirds of the sample. Although each MBN expresses approximately the same amount of 4-AP-sensitive outward current, the PaTx2-sensitive Shal-contributed component is relatively weak in a subset of neurons.

distribution, which comprised 72% of the sample, and -70.0 mV for a minor component. For the sake of completeness, Figure 5E offers the distribution of $V_{1/2}$ data in *wt* in cumulative manner to further document the gross departure from a normal distribution. The continuous line joining the experimental data in Figure 5E was estimated using the parameters derived from fitting two Gaussian distributions to the data.

The separation of neurons into two populations was not apparent in the *sh^{KS133}* sample, which distributed around an average $V_{1/2} = -77.0 \pm 2.7 \text{ mV}$ (Fig. 5C). Figure 5D depicts the plot of the frequency distribution of $V_{1/2}$ values in *sh^{KS133}*. The line

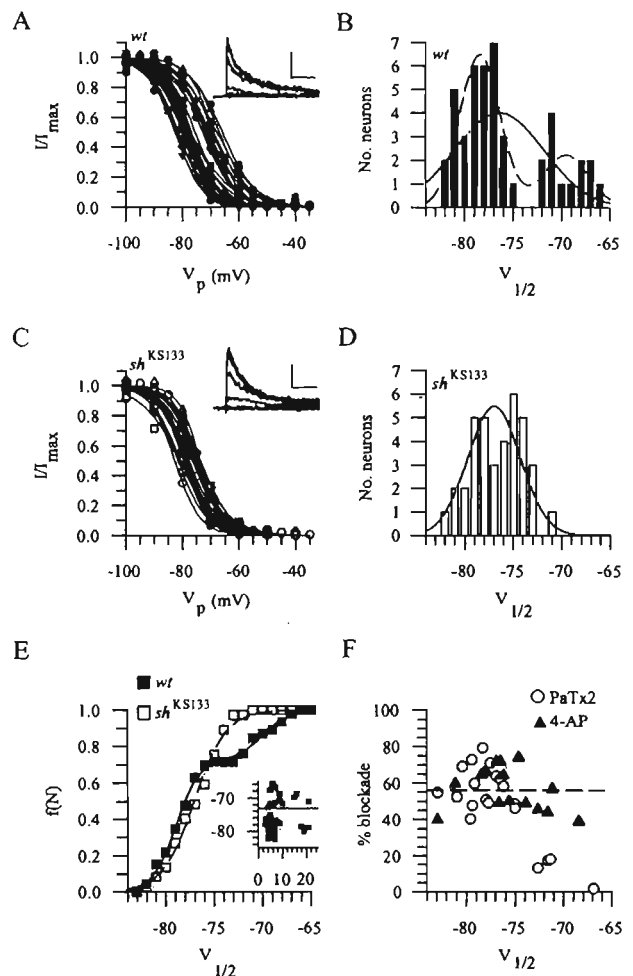


Figure 5. Shaker channel adds a depolarized component to the whole-cell inactivating current. **A**, Steady-state inactivation data from 46 *wt* neurons were obtained by measuring peak current elicited by a depolarizing pulse to $+40 \text{ mV}$ (inset) after the conditioning prepulses (V_p) indicated in the x-axis. Data were normalized to maximal current and single Boltzmann distributions used to fit experimental data. Midpoint voltage of steady-state inactivation ($V_{1/2}$) averaged $-76.4 \pm 4.6 \text{ mV}$ ($\pm \text{SD}$). **B**, Histogram showing that *wt* MBNs can be divided into two groups according to their $V_{1/2}$. Bin size is 1 mV . Continuous line depicts Gaussian function built with the mathematical average and SD values obtained from the experimental data. Dashed line shows best Gaussian fit. Optimization yielded the following values: $V_{1/2} = -78.0 \text{ mV}$ for the major component (72% of the sample) and $V_{1/2} = -70.0 \text{ mV}$ for the minor component. **C**, Steady-state inactivation data from 37 *sh^{KS133}* neurons were obtained and analyzed exactly as described above. $V_{1/2}$ averaged $-77.0 \pm 2.7 \text{ mV}$ ($\pm \text{SD}$). **D**, Histogram of $V_{1/2}$ for *sh^{KS133}* neurons was constructed as described above. The Gaussian function described by the empirical average value of $V_{1/2}$ and its SD is shown as a continuous line. **E**, The distribution of $V_{1/2}$ in *wt* and *sh^{KS133}* neurons is shown in cumulative manner. Continuous lines are Boltzmann distributions constructed with the parameters derived from fitting Gaussian distributions to the data in Figure 5, **B** and **D**. Whereas *sh^{KS133}* closely matches a single Gaussian distribution, *wt* sample departs grossly. Inset, *wt* $V_{1/2}$ values (in millivolts) plotted as a function of time in culture (in hours). The line indicates -73 mV . **F**, Sensitivity of the currents to PaTx2 ($n = 20$) and 4-AP ($n = 16$) is plotted as function of $V_{1/2}$. The dashed line indicates average blockade by 4-AP ($56 \pm 3\%$). Calibration: **A**, **C**, 100 pA , 20 ms .

joining the experimental bars is a Gaussian distribution constructed with the average and SD parameters derived from the whole sample to document that the fitting yields a good estimate of the population properties. In Figure 5E, the distribution of $V_{1/2}$ data in *sh^{KS133}* neurons is presented also in cumulative manner to emphasize the match to a normal distribution. Note that in *sh^{KS133}*, the distribution reaches 95% of cumulative inactivation

at -73 mV. In contrast, in *wt*, a significant fraction ($\sim 30\%$) of the neurons had $V_{1/2}$ values more depolarized than -73 mV (Fig. 5B). Thus, the analysis of the steady-state inactivation data indicated the presence of two neuronal populations in the *wt* sample: a major one ($\sim 72\%$) displaying $V_{1/2}$ values of approximately -78 mV and a minor one displaying more depolarized $V_{1/2}$ values. This last subset of neurons is absent in *sh*^{K^{S1.33}}. It is important to note that the percentage of neurons for which outward currents inactivated at more depolarized voltages ($\sim 28\%$) is similar to the percentage of neurons that displayed PaTx2-insensitive outward currents (24%) (Fig. 4) and were assumed in the previous section to represent a subset in which Shaker is a major contributor to the somatic A-type current. Thus, Shaker contributes a PaTx2-resistant A-type current, which inactivates at more depolarized voltages in a subset of MB neuronal somata in *wt* flies.

We further examined this hypothesis by analyzing the steady-state inactivation properties of the subgroups of MBNs showing either sensitivity or resistance to PaTx2. If the toxin-resistant current was contributed by Shaker, the same subgroup of neurons displaying resistance should also exhibit depolarized $V_{1/2}$ values. In 20 of the cells shown in the bottom panel of Figure 4D, the giga-seals lasted long enough (>4 min) to evaluate both steady-state inactivation and blockade by the toxin. The empty circles in the plot in Figure 5F show that in 16 of these neurons, the extent of block by PaTx2 was $\geq 40\%$, and these neurons had a $V_{1/2}$ more negative than -75 mV. The four neurons in which the toxin had little effect on peak current amplitude displayed more depolarized half-inactivation voltages. This result fits well with the idea that Shaker segregates to a small subset of MB neuronal somata where it contributes a PaTx2-resistant A-type current that inactivates at more depolarized voltages. To complete the argument, the triangles in the plot in Figure 5F document that the extent of A-type current block by 4-AP was quite even in a set of neurons that displayed a wide range of $V_{1/2}$ values.

The observation that Shaker segregates to a subset of dissociated MBNs in *wt* flies could also be explained by a time-dependent manufacture and transport of new channels for growing and maturing processes, because neurons recover from the axotomy performed during the dissociation procedure. In this instance, the toxin sensitivity and steady-state inactivation would vary during culture time, and the resistance to PaTx2 and depolarized $V_{1/2}$ values should segregate to the older neurons. As seen in the insets of Figures 4C and 5E, this was not the case, making this alternative explanation highly unlikely.

Shaker neuronal somata lack a rapidly inactivating outward current

The results in previous sections provide evidence that cells in the MBs express transcripts for four types of VDKCs and indicate that Shaker contributes to the somatic A-type current in only a subset of the intrinsic neurons. In additional experiments, we challenged this last notion by analyzing the kinetics of outward current inactivation. Outward currents in MBNs acutely dissociated (Wright and Zhong, 1995), or in primary culture (Delgado et al., 1998), display fast and slow inactivation. Shaker and Shal channels registered in larval (Tsunoda and Salkoff, 1995b) and pupal (Baker and Salkoff, 1990) neurons are known to encode for A-type currents exhibiting inactivation times <15 ms at voltages above $+20$ mV. Thus, both Shaker and Shal are competent to comprise the fast inactivating outward current component observed in MBNs. Therefore, if somatic Shaker channels segregate to a particular subset of neurons in which Shal makes little or no contribution, those neurons derived from the *sh*^{K^{S1.33}} mutant

deprived of functional Shaker channels should lack the fast component of outward current inactivation.

We analyzed outward current inactivation using a nested model to establish the minimal number of exponential components that best account for the time course of inactivation (Horn, 1987). Figure 6A shows representative examples of the *wt* and *sh*^{K^{S1.33}} currents for which inactivation kinetics was analyzed. The improvement in the correlation coefficient (r) when the number of terms in the sum of exponentials was increased is shown in Figure 6B. The analysis reveals that at most, two exponential components suffice to account for outward current inactivation (Fig. 6B). Moreover, in 58 of 60 *wt* neurons (97%), outward current inactivation was better accounted for in terms of two exponential components (Fig. 6C). In this majority of neurons, the time constant for the fast component of inactivation averaged 4.6 ± 0.3 ms, and the slow component averaged 22.0 ± 2.0 ms. The time constants for each individual neuron for which inactivation kinetics was fitted with two exponentials are displayed in the left panel of Figure 6D. The fast component contributed 66% of the peak current amplitude. In the two *wt* neurons in which a single exponential best fitted the time course of inactivation, the time constant was 22.0 and 21.0 ms, respectively.

The *sh*^{K^{S1.33}} sample contained a significantly larger number of neurons in which the time course of inactivation was well fitted by a single exponential (12 of 61; $p < 0.005$; χ^2 test) (Fig. 6C). In these neurons, the time constant of inactivation averaged 19.0 ± 2.0 ms, and the range of inactivation time constants are shown in the right panel of Figure 6D. Within error, this value equals the time constant of the slow inactivation component in *wt* (22.0 ± 2.0 ms) and is significantly slower than the fast inactivation component (4.6 ± 0.3 ms) in the *wt* sample ($p < 0.0005$, one-tail Student's t test). Importantly, the peak-current density of MBNs lacking the fast component of inactivation in *sh*^{K^{S1.33}} (432 ± 82 pA/pF; $n = 12$) was below the average peak current in *wt* neurons (602 ± 46 pA/pF; $n = 60$). This difference (28%) is marginally significant ($p = 0.056$; one-tail Student's t test). The above analysis indicates that in *sh*^{K^{S1.33}}, there is a significant fraction of MBNs displaying single-exponential inactivation in which peak outward currents are diminished relative to those exhibiting double-exponential inactivation as well as to peak outward currents in *wt* neurons from this brain region. These observations agree with the hypothesis that Shaker channels code for a fast-inactivating outward current that segregates to 20–30% of MB neuronal somata in which it contributes approximately one-third of the peak current density. Notably, the minor subgroup of *sh*^{K^{S1.33}} neurons displaying K⁺ currents inactivating along a single exponential were only weakly blocked by the Shal-specific PaTx2 (blockade, $<23\%$) (Fig. 6E, left top traces and filled circles), indicating that their current is conducted mostly through a different channel set. This is evidence for the existence of a subset of MBNs that expresses few (if any) rapid-inactivating Shal channels. In the *wt* flies, this subgroup of neurons expresses Shaker as the major somatic A-type current component.

In that majority of neurons ($\sim 76\%$) from *sh*^{K^{S1.33}} individuals displaying double-exponential inactivation, the time constant for the fast and slow components averaged 5.7 ± 0.5 and 27.0 ± 2.0 ms, respectively, and the fast component contributed 64% of peak-current density. The time constants for each individual *sh*^{K^{S1.33}} neuron for which inactivation kinetics was fitted with two exponentials are displayed in the right panel of Figure 6D. In this subset of *sh*^{K^{S1.33}} neurons, the peak-current density (595 ± 48 pA/pF; $n = 49$) nearly equals the peak-current density in the *wt* neuron population. They would represent that majority of MBNs

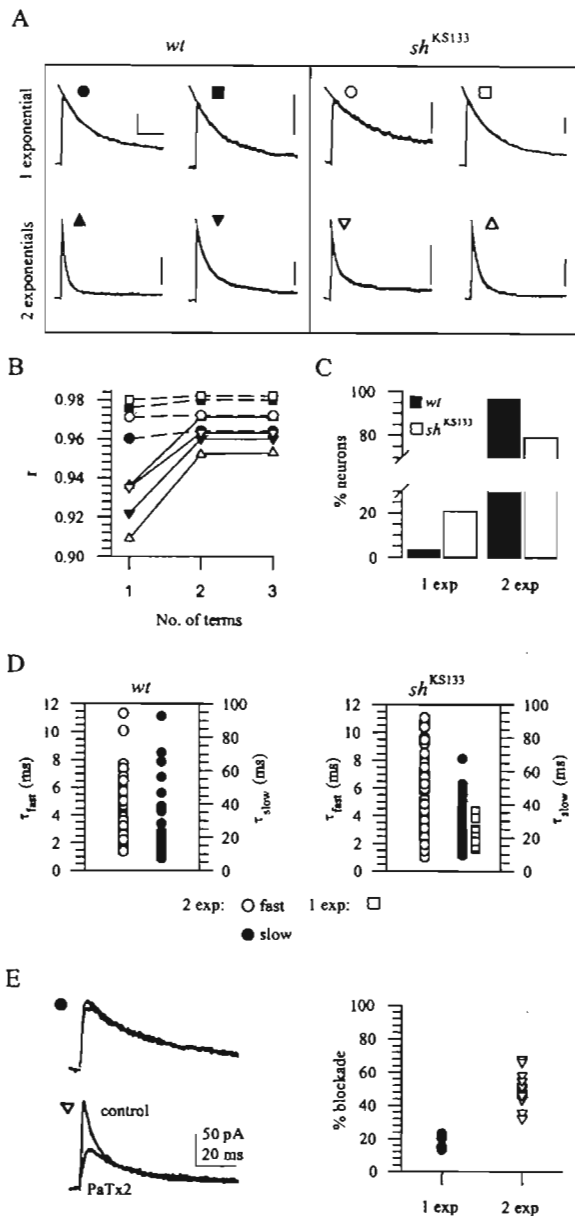


Figure 6. Shaker contributes to the rapidly inactivating current in a subset of MBNs. *A*, Transient K^+ currents from four different *wt* cells and four different *sh^{KS133}* cells are shown with fitted curves superimposed on current traces. Curves were fitted using a single or a double exponential function plus a base line. The minimal number of exponential components required to account for the time course of outward current inactivation was determined statistically according to the theory of nested models (see Materials and Methods). Calibration: (in all traces) 100 pA, 20 ms. *B*, Improvement of the coefficient of correlation (r) is shown as a function of incrementing terms in the fitted exponential functions of the traces shown in *A*. Some of the *wt* and *sh^{KS133}* neurons were already well fit by a single exponential (■, ●, □, ○), whereas others required two terms (▲, ▼, △, ▽). Symbols are related to the currents in *A*. *C*, Distribution of the analyzed *wt* ($n = 60$) and *sh^{KS133}* ($n = 61$) neurons according to the number of exponential terms for an adequate fitting. Whereas 97% of the *wt* neurons required two exponentials to account for the inactivation kinetics of the whole-cell current, only 80% of *sh^{KS133}* inactivated along a double exponential. Difference is statistically significant ($p < 0.005$; χ^2 test). *D*, Distribution of the fast and slow time constants of 58 *wt* and 49 *sh^{KS133}* MBNs, the inactivation kinetics of which were fitted with two exponentials. Squares in the right panel show the distribution of the 12 *sh^{KS133}* neurons inactivating along a single exponential. *E*, Left traces show examples of *sh^{KS133}* K^+ currents inactivating along a single (top) or a double (bottom) exponential before and after exposure to 1 μ M PaTx2. Only currents presenting a fast inactivating component were sensitive to the toxin. The right panel displays the results obtained in 22 *sh^{KS133}* neurons. Only four of them (filled circles) exhibited a single-exponential current and were slightly sensitive to the PaTx2.

in which Shal is solely responsible for carrying the somatic fast inactivating A-type current. In the *sh^{KS133}* neurons exhibiting a double-exponential current, the rapid-inactivating current was removed by application of the Shal-specific toxin PaTx2 (Fig. 6*E*, bottom left traces and inverted triangles) ($n = 18$) in an amount comparable with the PaTx2-sensitive current of the *wt* neurons (Fig. 4*D*).

The slowly inactivating current might be encoded by Shab

The slowly inactivating current that remained after 4-AP exposure (Fig. 4*D*) resembles the current reported previously in cultured larval neurons (Solc and Aldrich, 1988), embryonic myotubes (Zagotta et al., 1988), type III larval synaptic boutons (Martinez-Padron and Ferrus, 1997), and photoreceptors (Hardie, 1991). This current has been termed K_D and is possibly encoded by *shab* (Tsunoda and Salkoff, 1995a,b). Although we did not attempt to unambiguously identify the molecular nature of the 4-AP-resistant current in MBNs and it inactivates faster than K_D , by exclusion, we believe that Shab is indeed its major contributor. Because this current is resistant to 4-AP and removed by quinidine (data not shown) and is present in the *shaker^{KS133}* genotype, it is unlikely to be encoded by Shal or Shaker. Furthermore, although *shaw* transcripts were also found in the MB preparation for RT-PCR experiments, it is improbable that our recordings contain Shaw-conducted current. Shaw channels recorded in embryonic neurons or expressed in oocytes have extremely low voltage sensitivity and appear to function as a leak current (Wei et al., 1990; Tsunoda and Salkoff, 1995b). These currents would have been excluded from our analysis, because we linearly subtracted all of the traces according to the estimated input resistance of the cells. In addition, the slowly inactivating current was resistant to 4-AP (Fig. 4*D*), but native and recombinant Shaw channels are very susceptible to blockade by 4-AP (Wei et al., 1990; Tsunoda and Salkoff, 1995b).

Discussion

Ion channels expressed in the plasma membrane of neurons define their excitability (Hille, 2001). A total of 145 sequences coding for α and accessory ion channel subunits were identified in the *Drosophila* genome (Littleton and Ganetzky, 2000). From this repertoire, each neuron expresses a set of ion channels that endows it with particular excitability properties (Mandel, 1992; Serodio and Rudy, 1998; Hille, 2001).

MBNs are required for olfactory learning and retention in *Drosophila* (Roman and Davis, 2001). Although it is not yet possible to isolate *Drosophila* MBs because of the small brain region they occupy, transgenic lines expressing β -galactosidase or GFP highly preferentially in their intrinsic neurons has allowed their identification in whole-brain dispersions (Wright and Zhong, 1995; Delgado et al., 1998; Su and O'Dowd, 2003). Importantly, the expression of these proteins does not seem to alter the properties of the currents thus far recorded in the labeled neurons (Wright and Zhong, 1995; Su and O'Dowd, 2003). Here, we used GFP-labeled MBNs dissected from larval brains to characterize their VDKCs.

Olfactory learning is not adult specific. *Drosophila* larvae are capable of olfactory learning (Aceves-Piña and Quinn, 1979), which requires MB integrity (Heisenberg et al., 1985). A mutation in the gene *dunce* expressed both in larval and adult MB neuropil (Nighorn et al., 1991) perturbs learning acquisition at both stages (Aceves-Piña and Quinn, 1979). Moreover, under proper training, adult flies can recall what they were taught as larvae (Tully et al., 1994), even though axonal rearrangements

occur during metamorphosis (Armstrong et al., 1998; Lee et al., 1999). Among several molecular MB markers (Nighorn et al., 1991; Crittenden et al., 1998), the general Shaker-staining pattern is conserved in larval and adult brains (Rogerio et al., 1997). Several of these proteins have been implicated in olfactory learning and memory (Dubnau and Tully, 1998; Roman and Davis, 2001). Thus, there is a strong suggestion that MBs serve the same learning functions in larvae and in adults.

Our results show that cells in the MBs express four genes coding for VDKCs. Because the isolated cell clusters used in the RT-PCR contain neurons and glia, probably in a ratio 10:1 (Klammt et al., 2001), we cannot determine which cell type is responsible for the signal. Nevertheless, these data are consistent with our electrophysiological results and support the following conclusions: Shal is the major somatic A-type current conductor in MBNs, somatic Shaker channels segregate to 20–30% of the dissociated MBNs, and the absence of functional Shaker channels modifies significantly the whole-cell current profile of this subset of neurons.

In *Drosophila*, the product of the *shal* gene (Wei et al., 1990; Covarrubias et al., 1991) and several of the splice variants of *shaker* (Iverson et al., 1988; Timpe et al., 1988) produce A-type currents when expressed in *Xenopus* oocytes. Shab behaves as delayed rectifier and Shaw operates as a leak channel (Wei et al., 1990; Covarrubias et al., 1991; Tsunoda and Salkoff, 1995a,b). In vertebrates, a Kv channel formed by an α subunit alone, which conducts a sustained current may behave as an A-type channel when an auxiliary β subunit is bound to it (Pongs et al., 1999). However, the only β subunit of *Drosophila* (Littleton and Ganetzky, 2000), Hyperkinetic (Hk), lacks the inactivating ball domain of the vertebrate $\beta 1$ subunit and is incapable of restoring rapid inactivation to a Shaker mutant channel that lacks N-type inactivation (Chouinard et al., 1995). Because coexpression experiments of Hk with *shab* and *shaw* are lacking, and inactivating splice variants have not been described for these genes, the possibility that these α subunits conduct an A-type current cannot be excluded, but this seems remote.

Because at the time of electrophysiological examination dissociated MBNs did not develop appreciable neurites (Fig. 1C), we recorded mainly from channels expressed in the cell body membrane. The cell capacitance averaged 0.42 ± 0.01 pF, which corresponds to a $3.6 \mu\text{m}$ diameter sphere, assuming $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ of specific capacitance. This size is approximately the same as that reported for MB neuronal somata in intact brains ($3.9 \mu\text{m}$) (Wang et al., 2001). Therefore, we exclude the possibility of significant axonal current contribution to our reported data. We do not rule out the possibility that ion channel expression in MB neuronal axons could be different from the one we report here. In fact, Shaker seemed to be the major contributor to the A-type current recorded from honeybee dissociated MBNs that had developed axonal and dendritic arborizations (Pelz et al., 1999).

In our system, Shal seems to be the major A-type current contributor. This might be viewed as a common neuronal strategy, because in several experimental models (including *Drosophila* embryonic, larval, and pupal neurons), Shal channels underlie the somatic current (Solc et al., 1987; Baker and Salkoff, 1990; Tsunoda and Salkoff, 1995b; Song et al., 1998; Baro et al., 2000). In *sh*^{K5133} cells, inactivating outward currents half-inactivate at approximately -77 mV. Since first described, A-type currents activated at hyperpolarized voltages were proposed to have a functional role in determining interspike intervals (Connor and Stevens, 1971). In *Drosophila* embryonic neurons, 4-AP increased the firing frequency and shortened the latency to the

onset of spikes (Zhao and Wu, 1997). Genetic studies showed that the effect of 4-AP on the neuronal firing pattern of *Drosophila* neurons occurred because of Shal blockade (Tsunoda and Salkoff, 1995b). Thus, it is plausible that Shal determines the frequency coding capabilities of the MBNs.

Three morphological categories of MBNs associated with five sets of lobes have been described previously (Crittenden et al., 1998; Lee et al., 1999). Two types of neurons branch to give rise to a vertical and a median lobe (α/β and α'/β' , respectively). The third type composes the γ median lobe. Our results indicate that somatic Shaker channels are functionally expressed in a restricted subset of neurons, which represents $\sim 25\%$ of the GFP+ neurons. This value is a lower limit; we may have missed small Shaker contributions in the remaining cells. Whether this Shaker-expressing subgroup of neurons represents one of the three previously identified morphological classes remains to be established. *In situ* hybridization experiments failed to identify any preferred expression pattern of the *shaker* transcripts within adult MBNs (Pongs et al., 1988; Tseng-Crank et al., 1991), and they were undetected in larval brains possibly because of very low expression levels (Tseng-Crank et al., 1991). However, differential distribution among the three MBN subtypes has been reported for other proteins related to fly learning and memory, including metabotropic amine receptors, cAMP-related enzymes, and adhesion proteins (Crittenden et al., 1998). Distinct protein expression in the MBN subsets surely implies functional diversity. Several studies have addressed and supported this hypothesis by selectively modifying or disrupting defined lobes (O'Dell et al., 1995; Zars et al., 2000; McGuire et al., 2001; Pascual and Preat, 2001). Because a mutation in the *shaker* locus interferes with olfactory conditioning (Cowan and Siegel, 1986), its neuronal segregation might reveal the relevant circuits for this behavior.

Shaker expression in a subset of MB neuronal somata has a major impact in whole-cell current properties. In this neuronal subset, Shaker is the main contributor to the rapidly inactivating outward current ($\tau \approx 5$ ms), shifting their steady-state inactivation by approximately $+10$ mV. This contribution is physiologically relevant, because, as stated above, a *shaker* mutant performed poorly in an olfactory learning protocol that relies on the MBs (Cowan and Siegel, 1986). Shaker channels repolarize the action potential, and mutations in the *shaker* locus produce malfunctioning of the nervous system (Tanouye et al., 1981). The lack of Shaker function led to abnormal basal neurotransmitter release (Jan et al., 1977) and inhibited synaptic plasticity development (Delgado et al., 1994). This could account for part of the behavioral phenotype of *shaker* mutants. The Shaker-dependent currents recorded here stand out because they inactivate ~ 30 mV more negative than those reported in muscle or in oocyte expression studies (Wu and Haugland, 1985; Wei et al., 1990). A similar hyperpolarized $V_{1/2}$ was reported for somatic Shaker channels in *Drosophila* photoreceptors (Hardie, 1991). In these cells, inactivation of Shaker channels provides the membrane with an increased gain leading to amplification of the signal-to-noise ratio of the graded voltage signals (Niven et al., 2003). The work by Niven et al. (2003) provides evidence that the lack of Shaker channels alters the coding capabilities of photoreceptors. Additional work should establish the way in which Shaker helps to shape the electrophysiological properties of MBNs.

Ion channel modulation in the context of learning and memory is of major importance (Byrne and Kandel, 1996). PKA-dependent phosphorylation of Shaker channels at a C-terminal consensus sequence occurring in all functionally tested clones

induces an increase in inactivation velocity (Drain et al., 1994). cAMP metabolism is central to the cellular processes that underlie learning and memory in *Drosophila* (Dubnau and Tully, 1998; Roman and Davis, 2001), and it seems probable that Shaker channels are regulated by this signaling cascade. Wright and Zhong (1995) reported that a subset of MBNs express a rapidly inactivating current that is downregulated by permeable analogs of the cAMP. A comparative analysis of modulation in *wz* and *shaker* neurons should help to determine whether or not Shaker contributes to this component.

In summary, our findings lead to the notion that although *Drosophila* MBNs express more than two types of VD KC transcripts, Shal and Shaker channels segregate to different neuronal somata and that, surprisingly, lack of functional Shaker channels, which alters olfactory learning, modifies the electrophysiological profile of only a minor subset of MBNs.

References

- Aceves-Piña EO, Quinn WG (1979) Learning in normal and mutant *Drosophila* larvae. *Science* 206:93–96.
- Armstrong JD, de Belle JS, Wang Z, Kaiser K (1998) Metamorphosis of the mushroom bodies: large-scale rearrangements of the neural substrates for associative learning and memory in *Drosophila*. *Learn Mem* 5:102–114.
- Baker K, Salkoff L (1990) The *Drosophila* Shaker gene codes for a distinctive K⁺ current in a subset of neurons. *Neuron* 4:129–140.
- Baro DJ, Ayali A, French L, Scholz NL, Labenia J, Lanning CC, Graubard K, Harris-Warrick RM (2000) Molecular underpinnings of motor pattern generation: differential targeting of *shal* and *shaker* in the pyloric motor system. *J Neurosci* 20:6619–6630.
- Bate M (1993) The mesoderm and its derivatives. In: *The development of Drosophila melanogaster* (Bate M, Martínez Arias A, eds), pp 1013–1090. Plainview, NY: CHSL.
- Byrne JH, Kandel ER (1996) Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci* 16:425–435.
- Chouinard SW, Wilson GF, Schlimgen AK, Ganetzky B (1995) A potassium channel beta subunit related to the aldo-keto reductase superfamily is encoded by the *Drosophila hyperkinetic* locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6763–6767.
- Connor JA, Stevens CF (1971) Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J Physiol (Lond)* 213:31–53.
- Covarrubias M, Wei A, Salkoff L (1991) Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K⁺ current systems. *Neuron* 7:763–773.
- Cowan TM, Siegel RW (1986) *Drosophila* mutations that alter ionic conduction disrupt acquisition and retention of a conditioned odor avoidance response. *J Neurogenet* 3:187–201.
- Crittenden JR, Skoulakis EM, Han KA, Kalderon D, Davis RL (1998) Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learn Mem* 5:38–51.
- de Belle JS, Heisenberg M (1994) Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263:692–695.
- Delgado R, Latorre R, Labarca P (1994) *Shaker* mutants lack post-tetanic potentiation at motor end-plates. *Eur J Neurosci* 6:1160–1166.
- Delgado R, Davis R, Bono MR, Latorre R, Labarca P (1998) Outward currents in *Drosophila* larval neurons: *dunce* lacks a maintained outward current component downregulated by cAMP. *J Neurosci* 18:1399–1407.
- Diochot S, Drici MD, Moimier D, Fink M, Lazdunski M (1999) Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of Ito1 in cardiac electrogenesis. *Br J Pharmacol* 126:251–263.
- Drain P, Dubin AE, Aldrich RW (1994) Regulation of Shaker K⁺ channel inactivation gating by the cAMP-dependent protein kinase. *Neuron* 12:1097–1109.
- Dubnau J, Tully T (1998) Gene discovery in *Drosophila*: new insights for learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:407–444.
- Espinosa F, Lopez-Gonzalez I, Serrano CJ, Gasque G, de la Vega-Beltran JL, Trevino CL, Darszon A (1999) Anion channel blockers differentially affect T-type Ca²⁺ currents of mouse spermatogenic cells, alpha 1E currents expressed in *Xenopus* oocytes and the sperm acrosome reaction. *Dev Genet* 25:103–114.
- Hardie RC (1991) Voltage-sensitive potassium channels in *Drosophila* photoreceptors. *J Neurosci* 11:3079–3095.
- Heisenberg M, Borst A, Wagner S, Byers D (1985) *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet* 2:1–30.
- Hille B (2001) *Ion channels of excitable membranes*, Ed 3. Sunderland, MA: Sinauer.
- Horn R (1987) Statistical methods for model discrimination. Applications to gating kinetics and permeation of the acetylcholine receptor channel. *Biophys J* 51:255–263.
- Ito K, Suzuki K, Estes P, Ramaswami M, Yamamoto D, Strausfeld NJ (1998) The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem* 5:52–77.
- Iverson LE, Rudy B (1990) The role of the divergent amino and carboxyl domains on the inactivation properties of potassium channels derived from the *Shaker* gene of *Drosophila*. *J Neurosci* 10:2903–2916.
- Iverson LE, Tanouye MA, Lester HA, Davidson N, Rudy B (1988) A-type potassium channels expressed from *Shaker* locus cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5723–5727.
- Jan LY, Jan YN (1976) Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *J Physiol (Lond)* 262:189–214.
- Jan YN, Jan LY, Dennis MJ (1977) Two mutations of synaptic transmission in *Drosophila*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 198:87–108.
- Klambt C, Hummel T, Granderath S, Schimmelpfeng K (2001) Glial cell development in *Drosophila*. *Int J Dev Neurosci* 19:373–378.
- Lee T, Lee A, Luo L (1999) Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* 126:4065–4076.
- Lichtinghagen R, Stocker M, Wittka R, Boheim G, Stuhmer W, Ferrus A, Pongs O (1990) Molecular basis of altered excitability in *Shaker* mutants of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* 9:4399–4407.
- Littleton JT, Ganetzky B (2000) Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* 26:35–43.
- Mandel G (1992) Tissue-specific expression of the voltage-sensitive sodium channel. *J Membr Biol* 125:193–205.
- Martinez-Padron M, Ferrus A (1997) Presynaptic recordings from *Drosophila*: correlation of macroscopic and single-channel K⁺ currents. *J Neurosci* 17:3412–3424.
- McGuire SE, Le PT, Davis RL (2001) The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* 293:1330–1333.
- Nighorn A, Healy MJ, Davis RL (1991) The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila dunce* gene is concentrated in the mushroom body neuropil. *Neuron* 6:455–467.
- Niven JE, Vahasoyrinki M, Kauranen M, Hardie RC, Juusola M, Weckstrom M (2003) The contribution of Shaker K⁺ channels to the information capacity of *Drosophila* photoreceptors. *Nature* 421:630–634.
- O'Dell KM, Armstrong JD, Yang MY, Kaiser K (1995) Functional dissection of the *Drosophila* mushroom bodies by selective feminization of genetically defined subcompartments. *Neuron* 15:55–61.
- O'Dowd DK (1995) Voltage-gated currents and firing properties of embryonic *Drosophila* neurons grown in a chemically defined medium. *J Neurobiol* 27:113–126.
- Pascual A, Preat T (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294:1115–1117.
- Pelz C, Jander J, Rosenboom H, Hammer M, Menzel R (1999) I_A in Kenyon cells of the mushroom body of honeybees resembles shaker currents: kinetics, modulation by K⁺, and simulation. *J Neurophysiol* 81:1749–1759.
- Pirrotta V (1988) Vectors for P-mediated transformation in *Drosophila*. *Biotechnology* 10:437–456.
- Pongs O, Kecskemethy N, Muller R, Krah-Jentgens I, Baumann A, Kiltz HH, Canal I, Llamazares S, Ferrus A (1988) *Shaker* encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J* 7:1087–1096.
- Pongs O, Leicher T, Berger M, Roeper J, Bahring R, Wray D, Giese KP, Silva AJ, Storm JF (1999) Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel beta subunits. *Ann NY Acad Sci* 868:344–355.
- Rogero O, Hammerle B, Tejedor FJ (1997) Diverse expression and distribution of Shaker potassium channels during the development of the *Drosophila* nervous system. *J Neurosci* 17:5108–5118.
- Roman G, Davis RL (2001) Molecular biology and anatomy of *Drosophila* olfactory associative learning. *BioEssays* 23:571–581.

- Rubin GM, Spradling AC (1983) Vectors for P element-mediated gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 11:6341–6351.
- Saito M, Zhao ML, Wu CF (1993) Irregular activity in the giant neurons from *Shaker* mutants suggests that the *Shaker* locus may encode non-A-type K⁺ channel subunits in *Drosophila*. *Ann NY Acad Sci* 707:392–395.
- Schwarz TL, Papazian DM, Carretto RC, Jan YN, Jan LY (1990) Immunological characterization of K⁺ channel components from the *Shaker* locus and differential distribution of splicing variants in *Drosophila*. *Neuron* 4:119–127.
- Serodio P, Rudy B (1998) Differential expression of Kv4 K⁺ channel subunits mediating subthreshold transient K⁺ (A-type) currents in rat brain. *J Neurophysiol* 79:1081–1091.
- Sharma Y, Cheung U, Larsen EW, Eberl DF (2002) PPTGAL, a convenient Gal4 P-element vector for testing expression of enhancer fragments in *Drosophila*. *Genesis* 34:115–118.
- Solc CK, Aldrich RW (1988) Voltage-gated potassium channels in larval CNS neurons of *Drosophila*. *J Neurosci* 8:2556–2570.
- Solc CK, Zagotta WN, Aldrich RW (1987) Single-channel and genetic analyses reveal two distinct A-type potassium channels in *Drosophila*. *Science* 236:1094–1098.
- Song WJ, Tkatch T, Baranauskas G, Ichinohe N, Kitai ST, Surmeier DJ (1998) Somatodendritic depolarization-activated potassium currents in rat neostriatal cholinergic interneurons are predominantly of the A type and attributable to coexpression of Kv4.2 and Kv4.1 subunits. *J Neurosci* 18:3124–3137.
- Stewart BA, Atwood HL, Renger JJ, Wang J, Wu CF (1994) Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions. *J Comp Physiol [A]* 175:179–191.
- Stocker M, Stuhmer W, Wittka R, Wang X, Muller R, Ferrus A, Pongs O (1990) Alternative *Shaker* transcripts express either rapidly inactivating or noninactivating K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8903–8907.
- Stocker RF (1994) The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res* 275:3–26.
- Su H, O'Dowd DK (2003) Fast synaptic currents in *Drosophila* mushroom body Kenyon cells are mediated by alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors and picrotoxin-sensitive GABA receptors. *J Neurosci* 23:9246–9253.
- Tanouye MA, Ferrus A, Fujita SC (1981) Abnormal action potential associated with the *Shaker* complex locus of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6548–6552.
- Timpe LC, Schwarz TL, Tempel BL, Papazian DM, Jan YN, Jan LY (1988) Expression of functional potassium channels from *Shaker* cDNA in *Xenopus* oocytes. *Nature* 331:143–145.
- Tseng-Crank J, Pollock JA, Hayashi I, Tanouye MA (1991) Expression of ion channel genes in *Drosophila*. *J Neurogenet* 7:229–239.
- Tsunoda S, Salkoff L (1995a) The major delayed rectifier in both *Drosophila* neurons and muscle is encoded by Shab. *J Neurosci* 15:5209–5221.
- Tsunoda S, Salkoff L (1995b) Genetic analysis of *Drosophila* neurons: Shal, Shaw, and Shab encode most embryonic potassium currents. *J Neurosci* 15:1741–1754.
- Tully T, Cambiazo V, Kruse L (1994) Memory through metamorphosis in normal and mutant *Drosophila*. *J Neurosci* 14:68–74.
- Wang Y, Wright NJ, Guo H, Xie Z, Svoboda K, Malinow R, Smith DP, Zhong Y (2001) Genetic manipulation of the odor-evoked distributed neural activity in the *Drosophila* mushroom body. *Neuron* 29:267–276.
- Wei A, Covarrubias M, Butler A, Baker K, Pak M, Salkoff L (1990) K⁺ current diversity is produced by an extended gene family conserved in *Drosophila* and mouse. *Science* 248:599–603.
- Wright NJ, Zhong Y (1995) Characterization of K⁺ currents and the cAMP-dependent modulation in cultured *Drosophila* mushroom body neurons identified by *lacZ* expression. *J Neurosci* 15:1025–1034.
- Wu CF, Haugland FN (1985) Voltage clamp analysis of membrane currents in larval muscle fibers of *Drosophila*: alteration of potassium currents in *Shaker* mutants. *J Neurosci* 5:2626–2640.
- Wu CF, Suzuki N, Poo MM (1983) Dissociated neurons from normal and mutant *Drosophila* larval central nervous system in cell culture. *J Neurosci* 3:1888–1899.
- Zagotta WN, Brainard MS, Aldrich RW (1988) Single-channel analysis of four distinct classes of potassium channels in *Drosophila* muscle. *J Neurosci* 8:4765–4779.
- Zars T, Fischer M, Schulz R, Heisenberg M (2000) Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* 288:672–675.
- Zhao ML, Wu CF (1997) Alterations in frequency coding and activity dependence of excitability in cultured neurons of *Drosophila* memory mutants. *J Neurosci* 17:2187–2199.

Cholesterol-depleting compounds modulate K⁺-currents in *Drosophila* Kenyon cells.

Gabriel Gasque¹, Pedro Labarca², and Alberto Darszon^{1,3}

¹ Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México. Fax: (52) 777 3172388.

² Centro de Estudios Científicos, Arturo Prat 514, Valdivia, Chile

Abstract

Sterol-enriched lipid rafts have been involved in *Drosophila* membrane signaling such as Hedgehog targeting and glutamate receptor ligand-affinity regulation. Here, we show that the voltage-dependent K⁺ currents expressed by the intrinsic neurons of the Mushroom bodies are up-modulated by compounds that remove sterols from the plasma membrane. Modulation seems to rely on a fast-exchanging sterol-pool, which more strongly affects the slowly inactivating current. Our results provide the first evidence that sterols influence the operation of voltage-gated ion channels in *Drosophila* neurons and strengthen the importance of lipid rafts in this biological model.

Keywords

K⁺ channel modulation, *Drosophila*, sterols, Mushroom bodies, lipid rafts

List of abbreviations

PM, plasma membrane; KC, Kenyon cell; VDKC, voltage-dependent K⁺ channel; CD, cyclodextrin; M β CD, Methyl- β -cyclodextrin; HEPES, 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; UAS, Upstream Activating Sequence; GFP, Green Fluorescent Protein; C3S, cholesteryl 3-sulfate; BSA, bovine serum albumin, DMSO, dimethyl sulfoxide.

³ To whom correspondence should be addressed. e-mail: darszon@ibt.unam.mx

1.- Introduction.

Sterols influence various plasma membrane (PM) functions by modulating the lipid bilayer biophysical properties, or by directly interacting with proteins as cofactors [1]. Sterols promote lipid raft formation in membranes [2]. Protein partition in and out of lipid rafts regulates their sorting and function, and promotes protein–protein interaction by increasing their local concentrations [2].

The cholesterol/phospholipid ratio has been implicated in the modulation of K^+ [3-5], Ca^{2+} [6,7] and anion channels [8]. K^+ channels are key to the modulation of electrical activity in excitable cells [9]. Recently the molecular identity of K^+ channels operating in *Drosophila* Kenyon cells (KCs) has been partially solved [10]. KCs are the intrinsic neurons of the mushroom bodies, the cellular locus of olfactory learning and memory in insects and deficient K^+ channel function has been shown to cause learning deficiencies in *Drosophila* [11]. Here, we report that acutely removing cholesterol from the PM of KCs causes a significant increase in K^+ currents. Our observations document for the first time that cholesterol content is important to the regulation of K^+ channel activity in neurons from learning and memory centers.

2.- Materials and Methods.

Fly stocks. Third-instar larvae were obtained from the mating of 7A2-Gal4 males and UAS-GFP females. The fly line 7A2-Gal4 drives expression of Gal4 specifically into KCs and has been used and reported elsewhere [10]. All employed lines were fed with standard cornmeal food composed of (in g/l): 21 yeast, 9 agar, 48.75 dextrose, 21 sucrose, 60 cornmeal.

KC-preparation. KCs were obtained as described [10]. Final neuronal dispersion obtained using a beveled pipette was plated on coverslips (Bellco, Vineland, NJ) and kept in DDM before electrophysiological examination (23-24 °C for 2-10 h). KCs were identified as ~5 μ m-diameter GFP+ cells which under these culturing conditions exclusively express voltage-dependent K^+ channels (VDKCs) [10].

Electrophysiological recordings. The recording chamber containing the coverslip with the cells was superfused with (mM): 140 NaCl, 3 KCl, 1 CaCl₂, 4 MgCl₂, 5 HEPES (pH 7.2). Whole-cell patch clamp recordings in KCs were performed as described [10]. The patch pipettes (resistance = 4-7 M Ω) were filled with (in mM): 140 KCl, 2 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 1.1 EGTA, 10 HEPES (pH 7.2). While recording the cells were kept at a holding potential of -70 mV. Methyl β -cyclodextrin (MBCD) was from Aldrich (St. Louis, MO). Bovine serum albumin (BSA) and cholesteryl 3-sulfate (C3S) were from Sigma (St. Louis, MO). MBCD and BSA were freshly dissolved at appropriate concentrations in external saline solution. C3S was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) as 50 mM stock solution and kept frozen at -70 °C. Equimolar MBCD-C3S complexes were prepared by vortexing and sonication for 3 min in external saline solution [12]. The solution was then incubated overnight in a shaking bath at 37 °C.

Data acquisition and analysis. Cells were voltage-clamped using an Axopatch 200 amplifier (Axon Instruments, Union City, CA). Signals were acquired and filtered at 25 kHz and 5 kHz, respectively. The PM was held at -100 mV for 1 s prior to any voltage protocol, except otherwise stated. Currents were acquired and analyzed with pClamp6 software (Axon Instruments). Data are presented as mean \pm s.e.m. Differences were treated as statistically significant when $p < 0.05$.

3.- Results.

In most acutely dissociated *Drosophila* Kenyon cells (KCs) outward currents are made of a rapidly inactivating current, contributed mainly by Shal channels and a slowly inactivating current plus a sustained component, putatively conducted through Shab channels [10]. The decaying phase of outward currents elicited by a 250-ms pulse to +40 mV follows a double exponential function, with a fast inactivation time constant (τ_{fast}) = 6.5 ± 0.5 ms, and a slow inactivating time constant (τ_{slow}) = 78.5 ± 11.7 ($n = 20$). The fast component makes $76 \pm 3\%$ of the current amplitude; the slow component, $19 \pm 2\%$; and the non-inactivating component, $5 \pm$

1%. As illustrated in Figure 1A, exposure to external solutions containing BSA dramatically modifies the K⁺ current profile of KCs. We calculated the charge transferred by K⁺ channels during 250 ms integrating the current elicited by a +40 mV-depolarizing pulse before (q_0) and after (q) superfusing BSA to the recording chamber and estimated the ratio q/q_0 . Figure 1B shows that superfusion of BSA solutions, but not of control solution, increases q/q_0 in a dose dependent manner. The effect of BSA can be accounted for by a small but significant increase in the peak current amplitude ($25 \pm 8\%$ at 0.1% BSA, Figure 1C), a 3.7-fold increase (± 0.3) in stationary current (Figure 1D), and a raise in the fraction of the current inactivating along the slow time constant (from $25 \pm 10\%$ to $70 \pm 6\%$, Figure 1E). Following exposure to BSA extensive superfusion with BSA-free control solution (10 and 20 recording-chamber volumes) only partially restores K⁺ currents to their control profile (Figure 1F).

Because BSA can acutely remove cholesterol and other lipids from the PM [13,14], changes in PM lipid composition could account for the effects observed in the K⁺ currents [15]. To test if lipid sequestration was responsible for the changes in whole-cell K⁺ current induced by BSA we examined the effects of cyclodextrins (CDs), compounds chemically unrelated to BSA and known to be effective in removing lipids from the PM. CDs are water-soluble cyclic oligosaccharides that enhance the solubility of nonpolar substances by incorporating them into their hydrophobic cavity [16,17]. β -CDs preferentially extract cholesterol from the PM [16] and have been extensively used to deplete PM cholesterol [8,17]. After establishing the whole-cell configuration and recording the control outward current, neurons were superfused with M β CD. Traces in Figure 2A show that M β CD modified dramatically outward current patterns in the same way as BSA. Data analysis revealed that by large the major effect of M β CD is to increase the fraction of the current inactivating along the slow time constant ($\tau_{slow} = 67.8 \pm 5.8$ ms at +40 mV, $n = 11$) from $20 \pm 3\%$ in the control to $64 \pm 7\%$ (Figure 2B). The contribution of the fast inactivating component ($\tau_{fast} = 7.5 \pm 1.0$ ms) decreased correspondingly. For simplicity, all further

analysis was performed on the basis of charge transferred by the channels during a 250ms depolarising pulse to +40mV, since it best reflects the changes both in current amplitude and inactivation kinetics. As for BSA, the charge increase induced by M β CD was only partially reversible even after extensive washing (Figure 2C). Because BSA and M β CD are hydrophilic and do not penetrate the PM [16], the most plausible explanation for our observations is that BSA and CDs rapidly remove sterols from the PM, which can only be poorly restored by the cell during the recording session.

Chronic exposure to CDs has been shown to modify the voltage-sensitivity of K v channels [5]. A 2-minute superfusion of control solution shifted half-activation ($V_{a1/2}$) and half-inactivation ($V_{i1/2}$) voltages towards more negative values ($\Delta V_{a1/2} = -7.0 \pm 1.4$ mV, $\Delta V_{i1/2} = -8.2 \pm 1.3$ mV; details in legend of Figure 2) without changing the steepness of the voltage-dependence of activation (k_a) or inactivation (k_i) (control $k_a = 17.4 \pm 1.0$ mV, superfusion $k_a = 19.1 \pm 1.2$ mV; control $k_i = 4.8 \pm 0.3$ mV, superfusion $k_i = 5.5 \pm 0.1$ mV). These changes are probably due to intracellular content dialysis during whole-cell recording [18]. In view of this, cells superfused with control or with M β CD solution were compared. Although 5 mM M β CD markedly increased the 250 ms current integral, the steepness of voltage-dependence of activation and inactivation remained unchanged (Figure 2D, E). Moreover, Figure 2E reveals that at this concentration M β CD shifts the $V_{i1/2}$ by 4 mV to the right. Though this small shift was not statistically significant, because of the steepness of the inactivation curve, at $V_{i1/2}$ it would actually increase by ~22% the number of responsive channels. This change could account in part for the increase in peak current amplitude observed in presence of M β CD.

M β CD-cholesterol complexes can serve as cholesterol donors to the cell PM [12] and can revert the effect of empty CDs on anionic and inwardly rectifying K $^+$ currents [4,8]. Preincubating M β CD with equimolar concentration of the cholesterol analog C3S significantly prevents its effect (Figure 3). In contrast, superfusion with 50 μ M M β CD + 0.05% DMSO (d) leads to an increase in charge similar to that induced by M β CD (b) and significantly larger than

superfusion with either control solution (a) or equimolar complexes (c). Thus, preincubation of M β CD with the cholesterol analog significantly diminishes its capacity to modify currents, but does not decrease them.

Sterol-removing compounds more strongly affect the sustained current than the peak current and increase the fraction of current inactivating along τ_{slow} . Thus, we hypothesized that sterol-removal from the PM preferentially modulates slowly inactivating channels. We challenged this last notion by pharmacologically dissecting both currents. Figure 4A shows that quinidine blocks the slowly inactivating current (I_K), including the sustained component, revealing a fast inactivating current (I_A). In contrast, 4-aminopyridine (4-AP) blocks I_A , uncovering I_K . A mixture of both blockers completely removes the whole-cell current indicating that only these two components suffice to explain the K^+ current composition. We isolated each pharmacological component of the whole-cell K^+ current and superfused the recording chamber with 5 mM M β CD. As anticipated, the modulation by sterol removal was stronger on I_K than on I_A (Figure 4B). The charge transfer increase of I_K (2.9 ± 0.3) almost equals by itself the total current charge transfer increase (3.5 ± 0.3), whereas the I_A increase (1.7 ± 0.1) is significantly lesser.

4.- Discussion

Our data show that K^+ currents in the KCs of *Drosophila* are strongly and rapidly modulated by compounds that remove sterols from the plasma membrane. Both, BSA and M β CD increase the charge transferred by K^+ channels in a partially irreversible manner. Charge-transfer increase is mediated by a robust up-regulation of the slow inactivating current, possibly encoded by Shab, and a lesser modulation of the rapidly inactivating current, mostly encoded by Shal.

VDKCs are important determinants of cellular excitability and key components of multiple signal transduction pathways [9]. It is not surprising that ion channels, designed to

overcome the impermeability of the PM, might be functionally dependent on its constituent lipids. Although we ignore the identity of the lipids that regulate the VDKCs of KCs, sterols seem the best candidates because M β CD removes cholesterol with specificity over phospholipids [16]. However, it remains unclear whether the sterol-dependent K⁺ channel modulation is due to direct protein-lipid interaction or indirect signaling mechanisms.

In *Drosophila*, ergosterol is the most abundant sterol [19], which can be acquired from a yeast-supplemented diet. Taken together sterols represent 18% mol relative to phospholipids [19]. Because ergosterol is even more efficient than cholesterol at ordering acyl chains [20], these levels should suffice to induce lipid raft formation in a liquid ordered phase. Ion channel-raft association could serve primarily to cluster them with signaling molecules.

In several mammalian cell lines two kinetic pools for CD-mediated cholesterol efflux have been observed. A fast one with a cholesterol-release half-time (20-50% of total cholesterol) of 20 s and a slow one with half-time between 18 and 35 min [17]. Specific protein structures, such as caveola, are apparently not required since the same two pools exist in artificial membranes [17]. Because we observed stable BSA and M β CD effects within 2 min of superfusion, we hypothesize that the reported K⁺ current modulation in *Drosophila* KCs is dependent on the fast sterol pool.

The cell's cholesterol requirements extend beyond lipid raft formation. Acute cholesterol depletion disrupts the snare clusters required for exocytosis, blocks endocytic vesicle formation and delocalizes phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate (PIP₂) [21]. PIP₂ is a major regulator of the actin cytoskeleton [22], which modulates K⁺ channel activity [23,24]. Additionally, PIP₂ is a key determinant of the N-type inactivation rate of VDKCs by direct interaction with the inactivating ball-domain [15]. Experiments to elucidate the mechanism by which sterol removal modulates VDKCs in the *Drosophila* KCs need to be performed.

The importance of sterols in fly membranes has been questioned since fly tissue culture can be maintained in sterol depleted media [25] and adult flies survive when fed a sterol-free diet.

Though sterol depletion efficiency in adults is unknown, when *Drosophila* females are fed with ergosterol-deficient yeast, they produce embryos that fail to develop [19]. In *Drosophila* embryonic membranes, sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins associate with detergent resistant membranes [19]. This indicates that sterols are important for embryonic development, probably dictating the partitioning of signaling proteins to different lipid domains in the PM.

The ligand-binding affinity of *Drosophila* metabotropic glutamate receptors is modulated by their association with lipid rafts [26]. Our report further supports the influence of sterol-enriched lipid domains on *Drosophila* neuronal physiology. The findings presented here encourage the use of *Drosophila melanogaster* as a genetic model organism, amenable to molecular manipulation, for the study of lipid raft function.

5.- Acknowledgements

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico to A.D. and Howard Hughes Medical Institute to P.L. G.G. is a CONACYT and Dirección General de Estudios de Posgrado doctoral fellow.

6.- References

- [1] Burger, K., Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (2000). Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell Mol Life Sci.* 57, 1577-92.
- [2] Brown, D.A., and London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem.* 275, 17221-4.
- [3] Bolotina, V., Omelyanenko, V., Heyes, B., Ryan, U., and Bregestovski, P. (1989). Variations of membrane cholesterol alter the kinetics of Ca²⁺(+)-dependent K⁺ channels and membrane fluidity in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 415, 262-8.

- [4] Romanenko, V.G., Rothblat, G.H., and Levitan, I. (2002). Modulation of endothelial inward-rectifier K⁺ current by optical isomers of cholesterol. *Biophys J.* 83, 3211-22.
- [5] Martens, J.R., O'Connell, K., and Tamkun, M. (2004). Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of KV channels to lipid rafts. *Trends Pharmacol Sci.* 25, 16-21.
- [6] Jennings, L.J., Xu, Q.W., Firth, T.A., Nelson, M.T., and Mawe, G.M. (1999). Cholesterol inhibits spontaneous action potentials and calcium currents in guinea pig gallbladder smooth muscle. *Am J Physiol.* 277, G1017-26.
- [7] Lundbaek, J.A., Birn, P., Girshman, J., Hansen, A.J., and Andersen, O.S. (1996). Membrane stiffness and channel function. *Biochemistry.* 35, 3825-30.
- [8] Levitan, I., Christian, A.E., Tulenko, T.N., and Rothblat, G.H. (2000). Membrane cholesterol content modulates activation of volume-regulated anion current in bovine endothelial cells. *J Gen Physiol.* 115, 405-16.
- [9] Hille, B. (2001) *Ion channels of excitable membranes*, Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.
- [10] Gasque, G., Labarca, P., Reynaud, E., and Darszon, A. (2005). Shal and shaker differential contribution to the k⁺ currents in the *Drosophila* mushroom body neurons. *J Neurosci.* 25, 2348-58.
- [11] Cowan, T.M., and Siegel, R.W. (1986). *Drosophila* mutations that alter ionic conduction disrupt acquisition and retention of a conditioned odor avoidance response. *J Neurogenet.* 3, 187-201.
- [12] Christian, A.E., Haynes, M.P., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (1997). Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res.* 38, 2264-72.
- [13] Visconti, P.E., Ning, X., Fomes, M.W., Alvarez, J.G., Stein, P., Connors, S.A., and Kopf, G.S. (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm:

- cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol.* 214, 429-43.
- [14] Smani, T., Zakharov, S.I., Csutora, P., Leno, E., Trepakova, E.S., and Bolotina, V.M. (2004). A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol.* 6, 113-20.
- [15] Oliver, D., Lien, C.C., Soom, M., Baukrowitz, T., Jonas, P., and Fakler, B. (2004). Functional conversion between A-type and delayed rectifier K⁺ channels by membrane lipids. *Science.* 304, 265-70.
- [16] Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K., and Pitha, J. (1989). Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem.* 186, 17-22.
- [17] Yancey, P.G., Rodriguez, W.V., Kilsdonk, E.P., Stoudt, G.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (1996). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux. *J Biol Chem.* 271, 16026-34.
- [18] Hardie, R.C. (1991). Voltage-sensitive potassium channels in Drosophila photoreceptors. *J Neurosci.* 11, 3079-95.
- [19] Rietveld, A., Neutz, S., Simons, K., and Eaton, S. (1999). Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with Drosophila raft lipid microdomains. *J Biol Chem.* 274, 12049-54.
- [20] Urbina, J.A., Pekerar, S., Le, H.B., Patterson, J., Montez, B., and Oldfield, E. (1995). Molecular order and dynamics of phosphatidylcholine bilayer membranes in the presence of cholesterol, ergosterol and lanosterol: a comparative study using ²H-, ¹³C- and ³¹P-NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 1238, 163-76.
- [21] Edidin, M. (2003). The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 32, 257-83.

- [22] Caroni, P. (2001). New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *Embo J.* 20, 4332-6.
- [23] Maguire, G., Connaughton, V., Prat, A.G., Jackson, G.R., Jr., and Cantiello, H.F. (1998). Actin cytoskeleton regulates ion channel activity in retinal neurons. *Neuroreport.* 9, 665-70.
- [24] Jing, J., Peretz, T., Singer-Lahat, D., Chikvashvili, D., Thornhill, W.B., and Lotan, I. (1997). Inactivation of a voltage-dependent K⁺ channel by beta subunit. Modulation by a phosphorylation-dependent interaction between the distal C terminus of alpha subunit and cytoskeleton. *J Biol Chem.* 272, 14021-4.
- [25] Silberkang, M., Havel, C.M., Friend, D.S., McCarthy, B.J., and Watson, J.A. (1983). Isoprene synthesis in isolated embryonic Drosophila cells. I. Sterol-deficient eukaryotic cells. *J Biol Chem.* 258, 8503-11.
- [26] Eroglu, C., Brugger, B., Wieland, F., and Sinning, I. (2003). Glutamate-binding affinity of Drosophila metabotropic glutamate receptor is modulated by association with lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 10219-24.

7.- Figure legends

Figure 1. BSA increases the charge transferred by VDKCs. A, Superimposed control and saline or BSA-exposed (arrows) K⁺ currents elicited by a +40 mV pulse. Each current pair was recorded from a different KC. Color code applies to all panels. B, Average charge transfer ratios (q / q_0 ; q after, q_0 before superfusion). Parentheses indicate number of cells. One-way ANOVA followed by Scheffé's algorithm for multiple comparisons was applied in B, C and D; * $p < 0.01$ vs. the saline superfusion. C, Average peak current ratios (I_{peak}/I_0 ; I_{peak} after, I_0 before superfusion). Analysis of cells in B. * $p < 0.01$ vs. the saline superfusion. D, Average sustained current ratios (I_{250ms}/I_0 ; I_{250ms} after, I_0 before superfusion). Analysis performed on cells in B and C; * $p < 0.01$ vs. the saline superfusion. E, Left traces are currents elicited by a +40 mV pulse

recorded in a single KC in the absence (top) or presence (bottom) of 0.1% BSA. The best fit to a double exponential function $I = A_{slow} \exp(-t/\tau_{slow}) + A_{fast} \exp(-t/\tau_{fast}) + C$ is shown superimposed to the current traces. The fraction of the current inactivating along the slow time constant is shown to the right; * $p < 0.01$ paired Student's t -test. F, Left traces are superimposed currents elicited by a +40-mV pulse recorded in a single KC in the absence (initial), presence (0.1% BSA) and after washing (10 vol. wash, 20 vol. wash) BSA. Right bars show average charge transfer (q), normalized by the charge recorded during BSA exposure (q_{BSA}) from 3 different KCs. * $p < 0.05$ vs. initial current, paired Student's t -test. In all panels, scale bars are 100 pA and 100ms.

Figure 2. M β CD increases the charge transferred by VDKCs. A, Left, superimposed currents recorded before and after (arrow) superfusing (a) 5 μ M or (b) 5 mM M β CD in different KCs. Center graph shows average peak current ratios (I_{peak}/I_0 ; I_{peak} in presence, I_0 in absence of increasing M β CD concentrations). Parentheses indicate number of cells. Right graph shows average sustained current ratios (I_{250ms}/I_0 ; I_{250ms} in presence, I_0 in absence of increasing M β CD concentrations). Analysis performed on the cells used above. B, Left, currents elicited by a +40 mV pulse recorded in a single KC in the absence (top) or presence (bottom) of 5 mM M β CD. Analysis of inactivation kinetics was performed as in Figure 1E. The fraction of the current inactivating along the slow time constant is shown to the right. * $p < 0.01$ vs. the saline superfusion, paired Student's t -test. C, Left, superimposed currents elicited by a +40 mV pulse in a single KC recorded in absence (initial), presence (5 mM M β CD), and after washing (10 vol. wash, 20 vol. wash, 40 vol. wash) M β CD. Right graph shows average data, normalized by the charge recorded during M β CD exposure ($q_{M\beta CD}$), obtained from 4 different KCs. * $p < 0.01$ v.s. initial current, paired Student's t -test. D, Current-voltage relationships obtained measuring peak currents elicited by increasing depolarizing pulses indicated in the graph's x -axis. Experiments performed before (top traces) and after (bottom traces) superfusing control saline solution (left

traces) or 5 mM M β CD (right traces). Graph data points correspond to the bottom traces. Experimental data for D and E were fitted to single Boltzmann distribution $I = I_{\max} / (1 + \exp((V_{1/2} - V)/k)) + C$. E, Steady-state inactivation obtained measuring peak currents elicited by a +40 mV pulse after the conditioning prepulses (V_{pre}) indicated in the graph's x-axis. Experiments performed before (top traces) and after (bottom traces) superfusing control saline solution (left traces) or 5 mM M β CD (right traces). Graph data points correspond to the bottom traces. In all panels scale bars are 100 pA and 100 ms.

Figure 3. Pre-incubation of M β CD with cholesterol analog C3S inhibits its capacity to modulate the VDKCs. Top traces show superimposed currents before and after (arrow) superfusion of (a) control saline solution or (b) M β CD alone or preincubated with: (c) an equimolar C3S concentration or (d) DMSO 0.05%. Each current pair corresponds to a different KC. Letters on the traces are related to the bars in the bottom graph. Parentheses indicate the number of cells. * $p < 0.05$, Student's t -test. Scale bars are 100 pA and 100 ms.

Figure 4. Modulation of M β CD is more robust on the slowly inactivating current. A. Currents in each row were recorded from the same KC, before (left column) or after (right column) superfusion of (a) 100 μ M quinidine, (b) 5 mM 4-AP or (c) a mixture of both. Each treatment was tested in different cells. B, Bottom bars are average charge transfer ratios (q / q_0 ; q in presence, q_0 in absence of 5 mM M β CD). Experiments were performed in absence of blockers (*total I*) or in presence of quinidine (I_A) or 4-AP (I_K). Representative traces for each experiment are shown above their corresponding bar. Each superimposed pair was recorded from a different KC. Currents were recorded before and after (arrow) 5 mM M β CD superfusion. * $p < 0.01$, Student's t -test. In all panels, scale bars are 100 pA and 100 ms.

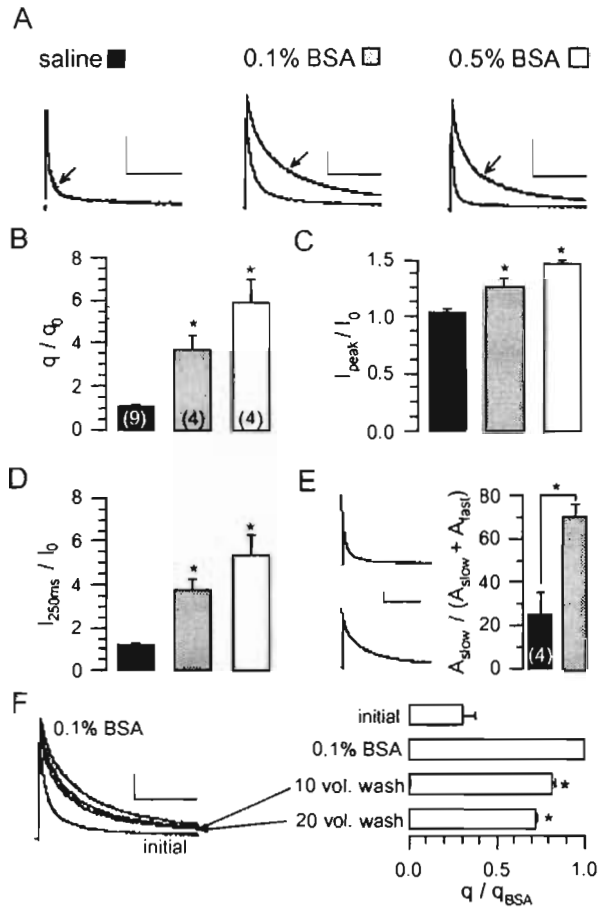


Figure 1

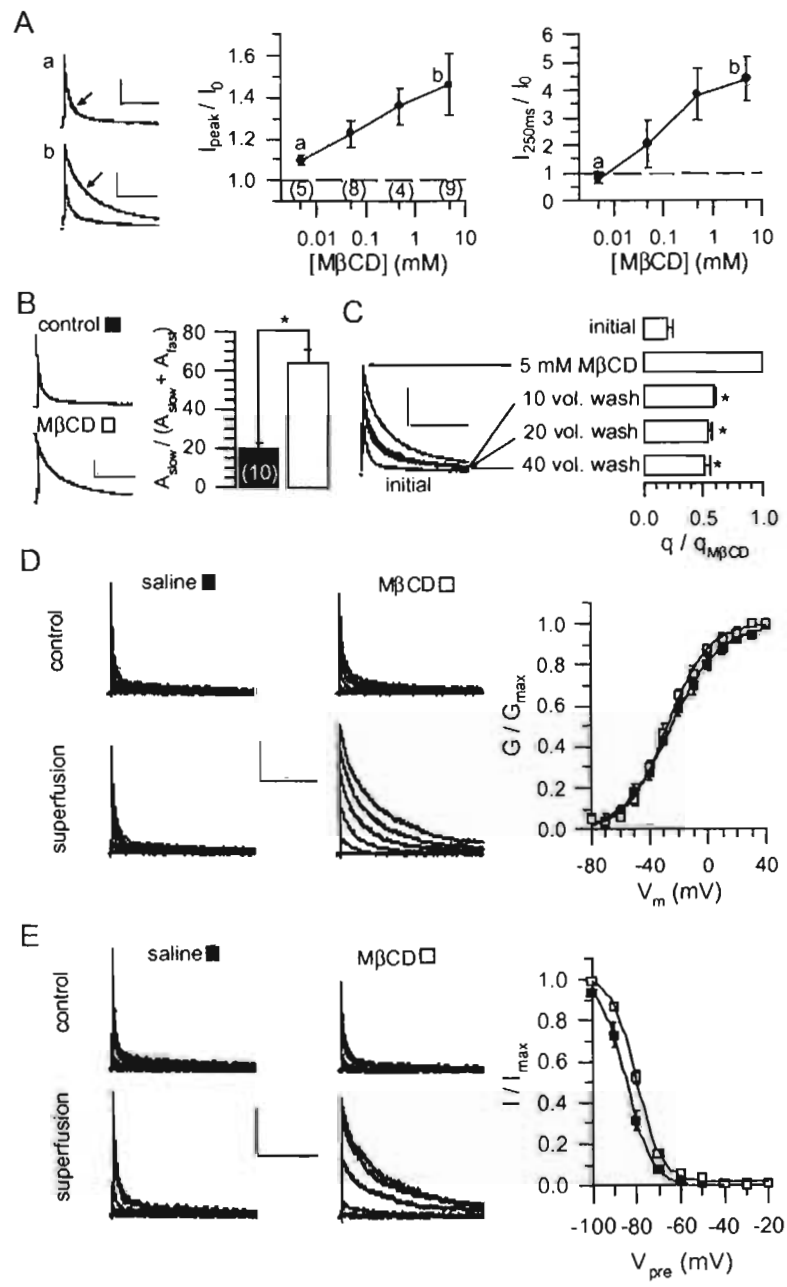


Figure 2

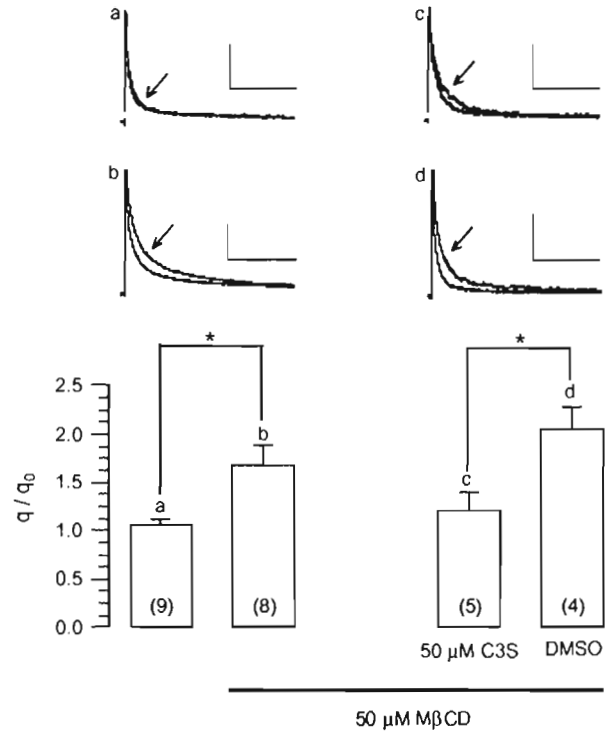


Figure 3

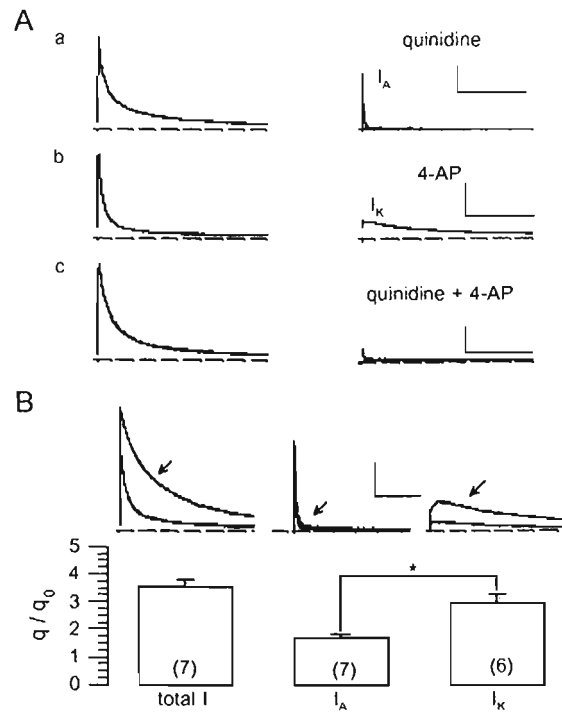


Figure 4