



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Participación del Sitio de Unión a Calcio en la
Selectividad Aniónica del Canal de Cloruro
Activado por Calcio TMEM16A**

Tesis que presenta

Odalys Grisell Posadas García

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la tesis:

Dr. Jorge Arreola Gómez

Dr. Braulio Gutiérrez Medina

San Luis Potosí, S.L.P., octubre de 2020



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "Participación del Sitio de Unión a Calcio en la Selectividad Aniónica del Canal de Cloruro Activado por Calcio TMEM16A" presentada para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Odalys Grisell Posadas García y aprobada el 07 del 11 de 2020 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Jorge Arreola Gómez
Codirector

Dr. Braulio Gutiérrez Medina
Codirector

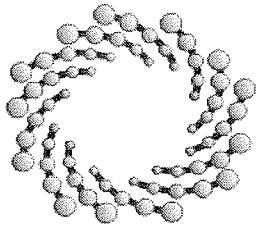
Dr. Alejandro De las Peñas Nava
Asesor



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biofísica del Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y en la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. La tesis fue Co-dirigida por los Drs. Jorge Arreola Gómez (UASLP) y Braulio Gutiérrez Medina (IPICYT).

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 933084) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 210 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 4 días del mes de diciembre del año 2020, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|--|------------------------|---------------|
| Dr. Alejandro De Las Peñas Nava | Presidente | IPICYT |
| Dr. Braulio Gutiérrez Medina | Secretario | IPICYT |
| Dr. Jorge Arreola Gómez | Sinodal externo | UASLP |

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Odalys Grisell Posadas García

sobre la Tesis intitulada:

Participación del Sitio de Unión a Calcio en la Selectividad Aniónica del Canal de Cloruro Activado por Calcio TMEM16A

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Braulio Gutiérrez Medina
Dr. Jorge Arreola Gómez (UASLP)


El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 19:10 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes de diciembre de 2020.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A Goodall.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Al Dr. Jorge Arreola Gómez y al Dr. Braulio Gutiérrez Medina por la dirección y apoyo en este trabajo. Al Dr. Alejandro De las Peñas Nava por las aportaciones en la tesis.

A los mis compañeros de laboratorio por el poyo, Dr. Alfredo Sánchez Solano, Dra. Guadalupe Segura Covarrubias, Dr. José Juan de Jesús Pérez, Lic. Carmen Yudith Hernández Carballo, Lic. Dabid Esparza Jasso, Lic. Andrea Alejandra Rodríguez Miramontes, Dra. Gloria Patricia Pérez Cornejo, Dra. Nancy Corral Fernández, Dr. Víctor De la Rosa Jiménez y Dra. Luisa Guzmán Hernández.

Contenido

| | |
|--|-----------|
| Constancia de aprobación de la tesis | 1 |
| Créditos institucionales..... | 2 |
| Acta del examen | 3 |
| Dedicatorias..... | 4 |
| Agradecimientos | 5 |
| Lista de tablas | 8 |
| Lista de figuras..... | 9 |
| Lista de acrónimos..... | 10 |
| Resumen | 11 |
| Abstract..... | 13 |
| Introducción..... | 15 |
| El canal de cloruro activado por calcio intracelular TMEM16A | 17 |
| Clonación y estudio de TMEM16A | 17 |
| Funciones fisiológicas..... | 20 |
| Mecanismo de activación..... | 22 |
| Estructura de TMEM16A..... | 24 |
| Selectividad iónica..... | 27 |
| Antecedentes inmediatos..... | 30 |
| Planteamiento del problema | 33 |
| Expresión estable de TMEM16A..... | 35 |
| Expresión transitoria de las mutantes TMEM16A E702Q, TMEM16A E705Q y TMEM16A E702Q/E705Q | 35 |
| Preparación de las células..... | 36 |
| Fijación del voltaje mediante Patch-clamp | 38 |
| Soluciones intracelulares | 39 |
| Soluciones extracelulares | 40 |
| Registros electrofisiológicos..... | 40 |
| Análisis | 41 |
| Estadística | 41 |
| Resultados | 43 |
| Las células Hek 293 no expresan un canal de cloruro activado por calcio de manera endógena | 43 |
| Alterar la estructura química del sitio de unión a calcio mediante mutagénesis altera la selectividad aniónica del canal TMEM16A..... | 45 |
| Potenciales de inversión de la corriente del canal silvestre TMEM16A | 46 |
| Potenciales de inversión de la corriente del canal mutante TMEM16A E702Q..... | 48 |
| Potenciales de inversión de la corriente del canal mutante TMEM16A E705Q..... | 50 |
| Potenciales de inversión de la corriente del canal mutante TMEM16A E702Q/E705Q | 52 |
| Cocientes de permeabilidad..... | 54 |
| Selectividad aniónica | 57 |
| El cociente de permeabilidad no depende del radio aniónico pero si de la energía de hidratación | 58 |
| Discusión | 64 |

| | |
|---|-----------|
| <i>Selectividad iónica de TMEM16A</i> | 64 |
| <i>El sitio de unión a calcio del canal TMEM16A participa en la selectividad aniónica..</i> | 65 |
| <i>Radio iónico o deshidratación</i> | 65 |
| Limitaciones | 69 |
| Conclusión | 70 |
| Perspectivas | 70 |
| Referencias | 71 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Funciones celulares de TMEM16A..... | 21 |
| Tabla 2. Cocientes de permeabilidad de TMEM16A calculados por el cambio del potencial de inversión para diferentes aniones..... | 28 |
| Tabla 3. Cocientes de permeabilidad P_X/P_{Cl} para los canales TMEM16A silvestre, E702Q, E705Q y E702Q/E705Q..... | 55 |
| Tabla 4. Secuencia de permeabilidad aniónica de los canales TMEM16A silvestre y E702Q y E705Q..... | 58 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Fig. 1. Activación de TMEM16A por Ca^{2+} y voltaje..... | 16 |
| Fig. 2. Locus CCND1-EMS1 en el cromosoma humano 11q13..... | 17 |
| Fig. 3. Mapa topológico de TMEM16A..... | 18 |
| Fig. 4. Árbol filogenético de la familia TMEM16..... | 19 |
| Fig. 5. Estructura de TMEM16A..... | 25 |
| Fig. 6. Estructura del poro de TMEM16A y el sitio de unión a Ca^{2+} | 26 |
| Fig. 7. Sensibilidad a Ca^{2+} de las mutantes E702Q, E705Q y E702Q/E705Q..... | 30 |
| Fig. 8. Configuración de Patch-clamp..... | 37 |
| Fig. 9. Técnica de Patch-clamp en conformación de célula completa..... | 39 |
| Fig. 10. Relación entre la corriente y el voltaje obtenidos de células Hek 293 que expresan y células que no expresan TMEM16A..... | 44 |
| Fig. 11. Selectividad aniónica del canal TMEM16A silvestre..... | 47 |
| Fig. 12. Selectividad aniónica en el canal TMEM16A con la mutación E702Q..... | 49 |
| Fig. 13. Selectividad aniónica en el canal TMEM16A con la mutación E705Q..... | 51 |
| Fig. 14. TMEM16A con los residuos E702 y E705 mutados pierde selectividad al tiocianato..... | 53 |
| Fig. 15. Incremento de la corriente en presencia de tiocianato..... | 54 |
| Fig. 16. Cocientes de permeabilidad $P_{\text{X}^-}/P_{\text{Cl}^-}$ de TMEM16A y las mutantes E702Q Y E705Q..... | 57 |
| Fig. 17. Relación entre la selectividad iónica y el radio aniónico..... | 59 |
| Fig. 18. Relación entre la selectividad iónica de TMEM16A y mutantes y la energía de hidratación de los aniones permeantes..... | 60 |
| Fig. 19. Ajuste lineal de la relación entre la selectividad iónica de TMEM16A y mutantes y la energía de hidratación..... | 61 |
| Fig. 20. Representación esquemática del poro de TMEM16A y el tamaño de los aniones permeantes..... | 68 |

Lista de acrónimos

Cl^- : cloruro

Ca^{2+} : calcio

Br^- : bromuro

I^- : ioduro

NO_3^- : nitrato

SCN^- : tiocianato

E_r : potencial de inversión

Resumen

Participación del Sitio de Unión a Calcio en la Selectividad Aniónica del Canal de Cloruro Activado por Calcio TMEM16A

TMEM16A es una proteína canal de cloruro (Cl^-) activado por incrementos en el calcio (Ca^{2+}) intracelular que se encuentra en las membranas biológicas. La salida del ion Cl^- a través de TMEM16A regula la secreción de fluidos epiteliales, contracción del músculo liso y sensibilidad al dolor por calor, entre otros procesos biológicos. El canal es un homodímero. Cada monómero tiene un poro para el paso de los iones. El canal cuenta con un sitio de unión a Ca^{2+} adyacente al poro. El sitio de unión está formado por las cadenas laterales de E654, E702, E705, E734 y D738. En cada sitio de unión se unen dos iones Ca^{2+} .

A pesar de que una de las propiedades fundamentales de los canales iónicos es su capacidad para seleccionar al ion que atraviesa por el poro, TMEM16A presenta una selectividad iónica baja. Estudios variados han identificado la siguiente secuencia de selectividad: tiocianato (SCN^-) > nitrato (NO_3^-) > yoduro (I^-) > bromuro (Br^-) > Cl^- > fluoruro. Sin embargo, se desconocen los elementos de la proteína involucrados en la selección del ion Cl^- . El objetivo de mi trabajo de tesis es determinar si la naturaleza química del sitio de unión a Ca^{2+} participa en el proceso de selectividad aniónica en el canal TMEM16A. Usualmente, la selectividad iónica se establece usando la permeabilidad del ion en el poro. El ordenamiento de mayor a menor de la permeabilidad define la secuencia de selectividad. Para determinar si el sitio de unión a Ca^{2+} participa en la selección del anión permeante, registré la corriente eléctrica que fluye a través del canal TMEM16A silvestre y de los canales con el sitio de unión a Ca^{2+} mutado (mutantes E702Q, E705Q y E702Q/E705Q) usando la técnica de fijación del voltaje mediante *Patch-clamp* en configuración de célula completa. Realicé los experimentos con diferentes soluciones extracelulares conteniendo uno de los siguientes aniones principales: SCN^- , NO_3^- , I^- , Br^- , Cl^- o Glutamato. A partir de las medidas del potencial de inversión determiné la

permeabilidad para estos aniones relativa a la permeabilidad del ion Cl^- . Mis datos muestran que la selectividad aniónica del canal TMEM16A silvestre es $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{Glutamato}$, mientras que la selectividad de las mutantes E702Q y E705Q es $\text{I}^- = \text{SCN}^- > \text{NO}_3^- = \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{Glutamato}$ y $\text{I}^- = \text{NO}_3^- = \text{Br}^- = \text{SCN}^- > \text{Cl}^- > \text{Glutamato}$, respectivamente.

Estos resultados muestran que la secuencia de selectividad de las mutantes E702Q y E705Q es diferente a la del canal silvestre, por lo que se concluye que los residuos que forman el sitio de unión a Ca^{2+} participan en la selectividad aniónica de TMEM16A.

Palabras clave: TMEM16A, permeabilidad, canal iónico.

Abstract

Role of the Calcium Binding Site on the Anionic Selectivity of Calcium-Activated Chloride Channel TMEM16A

The calcium-activated chloride (Cl⁻) channel TMEM16A has been associated with epithelial fluid secretion, smooth muscle contraction, and heat pain sensibility. TMEM16A is a homodimer with two pores, one in each monomer. Each pore function serves as permeation pathway for ions. TMEM16A has two identical Ca²⁺ binding sites, one in each monomer, located adjacent to the permeation pathway and near the intracellular side. The Ca²⁺ binding site is formed by the side chains of E654, E702, E705, E734, and D738. Two Ca²⁺ ions are bound to each site in a voltage-dependent manner.

A fundamental property of ionic channels is their ability to select among different ions, a property named ionic selectivity. Typically, ionic selectivity is reported relative to the physiological permeant ion. Hence, relative to chloride, TMEM16A has low ionic selectivity for other anions. Various studies agree about the selectivity sequence of TMEM16A: thiocyanate (SCN⁻) > nitrate (NO₃⁻) > iodide (I⁻) > bromide (Br⁻) > Cl⁻ > fluoride. However, it is unknown the element or domains involved in anion selection.

The aim of my thesis is to determine whether the chemical nature of the Ca²⁺ binding site plays a role in anion selectivity by the TMEM16A channel. Experimentally, the ionic selectivity is quantitated by the permeability ratio (Permeability of anion X⁻ / Permeability of Cl⁻) at the pore calculated using the reversal potentials and the Goldman-Hodgkin-Katz equation. The arrangement of permeability ratios from high to low values defines the selectivity sequence. To determine if the Ca²⁺ binding site participates in the ionic selectivity I registered the current flowing through the wild type TMEM16A channel and through channels with the Ca²⁺ binding site muted (E702Q, E705Q, and E702Q / E705Q mutants). I used the “patch-clamp” technique in whole-cell configuration to record the macroscopic currents. I recorded the channel activity exposed to different extracellular solutions

containing different anions SCN^- or NO_3^- , or I^- , or Br^- , or Cl^- , or Glutamate. First, I recorded the current in the presence of Cl^- in the bath and then replaced 100% of Cl^- with a given test anion X^- and recorded again the currents from the same cell. With the resulting currents, I constructed current versus voltage curves to determine the reversal potential in the presence of Cl^- and in the presence of anion X^- . Then, I calculated the reversal potential shifts to determine the permeability ratios used to determine anion selective sequence. My results show: the anionic selectivity of WT TMEM16A channel is $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{Glutamate}$ while the sequence for E702Q is $\text{I}^- = \text{SCN}^- > \text{NO}_3^- = \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{Glutamate}$, and for E705Q is $\text{I}^- = \text{NO}_3^- = \text{Br}^- = \text{SCN}^- > \text{Cl}^- > \text{Glutamate}$. The double mutant E702Q/E705Q displayed no SCN^- selectivity. To determine whether the anion radius or the hydration energy were involved in anion selection, I plotted the permeability ratios against anion radius or hydration energy. The analysis indicated that size of the anion was less critical for anion selection. In contrast, altering the Ca^{2+} binding site seems to alter the way the permeation pathway “dehydrates” the permeant anion.

In conclusion, the permeability sequences obtained for the E702Q and E705Q mutants are different from that of wild type TMEM16A, therefore the residues of Ca^{2+} binding site participate in TMEM16A anionic selectivity.

Keywords: TMEM16A, permeability, ionic channel.

Introducción

Los canales de cloruro (Cl^-) activados por calcio (Ca^{2+}) intracelular se describieron por primera vez en ovocitos de *Xenopus laevis* (Miledi et al., 1982). En estas células los canales se activan durante la fertilización al aumentar la concentración de Ca^{2+} , esto causa la despolarización de la membrana para así prevenir la poliespermia (Kuruma & Hartzell, 1999). Los canales de Cl^- activados por Ca^{2+} también se han descrito en foto receptores de salamandra (Bader et al., 1982), células acinares de la glándula parótida de rata (Arreola et al., 1996; Pérez-Cornejo et al., 2004), neuronas sensoriales olfativas de ratón (Saghdudu et al., 2010), neuronas de ganglios de la raíz dorsal (Cho et al., 2012) y miocitos cardiacos (Zygmunt., 1994).

La magnitud de las corrientes eléctricas que se generan cuando el ion Cl^- fluye a través del canal activado por Ca^{2+} dependen de la concentración del Ca^{2+} intracelular y de voltajes positivos o despolarizaciones. Se ha observado que a concentraciones $<1 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} intracelular la corriente en función del voltaje es una curva asimétrica, es decir rectificante, que toma cierto tiempo en ser establecida (Fig. 1). En contraste, en condiciones de alta concentración de Ca^{2+} , ($>1 \mu\text{M}$ de Ca^{2+}) la corriente de TMEM16A se establece más rápido (Arreola et al., 1996; Xiao et al., 2011). Por otra parte, a concentraciones $<1 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} , la activación se favorece por despolarizaciones y la desactivación por hiperpolarización. En condiciones de altas concentraciones de Ca^{2+} disminuye la dependencia de la activación al voltaje, hasta el punto en que el canal permanece abierto a todos los voltajes de membrana (Xiao et al., 2011).

Una de las propiedades fundamentales de los canales iónicos es su capacidad para discriminar entre los distintos iones que pueden pasar a través de la vía de permeación. A esta propiedad se le conoce como selectividad iónica. La habilidad que tiene el poro para llevar a cabo la selección iónica depende de la naturaleza química de las cadenas laterales de los aminoácidos que componen el poro. Además, propiedades fisicoquímicas de los iones tales como el tamaño de los

iones, la densidad de carga, y la energía de hidratación también juegan un papel importante en determinar la selectividad iónica.

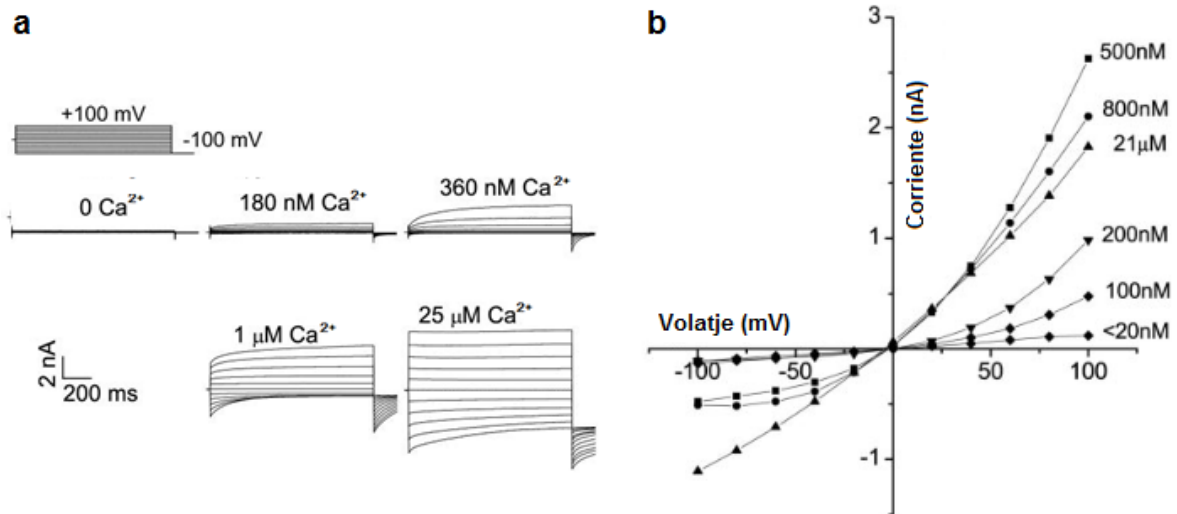


Fig. 1. Activación del canal TMEM16A por calcio y voltaje

- Corrientes de Cl⁻ a través del canal TMEM16A transfectado en células Hek 293. Se muestra el protocolo de voltaje al que se sometieron a las células, así como la concentración de Ca²⁺ intracelular para cada caso (Xiao et al., 2011).
- Relación entre las corrientes de Cl⁻ activadas por diferentes [Ca²⁺] y el voltaje en células IMCD-K2 de riñón de ratón. Los registros se realizaron con rampas de voltaje de -100 mV a +100 mV (Qu et al., 2003).

En este trabajo estudié la participación del sitio de unión a Ca²⁺ en la selectividad iónica del canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺, cambiando de manera conservada dos aminoácidos esenciales del sitio. Después, desarrollé un modelo en el que incorporo el papel del radio iónico y la energía de hidratación para entender el proceso de selectividad iónica de un canal de Cl⁻ en términos fisicoquímicos.

El canal de cloruro activado por calcio intracelular TMEM16A

Clonación y estudio de TMEM16A

TMEM16A (proteína transmembranal 16) fue renombrada ANOCTAMINA 1, este nombre proviene de que se predijo como un canal aniónico de 8 dominios transmembranales (Yang et al., 2008). Posteriores estudios mostraron que son 10 dominios transmembranales (Yu et al., 2012; Paulino et al., 2017b), además no está totalmente probado que toda la familia corresponde a la descripción de canales aniónicos (Suzuki et al., 2010; Suzuki et al., 2013; Gyobu et al., 2016). Por estas razones se prefiere llamarle TMEM16A.

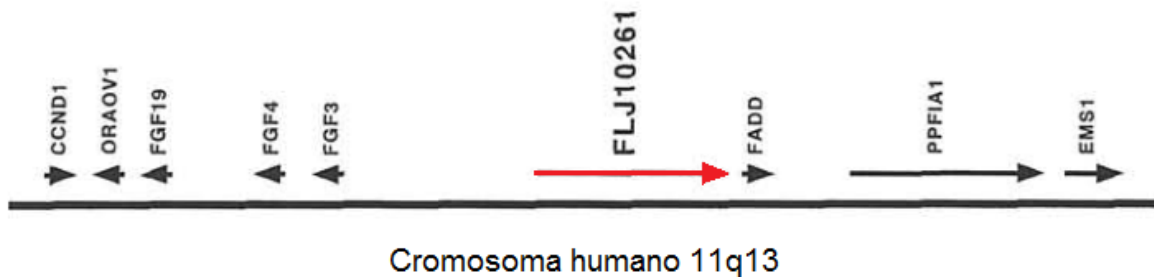


Fig. 2. Locus CCND1-EMS1 en el cromosoma humano 11q13

Mapa físico del locus CCND1-EMS1 en el cromosoma humano 11q13 donde se localiza TMEM16A (identificado como FLJ10261 en rojo). La barra horizontal esquematiza una región del cromosoma humano 11q13, el lado izquierdo está en dirección centromérica y el lado derecho en dirección telomérica. Los genes entre el locus CCND1-EMS1 están representados como flechas (Katoh & Katoh, 2003).

El gen ANO1 fue identificado como FLJ10261 en el locus CCND1-EMS1 en el cromosoma 11q13 de humano (Fig. 2) (Katoh & Katoh, 2003). ANO1 (abcd) codifica para una proteína de 1002 aminoácidos (Ferrera et al., 2010) denominada ANOCTAMINA 1, o TMEM16A. Sin embargo, este gen en el humano tiene 4 segmentos de corte y empalme (splicing) alternativo: **a**, **b**, **c** y **d**. El segmento **a** es

de 116 aminoácidos, el **b** es de 22 aminoácidos, el segmento **c** es de 4 aminoácidos y el **d** es de 26 (Caputo et al., 2008; Ferrera et al., 2009; O'Driscoll et al., 2011). Los segmentos **a** y **b** se localizan en la región amino terminal de la proteína, mientras que los segmentos **c** y **d** en la primera asa intracelular (Fig. 3) (Ferrera et al., 2009; Xiao et al., 2011). Estos segmentos de empalme alternativo dan origen a diferentes isoformas por el uso de promotores diferentes o la combinación por corte y empalme (Caputo et al., 2008; Ferrera et al., 2009; O'Driscoll et al., 2011). Las isoformas o variantes producen un canal funcional con propiedades distintas (Ferrera et al., 2009; Xiao et al., 2011).

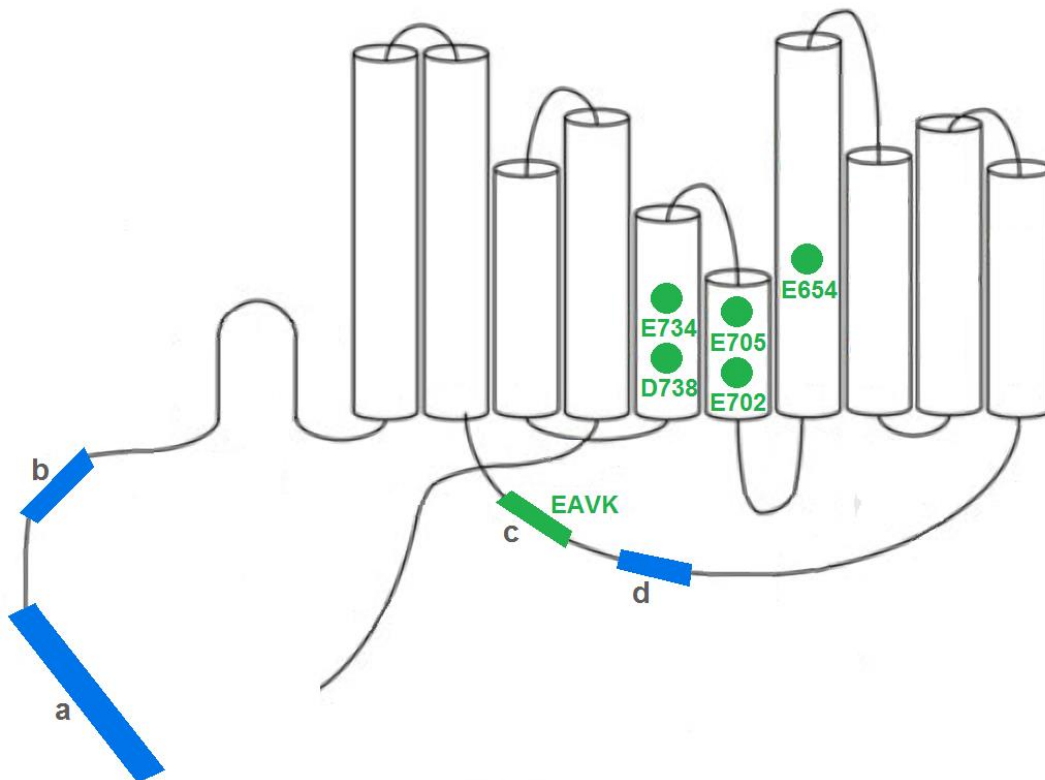


Fig. 3. Mapa topológico de TMEM16A

*Mapa topológico de TMEM16A basado en la estructura de cristal de TMEM16a por criomicroscopía electrónica. En la topología se observan los 10 dominios transmembranales representados como cilindros (Paulino et al., 2017b). Los cuadriláteros azules y verde señalados como **a**, **b**, **c** y **d** representan los segmentos de corte y empalme alternativo (Ferrera et al., 2009; Xiao et al., 2011). Los círculos verdes representan los residuos del*

TMEM16A pertenece a la familia TMEM16, cuyas proteínas se encuentran en muchos organismos eucariotas (Fig. 4) (Whitlock et al., 2015). Mediante análisis inmunohistoquímicos, se ha identificado la expresión de TMEM16A en: pulmón, células epiteliales, células alveolares, células acinares pancreáticas, células de epitelio y túbulos renales, capa celular de la retina, glándulas submandibulares, células acinares de membrana apical (Yang et al., 2008).

Funciones fisiológicas

La clonación de TMEM16A ha permitido implementar estrategias moleculares para el estudio de TMEM16A. Particularmente la supresión de la expresión tejido-específica de TMEM16A hace posible caracterizar su función en un tejido en especial. Esto es importante puesto que la supresión de la expresión del canal por completo es letal.

Las funciones fisiológicas en las que participa TMEM16A son variadas. Van desde la regulación de la actividad eléctrica hasta la regulación de la presión arterial (Bulley et al., 2012). La Tabla 1 lista funciones que se han demostrado. Como vemos, el canal participa en la percepción del dolor agudo por temperatura en neuronas sensoriales ya que al incrementar la temperatura se activa el canal lo cual induce la despolarización de las neuronas (Cho et al., 2012). También participa en la secreción de saliva dependiente de incrementos en la concentración de Ca^{2+} (Yang et al., 2008). En este caso, los canales se encuentran solo en la cara apical de las células acinares. Entonces cuando el canal se activa, el Cl^- sale por la cara apical. Esto permite el arrastre de agua y sodio los cuales junto con el Cl^- forman la saliva primaria. Faria y colaboradores (2014) encontraron la expresión de dicho canal en el túbulo proximal del epitelio de riñón, tanto en ratones y humanos. Observaron que ratones a los que les suprimieron la expresión de TMEM16A en el túbulo proximal del epitelio de riñón desarrollaron proteinuria. La secreción de Cl^- por TMEM16A es importante en los túbulos renales para la secreción de H^+ ya que permite la asimilación de HCO_3^- (Huang et al., 2009). Caputo y colaboradores (2008) confirmaron que en células del epitelio bronquial TMEM16A es necesario para la

secreción de Cl⁻, sobre todo en condiciones patológicas (Caci et al., 2015). Se ha sospechado que TMEM16A puede servir como una alternativa a los canales CFTR para la secreción de Cl⁻. Esto sería muy útil para la hidratación de las vías aéreas superiores de pacientes que padecen fibrosis quística, por lo que es necesario investigar maneras de encender a TMEM16A (Huang et al., 2009; Huang et al., 2012; Scudieri et al., 2012).

Tabla 1. Funciones fisiológicas de TMEM16A

| Célula | Función | Referencia |
|---|--|---|
| Neuronas de ganglios de la raíz dorsal | Sensibilidad al calor nocivo | (Cho et al., 2012) |
| Células β | Regulación de la secreción de insulina | (Edlund et al., 2014) |
| Células del túbulo proximal del epitelio de riñón | Secreción de Cl ⁻ en el proceso de asimilación de HCO ₃ ⁻ | (Faria et al., 2014) |
| Células del epitelio bronquial | Secreción de Cl ⁻ sobre todo en condiciones patológicas | (Caputo et al., 2008; Caci et al., 2015) |
| Células de músculo liso vascular | Regulación de la presión arterial | (Wang et al., 2015) |
| Células basales del músculo liso | Regulación de la proliferación celular | (Wang et al., 2012) |
| Ovocito de <i>Xenopus</i> | Bloqueo de polispermia | (Kuruma & Hartzell, 1999) |
| Miocitos cardíacos | Contracción de los miocitos cardíacos | (Zygmunt., 1994). |
| Células del epitelio de vías respiratorias | Mecanismo de protección contra microorganismos | (huang et al., 2009; Huang et al., 2012; Scudieri et al., 2012) |
| Células del epitelio bronquial | Secreción de electrolitos | (Caputo et al 2008) |
| Células de músculo liso de la arteria cerebral | Regulación de la presión arterial | (Bulley et al., 2012) |

| | | |
|--|---|--|
| Células intestinales de Cajal | Contracción de músculo liso del estómago | (Huang et al., 2009; Hwang et al., 2009) |
| Pericitos de arteriolas pequeñas de cerebro y retina | Regulación de la contracción | (Heinze et al., 2014) |
| Células basales del músculo liso | Regulación de la proliferación inducida por angiotensina II | (Wang et al., 2012) |

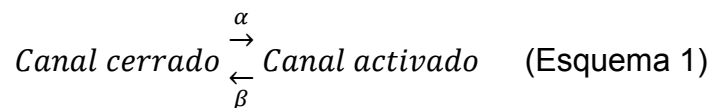
TMEM16A se expresa en músculo liso; por ejemplo, en células de músculo liso de arteria, en donde participa en la regulación de la presión arterial (Wang et al., 2015). Wang y colaboradores (2012) analizaron células de músculo liso de arteria cerebral de rata y probaron la expresión de TMEM16A. En el mismo tipo de células de rata, pero con hipertensión arterial, la densidad de corriente de TMEM16A fue más pequeña que las que se generan en células sanas. Por otro lado, al inhibir la expresión de TMEM16A con siRNA identificaron que la inhibición promueve la proliferación celular inducida por Angiotensina II. En resumen, la regulación negativa de TMEM16A está involucrada en el remodelamiento cerebrovascular que sufren las arterias durante el desarrollo de la hipertensión. Se ha confirmado también que TMEM16A se expresa en músculo liso del tracto gastrointestinal, específicamente en las células intestinales de Cajal (Yang et al., 2008; Huang et al 2009; Ferrera et al., 2010). Huang y colaboradores (2009) estudiaron este canal en estómago de ratón de 3 días de nacido al que previamente se le inactivo el gen TMEM16A. Observaron que la frecuencia y amplitud de las ondas que coordinan la ritmicidad de las contracciones se redujo en el tejido que no expresa TMEM16A respecto al control silvestre. La conclusión es que TMEM16A se involucra en la ritmicidad del tracto gastrointestinal.

Mecanismo de activación

El canal TMEM16A se activa por Ca^{2+} , por lo que se incluye en el grupo de canales de Cl^- activados por Ca^{2+} (Yang et al., 2008; Xiao et al., 2011; Ni et al., 2014). La activación por Ca^{2+} es dependiente del voltaje. En efecto, el canal se activa lentamente cuando la membrana se despolariza de un potencial de

membrana negativo a valores más positivos. De forma similar, el canal se desactiva cuando disminuye el potencial de membrana hacia valores cada vez más negativos. Éste comportamiento es dado acorde a la concentración de Ca^{2+} intracelular. A bajas concentraciones de Ca^{2+} ($<1\mu\text{M}$) la activación del canal es dificultosa y requiere potenciales de membrana más positivos. A su vez, concentraciones mayores de Ca^{2+} ($>1\mu\text{M}$) el canal se activa a potenciales de membrana menos positivos que en el caso anterior. Así, con concentraciones de Ca^{2+} muy altas ($>20\mu\text{M}$) el canal puede llegar a activarse a todos los potenciales de membrana.

Para activar TMEM16A en células Hek 293, la concentración requerida de Ca^{2+} para producir el 50% del efecto máximo (EC_{50}) fue de $2.6\mu\text{M}$ de a -60 mV y de $0.4\mu\text{M}$ a $+60\text{ mV}$ (Yang et al., 2008). El canal también puede activarse por otros cationes de naturaleza divalente como son Ba^{2+} , Sr^{2+} y Ni^{2+} pero no por Mg^{2+} (Xiao et al., 2011; Ni et al., 2014). Han et al., (2016) reportaron que la EC_{50} fue $9 \pm 0.27\mu\text{M}$ de Sr^{2+} a $+80\text{ mV}$. Se ha demostrado también que TMEM16A puede activarse por voltaje, incluso en ausencia de cationes (Yang et al., 2008; Xiao et al., 2011; Ni et al., 2014; Segura-Covarrubias et al., 2020).



El esquema 1 muestra un modelo sencillo de la activación del canal. α y β son las constantes dependientes de Ca^{2+} . Si asumimos que el paso limitante entre el estado cerrado y el activado es el pegado y despegado de Ca^{2+} , la EC_{50} para Ca^{2+} se puede calcular como:

$$(\text{Ecuación 1}) \quad \text{EC}_{50} = \frac{\beta}{\alpha}$$

En caso de que la asociación del canal con Ca^{2+} no dependiera del voltaje la EC_{50} debe ser una constante, pero si no es el caso entonces las constantes α y β cambiarían con el voltaje.

La activación de TMEM16A por voltaje en ausencia de Ca^{2+} es debido a la protonación de sus residuos ácidos. La propuesta es que iones H^+ del lado intracelular interactúan con la parte fuera del campo eléctrico del canal. La protonación como tal es un evento independiente del voltaje y de la concentración de Ca^{2+} . Sin embargo, la despolarización provocaría que los iones H^+ migren dentro del campo eléctrico. Ya que en el campo eléctrico está el sitio de unión a Ca^{2+} , los iones H^+ pueden protonar los residuos E654, E702, E705, E734 y D738. Como resultado de esta protonación aumenta la probabilidad de apertura del canal, entonces el canal llegará al estado conductivo con una transición dependiente de voltaje. De esta forma TMEM16A puede activarse por voltaje en ausencia de Ca^{2+} (Segura-Covarruvias et al., 2020).

Estructura de TMEM16A

La estructura de TMEM16A se conoce ya que se ha determinado mediante crio-microscopía electrónica. El canal es un homodímero, cada monómero contiene 10 hélices α (Fig. 5). Cada subunidad tiene un poro de conducción iónica constituido por las hélices α_3 , α_4 , α_5 , α_6 y α_7 para cada subunidad. El poro tiene una longitud aproximada de 20 Å, su estructura es ancha hacia la salida en los vestíbulos extracelular e intracelular y se angosta en la región del cuello (Fig. 6a). La parte más angosta del cuello del poro es de 2.5 Å (Paulino et al., 2017b). A pesar de esto, aniones con diámetros más grandes como son el Cl^- y el I^- cuyos diámetros son 3.62 Å y 4.4 Å, respectivamente, pueden pasar por el poro (Arreola & Hartzell, 2019).

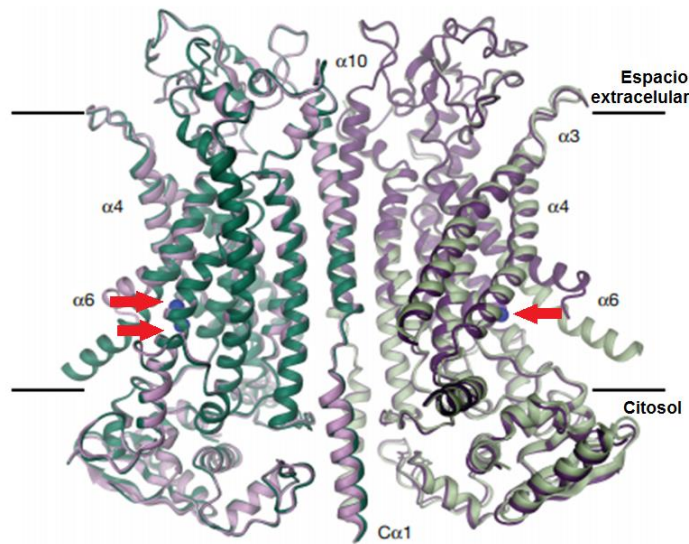


Fig. 5. Estructura de TMEM16A

El canal funcional TMEM16A es un homodímero. Las dos subunidades se muestran en tonos claros y oscuros del color correspondiente. Cada subunidad se activa de manera independiente y tiene un poro propio. Las subunidades consisten de 10 hélices α transmembranales representadas en forma de listón con Ca^{2+} en el sitio de unión (verde) y sin Ca^{2+} (violeta). Además de los extremos amino y carboxilo que se localizan en el lado citosólico. Las líneas negras representan los límites de la membrana, la línea superior indica el lado extracelular y la inferior el lado intracelular. Las flechas rojas señalan a las esferas azules que representan iones Ca^{2+} (Paulino et al., 2017b).

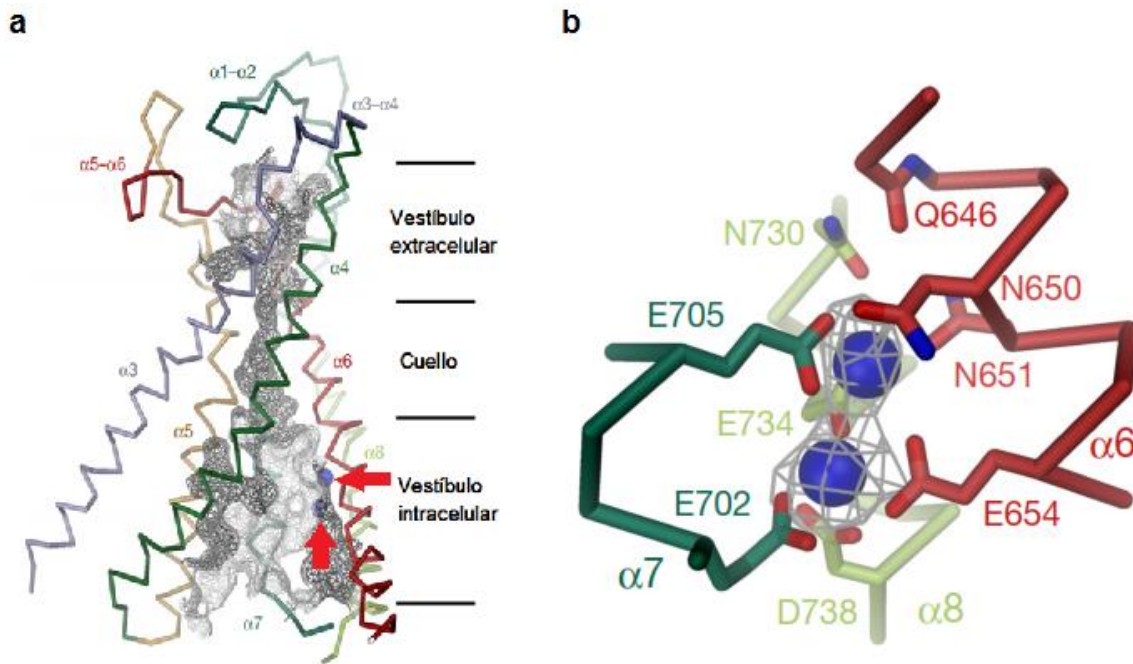


Fig. 6. Estructura del poro de TMEM16A y el sitio de unión a calcio

a) Representación del poro basada en la estructura tridimensional determinada mediante cryo-EM. La porción extracelular está hacia arriba y la intracelular hacia abajo. La malla gris delinea el contorno del poro a través de una subunidad del canal. Las flechas sirven para señalar la localización de los iones Ca^{2+} . El poro se encuentra rodeado por las hélices $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$. Los vestíbulos extra e intracelulares son grandes mientras que en el centro del poro hay un cuello angosto de 2.5 Å.

b) Representación de la estructura del sitio de unión a Ca^{2+} determinada mediante cryo-EM. Se aprecian las cadenas laterales de los residuos que coordinan a los dos iones Ca^{2+} : E654, E702, E705, E734 y D738. También se muestran los residuos Q646, N650, N651 de la hélice $\alpha 6$ y N730 de la hélice $\alpha 8$. El color de los residuos corresponde a la hélice a la que pertenecen. Las esferas azules representan iones Ca^{2+} (Paulino et al., 2017b).

Debido a que el diámetro del poro es más pequeño que el diámetro del ion Cl^- y este no podría pasar, se ha dicho que esta estructura determinada por criomicroscopía representa un poro colapsado. Se ha propuesto que esto se debe a que el canal fue purificado en altas concentraciones de Ca^{2+} , lo cual induce el

colapso del poro. Para impedir dicho colapso se ha planteado que el PIP2 pueda estabilizar el estado abierto del poro (Arreola & Hartzell, 2019).

El sitio de unión a los iones Ca^{2+} se encuentra en el vestíbulo intracelular del poro entre las hélices $\alpha 6$, $\alpha 7$ y $\alpha 8$ de cada subunidad de TMEM16A (Paulino et al., 2017b). Dos iones Ca^{2+} se unen a 5 cadenas laterales de aminoácidos negativos: E654, E702, E705, E734 y D738 (Fig. 6b) (Yu et al., 2012; Tien et al., 2014; Paulino et al., 2017b). El sitio es de alta afinidad y se encuentra a la orilla de la vía de permeación. Por esta razón física, los aniones permeantes podrán detectar el potencial electrostático generado por cargas ya sean positivas o negativas. Tal es el caso de las 5 cargas negativas que forman el bolsillo de Ca^{2+} . Cuando el canal está cerrado y no tiene Ca^{2+} pegado, el ambiente electrostático en la región del sitio es negativo, lo que constituye una barrera electrostática para el flujo de aniones. Una manera de abatirlo es neutralizando las cargas. Esto lo hace el Ca^{2+} de manera efectiva. La posición de la porción citoplasmática de la hélice $\alpha 6$ en el estado cerrado del canal permite a los iones Ca^{2+} acceder al sitio de unión a Ca^{2+} . La consecuencia del pegado de Ca^{2+} es doble: por un lado, neutraliza las cargas y por el otro lado atrae aminoácidos de la hélice $\alpha 6$, lo que provoca un cambio conformacional que mueve a la hélice $\alpha 6$ hacia las hélices $\alpha 7$ y $\alpha 8$ (Paulino et al., 2017b). Este último cambio resulta en la formación de la parte citosólica del poro lo cual lo lleva a un estado conductivo.

Selectividad Iónica

La permeabilidad se refiere la capacidad de un ion para pasar a través de un canal (Dawson, 1996). TMEM16A es un canal que permite el paso del ion Cl^- , sin embargo, es permeable a otros iones. La secuencia con la cual los aniones pasan es tiocianato (SCN^-) > nitrato (NO_3^-) > yoduro (I^-) > bromuro (Br^-) > Cl^- > fluoruro (Schroeder et al., 2008; Yang et al., 2008; Qu Z & Hartzell, 2000). En la tabla 2 se muestran los cocientes de permeabilidad de TMEM16A calculados por diferentes autores. La secuencia consenso indica que SCN^- y luego NO_3^- son los más permeables, en la tabla 2 se aprecia que estos dos tienen los cocientes de

permeabilidad más altos. Esto se podría explicar por las bajas energías de hidratación que estos aniones tienen (Xiao et al., 2011).

Tabla 2. Cocientes de permeabilidad de TMEM16A calculados por el cambio del potencial de inversión para diferentes aniones

| Aniones | Pérez-Cornejo et al., 2004 | Yang et al., 2008 | Peters et al., 2015 | Schroeder et al., 2008 | |
|------------------------------|---|--------------------|---------------------|---|---|
| | Células acinares de la glándula parótida de rata (endógeno) | Hek 293T (exógeno) | Hek 293T (exógeno) | Ovocito de <i>Xenopus laevis</i> (endógeno) | Ovocito de <i>Ambistoma mexicanum</i> (exógeno) |
| SCN ⁻ | 4.3 ± 0.4 | - | 5.6 ± 0.6 | 9.3 ± 1.9 | 3.4 ± 1.8 |
| NO ₃ ⁻ | 2.0 ± 0.007 | 2.20 | - | - | - |
| I ⁻ | 2.6 ± 0.1 | 1.85 | 2.9 ± 0.2 | 3.8 ± 0.4 | 1.9 ± 0.6 |
| Br ⁻ | 1.6 ± 0.08 | 1.77 | 1.5 ± 0.1 | 2.0 ± 0.1 | 1.4 ± 0.2 |
| Cl ⁻ | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| F ⁻ | 0.3 ± 0.04 | 0.43 | - | - | - |
| Glutamato | 0.05 ± 0.02 | - | - | - | - |

La selectividad iónica de un canal puede obtenerse de la conductividad y la permeabilidad.

Conductividad iónica: Los coeficientes de conductancia reflejan la habilidad de un ion de atravesar el poro de un canal. Se le ha llamado permeabilidad aparente, ya que además de reflejar la facilidad con qué un ion pasa a través de un canal incluiría la interacción con otros iones que compiten con el ion de interés. La conductancia del canal para un ion se mide cuando éste se encuentra en el lado intracelular y extracelular de la célula, después se vuelve a medir cuando se ha remplazado ese anión por otro. Los coeficientes de conductancia se calculan a partir de las relaciones corriente-voltaje determinadas con Cl⁻ y con el anión de prueba.

Permeabilidad iónica: muestra la facilidad con que un ion entra en un canal. Se refiere a la interacción de un ion con un canal, sin competir con otros iones. En términos fisicoquímicos, la permeabilidad (*P*) es igual al producto del coeficiente de

partición (β) multiplicado por el coeficiente de difusión del anión en el poro (D) y dividido entre el grosor de la membrana lipídica (ΔX).

$$\text{(Ecuación 2)} \quad P = \frac{D\beta}{\Delta X}$$

Como lo muestra la ecuación, la permeabilidad contiene propiedades microscópicas de: el coeficiente de partición (se define como la concentración de soluto en la solución acuosa dividida entre la concentración de soluto justo dentro de la membrana), el coeficiente de difusión del anión en el poro, y del grosor de la membrana lipídica (ΔX). Sin embargo, determinar los valores absolutos de β y D no es posible. Por lo tanto, la permeabilidad iónica usualmente se expresa en términos de los cocientes de permeabilidad para cada soluto usando como anión de referencia al Cl^- . Estos cocientes se obtienen de forma empírica con los potenciales de inversión. El potencial de inversión (E_r) es el voltaje donde la corriente es 0, es decir, el voltaje en el que los flujos entrantes son iguales a los salientes. Experimentalmente, se cambia el ion en el lado extracelular y se mide el E_r , mismo que se usará para calcular el corrimiento en el E_r respecto al ion con que se compara. Este dato se usa en la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz para obtener los coeficientes de permeabilidad.

Si bien la selectividad iónica basada en la conductancia da información de la resistencia que opone el poro al flujo de los iones con dependencia al gradiente electroquímico. El cálculo con la permeabilidad iónica arroja información relevante acerca del comportamiento de los iones dentro del poro.

Antecedentes inmediatos

Debido al interés en dilucidar el mecanismo de activación del canal TMEM16A se han estudiado diversas mutantes de residuos específicos de TMEM16A. Especialmente en la búsqueda del sitio de unión a Ca^{2+} se realizaron mutaciones de aminoácidos a lo largo del poro del canal (Yang et al., 2008; Yu et al., 2012; H. Yang et al., 2012; Tien et al., 2014; Peters et al., 2015; Dang et al., 2017). Las mutantes en los aminoácidos del sitio de unión a Ca^{2+} mostraron cambios en la sensibilidad a Ca^{2+} (Fig. 7) (Yu et al., 2012; Tien et al., 2014; Paulino et al., 2017a). La EC_{50} de Ca^{2+} de E702Q es $21.0 \mu\text{M}$ a $+120 \text{ mV}$ (Yu et al., 2012) y $30 \mu\text{M}$ a $+60 \text{ mV}$, mientras que la EC_{50} de E705Q es 2.9 mM a $+60 \text{ mV}$ (Tien et al., 2014). La doble mutante E702Q/E705Q también muestra disminución a la sensibilidad a Ca^{2+} (Yu et al., 2012; Han et al., 2016), la EC_{50} es $26.5 \pm 3.6 \mu\text{M}$ a $+80 \text{ mV}$ (Han et al., 2016).

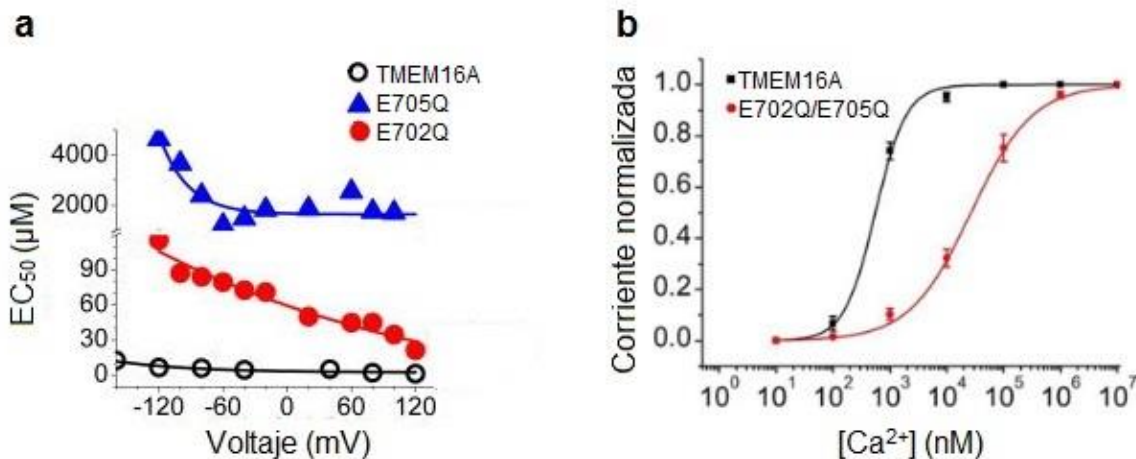


Fig. 7. Sensibilidad a calcio de los canales TMEM16A silvestre y mutantes E702Q, E705Q y E702Q/E705Q

- a) Dependencia de la EC_{50} con el voltaje de TMEM16A silvestre (círculos vacíos), E702Q (círculos rojos) y E705Q (triángulos). La EC_{50} de Ca^{2+} de TMEM16A silvestre es $0.94 \mu\text{M}$ a $+120 \text{ mV}$, mientras que para E702Q es $21.0 \mu\text{M}$ a $+120 \text{ mV}$ (Yu et al., 2012) y $30 \mu\text{M}$ a $+60 \text{ mV}$, mientras que la EC_{50} de E705Q es 2.9 mM a $+60 \text{ mV}$ (Tien et al., 2014).

b) *Curvas dosis-respuesta de TMEM16A silvestre (negro) y la doble mutante E702Q/E705Q (rojo) (Han et al., 2016). La EC₅₀ de TMEM16A silvestre es 0.53± 0.11 μM mientras que para la doble mutante E702Q/E705Q es 26.5 ± 3.6 μM a +80 mV (Han et al., 2016).*

Pérez-Cornejo y colaboradores (2004) mostraron que aniones permeantes regulan la activación de TMEM16A en células acinares de la glándula parótida de rata. Registraron dichas células y ajustaron las corrientes generadas en presencia de Cl⁻ extracelular a una función mono-exponencial. Esto para determinar la constante de activación, que describe cuantitativamente los efectos de los diferentes aniones permeantes en la cinética de activación. Observaron que en presencia de SCN⁻ y de NO₃⁻ la constante de activación fue menor que con Cl⁻, lo que indica que en estos dos casos el canal tarda menos tiempo en activarse. Observaron también que la constante de desactivación en presencia SCN⁻ y NO₃⁻ fue mayor que con Cl⁻, lo que significa que el canal tarda más tiempo en cerrarse. Los efectos relativos de aceleración y desaceleración inducidos por los aniones permeantes siguieron la secuencia de selectividad SCN⁻ > I⁻ > NO₃⁻ > Br⁻ > F⁻.

Después normalizaron los datos a las constantes de activación y desactivación obtenidas en presencia de Cl⁻ extracelular. Como resultado encontraron que la cinética de activación a +94 mV se aceleró 4 veces en presencia de SCN⁻ y 2 veces en presencia de NO₃⁻. En contraste, la constante de desactivación a -56 mV se redujo 3 veces en presencia de SCN⁻ y 2 veces en presencia de NO₃⁻. Estos datos están relacionados linealmente a los cocientes de permeabilidad. En conclusión, estos datos indican que la selectividad aniónica y la activación del canal están íntimamente ligados.

Betto y colaboradores (2014) investigaron la dependencia de Ca²⁺ con el anión permeante en TMEM16B. Midieron las relaciones dosis-respuesta y encontraron que a +100 mV necesitan menos [Ca²⁺] intracelular para activar el 50% de la corriente máxima cuando los aniones externos son más permeantes que el Cl⁻. De la misma forma, a +100 mV requirieron más [Ca²⁺] cuando los aniones externos fueron menos permeantes que los iones Cl⁻. Igualmente, la presencia de SCN⁻ de

forma intracelular aumenta la afinidad aparente por Ca^{2+} en comparación con Cl^- . De esta forma concluyeron que la activación de TMEM16B está modulada por los aniones permeantes.

Peters y colaboradores (2015) estudiaron la contribución del Ca^{2+} intracelular en la selectividad aniónica de TMEM16A. Registraron TMEM16A con Cl^- , Br^- , I^- y SCN^- en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} intracelular: 400 nM, 1.7 μM y 1 mM. En los tres casos se mantuvo la secuencia de permeabilidad $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$. Sin embargo, notaron que la selectividad de Br^- , I^- y SCN^- fue mayor a 400 nM de Ca^{2+} . Por ejemplo, para SCN^- el cociente de permeabilidad casi 2 veces mayor al usar 400 nM de Ca^{2+} que el obtenido con 1.7 μM y 1 mM de Ca^{2+} . El estado abierto de TMEM16A es más selectivo a SCN^- a bajas concentraciones de Ca^{2+} , entonces necesita menos $[\text{Ca}^{2+}]$ para alcanzar la máxima probabilidad de apertura a comparación de cuando permea iones Cl^- .

Todo esto nos lleva a suponer que el pegado del Ca^{2+} depende del anión o que el proceso de permeación dependerá de la ocupación del sitio de pegado de Ca^{2+} .

Planteamiento del problema

Se han identificado segmentos que regulan la dependencia con el voltaje y con la estructura de TMEM16A se ha establecido el sitio de unión a Ca^{2+} , que es donde Ca^{2+} se une para activar al canal. Esto ha permitido avanzar en el conocimiento del funcionamiento del canal. Si bien se han identificado mutaciones del canal que modifican la permeabilidad a iones, actualmente el papel de los iones permeantes en el proceso de activación del canal no está claro.

La permeabilidad iónica ha sido muy estudiada en TMEM16A. Incluso antes de ser identificado molecularmente se observó que los aniones más permeables que el Cl^- facilitan el proceso de apertura y enlentecen el cierre de los canales de Cl^- activados por Ca^{2+} , los iones Cl^- estabilizan el pegado del Ca^{2+} en su sitio y que los iones Ca^{2+} facilitan el paso del anión a través del poro. Esto sugiere que hay una interacción bidireccional entre los aniones permeantes y los iones Ca^{2+} .

Actualmente se sabe que el sitio de unión a Ca^{2+} está formado por E654, E702, E705, E734 y D738 y se posiciona viendo hacia la vía de permeación. Las evidencias de que E702Q y E705Q reducen la sensibilidad a Ca^{2+} y la relación entre la activación por Ca^{2+} y la permeación de iones nos llevan a pensar en una posible participación de E702 y E705 con la selectividad aniónica.

Objetivos

El objetivo central de mi tesis es determinar si el sitio de unión a Ca^{2+} participa en el mecanismo de selección de aniones en el canal de Cl^- TMEM16A, para lo cual se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar, mediante registros electrofisiológicos, las relaciones corriente voltaje para los canales silvestres y mutados.
2. Determinar los E_r de las corrientes cambiando el Cl^- en el baño por aniones como son SCN^- , NO_3^- , I^- , Br^- y glutamato.
3. Determinar los cocientes de permeabilidad relativos a la del Cl^- para cada anión probado. Con estos valores determinaré la secuencia de selectividad para cada canal.

Materiales y métodos

Expresión estable de TMEM16A

La expresión de TMEM16A fue necesaria para estudiar el canal silvestre y compararlo con los datos de las mutantes. El ADNc que se utilizó es de TMEM16A variante **ac** silvestre de ratón, se clonó en el vector de expresión pIRES2-EGFP (Clontech, Mountain View, CA, USA). Este vector bi-cistrónico fue transfectado establemente en células de riñón embrionario humano Hek 293 lo cual induce la expresión separada del canal y de la proteína verde EGFP. Esto permite estudiar al canal sin ninguna etiqueta ya que la proteína verde EGFP queda en el citoplasma de la célula mientras que el canal en la membrana. Estas células fueron mantenidas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM alta glucosa, INVITROGEN) suplementado con 10% de suero fetal bovino (INVITROGEN), 2mM de L-glutamina (GIBCO) y 1% de geneticina (GIBCO). Las condiciones de incubación fueron a 37°C, 95% de O₂ y 5% de CO₂.

Expresión transitoria de las mutantes TMEM16A E702Q, TMEM16A E705Q y TMEM16A E702Q/E705Q

Las mutantes del canal TMEM16A E702Q, E705Q y E702Q/E705Q fueron clonadas individualmente en el vector de expresión pEGFPn1, que permite la expresión del canal fusionado con la proteína GFP. Realicé transfecciones transitorias de los canales mutantes en células Hek 293. En este caso hice los cultivos en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM alta glucosa, INVITROGEN) suplementado con 10% de suero fetal bovino (INVITROGEN), 2mM de L-glutamina (GIBCO) y 1% de gentamicina (GIBCO). Las condiciones de incubación fueron las descritas anteriormente.

Para la reacción de transfección usé 0.5 µg del ADNc de interés en 50 µl de Opti-MEM y 1 µg de lipofectamina 2000 (INVITROGEN) en 35 µl de Opti-MEM. Dejé incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y después mezclé el contenido de los dos tubos, incubé nuevamente a temperatura ambiente 30 minutos. Coloqué la reacción de transfección en un pozo de cultivo de células Hek 293 con confluencia de 30%-60% y medio reciente. Cambié el medio del pozo al transcurrir 3 horas.

Preparación de las células

La preparación de las células es para disponer de las células transfectadas y poder usarlas en los experimentos de fijación de voltaje.

Aproximadamente después de 15 horas de incubación ininterrumpida, despegué las células del pozo en el que las cultivé. Esto lo hice con micropipeta al tomar y soltar volumen de cultivo repetidamente. Una vez que despegué las células del pozo, transferí parte del cultivo a un tubo de Eppendorf. En este tubo usé micropipeta para ocasionar la separación de las células y conseguir células aisladas. Ocasionalmente observaba en el microscopio para ver la calidad y estado de las células.

Después de que identifiqué células aisladas puse una gota de 10-15 μ l del cultivo sobre un cubreobjetos pequeño. Hice lo mismo para varios cubreobjetos dispuestos en una caja Petri. Coloqué las cajas en la incubadora de 10 a 30 minutos en las condiciones indicadas anteriormente, en este tiempo las células se adhieren al cubreobjeto. Transcurrido ese tiempo, agregué 1.5 ml de medio de cultivo suplementado con gentamicina en las cajas Petri. Nuevamente coloqué las cajas en la incubadora entre 1 y 4 horas. Con posterioridad deposité uno de los cubreobjetos en la cámara de registro que estaba colocada en la platina de un microscopio invertido (Fig. 8). Esta cámara tiene un compartimento que contenía solución extracelular y esta aterrizada mediante un puente de agar (3mM KCl hacia un electrodo de plata clorurada). Las células las observé con luz blanca y seleccioné células para realizar experimentos de fijación de voltaje iluminando las células con luz UV. Aquellas que expresan el canal se ven verde debido a la expresión de la proteína EGFP.

Ajusté los volúmenes y tiempos de incubación acorde a la confluencia celular y al tamaño de los cubreobjetos que usé.

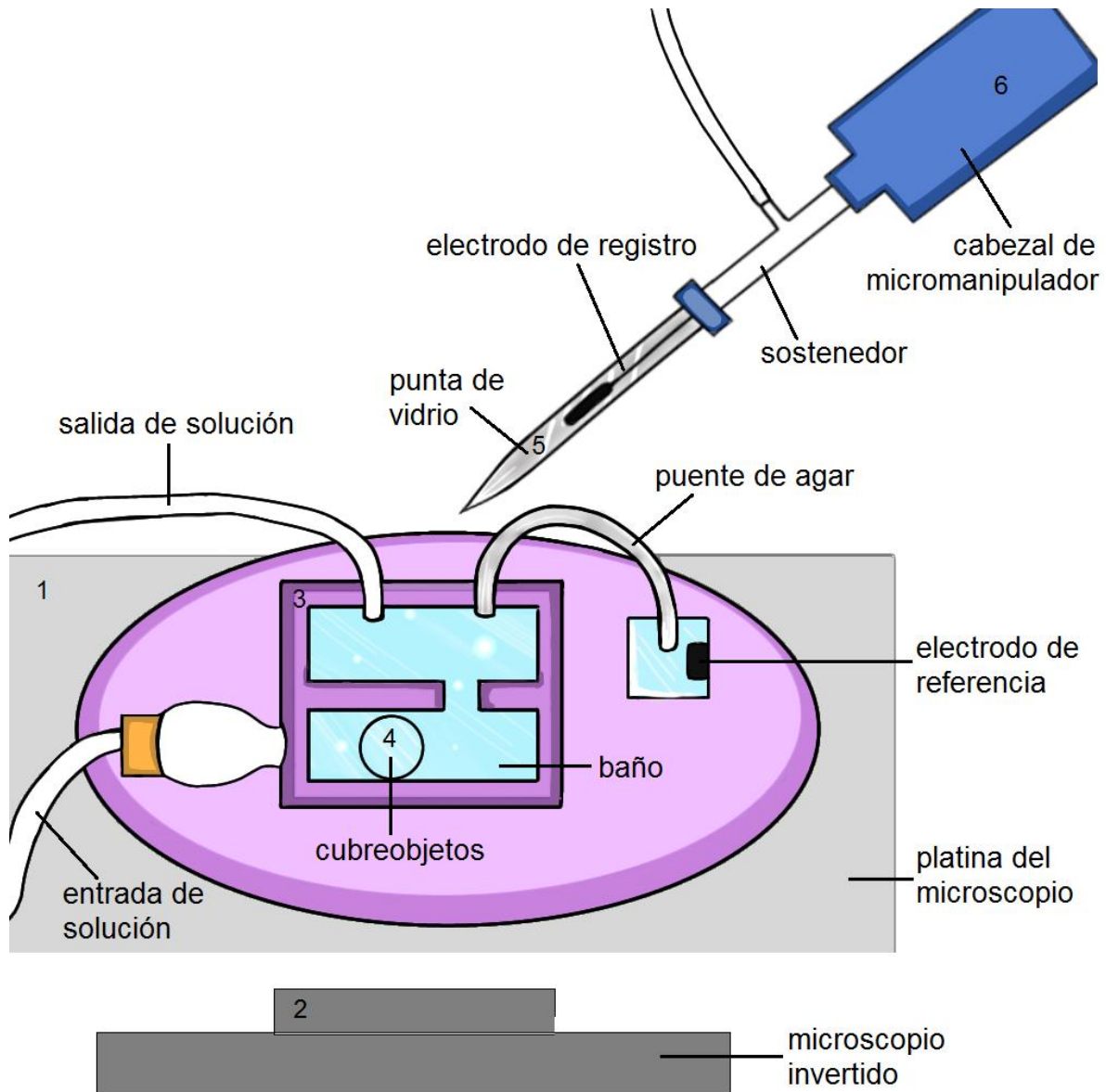


Fig. 8. Configuración de Patch-clamp

Los componentes son: (1) platina, (2) objetivo, (3) cámara de registro, (4) cubreobjetos con células bañadas con solución extracelular en color azul, (5) capilar de vidrio conteniendo la solución intracelular y el electrodo de registro, (6) cabeza con el sostenedor del capilar de vidrio. Se muestran dos baños, uno con la solución extracelular donde se coloca el cubreobjetos con las células y otro más pequeño donde el electrodo de referencia se sumerge con solución de KCl. Estos dos baños son conectados por un puente de agar que permite aterrizar el primer baño. En la parte inferior se representa un microscopio invertido.

Fijación del voltaje mediante Patch-clamp

La técnica de fijación de voltaje es una técnica que permite generar una diferencia de potencial entre el lado intracelular y el lado extracelular de la membrana de manera muy precisa. El lado extracelular es la referencia, esto es el voltaje es cero. Por lo tanto, todos los voltajes que haga referencia en esta tesis serán los voltajes en el lado intracelular. Para lograr establecer la diferencia de voltaje usamos dos electrodos. Uno intracelular y otro extracelular. El intracelular sirve para cambiar el voltaje mientras que el extracelular esta aterrizado. Por lo tanto, el experimentalista cambia el voltaje intracelular y registra la corriente que se genera ante la variación del voltaje. Hay diferentes maneras de controlar el voltaje una de ellas es el Patch-clamp. El Patch-clamp es una técnica empleada en experimentos electrofisiológicos que posibilita el registro de corrientes eléctricas en canales iónicos a voltaje constante. Para el Patch-clamp utilicé un electrodo de plata clorurada inserto en un capilar de vidrio (Sutter Instruments CO.) que contenía una solución intracelular con Ca^{2+} . Previamente estiré el capilar de vidrio hasta que tuviese una punta fina de aproximadamente 0.5 micras de diámetro. El capilar de vidrio es insertado en un sostenedor que está conectado al cabezal que está montado en un micro-manipulador (Fig. 8). La punta del electrodo de vidrio toca la membrana, hace un sello de alta resistencia y se rompe la membrana celular para que la solución intracelular quede en contacto con el citoplasma (Fig. 9). El citoplasma se deja equilibrar con la solución intracelular durante 5 minutos antes de iniciar los registros.

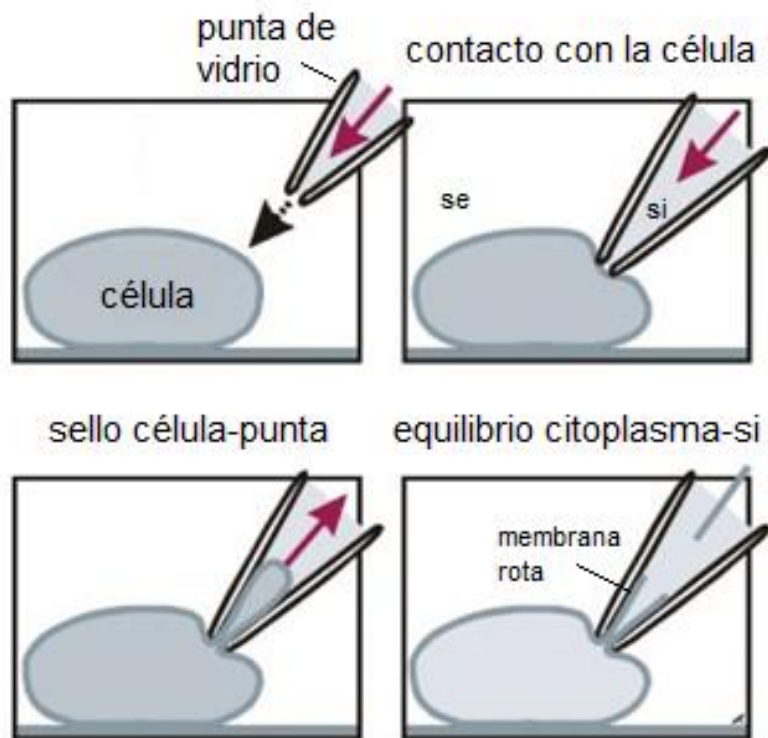


Fig. 9. Técnica de Patch-clamp en formato de célula completa

Formación del sello de alta resistencia (más de $1\text{ G}\Omega$) entre la membrana de la célula y la punta de vidrio requiere el contacto de la punta de vidrio con la célula y cambios de presión. Posteriormente al romper la membrana se pierde la barrera entre el citoplasma y la solución intracelular de la pipeta de vidrio. El citoplasma y la solución intracelular se equilibran de forma que se tiene control sobre el interior de la célula. Si: solución intracelular, se: solución extracelular. Las flechas rojas señalan hacia donde se establece la presión.

Soluciones intracelulares

Preparé soluciones intracelulares con concentraciones de Ca^{2+} amortiguadas para provocar la activación del canal. Preparé 3 soluciones intracelulares con diferentes concentraciones de Ca^{2+} cuyo pH ajusté a 7.3 y la osmolaridad a 300 mOsmol/Kg.

1. Solución intracelular conteniendo 0.5 μM de Ca^{2+} libre compuesta por 22.48 mM de Cl-TEA, 8.76 μM de CaCl_2 , 50 mM de HEPES, 94 mM de D-Manitol, 25 mM de EGTA-TEA.
2. Solución intracelular conteniendo 5.0 μM de Ca^{2+} libre contenía 11.8 mM de Cl-TEA, 14.1 μM de CaCl_2 , 50 mM de HEPES, 99 mM de D-Manitol, 25 mM de HEDTA.
3. Solución intracelular conteniendo 12.0 μM de Ca^{2+} libre compuesta por 2.0 mM de Cl-TEA, 19.0 μM de CaCl_2 , 50 mM de HEPES, 104 mM de D-Manitol, 25 mM de HEDTA.

Todas estas soluciones contenían 40 mM de Cl^- .

Soluciones extracelulares

Las soluciones extracelulares que utilicé me permitieron controlar el medio exterior de la célula, pues sólo lo que está en él puede entrar por los canales a la célula. Preparé 6 soluciones extracelulares que contenían cada una de ellas 139 mM de diferentes aniones: Cl^- , NO_3^- , I^- , Br^- , SCN^- y glutamato, con pH 7.3 y 400 mOsmol/kg. Para ello utilicé 139 mM de Cl-TEA, NO_3 -TEA, I-TEA, Br-TEA, Glu-TEA o SCN-Na según el anión. Además, contenían 0.5 mM de CaCl_2 , 20 mM de HEPES y 110 mM de D-Manitol. Todos los químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA.

Registros electrofisiológicos

Realicé los experimentos a una temperatura ambiente de $\sim 21^\circ \text{C}$. Para la adquisición de datos y generación de los protocolos de voltaje utilicé el Axodigdata 1550 (Molecular Devices) y el software pCLAMP10 (Molecular Devices) (Fig. 8).

Posteriormente estimulé la célula con rampas de voltaje que varían el potencial en el interior de la célula desde -100 mV hasta +100 mV, en algunos casos usé rampas de -60 mV a +60 mV. El protocolo experimental para contestar mis objetivos consistió en: a) realizar el registro control, esto es en presencia del Cl^- extracelular, b) después cambiar la solución en el medio extracelular con el anión de prueba y volver a registrar la curva corriente voltaje, y c) regresar a la solución control conteniendo Cl^- y registrar por tercera ocasión la curva corriente voltaje en

la misma célula. De esta forma obtuve valores del E_r pareados. Esto lo repetí para cada anión en cada canal.

Análisis

Para elegir los datos a analizar observé los E_r de Cl^- . Para incluir un par de E_r (control:prueba) en el análisis, los E_r de la corriente en presencia de Cl^- antes y después de aplicar el anión de interés debieron ser idénticos o similares.

Determiné los E_r con la finalidad de determinar la secuencia de selectividad iónica basada en permeabilidad de la siguiente manera. Grafiqué los registros en función del voltaje y tomé como E_r el voltaje en que la corriente tenía valor de cero. Con los E_r obtenidos calculé los cocientes de permeabilidad con la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (3). Para cancelar posibles errores en las medidas usé el corrimiento en el E_r ($\Delta E_r = E_{r,\text{Cl}^-} - E_{r,\text{X}^-}$) inducido por el reemplazo del Cl^- por un anión X^- (SCN^- , NO_3^- , Br^- , I^- o glutamato).

$$\text{(Ecuación 3)} \quad \frac{P_{\text{X}^-}}{P_{\text{Cl}^-}} = e^{\frac{\Delta E_r z F}{RT}}$$

Donde z es la valencia del ion, F la constante de Faraday, R la constante de los gases, T la temperatura y ΔE_r es el cambio de E_r . La secuencia de selectividad queda definida al ordenar de manera decreciente los cocientes $P_{\text{X}^-}/P_{\text{Cl}^-}$.

Estadística

Realicé los cálculos y las gráficas con el programa Origin 2018. Efectué la normalización de cada pareja de curvas corriente-voltaje (Cl^- : X^-) obtenidas de la misma célula usando la magnitud de la corriente control registrada en presencia de Cl^- a + 100 mV. Normalizar los datos me permitió corregir por el nivel de expresión de los canales. Los datos y las gráficas se presentan como el promedio \pm el error estándar del promedio. El número de células analizadas se indica como "n".

Para probar que los cocientes de permeabilidad a los aniones fueran diferentes con el canal silvestre TMEM16A y los canales mutados efectué análisis de T de student. Esto lo realicé con Origin 2018.

Resultados

Las células Hek 293 no expresan un canal de cloruro activado por calcio de manera endógena

Para demostrar que las corrientes que registré se deben a la expresión y activación del canal TMEM16A y no a la activación de un canal endógeno de las células HEK realicé los siguientes controles:

1. Registré y comparé las corrientes de células Hek 293 sin transfectar y de células transfectadas. Las células Hek 293 sin transfectar registradas en presencia de Cl^- en ambos lados de la membrana genera una corriente muy pequeña. La relación entre la corriente y el voltaje es casi una función lineal del voltaje. El valor más grande de esta corriente fue de $+0.07 \pm 0.0$ nA, a +100 mV. En cambio, en las mismas condiciones de registro las células transfectadas con el canal TMEM16A silvestre generan una corriente rectificante hacia el exterior (Fig. 10a). La corriente es muy grande a valores positivos de voltaje, a +100 mV tiene un valor promedio de $+0.69 \pm 0.1$ nA, mientras que a -100 mV, el valor promedio fue de $+0.04 \pm 0.0$ nA. Una diferencia importante entre ambos grupos de datos es el valor del E_r de inversión de la corriente. Las corrientes registradas de células transfectadas con TMEM16A tiene un E_r de -27.5 ± 2.3 mV mientras que las corrientes registradas de las células Hek 293 sin transfectar tienen un E_r de -93.2 ± 0.0 nA mV. Este resultado indica claramente que las células transfectadas generan una corriente cuyo E_r es cercano al E_r del ion Cl^- (-31.6 mV) calculado con la ecuación de Nernst. Este no es el caso en la corriente registrada de células sin transfectar. Por lo tanto, concluyo que las células sin transfectar no generan una corriente de Cl^- y que cuando expreso a TMEM16A las células generan corrientes con una magnitud casi 10 veces mayor.

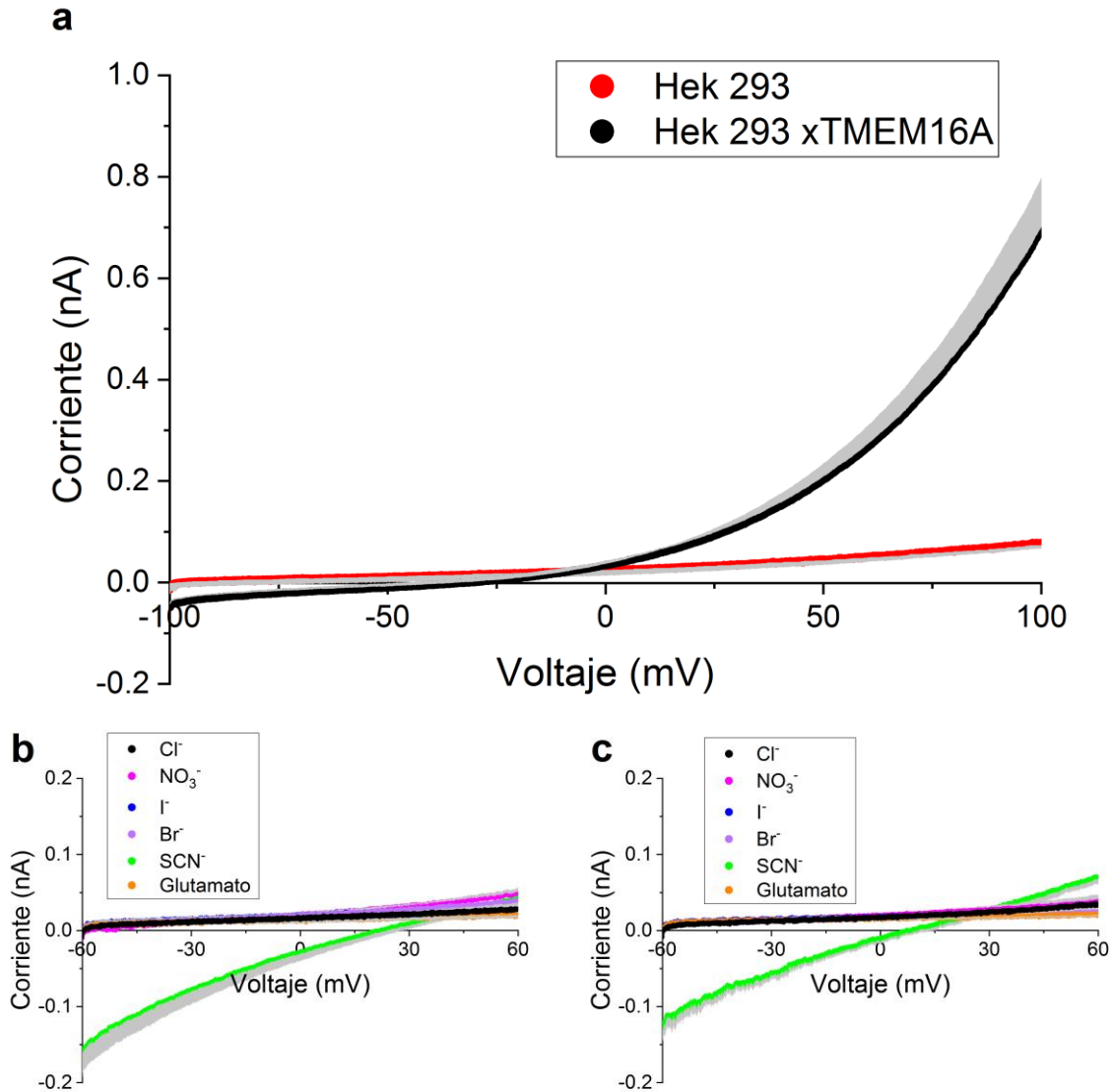


Fig. 10. Relación entre la corriente y el voltaje obtenidos de células Hek 293 que expresan y que no expresan TMEM16A

a) Curvas corriente-voltaje de la corriente de Cl⁻ fluyendo a través del canal TMEM16A silvestre (negro) y Hek 293 sin transfectar (rojo). El protocolo de voltaje utilizado consiste en una rampa que varía el voltaje en el lado intracelular desde -100 mV a +100 mV en 500 ms. La concentración extracelular de Cl⁻ fue de 140 mM, la intracelular fue de 40 mM y la concentración de Ca²⁺ libre intracelular de 0.5 μM. El E_r de la corriente registrada de células que expresan al TMEM16A fue de -27.5 ± 2.3 mV (n=10). El E_r esperado es de -30 mV.

b y c) Curvas corriente-voltaje de células Hek 293 que no expresan TMEM16A. Células Hek 293 sin transfectar (b; n=4-6). Células Hek 293 transfectadas con el vector sin el ADNc para la expresión de un canal (c; n=4-6). El protocolo de voltaje utilizado varía el voltaje

intracelular de -60 mV a $+60$ mV en 500 ms. Las curvas fueron determinadas en presencia de 139 mM de: SCN^- , NO_3^- , I^- , Br^- , Cl^- y glutamato. La concentración intracelular de Cl^- fue de 40 mM y 0.5 μM de Ca^{2+} intracelular. Note en b que el E_r no cambia al cambiar el anión en el baño.

Las relaciones corriente-voltaje graficadas son el promedio de los registros para el anión indicado. Las bandas grises indican el error estándar. El E_r corresponde al voltaje en que la corriente es cero.

2. Registré y comparé las corrientes de células Hek 293 sin transfectar y de células transfectadas con el vector sin gen codificante para canal. Para tener un control más completo, en este grupo de células las expuse a diferentes aniones extracelulares. Los aniones que probé son: Cl^- , SCN^- , NO_3^- , I^- , Br^- y glutamato. Tanto las células sin transfectar como las que portaron el vector que no codifica un canal generaron corrientes acarreadas por el ion Cl^- que tienen una forma lineal con el voltaje y son muy pequeñas (Fig. 10b-c). La magnitud promedio de las corrientes generadas por las células Hek 293 sin transfectar fue de 0.04 ± 0.0 nA a $+60$ mV. Las células transfectadas con el vector vacío generaron una corriente promedio de 0.07 ± 0.0 nA a $+60$ mV. Por otro lado, las corrientes que obtuve cuando expuse las células a los diferentes aniones son similares; se sobrepone en una misma gráfica. Exceptuando a las corrientes en presencia de SCN^- , no observé cambio en los E_r entre los cambios de solución de Cl^- a NO_3^- , I^- , Br^- y glutamato.

Los resultados de estos dos experimentos (magnitud pequeña de la corriente, la forma de las relaciones corriente voltaje, y los E_r) me llevan a concluir que las corrientes generadas por la transfección de TMEM16A no corresponden a una corriente endógena de la célula.

Alterar la estructura química del sitio de unión a calcio mediante mutagénesis altera la selectividad aniónica del canal TMEM16A

Para determinar la función del sitio de pegado de Ca^{2+} en la selectividad iónica de TMEM16A, analicé tres mutantes además del canal silvestre que sirve de control. Estas mutantes conservadas fueron E702Q, E705Q, y la doble mutante

E702Q/E705Q. Un aspecto importante de estas mutantes es que tienen una muy baja sensibilidad a Ca^{2+} comparada con la del canal silvestre (Yu et al., 2012; Tien et al., 2014; Han et al., 2016). La EC_{50} de E702Q es $30 \mu\text{M}$ a $+60 \text{ mV}$, de E705Q es 2.9 mM a $+60 \text{ mV}$ (Tien et al., 2014) y de E702Q/E705Q es $26.5 \pm 3.6 \mu\text{M}$ a $+80 \text{ mV}$ (Han et al., 2016). En cambio, la EC_{50} del canal silvestre es $0.4 \mu\text{M}$ a $+60 \text{ mV}$ (Yang et al., 2008). Esto sugiere que la probabilidad de que el Ca^{2+} se una al sitio unión a Ca^{2+} mutado es muy baja.

Potenciales de inversión de la corriente del canal silvestre TMEM16A

Los registros que obtuve con TMEM16A silvestre cuando el canal se activa en presencia de Cl^- extracelular y después de haber substituido el Cl^- extracelular por otro anión mantienen en casi todos los casos la rectificación saliente (Fig. 11). Esto es, la corriente a voltajes positivos es mayor que a voltajes negativos. Excepto la corriente generada con glutamato (Fig. 11e), que tiene una forma casi lineal con el voltaje.

Por otra parte, las corrientes con los aniones de prueba SCN^- , NO_3^- , I^- y Br^- muestran en general un incremento de la corriente respecto al registro control en presencia de Cl^- . El mayor aumento en la magnitud de la corriente es cuando la célula se expuso a SCN^- en la solución extracelular (Fig. 11d). La magnitud de la corriente incrementó 5.44 ± 0.39 veces a $+100 \text{ mV}$. En contraste, la corriente más pequeña se registró con glutamato. En este caso la magnitud de la corriente fue de 0.07 ± 0.01 veces la corriente en presencia de Cl^- a $+100 \text{ mV}$. Por lo tanto, debido a que la corriente en presencia de glutamato es muy pequeña, podemos concluir que el glutamato es impermeable a través del canal TMEM16A.

Uno de los valores más importantes que se determinan de las corrientes graficadas como función del voltaje es el E_r . El E_r control, esto es en presencia del anión Cl^- en el baño, fue de $-25.2 \pm 2.10 \text{ mV}$ ($n=11$). En las mismas células cambié el Cl^- por el SCN^- y registré la curva corriente voltaje. A partir de ella determiné el E_r , mismo que fue $-44.9 \pm 2.41 \text{ mV}$ ($n=11$). Este E_r es más negativo que para el registro en iones Cl^- . Este ejercicio lo repetí para todos los aniones. En todos los casos, el E_r fue negativo, excepto con el glutamato cuyo E_r fue positivo.

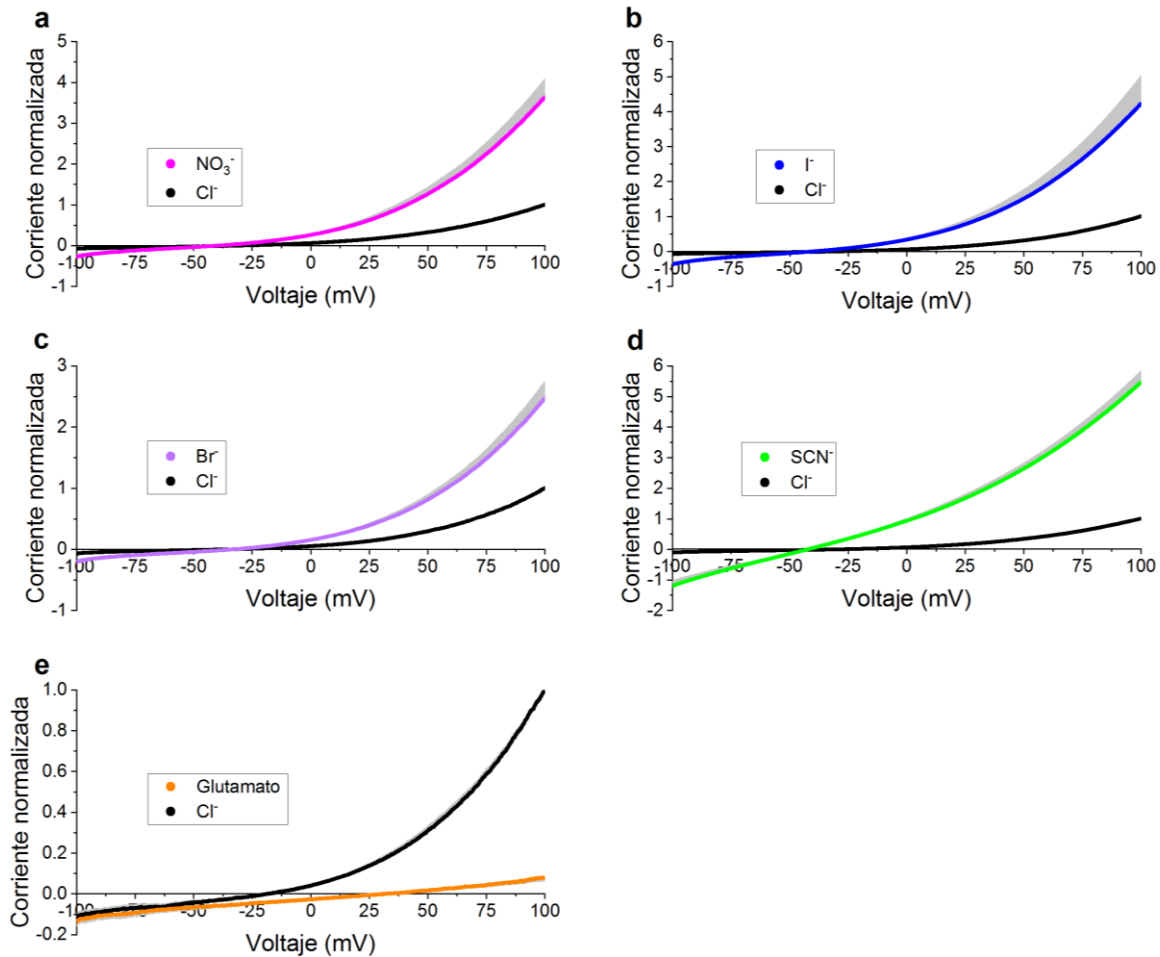


Fig. 11. Potenciales de inversión de la corriente a través del canal TMEM16A silvestre

Relaciones corriente-voltaje en diferentes condiciones iónicas. Se muestran los trazos promedio de la corriente normalizada. Los registros fueron realizados con una rampa de voltaje de -100 mV a $+100$ mV. La concentración del anión extracelular es de 139 mM, Cl^- intracelular de 40 mM y 0.5 μM de Ca^{2+} intracelular.

La curva negra es el promedio de las corrientes normalizadas registradas en condiciones control (139 mM de Cl^- de TEA extracelular). La otra línea es el promedio de las corrientes normalizadas obtenidas en presencia del anión extracelular de prueba señalado. Las bandas grises indican el error estándar. Los E_r promedios pareados fueron:

- a) con Cl^- -29.6 ± 3.39 mV y con NO_3^- -43 ± 3.22 mV ($n=6$).
- b) con Cl^- -30.6 ± 3.60 mV y con I^- -40.5 ± 3.65 mV ($n=6$).
- c) con Cl^- -30.2 ± 3.61 mV y con Br^- -35.6 ± 4.00 mV ($n=5$).
- d) con Cl^- -25.2 ± 2.10 mV y con SCN^- -44.9 ± 2.41 mV ($n=11$).

e) con Cl^- $-24.6 \pm 4.06 \text{ mV}$ y con glutamato $+22.9 \pm 7.95 \text{ mV}$ ($n=5$).

Con los E_r de las corrientes registradas con todos los aniones, calculé la diferencia entre el E_r control y el E_r del anión de prueba en cada célula. De esta manera determiné que la corriente en presencia de SCN^- tiene un E_r que es $-19.6 \pm 0.8 \text{ mV}$ más negativo que en presencia de Cl^- . Este mismo efecto resulta de exponer a la célula a una solución extracelular con NO_3^- , I^- y Br^- (Fig. 9a-c). El corrimiento del E_r para NO_3^- , I^- y Br^- es $-13.4 \pm 1.1 \text{ mV}$, $-9.9 \pm 1.5 \text{ mV}$ y $-5.4 \pm 1.9 \text{ mV}$, respectivamente. En cambio, con glutamato, el E_r se volvió más positivo (Fig. 11e), el E_r se movió $+47.3 \text{ mV}$ respecto a Cl^- . El corrimiento hacia valores negativos de voltaje es característico de aniones que son más permeables que el Cl^- mientras que el efecto opuesto es característico de aniones que son menos permeables que el Cl^- .

Potenciales de inversión de la corriente del canal mutante TMEM16A E702Q

Las relaciones corriente voltaje de este canal mutante son muy semejantes a las registradas con el canal silvestre. La corriente más grande registrada es la de SCN^- . Relativa a la corriente en presencia de Cl^- , La corriente en presencia de SCN^- fue 4.83 ± 0.15 veces más grande a $+100 \text{ mV}$ (Fig. 12d). A su vez, la corriente generada en presencia de I^- llegó a ser 2.86 ± 0.20 veces más grande a $+100 \text{ mV}$ (Fig. 12b). La corriente más pequeña es la generada con glutamato, 0.29 ± 0.15 a $+100 \text{ mV}$ (Fig. 12e).

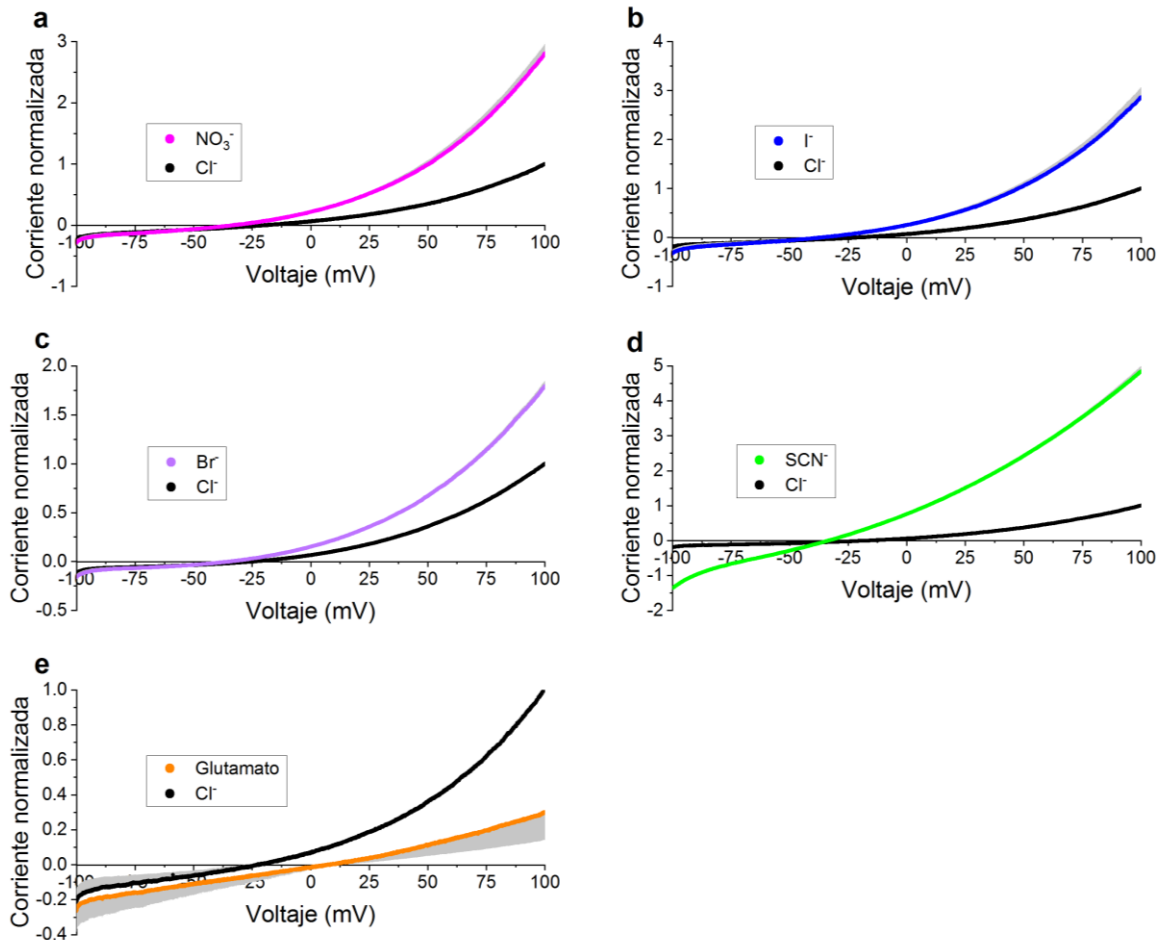


Fig. 12. Potenciales de inversión de la corriente a través del canal TMEM16A con la mutación E702Q

Relaciones entre la corriente y el voltaje en las condiciones iónicas indicadas. La línea negra es el control en presencia de 139 mM de Cl^- de TEA extracelular mientras que la de otro color es la condición de prueba. Se grafican los trazos promedio de la corriente normalizada y sus correspondientes errores estándar (gris). Los registros fueron realizados con una rampa de voltaje de -100 mV a +100 mV. La concentración del anión extracelular es de 139 mM, Cl^- intracelular de 40 mM y 5.0 μM de Ca^{2+} intracelular.

Los E_r fueron:

- a) con Cl^- -22.2 ± 3.15 mV y con NO_3^- -33.8 ± 3.86 mV (n=7).
- b) con Cl^- -25.5 ± 4.65 mV y con I^- -43.0 ± 5.2 mV (n=6).
- c) con Cl^- -25.9 ± 3.59 mV y con Br^- -37.2 ± 3.88 mV (n=6).
- d) con Cl^- -17.8 ± 2.55 mV y con SCN^- -33.4 ± 1.09 mV (n=7).
- e) con Cl^- -28.6 ± 4.59 mV y con glutamato $+12.3 \pm 6.71$ mV (n=6).

Las relaciones corriente voltaje en presencia de SCN^- , NO_3^- , I^- y Br^- invierten en voltajes negativos. Por ejemplo, el E_r más negativo corresponde a I^- , -43.0 ± 5.27 mV (n=6), mientras que su corriente control invirtió a -25.5 ± 4.65 mV (n=6) (Fig. 12b). Con glutamato el E_r fue positivo (Fig. 10e) al igual que en el canal silvestre arriba descrito. El E_r de la corriente en presencia de glutamato externo fue de $+12.3 \pm 6.71$ mV (n=6) mientras que los registros control en presencia de Cl^- fue de -28.6 ± 4.59 mV (n=6).

Si bien el E_r da información útil hay que tener en cuenta que a cada anión probado le corresponde un control. Por tanto, calculé los corrimientos del E_r . Los corrimientos para SCN^- , NO_3^- , I^- , Br^- y glutamato fueron -15.5 ± 2.4 mV, -11.5 ± 1.8 mV, -17.4 ± 1.4 , -11.2 ± 0.9 mV y 40.9 ± 8.8 mV respectivamente. Conviene resaltar que el corrimiento del E_r de Cl^- a glutamato es el único positivo.

Potenciales de inversión de la corriente del canal mutante TMEM16A E705Q

Los registros efectuados con esta mutante mostraron lo siguiente. La corriente que se generó en presencia de SCN^- fue la corriente más grande relativa a la corriente en presencia de Cl^- , al igual que pasó con el canal silvestre y la mutante E702Q. Esta corriente fue 5.92 ± 0.77 veces más grande a $+100$ mV (Fig. 13d). De nuevo la corriente más pequeña fue registrada con glutamato, que a $+100$ mV es 0.09 (Fig. 13e). Para analizar el efecto de SCN^- , la corriente control invirtió en -21.2 ± 2.30 mV (n=6) y la de SCN^- en -33.2 ± 1.53 mV (n=6). Por consiguiente, el corrimiento en el E_r fue negativo, -12.0 ± 1.3 mV. Observé un patrón similar cuando la solución externa se reemplazó por soluciones externas que contenían NO_3^- , I^- y Br^- (Fig. 13a-c). Por lo que se refiere a glutamato, el E_r de la corriente control en presencia de Cl^- fue -22.2 ± 2.78 mV (n=4) y en presencia de glutamato fue de $+24.0 \pm 1.35$ mV (n=4). El corrimiento en el E_r resultante fue $+46.25 \pm 2.7$ mV. Un valor positivo en el corrimiento indicaría que el glutamato es menos permeable que el Cl^- .

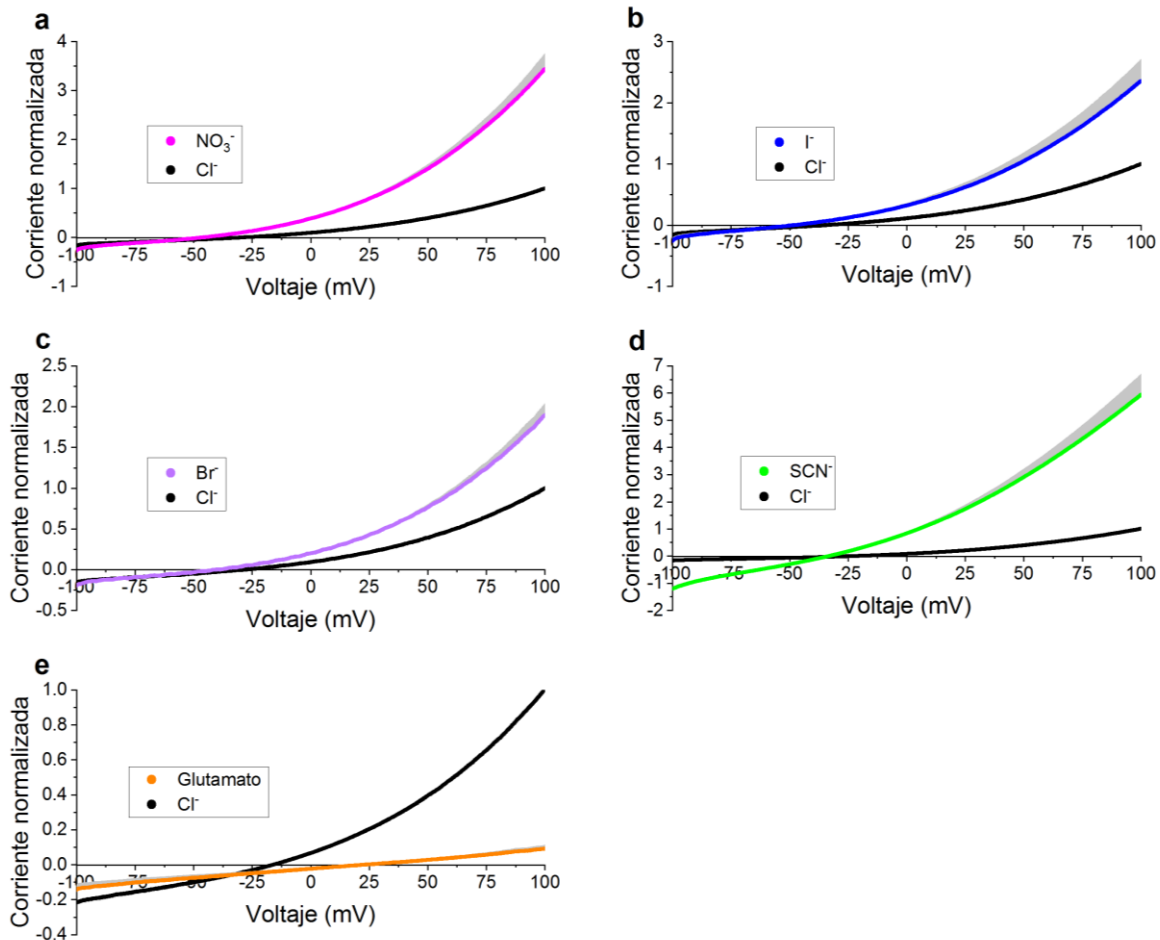


Fig. 13. Potenciales de inversión de la corriente a través del canal TMEM16A con la mutación E705Q

Relaciones entre la corriente y el voltaje en las condiciones iónicas indicadas. La línea negra representa el control en presencia de 139 mM de Cl^- de TEA extracelular mientras que la otra línea representa la condición iónica de prueba. Se grafican los trazos promedio de la corriente normalizada y su correspondiente error estándar (gris). Los registros fueron realizados con una rampa de voltaje de -100 mV a +100 mV. La concentración del anión extracelular es de 139 mM, Cl^- intracelular de 40 mM y 12.0 μM de Ca^{2+} intracelular. Los E_r fueron:

- a) con Cl^- -29.4 ± 3.93 mV y con NO_3^- -47.4 ± 3.11 mV ($n=7$).
- b) con Cl^- -30.3 ± 2.99 mV y con I^- -49.1 ± 2.33 mV ($n=6$).
- c) con Cl^- -26.1 ± 3.05 mV y con Br^- -40.3 ± 3.76 mV ($n=6$).
- d) con Cl^- -21.2 ± 2.30 mV y con SCN^- -33.2 ± 1.53 mV ($n=6$).
- e) con Cl^- -22.2 ± 2.78 mV y con glutamato $+24.0 \pm 1.35$ mV ($n=4$).

**Potenciales de inversión de la corriente del canal mutante *TMEM16A*
*E702Q/E705Q***

Finalmente registré la curva corriente voltaje de la doble mutante E702Q/E705Q en soluciones externas que contenían Cl⁻ y SCN⁻. Advertí la rectificación saliente de la corriente registrada contra el voltaje (Fig. 14a). La corriente del control empieza en -0.2 ± 0.03 veces más grande a -100 mV relativo a la corriente control en presencia de Cl⁻, mientras que la corriente de SCN⁻ es -1.4 ± 0.13 a -100 mV y a $+100$ mV sube hasta 3.7 ± 0.15 veces la magnitud de la corriente de Cl⁻. La doble mutante mostró el menor incremento de corriente a $+100$ mV al pasar de la solución control a la solución con SCN⁻ (Fig. 15). Mientras que los otros canales no son significativamente diferentes.

El E_r con Cl⁻ fue -16.4 ± 2.08 mV (n=9) y con SCN⁻ fue -16.2 ± 2.3 mV (n=9), por tanto, el corrimiento fue $+0.17 \pm 1.0$. En efecto SCN⁻ ya no es más permeable que Cl⁻, ahora es igualmente permeable que el Cl⁻. Para checar esto realicé en una misma célula cambios repetidos de soluciones con Cl⁻ a SCN⁻ y luego a Cl⁻. Esto lo repetí tanto como la célula lo permitió. Esto me permitió determinar un curso temporal de los E_r y de los correspondientes cocientes de permeabilidad SCN⁻ a Cl⁻.

La figura 14a muestra el promedio de las curvas corriente voltaje en presencia de Cl⁻ y después en presencia de SCN⁻. Se puede observar que la corriente incrementa en presencia de SCN⁻. Los E_r tienden a variar al momento iniciar el cambio de solución (Fig. 14b). Sin embargo, después de ~ 2 s tienden a alcanzar un valor estable. Observe que este valor parece ser el mismo en presencia de Cl⁻ que en presencia de SCN⁻.

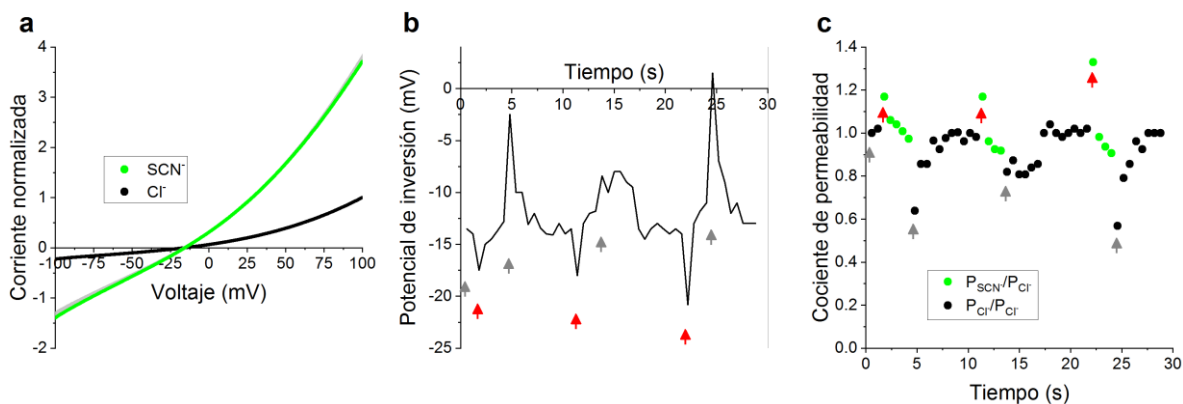


Fig. 14. TMEM16A con los residuos E702 y E705 mutados pierde selectividad al tiocianato

a) Relaciones entre la corriente normalizada promedio y el voltaje en presencia de Cl^- (negro) y en presencia de SCN^- (verde). Las bandas grises indican el error estándar. El E_r con Cl^- es -16.4 ± 2.08 mV y con SCN^- es -16.2 ± 2.3 mV.

b y c) E_r de la corriente generada por E702Q/E705Q graficada contra el tiempo (b) y el correspondiente cociente de permeabilidad $P_{\text{SCN}^-}/P_{\text{Cl}^-}$ de E702Q/E705Q contra el tiempo (c). Los puntos negros corresponden a $P_{\text{Cl}^-}/P_{\text{Cl}^-}$ mientras que los puntos verdes a $P_{\text{SCN}^-}/P_{\text{Cl}^-}$. Los datos se recabaron al cambiar de manera repetida la solución extracelular conteniendo Cl^- a una conteniendo SCN^- . Las flechas grises señalan el momento en que inicia el flujo de la solución de Cl^- de TEA y las flechas rojas señalan cuándo se cierra el flujo de Cl^- de TEA y empieza el de SCN^- de TEA.

El protocolo de voltaje utilizado consiste en una rampa que varía el voltaje en el lado intracelular desde -100 mV a +100 mV en 500 ms. La concentración del anión extracelular es de 139 mM, Cl^- intracelular de 40 mM y $12.0 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} intracelular.

Con los cocientes de permeabilidad (Fig. 14c) los valores son mayores cuando aumenta la concentración de Cl^- en el medio. Al cambiar la solución extracelular a SCN^- estos valores comienzan a bajar. Este último dato sugiere que TMEM16A pierde su habilidad para seleccionar a los aniones cuando tiene el sitio mutado.

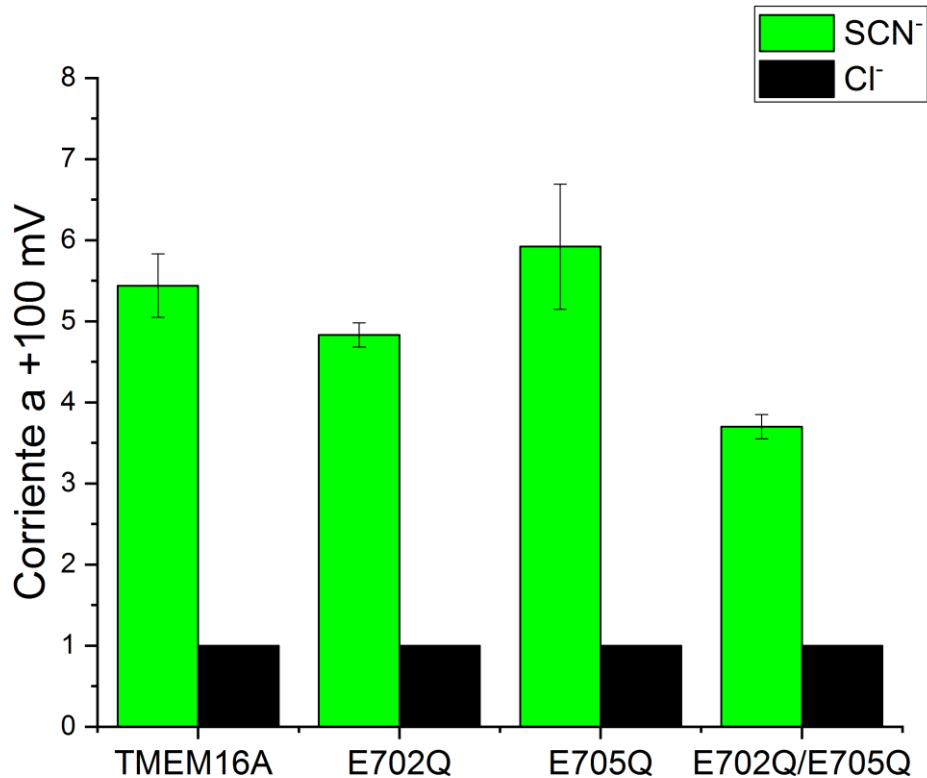


Fig. 15. La conductividad incrementó en presencia de tiocianato

La corriente incrementa al cambiar la solución externa de Cl⁻ a la de SCN⁻ en los 4 canales probados. Grafiqué el cociente de las corrientes registradas +100 mV en presencia de SCN⁻ (verde) dividida entre la corriente en presencia de Cl⁻ (negro). Las etiquetas del eje x indican el canal. La n es 11 con TMEM16A, 7 con E702Q, 6 con E705Q y 9 con E702Q/E705Q.

Cocientes de permeabilidad

Como se mencionó en la introducción, hay dos maneras de determinar la selectividad iónica de un canal. Por un lado, está calculando los cocientes de las corrientes mismos que son proporcionales a los cocientes de las conductancias. Los valores resultantes son extensivos ya que dependen de la concentración de los iones y del número de canales. Por otro lado, están los cocientes de los valores de los cocientes de permeabilidad. Estos valores son intensivos ya que no dependen

de la concentración ni del número de canales. Por lo tanto, este valor es un valor intrínseco del canal.

Los cocientes de permeabilidad son útiles para saber el comportamiento fisicoquímico relativo de un ion dentro del poro ya que resulta de dividir el producto de las constantes de difusión por el cociente de partición del anión en el poro. Debido a la dificultad para determinar estos valores, uno calcula el cociente de permeabilidades tomando como denominador la permeabilidad del anión fisiológicamente relevante, en este caso el anión Cl⁻. Por lo tanto, los cocientes que calculé me indican el comportamiento de diferentes aniones relativos a la del Cl⁻.

Usando los corrimientos en el E_r inducidos por cada anión (SCN⁻, NO₃⁻, Br⁻, I⁻, Cl⁻ y glutamato) calculé los cocientes de permeabilidad para los aniones en los canales TMEM16A silvestre, E702Q, E705Q y E702Q/E705Q (Tabla 3). Usé los cocientes para corregir por posibles errores que suceden durante el cambio de solución. Los cocientes los calcule con la ecuación 3 de Goldman-Hodgkin-Katz:

$$(Ecuación 3) \frac{P_{X^-}}{P_{Cl^-}} = e^{\frac{\Delta E_r z F}{RT}}$$

Tabla 3. Cocientes de permeabilidad P_X/P_{Cl} para los canales TMEM16A silvestre, E702Q, E705Q y E702Q/E705Q

| Anión | TMEM16A silvestre | | E702Q | | E705Q | | E702Q/E705Q | |
|------------------------------|-------------------|----|----------------|----|----------------|----|----------------|---|
| | P_X/P_{Cl^-} | n | P_X/P_{Cl^-} | n | P_X/P_{Cl^-} | n | P_X/P_{Cl^-} | n |
| SCN ⁻ | 2.16 ± .07 | 11 | 1.89 ± .18 | 7 | 1.60 ± .09 | 6 | 0.94 ± .08 | 9 |
| NO ₃ ⁻ | 1.74 ± .06 | 6 | 1.59 ± .11 | 7 | 2.06 ± .18 | 7 | - | - |
| I ⁻ | 1.49 ± .09 | 6 | 1.99 ± .11 | 6 | 2.13 ± .21 | 6 | - | - |
| Br ⁻ | 1.25 ± .10 | 5 | 1.56 ± .06 | 6 | 1.76 ± .13 | 6 | - | - |
| Cl ⁻ | 1.0 | 33 | 1.0 | 32 | 1.0 | 29 | 1.0 | 9 |
| Glutamato | 0.15 ± .03 | 5 | 0.27 ± .08 | 6 | 0.17 ± .02 | 4 | - | - |

Los cocientes de permeabilidad del canal silvestre TMEM16A (Tabla 3) fueron los siguientes: 2.16 ± 0.07 para SCN^- , $1.74 \pm .06$ para NO_3^- , 1.49 ± 0.09 para I^- , 1.25 ± 0.10 para Br^- , 1.0 para Cl^- y 0.15 ± 0.03 para glutamato. De manera semejante calculé los cocientes de permeabilidades para los aniones en los canales mutados. Los valores resultantes están listados en la tabla 3. Como se aprecia, los cocientes de permeabilidades para los aniones probados cambiaron. Podemos ver el anión I^- en el canal silvestre tenía un cociente de permeabilidad de 1.49 ± 0.09 mientras que el canal mutado E702Q el valor cambio a 1.99 ± 0.11 . En el caso de Br^- , en el canal silvestre tenía un cociente de permeabilidad de 1.25 ± 0.10 mientras que el canal mutado E702Q el valor cambio a 1.56 ± 0.06 . De hecho, la mutante E705Q también tiene cocientes de permeabilidad mayores para I^- y Br^- en comparación con TMEM16A silvestre (Fig. 16), 2.13 ± 0.21 y 1.76 ± 0.13 respectivamente. El cociente de permeabilidad en presencia de SCN^- en el canal E705Q fue de 1.60 ± 0.09 , mientras el cociente de permeabilidades para el SCN^- en la doble mutante E702Q/E705Q fue de 0.94 ± 0.08 . Estos datos nos indican que los canales con el sitio de unión a Ca^{2+} mutado seleccionan a los aniones de manera distinta. En particular podemos ver que el canal con el E705, único o doble, el canal pierde la habilidad para discriminar entre el SCN^- y el Cl^- .

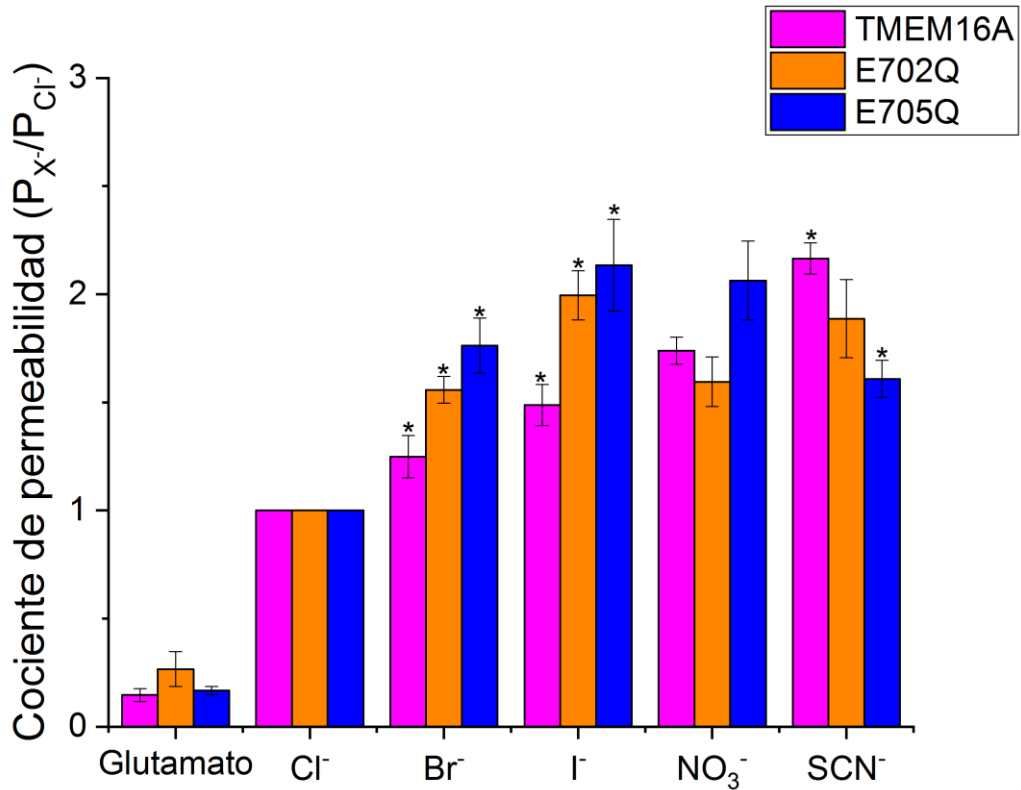


Fig. 16. Cocientes de permeabilidad P_x/P_{Cl} de TMEM16A y las mutantes E702Q Y E705Q

Cocientes de permeabilidad (P_x/P_{Cl}) calculados con la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (2) de TMEM16A silvestre ($n=5-11$), E702Q ($n=6-7$), y E705Q ($n=4-7$) con los aniones listados en el eje horizontal. Los * indican que el cociente de permeabilidad es significativamente diferente al de TMEM16A para el mismo anión.

Selectividad aniónica

Con el fin de establecer la secuencia de selectividad, esto es el orden en que los iones permean a través del poro del canal TMEM16A silvestre y las mutantes, ordené los cocientes de permeabilidades de mayor a menor (Tabla 4).

El canal TMEM16A silvestre tiene una secuencia de selectividad iónica que es: tiocianato (SCN⁻) > nitrato (NO₃⁻) > yoduro (I⁻) > bromuro (Br⁻) > Cl⁻ > glutamato.

Esta es la misma que ha sido determinada con anterioridad por otros grupos (Schroeder et al., 2008; Yang et al., 2008; Qu Z & Hartzell, 2000). En cambio el canal E702Q no distingue entre algunos de los aniones: I⁻ (1.99 ± 0.11) y SCN⁻ (1.89 ± 0.18), NO₃⁻ (1.59 ± 0.11) y Br⁻ (1.56 ± 0.06). Por su parte, el canal mutante E705Q también perdió selectividad. Los valores de los cocientes de permeabilidad indican que el canal no distingue entre las siguientes parejas de aniones: I⁻ (2.13 ± 0.21) y NO₃⁻ (2.06 ± 0.18), NO₃⁻ (2.06 ± 0.18) y Br⁻ (1.76 ± 0.13), Br⁻ (1.76 ± 0.13) y SCN⁻ (1.60 ± 0.09). No obstante, la secuencia cambió por efecto de la mutación, los aniones NO₃⁻, I⁻, Br⁻ y SCN⁻ aún son más permeables que el Cl⁻ tanto para el canal mutado E702Q como para el E705Q. Los únicos aniones que mantienen su posición en la secuencia son el Cl⁻ y el glutamato, que para TMEM16A y las mutantes son los menos permeables.

Tabla 4. Secuencia de permeabilidad aniónica de los canales TMEM16A silvestre y E702Q y E705Q

| TMEM16A | Secuencia de permeabilidad |
|-----------|--|
| Silvestre | SCN ⁻ > NO ₃ ⁻ > I ⁻ > Br ⁻ > Cl ⁻ > Glutamato |
| E702Q | I ⁻ = SCN ⁻ > NO ₃ ⁻ = Br ⁻ > Cl ⁻ > Glutamato |
| E705Q | I ⁻ = NO ₃ ⁻ = Br ⁻ = SCN ⁻ > Cl ⁻ > Glutamato |

Las secuencias de permeabilidad de los canales TMEM16A silvestre y las mutantes E702Q y E705Q (Tabla 4) son diferentes entre sí. Dado que las mutaciones provocaron cocientes de permeabilidad más cercanos, puedo interpretar que las mutantes perdieron la capacidad del canal silvestre de distinguir entre algunos de los aniones probados.

El cociente de permeabilidad no depende del radio aniónico pero si de la energía de hidratación

Debido a que el anión tiene un tamaño o radio y el poro del canal a través del cual el ion pasa tiene un radio muy pequeño, 2.5 Å (Paulino et al., 2017b), se podría suponer que el proceso de selectividad iónica depende del radio del anión

permeante. Esto es que la selectividad sea un problema estérico. Para analizar esta posibilidad, grafiqué los cocientes permeabilidades contra el radio del anión. En TMEM16A silvestre se observa que al incrementar el radio aniónico mayor es el cociente de permeabilidad, con la excepción de NO_3^- (Fig. 17a). El SCN^- tiene el radio aniónico más grande, 2.49 Å, a pesar de eso, en el canal silvestre fue el que tiene mayor permeabilidad. En cambio, en los canales mutantes, se observa una dependencia cóncava con el radio iónico. Con la mutante E702Q lo puntos se ven más desordenados, aunque los aniones más permeables que Cl^- son los de mayor radio aniónico. Este resultado me sugiere fuertemente que el radio iónico no es el determinante más importante para la selectividad aniónica, algo que otros autores ya han concluido en otros canales (Franciolini & Nonner, 1987; Ishikawa et al., 1993; Linsdell & Hanrahan, 1998; Rychkov et al., 1998).

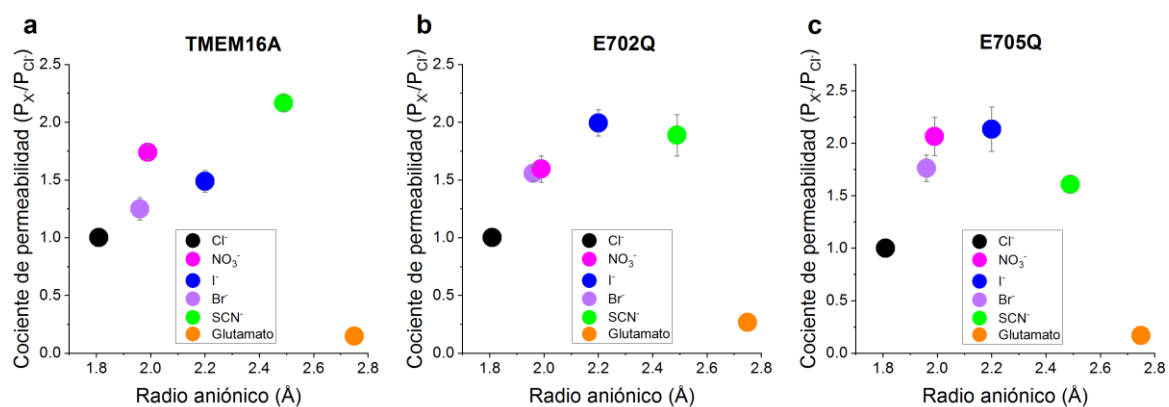


Fig. 17. Relación entre la selectividad iónica y el radio aniónico

Cocientes de permeabilidad de TMEM16A silvestre (a), E702Q (b), y E705Q (c) en relación a los radios iónicos de los aniones probados Cl^- , NO_3^- , I^- , Br^- y SCN^- . En el caso de los aniones de forma irregular, los radios se calcularon en base a una esfera de igual área de superficie. Los radios iónicos son: Cl^- 1.81 Å, NO_3^- 1.99 Å, Br^- 1.96 Å, I^- 2.20 Å, SCN^- 2.49 Å y glutamato 2.75 Å (Smith et al., 1999).

La segunda propiedad de los iones que es relevante para la selectividad es la hidratación. Debido a que el 70% de nuestras células es agua, los iones están hidratados por más de 4 moléculas de agua. Sin embargo, estudios estructurales

usando rayos x y cristales muestran que los iones potasio están casi deshidratados cuando se encuentran en el poro del canal (MacKinnon, 2004). Esto sugiere que el ion debe perder toda o parte del agua que lo rodea para entrar al poro. Aun cuando no tenemos esta información para los canales TMEM16A, podríamos suponer que algo parecido también sucede en la región más estrecha del canal. Esto se ha analizado con detalle en el canal de Cl^- activado por Ca^{2+} que es endógeno de las células acinares de la glándula parótida. Se ha observado que el cociente de permeabilidades es una relación lineal de la energía de hidratación (Pérez-Cornejo et al., 2004). Por lo tanto, para entender que está sucediendo con la selectividad de mis mutantes lleve a cabo un análisis similar.

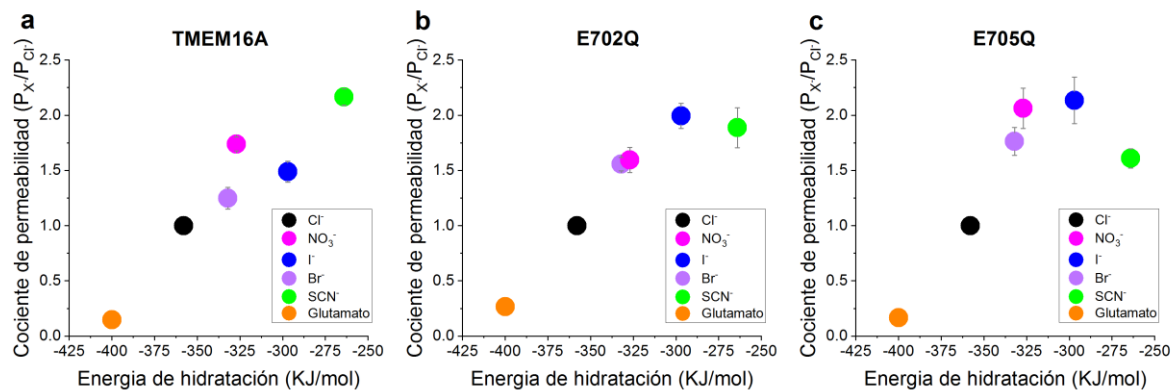


Fig. 18. Relación entre la selectividad iónica de TMEM16A y mutantes y la energía de hidratación de los aniones permeantes

Los cocientes de permeabilidad de TMEM16A silvestre (a), E702Q (b), y E705Q (c) en relación a la energía Born de hidratación. Los valores de energía de hidratación son: Cl^- -358 KJ/mol, NO_3^- -327 KJ/mol, Br^- -332 KJ/mol, I^- -297 KJ/mol, SCN^- -264 KJ/mol y glutamato -400 KJ/mol (Smith et al., 1999).

Observé que para el canal silvestre TMEM16A y el mutante E702Q, la relación entre el cociente de permeabilidades y la energía de hidratación de los aniones crece casi de manera lineal a medida que la energía de hidratación disminuye. Mientras más positiva es la energía de hidratación mayor es el cociente de permeabilidad (Fig. 18a-b). Esta relación tiene sentido ya que se podría suponer

que aquellos aniones que pierden de manera más sencilla su capa de hidratación ingresan al poro más fácilmente. Otra vez la excepción es NO_3^- . En el canal con la mutación E705Q en el sitio de unión a Ca^{2+} , la relación lineal se pierde (Fig. 18c). El cociente de permeabilidad disminuye a pesar de que la energía de hidratación disminuye. Esto podría sugerir que el canal con la mutación E705Q en el sitio de unión a Ca^{2+} modificado tiene una habilidad alterada para “deshidratar” o para competir con el agua por el anión.

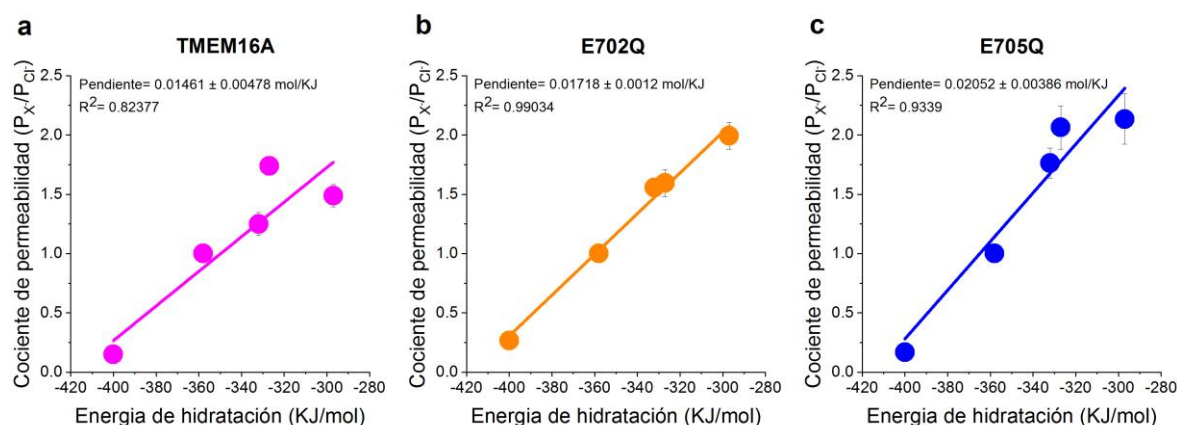


Fig. 19. Ajuste lineal de la relación entre la selectividad iónica de TMEM16A y mutantes y la energía de hidratación

Ajuste lineal de la relación entre los cocientes de permeabilidad y la energía de hidratación de los aniones Cl^- , NO_3^- , Br^- , I^- y glutamato. Los cocientes de permeabilidad de TMEM16A silvestre (a), E702Q (b), y E705Q (c) en relación a la energía Born de hidratación. Los valores de energía de hidratación son: Cl^- -358 KJ/mol, NO_3^- -327 KJ/mol, Br^- -332 KJ/mol, I^- -297 KJ/mol y glutamato -400 KJ/mol (Smith et al., 1999).

Por último, para comprender la tendencia lineal de la relación entre los cocientes de permeabilidad y las energías de hidratación, realicé un ajuste lineal a los datos del canal silvestre TMEM16A, y de las mutantes E702Q y E705Q excluyendo el anión SCN^- (Fig. 19). La pendiente de TMEM16A (Fig. 19a) indica que por que cada kJ/mol que la energía de hidratación aumenta el cociente de permeabilidades incrementa 0.01461. Las mutantes E702Q (Fig. 19b) y E705Q (Fig. 19c) también muestran el incremento de los cocientes de permeabilidad acorde a la energía de hidratación, 0.01718 y 0.02052 veces el cociente de permeabilidades

respectivamente. Eso explica el incremento en el cociente de permeabilidades que se observa en la figura 18.

Discusión

Selectividad iónica de TMEM16A

Schroeder y colaboradores (2008) reportaron la secuencia de selectividad iónica SCN^- (7.6 ± 0.4) > I^- (3.2 ± 0.1) > Br^- (1.7 ± 0.1) > Cl^- (1.0) basados en cocientes de permeabilidad para el canal de Cl^- activado por Ca^{2+} TMEM16A que se expresa de forma endógena en ovocitos de *Xenopus laevis*. Estos investigadores obtuvieron la misma secuencia de selectividad al transfectar ovocitos de *Ambistoma mexicanum* con el gen que codifica para TMEM16A de *Xenopus laevis*, la secuencia de permeabilidad fue: SCN^- (3.4 ± 1.8) > I^- (1.9 ± 0.6) > Br^- (1.4 ± 0.2) > Cl^- (1.0). Yang y colaboradores (2008) expresaron el canal TMEM16A al clonar el gen en un vector y transfectarlo en células Hek 293 y obtuvieron la secuencia de permeabilidad: NO_3^- (2.20) > I^- (1.85) > Br^- (1.77) > Cl^- (1.0). Peters y colaboradores (2015) también transfectaron y expresaron el canal en células Hek 293, la secuencia que obtuvieron es: NO_3^- (5.6 ± 0.6) > I^- (2.9 ± 0.2) > Br^- (1.5 ± 0.1) > Cl^- (1.0). Pérez-Cornejo y colaboradores (2004) analizaron los canales endógenos de células acinares de la glándula parótida de rata con las mismas soluciones extracelulares con que probé a TMEM16A. Obtuvieron la siguiente secuencia de permeabilidad: SCN^- (4.3 ± 0.4) > I^- (2.6 ± 0.1) > NO^- (2.0 ± 0.07) > Br^- (1.6 ± 0.08) > Cl^- (1.0) > glutamato (0.05 ± 0.02). A partir de todas estas secuencias es posible proponer que la secuencia de selectividad aniónica consenso del canal TMEM16A sería SCN^- > NO_3^- > I^- > Br^- > Cl^- > glutamato. La secuencia de permeabilidad que obtuve en células Hek 293 transfectadas con TMEM16A es SCN^- > NO_3^- > I^- > Br^- > Cl^- (1.0) > glutamato. Esta secuencia es la misma secuencia que la secuencia consenso. Sin embargo, hay discordancia en los valores absolutos de los cocientes de permeabilidad. Por ejemplo, el cociente de permeabilidad de SCN^- que en las células acinares es 3 veces más grande que el que obtuve en mi trabajo. Sin embargo, esto no solo se observa en mi trabajo. Al inicio de este párrafo listo los cocientes de permeabilidad. Ahí podemos ver que el cociente de permeabilidad para el SCN^- reportado varía ampliamente. Una posible explicación es el canal clonado

(mi trabajo; Schroeder et al., 2008) versus el endógeno (células acinares; *Xenopus laevis*). Sin embargo, una explicación adecuada no existe. Para eso se requiere realizar experimentos bajo las mismas condiciones para saber si algún componente ya sea de la membrana o del citoplasma puede contribuir al cociente de permeabilidad.

El sitio de unión a calcio del canal TMEM16A participa en la selectividad aniónica

Las secuencias de permeabilidad de los canales TMEM16A con las mutaciones E702Q y E705Q evidenciaron la importancia de estos dos aminoácidos en la selectividad aniónica. De ahí que los canales mutados no sólo mostraron una selectividad aniónica modificada, sino que también mostraron que se elimina la preferencia de un anión por otro.

La permeabilidad a SCN^- fue mayor en los canales silvestre, E702Q y E705Q. Sin embargo, el valor absoluto del cociente de permeabilidad disminuyó en la mutante E702Q de 2.16 ± 0.07 en el canal silvestre a 1.89 ± 0.18 . Esto se repitió para la mutante E705Q, el cociente de permeabilidad a SCN^- disminuyó a 1.60 ± 0.09 . En el caso de la permeabilidad a I^- , esta fue la tercera más permeable para el canal silvestre con el cociente de permeabilidad = 1.49 ± 0.09 . En las mutantes E702Q y E705Q el cociente de permeabilidad a I^- aumentó, a 1.99 ± 0.11 y 2.13 ± 0.21 respectivamente. Además, en los canales mutados seleccionan más a I^- que el canal silvestre, esto se puede apreciar en la tabla 4.

Las secuencias de selectividad iónica se muestran en la tabla 4, en ella se puede apreciar que las secuencias de selectividad de las mutantes cambiaron respecto al canal TMEM16A silvestre. En conclusión, la mutación del residuo E702 y del E705 modifica la habilidad del canal para seleccionar a los iones.

Radio iónico o deshidratación

El canal TMEM16A tiene una tendencia a ser más permeable a aniones con mayores valores de radio aniónico y de la energía de hidratación. Esto sugiere que ambos parámetros participan o son determinantes del proceso de selectividad iónica y permeación. La tendencia de TMEM16A respecto al tamaño e hidratación

no la cumple el ion NO_3^- , la secuencia de selectividad que generé no sigue completamente a la secuencia liotrópica $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{glutamato}$ como lo reportan en estudios del canal endógeno TMEM16A en *Xenopus laevis* o en células acinares (Qu & Hartzell., 2000; Pérez-Cornejo et al., 2004) o con el canal de la misma familia TMEM16B (Betto et al., 2014).

Debido a que se llevó a cabo una mutación conservada, es probable que el tamaño del poro no se vea modificado. Esto sugeriría que la secuencia de selectividad sería la misma en los canales silvestres y mutados si el diámetro del ion fuera el más importante. Sin embargo, este no fue el caso. En los canales mutantes los cocientes de permeabilidad cuando se grafican como función del diámetro tienen una forma cóncava.

El poro para abrirse necesita que el Ca^{2+} se una al sitio de unión. Esta interacción induce el movimiento de la hélice α_6 desde la hélice α_4 a la α_8 (Paulino et al., 2017b). En este trabajo hice experimentos con el canal TMEM16A silvestre y con canales TMEM16A cuyos sitios de unión a Ca^{2+} fueron modificados. Éste sitio de unión a Ca^{2+} es de naturaleza negativa por lo que es una barrera electrostática para los aniones. El número de cargas negativas aportadas por el sitio de unión a Ca^{2+} en el canal silvestre son 5. En cambio, en los canales con los residuos E702 o E705 mutados a glutamina el número de cargas será de -4 y de -3 en la doble mutante E702Q/E705Q. En contraste, el pegado de dos iones Ca^{2+} a su sitio 4 cargas negativas. Por lo tanto, el Ca^{2+} permite la permeación de aniones (Paulino et al., 2017b). Cuando el anión atraviesa el poro pasa por el sitio de pegado de Ca^{2+} , entonces pasa por la región con los dos iones Ca^{2+} . Los canales mutantes E702Q, E705Q y E702Q/E705Q no tienen el mismo ambiente electrostático y es posible que en el sitio de unión a Ca^{2+} con estas alteraciones sólo se pegue un ion Ca^{2+} . Las mutantes E702Q y E75Q resultan en sitios de unión a Ca^{2+} menos negativos, razón por la que disminuye la sensibilidad a Ca^{2+} (Yu et al., 2012; Tien et al., 2014). Estos cambios de carga de los residuos podrían provocar que los iones Ca^{2+} no sean igualmente atraídos o/y que el pegado sea inestable. Por lo tanto, el movimiento de la hélice α_6 podría no estar sucediendo en las mutantes. Esto podría ocasionar modificaciones en el tamaño del poro de los canales mutantes de una manera que

desconocemos. Quizás se vuelva más estrecho y eso modifique la permeabilidad. Otra posibilidad es que el diámetro del poro se ensanche lo cual favorece la entrada del agua al poro. Esto garantizaría que el ion esté hidratado. Un ion hidratado es menos propenso de pasar por el poro. La consecuencia de las mutantes es que el anión podría estar experimentando un ambiente distinto al que experimenta en el canal silvestre tal que modifica la permeabilidad. El hecho que la permeabilidad incrementa para los aniones más grandes y que la permeabilidad como función del tamaño tiene una forma cóncava en las mutantes me lleva a concluir que el tamaño del anión (Fig. 20) no parece ser el determinante de la selectividad.

Si bien el tamaño de los iones no parece ser determinante en la selectividad, el tamaño del poro es crítico para que los iones puedan pasar. La figura 20 muestra que el diámetro del poro con Ca^{2+} unido en su región más estrecha es de solo 2.5 Å mientras que el diámetro del Cl^- es de 3.62 Å y el del SCN^- es de 4.98 Å. Esto me sugiere que el poro del canal debe dilatarse para permitir el paso de los aniones. De otra forma no es posible imaginarse la permeabilidad iónica del canal. Quien lleva a cabo la dilatación y como sucede son preguntas abiertas.

La interacción entre el agua y el anión es directamente proporcional a la densidad de carga del anión y a su tamaño (Jackson, 2006). Cuando la densidad de carga es muy grande la energía de interacción es mayor. Esto sucede con los aniones pequeños como es el fluoruro y es menor con aniones grandes como es el I^- . Sin embargo, los aniones grandes como el I^- tienen una densidad de carga menor por lo tanto la energía de interacción disminuye. Sin embargo, el tamaño también importa ya que los aniones pequeños aun cuando tienen una densidad de carga grande, el número de moléculas de agua que pueden acomodar es pequeño debido a que su superficie es menor. En cambio, aniones grandes pueden acomodar más moléculas de agua. Así que el radio y la densidad de carga funcionan de una manera opuesta: a mayor radio mayor el número de moléculas de agua, pero a mayor radio menor densidad de carga para atraer estas moléculas (Jackson, 2006; Roux, 2017).

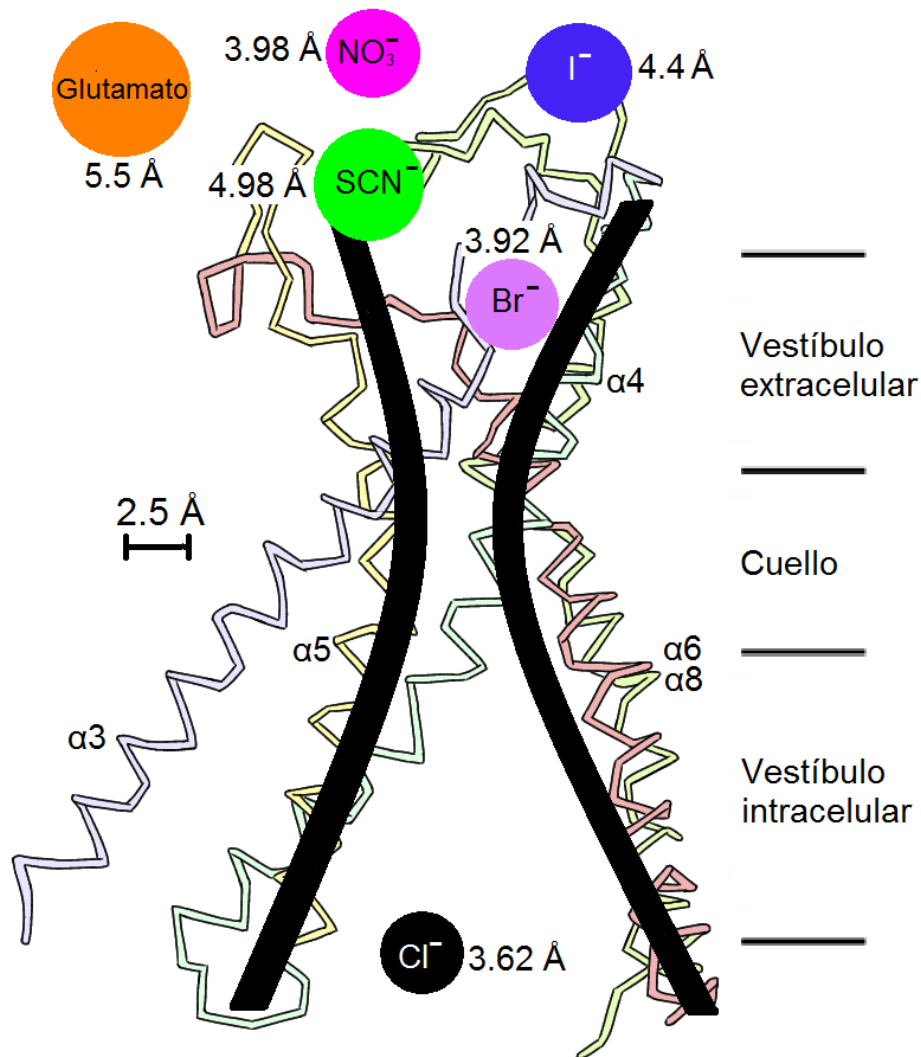


Fig. 20. Representación esquemática del poro de TMEM16A y el tamaño de los aniones permeantes

Representación del poro de TMEM16A y los aniones Cl^- , NO_3^- , I^- , SCN^- y Br^- a escala. Se representan las hélices $\alpha 3$ -8 que forman el poro. Las líneas gruesas negras enmarcan la vía de permeabilidad por la que atraviesan los aniones. La parte más angosta del poro o cuello es de 2.5 Å (Paulino et al., 2017b). Los aniones están representados en forma esférica con su diámetro indicado (Smith et al., 1999). A la derecha se indican las regiones del poro: vestíbulo extracelular, cuello y el vestíbulo intracelular. Éste último es el que está el lado del citoplasma celular.

Los vestíbulos extra e intracelular garantizan que el anión esté siempre hidratado aun cuando se encuentra dentro del poro. Sin embargo, cuando pasa por la región más estrecha debe deshidratarse parcialmente. Aquellos que se deshidratan fácilmente pasarán más fácilmente (Jackson, 2006). Esto último está de acuerdo con los datos que obtuve. Por ejemplo, el valor de la energía de hidratación de SCN^- este es -264 KJ/mol mientras que la del Cl^- es de -358 KJ/mol . Esto indica que es más fácil deshidratar al SCN^- que al Cl^- . El SCN^- tiene los mayores cocientes de permeabilidad de TMEM16A y E702Q. Pues bien, para ser "reconocido" por un canal, un ion debe deshidratarse al menos parcialmente. Esto implica que el costo de energía libre para la deshidratación debe ser compensado por las interacciones dentro del poro (Noskov, 2007).

Mis datos muestran que el cociente permeabilidades para los distintos aniones incremento casi linealmente con la energía de deshidratación. Este comportamiento no se mantuvo en la mutante E705Q. El valor de los cocientes de permeabilidad no parece incrementar en relación lineal con la energía de deshidratación. De hecho, el cociente de SCN^- es menor a lo esperado en la relación lineal. Esto podría sugerir que la mutación de los residuos E702 y E705 en el sitio de unión a Ca^{2+} altera la habilidad del poro de "deshidratar" el anión, a su vez generaría una estructura del poro que acomoda mejor al anión y por lo tanto su transferencia o participación al poro es mejor.

Con esta información puedo concluir que para el canal silvestre TMEM16A y las mutante E702Q y E705Q, el determinante más importante para la permeación y selectividad iónica es la energía de hidratación de los iones.

Limitaciones

En este trabajo no abordé la permeabilidad de los aniones NO_3^- , Br^- , I^- ni glutamato de la doble mutante E702Q/E705Q. Por lo que no puedo saber qué sucede con la secuencia de selectividad aniónica. Además, este problema requiere más estudios moleculares con herramientas estructurales que permitan visualizar el paso del anión a través del poro para así determinar qué sucede con dicho proceso en los canales mutados.

Conclusión

En este estudio, he proporcionado evidencia de que los residuos E702 y E705 son importantes para la selectividad aniónica, así como lo son para la activación de TMEM16A por Ca^{2+} (Yu et al., 2012; Tien et al., 2014; Paulino et al., 2017a). El sitio de unión a Ca^{2+} es necesario para la activación por Ca^{2+} y también ayuda a la selectividad aniónica.

Perspectivas

Estudios futuros tienen que determinar cómo es la interacción de los iones permeantes con los iones Ca^{2+} . Además, se debe abordar la pregunta acerca de cómo es el proceso de dilatación del poro que permita la permeabilidad de aniones con diámetros mayores que el diámetro del poro.

Referencias

- Arreola, J., & Hartzell, H. C. (2019). Wasted TMEM16A channels are rescued by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Cell calcium*, 84, 102103. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.102103>
- Arreola, J., Melvin, J. E., & Begenisich, T. (1996). Activation of calcium-dependent chloride channels in rat parotid acinar cells. *The Journal of general physiology*, 108(1), 35–47. <https://doi.org/10.1085/jgp.108.1.35>
- Bader, C. R., Bertrand, D., & Schwartz, E. A. (1982). Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina. *The Journal of physiology*, 331, 253–284. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014372>
- Betto, G., Cherian, O. L., Pifferi, S., Cenedese, V., Boccaccio, A., & Menini, A. (2014). 25. *The Journal of general physiology*, 143(6), 703–718. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411182>
- Bulley, S., Neeb, Z. P., Burriss, S. K., Bannister, J. P., Thomas-Gatewood, C. M., Jangsangthong, W., & Jaggar, J. H. (2012). TMEM16A/ANO1 channels contribute to the myogenic response in cerebral arteries. *Circulation research*, 111(8), 1027–1036. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.277145>
- Caci, E., Scudieri, P., Di Carlo, E., Morelli, P., Bruno, S., De Fino, I., Bragonzi, A., Gianotti, A., Sondo, E., Ferrera, L., Palleschi, A., Santambrogio, L., Ravazzolo, R., & Galiotta, L. J. (2015). Upregulation of TMEM16A Protein in Bronchial Epithelial Cells by Bacterial Pyocyanin. *PloS one*, 10(6), e0131775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131775>
- Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O., & Galiotta, L. J. (2008). TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5901), 590–594. <https://doi.org/10.1126/science.1163518>

- Cho, H., Yang, Y. D., Lee, J., Lee, B., Kim, T., Jang, Y., Back, S. K., Na, H. S., Harfe, B. D., Wang, F., Raouf, R., Wood, J. N., & Oh, U. (2012). The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nature neuroscience*, 15(7), 1015–1021. <https://doi.org/10.1038/nn.3111>
- Dang, S., Feng, S., Tien, J., Peters, C. J., Bulkley, D., Lolicato, M., Zhao, J., Zuberbühler, K., Ye, W., Qi, L., Chen, T., Craik, C. S., Jan, Y. N., Minor, D. L., Jr, Cheng, Y., & Jan, L. Y. (2017). Cryo-EM structures of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Nature*, 552(7685), 426–429. <https://doi.org/10.1038/nature25024>
- Dawson, D. (1996) Permeability and conductance of ion channels. In *Molecular biology of membrane transport disorders*, Schultz, S. (ed) pp 87 – 110. Plenum Press: New York
- Edlund, A., Esguerra, J. L., Wendt, A., Flodström-Tullberg, M., & Eliasson, L. (2014). CFTR and Anoctamin 1 (ANO1) contribute to cAMP amplified exocytosis and insulin secretion in human and murine pancreatic beta-cells. *BMC medicine*, 12, 87. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-87>
- Faria, D., Rock, J. R., Romao, A. M., Schweda, F., Bandulik, S., Witzgall, R., Schlatter, E., Heitzmann, D., Pavenstädt, H., Herrmann, E., Kunzelmann, K., & Schreiber, R. (2014). The calcium-activated chloride channel Anoctamin 1 contributes to the regulation of renal function. *Kidney international*, 85(6), 1369–1381. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.535>
- Ferrera, L., Caputo, A., & Galletta, L. J. (2010). TMEM16A protein: a new identity for Ca(2+)-dependent Cl⁻ channels. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(6), 357–363. <https://doi.org/10.1152/physiol.00030.2010>
- Ferrera, L., Caputo, A., Ubbly, I., Bussani, E., Zegarra-Moran, O., Ravazzolo, R., Pagani, F., & Galletta, L. J. (2009). Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing. *The Journal of biological chemistry*, 284(48), 33360–33368. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.046607>

- Franciolini, F., & Nonner, W. (1987). Anion and cation permeability of a chloride channel in rat hippocampal neurons. *The Journal of general physiology*, 90(4), 453–478. <https://doi.org/10.1085/jgp.90.4.453>
- Gyobu, S., Miyata, H., Ikawa, M., Yamazaki, D., Takeshima, H., Suzuki, J., & Nagata, S. (2015). A Role of TMEM16E Carrying a Scrambling Domain in Sperm Motility. *Molecular and cellular biology*, 36(4), 645–659. <https://doi.org/10.1128/MCB.00919-15>
- Han, Y., Zhang, S., Ren, S., Chen, Y., Yuan, H., Chai, R., Yu, H., Zhang, H., Zhan, Y., & An, H. (2016). Two Ca(2+)-Binding Sites Cooperatively Couple Together in TMEM16A Channel. *The Journal of membrane biology*, 249(1-2), 57–63. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9846-1>
- Heinze, C., Seniuk, A., Sokolov, M. V., Huebner, A. K., Klementowicz, A. E., Szijsártó, I. A., Schleifenbaum, J., Vitzthum, H., Gollasch, M., Ehmke, H., Schroeder, B. C., & Hübner, C. A. (2014). Disruption of vascular Ca²⁺-activated chloride currents lowers blood pressure. *The Journal of clinical investigation*, 124(2), 675–686. <https://doi.org/10.1172/JCI70025>
- Huang, F., Rock, J. R., Harfe, B. D., Cheng, T., Huang, X., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2009). Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21413–21418. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911935106>
- Huang, F., Zhang, H., Wu, M., Yang, H., Kudo, M., Peters, C. J., Woodruff, P. G., Solberg, O. D., Donne, M. L., Huang, X., Sheppard, D., Fahy, J. V., Wolters, P. J., Hogan, B. L., Finkbeiner, W. E., Li, M., Jan, Y. N., Jan, L. Y., & Rock, J. R. (2012). Calcium-activated chloride channel TMEM16A modulates mucin secretion and airway smooth muscle contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40), 16354–16359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214596109>
- Hwang, D. G., Qian, X., & Hornick, J. L. (2011). DOG1 antibody is a highly sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors in cytology cell blocks.

- American journal of clinical pathology, 135(3), 448–453.
<https://doi.org/10.1309/AJCP0PPKOBNDT9LB>
- Ishikawa, T., & Cook, D. I. (1993). A Ca²⁺-activated Cl⁻ current in sheep parotid secretory cells. *The Journal of membrane biology*, 135(3), 261–271.
<https://doi.org/10.1007/BF00211098>
- Jackson, M. (2006) Ion permeation and channel structure. In *Molecular and Cellular*. Jackson, M. pp 367 – 394. Cambridge University Press: United States of America
- Katoh, M., & Katoh, M. (2003). FLJ10261 gene, located within the CCND1-EMS1 locus on human chromosome 11q13, encodes the eight-transmembrane protein homologous to C12orf3, C11orf25 and FLJ34272 gene products. *International journal of oncology*, 22(6), 1375–1381.
- Kuruma, A., & Hartzell, H. C. (1999). Dynamics of calcium regulation of chloride currents in *Xenopus* oocytes. *The American journal of physiology*, 276(1), C161–C175. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.1.C161>
- Linsdell, P., & Hanrahan, J. W. (1998). Adenosine triphosphate-dependent asymmetry of anion permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *The Journal of general physiology*, 111(4), 601–614. <https://doi.org/10.1085/jgp.111.4.601>
- Ma, K., Wang, H., Yu, J., Wei, M., & Xiao, Q. (2017). New Insights on the Regulation of Ca²⁺ -Activated Chloride Channel TMEM16A. *Journal of cellular physiology*, 232(4), 707–716. <https://doi.org/10.1002/jcp.25621>
- MacKinnon R. (2004). Nobel Lecture. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction. *Bioscience reports*, 24(2), 75–100.
<https://doi.org/10.1007/s10540-004-7190-2>
- Miledi R. (1982). A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 215(1201), 491–497. <https://doi.org/10.1098/rspb.1982.0056>
- Ni, Y. L., Kuan, A. S., & Chen, T. Y. (2014). Activation and inhibition of TMEM16A calcium-activated chloride channels. *PLoS one*, 9(1), e86734.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086734>

- Noskov, S. Y., & Roux, B. (2007). Importance of hydration and dynamics on the selectivity of the KcsA and NaK channels. *The Journal of general physiology*, 129(2), 135–143. <https://doi.org/10.1085/jgp.200609633>
- O'Driscoll, K. E., Pipe, R. A., & Britton, F. C. (2011). Increased complexity of Tmem16a/Anoctamin 1 transcript alternative splicing. *BMC molecular biology*, 12, 35. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-12-35>
- Paulino, C., Kalienkova, V., Lam, A., Neldner, Y., & Dutzler, R. (2017b). Activation mechanism of the calcium-activated chloride channel TMEM16A revealed by cryo-EM. *Nature*, 552(7685), 421–425. <https://doi.org/10.1038/nature24652>
- Paulino, C., Neldner, Y., Lam, A. K., Kalienkova, V., Brunner, J. D., Schenck, S., & Dutzler, R. (2017a). Structural basis for anion conduction in the calcium-activated chloride channel TMEM16A. *eLife*, 6, e26232. <https://doi.org/10.7554/eLife.26232>
- Pérez-Cornejo, P., De Santiago, J. A., & Arreola, J. (2004). Permeant anions control gating of calcium-dependent chloride channels. *The Journal of membrane biology*, 198(3), 125–133. <https://doi.org/10.1007/s00232-004-0659-x>
- Peters, C. J., Yu, H., Tien, J., Jan, Y. N., Li, M., & Jan, L. Y. (2015). Four basic residues critical for the ion selectivity and pore blocker sensitivity of TMEM16A calcium-activated chloride channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), 3547–3552. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502291112>
- Qu, Z., & Hartzell, H. C. (2000). Anion permeation in Ca(2+)-activated Cl(-) channels. *The Journal of general physiology*, 116(6), 825–844. <https://doi.org/10.1085/jgp.116.6.825>
- Qu, Z., Wei, R. W., & Hartzell, H. C. (2003). Characterization of Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in mouse kidney inner medullary collecting duct cells. *American journal of physiology. Renal physiology*, 285(2), F326–F335. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00034.2003>
- Rubaiy, H. N., & Linsdell, P. (2015). Location of a permeant anion binding site in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore.

- The journal of physiological sciences : JPS, 65(3), 233–241.
<https://doi.org/10.1007/s12576-015-0359-6>
- Roux B. (2017). Ion channels and ion selectivity. *Essays in biochemistry*, 61(2), 201–209. <https://doi.org/10.1042/EBC20160074>
- Sagheddu, C., Boccaccio, A., Dibattista, M., Montani, G., Tirindelli, R., & Menini, A. (2010). Calcium concentration jumps reveal dynamic ion selectivity of calcium-activated chloride currents in mouse olfactory sensory neurons and TMEM16b-transfected HEK 293T cells. *The Journal of physiology*, 588(Pt 21), 4189–4204. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.194407>
- Segura-Covarrubias, G., Aréchiga-Figueroa, I. A., De Jesús-Pérez, J. J., Sánchez-Solano, A., Pérez-Cornejo, P., & Arreola, J. (2020). Voltage-Dependent Protonation of the Calcium Pocket Enable Activation of the Calcium-Activated Chloride Channel Anoctamin-1 (TMEM16A). *Scientific reports*, 10(1), 6644. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62860-9>
- Schroeder, B. C., Cheng, T., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2008). Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell*, 134(6), 1019–1029. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.003>
- Scudieri, P., Caci, E., Bruno, S., Ferrera, L., Schiavon, M., Sondo, E., Tomati, V., Gianotti, A., Zegarra-Moran, O., Pedemonte, N., Rea, F., Ravazzolo, R., & Galletta, L. J. (2012). Association of TMEM16A chloride channel overexpression with airway goblet cell metaplasia. *The Journal of physiology*, 590(23), 6141–6155. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.240838>
- Smith, S. S., Steinle, E. D., Meyerhoff, M. E., & Dawson, D. C. (1999). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Physical basis for lyotropic anion selectivity patterns. *The Journal of general physiology*, 114(6), 799–818. <https://doi.org/10.1085/jgp.114.6.799>
- Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., & Nagata, S. (2013). Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members. *The Journal of biological chemistry*, 288(19), 13305–13316. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457937>

- Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P. J., & Nagata, S. (2010). Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*, 468(7325), 834–838. <https://doi.org/10.1038/nature09583>
- Tien, J., Peters, C. J., Wong, X. M., Cheng, T., Jan, Y. N., Jan, L. Y., & Yang, H. (2014). A comprehensive search for calcium binding sites critical for TMEM16A calcium-activated chloride channel activity. *eLife*, 3, e02772. <https://doi.org/10.7554/eLife.02772>
- Wang, B., Li, C., Huai, R., & Qu, Z. (2015). Overexpression of ANO1/TMEM16A, an arterial Ca²⁺-activated Cl⁻ channel, contributes to spontaneous hypertension. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 82, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.02.020>
- Wang, M., Yang, H., Zheng, L. Y., Zhang, Z., Tang, Y. B., Wang, G. L., Du, Y. H., Lv, X. F., Liu, J., Zhou, J. G., & Guan, Y. Y. (2012). Downregulation of TMEM16A calcium-activated chloride channel contributes to cerebrovascular remodeling during hypertension by promoting basilar smooth muscle cell proliferation. *Circulation*, 125(5), 697–707. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.041806>
- Whitlock, J. M., & Hartzell, H. C. (2016). A Pore Idea: the ion conduction pathway of TMEM16/ANO proteins is composed partly of lipid. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 468(3), 455–473. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1777-2>
- Xiao, Q., Yu, K., Perez-Cornejo, P., Cui, Y., Arreola, J., & Hartzell, H. C. (2011). Voltage- and calcium-dependent gating of TMEM16A/Ano1 chloride channels are physically coupled by the first intracellular loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(21), 8891–8896. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102147108>
- Yang, H., Kim, A., David, T., Palmer, D., Jin, T., Tien, J., Huang, F., Cheng, T., Coughlin, S. R., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2012). TMEM16F forms a Ca²⁺-activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation. *Cell*, 151(1), 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.036>

- Yang, Y. D., Cho, H., Koo, J. Y., Tak, M. H., Cho, Y., Shim, W. S., Park, S. P., Lee, J., Lee, B., Kim, B. M., Raouf, R., Shin, Y. K., & Oh, U. (2008). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature*, 455(7217), 1210–1215. <https://doi.org/10.1038/nature07313>
- Yu, K., Duran, C., Qu, Z., Cui, Y. Y., & Hartzell, H. C. (2012). Explaining calcium-dependent gating of anoctamin-1 chloride channels requires a revised topology. *Circulation research*, 110(7), 990–999. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.264440>
- Zygmunt A. C. (1994). Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes. *The American journal of physiology*, 267(5 Pt 2), H1984–H1995. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.267.5.H1984>

