



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Activación por voltaje del canal de cloruro
activado por calcio, TMEM16A**

Tesis que presenta
Ma. Guadalupe Segura Covarrubias

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
Dr. Jorge Arreola

San Luis Potosí, S.L.P., septiembre 2020



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Activación por voltaje del canal de cloruro activado por Ca^{2+} , TMEM16A**" presentada para obtener el Grado de Doctor(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ma. Guadalupe Segura Covarrubias** y aprobada el **14 de agosto 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
Codirector de la tesis

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
Codirector de la tesis

Dr. Ataúlfo Martínez Torres
Miembro del Comité Tutorial

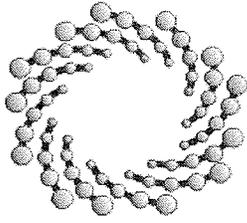
Dr. Braulio Gutiérrez Medina
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., y en el Laboratorio de Biofísica de Canales iónicos en el Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí bajo la codirección del Dr. Alejandro De Las Peñas Nava y el Dr. Jorge Arreola Gómez

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 297721) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Esta tesis fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante los proyectos: INTERACCIONES ENTRE CANALES IONICOS Y LÍPIDOS EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA. Proyecto Fronteras de la Ciencia 2016-01-1955. Y con el proyecto BIOFISICA MOLECULAR DE CANALES IONICOS Y SU RELEVANCIA FISIOLÓGICA. No Proyecto 219949.



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 112 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 2 días del mes de octubre del año 2020, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
Dr. Braulio Gutiérrez Medina

Presidente
Secretario

IPICYT
IPICYT

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Ma. Guadalupe Segura Covarrubias

sobre la Tesis intitulada:

Activación por voltaje del canal de cloruro activado por calcio, TMEM16A

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
Dr. Jorge Arreola Gómez (UASLP)

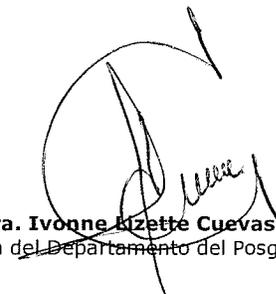
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:38 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 2 días del mes de octubre de 2020.


Dr. Marcial Bohilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Kizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

Con todo mi amor a mi esposo Rogelio, a Lulú y a Tito.

Con respeto y admiración a Jorge Arreola

Agradecimientos

Al **Dr Jorge Arreola** por inculcarme siempre la excelencia académica, por guiarme y formarme con su calidad humana y sublimidad científica. Por inculcarme ese amor a la ciencia y por despertar siempre mi curiosidad científica.

A la **Dra. Patricia Pérez** por sus comentarios tan directos que siempre me ayudaron a mejorar. Gracias por estar siempre allí para mí y por sus consejos y todo su apoyo.

Al **Dr Alejandro de Las Peñas Nava** por su respaldo y sus atinados comentarios a mi trabajo.

A **mis amigos y compañeros del laboratorio**, especialmente al **Dr Alfredo Sánchez** con quién además de hacer una buena amistad hicimos un buen equipo de trabajo.

A la **Q.F.B Carmen Yudith Hernández Carbayo** por todo su apoyo y colaboración en este trabajo, por compartirme su experiencia y fomentarme el trabajo en equipo. También quiero agradecer a la **Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo** por todo su apoyo técnico.

Quiero agradecer a **CONACYT** por otorgarme la beca con No de registro 297721 para llevar a cabo mis estudios de doctorado.

Índice General

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 CANALES DE CLORURO	3
1.2 EL CANAL DE CLORURO ACTIVADO POR CALCIO, ANOCTAMINA 1 O TMEM16A	8
1.3 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE TMEM16A	11
1.3.1 <i>Presión sanguínea</i>	12
1.3.2 <i>Secreción de mucina</i>	12
1.3.3 <i>Secreción de saliva</i>	12
1.3.4 <i>Secreción de insulina</i>	13
1.3.5 <i>Motilidad y capacitación del espermatozoide</i>	14
1.3.6 <i>Motilidad gastrointestinal</i>	14
1.3.7 <i>Dolor</i>	15
1.3.8 <i>Cáncer</i>	16
1.4 REGULACIÓN DEL CANAL TMEM16A	17
1.4.1 <i>Regulación de la activación por Ca²⁺</i>	17
1.4.2 <i>Protones intra y extracelulares</i>	18
1.4.3 <i>Aniones extracelulares</i>	19
1.4.4 <i>Componentes de la membrana celular</i>	20
1.4.5 <i>Regulación por interacción proteína-proteína</i>	23
1.4.6 <i>FKBP12 y CaN</i>	25
1.4.7 <i>Regulación farmacológica</i>	25
1.5 ESTRUCTURA DE TMEM16A	27
1.5.1 <i>Estructura</i>	27
1.5.2 <i>Dominios transmembranales (TMD)</i>	27
1.5.3 <i>Sitio de unión de Ca²⁺</i>	30
1.5.4 <i>Poros</i>	31
1.6 MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE TMEM16A	34
1.6.1 <i>Activación por Ca²⁺</i>	34
1.6.2 <i>Transiciones conformacionales dependientes de Ca²⁺ durante la activación de TMEM16A</i>	39
1.6.3 <i>Activación por calor</i>	41
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
2.1 HIPÓTESIS	49
2.2 OBJETIVOS	50
3 MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.1 CULTIVO CELULAR Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNA	52
3.2 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	52
3.3 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS	55
3.3.1 <i>Técnica Fijación de Voltaje (Patch Clamp)</i>	55
3.3.2 <i>Condiciones técnicas de registro</i>	59
3.4 SOLUCIONES DE REGISTRO	61
3.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	62
3.5.1 <i>Criterios de inclusión de células</i>	62

3.5.2	<i>Criterios de inclusión de datos para análisis</i>	63
3.6	ANÁLISIS DE DATOS	64
4	ACTIVACIÓN POR VOLTAJE DE TMEM16A EN AUSENCIA DE CA²⁺	68
4.1	INTRODUCCIÓN.....	68
4.2	RESULTADOS	69
4.2.1	<i>La probabilidad de apertura de TMEM16A activado por voltaje es muy baja</i>	69
4.2.2	<i>La I_{Cl, Vm} depende del anión extracelular</i>	71
4.2.3	<i>La I_{Cl, Vm} obtenida de la activación de TMEM16A por Vm se bloquea por los inhibidores ácido tánico y ácido antraceno-9-carboxílico (A-9-C)</i>	74
4.3	CONCLUSIÓN.....	76
5	EL PRIMER ASA INTRACELULAR Y SU PAPEL EN LA ACTIVACIÓN POR VOLTAJE DE TMEM16A	77
5.1	INTRODUCCIÓN.....	77
5.2	RESULTADOS	79
5.2.1	<i>El canal TMEM16A-ΔEAVK se activa débilmente por Vm y por Ca²⁺</i>	79
5.2.2	<i>El segmento EAVK modula la activación por voltaje de los canales TMEM16A-I637A y TMEM16A-Q645A</i>	80
5.2.3	<i>Estudio del papel del segmento ⁴⁴⁴EEEEEE⁴⁴⁸ en la activación por voltaje de TMEM16A</i>	82
5.2.4	<i>EAVK modula alexitéricamente el sitio de pegado de Ca²⁺ durante la activación por voltaje y por Ca²⁺ en TMEM16A</i>	84
5.2.5	<i>Reevaluación del segmento EAVK en la activación por Vm de TMEM16A</i>	87
5.3	CONCLUSIÓN.....	90
6	LA TITULACIÓN DEPENDIENTE DE VM DE LOS RESIDUOS ACÍDICOS DEL SITIO DE UNIÓN A CA²⁺ PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE TMEM16A EN AUSENCIA DE CA²⁺	92
6.1	INTRODUCCIÓN.....	92
6.2	RESULTADOS	92
6.2.1	<i>Acidificación intracelular facilita la activación de TMEM16A</i>	92
6.2.2	<i>La constante de equilibrio de la reacción de protonación es voltaje-dependiente</i>	95
6.2.3	<i>El sitio de unión de Ca²⁺ también sirve como sitio de unión del H⁺ intracelular</i>	99
6.2.4	<i>La mutación de residuos del sitio de pegado de Ca²⁺ disminuye, pero no abate el efecto del H⁺ intracelular sobre la activación por Vm de TMEM16A</i>	103
6.2.5	<i>La protonación dependiente de Vm del sitio de pegado de Ca²⁺ facilita la activación de TMEM16A por Vm debido al incremento en la probabilidad de apertura</i>	106
6.2.6	<i>La protonación dependiente del Vm o la mutación en el sitio de pegado de Ca²⁺ corre la dependencia con el Vm de TMEM16A favoreciéndola</i>	107
6.3	CONCLUSIÓN.....	109
7	DISCUSIÓN	111
7.1	ACTIVACIÓN POR VOLTAJE DE TMEM16A EN AUSENCIA DE CA ²⁺	111
7.2	PAPEL DE LOS RESIDUOS DEL PRIMERA ASA INTRACELULAR EN LA ACTIVACIÓN POR VOLTAJE: COMUNICACIÓN BIDIRECCIONAL CON EL SITIO DE UNIÓN A CA ²⁺	114
7.3	PROTONACIÓN DEPENDIENTE DE VM PERMITE LA ACTIVACIÓN DE TMEM16A POR VOLTAJE EN AUSENCIA DE CA ²⁺ INTRACELULAR.....	116

7.4 IMPORTANCIA FISIOLÓGICA	120
8 CONCLUSIONES	121
9 TRABAJO A FUTURO	122
10 REFERENCIAS.....	123
11 APÉNDICE A	137
12 APÉNDICE B	138
13 APÉNDICE C	139

Índice de figuras

FIGURA 1-1 CLADOGRAMA DE LA FAMILIA ANOCTAMINAS.	8
FIGURA 1-2 REPRESENTACIÓN ESQUEMATIZADA DE LA TOPOLOGÍA DEL CANAL TMEM16A.	11
FIGURA 1-3 ESTRUCTURA DEL CANAL TMEM16A.	28
FIGURA 1-4 DOMINIOS TRANSMEMBRANALES DE TMEM16A.	29
FIGURA 1-5 COMPARACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS TMEM16A Y TMEM16F.	30
FIGURA 1-6 SITIO DE UNIÓN DE Ca^{2+}	32
FIGURA 1-7 ESTRUCTURA DEL PORO DE TMEM16A.	34
FIGURA 1-8 ACTIVACIÓN POR Ca^{2+} DEL CANAL TMEM16A.	35
FIGURA 1-9 LA ACTIVACIÓN DE TMEM16A ES DEPENDIENTE DE LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+}	36
FIGURA 1-10 LA ACTIVACIÓN POR Ca^{2+} ES DEPENDIENTE DE V_m EN EL CANAL TMEM16A.	38
FIGURA 1-11 MOVIMIENTO DE LA HÉLICE TRANSMEMBRANAL 6 (TM6).	39
FIGURA 2-1 ACTIVACIÓN DE TMEM16A POR VOLTAJE.	45
FIGURA 3-1 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL MÉTODO DE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA AL SITIO QUIKCHANGE II ...	55
FIGURA 3-2 ESQUEMA QUE DESCRIBE LA TÉCNICA DE FIJACIÓN DE VOLTAJE EN DOS CONFIGURACIONES.	56
FIGURA 3-3 LA TÉCNICA DE PATCH CLAMP.	59
FIGURA 3-4 PROTOCOLOS DE VOLTAJE.	60
FIGURA 4-1 ACTIVACIÓN POR VOLTAJE EN AUSENCIA DE CALCIO INTRACELULAR.	70
FIGURA 4-2 ACTIVACIÓN POR Ca^{2+} DE TMEM16A Y TMEM16B.	72
FIGURA 4-3 SECUENCIA DE SELECTIVIDAD ANIÓNICA PARA TMEM16A.	74
FIGURA 4-4 INHIBICIÓN DE LA I_{CL,V_m} DE TMEM16A POR ÁCIDO TÁNICO Y A-9-C.	75
FIGURA 5-1 ACTIVACIÓN POR V_m Y POR Ca^{2+} DE LA MUTANTE TMEM16A- Δ EAVK.	80
FIGURA 5-2 EFECTO DE LAS MUTANTES I637A Y Q645A SOBRE LA DEPENDENCIA CON EL V_m DE TMEM16A ISOFORMA "A" Y "AC".	81
FIGURA 5-3 RESIDUOS DE LA PRIMERA ASA INTRACELULAR CONTRIBUYEN POCO A LA ACTIVACIÓN POR V_m EN DEL CANAL TMEM16A.	83
FIGURA 5-4 ACTIVACIÓN DE LA MUTANTE ⁴⁴⁴ EEEE/ ⁴⁴⁷ KKKK POR VOLTAJE.	84
FIGURA 5-5 ACTIVACIÓN DEL CANAL TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q CON 0.2 μ M DE Ca^{2+} Y SIN Ca^{2+}	85
FIGURA 5-6 CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA Y ELECTROFISIOLÓGICA DEL CANAL TMEM16A- Δ EAVK-E702Q- E705Q.	87
FIGURA 5-7 ESTUDIO DEL SEGMENTO EAVK.	89
FIGURA 5-8 ESTUDIO DEL PAPEL DE LA K451 EN LA DEPENDENCIA CON EL V_m DEL CANAL TMEM16A.	90
FIGURA 6-1 PROTONACIÓN DEPENDIENTE DE V_m FACILITA LA ACTIVACIÓN POR V_m DE TMEM16A EN AUSENCIA DE Ca^{2+} INTRACELULAR.	94
FIGURA 6-2 ACIDIFICACIÓN INTRACELULAR NO ACTIVA CORRIENTES EN HEK-293.	95
FIGURA 6-3 ACTIVACIÓN POR V_m DE TMEM16A NO MUESTRA UN COMPORTAMIENTO ÓHMICO.	96
FIGURA 6-4 LA CONSTANTE DE EQUILIBRIO DE LA REACCIÓN DE PROTONACIÓN ES VOLTAJE-DEPENDIENTE.	97
FIGURA 6-5 PROTONACIÓN DEPENDIENTE DE VOLTAJE DE TMEM16A EN DOS PARCHES ESCINDIDOS.	98
FIGURA 6-6 ACTIVACIÓN POR VOLTAJE Y POR Ca^{2+} DE LA MUTANTE TMEM16A-E702Q-E705Q.	100
FIGURA 6-7 MUTAR LOS RESIDUOS ÁCIDOS QUE FORMAN EL SITIO DE UNIÓN DE Ca^{2+} POTENCIA LA ACTIVACIÓN POR V_m DE TMEM16A EN CONDICIONES DE Φ_i FISIOLÓGICAS.	102
FIGURA 6-8 CANALES CON MUTACIONES EN EL SITIO DE UNIÓN A Ca^{2+} SON MENOS SENSIBLES A ACIDIFICACIÓN INTRACELULAR.	104
FIGURA 6-9 LA MUTACIÓN DEL SITIO DE PEGADO DE Ca^{2+} NO ABATE POR COMPLETO LA DEPENDENCIA CON LE V_m DE LA PKA.	105
FIGURA 6-10 ACIDIFICACIÓN INTRACELULAR FACILITA LA ACTIVACIÓN DE TMEM16A POR INCREMENTO EN LA PROBABILIDAD DE APERTURA.	107

FIGURA 6-11 LOS RESIDUOS ÁCIDOS DEL SITIO DE UNIÓN DE Ca^{2+} CONTROLAN LA ACTIVACIÓN DEPENDIENTE DE V_m DE TMEM16A.....	109
FIGURA 7-1 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL MECANISMO DE ACTIVACIÓN POR PROTONACIÓN DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DE V_m.....	117

Índice de tablas

TABLA 1 CEBADORES OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA.	53
TABLA 2 PARÁMETROS PARA LAS CICLOS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	54
TABLA 3 COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES CONTROL (MM) INTERNAS Y EXTERNA USADAS EN EXPERIMENTOS DE FIJACIÓN DE VOLTAJE.	62

Abreviaturas

[X]_{i,e}	Concentración interna (i) o extracelular (e) del ion X.
Cl⁻	Ion cloruro
NO₃⁻	Ion nitrato
SCN⁻	Ion tiocianato
I⁻	Ion ioduro
Br⁻	Ion Bromuro
CaCC	Canales de Cl ⁻ activados por Ca ²⁺
Ca²⁺	Ion Calcio
H⁺	Protón
I_{Cl, V_m}	Corriente de Cl ⁻ inducida por voltaje.
V_m	Voltaje de membrana
V_r	Potencial de inversión de una corriente iónica
V_{0.5}	Voltaje al cual la probabilidad de activación es 0.5
t	Tiempo
ms	Milisegundos
s	Segundos
nA	Nano amperios
τ	Constante de tiempo
Glu	Ácido glutámico
Asp	Ácido aspártico
His	Histidina
Cys	Cisteína
Ala	Alanina
Gln	Glutamina
HEK-293	Células de riñón de embrión humano 293

Resumen

Activación por voltaje del canal de cloruro activado por calcio, TMEM16A

TMEM16A es un canal de cloruro activado por calcio que controla el transporte de líquido epitelial, la contracción del músculo liso, el bloqueo de la poliespermia y la liberación de insulina, entre otros. La activación de TMEM16A es un mecanismo complejo que requiere incrementos de calcio intracelular y despolarizaciones de la membrana plasmática. TMEM16A no tiene un sensor de voltaje canónico, sin embargo, puede ser activado por la diferencia de voltaje a través de la membrana, aunque el mecanismo aún no está claro. En este trabajo mostramos que el canal TMEM16A silvestre se activa por voltaje en ausencia de calcio. Las corrientes muestran una fuerte rectificación saliente, la activación es muy rápida (<1 ms) y no presentan corrientes de cola. La corriente activada por voltaje depende del anión permeante y se inhibe por los ácidos tánico y antraceno-9-carboxílico. La amplitud de la corriente activada por voltaje es pequeña, sin embargo, se incrementa al eliminar los residuos 448EAVK451 en el primer asa intracelular y al mutar los residuos E702Q-E705Q que forman parte del sitio de unión de calcio. La mutación o eliminación de los residuos 444EEEEAVK451 modula la activación por calcio y por voltaje, pero no explica la dependencia con el voltaje de TMEM16A. En este trabajo planteamos la hipótesis de que la titulación dependiente de voltaje de los residuos del sitio de unión de calcio permite la activación de TMEM16A. Para probar esto, registramos la actividad del canal a diferentes concentraciones de protones intracelulares. A medida que aumentaba la concentración de protones, incrementaba la corriente activada por voltaje. Para demostrar que estaban involucrados los residuos del sitio de unión de calcio, mutamos los residuos Glutámico / Aspártico a glutamina (para simular un Glutámico protonado permanente). Los canales mutados fueron más fáciles de activar a pH fisiológico. En particular, la respuesta de estos canales mutados a la acidificación intracelular disminuyó y se volvió independiente del voltaje. En conclusión, la protonación dependiente de voltaje de los residuos glutámico / aspártico del sitio de unión de calcio, resalta la activación de TMEM16A por voltaje en ausencia de calcio intracelular. Las corrientes resultantes fueron rápidas, sostenidas y lo suficientemente grandes como para regular la excitabilidad eléctrica.

PALABRAS CLAVE: activación por voltaje de membrana, canales de cloruro, acidificación intracelular, TMEM16A.

Abstract

Voltage Activation of Calcium Activated Chloride Channel, TMEM16A

TMEM16A is a calcium-activated chloride channel that controls epithelial fluid transport, smooth muscle contraction, polyspermia blockade, and insulin release, among others. Activation of TMEM16A is a complex mechanism that requires increases in intracellular calcium and depolarizations of the plasma membrane. TMEM16A does not have a canonical voltage sensor, however it can be voltage-activated, although the mechanism is still unclear. In this work we show that the wild-type TMEM16A channel is voltage-activated in the absence of calcium. The currents show a strong outward rectification, the activation is very fast (<1 ms) and did not present tail currents. The voltage-gated current is dependent on the permeating anion and is inhibited by tannic and anthracene-9-carboxylic acids. The amplitude of the voltage-gated current is small; however, it is increased by eliminating the 448EAVK451 residues in the first intracellular loop and by mutating the E702Q-E705Q residues that are part of the calcium binding site. Mutation or deletion of residues 444EEEEAVK451 modulates calcium and voltage activation but does not explain the voltage dependence of TMEM16A. In this work we hypothesize that voltage-dependent titration of calcium-binding site residues enables activation of TMEM16A. To test this, we record channel activity at different concentrations of intracellular protons. As the concentration of protons increased, the voltage-gated current increased. To demonstrate that calcium binding site residues were involved, we mutated the Glutamic / Aspartic residues to glutamine (to simulate a permanent protonated Glutamic). Mutated channels were easier to activate at physiological pH. In particular, the response of these mutated channels to intracellular acidification decreased and became independent of voltage. In conclusion, the voltage-dependent protonation of the glutamic / aspartic residues of the calcium binding site highlights the activation of TMEM16A by voltage in the absence of intracellular calcium. The resulting currents were fast, sustained, and large enough to regulate electrical excitability.

KEY WORDS: membrane voltage activation, chloride channels, protonation voltage dependent.

1 **INTRODUCCIÓN**

Los canales iónicos son complejos macro proteicos de alto peso molecular que se localizan embebidos en los lípidos de las membranas biológicas. La función de estas proteínas es permitir el flujo de iones a través de la membrana, proceso muy importante para la homeóstasis de la célula.

Para eso, los canales iónicos tienen poros o vías de permeación a través del cual los iones fluyen una vez que el canal es activado. Los canales iónicos pueden ser activados por voltaje de membrana (V_m), por ligandos, y por cambios en las fuerzas en la membrana. Por ejemplo, los canales de sodio que participan en la generación del potencial de acción en neuronas o músculo son canales activados por V_m mientras que los canales de cloruro (Cl^-) activados por GABA (ligando) inhiben la función neuronal en el sistema nervioso central.

Otra característica intrínseca de estas proteínas es su capacidad de seleccionar al ion que pasará a través del poro. Así tenemos, canales de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , etc. Otra propiedad importante que diferencia a los canales iónicos de transportadores primarios o secundarios es la alta velocidad a la que permiten el paso de los iones, ya que los transportadores tienen tasas de flujo de 10^0 - 10^4 iones/segundo y los canales iónicos tiene una tasa de arriba de 10^8 iones/segundo. Finalmente, los canales iónicos permiten el paso de los iones de manera pasiva en la dirección que dicta el gradiente electroquímico del ion permeante a través de la membrana.

Los canales pueden ser clasificados de acuerdo con el ion permeante (canales de Na^+ , canales de K^+ , canales de Ca^{2+} , etc.) o de acuerdo con el estímulo que los activa (canales activados por V_m , canales activados por ligandos, canales activados por volumen, etc.).

La función fisiológica asociada a los canales iónicos proviene de:

- a) Los cambios en el potencial a través de la membrana debido al movimiento rápido de los iones.
- b) Cambios en la concentración de Ca^{2+} , H^+ o Mg^{2+} en el citoplasma.
- c) Metabolismo de la proteína canal.
- d) Arrastre de agua y iones que acompañan al flujo de iones a través de los canales.

Los canales iónicos son fundamentales para la vida, ya que se encuentran ampliamente distribuidos en todos los tipos celulares del cuerpo humano, en donde participan en procesos de gran relevancia.

Uno de los ejemplos más importantes que demuestran el papel fisiológico de los canales iónicos es la generación de la actividad eléctrica en los tejidos musculares y neuronales. La actividad fisiológica del músculo esquelético y de una neurona se inicia por un potencial de acción, esto es una variación rápida en la diferencia de V_m a través de la membrana. Así, el potencial varía desde un valor negativo (-55 a -65 mV en neuronas o -80 a -90 en músculos) hasta un valor positivo, usualmente +40 a +50 mV. Después, la membrana se repolariza. Esta variación transitoria dura desde unos cuantos milisegundos en las neuronas hasta cientos de milisegundos en el músculo cardíaco o segundos en el ovocito de *Xenopus laevis* (13, 14, 76). La variación transitoria del potencial se debe a los flujos de los iones a través de la membrana. Por ejemplo, la subida rápida del potencial de acción en axones se debe a la entrada de Na^+ y la repolarización por la salida de K^+ . El acarreo al interior de neuronas de cationes o la salida de aniones, induce la activación de neuronas mientras que el efecto contrario ocurre cuando los cationes salen o los aniones entran (67).

Los flujos de los iones a través de los canales también tienen gran relevancia en procesos tales como: secreción de saliva, secreción de neurotransmisores como hormonas, motilidad del espermatozoide, fecundación y muchos otros.

1.1 CANALES DE CLORURO

Los canales de Cl^- son proteínas que permiten el paso selectivo y pasivo de Cl^- a través de la membrana. Estos canales permiten el paso de diversos aniones, sin embargo, debido a que el Cl^- es el anión más abundante en las células y este es el anión que fisiológicamente fluye por estos canales, se les llama canales de Cl^- . La homeostasis del Cl^- en la célula se logra con la participación de mecanismos de transporte activo primario y secundario y de transporte pasivo. Entre las proteínas que participan en el transporte pasivo de Cl^- están cuatro grandes familias de canales de Cl^- .

I. La familia CLC.

T. Jentsch fue el primero en clonar a un miembro de esta familia identificado como canal CLC-0 (79). Este canal es por mucho el más estudiado de la familia. La familia CLC está compuesta por nueve miembros, CIC-0, CIC-1, CIC-2, CIC-Ka y CIC-Kb, CIC-3, CIC-4, CIC-5, CIC-6, y CIC-7 (2, 15, 51, 79, 85, 87, 120, 121) . De estos los 5 primeros son canales activados por V_m que están en la membrana plasmática mientras que CLC-3 a CLC-7 son intercambiadores Cl^-/H^+ . CIC-3 es más probable encontrarlo en la membrana de organelos, pero puede también estar en la membrana plasmática (85). Finalmente, CIC4-CIC-7 se cree que se localizan predominantemente en la membrana de vesículas (15, 120).

Las proteínas CLC tienen una arquitectura homodimérica con dos poros que permiten el paso del Cl^- de manera independiente (45). En el caso de los intercambiadores, la región del poro tienen tres sitios (interno, central y externo) que ocupa el Cl^- y esta ocupación permite su flujo (46), por otro lado, en el caso de los canales iónicos, se ha propuesto que el poro solo cuenta con dos de estos sitios (interno y central). La vía de conducción de estas proteínas se controla por la presencia de un ácido glutámico conservado cuya cadena lateral se encuentra en el lumen del poro (45). Para que el poro pase de un estado no conductivo a uno conductivo, la cadena lateral también conocida como compuerta glutámica debe moverse para permitir la conducción iónica (41, 48).

Fisiológicamente el papel de todos los miembros CLC aún no es claro. Sin embargo, se sabe que el canal CIC-1 participa en la generación y propagación del potencial de acción en células musculares, mediante el mantenimiento del potencial de reposo. Por otro lado, el canal CIC-2 contribuye a la regulación de la actividad neuronal manteniendo la concentración interna de Cl^- (124, 138), a la secreción de aldosterona, y a la secreción de fluidos en el tracto gastro-intestinal (84, 130).

II. CFTR o canal regulador de la conductancia transmembranal activado por cAMP.

Esta familia está constituida por un solo miembro CFTR (39, 52, 135). Este canal ha sido por mucho el canal de Cl^- más estudiado debido a que la delección del residuo fenilalanina en la posición 508 provoca la letal enfermedad fibrosis quística. Este canal pertenece a la familia de proteínas llamada transportadores ABC. Se expresa en la membrana apical de varios epitelios, como el intestino, vías aéreas, glándulas secretoras, ducto biliar y en el epidídimo.

La proteína CFTR está formada por dos motivos repetidos, compuestos cada uno por un dominio hidrofílico compuesto por seis alfa hélices que atraviesa a la membrana (TMD, membrane-spanning domain) y una región hidrofílica que une ATP (NBF, nucleotide binding fold). Ambos motivos se encuentran unidos por un dominio citoplásmico (dominio R, codificado por el exón 13) que está formado por varios residuos cargados y contiene la mayoría de los sitios de fosforilación (39, 52).

Esta proteína participa en diversos procesos fisiológicos tales como en la secreción de electrolitos activada por cAMP y Ca^{2+} intracelular. CFTR es el principal transportador en la vía de salida luminal de Cl^- . Además de su función secretora, también regula la función de electrolitos al controlar la actividad del canal de Na^+ epitelial (ENaC) en los epitelio de absorción del colon y de las vías aéreas (97).

III. La Familia VRAC (volume-regulated anion channel)

El canal VRAC es el principal constituyente de la respuesta reguladora a la baja del volumen celular ante retos hipo osmóticos que llevan al hinchamiento celular.

Debido a que en condiciones de hinchamiento celular VRAC se activa, se le conoce como canal aniónico activado por volumen celular. Además de participar en la respuesta reguladora a la baja del volumen celular en condiciones hipotónicas, VRAC también participa en procesos como apoptosis (107) y en la regulación de la excitabilidad eléctrica de neuronas a través de la liberación de neurotransmisores provenientes de los astrocitos (75, 89, 111).

El canal VRAC está compuesto por 5 subunidades de la familia LRRC8: LRRC8A, LRRC8B, LRRC8C, LRRC8D y LRRC8E. Cada subunidad está formada por un dominio transmembranal que participa en la formación del poro, seguido del dominio C-terminal que contiene 15-17 repetidos ricos en leucina (1, 78, 122). Estas subunidades se combinan en un hetero-hexámero lo que da origen al canal VRAC. Para formar el hexámero siempre debe estar presente el monómero LRRC8A, sin embargo, se desconoce si las diferentes combinaciones de subunidades para formar el hetero-hexámero tienen un papel fisiológico. Lo que sí se conoce es que las propiedades de activación del canal son diferentes entre las diversas combinaciones.

IV. Canales de cloruro activados por ligando

El canal de cloruro dependiente de ligando (LGCC) es un subtipo importante de esta familia de proteínas de transporte. Los canales dependientes del ácido gamma-aminobutírico (GABA), específicamente el subtipo GABA-A, y los canales dependientes de la glicina son las formas más conocidas y mejor estudiadas de LGCC (3).

Todos los LGCC comparten una estructura proteica similar, sin embargo la diferencia entre estos está en el poro central con una afinidad diferente por cationes / aniones específicos (3). Las estructuras LGCC son proteínas transmembranales pentaméricas. A continuación se describen las características estructurales de cada una (18, 66):

1. Receptores GABA-A: constituidos por dos subunidades α , dos subunidades β y una subunidad γ o combinaciones de otras subunidades menos

abundantes como δ , π o las ρ , todas situadas en un anillo alrededor de un poro selectivo aniónico. Dentro de la conformación de la proteína, están presentes varios sitios alostéricos: dos que sirven como sitios activos para la unión a GABA y sitios de unión a varios agentes farmacológicos que incluyen benzodiazepinas, barbitúricos, zolpidem / zaleplón y flumazenil.

2. Receptores de glicina: constituidos por tres subunidades α y dos subunidades β , situadas en un anillo alrededor de un poro selectivo aniónico. Existen varios sitios activos alostéricos para la unión de glicina, así como un sitio de unión para estricnina, un alcaloide cristalino utilizado como pesticida.

Tanto los receptores GABA-A como los de glicina están presentes en el sistema nervioso central (SNC) cuyas funciones principales contribuyen a la señalización inhibitoria sináptica. De los dos, GABA-A se ha encontrado más ampliamente distribuido en todo el sistema nervioso, sin embargo la concentración principal de estos receptores se encuentra en el tálamo (específicamente el núcleo reticular), el hipotálamo, los ganglios basales y el hipocampo (56).

Los receptores GABA-A dentro de estas áreas funcionan como bucles de retroalimentación negativa. Específicamente en los ganglios basales, estos receptores trabajan para regular el control motor. Los receptores GABA-A se vuelven muy activos en momentos en que hay impulsos voluntarios y / o involuntarios para disminuir la actividad motora (63, 140). También el sistema GABAérgico es pertinente para comprender las enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Huntington (101).

Los receptores de glicina (GlyR) son canales iónicos inhibidores que contribuyen al control de la excitabilidad a lo largo del sistema nervioso central (SNC). Los GlyR se encuentran en la médula espinal y el tronco encefálico, y más recientemente se identificaron en regiones más altas del SNC, como el hipocampo y el núcleo accumbens. Los GlyR participan en la coordinación motora, los ritmos respiratorios, la transmisión del dolor y el procesamiento sensorial, y son blancos para moduladores fisiológicos y farmacológicos relevantes (18).

V. La familia Anoctaminas

La familia de Anoctaminas, anteriormente denominada como CaCC's, se encuentra solamente en eucariontes. En mamíferos está compuesta por 10 parálogos (ANO1-ANO10 o TMEM16A-TMEM16K), dentro de los cuales solo TMEM16A y TMEM16B son canales iónicos que permiten el paso del Cl^- cuando la concentración intracelular de Ca^{2+} incrementa. Por esta razón también se les conoce como canales de cloruro activados por Ca^{2+} (CaCC). Los canales comparten el 63% de identidad en secuencia lo que sugiere que evolutivamente dentro de la familia son los más cercanos (Figura 1-1, Ver anexo A). En cambio, TMEM16C, TMEM16D, TMEM16E, TMEM16F, TMEM16G, TMEM16I y TMEM16J son escramblasas de fosfolípidos que median la difusión pasiva de lípidos entre la monocapa interna y la externa (59, 115, 144). TMEM16J, TMEM16H y TMEM16K se localizan en baja cantidad en la membrana quedándose retenidas en el citosol (150).

Los canales iónicos TMEM16A y TMEM16B se expresan en diversos tejidos del cuerpo humano. Por ejemplo TMEM16A se expresa entre otros tejidos en músculo liso, venas y arterias así como en neuronas nociceptivas (86, 93, 95, 99); en el caso de TMEM16B se expresa en fotorreceptores, así como en neuronas olfatorias y en neuronas sensoriales vomeronasales (10, 11, 88). Estos canales participan en procesos fisiológicos de gran relevancia como: transporte iónico trans epitelial, sentido del olfato, foto transducción, contracción del músculo liso, nocicepción, proliferación celular y en el control de la excitabilidad neuronal.

Los canales iónicos de esta familia muestran una estructura de homodímero con dos poros. Cada monómero forma un poro. Topológicamente están compuestos por 10 hélices transmembranales y entre la hélice 7 y 8 se encuentra el sitio de unión de Ca^{2+} . El segmento N-Terminal, así como el C-Terminal se ubican en el citosol.

En este trabajo nos enfocamos en el canal TMEM16A, un miembro de esta familia, el cual describiremos con más detalle a continuación.

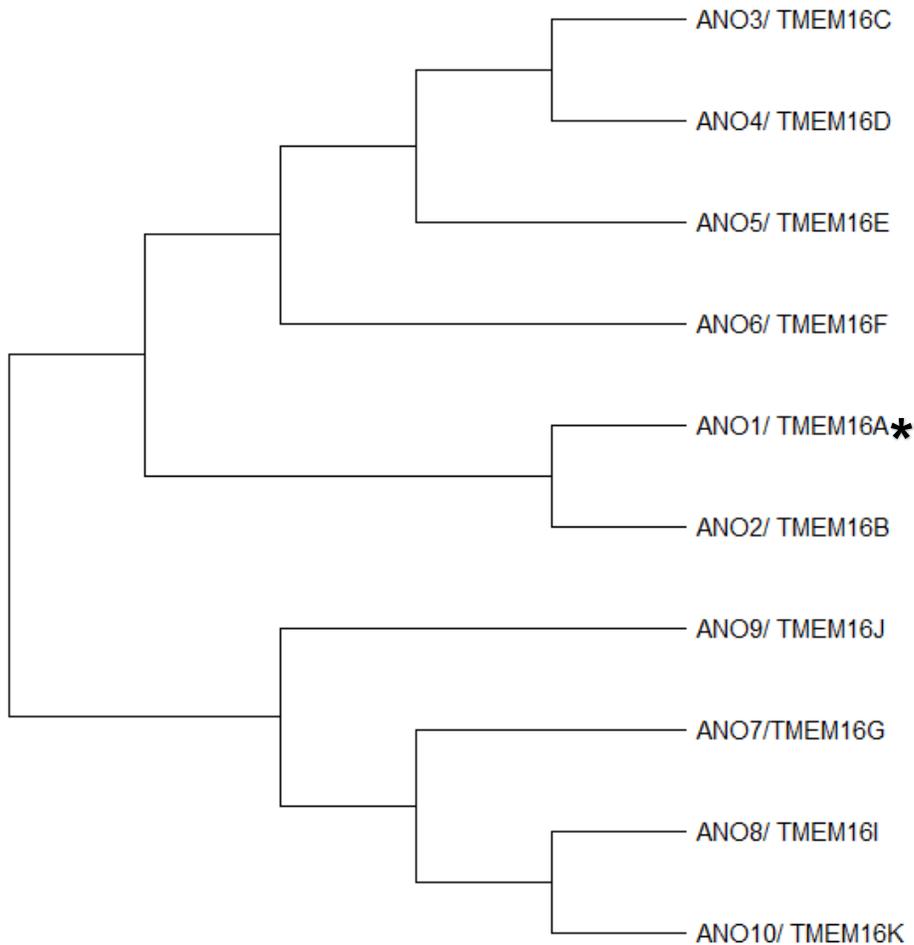


Figura 1-1 Cladograma de la familia Anoctaminas. La historia evolutiva se infiere utilizando el método Neighbor-Joining (166) . Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de las ramas = 4.35376877. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta (167) y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Este análisis involucró 10 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 8081 posiciones en el conjunto de datos finales. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (168)

1.2 EL CANAL DE CLORURO ACTIVADO POR CALCIO, ANOCTAMINA 1 o TMEM16A

Los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ (CaCCs) se describieron por primera vez en 1980's en ovocitos de *Xenopus*. Se fijó un V_m negativo de -100 mV y a medida que el potencial se volvía cada vez más positivo, la corriente externa transitoria primero

aumentó y luego disminuyó. La amplitud de la corriente transitoria aumentó cuando se aumentó la concentración externa de Ca^{2+} ; y la corriente se eliminaba por Mg^{2+} . Esto sugería cuando la membrana se despolariza, los iones Ca^{2+} entran en el ovocito y desencadenan una corriente saliente de Cl^- (100).

Posteriormente se encontró que había corrientes activadas por calcio en otros tipos celulares. Ejemplo de estos son: células epiteliales, fotorreceptores, receptores del olfato, células cardiacas, músculo liso y cardiaco, linfocitos, adipocitos café, hepatocitos, células beta secretoras de insulina, glándulas mamarias, glándulas sudoríparas, entre muchos otros tipos celulares (60).

Los canales CaCCs se activan por incrementos en Ca^{2+} citosólico. Estos incrementos se originan por la liberación de posas intracelulares o por el influjo a través de canales de calcio de la membrana. Las características más comunes de CaCCs son: 1) los iones I^- y SCN^- son más permeables que el Cl^- (118), 2) estos canales pueden activarse por Ca^{2+} intracelular en un intervalo de concentración de 0.2-1 μM y 3) la activación del canal se modula por el potencial de membrana (6, 60, 110).

Se realizaron varios intentos para identificar las proteínas que conforma a los CaCCs. El primer candidato fue la proteína CLCA. Esta proteína se aisló de la tráquea de bobino (35). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que las proteínas CLCA son moléculas secretadas y ancladas a la superficie celular para la adhesión celular (54).

CIC-3 fue otra proteína candidata para ser CaCCs. Sin embargo, las corrientes obtenidas por la expresión de CIC-3 no son V_m -dependientes comparadas con los CaCCs (72, 125). Además, las corrientes de CIC-3 se activan por Ca^{2+} /Fosforilación dependiente de Calmodulina, mientras que se los CaCCs se activan directamente por Ca^{2+} (60).

También se propuso que las bestrofinas pudieran ser el componente de CaCCs. Sin embargo, tras varios estudios se observó que las bestrofinas afectan indirectamente

la actividad de los CaCCs, debido a que estas modulan la forma y amplitud de las señales regulatorias de Ca^{2+} (12).

Finalmente, en 2008 tres grupos de manera independiente identificaron a la proteína TMEM16A como la subunidad principal de los CaCCs (20, 131, 161). El gene *ANO1* que codifica para la proteína TMEM16A cuenta con cuatro segmentos que son procesados por empalme alternativo llamados “a” (116 aa) , “b” (22 aa), “c” (4 aa) y “d” (26 aa) . El segmento a y b se localizan en el N-terminal y el c y d se ubica en el primera asa intracelular (Figura 1-2).

La inclusión o exclusión de estos segmentos durante la maduración del mRNA da origen a diversas isoformas de la proteína. Estas isoformas muestran diferencias importantes como por ejemplo en la expresión en tejido específico, en la cinética de activación y posiblemente en función fisiológica (49). Se ha observado que el segmento “c” se asocia con la sensibilidad a V_m y a Ca^{2+} mientras que la isoforma “ab” muestra disminución en la sensibilidad a Ca^{2+} así como un incremento en la sensibilidad a V_m (158). En cambio la isoforma “acd” que no tiene el segmento “b” tiene una mayor sensibilidad a Ca^{2+} (49).

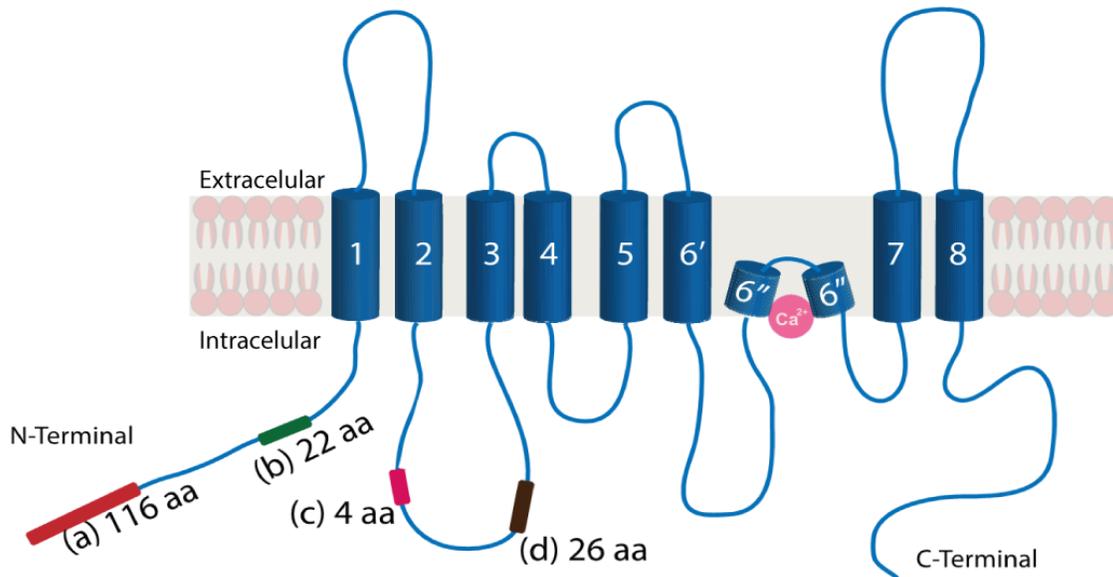


Figura 1-2 Representación esquematizada de la topología del canal TMEM16A. El esquema representa una subunidad con los 8 alfa hélices que atraviesan la membrana, mientras dos hélices truncadas entre las hélices 6 y 7 forman parte del sitio de unión a Ca^{2+} (esfera rosa). Los segmentos expuestos a empalme alternativo se muestran en rojo ("a" de 116 aminoácidos), en verde ("b" de 22 aminoácidos), en rosa ("c" de 4 aminoácidos), y en marrón ("d" de 26 aminoácidos). Las colas N y C terminal se encuentran hacia el lado citosólico.

1.3 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE TMEM16A

La secreción de Cl^- en el organismo es de gran relevancia en diversos procesos fisiológicos. Las funciones fisiológicas del canal TMEM16A dependerán de la dirección del flujo de Cl^- . Si el Cl^- sale de la célula, esto lleva a una despolarización de la célula, lo cual puede activarla. Si por el contrario el Cl^- entra a la célula, esto hiperpolarizara a la célula, lo cual es usualmente asociado a una disminución de la actividad celular.

No se ha demostrado que el Cl^- juegue un papel de segundo mensajero, aunque las concentraciones intracelulares se mantienen relativamente altas, en el rango de mM. Por ejemplo, en neuronas la concentración es del orden de 5-10 mM, mientras que en tejido epitelial la concentración llega a ser hasta de 50 mM o más. Dependiendo del gradiente electroquímico (potencial de membrana + gradiente químico de Cl^-), el Cl^- podrá entrar o salir de la célula.

1.3.1 Presión sanguínea

El control de la presión arterial es un proceso regulado por TMEM16A. Varios grupos de investigación han demostrado la expresión de este canal en arterias y venas, así como su posible papel fisiológico (37, 62, 73, 123). Más importante aún, en modelos de hipertensión se ha demostrado un incremento en los niveles de expresión o en la actividad del canal (50, 149) y que la inhibición del canal *in vivo* tiene un efecto vaso-relajante en arterias humanas y de ratón (38). Aunado a esto, en un experimento donde se redujo la expresión de TMEM16A en las células contráctiles de los vasos sanguíneos de ratones hipertensos disminuyó la presión arterial (62). Estos hallazgos han llevado a la propuesta que TMEM16A es un potencial blanco farmacéutico para el tratamiento de la hipertensión.

1.3.2 Secreción de mucina

Recientemente se demostró que TMEM16A es relevante para la liberación de la proteína mucina. Esta proteína tiene la facilidad de gelificarse, por lo que son componente clave de las secreciones con forma de gel (71). En este caso, la inhibición de TMEM16A afecta notablemente la secreción de moco en las células epiteliales de la superficie de las vías aéreas primarias humanas. Esto llevó a proponer que TMEM16A contribuye a la secreción de moco en las vías aéreas.

Aunque todavía no es claro el mecanismo por el cual TMEM16A media la liberación de mucina, se propone que quizá se deba a la liberación de bicarbonato. El bicarbonato es esencial para la liberación de mucina como se describió en el CFTR (53).

1.3.3 Secreción de saliva

La secreción de saliva es un proceso dependiente de la salida de cloruro por la membrana apical de las células acinares de las glándulas salivales. La secreción se estimula por la activación de los receptores muscarínicos que inducen la liberación de calcio mediante la producción de IP₃ (6, 22, 127, 164). TMEM16A se identificó en la membrana apical de las glándulas salivales de ratón mediante inmunohistoquímica. Esto apoya la idea que la salida de cloruro ocurre por la parte

apical de las células (127, 161). Para demostrar que TMEM16A es la vía de salida del Cl⁻ se abrogó la expresión de TMEM16A. Células acinares submandibulares provenientes del ratón knockout de TMEM16A no mostraron corrientes de Cl⁻ activadas por Ca²⁺ (127). Además, la ausencia de TMEM16A en la glándula salivar causa una total eliminación de las corrientes de Cl⁻ activadas por Ca²⁺ así como la secreción de saliva (22). En ratones cuya expresión de TMEM16A se había silenciado mediante siRNA, se encontró que la secreción de saliva inducida por Pilocarpina, un fármaco que induce la secreción de Cl⁻, está disminuida. Todas las observaciones anteriores dejan en claro la importancia de TMEM16A y la liberación de Cl⁻ en el proceso de salivación en las glándulas salivales.

1.3.4 Secreción de insulina

TMEM16A es esencial para el funcionamiento de las células pancreáticas (33). La mayoría de los islotes de células pancreáticas expresan al canal TMEM16A. Para que la insulina se secrete hay dos procesos importantes que deben llevarse a cabo: fluctuaciones en el potencial de membrana y ráfagas de potenciales de acción.

La salida de Cl⁻ inducida por glucosa vía TMEM16A favorece la despolarización de la membrana (33). Finalmente, tanto la secreción de insulina como la oscilación en el potencial de membrana inducidos por glucosa en los islotes pancreáticos o en células β se abatieron por el inhibidor T16Ainh-A01, un fármaco específico para TMEM16A. Estos estudios claramente demuestran que TMEM16A es central para la secreción de insulina.

Por otro lado, se observó en islotes pancreáticos humanos usando cromatina circular que el promotor del gene de insulina (*INS*) tiene contacto físico con el gene *ANO1* que se encuentra a 68 Mb en el cromosoma 11, el cuál codifica para un canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺. En respuesta a la glucosa, este contacto se fortaleció y aumento la expresión de *ANO1*, mientras que la inhibición del gen *INS* por un siRNA disminuyo la expresión de *ANO1* revelando un efecto regulador del promotor *INS* sobre la expresión de *ANO1*. Por lo anterior se concluye que TMEM16A/*ANO1* juega un papel importante en la secreción de insulina (160).

1.3.5 Motilidad y capacitación del espermatozoide

La motilidad, la maduración y la reacción del acrosoma (AR, un evento exocitótico necesario para fertilizar el óvulo) son funciones fundamentales de los espermatozoides de mamíferos. Mientras viaja a través del tracto reproductivo femenino, los espermatozoides deben madurar a través de un proceso llamado capacitación, para que puedan llegar al óvulo y someterse a la AR. Aunque el Cl^- es importante para la capacitación de espermatozoides y para el AR, no se sabe mucho acerca de la identidad molecular de los transportadores de Cl^- involucrados en estos procesos (108).

Un estudio reciente sugiere que el espermatozoide de humano también presenta corrientes de cloruro activadas por Ca^{2+} atribuibles a TMEM16A. La activación de este canal es necesaria para la capacitación y lograr que el espermatozoide sea móvil. Esto se descubrió gracias a que los inhibidores de TMEM16A, T16Ainh-A01 y ácido niflúmico, redujeron la capacitación, bloquearon la reacción acrosomal inducida por progesterona, inhibieron la motilidad progresiva y la adquisición de la motilidad hiperactiva (31).

Estos cambios en los parámetros cinemáticos de los espermatozoides proporcionan una nueva evidencia del importante papel que desempeña TMEM16A en la producción de espermatozoides capaces de fertilizar ovocitos.

1.3.6 Motilidad gastrointestinal

En el tracto gastrointestinal TMEM16A se expresa abundantemente en las células intersticiales de Cajal (ICC's). Estas células forman un marcapaso celular que controla la contracción de las capas del musculo liso.

La importancia de TMEM16A en la motilidad gastrointestinal se demostró por estudios en ratones que no expresan TMEM16A. Estos animales carecen de ondas lentas, que son los cambios rítmicos en el potencial de membrana que controlan la contracción (55, 70, 74).

Estos descubrimientos demuestran la importancia de TMEM16A en la peristalsis del tracto gastrointestinal. Además, estos datos sugieren que alteraciones en

función y expresión de la proteína TMEM16A puede ser una característica de desórdenes en la motilidad gastrointestinal. Por ejemplo, la isoforma de TMEM16A que carece del segmento “c” (Figura 1.2) es menos sensible a Ca^{2+} . Cuando esta isoforma se expresa en el tracto gastrointestinal induce problemas de motilidad dando como consecuencia gastroparesia (98, 141).

1.3.7 Dolor

Las neuronas somatosensoriales están implicadas en el tacto, la propiocepción, y el dolor. Las neuronas del ganglio de la raíz dorsal extienden sus axones a terminales periféricas donde señales nociceptivas como calor, frío, mecánicos, y los estímulos químicos se transducen a señales eléctricas.

En estas neuronas, TMEM16A se activa por Ca^{2+} intracelular fisiológico que a su vez despolariza las neuronas sensoriales (9, 132). TMEM16A se expresa principalmente en las neuronas DRG, las cuales también son positivas para TRPV1, un marcador de nocicepción (27). TRPV1 y TMEM16A se localizan próximos uno al otro lo cual sugiere que la entrada de Ca^{2+} estimulada por TRPV1 ayuda a la activación de TMEM16A. Sin embargo, recientemente se ha mostrado que TRPV1 induce mediante IP3 la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares y este Ca^{2+} liberado activa TMEM16A. En este caso particular, la activación de TMEM16A coadyuva al incremento en la actividad eléctrica de las neuronas.

Se conoce que TMEM16A se activa en ausencia de Ca^{2+} por calor nocivo, $T > 44^{\circ}C$ (26, 27) la cual está por encima del umbral de temperatura para el dolor en humanos (23, 153). En ratones que no expresan TMEM16A en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal son significativamente insensibles a calor nocivo. Esta observación sugiere que TMEM16A medía el dolor térmico agudo (27).

Por otro lado, TMEM16A parece estar involucrado en la percepción de dolor inflamatorio y neuropático. Un ratón knockout condicional de TMEM16A mostró reducción en hiperalgesia inflamatoria, así como alodinia mecánica en un modelo de dolor neuropático (94).

Finalmente, estudios recientes han mostrado que TRPV1 y TMEM16A interactúan física y funcionalmente. El bloqueo de TMEM16A reduce significativamente el comportamiento relacionado al dolor inducido por capsaicina (147). Por lo tanto, la interacción TRPV1 y TMEM16A proporciona efectos que mejoran el dolor en nociceptores.

1.3.8 Cáncer

Antes de que se conociera la identidad molecular de TMEM16A se determinó que DOG1/TMEM16A era un marcador molecular para cáncer escamoso gastrointestinal ya que esta sobre expresado en este tipo de cáncer (155). Está bien documentada la sobreexpresión de TMEM16A en varios tipos de cáncer como son cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), mamario, próstata, pancreático, colorrectal y de parótida (32).

El mecanismo mediante el cual TMEM16A favorece la formación y progresión de cáncer no es claro. Sin embargo, se conoce que TMEM16A favorece la proliferación celular (96, 109, 154, 156, 159). Consistente con esta idea, al inhibir a TMEM16A disminuye la tasa de proliferación celular (16, 47, 81, 154) e incluso se ha observado que disminuye el tamaño de los tumores mamarios inducidos en ratones.

También se ha estudiado el papel de TMEM16A en la resistencia a la muerte celular en células cancerígenas (90) ya que la sobreexpresión de TMEM16A mantiene la viabilidad celular y evita la apoptosis (57, 90, 139). También se favorece la migración celular e invasión hacia otros tejidos (metástasis) (8, 19, 137, 143). TMEM16A se considera como un marcador con un pronóstico malo en cáncer de células escamosas de cuello y cabeza (128). Además, se propone que TMEM16A participa en la proliferación celular, resistencia a apoptosis, invasión y metástasis.

El papel multifacético de TMEM16A en los cánceres puede reflejar los orígenes de sobreexpresión de TMEM16A en células cancerosas. Varios mecanismos se han sugerido para explicar la sobreexpresión de TMEM16A. A nivel genómico, la amplificación del locus 11q13 es el mecanismo más frecuentemente asociado a la sobreexpresión de TMEM16A en cáncer. Este amplicón se ha observado y se

correlaciona con varios tipos de cáncer tales como GIST, HNSCC, cáncer mamario, carcinoma esofágico y cáncer de pulmón (8, 16, 21, 44, 61, 64, 112, 126, 136, 142).

Se ha observado hipermetilación de la región promotora del gen que codifica para TMEM16A en HNSCC positivo para VPH y en metástasis a distancia de HNSCC. Esta hipermetilación se correlaciona con una baja expresión transcripcional de TMEM16A (44, 137) y se ha propuesto que la hipermetilación del promotor está inhibiendo la activación de la transcripción. Por lo tanto, es posible proponer que la hipometilación del promotor del gen que codifica para TMEM16A podría ser un mecanismo que contribuya a su sobreexpresión en el cáncer. Otra vía que regula la expresión del gen que codifica para TMEM16A es la activación mediada por ligandos extracelulares como el factor de crecimiento epidermal (EGF) o interleucina-4 (IL-4) (20, 102).

Por lo tanto, parece que la sobreexpresión del gen que codifica para TMEM16A tiene múltiples orígenes. Esto apoya la idea de que la sobreexpresión de TMEM16A es una característica importante para el desarrollo del cáncer que puede lograrse de múltiples maneras (32).

1.4 REGULACIÓN DEL CANAL TMEM16A

La expresión de TMEM16A está sujeta a diversos niveles de regulación como la transcripción, la síntesis y su actividad. Los mecanismos mejor estudiados que regulan a TMEM16A son aquellos asociados con su función. En esta sección me enfocaré a describir los mecanismos regulatorios de la función de TMEM16A. La regulación de la actividad de TMEM16A incluye activación por Ca^{2+} , regulación por interacción proteína-proteína y fosforilación.

1.4.1 Regulación de la activación por Ca^{2+}

Uno de los procesos regulatorios más importantes de entender es la regulación del mecanismo de activación por Ca^{2+} . Una de las características de este mecanismo regulatorio es que depende de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Esto es, a concentraciones muy altas de Ca^{2+} donde la probabilidad de apertura del canal es

máxima, el efecto regulatorio es nulo mientras que a bajas concentraciones el efecto es inverso. Como consecuencia de ello, la probabilidad de apertura se ve modificada a la alta o a la baja y, además, se puede modificar la cinética de activación mediante H^+ extra e intracelulares, los aniones permeantes, el PIP2, el colesterol y los ácidos grasos.

1.4.2 Protones intra y extracelulares

Los H^+ forman parte de la composición iónica de la célula, tanto en la región intra como en la extracelular. Debido a que estos dictan el pH de las células, su concentración está muy controlada. Para mantener el pH intracelular en el rango fisiológica, 7.2-7.4, existen en la membrana plasmática intercambiadores, bombas de H^+ , y canales de H^+ . Sin embargo, en condiciones de actividad normal, en algunas células el pH_i se acidifica parcialmente. También en condiciones patológicas el pH_e varía de forma importante. Estos cambios en la $[H^+]$ impactan el funcionamiento de bombas, acarreadores y canales.

El efecto de los H^+ sobre los canales CaCC se infirió a partir de suponer que los sitios de unión a Ca^{2+} podrían estar formados por residuos acídicos que podrían ser susceptibles de ser protonados. Esto es, cuando la concentración de H^+ incrementa hasta un rango lo suficientemente alto, pueden competir con el Ca^{2+} por el sitio de unión. Es decir, los H^+ podrían desplazar al Ca^{2+} . El resultado neto de esta competencia sería una inhibición competitiva del canal.

Esto se demostró en células epiteliales secretoras de carcinoma de colon humano T84 y en células acinares parótidas de rata que expresan de manera endógena el canal TMEM16A. En este caso, una disminución en el pH inhibió parcialmente las corrientes de Cl^- activadas por el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina (5). Consistente con esta observación, se han mostrado resultados muy similares expresando de manera heteróloga el canal TMEM16A en células HEK-293T. En este caso, al disminuir la concentración de protones intracelulares de $10^{-7.3}$ a 10^{-6} M se observa inhibición de las corrientes del canal TMEM16A. La $IC_{50}=7.08\pm 0.02$ a +80 mV con $1 \mu M Ca^{2+}$ y cuando se mutan los sitios de unión a Ca^{2+} E702 y E705 se observó una notable reducción en la sensibilidad por Ca^{2+} en condiciones control. Al acidificar el medio

intracelular la inhibición del canal no fue tan notoria y la diferencia entre la EC_{50} de Ca^{2+} es estadísticamente menor en la condición ácida. Estos datos sugieren fuertemente que el efecto inhibitorio de los protones en presencia de Ca^{2+} se debe a la competencia del protón con los iones Ca^{2+} por el sitio de unión a Ca^{2+} (28).

Por otro lado, protones extracelulares también regulan la actividad del canal. Al incrementar la concentración de protones extracelulares de 10^{-10} a 10^{-5} M hay un incremento progresivo en la corriente de Cl^- (I_{Cl}) la cual se explica por la titulación de sitios protonables con un $pK=7.3$. El efecto de los protones extracelulares es independiente de V_m . Mediante mutagénesis sitio dirigida se encontró que el residuo E623 que se encuentra localizado en el lado extracelular participa en la interacción con protones. Cuando el residuo E623 se muta, el efecto potenciador de los protones se abate. En este caso, el H^+ regula al canal al incrementar la probabilidad de apertura. Esta regulación depende de la concentración de Ca^{2+} , a bajas concentraciones el efecto es mucho más evidente comparado con altas concentraciones de Ca^{2+} en donde el efecto es mucho menos evidente.

1.4.3 Aniones extracelulares

TMEM16A es un canal aniónico, esto significa que además de Cl^- permite el flujo de otros aniones. La secuencia de selectividad aniónica basada en cocientes de permeabilidad es $SCN^- > I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > F^- > Aspartato > Glutamato$. Esto significa que aniones que pierden más fácilmente el agua se alojan dentro del poro. Cuando se sustituye el Cl^- por SCN^- , por ejemplo, se observó que la constante de tiempo de la activación del canal se aceleraba mientras que la constante de cierre se enlentecía. El resultado neto de estos dos efectos es que el canal permanece más tiempo en el estado abierto. Al realizar un análisis más exhaustivo con diferentes aniones se observó que hay una relación entre la permeabilidad y la apertura del canal. Aquellos aniones que son más permeables que el Cl^- consistentemente aceleraron la apertura y enlentecieron el cierre. Esto llevó a plantear la hipótesis que los aniones controlan la apertura del canal. En otras palabras, los aniones más permeables mantienen al canal abierto por más tiempo (118). Esto ha llevado a plantear una hipótesis más general que sugiere que los aniones permeantes regulan

la activación del canal TMEM16A mediante un mecanismo que acopla la permeación al mecanismo de apertura del canal.

1.4.4 Componentes de la membrana celular

Las proteínas que residen en las membranas biológicas interactúan con los fosfolípidos, colesterol y otras proteínas de membrana. Debido a esta constante interacción, ya sea inespecífica o específica, los canales iónicos se regulan también por componentes de la membrana. A continuación, describiré algunos ejemplos de esta regulación de TMEM16A que se han descrito recientemente.

1.4.4.1 Fosfatidilinositol 4,5 difosfato (PIP2)

Varios canales iónicos se regulan por fosfoinosítidos, especialmente por fosfatidilinositol 4,5 difosfato (PIP2) (68), un lípido poco abundante en la membrana plasmática. Se estima que PIP2 únicamente constituye el 1% de los fosfolípidos. Además, se encuentra localizado únicamente en la monocapa interna ya que es utilizado por las enzimas que regulan la concentración de fosfoinosítidos en la membrana plasmática. Su contenido fluctúa frecuentemente cuando se activan receptores acoplados a proteínas G (GPCR) ya que estos inducen la síntesis de IP3. Entre los canales que son regulados por PIP2 están los canales KCNQ, TRPC1, Kir y ENaC. Varios reportes recientes muestran que PIP2 regula a TMEM16A mediante una interacción directa.

En células HEK 293 que expresan el canal TMEM16A se demostró que el análogo de PIP2 (dic8-PIP2) incrementó la actividad del canal TMEM16A hasta cinco veces. Los efectos de dic8-PIP2 en las corrientes de TMEM16A fueron especialmente pronunciadas a bajas $[Ca^{2+}]_i$ y casi nulas a altas $[Ca^{2+}]_i$ (145). Por el contrario, la disminución del contenido de PIP2 de la membrana plasmática usando la fosfatasa que se activa por despolarizaciones, mostró que la actividad del canal se inhibe de manera bi-exponencial con unas constantes de tiempo de 2.47 ± 0.43 s y 1.05 ± 0.3 s (42). Este efecto debe suceder cuando se activan los GPCR ya que la estimulación muscarínica que acopla la producción de IP3 mediante la hidrólisis de PIP2 también disminuye la magnitud de las corrientes a través de TMEM16A (42). Estas observaciones se han replicado en ovocitos de rana *Xenopus laevis* (148).

Experimentos con tiras que tienen pegados diferentes tipos de lípidos (snoopers) indicaron que la interacción del canal con el PIP2 debería de ser directa ya que el canal se unía a la tira (42). Esta última observación fue confirmada al caracterizar los posibles sitios de interacción de PIP2 con el canal. Por un lado, se utilizó la velocidad de decaimiento de la corriente de Cl^- activada por $100 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} como un índice de sensibilidad a PIP2.

La suposición es que altas concentraciones de Ca^{2+} en el lado citosólico secuestran a PIP2 e inducen su metabolismo. Esto rápidamente disminuye el contenido de PIP2 en la membrana y la corriente decae. Por lo tanto, para determinar los posibles sitios de unión se mutaron residuos básicos localizados en la interfase de la monocapa interna y el citosol. Las mutantes R451 y K461 del asa que une TM2 y TM3, R482 en TM3 y K567 y K579 en TM4 y TM5 (Figura 2-1) mostraron una disminución en el decaimiento mismo que fue asociado con una falta del pegado e PIP2. Así se logró caracterizar a los residuos R451, K461, R482, K567 y K579 como un sitio putativo de unión de PIP2 (92).

Por otro lado, basados en simulaciones de dinámica molecular se evaluaron sitios de interacción de PIP2 con el canal TMEM16A. Este método computacional arrojó tres posibles sitios de interacción. Por lo tanto, siguiendo la misma lógica se mutaron los residuos básicos de cada sitio y se evaluó la sensibilidad a PIP2 exógeno. El sitio A está compuesto por los residuos : K313, R429, K430, R433 y R437; el sitio B está formado por los residuos: K659, R662, R665, R666, R682, R683 y K684; el sitio C está formado por los residuos: R461, K480 y R484. Estos residuos formarían una red a través de la superficie del canal. Esto sugiere que en el canal hay más de un sitio de unión a PIP2 y da lugar a las siguientes preguntas: ¿Cuál es el papel de la unión de PIP2 a cada uno de estos sitios? ¿Todos los sitios de unión se requieren para que el canal se mantenga funcionando?

Finalmente, el trabajo de Kuai Yu y colaboradores uso las técnicas de estudios computacionales, electrofisiología, mutagénesis y ensayos funcionales para mostrar que PIP2 regula al canal TMEM16A. Proponen un modelo que consiste en una red de sitios de unión a PIP2 en la cara citosólica de la membrana, la cual regula de

manera alostérica la activación del canal TMEM16A. Estos trabajos concuerdan en que los residuos R429, K430, R437 y K313 son los más relevantes.

Además de demostrar que PIP2 se une al canal, estos trabajos también demostraron mediante análisis de dinámica molecular que PIP2 unido al canal ayuda al Ca^{2+} para que el segmento TM6 se mantenga en el estado abierto. Esto es muy importante ya que la estructura del canal en presencia de Ca^{2+} muestra un poro estrangulado por donde no podría permear el Cl^- . Si bien el PIP2 ayuda a ensanchar el poro, el ensanchamiento aún es muy pequeño para que el Cl^- pueda pasar (36, 113, 114). Debido a que los sitios de pegado de Ca^{2+} y de PIP2 parecen ser mutuamente excluyente, se propone que la vía de conducción iónica está compuesta de dos módulos. El primer módulo está formado por el sitio de pegado de Ca^{2+} , compuesto por la hélices transmembranales TM6, TM7 y TM8. El segundo modulo es el módulo regulatorio de unión a PIP2, este está formado por las hélices transmembranales TM3, TM4 y TM5. Estos módulos median la activación del canal, así su la desensibilización (92). Esto ha llevado a proponer que el mecanismo de activación del canal es un mecanismo cooperativo mediado por la participación obligatoria de Ca^{2+} y PIP2 (4).

1.4.4.2 Colesterol y ácidos grasos

En 2018 por primera vez se reportó que los ácidos grasos regulan la actividad del canal TMEM16A (42).

Uno de los constituyentes de la membrana plasmática más abundante es el colesterol. Se estima que el contenido de colesterol de la membrana es de casi el 30%. Por esta razón no es de sorprender que varias proteínas de la membrana plasmática se regulan por este lípido. Uno de los problemas para determinar el efecto del colesterol sobre las proteínas es la ausencia de herramientas efectivas para manipular el contenido de colesterol en la membrana. La herramienta más usada es la metil-beta-ciclodextrina que remueve el contenido de colesterol de la membrana cuando se aplica sola o puede adicionar colesterol a la membrana si se aplica una mezcla de metil-beta-ciclodextrina más colesterol. La exposición de células HEK 293 que expresan a TMEM16A a metil-beta-ciclodextrina indujo una

disminución parcial de la corriente. Este efecto no se debió a que los canales se redistribuyeran en la célula. Además, se observó que al variar el contenido de colesterol en la membrana hubo un pequeño efecto en la habilidad de PIP2 para regular al canal TMEM16A. Finalmente se propone que el colesterol como el PIP2 como puede interactuar directamente con el canal (42).

Una de las observaciones relevantes recientes es que los ácidos grasos poliinsaturados como son el esteárico, araquidónico, oleico, docosahexaenoico y eicosapentaenoico, inhiben la función de TMEM16A de una manera dependiente de la dosis y el V_m . Entre estos ácidos grasos destacan el docosahexaenoico y araquidónico ya que son abundantes en el sistema nervioso central y la retina. Se ha propuesto que estos ácidos grasos son fundamentales para el desarrollo del cerebro y la visión. En cambio, se ha demostrado que el ácido oleico disminuye la presión arterial y esto podría ser mediado por sus efectos sobre TMEM16A ya que este canal está sobre expresado en hipertensión (ver funciones). La fosfatidilserina, un fosfolípido cuyas colas de hidrocarburos contienen ácidos esteárico y oleico, también inhibe a TMEM16A (42). Esta observación es muy interesante ya que la fosfatidilserina se transporta por la escramblaza TMEM16F desde la monocapa interna a la externa usando una vía de conducción semejante a la que existe en TMEM16A. El hecho que fosfatidilserina inhiba la función de TMEM16A explica porque este fosfolípido no se transporta por este canal.

Los hallazgos de estos trabajos proponen que los lípidos y los ácidos grasos regulan el canal TMEM16A a través de una interacción proteína-lípidos delimitada por la membrana. Los mecanismos de regulación de TMEM16A por estas moléculas hidrofóbicas se desconocen, pero, su elucidación será importante para entender cómo el canal se regula por componentes de la membrana plasmática y a qué señales responden.

1.4.5 Regulación por interacción proteína-proteína

El canal TMEM16A se activa por la interacción directa del Ca^{2+} con el sitio de unión formado por las hélices transmembranales TM6, TM7 y TM8. Por lo tanto, no es sorprendente que TMEM16A se regule por procesos celulares que controlan la

liberación de Ca^{2+} . Uno de estos es el receptor IP3 que se expresa en el retículo endoplásmico y permite el vaciamiento de las pozas intracelulares de Ca^{2+} . Además del receptor a IP3, se ha demostrado recientemente que la función de TMEM16A se regula por la proteínas citosólicas FKBP12 y Calcineurina (CaN) (129). Sorprendentemente, la fosforilación de TMEM16A por cinasas citosólicas dependientes de Ca^{2+} y calmodulina parece disminuir la actividad del canal.

1.4.5.1 Receptor a Inositol 1,4,5 tri-fosfato (IP3R)

En las neuronas DRG nociceptivas se demostró la existencia de vías de señalización específicas que involucran a TMEM16A, GPCR y al receptor IP3. Se propuso que estas estructuras pueden servir para garantizar la fidelidad de las señales inflamatorias agudas (83).

Por otro lado, el canal TRPV1 se había propuesto como una fuente de Ca^{2+} para activar a TMEM16A. Sin embargo, se observó que la cantidad de Ca^{2+} que metía a la célula TRPV1 era insuficiente para activar a TMEM16A. Sin embargo, en 2020 Shan y colaboradores encontraron que TRPV1 dispara la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico a través de una isoforma del receptor IP3 (134). Técnicas de imagen mostraron que TMEM16A, TRPV1 y el receptor IP3 se localizan muy cerca uno de otro en las neuronas DRG transmisoras del dolor.

Estos resultados identifican a los componentes celulares que regulan la liberación de Ca^{2+} y que a su vez regulan la activación del canal TMEM16A. La concentración de Ca^{2+} citosólico esta finamente regulada por diversos mecanismos celulares por lo que la activación de TMEM16A depende completamente de estos mecanismos.

El canal TMEM16A es fuertemente susceptible a modulación alostérica de diversas fuentes, entre ellas componentes de la membrana, iones y proteínas intracelulares. A continuación, describiré algunos componentes que regulan la activación a nivel fisiológico del canal TMEM16A, así como algunos fármacos que se usan para afectar las propiedades de activación de TMEM16A.

1.4.6 FKBP12 y CaN

El Ca^{2+} intracelular es central en el metabolismo de la célula. Los cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular pueden inducir una serie de reacciones que van desde la activación de proteínas hasta la regulación de diversos procesos para mantener la homeostasis celular.

Una de estas proteínas activadas por el incremento de Ca^{2+} intracelular es TMEM16A. Este canal está sujeto a varios mecanismos de regulación (ver arriba). Además, TMEM16A también modula su actividad por el complejo FKBP12-CaN (Calcineurina). Este complejo interactúa con el canal e incrementa su actividad.

En 2020 Sánchez-Solano y colaboradores mostraron esta interacción mediante el uso de técnicas como coimmunoprecipitación, electrofisiología y el uso de algunos antagonistas de estas proteínas que forman el complejo. En este trabajo se mostró que la ciclosporina (CsA) y la FK506 (inhibidores de CaN y FKBP12) disminuyen parcialmente la actividad de TMEM16A.

También se mostró la interacción directa de este complejo con el canal mediante estudios de coimmunoprecipitación. Al aplicar el inhibidor FK506 que se une a FKBP12, se impide la formación del complejo FKBP12-CaN. La actividad del canal no se ve afectada, sin embargo, se evita el efecto negativo de la CsA sobre el canal (129).

Finalmente se propone que en condiciones fisiológicas una elevación de la concentración de Ca^{2+} intracelular induce la asociación de FKBP12-CaN con TMEM16A e incrementa la actividad de TMEM16A. Sin embargo, la formación de este complejo ternario no es necesaria para la activación de TMEM16A por Ca^{2+} , al parecer esta interacción funciona como un modulador de la actividad del canal.

1.4.7 Regulación farmacológica

Para la evaluación de la participación fisiológica de los CaCC en varios tejidos se habían utilizado casi exclusivamente agentes farmacológicos que carecían de potencia y especificidad. Ahora, por ejemplo, debido a la participación de TMEM16A en diversas patologías como cáncer, la modulación de su función ha sido un área

de interés para el desarrollo de fármacos. Diversos grupos de investigación han encontrado compuestos potentes y específicos que pueden activar o inhibir TMEM16A. Con fines de claridad dividiré estos compuestos en dos grupos, activadores e inhibidores.

Los activadores de TMEM16A pueden clasificarse a su vez en dos categorías: 1) productos naturales y 2) compuestos sintéticos. En cuanto a los productos naturales se han descrito una gran variedad, entre ellos el ginsenósido Rb1 (GRb1) y el resveratrol (RES). Estos se identificaron mediante métodos fluorescentes y de electrofisiología como activadores de TMEM16A (24, 58). GRb1 y RES también pueden aumentar la amplitud y frecuencia de contracciones en el íleon de cobaya aislado. Esto sugiere que GRb1 y RES podrían ser fármacos prometedores para el tratamiento de la hipomotilidad de tracto gastrointestinal. En cuanto a los productos sintetizados, se ha descubierto que dos moléculas pequeñas tienen el efecto de estimular la secreción de Cl^- epitelial y la contracción intestinal. Uno de ellos es el Eact (naroylamino-tiazol) que aumenta las corrientes de Cl^- en ausencia de Ca^{2+} y Fact (tetrazolilbenzamida), que no tiene actividad en ausencia Ca^{2+} , pero reduce los valores de EC_{50} que activa TMEM16A en presencia de Ca^{2+} . Esto significa que hace más sensible el canal a Ca^{2+} (104).

Los inhibidores de TMEM16A también se dividen en dos grupos, los naturales y los sintetizados químicamente. Algunos inhibidores naturales son el ácido tánico y los gallotaninos (104), el eugenol (4-alil-2-metoxifenol, el componente principal del aceite de clavo (162)), la shikonina (82), y compuestos flavonoides (165). Se descubrió que estos compuestos tienen la capacidad de evitar la diarrea o inhibir la proliferación, la migración y la invasión de las células cancerosas.

Entre los productos sintéticos están: el ácido niflúmico (NFA), el ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-ácido-2,2'-disulfónico (DIDS), el ácido-5-nitro-(3-fenilpropilamino)-benzoico, el ácido flufenámico NPPB (81), CaCCinh- A01 (43), T16Ainh-A01 (104), MONNA (106), y la 2-(4-cloro-2-metilfenoxi)-N- [(2-metoxifenil) metilideneamino] - acetamida (Ani9) (133).

CaCCinh-A01 es el bloqueador más eficaz para TMEM16A, mientras que T16Ainh-A01 inhibe parcialmente las corrientes TMEM16A (104). En el futuro, estos moduladores TMEM16A pueden usarse para tratar enfermedades causadas por la disfunción de TMEM16A (80).

1.5 ESTRUCTURA DE TMEM16A

1.5.1 Estructura

En 2014, Brunner et al, describió la estructura de la proteína TMEM16F del organismo *Nectria haematococca* (4WIS) (17). Esta fue la primera estructura resuelta de una proteína de la familia TMEM16. La estructura muestra a un homodímero en forma de mariposa y cada monómero tiene unidos dos iones Ca^{2+} . Sin embargo, esta proteína no es un canal, es una escramblasa que mueve fosfolípidos entre las monocapas de la membrana plasmática. A pesar de eso, esta estructura nos proporcionó una idea clara de arreglo tridimensional que podría adquirir el canal TMEM16A ya que existe un alto grado de homología entre estas proteínas. Esta estructura subsecuentemente se usó como una plantilla para generar modelos por homología.

En 2017 se obtuvo la primera descripción de la estructura de la proteína TMEM16A (114). Mediante la técnica de crio-microscopía electrónica (Cryo-EM) se obtuvo la estructura tridimensional a una resolución de 6.6 Å (5NL2). Debido a la baja resolución no se lograron apreciar detalles estructurales como la orientación de la cadena lateral de los aminoácidos. Los detalles atómicos se describieron después por dos grupos independientes. Para describir de manera clara la estructura de la proteína, la he dividido en tres segmentos o dominios que son: dominio transmembranal (TMD), el sitio de unión a Ca^{2+} , y el poro.

1.5.2 Dominios transmembranales (TMD)

Diversos trabajos mostraron por primera vez la estructura del canal TMEM16A en diferentes condiciones con distintas conformaciones funcionales como son conductivo (Ca^{2+} unido) y no conductivo (sin Ca^{2+}). El canal se describió con dos

iones Ca^{2+} unidos (5OYB, 6BGI), con un ion Ca^{2+} (6BGJ), y en ausencia de Ca^{2+} (5OYG) (36, 114). Entre todas estas estructuras, la estructura 5OYB que tiene dos iones de Ca^{2+} tuvo la más alta resolución (3.7 Å) y le siguen 6BGI y 6BGJ con 3.8 Å y 5OYG con 4.06 Å.

Con estas estructuras se determinó que residuos forman el sitio de unión de Ca^{2+} , los residuos que interactúan en la interfaz de los monómeros y los cambios sutiles entre las estructuras con y sin Ca^{2+} unido (Figura 1-3). En la figura 1-3 muestro un alineamiento estructural de las estructuras de TMEM16A con (naranja) y sin (verde) Ca^{2+} . El estado de agregación es un homodímero en forma de mariposa, tiene 10 hélices transmembranales (TM1-10), la hélice 10 es la interfaz entre los dos monómeros (Figura 1-4B).

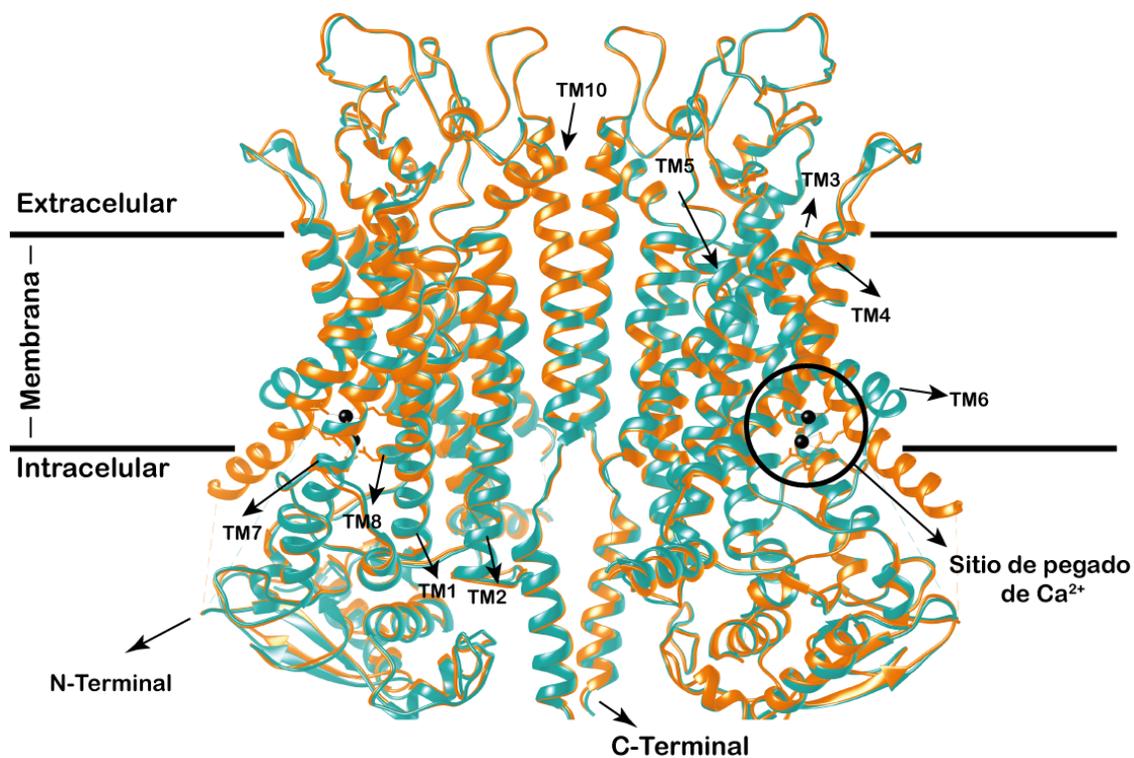


Figura 1-3 Estructura del canal TMEM16A. Superposición de las estructuras del canal TMEM16A en presencia (azul) y en ausencia (naranja) de Ca^{2+} . Las estructuras fueron tomadas de la base de datos PDB, el número de identificación con Ca^{2+} es 5OYB y sin Ca^{2+} es 5OYG. Estas estructuras fueron editadas usando el software UCSF Chimera X (169).

El sitio de unión de Ca^{2+} está formado por las hélices transmembranales 7 y 8 las cuales unen dos iones calcio a cada monómero, el sitio de unión de Ca^{2+} se

encuentra dentro del campo eléctrico (Figura 1-4C) . Se propone que la vía de conducción está formada por las hélices transmembranales 3, 4, 5, 6 y 7 en donde podemos ver con claridad que el poro está formado completamente por aminoácidos a diferencia de la escramblasa cuyo poro está formado por aminoácidos y por fosfolípidos de la membrana (Figura 1-4C) . Los monómeros interactúan entre sí mediante la hélice transmembranal 10 en esta zona se forma la interfase entre los monómeros. Los segmentos N y C-terminal se encuentran en la región citosólica, sin embargo, estas regiones no lograron resolverse debido a su flexibilidad.

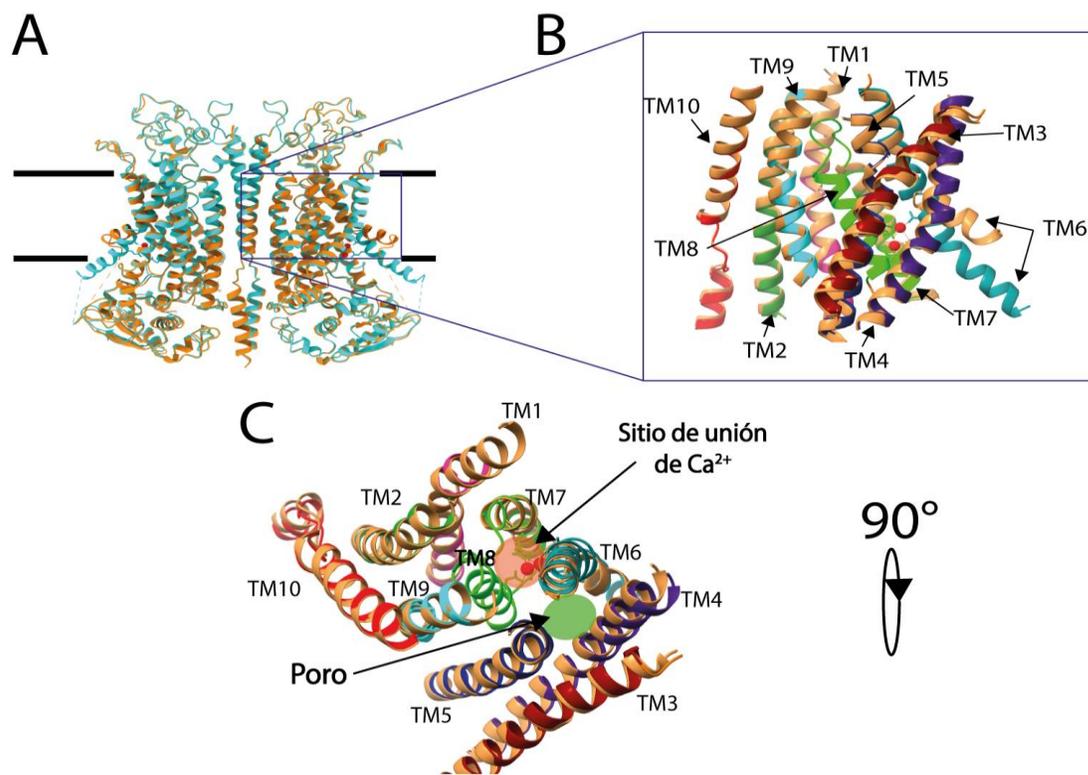


Figura 1-4 Dominios transmembranales de TMEM16A con (colores) y sin (café) Ca^{2+} . A) Alineamiento estructural de las estructuras de TMEM16A con (azul) y sin (café) Ca^{2+} las barras en color negro representan los límites de la membrana celular. B) Maximización de las hélices transmembranales del canal TMEM16A con (colores) y sin (café) Ca^{2+} . Cada una de las hélices transmembranales se representan de un color diferente, TM1-rosa, TM2-verde, TM3-marrón, TM4-morado, TM5-azul oscuro, TM6-azul, TM7- TM8 verde lima, TM9-cian, TM10-rojo. Los iones Ca^{2+} se muestran como dos esferas de color rojo. C) Giro de 90° de la estructura mostrada en B, círculo verde muestra la ubicación de la vía de conducción y el círculo en color rojo ubica el sitio de unión de Ca^{2+} .

La estructura de la escramblasa TMEM16F debería ser muy parecida a la de TMEM16A. Sin embargo, un alineamiento estructural con el software UCSF Chimera muestra algunas variaciones en la posición de la hélice transmembranal 6

(TM6) de la interfaz del poro con la membrana (Figura 1-5-A). En la escramblasa se observa el poro abierto haciendo una interfaz proteína-membrana por donde fluyen los lípidos. En cambio, en TMEM16A el poro se encuentra cerrado a la membrana y se propone que quizá esta es la razón por la que TMEM16A no es capaz de transportar lípidos (Figura 1-5B).

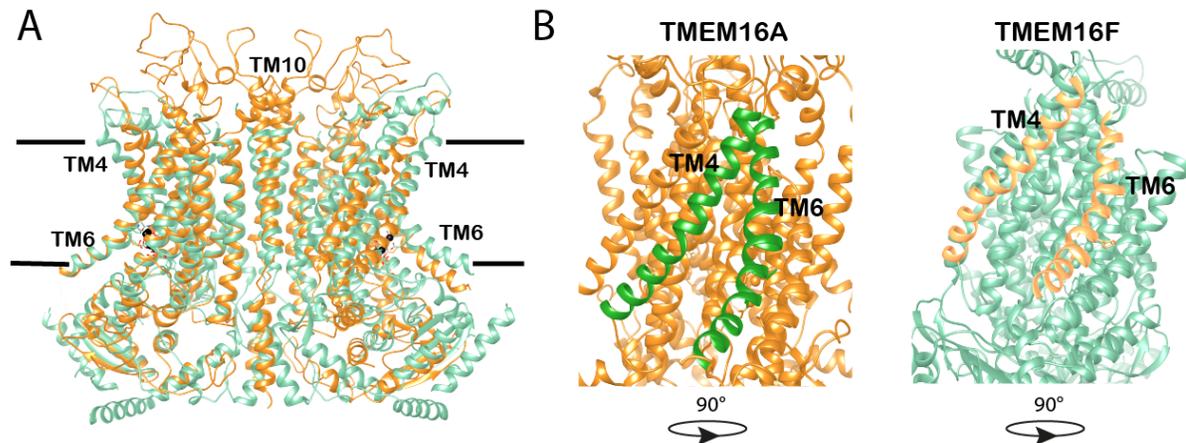


Figura 1-5 Comparación de las estructuras TMEM16A y TMEM16F. **A** superposición de las estructuras TMEM16A (naranja, 5OYB) y TMEM16F (verde, 4WIS). Las esferas negras son los iones Ca²⁺. Las líneas en negro representan los límites de la membrana, las esferas negras representan los iones Ca²⁺. **B** A la izquierda se muestra el canal TMEM16A rotado 90° a la derecha. Se enfatizan en color verde las hélices transmembranales TM4 y TM6. A la derecha se muestra la estructura de la escramblasa TMEM16F rotada 90° a la derecha. En color naranja se resaltan las hélices transmembranales TM4 y TM6.

1.5.3 Sitio de unión de Ca²⁺

Antes de que se obtuviera la estructura de TMEM16A se encontró que mutar E702Q y E705Q reduce 100 veces la sensibilidad a Ca²⁺ (163). Se propuso que estos residuos pudieran formar parte del sitio de alta afinidad de unión a Ca²⁺. Sin embargo, el sitio de unión a Ca²⁺ es químicamente muy complejo. Un análisis más extenso encontró que varios residuos conservados evolutivamente en TMEM16A (N650, E654, E702, E705, E734 y D738) formaban parte del sitio de unión a Ca²⁺(151). Estos residuos se encuentran localizados en las hélices TM6 (E654), TM7 (E702 y E705) y TM8 (E734 y D738). Cada uno de estos residuos se mutó individualmente. En todos los casos la sensibilidad a Ca²⁺ disminuyó demostrando que estos residuos forman el sitio de unión a Ca²⁺ y que son responsables de la activación por Ca²⁺ de TMEM16A.

La determinación de la estructura tridimensional de la escramblasa nhTMEM16 en presencia de Ca^{2+} mediante cristalografía de rayos X a una resolución de 3.30 Å permitió determinar con gran detalle la localización del sitio de pegado de Ca^{2+} , así como los residuos de las cadenas laterales que lo conforman (17). nhTMEM16 es una proteína de membrana de la familia Anoctaminas que moviliza fosfatidilserina de monocapa interna a la externa y comparte el 33% de identidad con el canal TMEM16A. Con base en esta identidad se localizaron los residuos homólogos que correspondían al sitio de unión a Ca^{2+} en TMEM16A. Este análisis identificó a los mismos residuos que se habían propuesto como el sitio de unión a Ca^{2+} : E654, E702, E705, E734 y D738. La determinación de la estructura del canal TMEM16A mediante crio microscopía electrónica corroboró estos resultados (36, 113). La estructura mostró que los residuos E654, E702, E705, E734 y D738 forman el sitio de unión a Ca^{2+} , en donde se pueden unir dos iones Ca^{2+} (Figura 1-6A). Cada monómero cuenta con su sitio de unión a Ca^{2+} . El sitio se localiza del lado opuesto a la interfase entre los monómeros, dentro de la membrana y muy cerca de la interfase entre la monocapa interna y el citosol (Figura 1-6).

Además de los residuos ácidos antes mencionados, al sitio de unión de Ca^{2+} contribuyen las asparaginas N650, N651 y N730 que se encuentran en las hélices TM 6, 7 y 8. Estas hélices TM están altamente conservadas entre los miembros de la familia de TMEM16 (Figura 1-6B). La estructura muestra que el Ca^{2+} está unido a los residuos ácidos mientras que los tres residuos polares N650, N651 y N730 estabilizan el Ca^{2+} en su sitio.

1.5.4 Poro

Cuando se caracteriza un canal es muy relevante conocer qué ion permea por el poro del canal. La determinación de la selectividad iónica indica qué iones pasan a través del poro y en qué orden. Para tener una idea acerca del mecanismo de permeación de los iones, es necesario conocer la vía de permeación y los aminoácidos que la constituyen.

Antes de conocer la estructura de TMEM16A se buscó caracterizar la vía de permeación mediante experimentos electrofisiológicos que permitieron saber la

selectividad iónica. Así se demostró que este canal era aniónico y que su secuencia de selectividad es $\text{SCN}^- \gg \text{I}^- \gg \text{NO}_3^- \gg \text{Br}^- \gg \text{Cl}^-$. A partir de estos experimentos se concluyó que este canal es aniónico y que no permite el paso de cationes.

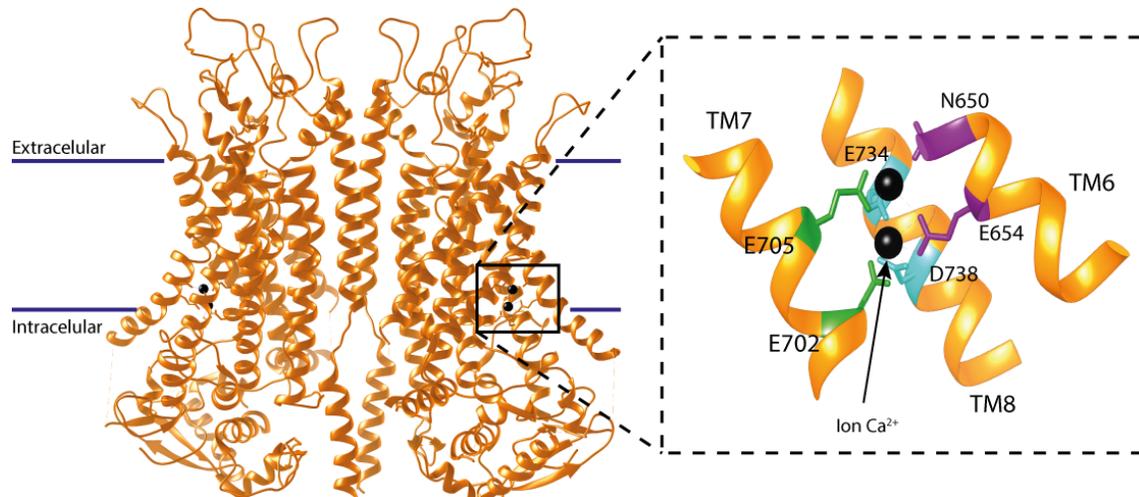


Figura 1-6 Sitio de unión de Ca^{2+} . A izquierda se muestra la estructura de TMEM16A (5OYB) y marcado con un rectángulo negro el sitio de pegado de Ca^{2+} . A la derecha se muestra una ampliación del sitio de pegado de Ca^{2+} . Se resaltan en color verde los residuos E702 y E705 en la TM7, en la TM8 se resaltan en azul los residuos E734 y E738 y en la TM6 se resaltan los residuos N650 y E654.

Mediante estudios funcionales se propuso que TMEM16A podía tener dos poros que se activan de manera independiente (77). La determinación de la estructura tridimensional de TMEM16A corroboró esta idea. Con la estructura se mostró que TMEM16A tiene dos poros, cada monómero tiene su propio poro y un sitio de unión de Ca^{2+} . TMEM16A tiene la arquitectura de doble barril similar a lo encontrado en los canales y transportadores CLC.

La estructura del canal describe con mucha precisión la estructura del poro, así como los aminoácidos que lo forman. Cada vía de conducción o poro está formada por las hélices $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$. El poro tiene una forma parecida a un reloj de arena con un pequeño vestíbulo extracelular, una región estrecha llamada cuello y un gran vestíbulo intracelular (Figura 1-7).

El poro puede subdividirse en tres secciones: dos vestíbulos localizados a las entradas del poro y un cuello (Figura 1-7A). Tanto el vestíbulo extracelular como el intracelular están compuestos por un gran número de residuos hidrofílicos, y

revestidos por residuos ionizables. El alto contenido de residuos básicos confiere un ambiente electrostático positivo facilitando el flujo de aniones (Figura 1-7B). A diferencia de los vestíbulos, el cuello es altamente anfifílico y no tiene residuos cargados. Esto forma un cuello de botella para el flujo de iones.

La estructura determinada en presencia de Ca^{2+} muestra que el poro es continuo. Esto indica que el canal podría estar en una conformación conductiva. Sin embargo, en la región del cuello que es la región más estrecha, el diámetro del poro es de 2.5 Å. Si tomamos en cuenta que el diámetro del Cl^- es de 3.6 Å, entonces el poro no es lo suficientemente ancho para permitir el paso del ion. Esto sugiere que el poro está colapsado y que debe expandirse para permitir el paso de Cl^- (113, 114).

En comparación con la estructura del poro de TMEM16F, el poro del canal TMEM16A no está expuesto a la membrana ya que este canal solo permite el flujo de iones y no de fosfolípidos. En la figura 1-7C se muestra un diagrama que resalta las diferencias entre los poros de la escramblasa y el canal. Como podemos observar la escramblasa tiene el poro abierto a la membrana lo que le permite alojar con facilidad los fosfolípidos en la vía de permeación y finalmente translocarlos. Este proceso no ocurre en el canal TMEM16A porque en este caso el poro está cerrado a la membrana (Figura 1-7).

En resumen, TMEM16A es un homodímero, cada monómero cuenta tanto con el sitio de unión de Ca^{2+} como con su propia vía de conducción. La vía de conducción está compuesta por tres partes, el vestíbulo extracelular que es una región relativamente ancha, el cuello que es la región más angosta del poro con un diámetro de 2.5 Å y finalmente el vestíbulo intracelular que es la región del poro más ancha de aproximadamente 20 Å.

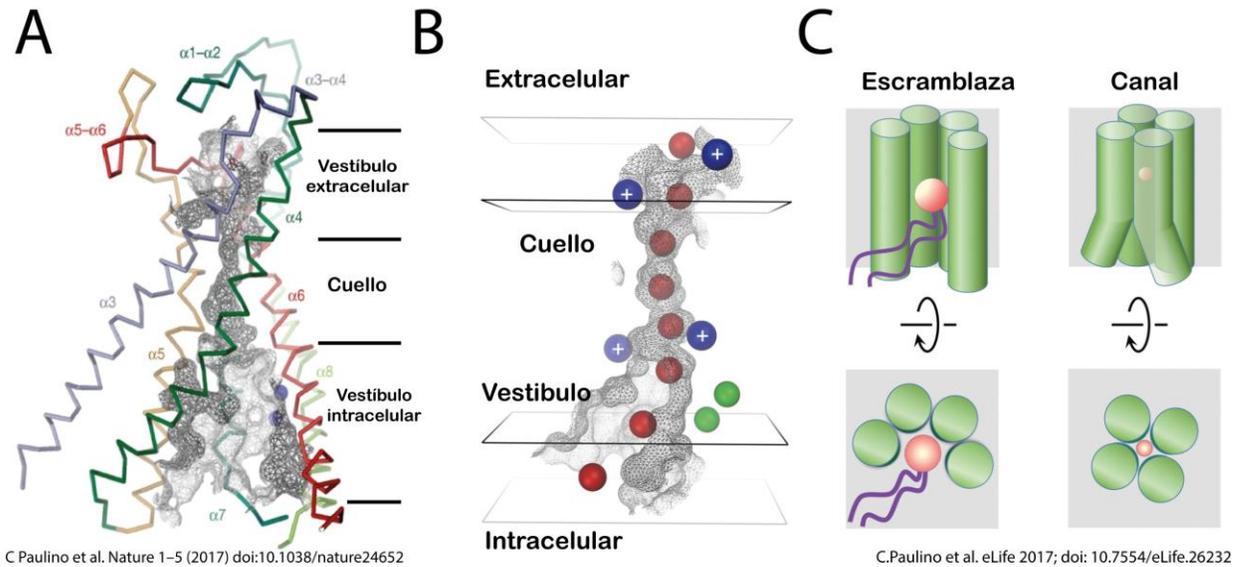


Figura 1-7 Estructura del poro de TMEM16A. **A** vía de conducción de iones, en color gris se muestra la superficie del poro. En colores se muestran las hélices transmembranales que forman el poro ($\alpha 1-\alpha 8$), en esferas azules se muestran los iones de Ca^{2+} . (Tomado y modificado de la ref (113)). **B** Descripción del poro de TMEM16A. superficie molecular del poro se muestra como una malla gris. Las regiones de la membrana (negro) y la región intra y extracelular (gris) se indican con planos rectangulares. La posición de residuos cargados positivamente que afectan la conducción iónica se representa con esferas azules y los iones de Ca^{2+} se representan con esferas verdes. Las esferas rojas representan hipotéticos iones de Cl^- (radio 1.8 Å) a través del poro. **C** Representación esquemática de las características que distinguen el poro de las escramblazas (izquierda) del poro de los canales iónicos (derecha) en la familia TMEM16. La vista es desde el interior de la membrana (paneles superiores) y desde el exterior (paneles inferiores). Las hélices que constituyen la cavidad polar accesible a la membrana en la escramblaza han cambiado su ubicación en canales para formar un conducto rodeado de proteínas. (B y C fueron tomados y modificados de (114).

1.6 MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE TMEM16A

1.6.1 Activación por Ca^{2+}

El mecanismo de activación por Ca^{2+} ha sido ampliamente estudiado antes de conocer la composición y la estructura de la proteína. El análisis cuantitativo de la actividad del canal se ha realizado mediante análisis de la cinética de la corriente mediante cadenas de Márkov. En estos análisis se ha incluido el efecto de la concentración de Ca^{2+} , el V_m y la concentración extracelular de Cl^- (30).

El análisis funcional había demostrado que la activación del canal se dispara por incrementos en la concentración intracelular de Ca^{2+} . Estos incrementos en Ca^{2+} pueden surgir por la activación de receptores acoplados a proteínas G, de la inyección de IP_3 , de la aplicación del ionóforos de Ca^{2+} como la ionomicina, o por

la inyección de cationes divalentes como son Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} . Todos estos datos demostraron que el incremento en Ca^{2+} en el citoplasma de la célula induce la activación de una corriente de Cl^- dependiente de un incremento en Ca^{2+} .

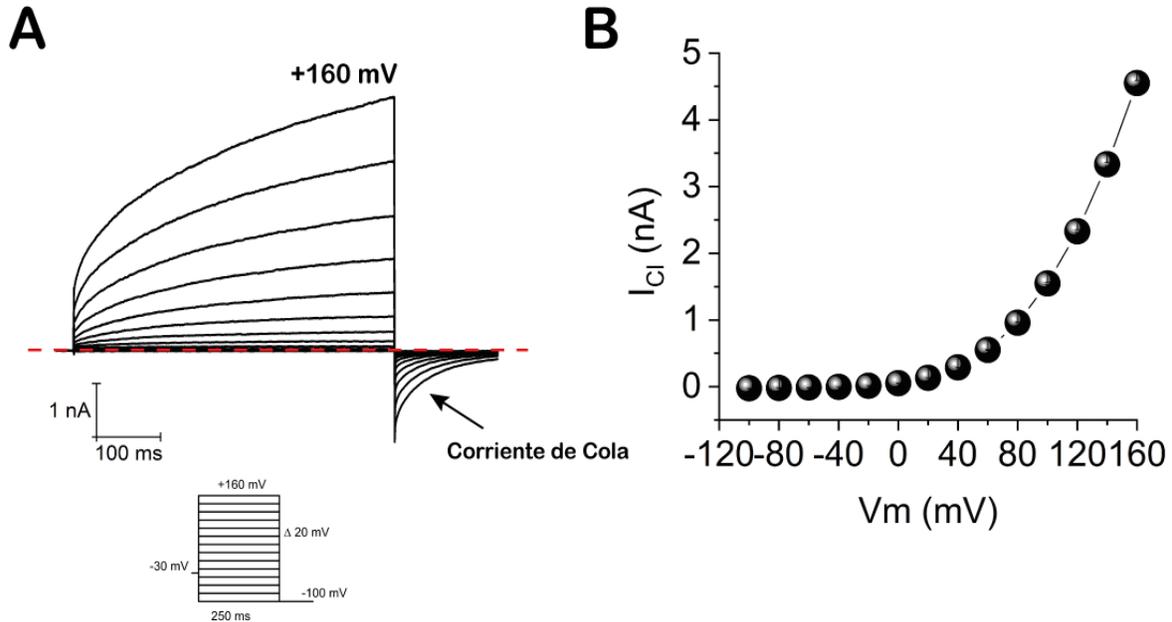


Figura 1-8 Activación por Ca^{2+} del canal TMEM16A. A arriba: Trazos de corriente representativos de la activación de TMEM16A por Ca^{2+} . Estos trazos fueron obtenidos de una célula HEK-293 que expresó al canal TMEM16A. La célula es dializada con $0.2 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} y 40 mM de Cl^- y es bañada con 140 mM de Cl^- . Abajo: protocolo de activación que consiste en la aplicación de pasos de V_m de 20 mV desde -100 mV hasta $+160 \text{ mV}$ durante 250 ms , mientras la célula fue mantenida a -30 mV y al final del pulso la célula se repolariza a -100 mV . B Curva corriente- V_m , los valores fueron obtenidos a partir del trazo de corriente mostrado en el panel A en donde los valores se tomaron al final de pulso de activación. La línea roja indica el cero de corriente

En la Figura 1-8A se muestran trazos representativos de corriente característicos de la activación por $0.2 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} . Las corrientes se generaron cambiando el potencial desde -100 mV hasta $+160 \text{ mV}$ mientras la célula se mantenía a -30 mV . Se puede apreciar que la corriente a valores negativos de V_m es pequeña mientras que a valores positivos de V_m la corriente incrementa (Figura 1-8B). Es evidente la cinética a diferentes V_m . La corriente incrementa siguiendo un curso temporal exponencial hasta alcanzar un valor casi estacionario al final del pulso despolarizante. Cuando la polaridad del V_m se cambia de positiva a negativa se observa una corriente negativa, llamada corriente de cola. En este caso, la corriente positiva es el reflejo del flujo entrante de cloruro mientras que la corriente negativa es el reflejo de Cl^- saliendo de la célula.

Al mismo tiempo, el curso temporal de la corriente positiva refleja el curso temporal de la activación del canal mientras que el curso temporal de la corriente de cola refleja el curso temporal del cierre del canal. Por lo tanto, el curso temporal de la corriente tiene información crucial para estudiar la cinética de activación y desactivación del canal.

La activación del canal es dependiente de la concentración de Ca^{2+} , en la Figura 1-9A muestro un trazo de corriente proveniente de un parche de membrana registrado mediante la técnica de parche escindido. En este caso, el V_m se mantuvo fijo a +80 mV y el lado citosólico del parche conteniendo los canales se expuso a concentraciones crecientes de Ca^{2+} .

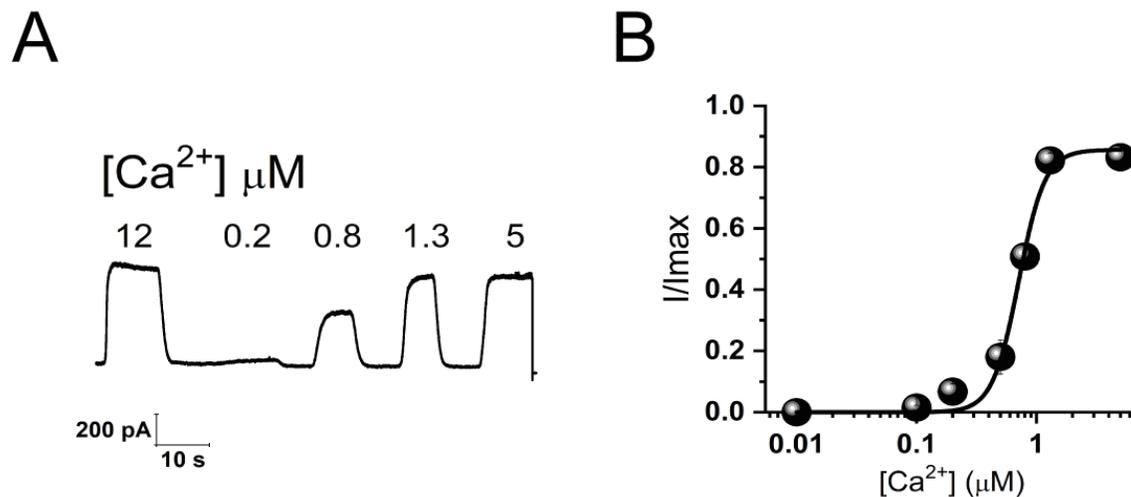


Figura 1-9 La activación de TMEM16A es dependiente de la concentración de Ca^{2+} . **A** trazo representativo de corriente de TMEM16A proveniente de registros en la configuración parche escindido estimulando con diferentes concentraciones de Ca^{2+} . Los parches fueron mantenidos a 80 mV. **B** Curva dosis respuesta a Ca^{2+} para TMEM16A, la línea continua es el ajuste a la ecuación de Hill de donde se obtuvieron los siguientes parámetros, $EC_{50}=0.70\pm 0.035 \mu\text{M}$, $N= 3.98\pm 0.68$.

Entre cada concentración de Ca^{2+} , se aplicó una solución sin Ca^{2+} . Se observa que conforme se incrementa la concentración de Ca^{2+} , se incrementa la magnitud de la corriente lo cual nos indica que más canales se activaron por el Ca^{2+} a ese V_m . En la Figura 1-9B he graficado la curva concentración-respuesta a Ca^{2+} . Para comparar los datos de diferentes parches he normalizado la magnitud de las corrientes utilizando la corriente obtenida con 12 μM de Ca^{2+} . Podemos ver que el grado de activación del canal incrementa de forma sigmoidea al incrementar la concentración

de Ca^{2+} . Al ajustar estos datos a una ecuación de Hill que describe la unión de Ca^{2+} a un sitio, encontramos que la EC_{50} es de 700 nM a +80 mV. El análisis también arroja que el coeficiente de Hill es de 3.98 ± 0.68 lo cual sugiere que se requieren 4 iones Ca^{2+} para activar el canal.

Del análisis de las curvas concentración-respuesta a Ca^{2+} se demostró que la sensibilidad aparente a Ca^{2+} (medida como la concentración necesaria de Ca^{2+} para obtener el 50% de activación) dependía del potencial. A potenciales positivos la EC_{50} es menor que a potenciales negativos (Figura 1-10).

El mismo análisis también arrojó que el proceso de activación del canal requería de más de un ion Ca^{2+} , probablemente dos, para que el canal pudiese adquirir el estado conductivo. Estos datos llevaron a proponer que la activación procedía de manera secuencial iniciando con el pegado de un Ca^{2+} , seguida del pegado de un segundo Ca^{2+} , y finalmente el canal se abriría (151). Para explicar la dependencia con el potencial se propuso que la activación del canal procedía mediante la unión directa del ion Ca^{2+} al sitio de unión de manera dependiente del V_m (Figura 1-10) (113).

Con la determinación de la estructura tridimensional de TMEM16A con o sin Ca^{2+} unido se propuso un mecanismo molecular del proceso de activación. Este proceso comparte semejanzas con los mecanismos propuestos anteriormente basados en el análisis cuantitativo de las corrientes de Cl^- a diferentes V_m , concentraciones de Ca^{2+} y de Cl^- . La estructura tridimensional mostró que la hélice TM6 adopta un estado conformacional diferentes cuando el Ca^{2+} está unido a la proteína.

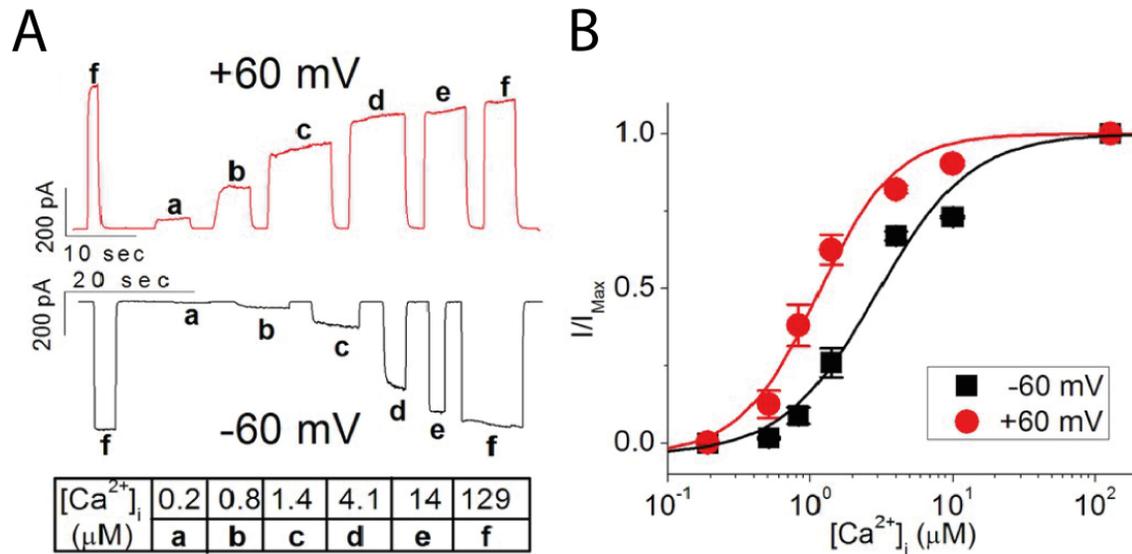


Figura 1-10 La activación por Ca^{2+} es dependiente de V_m en el canal TMEM16A. **A** registros de corriente representativos de TMEM16A-CaCC de ratón (mTMEM16A) registrados a +60 mV y -60 mV usando la configuración inside out. La tabla indica la concentración de calcio utilizada. **B** Dosis respuesta a Ca^{2+} del canal mTMEM16A a +60 mV y -60 mV. Las líneas continuas representan el ajuste a la ecuación de Hill. (Tomado y modificado de (151))

En principio estos estados conformacionales son los más probables de ser adoptados por estas hélices y se deben únicamente a la unión del Ca^{2+} . Por lo tanto, la premisa es que los estados conformacionales de cada una de las partes del canal representan el estado cerrado cuando no hay Ca^{2+} unido y el estado abierto cuando el Ca^{2+} está pegado. Es importante aclarar que el mecanismo propuesto aquí será válido para la condición de 0 mV y condiciones no fisiológicas como son 1 mM de Ca^{2+} y la proteína fuera del ambiente lipídico. A pesar de estas limitantes, el mecanismo propuesto tiene similitudes con aquellos mecanismos propuestos basados en el análisis de las corrientes bajo condiciones fisiológicas.

En 2018, Lam y Dutzler propusieron un mecanismo de activación bastante detallado que consiste en lo siguiente: el canal en reposo (ausencia de Ca^{2+}) tiene 2 barreras que impiden el flujo de Cl^- , la barrera estérica formada por la posición de la TM6 (en ausencia de Ca^{2+}) y la barrera electrostática formada por los residuos cargados negativamente que forman el sitio de unión de Ca^{2+} (pocket de Ca^{2+}).

Al despolarizarse la célula e incrementar el Ca^{2+} intracelular la TM6 gira en dirección del sitio de pegado de Ca^{2+} para estabilizar el pegado de este (Figura 1-11). Esto

permite que el giro lleve a la TM6 a una nueva posición eliminando la barrera estérica e inmediatamente después el calcio se estabiliza en el dominio de unión, lo que deriva en la reducción de la barrera electrostática facilitando entonces el flujo de Cl^- a través del poro (91).

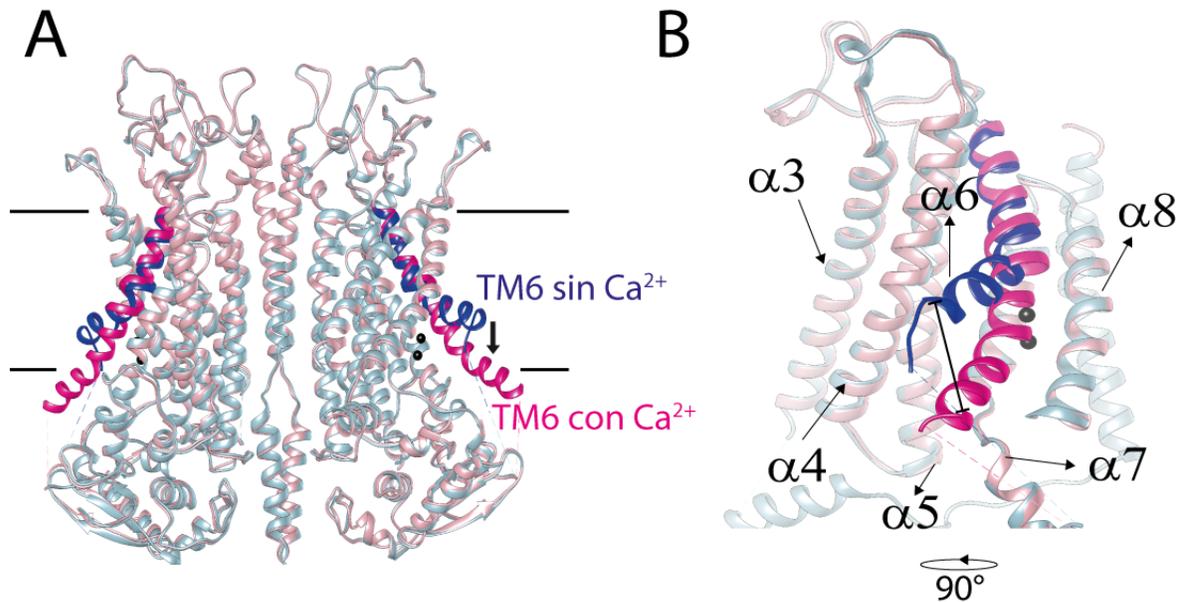


Figura 1-11 Movimiento de la hélice transmembranal 6 (TM6). A Superposición de las estructuras de TMEM16A con (rosa, 5OYB) y sin (azul, 5OYG) Ca^{2+} . La TM6 se resalta en rosa fuerte (con Ca^{2+}) y en azul fuerte (sin Ca^{2+}) con la finalidad de notar diferencias. Las líneas horizontales negras indican el grosor de la membrana. La flecha negra indica la separación de la TM6 en la estructura con Ca^{2+} y la TM6 de la estructura sin Ca^{2+} . B Vista lateral de la superposición de las hélices TM3-TM8 de las estructuras TMEM16A con y sin Ca^{2+} . Las esferas negras indican los iones Ca^{2+} . La línea en negro en B resalta la diferente posición de la TM6 en la estructura de TMEM16A sin Ca^{2+} .

1.6.2 Transiciones conformacionales dependientes de Ca^{2+} durante la activación de TMEM16A.

Algo interesante, es que el sitio de unión de Ca^{2+} sufre un cambio conformacional por interacción del Ca^{2+} y su unión a la proteína. La hélice transmembranal 6 (TM6) tiene que girar para que los residuos N650 y E654 puedan llevar a cabo la correcta coordinación del Ca^{2+} (Figura 1-12B).

Cuando se resuelve la estructura de una proteína podemos conocer la posición de los átomos que la componen en una condición específica. Sin embargo, los

procesos biológicos son altamente dinámicos, por lo que la estructura de una proteína nos muestra solo un estado conformacional de muchos.

La estructura de TMEM16A en diferentes estados proporciona información importante para comprender el mecanismo de activación. Gracias a las estructuras proporcionadas por Paulino et al. 2017 y Dang et al. 2017 donde el canal tiene unidos 1,2 o ningún ion Ca^{2+} , ahora es posible entender mejor el mecanismo de activación de TMEM16A.

Lo primero que se estudió fueron las diferencias entre la estructura con Ca^{2+} y sin Ca^{2+} . Dang et al. 2017 mostraron dos estructuras de TMEM16A obtenidas a partir de dos técnicas diferentes de purificación, nanodiscos y solubilizando en LMNG (lauril maltosa neopentilglicol).

En este trabajo observaron diferencias en la posición y orientación de la hélices transmembranales TM3, TM4 y TM6 cuando se usó LMNG. Mediante la técnica de nanodiscos y LMNG se purificó la proteína usando 1 mM Ca^{2+} , sin embargo, solo en las estructuras obtenidas con nanodiscos se observaron dos iones Ca^{2+} unidos. En cambio, en la proteína purificada con LMNG apenas se logró observar la presencia de un Ca^{2+} . La diferencia se debe a que los nanodiscos pueden ayudar a estabilizar la TM6 y permite la coordinación correcta de Ca^{2+} .

Esto llevo a proponer que un proceso importante para la activación del canal es la unión de dos iones Ca^{2+} y que a su vez permiten el movimiento de la TM6 para la estabilización de los iones Ca^{2+} en su sitio. En el caso de la estructura con un solo ion de Ca^{2+} unido, no hay mucha información experimental que sustente que este estado conformacional representa a un canal activo.

El trabajo publicado simultáneamente por Paulino et al, 2017 mostró algo muy similar. En este trabajo se purificó TMEM16A en ausencia y presencia de 1 mM de Ca^{2+} . La estructura tridimensional se obtuvo mediante Crio microscopia electrónica. Las estructuras obtenidas en las dos condiciones mostraron gran similitud en la mayor parte de la proteína, excepto por cambios en la regiones que rodean el sitio de unión de Ca^{2+} (Figura1-6A) .

La formación del dímero se da por las interacción de la hélice α_{10} de cada monómero, y se mostró que el poro está formado por α_3 - α_7 de igual manera como se reportó en el trabajo anterior (36). El sitio de unión de Ca^{2+} está formado por las α_6 , α_7 y α_8 y este se localiza justo frente al poro (Figura 1-6B).

Las diferencias estructurales entre el canal que tiene unido Ca^{2+} y el que no lo tiene, se refleja principalmente en el movimiento de la hélice transmembranal α_6 (Figura 1-6B). En ausencia de Ca^{2+} , la α_6 se encuentra en dirección a la α_4 , cuando el calcio se une induce el giro de α_6 en dirección al sitio de pegado de Ca^{2+} permitiendo que los residuos N650 y E654 (isoforma ac) estabilice dos iones Ca^{2+} en sus sitio de unión. Se mostró que el residuo que facilita dicho movimiento es el G654. Las Gln son altamente flexibles.

Estos resultados llevaron a proponer que el canal se encuentra en diferentes estados conformacionales con y sin Ca^{2+} . Estos cambios estructurales electrostáticos están dados por la unión de Ca^{2+} y derivan en el movimiento de la α_6 facilitado por el residuo G654 que funciona como una bisagra. Al mismo tiempo la estabilización del Ca^{2+} en su sitio reduce sustancialmente el potencial electrostático lo que facilita el flujo de aniones por el poro y lleva al canal a un estado activo.

1.6.3 Activación por calor

El cuerpo humano regula la temperatura mediante mecanismos de retroalimentación neural, que operan principalmente a través del hipotálamo. En el hipotálamo están tanto los mecanismos de control como los detectores de temperatura. Se ha observado que estos detectores son canales iónicos que están distribuidos en el cuerpo humano. Por ejemplo, se ha observado en queratinocitos detectores a calor (29, 117).

Inicialmente se describió al canal TRPV1 como canal detector de calor ya que se activa a temperaturas superiores a 43°C . Más tarde se identificaron los canales TRPV2, TRPV4, TRPA1 y TRPV8 como los canales responsables de detectar cambios de temperatura desde frío hasta calor (152). En 2012 Cho et al. propusieron

al canal TMEM16A como detector de calor en neuronas nociceptivas (23, 116, 152). En este trabajo sobre expresaron TMEM16A en células HEK-293 y aplicaron un gradiente de temperaturas y observaron corrientes entrantes de Cl⁻. Reportaron que el canal TMEM16A, así como TMEM16B pueden activarse a temperaturas superiores a 43°C en ausencia de Ca²⁺. También se observó que inhibidores para TMEM16A atenuaban esta respuesta.

Actualmente se desconoce el mecanismo por el cual TMEM16A detecta la temperatura. Se ha propuesto que la activación en altas temperaturas deriva en la despolarización de las neuronas DRG las cuales tienden a acumular altas concentraciones de Cl⁻ intracelular (27).

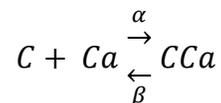
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

TMEM16A es un canal que para activarse requiere además de Ca^{2+} que la membrana se despolarice y entonces el canal puede ser conductivo. Como se describió en los antecedentes, la relación entre la conductancia y el V_m no es constante, incrementa a medida que el V_m incrementa.

Esto demuestra que la probabilidad de encontrar al canal en el estado abierto depende del V_m a una concentración constante de Ca^{2+} intracelular. ¿Como explicar esta dependencia con el V_m ? Los canales dependientes de V_m tienen un detector de V_m que les permite percibir los cambios en la diferencia de V_m a través de la membrana. Este detector se localiza en una región de la proteína, usualmente una alfa hélice, que contiene aminoácidos cargados que se reubican ante los cambios en el campo eléctrico de la membrana.

Este cambio conformacional lleva al canal a un estado activo conductivo. De esta manera el potencial eléctrico se convierte en trabajo mecánico que finalmente abre el poro. Sin embargo, TMEM16A no cuenta con detectores de V_m “canónicos”. Por lo anterior surgen las preguntas ¿Cómo TMEM16A puede detectar cambios en el V_m para activarse? y ¿De dónde viene esa dependencia con el V_m ?

En los antecedentes mostré información indicando que la sensibilidad del canal al Ca^{2+} intracelular dependen del V_m . Este aspecto lo podríamos analizar de la siguiente manera:



Donde C es el canal, Ca es el Ca^{2+} , CCa es el Ca^{2+} unido al canal, y α y β son las constantes de velocidad que dictan las probabilidades de la interacción del canal (C) con Ca^{2+} .

La probabilidad de encontrar al canal en el estado abierto esta dado por:

$$P = \frac{1}{1 + \left(\frac{EC_{50}(Vm)}{[H]}\right)^N} \quad \text{Ecuación 1}$$

La constante de equilibrio de esta interacción es el cociente β/α . Este cociente es directamente proporcional a la concentración necesaria para obtener el 50% de la respuesta (EC_{50}). Este valor se usa para inferir la sensibilidad de una proteína a un activador o a un inhibidor. En este caso, lo usaré para definir la sensibilidad de TMEM16A a Ca^{2+} . La EC_{50} tendrá un valor constante si estas dos constantes de velocidad no varían con el V_m .

La Figura 1-11B muestra que el valor de la EC_{50} es diferente a +60 mV y a -60 mV. Esto significa que la EC_{50} es dependiente de V_m . En otras palabras, el V_m despolarizante mantiene al Ca^{2+} en su sitio de unión y por el contrario el V_m hiperpolarizante empujaría al Ca^{2+} lejos del canal. Este análisis, sugiere que la dependencia con el V_m puede ser atribuida únicamente a la unión del Ca^{2+} .

En 2011 se describió por primera vez que el canal TMEM16A puede activarse por V_m en ausencia de Ca^{2+} intracelular (158). Sin embargo, el mecanismo preciso se desconoce.

La activación por V_m es muy baja. En la Figura 2-1 izquierda se observa un trazo representativo de corriente de la activación de TMEM16A por V_m . Es claro ver que a comparación con la activación por Ca^{2+} , no hay cinética de activación y no se observan las corrientes de cola características de la activación por Ca^{2+} . Además, la activación es muy rápida y constante durante todo el tiempo del estímulo.

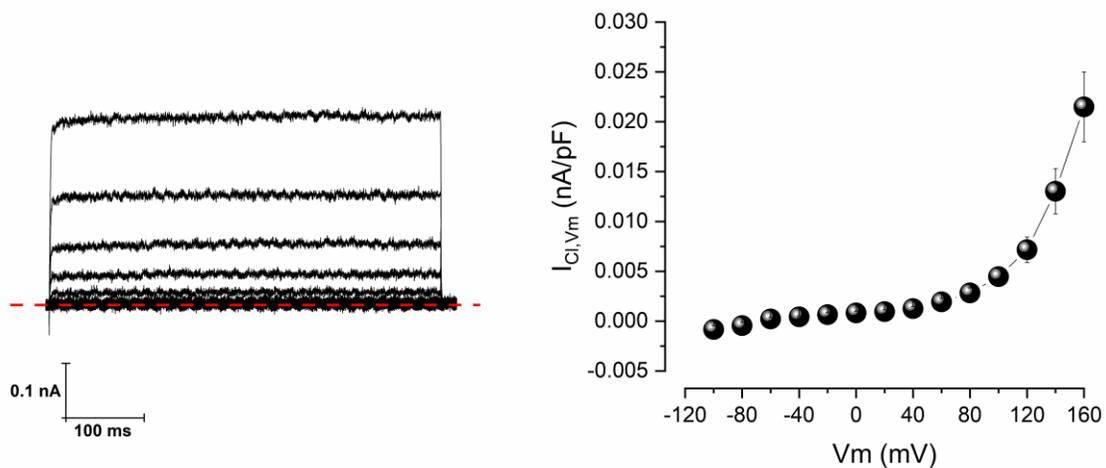


Figura 2-1 Activación de TMEM16A por voltaje. Izquierda: trazos representativos de corriente a diferentes V_m provenientes de la activación de TMEM16A por V_m en ausencia de Ca²⁺ intracelular. Derecha: Relación corriente-V_m de la activación por V_m de TMEM16A, los datos de esta grafica fueron obtenidos midiendo el valor de corriente (izquierda) al final del pulso para cada V_m.

Este dato sugiere que además de la dependencia con el V_m provista por la unión de Ca²⁺ debe existir otra fuente ya sea intrínseca o extrínseca que provea dependencia con el V_m.

La activación del canal en ausencia de Ca²⁺ es muy pequeña, aproximadamente 10 veces más pequeña a la observada con Ca²⁺ (Figura 2-1).

Hay dos requisitos que debe cumplir un segmento de la proteína para participar en la medición del V_m: 1) tener aminoácidos cargados y 2) estar localizados dentro de la membrana donde varía el campo eléctrico.

Mediante un análisis de la topología del canal se observó que la primera asa intracelular contiene 5 residuos cargados negativamente (⁴⁴⁴EEEE⁴⁴⁸). A pesar de que se encuentran fuera de la membrana podrían funcionar como detectores de V_m. Una despolarización podría modificar la posición de los residuos cargados y acercarlos a la membrana. Esto modifica la estructura de la proteína y permite la apertura del canal. En cambio, una hiperpolarización tendría el efecto contrario. Sin embargo, el análisis de mutantes en los residuos de esta región rápidamente demostró lo contrario, esta región no participa en la detección del V_m. Ríe abajo de

estos residuos se encuentran 4 residuos EAVK que forman el segmento de empalme alternativo "c" (EAVK). Lo sorprendente es la variante de TMEM16A que carece del segmento c (TMEM16A abd), tiene una activación por Vm potenciada y la sensibilidad a Ca²⁺ esta disminuida (158). Esto sugiere que EAVK podría modular tanto la detección del Vm, como el sitio de unión de Ca²⁺. En ausencia de este segmento resulta más fácil activar al canal por Vm. Hasta el momento no está claro cómo estos aminoácidos pueden participar en la dependencia con el Vm.

Adicionalmente, la apertura por Vm también se logra al mutar residuos específicos localizados en la hélice transmembranal 6 (TM6). Las mutantes en los residuos I637A y Q645A permitieron que el canal mTMEM16A (a) se active por Vm conservando las propiedades conductivas del canal y además con un incremento radical en la sensibilidad a Ca²⁺ (119). Actualmente no hay una descripción del mecanismo de activación por Vm, aunque también se ha propuesto que el canal puede tener dependencia intrínseca con el Vm.

Estos trabajos descritos aquí han dejado en claro que TMEM16A o sus mutantes pueden activarse por Vm en ausencia de Ca²⁺, sin embargo, estos estudios no han dejado claro lo siguiente:

- ¿TMEM16A tiene dependencia intrínseca con el Vm o son factores externos los que confieren esta dependencia?
- A pesar de que se han estudiado las mutantes (Δ EAVK, I641A y G644A) que dan origen a canales que pueden ser activados solo por Vm en ausencia de Ca²⁺, se desconoce de dónde viene este aumento en la sensibilidad a Vm. Es decir, ¿Estas mutantes aportan a la dependencia con el Vm del canal o funcionan como moduladores de la activación por Vm?
- Los experimentos donde se elimina el segmento EAVK ubicado en la primera asa intracelular y se activa TMEM16A en ausencia de Ca²⁺, sugieren que esta región pudiera participar en la dependencia con el Vm.

- Finalmente, es necesario un análisis de la estructura primaria de la proteína en búsqueda de regiones que podrían participar en la dependencia con el V_m , además de identificar nuevas regiones que pudieran tener alguna implicación. También es necesario determinar si la dependencia a V_m pudiera provenir de factores externos tales como los iones que podrían estar aportando a la dependencia con el V_m como se ha observado que ocurre en el canal de Cl^- CLC-2. Esta información es de vital importancia para proponer mecanismos que explique la función de TMEM16A.

Un escenario posible para explicar la dependencia con el V_m puede inferirse del mecanismo por el cual el Ca^{2+} interacciona con TMEM16A. En este caso, he mostrado arriba que el V_m mantiene al Ca^{2+} unido al canal.

Un aspecto importante de la interacción electrostática es que el campo eléctrico no identifica la naturaleza química del catión. Por lo tanto, uno esperaría que los cationes divalentes puedan ser impulsados casi con igual eficiencia que el Ca^{2+} al sitio de unión y así activar al canal.

Yu-Li Ni et al. caracterizaron la activación del canal por diferentes cationes y observaron que el Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} pueden activar al canal y descubrieron que el Mg^{2+} compite con el calcio por el sitio de unión sin activar al canal (105). Esto sugiere que el sitio de unión tiene poca selectividad. Pero, el campo eléctrico también puede impulsar a cationes monovalentes a interactuar con el sitio de unión a Ca^{2+} siempre y cuando el sitio de unión permita la interacción con ellos.

Debido a la naturaleza acídica de los residuos que forman el sitio de unión a Ca^{2+} , el protón puede interactuar con ellos neutralizando su carga. Esto se demostró por Chun et al. en donde se observó que la activación inducida por Ca^{2+} está fuertemente inhibida por el H^+ intracelular. El incremento en la concentración de H^+ intracelulares desplazo a la derecha la curva concentración-respuesta a Ca^{2+} .

Con la finalidad de localizar el sitio donde tienen efecto los protones se mutaron las histidinas ubicadas en la región citosólica, sin embargo, ninguna de las mutantes mostró reducción en la inhibición por el H^+ . Sorprendentemente las mutaciones en

los residuos Glu, Asp o Asn en el sitio de pegado de Ca^{2+} bloquearon la inhibición inducida por el H^+ . Esto sugiere que el H^+ interfiere en el pegado del Ca^{2+} a su sitio probablemente compitiendo por el sitio (28).

Los escenarios arriba analizados sugieren que TMEM16A podría adquirir dependencia con el V_m de manera extrínseca. Esto es, el potencial podría movilizar a cationes al sitio de unión y así permitir que el V_m active al canal.

Entre los cationes fisiológicos presentes en el lado citoplásmico se encuentran el Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y H^+ . El Na^+ y K^+ a pesar de ser muy abundantes no activan a TMEM16A. Los protones, a pesar de su baja concentración $10^{-7.2}$ M podrían activar al canal, como ya se ha mencionado, pueden competir con el Ca^{2+} por el sitio de pegado y así desplazarlo. Esto sucede en presencia de Ca^{2+} , pero igualmente podría suceder en ausencia de Ca^{2+} .

En mi trabajo de tesis analicé dos posibilidades:

1. Que la primera asa intracelular participe en conferir dependencia con el V_m .
2. Que el protón pueda interaccionar con el canal de manera dependiente del V_m .

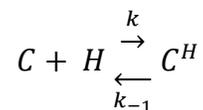
2.1 HIPÓTESIS

Con base en los datos arriba descritos propongo la siguiente hipótesis para explicar la activación de TMEM16A en ausencia de Ca^{2+} intracelular:

La activación por V_m de TMEM16A en ausencia de Ca^{2+} se lleva a cabo por dos vías: la primera es mediada por la primera asa intracelular que al reaccionar ante cambios en el potencial promueve la apertura del canal. La segunda vía es mediada por la protonación dependiente del V_m del sitio de pegado de Ca^{2+} que promueve la apertura del canal.

La primera parte de mi hipótesis sugiere que residuos de la primera asa $^{444}\text{EEEEAVK}^{451}$ forman parte de un detector del V_m intrínseco que responde a cambios en el V_m y que lleva al estado abierto del canal.

La segunda parte sugiere que el canal será protonado de manera dependiente del V_m . Esto es:



La constante de equilibrio K de la reacción de protonación debe ser dependiente del V_m . Por lo tanto, la probabilidad de encontrar al canal en el estado abierto estará dado por:

$$P = \frac{1}{1 + \left(\frac{K(V_m)}{[H]}\right)^N} \quad \text{Ecuación 1}$$

2.2 OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar el mecanismo mediante el cual el Vm activa al canal TMEM16A en ausencia de calcio intracelular.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar la activación por Vm de TMEM16A en ausencia de Ca^{2+} . Para lograr esto registraré la actividad del canal a diferentes Vm en células dializadas con soluciones que no contengan Ca^{2+} .
2. Determinar la contribución del segmento $^{448}\text{EAVK}^{451}$ a la dependencia a Vm de TMEM16A mediante delección completa de este segmento y mutaciones que rompan la integridad del segmento como es eliminando EA o VK. Los canales mutantes los registraré en ausencia de Ca^{2+} y determinaré su dependencia con Vm.
3. Determinar la contribución a la dependencia con el Vm de los residuos I641 y Q649 que se encuentran en el poro de TMEM16A mediante mutaciones dirigidas I641A y Q649A. Ambas mutantes las registraré en ausencia de Ca^{2+} intracelular y compararé la dependencia con Vm de canales silvestres y mutantes.
4. Analizar la contribución del segmento intracelular $^{444}\text{EEEE}^{448}$ a la dependencia con el Vm mediante la remoción estos residuos (Glu) que lo componen y mediante el reemplazo de todos los residuos $^{444}\text{EEEE}^{447}$ por lisina para invertir la carga de negativa a positiva y evaluar el efecto en la dependencia con Vm. Posteriormente evaluaré la función de los canales mutantes resultantes en ausencia de Ca^{2+} intracelular.
5. Determinar la posible interacción entre el primer asa intracelular y el sitio de unión a Ca^{2+} . Para esto realizaré mutaciones en el sitio de unión a Ca^{2+} en la isoforma a de TMEM16A (Figura 1-2) que carece de los residuos EAVK, el

segmento b y d y evaluaré la actividad de las mutantes resultantes en ausencia de Ca^{2+} intracelular.

6. Determinar el efecto del H^+ intracelular en la activación de TMEM16A por V_m en ausencia de Ca^{2+} . Para demostrar que el H^+ intracelular puede inducir la activación del canal en ausencia de Ca^{2+} intracelular, registraré la actividad del canal a diferentes V_m y a diferentes pH_i en ausencia de Ca^{2+} intracelular.
7. Evaluar la participación de los residuos ácidos que forman el sitio de unión de Ca^{2+} (E654, E702, E705, E734 y E738) en la activación por V_m mediante acidificación intracelular y mediante mutaciones puntuales de cada uno de los residuos. Registraré la actividad de los canales mutantes en ausencia de Ca^{2+} intracelular a diferentes pH_i y V_m .

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CULTIVO CELULAR Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNA

Para realizar mis experimentos utilicé células HEK-293. Las células se cultivaron en el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO BRL) suplementado con 10% FBS y 2 mM L-glutamina y 1 mg ml⁻¹ de Geneticina a 37 C° en una atmosfera compuesta por 95%O₂/5%CO₂.

Expresión transitoria de los canales. El gene que codifica para el canal TMEM16A isoforma ac se clonó en un vector bi-cistronico (pIRES II-EGFP, Clontech, Mountain View, CA, USA) para su expresión en células HEK 293 como se ha descrito previamente (34). Este vector permite la expresión del canal sin etiqueta fusionada y de la proteína verde fluorescente EGFP que se queda en el citoplasma. Esta última nos permite seleccionar las células transfectadas. Crecimos células HEK-293 hasta una confluencia del 70-80% y transfectamos con 1 µg/µl del cDNA con el agente de transfección Polyfect (QIAGEN), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las células transfectadas se usaron 12-16 horas después de la transfección. Las células se despegaron y se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio de 5 mm de diámetro. La células se dejaron adherirse al cubreobjetos por al menos 2 horas antes de utilizarse. Para experimentos de parche escindido, las células HEK293 transfectadas (estable o transitorias) con TMEM16A o las mutantes se sembraron en cubreobjetos tratados previamente con Poly-L-lisina.

3.2 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

La mutagénesis dirigida es una técnica de biología molecular que se utiliza para hacer cambios específicos en la secuencia de ADN de un gen. En este trabajo usé la técnica de PCR inversa. Esta técnica utiliza cebadores orientados al revés (los

cebadores se ubican en el mismo punto para amplificar el plásmido entero). De esta manera se puede amplificar el plásmido con una inserción, delección o sustitución.

Para obtener mutaciones en sitios específicos utilicé el kit Quick Change mutagénesis Kit (Agilent Santa Clara, CA, USA). Este kit es muy práctico para realizar mutaciones puntuales, reemplazar aminoácidos y eliminar o insertar aminoácidos únicos o varios adyacentes. El método de mutagénesis dirigida QuikChange II se lleva a cabo utilizando la ADN polimerasa *PfuUltra* de alta fidelidad (HF) ** para la replicación mutagénica dirigida por cebador de ambas cadenas de plásmidos con la mayor fidelidad.

El procedimiento básico utiliza el vector pEGFP-N1 que tiene clonado el gen que codifica para el canal TMEM16A y los cebadores sintéticos para cada mutación (ver Tabla 1 y Figura 3-1). Los cebadores, cada uno complementario a las cadenas opuestas del vector, se extienden durante la reacción de PCR mediante la ADN polimerasa *PfuUltra* HF, sin desplazamiento del cebador .

Tabla 1 Oligonucleótidos cebadores usados para mutagénesis sitio dirigida.

Mutación	Cebadores 5'-3'
N650Q- E654Q	F: 5'- CATTGAGATCCGCCTGCAGGCCAAAAAGTTTGTAC CG -3' R:5'- CGGTGACAACTTTTTGGCCTGCAGGCGGA TCT CAA TG -3'
E734Q	F: 5'- GCT AAA CAA CAT TCA GAT CCG CCT GG -3' R: 5'- CCA GGC GGA TCT GAA TGA TGT TTA GC -3'
D738Q	F: 5'- CAACATCATTGAGATCCGCCTGCAGGCCAAAA G -3' R: 5'- CTTTTTGGCCTGCAGGCGGATCTGAATGATGTTG -3'

La extensión de los cebadores genera un plásmido mutado. El protocolo de temperaturas usado durante la reacción de PCR se muestra en la Tabla 2. Después de la reacción de PCR, el producto se trata con *Dpn* I. La endonucleasa *Dpn* I

(secuencia blanco: 5´-Gm6ATC-3´) es específica para ADN metilado y hemimetilado y se usa para digerir la cadena de ADN parental y así seleccionar el DNA sintetizado con la mutación (el ADN aislado de casi todas las cepas de *E. coli* está metilado y, por lo tanto, es susceptible a la digestión por *Dpn I*). Posteriormente el DNA se purificó y se secuenció mediante la técnica de Sanger.

Tabla 2 Parámetros para las ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	1 min
2	18	95°C	50 s
		60°C	50 s
		68°C	12 min
3	1	68°C	8 min

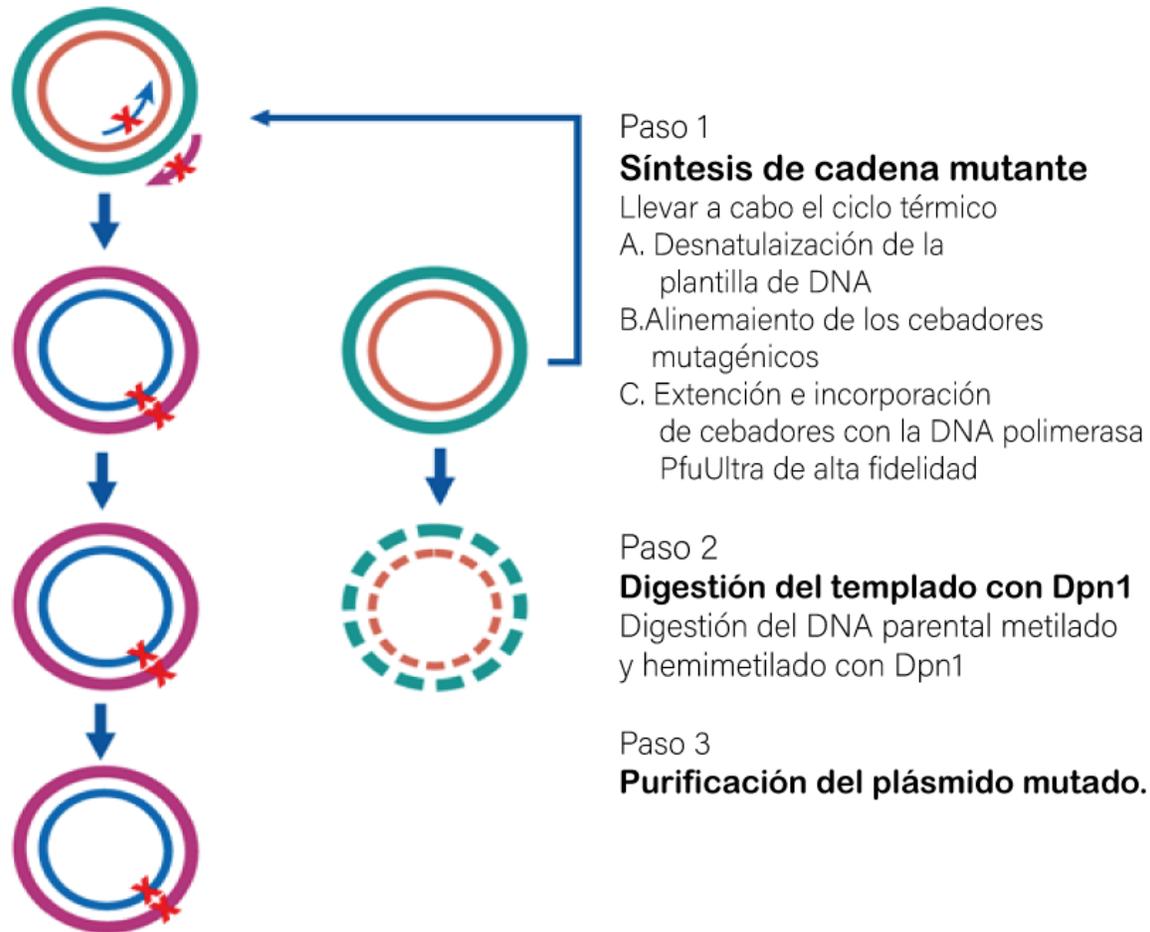


Figura 3-1 Descripción general del método de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange II

3.3 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

3.3.1 Técnica Fijación de Voltaje (Patch Clamp)

La técnica de fijación de V_m permite establecer una diferencia de V_m a través de la membrana plasmática de la célula (K. Cole 1940). La diferencia de V_m se puede cambiar entre V_m positivos o negativos y también se determina el tiempo del estímulo, esto se denomina protocolo. El protocolo puede ser un escalón de V_m que cambia el V_m de un valor constante A and otro valor constante B, puede ser un potencial de acción, o puede ser una rampa de V_m que cambia la diferencia de V_m a través de la membrana a una velocidad específica. Estos protocolos tienen una cierta duración que se especifica. Durante ese tiempo, la diferencia de V_m a través de la membrana debe ser la que especifica el protocolo. Debe de ser isopotencial.

De esta forma, todas las proteínas que se encuentren en todas las regiones de la membrana plasmática estarán expuestas al mismo V_m .

Hay varias maneras de fijar el V_m : fijación del V_m con el alambre axial, fijación de V_m en fibra muscular cortada, fijación de V_m mediante electrodos, fijación de V_m mediante patch clamp, o fijación de V_m en bicapas, entre otras. La ventaja del patch clamp es que permite registrar la actividad eléctrica de una gran variedad de células en diferentes formas.

La técnica de patch clamp cuenta con varias configuraciones, entre ellas está la configuración de célula completa, también el registro de micro áreas como parche escindido con la cara interna o externa hacia afuera entre otras (Neher y Sakman en 1976). En este trabajo usamos dos configuraciones, la configuración de célula completa y la configuración de parche escindido con la cara interna hacia afuera.

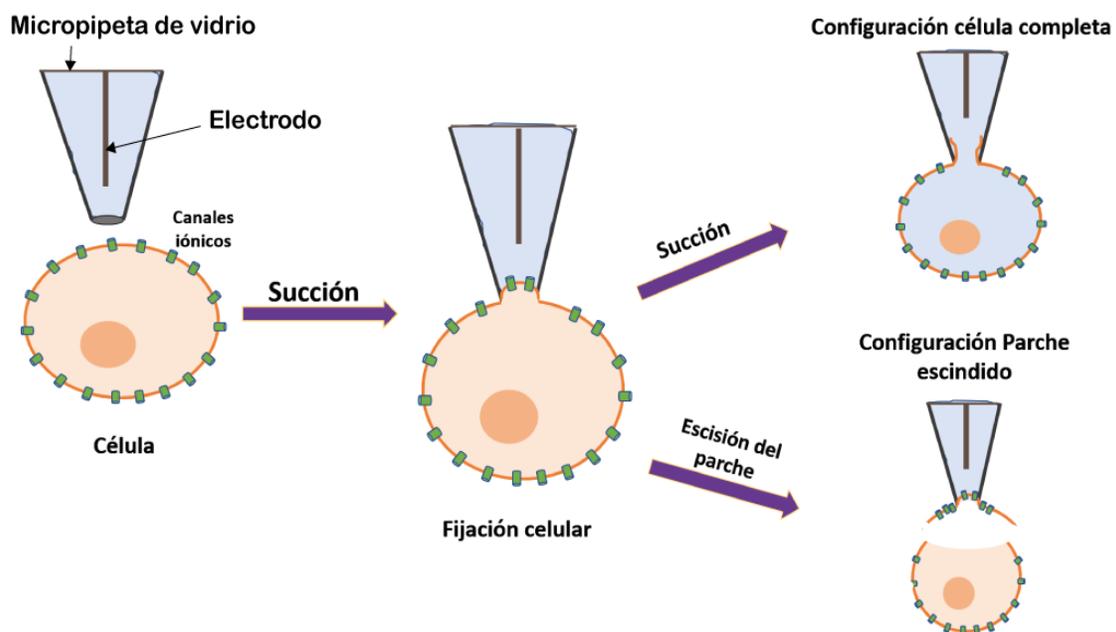


Figura 3-2 Esquema que describe la técnica de fijación de voltaje en dos configuraciones.

En la Figura 3-2 se muestran estas dos modalidades y el proceso para llegar a cada una de las configuraciones. Antes de iniciar el experimento, la micropipeta de vidrio se llena con la solución interna y se inserta en un sostenedor. Este sostenedor a su vez está enroscado al cabezal y tiene un alambre de plata cubierto de cloruro que

sirve como electrodo de registro (Figura 3-2) . De esta forma el electrodo de registro queda en el interior de la micropipeta en contacto con la solución electrolítica intracelular de registro. Al inicio del experimento, la entrada negativa del amplificador operacional, que se encuentra en el cabezal, está conectada al baño y esta aterrizada, mientras que la entrada positiva, que está conectada al electrodo de registro, está conectada al protocolo de estímulos. Cuando se inserta la micropipeta al baño que rodea a las células, el amplificador medirá una cierta corriente que es proporcional al V_m aplicado por el estímulo. Con la ley de Ohm

$$I = \frac{V}{R}$$

podemos calcular la resistencia de la pipeta R . En esta caso, la resistencia del baño se ignora ya que es solución electrolítica altamente conductiva compuesta con 140 mM de TEA-Cl, 0.5 mM $CaCl_2$, 20 mM HEPES por lo cual su resistencia es cerca de 0. Haciendo que $V=0$ corregimos con el amplificador cualquier corriente espuria, esto es hacemos $I=0$.

Una vez seleccionada la célula, con la ayuda de un micro manipulador se acerca la micropipeta de vidrio hasta tocar la membrana plasmática. Debido a que estamos pasando un estímulo de valor constante en este momento podemos ver una disminución en la magnitud de la corriente lo cual nos indica que estamos sobre la membrana y que la resistencia ha incrementado. Después con una sutil succión se logra que la membrana se pegue mejor a la boca de la micropipeta hasta llegar a la configuración de célula adherida. En este momento la resistencia entre la pipeta y el baño adquiere un valor $> 1 \text{ G}\Omega$. Esto nos indica que ahora la boca de la micropipeta está en contacto físico íntimo con la membrana y que la fuga de corriente hacia el electrodo de tierra es minúscula. Este sello entre la micropipeta y la membrana es eléctrico y mecánicamente estable. A partir de aquí se puede llegar a varias configuraciones.

Configuración de célula completa. Como su nombre lo indica, esta configuración nos permite registrar la corriente iónica de todos los canales en la membrana plasmática de una célula. Después de obtener el sello de alta resistencia,

succionamos sutilmente, Esto romperá la membrana y entonces la solución intracelular de registro de la micropipeta dializará el citoplasma de la célula (Figura 3-2). A partir de aquí podemos aplicar el protocolo necesario para registrar la corriente deseada.

Configuración de parche escindido. Esta configuración nos permite registrar la corriente a través de los canales que presentes en una pequeña área de membrana que se encuentra adosada a la boca de la pipeta. En este caso particular, la cara citosólica de la membrana queda expuesta a la solución que se encuentra en el baño. Esto nos permite exponer ahora la parte intracelular de los canales a iones o fármacos que deseemos. Después de obtener el sello de alta resistencia, con un jalón rápido controlado por el micro manipulador se retira la micropipeta. Esto escinde un parche de la membrana el cual queda adherido al electrodo ya que el sello de alta resistencia obtenido en la configuración de célula adherida nunca se pierde.

En ambas configuraciones hay dos electrodos, uno a cada lado de la membrana plasmática. Estos electrodos sirven para fijar la diferencia de potencial en la membrana. Cuando el V_m a través de la membrana cambia, los canales responden con una corriente. Esa corriente desviará el V_m proporcionalmente siguiendo la ley de Ohm. Para mantener el V_m al valor deseado durante el tiempo elegido, se inyecta de manera retroalimentada una corriente proporcional a la que se movió a través de la membrana con la ayuda de un amplificador (Figura 3-3). La corriente inyectada es la misma que se movió a través de los canales, por lo tanto, podemos registrar la corriente inyectada como la corriente iónica. Esta corriente se mide con el amplificador, donde se amplifica, se filtra y después la corriente se digitaliza. En mi caso, las corrientes se filtraron a 5 kHz y se digitalizaron a 10 kHz (Figura 3-3).

Después, la corrientes digitalizadas las podemos visualizar y analizar. Todo el proceso se controla con el programa de adquisición de datos llamado pClamp versión 10.6. Este programa cuenta con dos subprogramas. Uno llamado Clampex que tiene todas las rutinas para la adquisición de datos mediante un convertidor analógico digital, filtros digitales. Cuenta además con rutinas para diseñar y aplicar

mediante un convertidor digital analógico el protocolo de pulsos. El otro subprograma es Clampfit que sirve para analizar los datos y graficarlos. Cuenta además con rutinas para filtrar digitalmente los datos. Por lo tanto, todo el proceso está controlado por este programa instalado en una computadora personal.

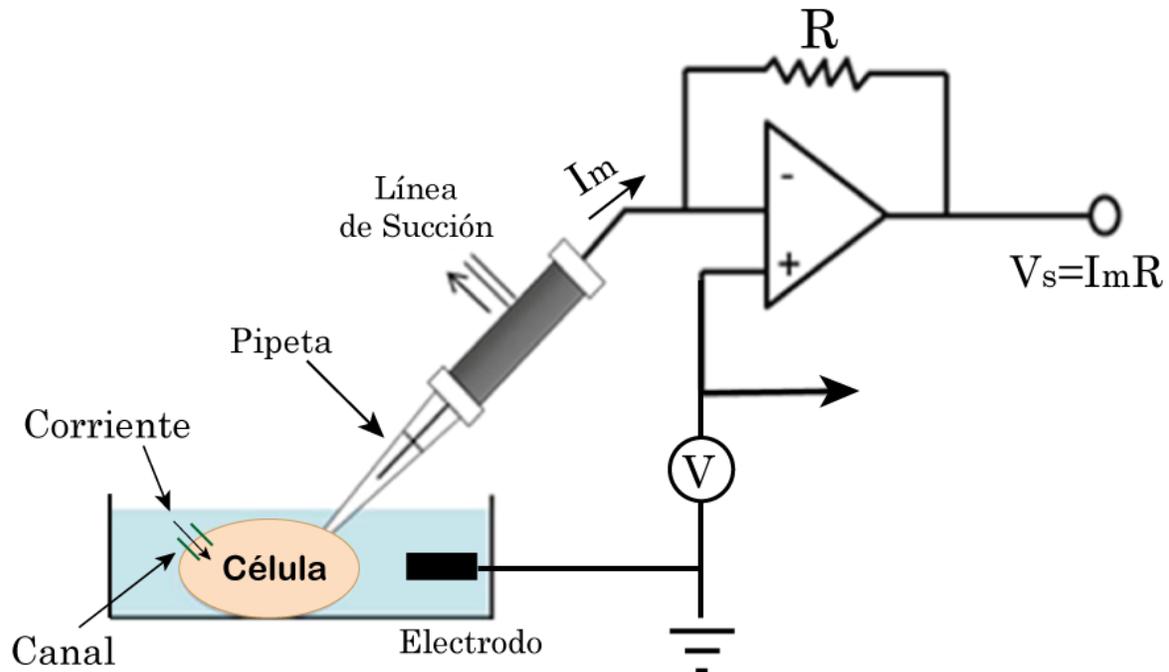


Figura 3-3 La técnica de patch clamp. La pipeta está conectada a la entrada negativa de un amplificador y la entrada positiva se conecta al voltaje de comando V_m , se muestra la configuración de célula completa. I_m es la corriente que en nuestro caso es I_{Cl, V_m} , y V_s es el voltaje de salida que esta dado por el producto de I_m y R que es la resistencia.

3.3.2 Condiciones técnicas de registro.

Las células HEK-293 se identificaron por su fluorescencia cuando se iluminaron con luz azul (~ 488 nm) dada por la expresión de la proteína verde fluorescente. Registros de corriente de Cl^- (I_{Cl}) se realizaron a temperatura ambiente (20-23 °C) mediante la técnica de fijación de V_m modalidad célula completa y parche escindido.

Protocolos de voltaje. Con la ayuda de un convertidor digital analógico se generan los protocolos de V_m que se aplican a través del electrodo que se encuentra en el lado citosólico. El protocolo de V_m para activar a los canales consiste en un potencial de mantenimiento de -30 mV seguido de pasos de V_m desde -100 mV hasta +160 mV en incrementos de 20 mV cada 0.5 segundos y se repolarizó a -100

mV. El intervalo entre cada pulso fue de 7 segundos (Figura 3-4A). Para la condición de parche escindido registramos la I_{Cl} aplicando una rampa de V_m de 635 ms que va desde -100 mV hasta +200 mV con la solución control (pHi=7.3) (Figura 3-4C). Posteriormente se recambia la solución a un pHi diferente mediante perfusión casera a gravedad (Figura 3-4C). La adquisición de datos y la generación de protocolos de V_m se realizaron con la interfaz Digidata 1550 (Molecular Devices) y amplificador PC ONE (Dagan Corporation) o un Axopatch 200 B (Molecular Devices). Las corrientes se filtraron a 5 kHz y se digitalizaron a 10 KHz con el software pCLAMP 10.6 (Molecular Devices).

Microelectrodos o micropipetas. Las micropipetas se hicieron con capilares de vidrio (Sutter Instruments) con un pulidor P-97 y se pulieron con la microforja de electrodos PP830 (Narishige, Tokio, Japón). Las resistencias de las pipetas se usaron en un rango de 4 a 5 M Ω para célula completa y 2-3 M Ω para parche escindido. Un puente de Agar en 3 M de KCl se usó para aterrizar la cámara de registro.

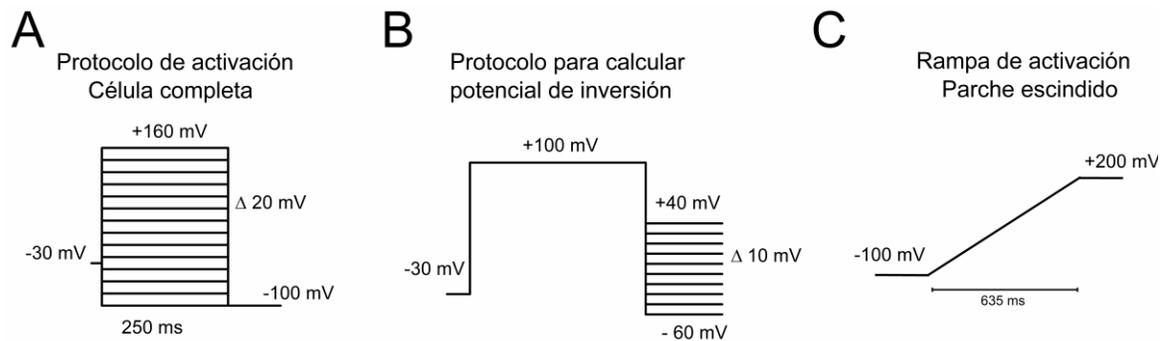


Figura 3-4 Protocolos de voltaje. **A** se muestra el protocolo que se usó en la configuración célula completa. Consiste en pasos de voltaje desde -100 mV hasta +160 mV con incrementos de 20 mV, el potencial de mantenimiento es de -30 mV y la repolarización se lleva a -100 mV. **B** Protocolo para calcular el potencial de inversión, este consiste en un pulso largo a + 100 mV y después pulsos cortos desde +40 mV hasta -60 mV con decrementos de 10 mV. **C** Protocolo usado en parche escindido, el cual consiste en cambios de voltaje desde -100 hasta +200 mV en un tiempo de 635 ms, este protocolo es conocido como rampa de voltaje.

3.4 SOLUCIONES DE REGISTRO

Solución intracelular: se preparó con y sin Ca^{2+} . La solución con $0.2 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} libre tiene los siguientes componentes: 39 mM TEA-Cl, 5.241 mM CaCl_2 , 50 mM HEPES, 25.24 mM EGTA-TEA, 85 mM D-manitol. Para la solución en cero Ca^{2+} , no se agrega Ca^{2+} y se compensa la osmolaridad con 90.2 de D-manitol. En ambos casos se usó EGTA como quelante, únicamente para la solución cero Ca^{2+} $\text{pHi}=4$ se usó 10 mM de BAPTA-K. Se usó el programa MAXCHELATOR (maxchelator.stanford.edu) para calcular la concentración de EGTA y Ca^{2+} totales para tener una concentración deseada de Ca^{2+} ionizado libre. La osmolaridad de las soluciones se midió con el método de punto de presión de vapor (VAPRO, Wescor Inc., South Logan, UT, USA). En todos los casos, la osmolaridad de la solución interna fue 290-310 mOsmol Kg⁻¹. Para soluciones con diferentes pH intracelular, las soluciones se prepararon en ausencia de Ca^{2+} como se describió antes y se amortiguaron con 50 mM de diferentes amortiguadores como MES (pH=6, 5 y 4), ácido cítrico (pH=5), ácido tartárico (pH=4), HEPES (pH=7.3), Bicina (pH=8 y 9). La tonicidad se mantuvo en 290-300 mosm/Kg.

Soluciones extracelulares: Las células se sumergieron en una solución externa control de: 139 mM TEA-Cl, 0.5 mM CaCl_2 , 20 mM HEPES, y 110 mM D-Manitol, el pH se ajustó a 7.3 con TEA-OH. Para determinar la selectividad iónica se reemplazó el 100% del Cl^- con el anión deseado. Para evitar que la I_{Cl^-} a través de los canales activados por cambios en el volumen celular (VRAC) contaminaran los registros, la solución externa se mantuvo hipertónica (380 – 400 mosmol Kg⁻¹) con D-manitol para evitar la activación de estos canales (65). Las soluciones externas se perfundieron por gravedad a un flujo de 3 ml/min. Para aplicar ácido tánico se sustituyó TEA-Cl por NaCl para evitar que este se precipitará. Todos los químicos son de Sigma Aldrich C0. St. Louis, MO, USA.

Tabla 3 Composición de las soluciones control (en mM) internas y externa.

Químicos	Soluciones internas		Solución externa
	0.2 μM Ca^{2+}	Cero Ca^{2+}	
TEA-Cl	39	40	139
CaCl ₂	5.241	—	0.5
EGTA-TEA	25.24	25.24	—
HEPES	50	50	20
D-manitol	85	90.2	110

3.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los criterios de inclusión y exclusión son una parte fundamental del protocolo de los experimentos.

3.5.1 Criterios de inclusión de células

Para este estudio se usaron células HEK-293 entre los pases 4-25. Hay dos criterios para la selección de células que formaron parte de este estudio:

1. La célula adherida al cubreobjetos
2. Una vez estimulada con la luz azul la célula debe emitir fluorescencia. Esto nos indica que la célula ha procesado el DNA y que tanto la proteína EGFP como la del canal están expresadas.

Una vez seleccionada la célula y se obtiene la configuración de fijación de Vm en célula completa, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros para determinar si se continúa con el experimento:

- a) Capacitancia de membrana (C_m): Intervalo de 10-20 pF.
- b) Resistencia de membrana (R_m): Mayor a 1 G Ω .
- c) Resistencia de acceso (R_a): Menor a 20 m Ω .
- d) La constante de tiempo de la corriente capacitiva o transiente capacitivo: Menor a 200 μ s.

3.5.2 Criterios de inclusión de datos para análisis

Una vez obtenidos los datos no todos son incluidos en el análisis. Para seleccionar los datos que serán analizados estos deben cumplir con el siguiente criterio.

El potencial de inversión es el criterio más importante para considerar. El potencial de inversión nos permite saber que el flujo de corriente que observamos es consecuencia del ion Cl⁻. Además, nos indica que la diálisis de la célula se llevó a cabo de manera óptima; es decir, cuando el potencial de inversión de la corriente es idéntico al potencial de Nernst para el gradiente de Cl⁻ a través de la membrana. El potencial de Nernst para el ion Cl⁻ se calcula con la siguiente ecuación:

$$E_{Cl} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_e} \quad \text{Ecuación 2}$$

Tomando en cuenta las concentraciones de Cl⁻ de las soluciones, el potencial de Nernst para el Cl⁻ es de -32.0 mV. El potencial de inversión de las corrientes que se registraron se obtuvo por interpolación en las curvas corriente contra V_m .

Aquí es importante hacer una aclaración en relación con el valor experimental del potencial de inversión. Este valor estará desviado del esperado por diferentes razones: la resistencia intrínseca de todo el sistema de registro, las diferencias de V_m inducidas por el potencial de unión líquida, la resistencia en serie, la concentración real de cloruro en las soluciones, entre otras. Todas estas variables contribuyen a que el potencial de inversión no sea idéntico al potencial de Nernst. Después de realizar las correcciones apropiadas, el potencial de inversión promedio experimental que se obtuvo fue de -31.0 ± 6 mV ($n= 9$). Por lo tanto, en el análisis

de datos solo se incluyó aquellos datos cuyo potencial de inversión estuviese en el rango de V_m de -25 a -37 mV.

3.6 ANÁLISIS DE DATOS

Todos los datos se analizaron y se graficaron con pCLAMP 10 (Molecular Devices) y Origin 9 (Origin Lab, Northampton, MA, USA). Las líneas punteadas de color rojo en los trazos de corriente indican el cero.

Curvas Corriente vs V_m . Los valores de I_{Cl, V_m} a cada V_m se midieron al final de cada despolarización. Después se dividieron entre el valor de la capacitancia de la célula (capacitancia es proporcional a la superficie de la célula o sea al tamaño de la célula) para obtener la densidad de corriente a cada potencial. Los valores de densidad de corriente de distintas células se promediaron y se graficaron como función del V_m . Alternativamente, los valores de corriente se normalizaron mediante la magnitud de corriente I_{Cl, V_m} medida al final del pulso a +160 mV. Los valores normalizados después se promediaron.

Secuencia de selectividad. Para determinar la secuencia de selectividad se llevaron a cabo experimentos pareados, esto significa que se aplicó siempre el control (Cl^-) y el anión de prueba. Los valores de I_{X, V_m} a cada V_m se midieron al final de cada despolarización en cada condición iónica. La corriente obtenida del anión X se dividió entre el control que es Cl^- a cada V_m correspondiente, de tal forma que se obtiene el cociente $I_{X, V_m}/I_{Cl, V_m}$, posteriormente los valores se promediaron.

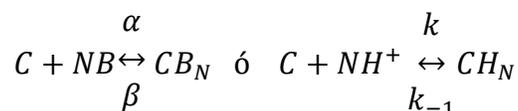
Cálculo de la EC_{50} o pK . Para este análisis se construyeron curvas concentración-respuesta de la siguiente manera. En el caso de inhibidores, los datos se presentan como % de inhibición. Los valores tanto en condiciones control como en la aplicación del inhibidor se tomaron al final del pulso. Una vez obtenidos los valores tanto del control como de la condición prueba a cada V_m se aplicó la siguiente fórmula para calcular el % de inhibición:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{I_{Cl, V_m} \text{ con inhibidor}}{I_{Cl, V_m} \text{ control} - I_{Cl, V_m} \text{ con inhibidor}} \times 100$$

Una vez obtenido el % de inhibición se promedió y se graficó en función de la concentración del inhibidor ([B]), para finalmente ajustar la curva resultante a la ecuación de Hill que se describe a continuación.

En el caso de las curvas concentración-respuesta a la $[H^+]$ intracelular, los valores se obtuvieron en célula completa en cada condición midiendo el valor de la corriente al final del pulso de activación. Los datos se normalizaron con el valor de conductancia, después todos los datos se promediaron y se graficaron en función del V_m . Debido a que las curvas obtenidas a $pH_i=4$ tenían mayor tendencia a saturar, se utilizaron estas curvas y su ajuste para calcular el valor de V_{max} el cual se usó para ajustar las curvas a otros valores de V_m . Por lo tanto, en el ajuste solo se dejaron dos parámetros libres, la constante de equilibrio, así como el número de Hill. Para el caso de parche escindido, se procedió de la siguiente manera. Los datos a diferentes pH se obtuvieron de manera pareada. Esto es, $pH_i=4$ y $pH_i =$ prueba. Debido a que pH ácidos activan la corriente, se consideró que la corriente máxima sería aquella magnitud de corriente activada a +200 mV y a $pH_i=4$. De esta manera, dos curvas I-V obtenidas de un mismo parche escindido se normalizaron contra el valor máximo de corriente registrado a +200 mV y a $pH_i=4$. Los valores normalizados después se promediaron y el cociente promedio ($I_{pH=x}/I_{pH=4}$) se graficó en función del V_m .

Los parámetros que caracterizan el efecto de diferentes concentraciones de inhibidores o protones ($[B]$ o $[H^+]_i$) en I_{Cl,V_m} se determinaron ajustando la ecuación de Hill (Ecuación 1) a las curvas concentración-respuesta. Asumiendo que N es el número de H^+ o B (moléculas que inhiben) que interactúan con un canal de acuerdo con el siguiente esquema:



Donde C es el canal, alfa y beta representan las constantes de velocidad y k y k_{-1} indican las constantes de equilibrio, se puede mostrar que la fracción de respuesta obtenida será dada por:

$$Respuesta = (I_{max} - I_{min}) \frac{1}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{[B]}\right)^N} + I_{min} \quad \text{Ecuación 3}$$

I_{max} y I_{min} son máxima y mínima respuestas, IC_{50} es la concentración de inhibidor ([B]) necesario para obtener el 50 % de inhibición; esta también representa la constante de equilibrio de protonación K, y N es el coeficiente de Hill.

Dependencia con el voltaje de la constante de equilibrio de la reacción de protonación. Para determinar la dependencia con el V_m de la constante de asociación del protón con el canal (K) se ajustaron las curvas de titulación con la ecuación de Hill a diferentes V_m . De esos ajustes se obtuvo K a cada V_m . K se convirtió a pK (-log K) y se graficó en función del V_m . Para calcular la “localización” del sitio de unión del protón dentro del campo eléctrico, la curva pK vs V_m se ajustó a la ecuación 4:

$$pK(V_m) = pK_0 + \frac{\theta zFE}{2.303RT} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde pK_0 es el pH efectivo necesario para obtener el 50 % de activación cuando el $V_m=0$, R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, F es la constante de Faraday, z es la carga y δ es la distancia del campo eléctrico desde el interior.

Para obtener el valor de $V_{0.5}$ de TMEM16A-WT, la curva I_{Cl, V_m} vs V_m se ajustó a la siguiente ecuación:

$$y = \frac{(V_m - V_r) * G_{max}}{1 + e^{(V_m - V_{0.5})/dx}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde V_m es el V_m fijado, V_r es el potencial de inversión, $V_{0.5}$ es el V_m al cual se obtiene el 50% de canales activados, G_{max} es la conductancia máxima observada y dx es la sensibilidad a V_m . El potencial de unión líquida se calculó con el protocolo

Clampex de pClamp y el valor obtenido se usó para corregir todos los valores de potencial de inversión.

Los datos graficados se presentan como el promedio \pm error estándar de la media (S.E.M). Con la letra n se indica el número de experimentos independientes que se realizaron para cada condición. Diferencias estadísticamente significativas se calcularon con la prueba estadística de Student-t-test o ANOVA.

4 **ACTIVACIÓN POR VOLTAJE DE TMEM16A EN AUSENCIA DE Ca^{2+}**

4.1 INTRODUCCIÓN

Existen reportes que el canal TMEM16A podría activarse por V_m en ausencia de Ca^{2+} cuando se elimina el segmento de empalme alternativo “C” (EAVK) (158). El canal sin este segmento se activa por V_m y su sensibilidad a Ca^{2+} se reduce dramáticamente (157). Sin embargo, para demostrar que TMEM16A se activa en ausencia de Ca^{2+} intracelular es necesario registrar la actividad del canal silvestre y corroborar que las corrientes resultantes se originan por la expresión de TMEM16A y no por la activación de algún canal endógeno del sistema de expresión. Para demostrar de manera definitiva que TMEM16A se activa por V_m en ausencia de Ca^{2+} intracelular se realizaron los siguientes experimentos:

1. Caracterización de la I_{Cl, V_m} a través de TMEM16A que se activa por efecto de la estimulación por V_m en ausencia de Ca^{2+} intracelular en células HEK 293 que expresan el canal TMEM16A silvestre.
2. Evaluación de las propiedades de conducción para contestar las siguientes preguntas :¿TMEM16A sigue siendo un canal aniónico?, ¿Se ve alterada la secuencia de selectividad?
3. Finalmente, para mostrar farmacológicamente que TMEM16A se activa en ausencia de Ca^{2+} intracelular, se realizaron curvas concentración respuesta para los inhibidores específicos de TMEM16A: ácido tánico y ácido 9-antracencarboxílico.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 La probabilidad de apertura de TMEM16A activado por voltaje es muy baja.

Para demostrar la activación de TMEM16A en ausencia de Ca^{2+} intracelular se dializaron células HEK 293 que expresan el canal durante 5 minutos antes de realizar el registro de la corriente. Las células se estimularon con el protocolo de activación mostrado en la Figura 3-4A. Con este protocolo, se cambió la diferencia de potencial entre el exterior y el interior de la célula desde -100 hasta +160 mV. La Figura 4-1A muestra las corrientes en una célula. Las corrientes que se obtuvieron varían con el potencial. A V_m negativos no se registró corriente alguna a pesar de tener 40 mM de Cl^- en el lado citosólico. A V_m positivos la corriente incrementa al incrementar la magnitud del V_m a valores positivos.

La I_{Cl,V_m} se activa y se desactiva muy rápido. La constante de tiempo de activación fue de 0.59 ± 0.11 ms a +160 mV ($n=5$) mucho más rápida que la reportada para la activación por Ca^{2+} que ronda los 500 ms. La magnitud de I_{Cl,V_m} permanece casi constante durante el tiempo que duró el estímulo. Un aspecto sorprendente de estos registros es que no se observaron corrientes de cola al repolarizar a -100 mV. Esto sugiere que el cerrado del canal es muy rápido y por lo tanto la probabilidad de apertura disminuye casi a 0. La relación entre la corriente y el V_m se muestra en la Figura 4-1B. Aquí se aprecia que la corriente inicia al incrementar a un V_m relativamente positivo, alrededor de +100 mV. La relación muestra una fuerte rectificación saliente (corriente mayor a V_m positivo que a V_m negativo) cuando TMEM16A se activa en ausencia de Ca^{2+} (azul). La magnitud de la corriente promedio registrada a +160 mV fue de 0.26 ± 0.037 nA. Para evaluar si estas corrientes se debían al flujo de Cl^- por el canal TMEM16A obtuvimos registros de células HEK-293 que se transfectaron con el vector vacío y dializadas con 0 Ca^{2+} o con 0.2 μM Ca^{2+} . En estos registros no se observan corrientes endógenas debidas a la activación por V_m (Figura 4-1C). Todos los resultados anteriores muestran que el V_m activa al canal TMEM16A en ausencia de Ca^{2+} intracelular.

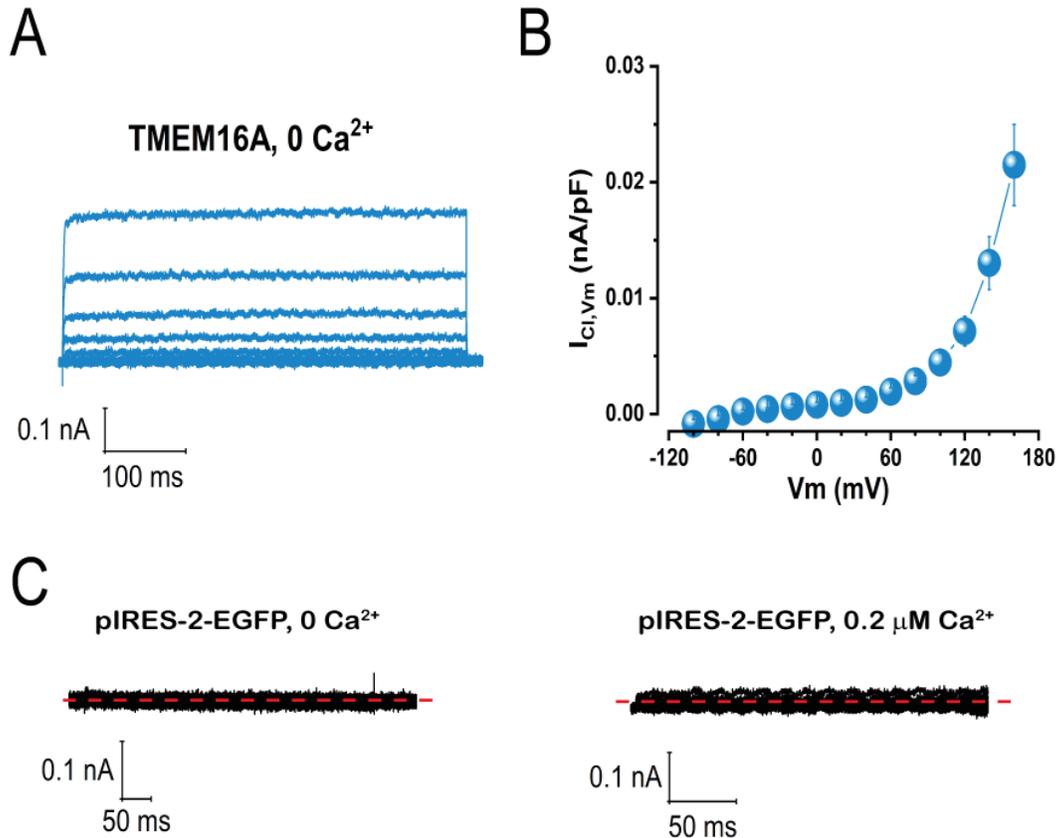


Figura 4-1 Activación por voltaje en ausencia de Calcio intracelular. **A** Trazos representativos de $I_{Cl,Vm}$ obtenidos de células HEK-293 que expresan el canal TMEM16A y dializadas con 25.24 mM EGTA/ 0 Ca^{2+} . **B** Relación de la densidad de $I_{Cl,Vm}$ en función de V_m del canal TMEM16A-WT ($n=10$). $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i=140/40$ mM, $pH_e/pH_i=7.3$. **C** Trazos representativos de $I_{Cl,Vm}$ obtenidos de células HEK-293 transfectadas con el vector pIRES-II-EGFP vacío, dializadas en ausencia (arriba) y en presencia (abajo) de 2.5 μM Ca^{2+} . $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i=140/40$ mM, $pH_e/pH_i=7.3$.

La cinética de la corriente a través de TMEM16A activada por V_m en ausencia de Ca^{2+} es diferente a la generada cuando el canal se activa en presencia de Ca^{2+} intracelular. La Figura 4-2A muestra registros de corrientes de cloruro de una célula dializada con una solución con 0.2 μM Ca^{2+} libre. La corriente a V_m negativos es pequeña, pero las corrientes a V_m positivos incrementan siguiendo un curso temporal rápido al inicio seguido de un componente lento. La magnitud de las corrientes aumenta al incrementar la magnitud del potencial. La magnitud promedio de la corriente a +160 mV fue de 2.95 ± 0.37 nA. Este valor es cerca de 10 veces más grande que el obtenido en ausencia de Ca^{2+} . Al repolarizar la célula a -100 mV, se registraron corrientes negativas llamadas corrientes de cola. El curso temporal mono exponencial es característico de las corrientes a través de este canal. Las

corrientes de cola muestran la cinética del cerrado del canal (Figura 4-2A). La relación corriente V_m muestra que el canal aun en presencia de Ca^{2+} tiene una rectificación pronunciada. El potencial de inversión promedio es de -32.01 ± 1.22 lo que indica que el cloruro es el responsable de llevar la corriente.

La corriente I_{Cl, V_m} también es diferente a la corriente a través de TMEM16B. TMEM16B es un parólogo de TMEM16A, pero tiene una sensibilidad menor a Ca^{2+} . Cuando se activa en presencia de $2.5 \mu M$ Ca^{2+} genera corrientes que son más rápidas que las de TMEM16A en presencia de Ca^{2+} (Figura 4-2B). Sin embargo, son más lentas que las de TMEM16A en ausencia de Ca^{2+} . Las corrientes a V_m negativos son muy pequeñas, pero incremental rápidamente a V_m positivos. A -100 mV genera una corriente de cola también rápida indicando que el canal se cierra rápidamente. La relación I_{Cl} vs V_m muestra que TMEM16B es un canal con rectificación saliente (Figura 4.2B). La magnitud promedio de corriente registrada a $+160$ mV fue de 1.182 ± 0.25 nA. Esta corriente es 4.5 veces más grande que la corriente a través de TMEM16A en ausencia de Ca^{2+} . A pesar de su identidad en secuencia con TMEM16A (63 %), TMEM16B no se activó por V_m en ausencia de Ca^{2+} intracelular (Figura 4-2C Izquierda). Esto está resumido en la curva corriente V_m de la Figura 4-2C derecha en círculos azules.

4.2.2 La I_{Cl, V_m} depende del anión extracelular

La corriente I_{Cl, V_m} se acarrea por el flujo de aniones y no por otros iones. Para demostrar esto se realizaron experimentos de sustitución iónica donde el Cl^- extracelular se sustituyó por los aniones SCN^- , I^- , Br^- y NO_3^- , para la condición de cero Ca^{2+} y en condiciones de activación con $0.2 \mu M$ de Ca^{2+} . Además de los aniones mencionados, se añadieron Fluoruro, glutamato y aspartato. En este caso el experimento consistió en primero registrar I_{Cl, V_m} y luego en la misma célula registrar la corriente después de sustituir al anión.

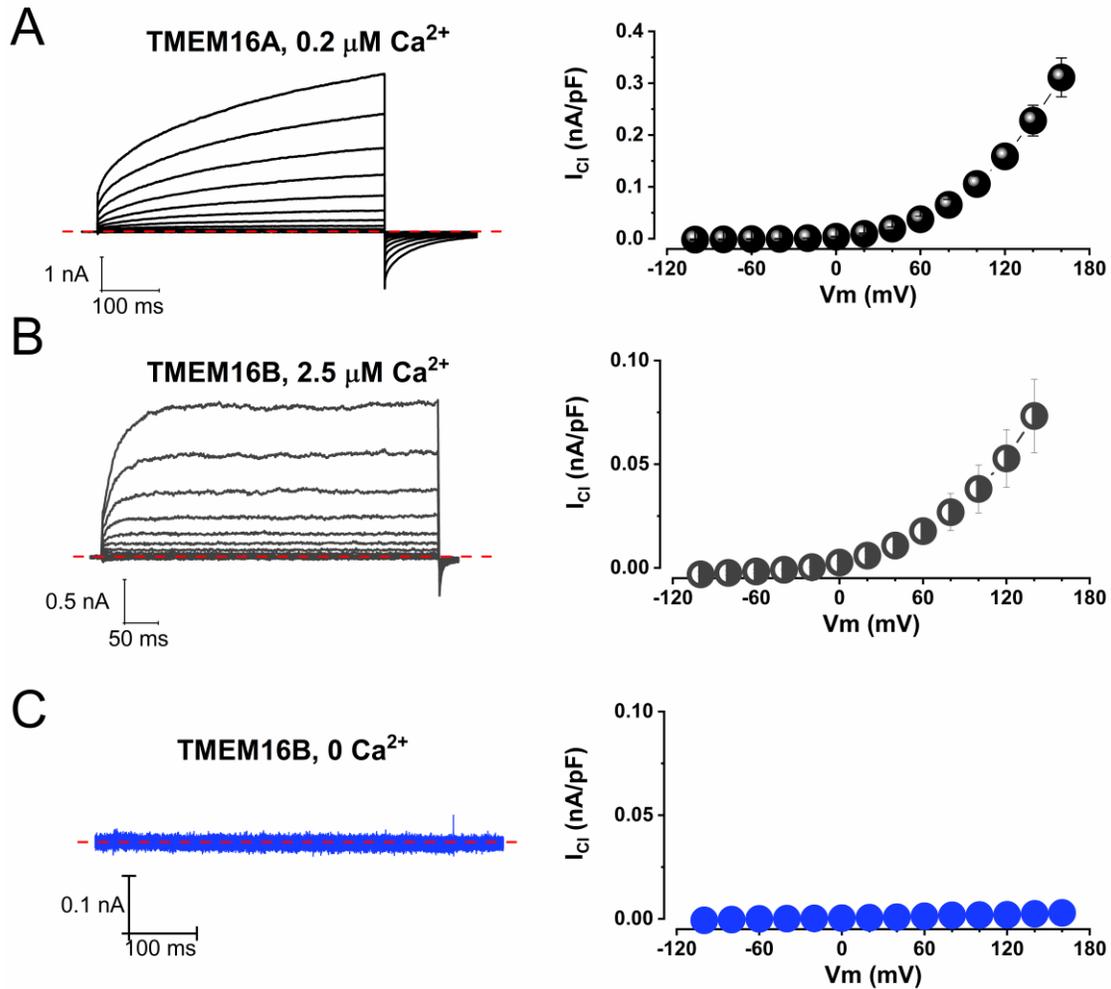


Figura 4-2 Activación por Ca^{2+} de TMEM16A y TMEM16B. **A** Trazos representativos de I_{Cl} obtenidos de células HEK-293 que expresan el canal TMEM16AWT y fueron dializadas con 0.2 μM Ca^{2+} . Derecha: Relación Densidad I_{Cl} en función de V_m de TMEM16AWT ($n=10$). $[\text{Cl}^-]_e/[\text{Cl}^-]_i=140/40$ mM, $\text{pH}_e/\text{pH}_i=7.3$. **B-C** Izquierda Trazos representativos de I_{Cl} obtenidos de dos células que expresan TMEM16B y que fueron dializadas una con 2.5 μM Ca^{2+} libre, 25.24 mM EGTA de (B) y la otra 0 μM Ca^{2+} , 25.24 mM EGTA-TEA (C). Derecha: relación densidad de I_{Cl} en función de V_m de TMEM16B en presencia (B-gris-negro) de 2.5 μM Ca^{2+} ($n=5$) y en ausencia de Ca^{2+} (C-azul). $[\text{Cl}^-]_e/[\text{Cl}^-]_i=140/40$ mM, $\text{pH}_e/\text{pH}_i=7.3$. Ambas proteínas fueron activadas usando el protocolo de activación mostrado en la figura 3-4A.

La Figura 4-3A muestra trazos representativos de corriente para cada uno de los aniones y se conserva la cinética con cada uno de los aniones y lo único que cambia es la amplitud de la corriente que permanece constante durante todo el estímulo. El anión SCN^- tiene el mayor incremento en la amplitud de corriente. A la izquierda de la Figura 4-3A están las relaciones I_{Cl,V_m} en función de V_m . Podemos ver que aniones altamente permeables como son SCN^- , NO_3^- , y I^- generan corrientes grandes, en cambio aniones como el Br^- generan corrientes semejantes en

magnitud a las generadas por el Cl^- . Debido a que la I_{Cl,V_m} es fuertemente rectificante no es posible medir el potencial de inversión de manera precisa. Esto impidió determinar la secuencia de selectividad aniónica basada en cocientes de permeabilidad usando la ecuación de Goldman-Hodgkin y Katz. A pesar de esto es posible obtener una secuencia de selectividad a partir de los cocientes de I_{X,V_m} (corriente generada anión X) entre I_{Cl,V_m} a +160mV. Con este cálculo se obtuvo la siguiente secuencia de selectividad: SCN^- (7.7 ± 0.70 ; $n=6$) > I^- (3.9 ± 0.16 ; $n=5$) > NO_3^- (2.6 ± 0.29 ; $n=5$) > Br^- (1.38 ± 0.22 ; $n=5$) > Cl^- (1.0; $n=10$). El valor en los paréntesis indica el cociente de las corrientes a +160 mV. Este mismo ejercicio se realizó con el canal TMEM16A silvestre en presencia de $0.2 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} . En la Figura 4-3B se observan los trazos representativos de la activación con algunos de los aniones más permeables que Cl^- . Se observa cómo se conserva la cinética en cada uno de los aniones, y también un incremento notable en la amplitud de corriente. Para poder realizar una comparación lo más cercano posible a la hecha con I_{Cl,V_m} , también se calculó el cociente de corrientes a +160 mV. La secuencia de selectividad iónica y los cocientes de corriente (en paréntesis) son los siguientes: SCN^- (4.3 ± 0.4 ; $n=6$) > I^- (2.6 ± 0.1 ; $n=6$) > NO_3^- (2.0 ± 0.07 ; $n=6$) > Br^- (1.35 ± 0.08 ; $n=6$) > Cl^- (1.0; $n=10$). Esta secuencia es la misma secuencia obtenida para I_{Cl,V_m} en ausencia de Ca^{2+} . La diferencia más importante es que el valor absoluto de los cocientes es menor en presencia de Ca^{2+} . Estos datos sugieren que la secuencia de selectividad no se ve modificada por la ausencia de Ca^{2+} , sin embargo, se modifica la conductividad de los aniones más permeables que Cl^- (Figura 4-3A). Desgraciadamente estos datos no permiten evaluar si este incremento en la conductividad se debe a que hay un incremento en la probabilidad de apertura o bien un incremento en la conductancia unitaria. Estos resultados también indican, que las propiedades del poro, que es donde recae la selección aniónica, no se modifica cuando el canal se activa por V_m , por lo que TMEM16A sigue siendo un canal aniónico.

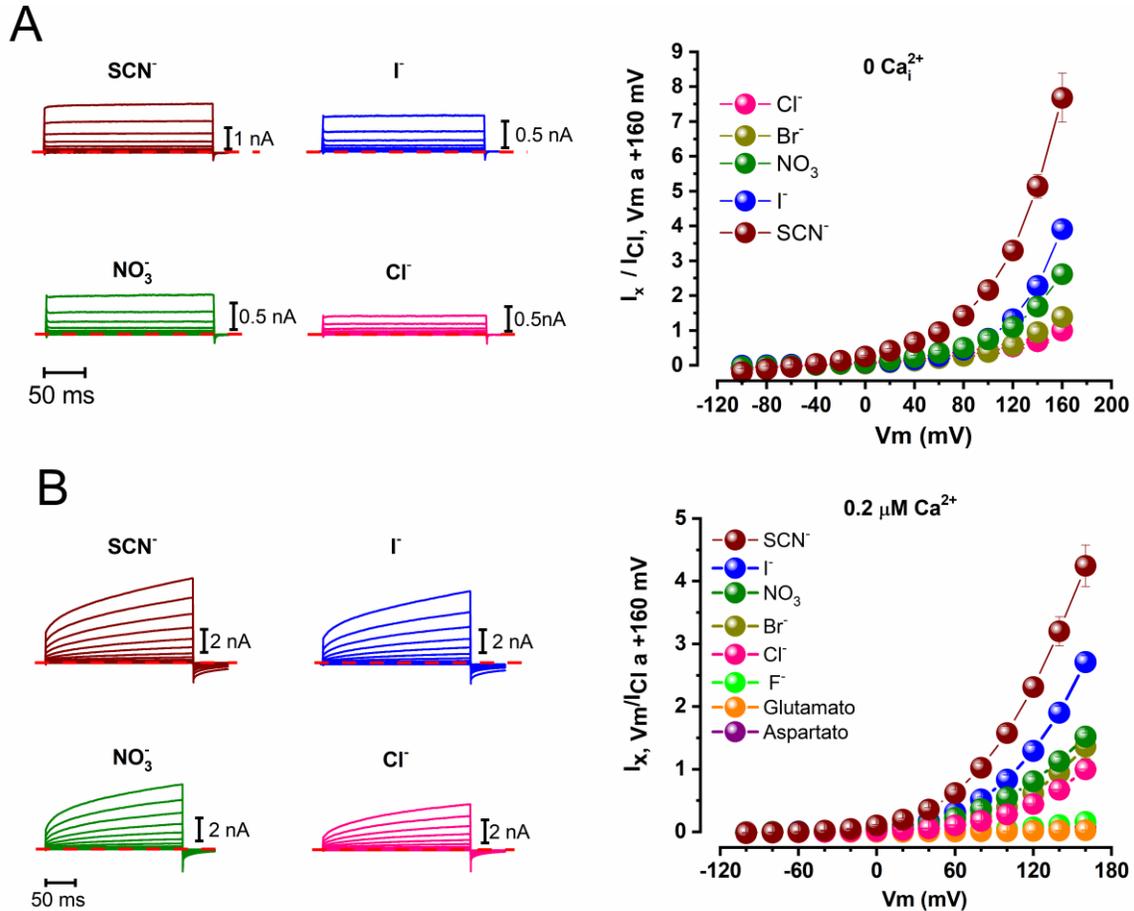


Figura 4-3 Secuencia de selectividad aniónica para TMEM16A. (A-B) Izquierda: trazos representativos de corriente obtenidos de células HEK-293 que expresan al canal TMEM16A, expuestas a diferentes aniones desde el lado extracelular, el lado intracelular fue dializado sin Ca²⁺ (A) o con 0.2 μM Ca²⁺ (B) y 40 mM Cl⁻. Derecha: Curvas corriente Vm construidas con la magnitud de las corrientes activadas por Vm obtenidas de células dializadas con cero Ca²⁺ (A, n=6) o con 0.2 μM de Ca²⁺ (B, n=8). El Cl⁻ en el lado extracelular fue de 140 mM, y este fue sustituido totalmente por de cada uno de los aniones indicados en el medio extracelular. Las magnitudes de las corrientes fueron normalizadas usando el valor de la corriente obtenida con Cl⁻ a +160 mV.

4.2.3 La I_{Cl,Vm} obtenida de la activación de TMEM16A por Vm se bloquea por los inhibidores ácido tánico y ácido antraceno-9-carboxílico (A-9-C).

Evidencia adicional de que TMEM16A se activa por Vm en ausencia de Ca²⁺ intracelular se obtuvo usando inhibidores del canal TMEM16A. En este caso, se evaluó la sensibilidad de I_{Cl,Vm} a los inhibidores ácido tánico y A-9-C mediante experimentos concentración-respuesta. La Figura 4-4 muestra las curvas concentración-respuesta para cada uno de estos inhibidores a +160 y +60 mV con células dializadas en una solución sin Ca²⁺ y expuestas extracelularmente a concentraciones crecientes de los inhibidores. La I_{Cl,Vm} se inhibió con una IC₅₀ de

$18.2 \pm 1.7 \mu\text{M}$ por ácido tánico y $0.98 \pm 0.22 \text{ mM}$ para A-9-C a $+160 \text{ mV}$ y $21.9 \pm 1.56 \mu\text{M}$ por ácido tánico a $+60 \text{ mV}$ y $3.5 \pm 0.4 \text{ mM}$ por A-9-C a $+60 \text{ mV}$.

Los valores de IC_{50} para el ácido tánico son similares a los reportados en células epiteliales bronquiales en donde se estimuló al canal con ionomicina y las corrientes se inhibieron con una $\text{IC}_{50} = 11.2 \mu\text{M}$. La inhibición de I_{Cl,V_m} por ácido tánico coincide con la inhibición independiente de V_m reportada (103). Esto sugiere que el sitio de inhibición seguramente se localiza fuera del campo eléctrico. Por el contrario, A-9-C inhibe de manera dependiente de V_m y esto sugiere que la IC_{50} también es dependiente de V_m . Los valores de IC_{50} mostrados en este trabajo son muy diferentes a los reportados, quizá esto se deba a la forma de activación del canal. En este trabajo se activa por V_m y lo reportado se activa con $12 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} .

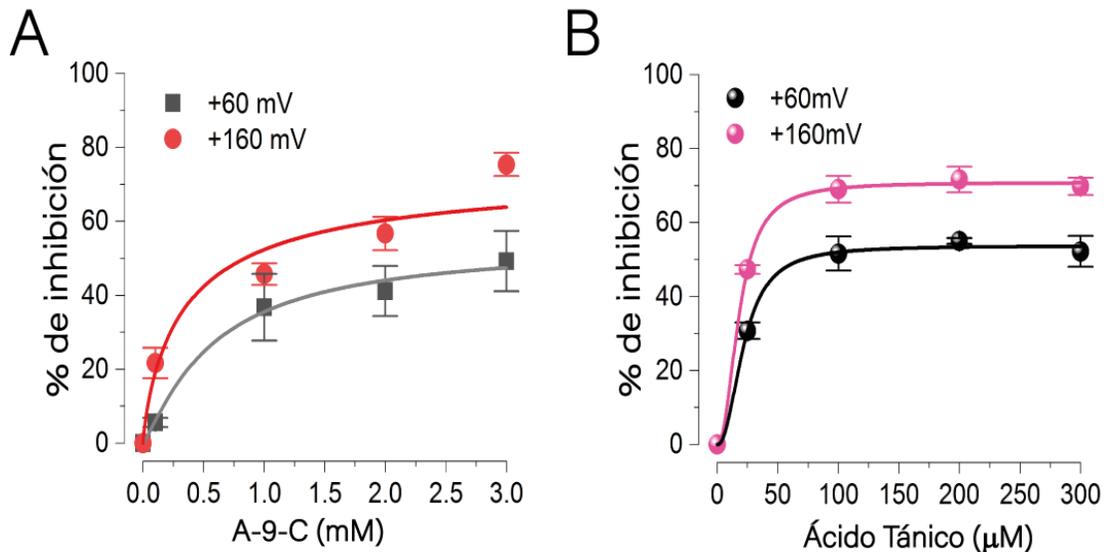


Figura 4-4 Inhibición de la I_{Cl,V_m} de TMEM16A A-9-C y por ácido tánico. A Relación entre el porcentaje de inhibición por A-9-C y V_m , a $+60$ (círculos rojos) y a $+160$ (círculos color gris). Las líneas continuas indican el ajuste a la ecuación de Hill (Ecuación 3) de la cual se obtuvieron los siguientes parámetros $\text{IC}_{50} = 0.98 \pm 0.2 \text{ mM}$, $N = 0.6 \pm 0.1$ a $+160 \text{ mV}$, y $\text{IC}_{50} = 3.5 \pm 0.4 \text{ mM}$, $N = 0.5 \pm 0.03$ a $+60 \text{ mV}$ ($n = 5$). B Curvas concentración-respuesta a ácido tánico a $+60 \text{ mV}$ (círculos negros) y a $+160 \text{ mV}$ (círculos rosas). Las líneas continuas indican el ajuste a la ecuación de Hill de la cual se obtuvieron los siguientes parámetros $\text{IC}_{50} = 18.22 \pm 1.75 \mu\text{M}$, $n = 2.21 \pm 0.72$ a $+160 \text{ mV}$ y $\text{IC}_{50} = 21.95 \pm 1.56 \mu\text{M}$, $N = 2.24 \pm 1.02$ a $+60 \text{ mV}$ ($n = 3-4$).

4.3 CONCLUSIÓN

El canal TMEM16A se activa por V_m en ausencia de Ca^{2+} . Las propiedades de la corriente son diferentes a las observadas en presencia de Ca^{2+} . En ausencia de Ca^{2+} , la corriente tiene una cinética de activación muy rápida, la magnitud se mantiene constante durante la duración del estímulo y el cerrado del canal es también muy rápido de tal manera que no se observan corrientes de cola.

TMEM16A en ausencia de Ca^{2+} conserva las propiedades conductivas y es aniónico (secuencia de selectividad $SCN^- > I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^-$) y se inhibe por los inhibidores específicos para TMEM16A: ácido tánico y A9C.

5 EL PRIMER ASA INTRACELULAR Y SU PAPEL EN LA ACTIVACIÓN POR VOLTAJE DE TMEM16A

5.1 INTRODUCCIÓN

TMEM16A cuenta con cuatro segmentos expuestos a empalme alternativo lo que da origen a diversas isoformas con propiedades de activación diferentes (49) por ejemplo diferente sensibilidad a Ca^{2+} y a V_m . El segmento C compuesto por los residuos ⁴⁴⁸EAVK⁴⁵¹, se encuentra en el primer asa intracelular. Sin embargo, antecediendo a estos cuatro residuos están 4 Glu, dando lugar a un segmento de 5 residuos cargados negativamente, ⁴⁴⁴EEEEAVK⁴⁵¹. Aun cuando este segmento se encuentra localizado en el lado citoplásmico y no en la membrana, este podría funcionar como una hélice cargada negativamente que responda a los cambios en el V_m y así interaccionar con alguna región de la proteína dentro del campo eléctrico y facilitar su apertura. De hecho, se ha encontrado que la sustitución de los primeros cuatro Glu por Ala inhibe la activación de TMEM16A dependiente de V_m , sin cambiar la aparente sensibilidad a Ca^{2+} . En cambio, la delección de los residuos ⁴⁴⁸EAVK⁴⁵¹ disminuye la sensibilidad a Ca^{2+} y potencia la activación de TMEM16A solo por V_m (158). No es claro cómo esta región participa en la activación por V_m en ausencia de Ca^{2+} intracelular. Más aun, se desconoce cómo es capaz de modular la activación por Ca^{2+} ya que espacialmente ambas regiones están distanciadas. También se ha reportado que las mutaciones I641A y Q649A ubicadas en el poro del canal permiten la activación por V_m en ausencia de Ca^{2+} mientras que incrementan notoriamente la sensibilidad del canal a Ca^{2+} (119). Sin embargo, el mecanismo por el cual el canal puede responder a cambios de V_m aún no es claro. Este dato sugiere que esta región del primer asa intracelular es importante para regular la dependencia con el V_m y podría participar en la activación por V_m en ausencia de Ca^{2+} .

En 2018 Peters et al, mostraron que al mutar los residuos I637 y Q645 (isoforma “a” TMEM16A) se facilitaba la activación por Vm en ausencia de Ca²⁺ intracelular. En este trabajo los autores sugieren que el canal podría tener dependencia intrínseca con el Vm, sin embargo, la región involucrada no fue descrita.

Para determinar el papel de estos residuos en la activación por Vm, se realizaron los siguientes experimentos:

1. Análisis del segmento de empalme alternativo “c” (EAVK) en la activación por Vm de TMEM16A. Se registró la actividad del canal que carece de EAVK en ausencia y presencia de Ca²⁺ intracelular.
2. Evaluación de EAVK en un fondo que permita la activación en ausencia de Ca²⁺ intracelular. Se emplearon las mutantes I637A y Q645A que tienen la capacidad de activarse por Vm en ausencia de Ca²⁺. Además, estos residuos están alejados del segmento EAVK por lo que así se elimina alguna posible interacción directa y únicamente se ve el efecto del segmento. Se registró la actividad de las mutantes TMEM16A(ac)-I637A, TMEM16A(a)-I637A, TMEM16A(ac)-Q645A, y TMEM16A(ac)-Q645A en ausencia de Ca²⁺ intracelular a diferentes Vm.
3. Caracterización de los residuos acídicos ⁴⁴⁴EEEE⁴⁴⁷ que anteceden el segmento EAVK y evaluación de su contribución en la activación por Vm. Para esto se registró la actividad del canal a diferentes Vm cuyos Glu han sido eliminados de manera acumulativa. También se mutaron todos los residuos acídicos a lisinas para invertir la carga y evaluar su efecto en la dependencia con Vm.
4. Análisis de la modulación del segmento EAVK sobre el sitio de pegado de Ca²⁺. Se mutaron dos residuos en el sitio de pegado de Ca²⁺ E702 y E705 a glutamina.
5. Reevaluación del papel del segmento EAVK sobre la modulación al sitio de pegado de Ca²⁺. Se evaluó detalladamente el segmento EAVK. Primero se

buscó si la integridad del segmento era relevante, y posteriormente se analizó la lisina K451 que es un residuo cargado: se cambió por alanina (Ala) y por Glu.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 El canal TMEM16A- Δ EAVK se activa débilmente por V_m y por Ca^{2+}

El segmento “EAVK” es el segmento de empalme alternativo “C”. Se evaluó la ausencia de estos cuatro residuos mediante la activación por V_m en ausencia y en presencia de $0.2 \mu M$ de Ca^{2+} intracelular. El panel A de la Figura 5-1 (arriba) se muestran trazos de I_{Cl, V_m} obtenidos de células HEK-293 que expresan al canal TMEM16A- Δ EAVK. En este caso las células se dializaron con $40 mM Cl^-$ y $25.24 mM EGTA/0Ca^{2+}$. En estos trazos se observa que la magnitud de la corriente es muy pequeña: a $+160 mV$ es de $0.1 nA$ de amplitud de corriente.

Debido a que las corrientes son muy pequeñas es complicado hacer una descripción crítica. Sin embargo, lo que se puede observar es que se conserva una activación rápida a todos los V_m y carece de las corrientes de cola características de la activación por Ca^{2+} (Figura 5-1A arriba). Al activar este canal con $0.2 \mu M Ca^{2+}$, se observa un ligero incremento de la corriente (Figura 5-1B) como cinética en la activación sin embargo no es clara la presencia de corriente de cola (Figura 5-1A abajo).

Comparado con el canal silvestre, TMEM16A- Δ EAVK presenta una sensibilidad a Ca^{2+} muy disminuida ya que la corriente es muy pequeña. Este resultado es distinto con lo reportado en 2011 por Xiao et al. Es posible que esta diferencia se deba a la técnica de registro usada, así como a las condiciones iónicas. En el caso del trabajo del 2011 se usó configuración parche escindido y las condiciones iónicas $[Cl^-]_o/[Cl^-]_i = 140/140 mM$. En este caso usamos la configuración de célula completa con las condiciones $[Cl^-]_o/[Cl^-]_i = 140/40 mM$. En conclusión, esta mutante no se puede usar para analizar el efecto del segmento EAVK en la activación por V_m ya que las corrientes que se obtienen de la activación son muy pequeñas.

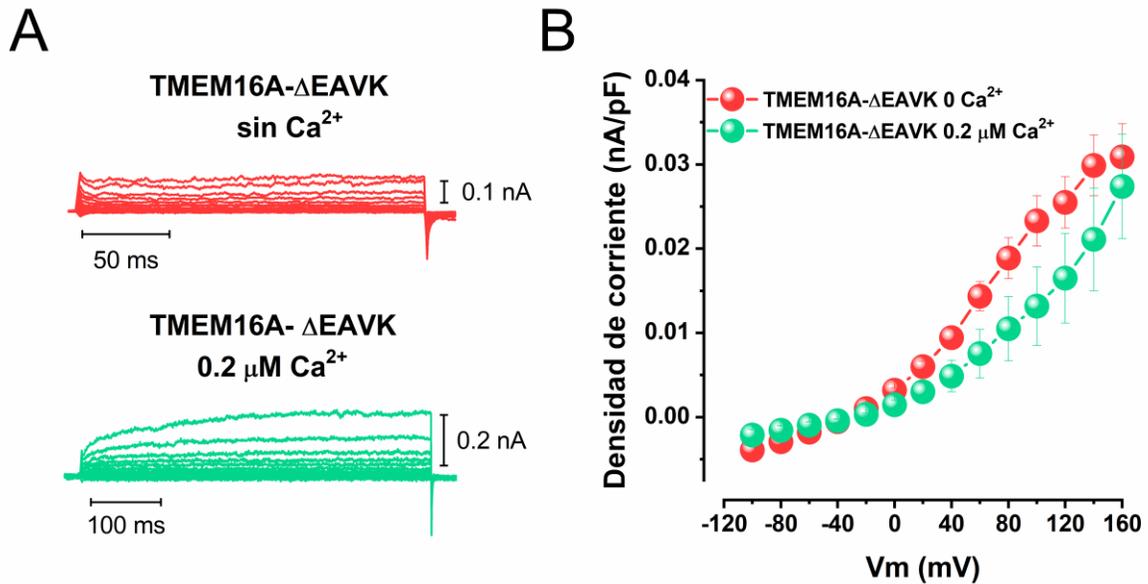


Figura 5-1 Activación por V_m y por Ca^{2+} de la mutante TMEM16A- Δ EAVK. **A** Trazos representativos de dos células HEK-293 que expresan el canal TMEM16A- Δ EAVK y que fueron dializadas una con una solución con 25.24 mM EGTA/0 Ca^{2+} (arriba-rojo) y otra con 25.24 mM EGTA y 0.2 μM Ca^{2+} (abajo-verde). Las células fueron estimuladas con el protocolo de activación mostrado en la figura 3-4A. $[\text{Cl}]_e/[\text{Cl}]_i=140/40$ mM. **B** Relación Densidad de Corriente en función de V_m del canal TMEM16A- Δ EAVK activado con 0.2 μM Ca^{2+} (verde) y activado por V_m en ausencia de Ca^{2+} (rojo) (n=4).

5.2.2 El segmento EAVK modula la activación por voltaje de los canales TMEM16A-I637A y TMEM16A-Q645A.

Datos recientes muestran que mutaciones en el canal que incrementan la afinidad por Ca^{2+} pueden llevar a la activación del canal por V_m en ausencia de Ca^{2+} intracelular. Esta observación resulta sorprendente ya que sugiere que la abolición del pegado de Ca^{2+} favorece la activación por V_m . Para evaluar mejor el papel de EAVK en la activación por V_m , se realizó la delección de EAVK y las mutantes I637A y Q645A. Estas mutantes incrementan la afinidad aparente a Ca^{2+} a 70 nM y 50 nM, respectivamente. Cada una de las proteínas mutantes se expresaron en células HEK293, se dializaron con una solución con 25.24 mM EGTA en ausencia de Ca^{2+} , y se activaron con el protocolo de activación mostrado en la Figura 3-4A

En el panel A de la Figura 5-2 se muestran los trazo de I_{Cl,V_m} de las mutantes TMEM16A(ac)-I637A. Se observa que el canal se activa y desactiva rápidamente, la cinética de activación es lenta y se aprecia una pequeña corriente de cola. Este canal sí tiene el segmento EAVK.

La mutante TMEM16A(a)-I637A tiene una activación muy similar a la anterior (Figura 5-2A). Sin embargo, no se observa corriente de cola y la amplitud de corriente se disminuyó aproximadamente tres veces comparado con la isoforma ac (Figura 5-2A derecha). Esta mutante no tiene el segmento EAVK. Estos datos sugieren que además de modificar la activación por V_m , aparentemente también está modulando la rectificación del canal (Figura 5-2A).

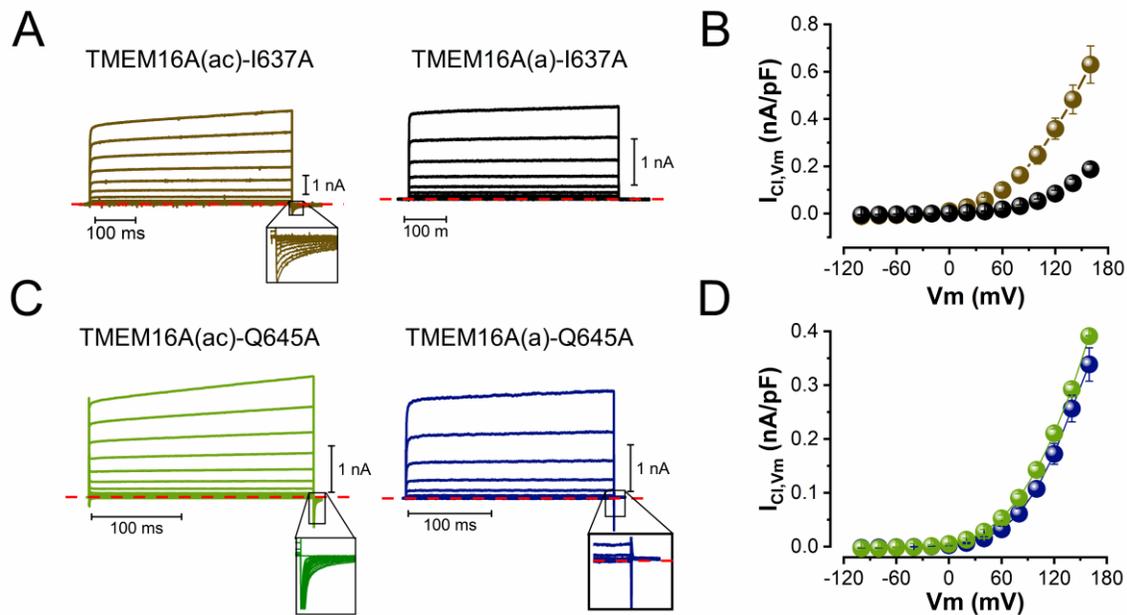


Figura 5-2 Efecto de las mutantes I637A y Q645A sobre la dependencia con el V_m de TMEM16A isoforma "a" y "ac". **A** Trazos representativos de $I_{Cl, Vm}$ obtenidos de células HEK-293 transfectadas con los canales TMEM16A(ac)-I637A (izquierda, $n=5$) en este trazo se muestra una amplificación con la corriente de cola, TMEM16A(a)-I637A (centro, $n=7$). Las células fueron dializadas con 25.24 mM EGTA/0Ca²⁺, $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i=140/40$ mM. Las células fueron estimuladas usando el protocolo de activación (Figura 3-4A). **B** Curvas $I_{Cl, Vm}$ vs V_m obtenidas de los trazos de corrientes de los canales mostrados en A. Los valores de $I_{Cl, Vm}$ a cada V_m se obtuvieron al final del pulso de activación y fueron normalizados usando la capacitancia de la célula. **C** Trazos representativos de $I_{Cl, Vm}$ obtenidos de células HEK-293 transfectadas con los canales TMEM16A(ac)-Q645A (izquierda), TMEM16A(a)-Q645A (derecha), ambas figuras tienen el cuál muestra la corriente de cola maximizada. Las células fueron dializadas con 25.24 mM EGTA/0Ca²⁺, $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i=140/40$ mM. Las células fueron estimuladas usando el protocolo de activación (Figura 3-4A). **D** Curvas $I_{Cl, Vm}$ vs V_m obtenidas de los trazos de corrientes de los canales TMEM16A(a)-Q645A (azul, $n=6$) y TMEM16A(ac)-Q645A (verde, $n=4$). Los valores de $I_{Cl, Vm}$ a cada V_m se obtuvieron al final del pulso de activación y fueron normalizados usando la capacitancia de la célula. Las líneas punteadas en color rojo representan el cero de corriente.

Por otro lado, la mutante Q645A en ambas isoformas (a y ac) muestra un comportamiento muy similar de activación, ya que se activa y desactiva muy rápido. Esta mutante tiene diferencias interesantes en la cinética de activación ya que no se observa la cinética lenta que se describió en la mutante I638A. La corriente se mantiene constante durante todo el tiempo del estímulo. Otra diferencia importante es que en la mutante Q645A no se aprecian corrientes de cola (Figura 5-2C derecha-inset). Esto sugiere que el cerrado del canal es realmente rápido. Q645A muestra mayor rectificación que la mutante I637A y sugiere que el segmento EAVK regula la rectificación del canal, así como el curso temporal de la apertura y cierre del canal.

5.2.3 Estudio del papel del segmento ⁴⁴⁴EEEE⁴⁴⁸ en la activación por voltaje de TMEM16A.

Para identificar la posible participación de los residuos acídicos ⁴⁴⁴EEEE⁴⁴⁸ en la activación por V_m , se eliminaron de forma consecutiva y sumatoria cada uno de los Glu, y se determinó la activación por V_m de cada uno de los canales mutantes. También se cambiaron por lisinas en el fondo genético de TMEM16A-E702Q-E705Q- Δ^{448} EAVK⁴⁵¹. Los trazos de corriente generados al activar las mutantes $\Delta 445$ EEE, $\Delta 446$ EE y $\Delta 447$ E son muy semejantes al control (Figura 5-3A). Se activan muy rápido, carecen de cinética y no se observa corriente de cola. Las curvas I_{Cl, V_m} vs V_m muestran que la amplitud de corriente es muy semejante al control (Figura 5-3B, estrellas rellenas en negro).

Se ha reportado que la mutante E447A es relevante para la sensibilidad al potencial. En este caso no se muestran cambios evidentes ni en la activación ni en la amplitud de sus corrientes. El único cambio sutil que se observa es en la cinética, ya que a +160 mV se aprecian cambios en la amplitud de corriente conforme pasa el tiempo del estímulo (160). Los datos nos indican que la eliminación de los Glu no altera la activación por V_m del canal TMEM16A.

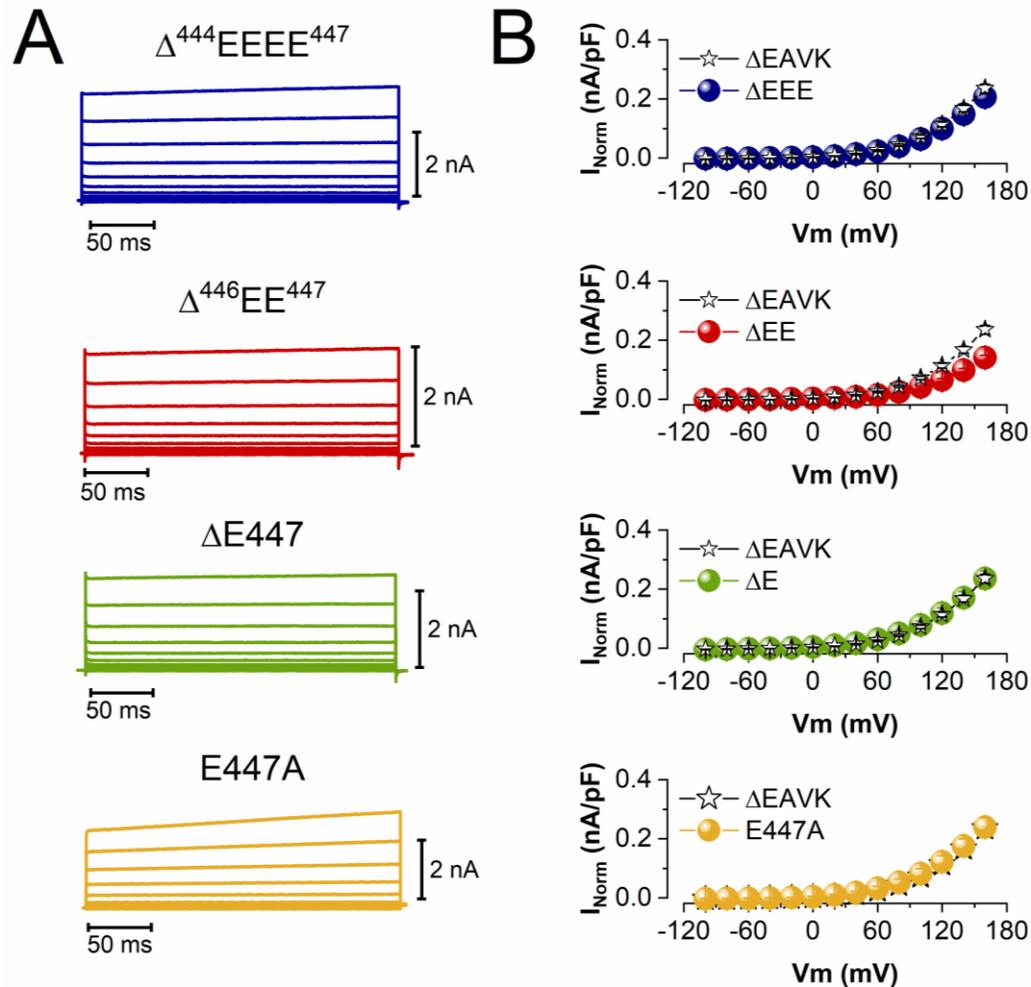


Figura 5-3 Residuos de la primera asa intracelular contribuyen poco a la activación por V_m en del canal *TMEM16A*. A Trazos de corriente obtenidos de canales con los siguiente glutamatos eliminados: Azul: $\Delta^{444}EEEE^{447}$, rojo: $\Delta^{446}EE^{447}$, verde: $\Delta E447$ y amarillo: $E447A$. Las deleciones o mutaciones fueron realizadas en el fondo genético de *TMEM16A-E702Q-E705Q- $\Delta^{448}EAVK^{451}$* . Los registros fueron obtenidos aplicando el protocolo de activación a células dializadas con 40 mM Cl^- , 25.24 mM EGTA/ OCa^{2+} , y bañadas en una solución con 140 mM de Cl^- . B Relación $I_{Cl,Vm} - V_m$ normalizadas de los canales mutantes mostrados en el panel A. Las corrientes fueron normalizadas con la capacitancia de las células, (n=6-8).

En la mayoría de los casos las densidades de corriente son muy parecidas en las mutantes (Figura 5-3B). Únicamente cuando se eliminan dos Glu, $\Delta^{446}EE^{447}$, se reduce 28.51 % la $I_{Cl,Vm}$ en comparación con *TMEM16A- $\Delta EAVK$ -E702Q-E705Q*. Esta reducción es estadísticamente significativa.

En la caso de la inversión de carga al segmento $^{444}EEEE^{447}$ en donde se cambiaron todos los residuos negativos por lisinas (K), se observa sorprendentemente que no hay ningún cambio comparado con el control (*TMEM16A- $\Delta EAVK$ -E702Q-E705Q*)

(Figura 5-4). Este resultado sugiere que en la activación por V_m , la carga no juega un papel relevante para modular al canal. Por el contrario, en la activación por Ca^{2+} ya se ha mostrado que eliminar estos residuos reducen dramáticamente la sensibilidad a Ca^{2+} .

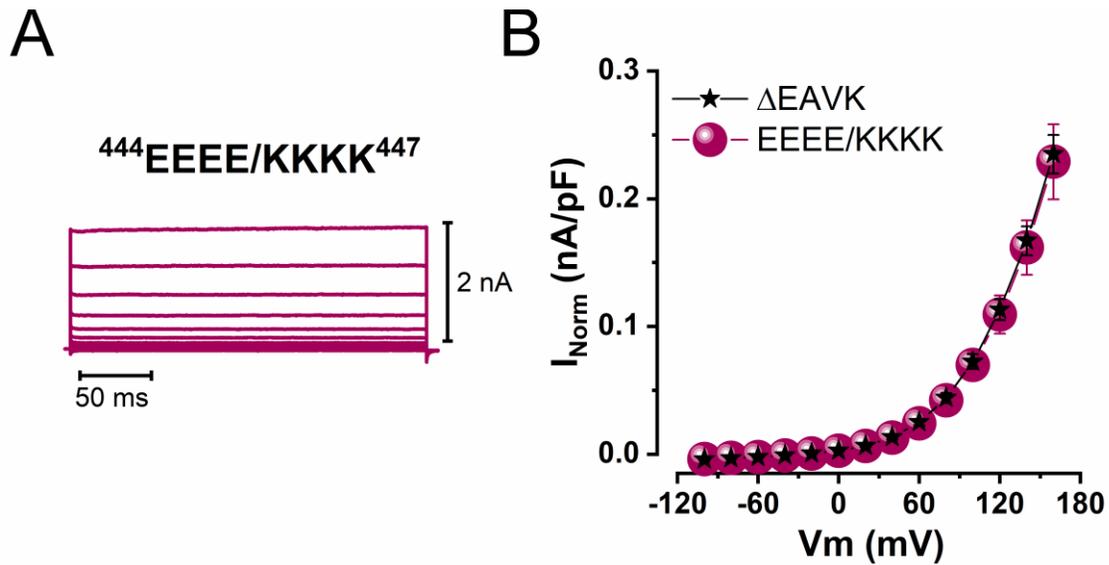


Figura 5-4 Activación de la mutante $^{444}EEEE/KKKK^{447}$ por voltaje. **A)** trazos de corriente obtenidos de células que expresan el canal TMEM16A-E702Q-E705Q- Δ EAVK- $^{444}EEEE/KKKK^{447}$, las células fueron dializadas con 40 mM de Cl^- y 25.24 mM EGTA/0 Ca^{2+} **B)** Curva corriente V_m de los datos mostrados a la izquierda, en estrellas llenas de color negro se muestra el control (TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q) y en morado se muestra la mutante (n=6).

5.2.4 EAVK modula alexitéricamente el sitio de pegado de Ca^{2+} durante la activación por voltaje y por Ca^{2+} en TMEM16A

Datos recientes muestran que mutaciones en el canal que incrementan la afinidad por Ca^{2+} pueden activar el canal por V_m en ausencia de Ca^{2+} intracelular (119). Esta observación resulta sorprendente ya que sugiere que la abrogación de la unión de Ca^{2+} favorece la activación por V_m . Debido a que TMEM16A- Δ EAVK altera la sensibilidad a Ca^{2+} (158), EAVK podría regular el sitio de unión a Ca^{2+} y así alterar la sensibilidad a V_m del canal. Para probar esta posibilidad se hicieron las mutantes E702Q y E705Q sobre el fondo genético TMEM16A- Δ EAVK.

La mutante TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q se expresó en células HEK-293 y se registró en ausencia y en presencia de $0.2\mu M$ Ca^{2+} .

Los trazos representativos de corriente del canal TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q en condiciones de ausencia de Ca^{2+} (Figura 5-5A) muestran que la apertura del canal es muy rápida a todos los V_m . Esto genera corrientes que no cambian de magnitud a lo largo del estímulo, es decir carece de cinética. En cambio, la activación de este canal con Ca^{2+} tiene el mismo comportamiento pues no se observa la cinética característica de la activación por Ca^{2+} del canal silvestre, y además no se observa corrientes de cola.

Este canal muestra una fuerte rectificación saliente (Figura 5-5A-Abajo). Esto sugiere que a V_m negativos la permeación de Cl^- es casi nula. Este canal mutado puede activarse por V_m en ausencia de Ca^{2+} intracelular con magnitudes de corriente grandes que permiten caracterizar la activación. Debido a lo anterior, este canal se puede usar como una herramienta para el estudio de la participación del primer asa intracelular en la dependencia con el V_m de TMEM16A.

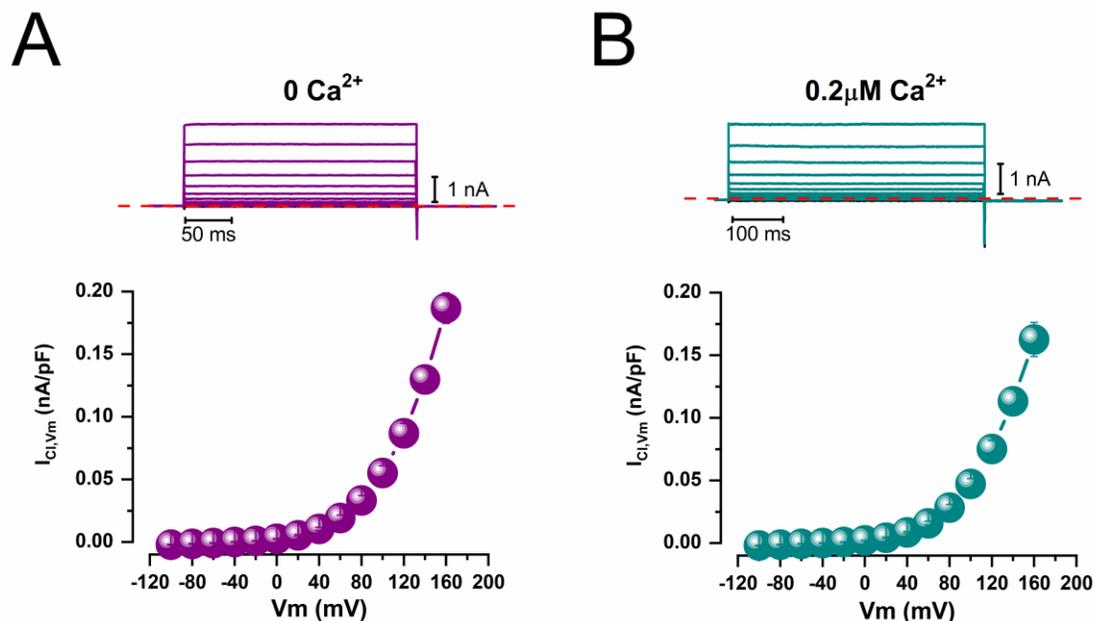


Figura 5-5 Activación del canal TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q con 0.2 μM de Ca^{2+} y sin Ca^{2+} . A-B arriba: Trazos representativos de la mutante TMEM16A-E702Q-E705Q- Δ EAVK provenientes de dos células HEK293 que fueron dializadas una solución interna sin Ca^{2+} , 40 mM Cl^- y 25.24 mM de EGTA-TEA (A) y la otra con 0.2 μM Ca^{2+} . Los registros de corriente fueron obtenidos aplicando el protocolo de activación (Figura 3-4A). A-B abajo: Relación corriente V_m para TMEM16A-E702Q-E705Q- Δ EAVK activado sin Ca^{2+} (izquierda, n=8) y con 0.2 μM Ca^{2+} (derecha, n=6)

Para determinar si la corriente a través del canal TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q depende de la concentración de $[\text{Cl}^-]_e$ y si es sensible a ácido tánico, se hicieron

curvas I_{Cl, V_m} vs V_m con células HEK-293 que expresan TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q y expuestas a diferentes concentraciones extracelulares de Cl^- (Figura 5-6A). Al incrementar la concentración de Cl^- la magnitud de la corriente se incrementa. Esto demuestra que en este canal la I_{Cl, V_m} es acarreada por el ion Cl^- .

Además, se realizó un análisis de selectividad aniónica basado en la conductividad como se describió en la sección anterior. En la Figura 5-6B se muestra la relación del cociente de la corriente obtenida del anión X entre la corriente de Cl^- a +160 mV (I_X/I_{Cl} a +160mV) con V_m . Se observa que el comportamiento del canal TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q frente a diferentes aniones es muy similar al comportamiento del canal silvestre (Figura 4-3), con excepción del ion yoduro que tiene menor conductividad que en el canal silvestre. La secuencia de selectividad basada en la conductividad es la siguiente SCN^- (3.91 ± 0.32 , $n=6$) \gg NO_3^- (1.76 ± 0.12 , $n=5$) \gg I^- (1.55 ± 0.15 , $n=7$) \gg Br^- (1.35 ± 0.08 , $n=5$) \gg Cl^- . Estos resultados sugieren que las propiedades de la vía de conducción se conservan en la proteína TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q.

Para evaluar si la sensibilidad a bloqueadores esta alterada en la mutante TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q, se probó el efecto del ácido tánico debido a que es más eficaz como bloqueador del TMEM16A silvestre. Este compuesto inhibe de manera casi idéntica a los canales TMEM16A silvestre y TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q (Figura 5-6C). Las curvas se ajustaron a la ecuación de Hill (líneas continuas) y de ahí se obtuvieron los valores para los parámetros $IC_{50} = 22.4 \pm 1.05$ μ M a +160 mV, $n=4$. Además, se observa que el efecto bloqueador sigue siendo independiente de V_m . Los valores de los parámetros a 60 mV son $IC_{50} = 22.80 \pm 1.93$ μ M, $N = 2.54 \pm 0.77$. Los valores de la IC_{50} a +160 y a +60 mV no son estadísticamente diferentes ($p=0.001$).

Los datos de selectividad y de bloqueo sugieren que el poro del canal y su sensibilidad farmacológica no se modifican por las mutaciones. El cambio más relevante en esta mutante es su mayor sensibilidad al V_m .

Con base a estos resultados, el canal TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q se usó como herramienta para reevaluar el papel del segmento EAVK.

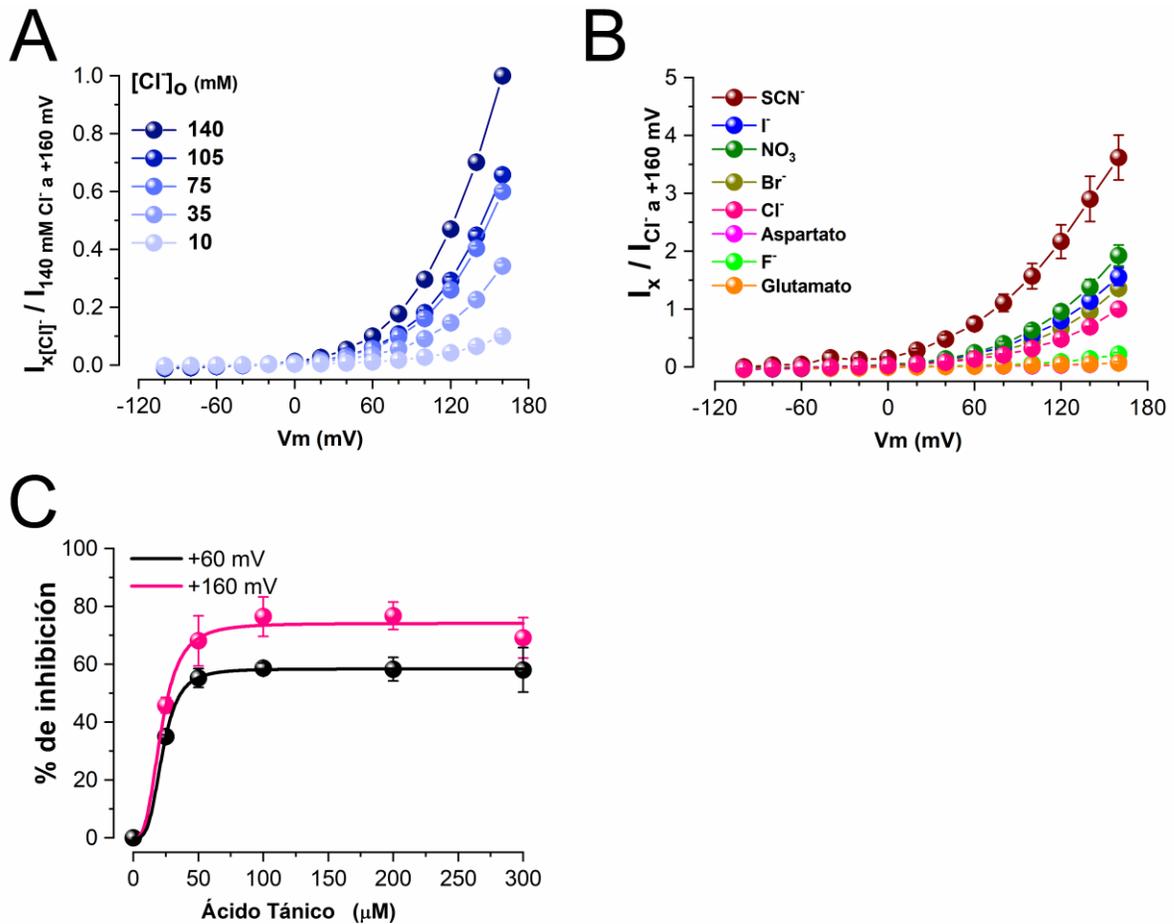


Figura 5-6 Caracterización biofísica y electrofisiológica del canal TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q. **A** Dependencia con el Cl⁻ extracelular de la corriente generada por activación de TMEM16A-E702Q-E705Q- Δ EAVK. Relaciones corriente-V_m obtenidas de las células HEK293 que expresan al canal TMEM16A-E702Q-E705Q- Δ EAVK. Estas células fueron expuestas a diferentes concentraciones de Cl⁻ extracelular como se indica. Las corrientes fueron normalizadas usando la I_{Cl_i,V_m} a 140 mM Cl⁻ extracelular tomadas al final del pulso a +160 mV, (n=10). **B** Relación corriente-V_m obtenida de las células HEK293 que expresan al canal TMEM16A-E702Q-E705Q- Δ EAVK. Estas células fueron expuestas a diferentes aniones como se indica reemplazando por completo el Cl⁻ extracelular por cada uno de los aniones. Las corrientes fueron normalizadas usando la I_{Cl_i,V_m} a 140 mM Cl⁻ extracelular tomadas al final del pulso a +160 mV (n=6). **C** Curvas concentración respuesta a ácido tánico determinados a +60 mV (círculos negros) y a +160 mV (círculos rosas). La línea continua indica el ajuste a la ecuación de Hill de la cual se obtuvieron los siguientes parámetros IC₅₀=22.44 ± 1.05 μM, N= 3.17 ± 0.72 a +160 mV y IC₅₀=22.80 ± 1.93 μM, N= 2.54 ± 0.77 a +60 mV(n=4).

5.2.5 Reevaluación del segmento EAVK en la activación por V_m de TMEM16A.

Para reevaluar la importancia de la integridad del segmento EAVK, modificamos este segmento: eliminamos primero los residuos EA conservando VK (TMEM16A-E702Q-E705Q- Δ EA) y eliminamos VK conservando EA (TMEM16A-E702Q-E705Q-

ΔVK). Los canales mutantes se expresaron después en células HEK 293 y su actividad se registró mediante patch clamp.

En la Figura 5-7A están los trazos representativos de dos células HEK-293, una expresa el canal TMEM16A-E702Q-E705Q- ΔEA (arriba) y la otra el canal TMEM16A-E702Q-E705Q- ΔVK (abajo). Ambos trazos muestran una activación rápida y constante durante el tiempo del estímulo, así como cerrado rápido del canal.

No son claras las corrientes de cola en estos dos casos. En cuanto a la magnitud de corriente, se observa que la mutante TMEM16A-E702Q-E705Q- ΔEA muestra un comportamiento muy parecido al control (TMEM16A-E702Q-E705Q- $\Delta EAVK$). Sin embargo, la mutante TMEM16A-E702Q-E705Q- ΔVK muestra una ligera disminución en la amplitud de corriente preferentemente a V_m positivos.

En las curvas $I_{Cl,VM}$ vs V_m , se muestra claramente que la activación de las mutantes $\Delta EAVK$ es notablemente pequeña comparada con las mutantes anteriores (Figura 5-7B).

Por otro lado, la mutante TMEM16A-E702Q-E705Q tiene una activación mucho menor comparada con las mutantes TMEM16A-E702Q-E705Q- ΔVK y TMEM16A-E702Q-E705Q- ΔEA . Esto sugiere que es importante eliminar el segmento EAVK para que el canal sea más sensible a V_m .

El cambio más importante se observa en la mutante TMEM16A-E702Q-E705Q- ΔVK , en donde la corriente disminuye ligeramente, aunque esta disminución no es estadísticamente significativa.

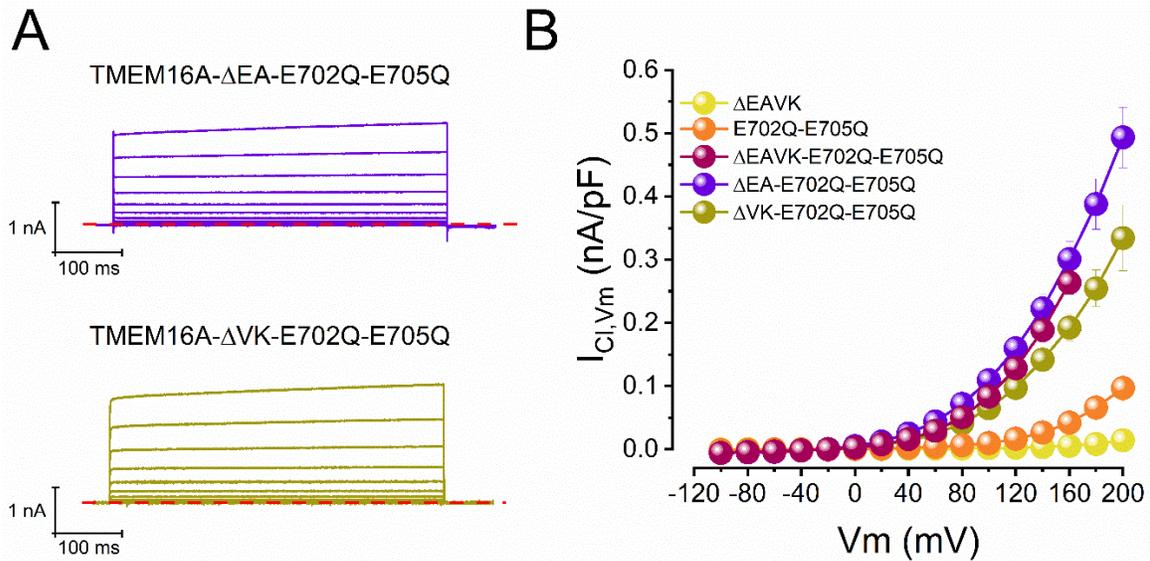


Figura 5-7 Estudio del segmento EAVK. **A** trazos representativos de $I_{Cl,Vm}$ de dos células independientes que expresan los canales TMEM16A- Δ EA-E702Q-E705Q (arriba) y TMEM16A- Δ VK-E702Q-E705Q (abajo). Las células fueron dializadas con una solución con 25.24 mM EGTA/0 Ca²⁺. Las células fueron estimuladas con el protocolo de activación. $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i = 140/40$ mM. **B** Relación $I_{Cl,Vm}$ vs Vm de las mutantes TMEM16A- Δ EAVK (amarillo, n=5), TMEM16A-E702Q-E705Q (naranja, n=5), TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q (vino, n=6), TMEM16A- Δ EA-E702Q-E705Q (azul, n=6) y TMEM16A- Δ VK-E702Q-E705Q (verde, n=7). Los valores de $I_{Cl,Vm}$ se normalizaron por la capacitancia de la célula.

Debido a este comportamiento, se analizó el segmento VK en donde se observa que el único residuo cargado es la K (lisina/Lys). Para evaluar si este residuo está involucrado en la disminución en la activación observada con la mutante TMEM16A-E702Q-E705Q- Δ VK, se cambió la Lys por Glu invirtiendo la carga.

También se cambió la Lys por Ala haciendo ahora una cadena lateral mucho más pequeña, y así evitar alguna interacción. La Figura 5-8A muestra trazos representativos de células HEK-293 transfectadas con las mutantes TMEM16A-E702Q-E705Q-VA (izquierda) y TMEM16A-E702Q-E705Q-VE (derecha).

Los trazos muestran similitud comparados con el control que en este caso es la mutante TMEM16A-E702Q-E705Q-VK. La activación y desactivación son muy rápidas, la corriente es constante durante el tiempo de activación, no se observan corrientes de cola, y además se conserva la fuerte rectificación saliente.

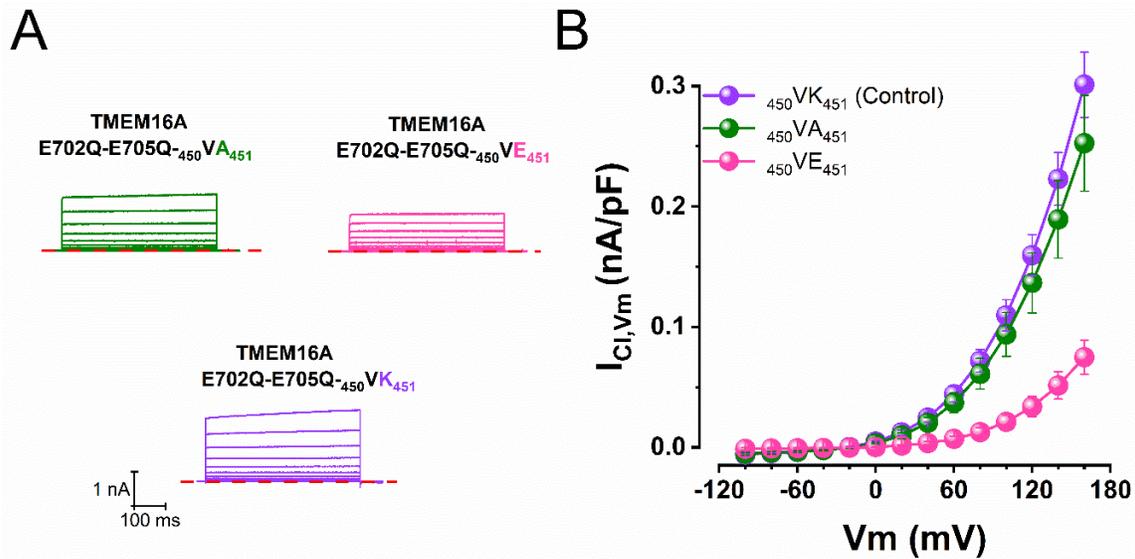


Figura 5-8 Estudio del papel de la K451 en la dependencia con el Vm del canal TMEM16A. A Trazos representativos de corriente obtenidos de tres células HEK-293 que expresan los canales TMEM16A-E702Q-E705Q-VK (control, inferior, morado), TMEM16A-E702Q-E705Q-VA (superior-izquierda) y TMEM16A-E702Q-E705Q-VE (superior-derecha). Las células fueron dializadas con una solución con 25.24 mM EGTA/0Ca²⁺, [Cl]_o/[Cl]_i=140/40 mM. Las células fueron estimuladas aplicando el protocolo de activación (Figura 4-1E). B Curva I_{Cl_i,V_m} en función de V_m, de las mutantes TMEM16A-E702Q-E705Q-VK (morado/control, n=5), TMEM16A-E702Q-E705Q-VA (verde, n=5) y TMEM16A-E702Q-E705Q-VE (rosa, n=6). Los valores de la curva fueron obtenidos midiendo la I_{Cl_i,V_m} al final del pulso de los trazos en A. Los valores fueron normalizados usando la capacitancia de la célula que corresponde al tamaño de esta.

En cuanto a la magnitud de corriente se observa que la mutante TMEM16A-E702Q-E705Q-VA no muestra cambios comparada con el control, sin embargo, la mutante TMEM16A-E702Q-E705Q-VE muestra una notable disminución en la activación del canal. Esto sugiere que la inversión de carga en la Lys 451 altera la sensibilidad por V_m de este canal (Figura 5-8B).

5.3 CONCLUSIÓN

Estos datos sugieren que el segmento “c” compuesto por los aminoácidos EAVK es importante para la activación tanto por Ca²⁺ como por V_m.

Cuando EAVK está presente el canal TMEM16A-I637A muestra corrientes grandes, cinética lenta y corrientes de cola. Por el contrario, cuando se elimina EAVK se observa disminución en la activación del canal y se pierde la cinética lenta, se observa la corriente constante durante todo el estímulo y finalmente no se observan corrientes de cola.

La delección de los residuos EAVK inducen un incremento en la rectificación y aparentemente están modificando la cinética de activación y desactivación ya que se ve modificado el curso temporal aún en ausencia de Ca^{2+} .

El cambio de carga (negativo a positivo) de los residuos ⁴⁴⁴EEEE/⁴⁴⁷KKKK no altero la activación por Vm lo cual demuestra que las cargas negativas de este segmento no participan en la detección del Vm.

La mutante TMEM16A- Δ EAVK-E702Q-E705Q es un canal que es altamente sensible al Vm. Este canal se activa en ausencia de Ca^{2+} intracelular y genera corrientes rectificantes salientes con poca cinética. La mutación por separado es decir mutar solo E702 y E705 o solo eliminar EAVK no tiene el mismo efecto que las mutantes juntas. De hecho, cuando solo se elimina EAVK la corriente casi es nula. Estos datos sugieren que podría haber modulación alostérica del segmento EAVK hacia el sitio de pegado de Ca^{2+} .

La integridad del segmento EAVK no es relevante para llevar a cabo la modulación del canal. Sin embargo, el cambio de la Lys451 por Glu disminuye la activación del canal. Es posible que este residuo sea importante en la modulación, ya que un residuo cargado tiene la posibilidad de generar interacciones con otras regiones de la proteína.

6 LA TITULACIÓN DEPENDIENTE DE V_m DE LOS RESIDUOS ACÍDICOS DEL SITIO DE UNIÓN A Ca^{2+} PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE TMEM16A EN AUSENCIA DE Ca^{2+}

6.1 INTRODUCCIÓN

Bajo condiciones fisiológicas la $[Ca^{2+}]_i$ fluctúa entre 10^{-7} y 2×10^{-6} M mientras que la $[H^+]_i$ fluctúa muy poco, en general la concentración permanece alrededor de los $10^{-7.2}$ M. En condiciones de actividad fisiológica constante la $[H^+]_i$ llega a subir hasta los $10^{-6.5}$ M. Esto es, la concentración de los cationes es muy semejante. Por lo tanto, si la afinidad por un sitio dado es similar, entonces los dos podrían competir.

TMEM16A se activa por la unión de Ca^{2+} dependiente de V_m . El sitio de unión a Ca^{2+} está localizado ligeramente dentro de la membrana (6, 113, 151). La acidificación intracelular inhibe la activación de TMEM16A por Ca^{2+} en células T84 de colon humano, así como en HEK-293 debido a que el H^+ compite con el Ca^{2+} por el sitio de unión a Ca^{2+} (5, 28).

En esta sección el objetivo es: demostrar si el H^+ impulsado por el V_m viaja dentro del campo eléctrico hasta llegar al sitio de unión de Ca^{2+} y protonar los residuos cargados negativamente, mimetizando débilmente el efecto del Ca^{2+} . Esto propone que la apertura inducida por el V_m en ausencia de Ca^{2+} intracelular tenga un componente extrínseco en la dependencia con el V_m .

6.2 RESULTADOS

6.2.1 Acidificación intracelular facilita la activación de TMEM16A.

Para probar esto expresamos el canal TMEM16A en células HEK293. Se registró la I_{Cl, V_m} de estas células mediante patch clamp en configuración de célula completa. Se usaron diferentes concentraciones de H^+ intracelular. Las células se dializaron con una solución interna que contiene 25.24 mM EGTA/0 Ca^{2+} y el pH se ajustó a 8.0, 7.3, 6.0, 5.0 y 4.0.

Para asegurar que el pH se mantuviera durante todo el registro, se incrementó la capacidad amortiguadora de la solución ajustando el pH requerido con los siguientes amortiguadores: 50 mM de Bicina (8.0), HEPES (7.3), MES (6.0, 5.0 y 4.0), ácido cítrico (5.0) y ácido tartárico (4.0). No se observaron diferencias entre datos obtenidos con diferentes amortiguadores al mismo pH.

La Figura 6-1A muestra la trazos de I_{Cl, V_m} a -100, -40, +20, +60, +120 y +160 mV al pH indicado de 5 experimentos independientes a cada pH. Así como el pH disminuye de 8.0 (arriba) a 4.0 (abajo), la magnitud de I_{Cl, V_m} incrementa. Bajo condiciones ácidas I_{Cl, V_m} se activa y desactiva muy rápido. A +160 mV la constante de tiempo de activación fue 0.24 ± 0.02 ms a pH=4 (n=5). Las corrientes de cola están ausentes excepto a pH=4 en donde se observó una pequeña corriente entrante (maximización de la corriente de cola Figura 6-1A).

Las correspondientes curvas I_{Cl, V_m} se muestran a la derecha de la Figura 6-1B. A -100 mV hay una reducción de pH_i de 6.0 a 4.0 que produce un incremento de aproximadamente 5 veces en la I_{Cl, V_m} (-1.5 ± 0.4 a -7.5 ± 2.7 pA/pF, n=5).

Finalmente, para corroborar que las I_{Cl, V_m} se deben al canal TMEM16A se registraron células HEK293 transfectadas con el vector vacío y dializadas con pH_i=4.0 que contiene EGTA o BAPTA-K (Figura 6-2A). No se observaron corrientes bajo estas condiciones y esto sugiere que la potenciación de I_{Cl, V_m} bajo condiciones acídicas resulta de la activación de TMEM16A.

Sin embargo, el efecto del H⁺ intracelular en la activación dependiente de V_m de I_{Cl, V_m} se puede deducir mediante el análisis de la conductancia macroscópica ($G=I_{Cl, V_m}/V_m-V_r$) vs V_m a diferentes [H⁺] por dos razones:

La primera es que a pH_i ≥ 6.0 el potencial de inversión (V_r) no se puede medir de manera confiable debido a la fuerte rectificación saliente de I_{Cl, V_m} . En el caso de pH_i=5.0 y 4.0 si fue posible medirlo y fue -34.4 ± 2.3 y -31.4 ± 0.8 mV respectivamente (estos valores están cerca del valor esperado para Cl⁻) (Figura 6-3A).

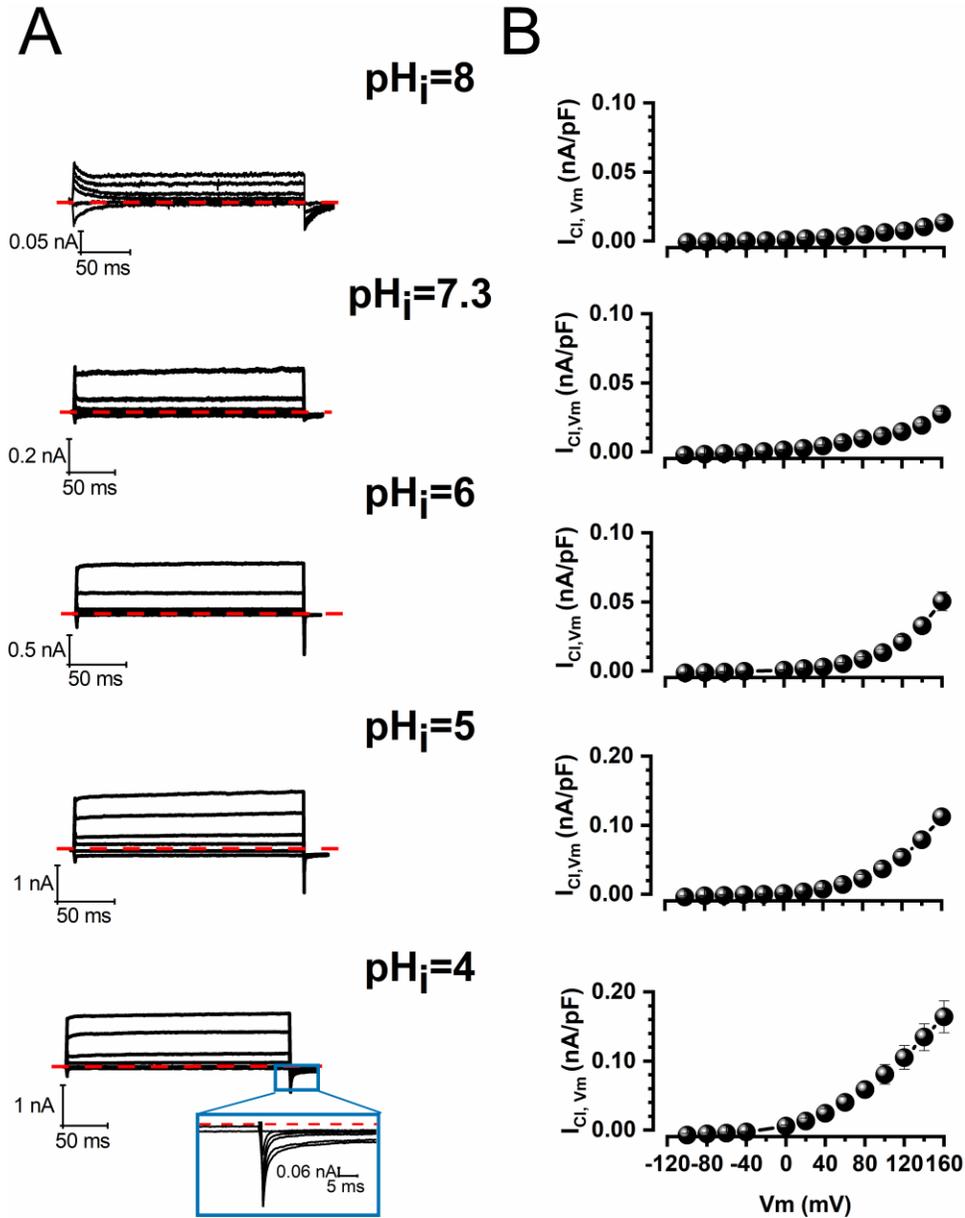


Figura 6-1 Protonación dependiente de V_m facilita la activación por V_m de TMEM16A en ausencia de Ca^{2+} intracelular. A Trazos representativos de I_{Cl,V_m} y B curvas I_{Cl,V_m} vs V_m obtenidas de diferentes células dializadas con una solución interna con un pH ajustado a (de arriba a abajo) 8.0 ($n = 4$), 7.3 ($n = 8$), 6.0 ($n = 6$), 5.0 ($n = 5$) y 4.0 ($n = 5$). Trazos de corriente fueron registrados a -100 , -40 , $+20$, $+60$, $+120$ y $+160$ mV. Una amplificación de la corrientes de cola a pH_i 4.0 se muestra. $[\text{Cl}^-]_o/[\text{Cl}^-]_i = 140/40$ mM y $\text{pH}_e = 7.3$ para todos los casos. La línea punteada en rojo representa el cero. Las curvas corriente- V_m fueron normalizadas con la conductancia de la célula y después fueron promediada.

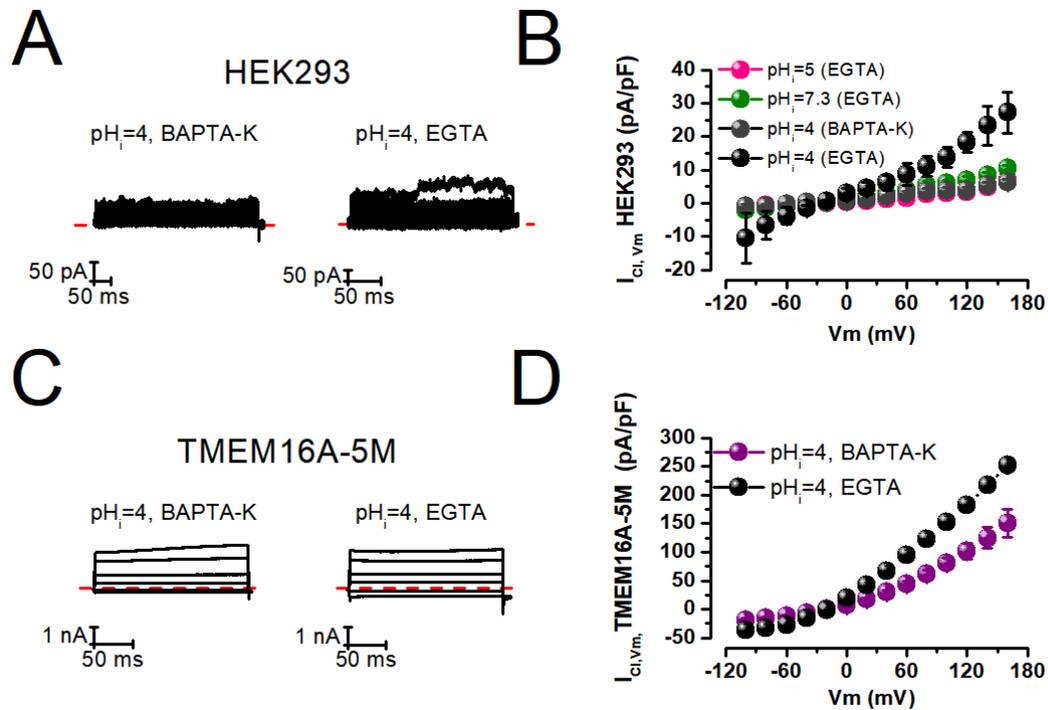


Figura 6-2 Acidificación intracelular no activa corrientes en HEK-293. **A** Trazos representativos de células HEK-293 no transfectadas, dializadas con 40 mM Cl⁻, 0 Ca²⁺ and 10 mM BAPTA-K (izquierda) o 25.24 mM EGTA/0Ca²⁺ (derecha) a pH_i=4.0. Las células fueron estimuladas usando el protocolo de activación. Las líneas rojas punteadas indican el cero de corriente. **B** Curvas corriente - V_m obtenidas de experimentos iguales a los mostrados en usando BAPTA-K pH_i=4 (gris), EGTA-TEA pH_i=4 (negro), EGTA-TEA pH_i=5 (rosa) y EGTA-TEA pH_i= 7.3 (verde) (n=5-6). **C** Registros de I_{Cl,Vm} obtenidos de células HEK-293 que expresan el canal 5M. Las células fueron dializadas con 40 mM Cl⁻, 10 mM BAPTA-K (izquierda) o 40 mM Cl⁻ and 25.24 mM EGTA/0Ca²⁺ (derecha) a pH_i=4. **D** Curvas I_{Cl,Vm} -V_m obtenidas de células HEK-293 transfectadas con el canal 5M. Las células fueron dializadas con 40 mM Cl⁻, pH_i=4, y 0 Ca²⁺ usando BAPTA-K (morado, n=5) o EGTA-TEA (negro, n=6).

La segunda es que la relación corriente instantánea vs V_m no es lineal como se muestra en la Figura 6-3B, indicando que la I_{Cl,Vm} no sigue la ley de Ohm y la magnitud de la corriente de cola a -100 mV (naranja) fue la misma en todos los V_m desde -100 a +160 mV y esto demuestra que la probabilidad de apertura es independiente de V_m.

6.2.2 La constante de equilibrio de la reacción de protonación es voltaje-dependiente.

Para probar la hipótesis de que la activación por V_m de TMEM16A se debe a la protonación, se debe mostrar que la constante de equilibrio de protonación (K) es dependiente de V_m.

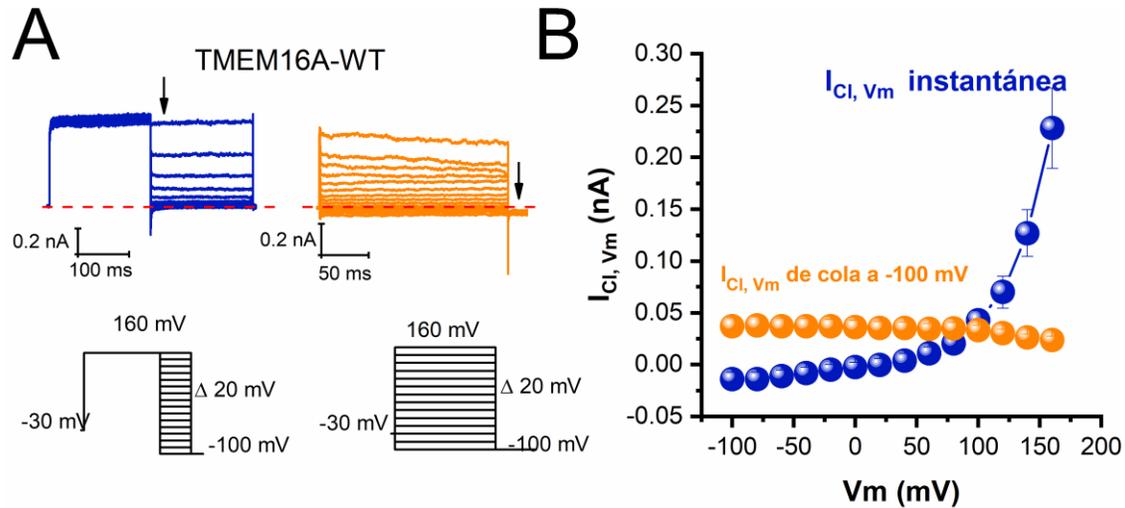


Figura 6-3 Activación por V_m de TMEM16A no muestra un comportamiento Óhmico. **A** Izquierda: Registros representativos de $I_{Cl, Vm}$ obtenidos de células HEK-293 que expresan al canal TMEM16A-WT. El protocolo usado para activar al canal se muestra abajo. Derecha: Trazos representativos de $I_{Cl, Vm}$ obtenidos con el protocolo de activación mostrado abajo. La célula fue dializada con $[Ca^{2+}]_i = 0$ y $[Cl^-]_i = 40$ mM Cl⁻. Las líneas punteadas indican el cero de corriente. Los valores tomados para construir una curva corriente- V_m indicado con las flechas **B** Curvas corriente de cola instantánea - V_m (azul, n= 3) y corriente de cola - V_m (naranja, n= 6).

En la Figura 6-4A están las curvas de titulación a diferentes V_m . Lo que se observa es que conforme incrementa la $[H^+]_i$ incrementa la magnitud de $I_{Cl, Vm}$. Se observó indicios mínimos de saturación, solo a +160 mV a $pH_i=4.0$. Experimentos a $pH_i=3$ no se lograron completar debido a la pérdida muy rápida de viabilidad de que las células.

Para determinar la constante de equilibrio de protonación (K) a cada V_m , primero se ajustó la curva a +160 mV a la ecuación de Hill (Ecuación 1) para obtener la $I_{Cl, Vm}$ máxima. Después este valor se fijó en la ecuación de Hill y se ajustaron las curvas restantes. Esto permitió tener solo dos parámetros libres, la K y el coeficiente de Hill (N). Las líneas continuas en la Figura 6-4B indican el ajuste. El valor correspondiente de la R^2 muestra que el ajuste es una buena descripción cuantitativa de los datos experimentales a todos los V_m .

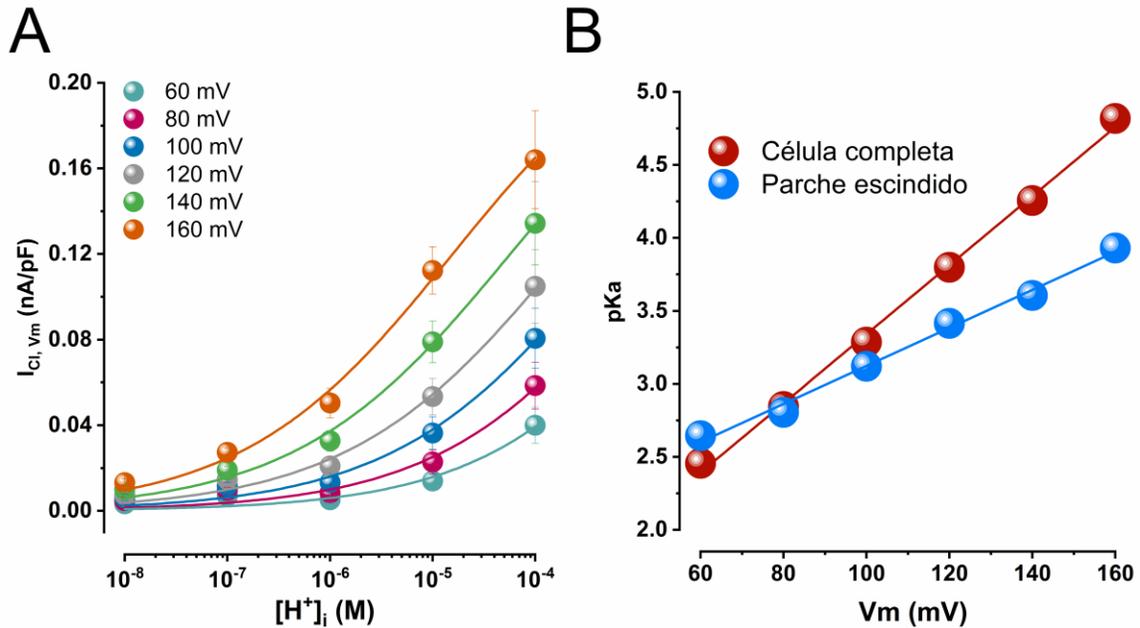


Figura 6-4 La constante de equilibrio de la reacción de protonación es voltaje-dependiente. **A** Curvas de titulación al V_m indicado, líneas continuas indican el ajuste a la ecuación de Hill usando un solo valor de I_{Cl, V_m} máximo de 0.23853 nA/pF determinado por el ajuste de la curva a +160 mV. Los valores de la constante de equilibrio de protonación K y el coeficiente de Hill N fueron determinados del ajuste. Los valores de $K/N/R^2$ fueron 0.0035 ± 0.002 M/ $0.44 \pm 0.07/0.951$ a 60 mV, 0.0014 ± 0.00075 M/ $0.43 \pm 0.06/0.96$ a +80 mV, 0.00052 ± 0.00016 M/ $0.42 \pm 0.04/0.981$ a +100 mV, 0.000159 ± 0.000029 M/ $0.42 \pm 0.03/0.990$ a +120 mV, 0.000055 ± 0.0000071 M/ $0.42 \pm 0.02/0.994$ a +140, and 0.0000152 ± 0.0000016 M/ $0.43 \pm 0.076/0.990$ a +160 mV. **B** Dependencia con el V_m de la constante de equilibrio de protonación K determinada de los datos obtenidos en B. Las líneas continuas indican el ajuste a la ecuación 4 con valores de δ de 1.39 ± 0.04 y pK_0 de 0.97 ± 0.07 . Para comparación se graficó en azul el promedio de los valores de pK_a calculados de dos parches. La línea continua azul indica el ajuste a la ecuación 4, los parámetros obtenidos fueron $\delta = 0.77 \pm 0.03$ y $pK_0 = 1.82 \pm 0.06$.

La Figura 6-4B muestra los valores resultantes de pK_a ($= -\log_{10} K$) como función del V_m . A valores positivos de V_m el valor de pK_a incrementa indicando que menos H^+ se requieren para generar el 50% de I_{Cl, V_m} . Esta dependencia con el V_m del pK_a se asemeja a la dependencia con el V_m de la EC_{50} para Ca^{2+} .

La relación $pK_a - V_m$ se ajustó a la ecuación 4 para calcular K_0 (constante de equilibrio a 0 mV) y δ (fracción del campo eléctrico detectado por H^+ desde el lado intracelular hacia el extracelular). Los valores estimados fueron $pK_0 = 0.97 \pm 0.07$ y $\delta = 1.39 \pm 0.04$.

Experimentos similares se llevaron a cabo usando la configuración parche escindido; sin embargo, la mayoría de los parches eran inestables bajo condiciones acídicas. La Figura 6-4B (símbolos azules) muestran el promedio de dos super

parches que fueron expuestos a pHi 8.0, 6.0, 5.0 y 4.0. En la Figura 6-5 podemos observar cada uno de estos dos super parches. Los valores de pKa obtenidos de parche escindido (Figura 6-5B) son muy similares a los obtenidos usando la configuración célula completa (Figura 6-4B rojo). Los valores obtenidos en esta condición fueron $pK_0 = 1.77$ y $\delta = 0.79$.

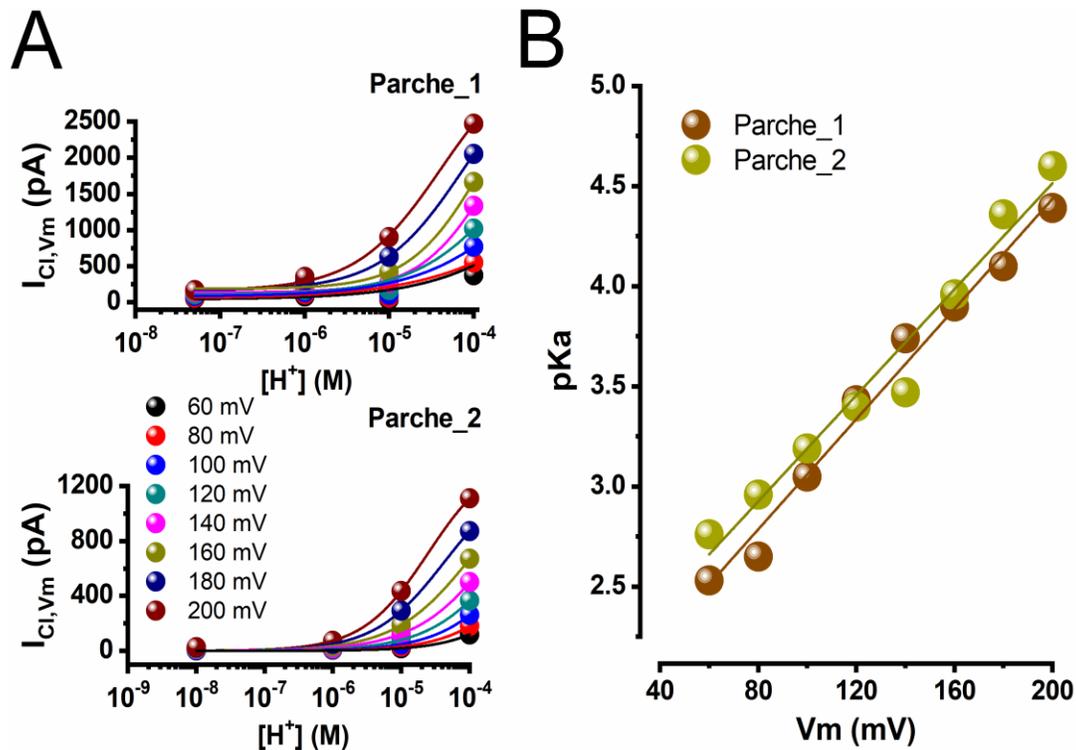


Figura 6-5 Protonación dependiente de voltaje de TMEM16A en dos parches escindidos. **A** Curvas de titulación obtenidas a los V_m de +60 a +200 mV. Las curvas fueron construidas usando $I_{Ci,Vm}$ registradas de dos parches usando la configuración parche escindido obtenidas de células HEK-293 que expresan el canal TMEM16A-WT. Las líneas continuas indican el ajuste a la ecuación de Hill (ecuación 1). **B** Dependencia con el V_m de la constante de equilibrio de protonación (K) determinada de los datos mostrados en A. Las líneas continuas indican el ajuste a la ecuación 4 (ver el texto principal). Los valores de los parámetros para δ/K_0 fueron $0.096 \pm 0.005/2.17 \pm 0.07$ para el parche 1 y $0.090 \pm 0.007/2.06 \pm 0.09$ para el parche 2.

Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que la activación por V_m de TMEM16A se debe a la protonación intracelular. Esta conclusión toma más fuerza con los resultados de las dos configuraciones diferentes de patch clamp y que muestran el mismo comportamiento.

Dado que el protón está dando dependencia a V_m al canal TMEM16A, se debe de identificar el sitio sobre el cual actúa el protón intracelular. Estudios anteriores

mostraron que el sitio de pegado de Ca^{2+} formado por residuos cargados negativamente podrían verse afectados ante un incremento en la concentración intracelular de H^+ . Basados en este antecedente, determinamos si el sitio de unión de Ca^{2+} es el blanco de la protonación dependiente de V_m .

6.2.3 El sitio de unión de Ca^{2+} también sirve como sitio de unión del H^+ intracelular.

El movimiento de cargas a través de la membrana debido a un cambio en el potencial del campo eléctrico puede generar cambios estructurales que induzcan la apertura del canal. Se ha sugerido que la dependencia con el V_m proviene del pegado del Ca^{2+} a su sitio de unión.

El sitio de unión a Ca^{2+} está formado por los residuos N650, E654, E702, E705, E734 y E738. Cuando se reemplazan los dos Glu, E702 y E705, por glutaminas, la sensibilidad del canal por Ca^{2+} disminuye desde nM hasta mM (151).

El sitio de unión de calcio cuenta con 4 aminoácidos cargados negativamente que se localizan dentro la membrana donde detecta aproximadamente el 12-15% del campo eléctrico. Por esta razón, ante un cambio en el potencial, estos aminoácidos podrían moverse y permitir que el canal se abra parcialmente.

Para eliminar la dependencia con V_m debido al pegado de Ca^{2+} y para evaluar el comportamiento de estos residuos ante un cambio en el potencial, se mutaron los residuos E702 y E705 a glutaminas. Este cambio elimina la carga de estos residuos por lo que ya no podrían reaccionar a cambios en el V_m . Además, la probabilidad de que el calcio se una a ese sitio ahora es muy baja.

En la Figura 6-6A se observan trazos representativos de las corrientes obtenidas de dos células HEK-293 transfectadas con el canal TMEM16A-E702Q-E705Q y dializadas una con una solución que contiene 25.24 mM de EGTA/0 Ca^{2+} (arriba) y la otra dializada con una solución que contiene 25.24 mM de EGTA y 0.2 mM Ca^{2+} (abajo). Las células se estimularon usando el protocolo de activación (Figura 3-4A). La cinética de I_{Cl,V_m} es muy similar en ambos casos. El canal se activa rápidamente, se mantiene constante la corriente durante el estímulo y después el canal cierra muy

rápido y en ninguna condición se observó corriente de cola. La amplitud de $I_{Cl, Vm}$ es similar en presencia y ausencia de Ca^{2+} (Figura 6-6B).

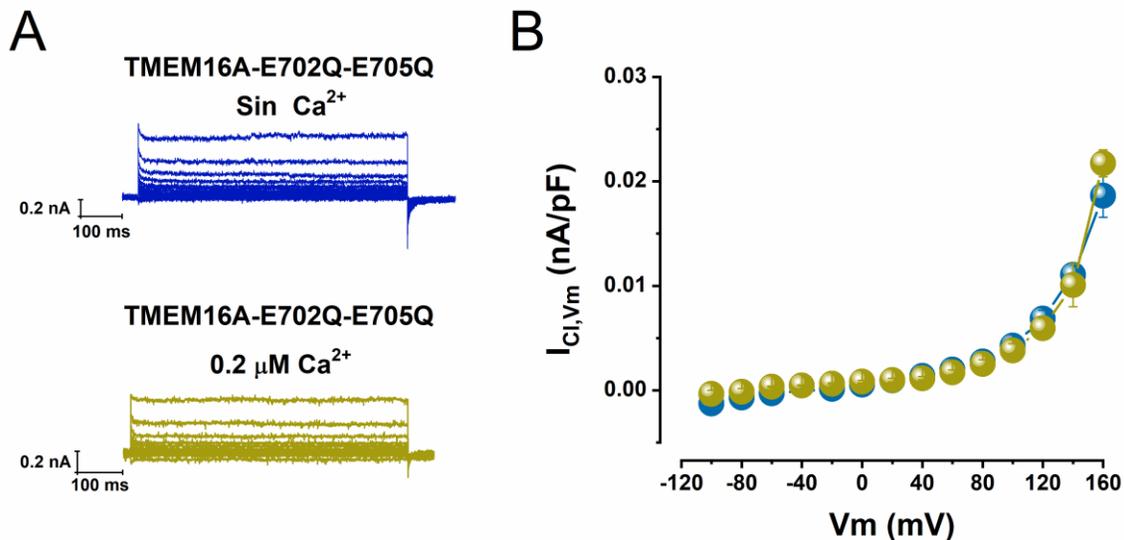


Figura 6-6 Activación por voltaje y por Ca^{2+} de la mutante TMEM16A-E702Q-E705Q. **A** Trazos representativos de dos células HEK-293 que expresan el canal TMEM16A-E702Q-E705Q y que fueron dializadas una con una solución con 25.24 mM EGTA/0 Ca^{2+} y otra con 25.24 mM EGTA y 0.2 μ M Ca^{2+} . Las células fueron estimuladas con el protocolo de activación mostrado en la figura 3-4A. $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i=140/40$ mM. **B** Relación Densidad de Corriente en función de V_m del canal TMEM16A-E702Q-E705Q activado con 0.2 μ M Ca^{2+} (verde) y activado por V_m en ausencia de Ca^{2+} (azul) ($n=5$).

Debido a que no hay cambio en la activación por V_m con el canal silvestre, estos resultados sugieren que el sitio de pegado de calcio no participa en la dependencia con el V_m cuando el canal se activa por V_m en ausencia de Ca^{2+} .

Con la finalidad de identificar cuales residuos negativos (Glu o Asp) dentro del sitio de unión de Ca^{2+} son blanco del H^+ intracelular, se cambiaron los residuos de manera sumatoria (4 Glu y 1 Asp). Estos residuos se mutaron a Gln para simular un Glu con la cadena lateral permanentemente protonada.

Por otro lado, si el H^+ neutraliza el grupo COO^- del Glu o Asp para activar el canal TMEM16A WT entonces el V_m activaría las mutantes a Gln a $pH_i=7.3$.

La Figura 6-7 muestra los registros de $I_{Cl, Vm}$ a -100, -40, +20, +60, +120 y +160 mV de cinco células independientes que expresan los canales (de arriba hacia abajo): silvestre, E702Q-E705Q (2M), E702Q-E705Q-E734Q (3M), E702Q-E705Q-E734Q-

D738Q (4M) y E654-E702Q-E705Q-E734Q-D738Q (5M). Todas las células se dializaron con 25.24 mM EGTA/0 Ca^{2+} y pHi 7.3.

Conforme en número de mutaciones incrementa, la magnitud de I_{Cl,V_m} aumenta imitando el efecto de la acidificación intracelular (Figura 6-7). La I_{Cl,V_m} al inicio fue rápida y constante durante el estímulo y no se observaron corrientes de cola cuando se repolarizó a -100 mV. Una rápida corriente de cola se observó solamente con la 5M (ver la maximización panel inferior izquierdo).

La correspondiente curva I_{Cl,V_m} - V_m muestra rectificación saliente como el canal silvestre, sin embargo, el patrón de rectificación en las mutantes es variable y no parece tener un patrón particular (Figura 6-7A columna de la derecha). Aunque la magnitud de la I_{Cl,V_m} incrementa a todos los V_m a +160 en el caso de la 5M se observa una aparente saturación de la corriente.

A pHi=7.3 una fuerte despolarización (+160 mV) induce un incremento de I_{Cl,V_m} de 6.5 veces en el canal 5M comparado con el silvestre (Figura 6-7B).

Los datos anteriores muestran que mutar los residuos ácidos del sitio de unión de Ca^{2+} a Gln permite la activación de TMEM16A a pHi=7.3 en ausencia de Ca^{2+} intracelular.

Si estos residuos son la principal fuente de sensibilidad con el V_m , se puede suponer que bajo condiciones ácidas debería tener un pequeño o nulo efecto en la I_{Cl,V_m} y la dependencia con el V_m de pKa ya no debería existir. Para probar esto, se registraron la I_{Cl,V_m} de células dializadas con una solución intracelular a pHi=4.

La Figura 6-8 muestra registros de I_{Cl,V_m} para los canales silvestre, 2M, 3M, 4M y 5M (arriba a abajo). La cinética de las I_{Cl,V_m} a pHi 4.0 y 7.3 (comparando 6-7A con 6-8A) fue muy similar. Por ejemplo, a +160 mV la constante de tiempo de activación para el canal 5M fue 0.46 ± 0.04 ms (n=5) a pHi 7.3 y 0.77 ± 0.03 ms (n=5) a pHi 4.0. Las correspondientes curvas I_{Cl,V_m} - V_m muestran menor rectificación (Figura 6-8A panel derecho).

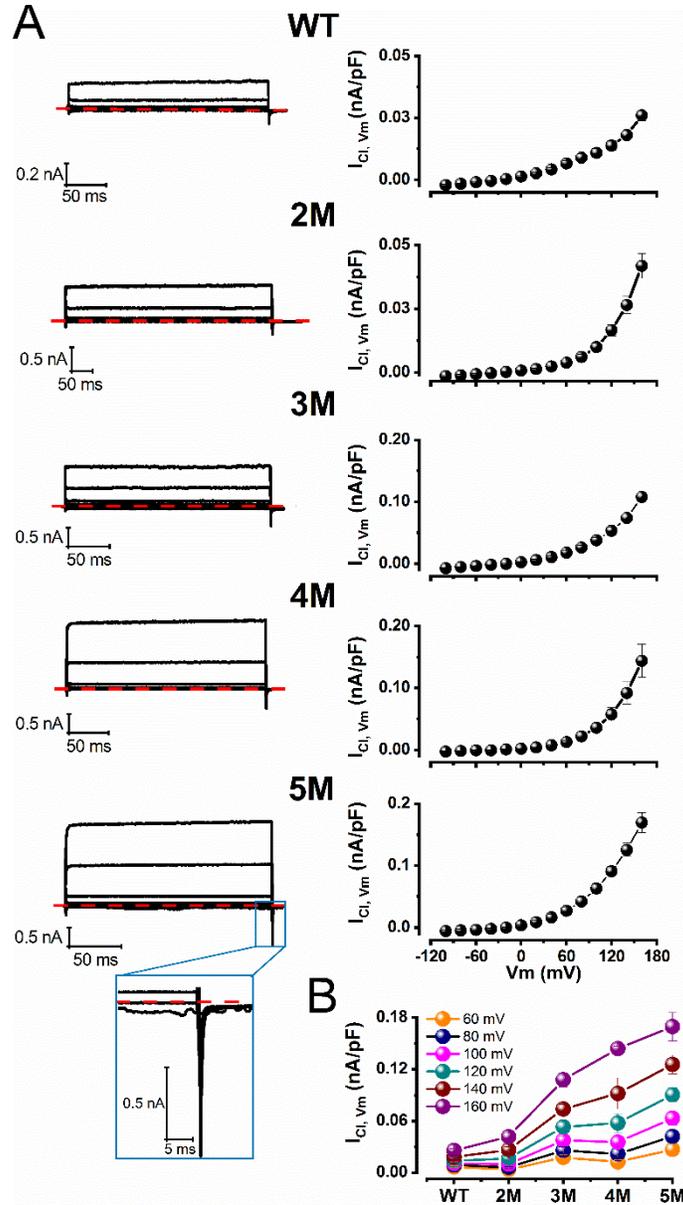


Figura 6-7 Mutar los residuos ácidos que forman el sitio de unión de Ca^{2+} potencia la activación por V_m de *TMEM16A* en condiciones de pH_i fisiológicas. A Registros representativos de $I_{Cl, Vm}$ (izquierda) obtenidos de diferentes células que expresan los canales (arriba-abajo) WT (n = 8), 2M (n = 5), 3M (n = 6), 4M (n = 6), and 5M (n = 6) y sus correspondientes curvas $I_{Cl, Vm}$ (derecha). Nótese la ausencia de corriente de cola en esos registros (amplificación: Corriente de cola de la mutante 5M). En todos los registros: $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i = 140/40$ mM, $pH_e/pH_i = 7.3/7.3$ y $[Ca^{2+}]_i = 0$. **B** Densidad de corriente vs el número de residuos ácidos mutados a Gln a diferentes V_m .

Los valores de potencial de inversión para el silvestre, 2M, 3M, 4M y 5M fueron -31.4 ± 0.8 , -31.5 ± 0.7 , -29.2 ± 0.7 , -31.0 ± 2.1 y -28.0 ± 0.9 mV respectivamente. Esto indica que a pH_i 4.0 la I_{Cl,V_m} se generó por flujo de Cl^- .

Sin embargo, a pH_i 4.0 la magnitud de I_{Cl,V_m} (registrada a V_m positivos) incrementa conforme incrementa el número de mutaciones en el sitio de pegado de Ca^{2+} (Figura 6-8B). Aunque, este incremento es mucho menor en la 5M comparado con la versión silvestre del canal.

6.2.4 La mutación de residuos del sitio de pegado de Ca^{2+} disminuye, pero no abate el efecto del H^+ intracelular sobre la activación por V_m de TMEM16A.

Cuando se usa pH_i 4.0 para protonar los aminoácidos Glu y Asp la probabilidad de protonación es de aproximadamente 0.64, es decir, no es sencillo comparar el canal silvestre y los canales mutados (con protonación permanente).

A pesar de esta limitación y contrario a los resultados obtenidos a pH_i 7.3 (Figura 6-7) la activación por V_m de I_{Cl,V_m} a pH_i 4.0 se debilitó fuertemente pero no se eliminó.

Esto es debido a que se observó que al despolarizar a +160 mV se induce un incremento en la I_{Cl,V_m} de 1.4 veces en el canal 5M comparado con el silvestre a pH_i 4.0. Por lo tanto, mutar 4 glutámicos y 1 aspártico en el sitio de pegado de Ca^{2+} reduce notablemente pero no se elimina la habilidad del H^+ para incrementar la I_{Cl,V_m} .

Para investigar si la dependencia con el V_m de pK_a se eliminaba por la mutación de los residuos ácidos, se llevaron a cabo experimentos usando la configuración parche escindido con el canal 5M y se hicieron curvas dosis respuesta a H^+ . La Figura 6-9 muestra curvas de titulación usando la I_{Cl,V_m} registrada a varios V_m desde +60 a +160 mV en configuración célula completa (A) o con parche escindido (B). Diferente a el canal silvestre las curvas dosis respuesta para la mutante 5M muestran un empalme a diferentes V_m , esto indica menor dependencia con el V_m .

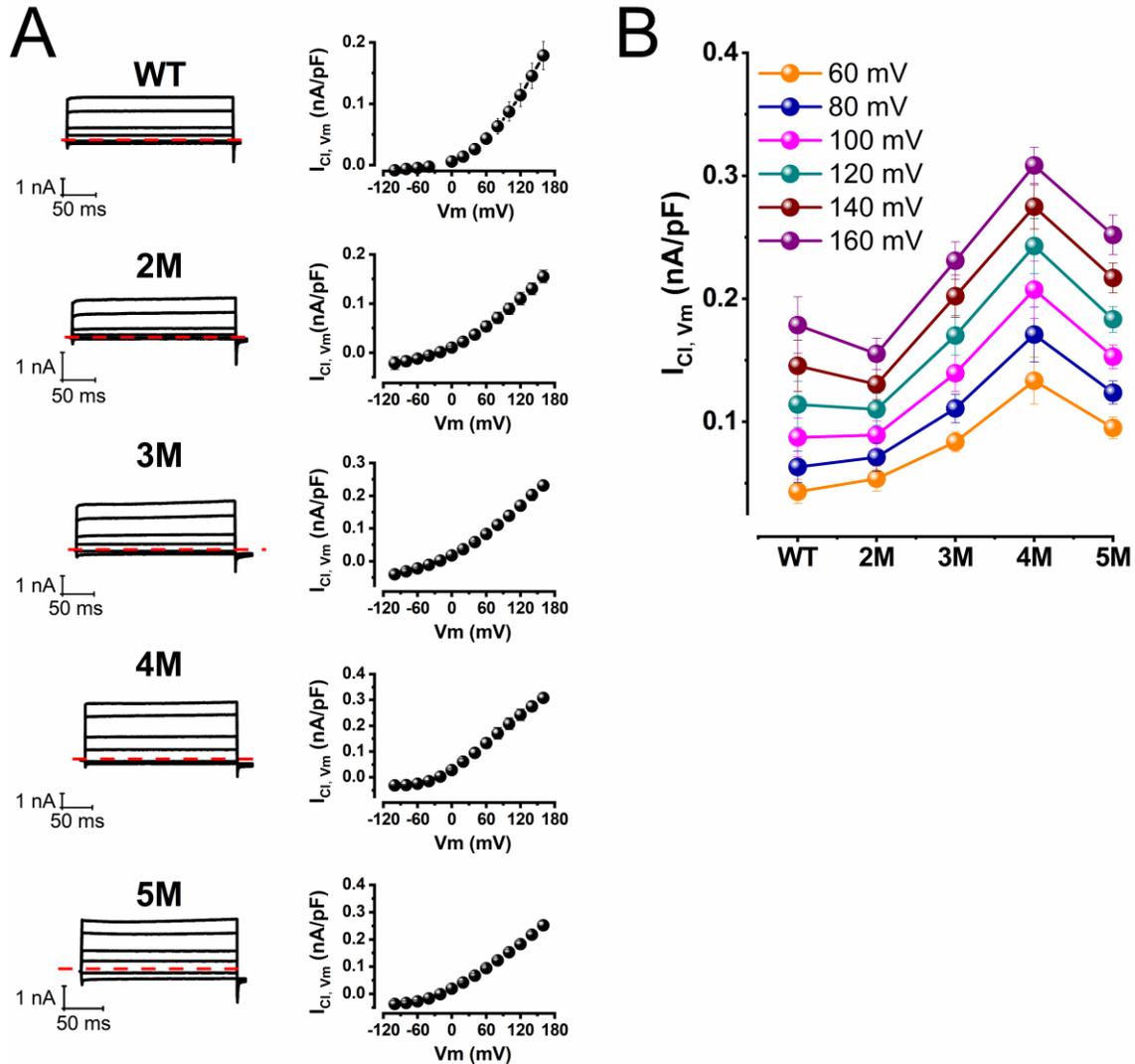


Figura 6-8 Canales con mutaciones en el sitio de unión a Ca^{2+} son menos sensibles a acidificación intracelular. **A** Trazos representativos de $I_{Cl, Vm}$ (panel izquierda) y sus correspondientes curvas $I_{Cl, Vm} - V_m$ (panel derecha). De los canales TMEM16A de izquierda a derecha: WT (n = 5), 2M (n = 5), 3M (n = 5), 4M (n = 6), and 5M (n = 6). La $I_{Cl, Vm}$ fue obtenida de diferentes células dializadas con una solución interna a la cual fue ajustado el pH a 4.0 y $[Ca^{2+}]_i = 0$. Nótese la presencia de pequeñas corrientes de cola. $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i = 140/40$ mM, $pH_e/pH_i = 7.3/4.0$ y $[Ca^{2+}]_i = 0$ en todos los casos. **B** Densidad de corriente vs el número de residuos ácidos mutados a Gln a diferentes V_m .

Este comportamiento es más evidente en los datos obtenidos de parche escindido, posiblemente por que en esta configuración es posible probar todas la $[H^+]_i$ en el mismo parche. Las curvas se ajustaron a la ecuación de Hill para calcular el pKa.

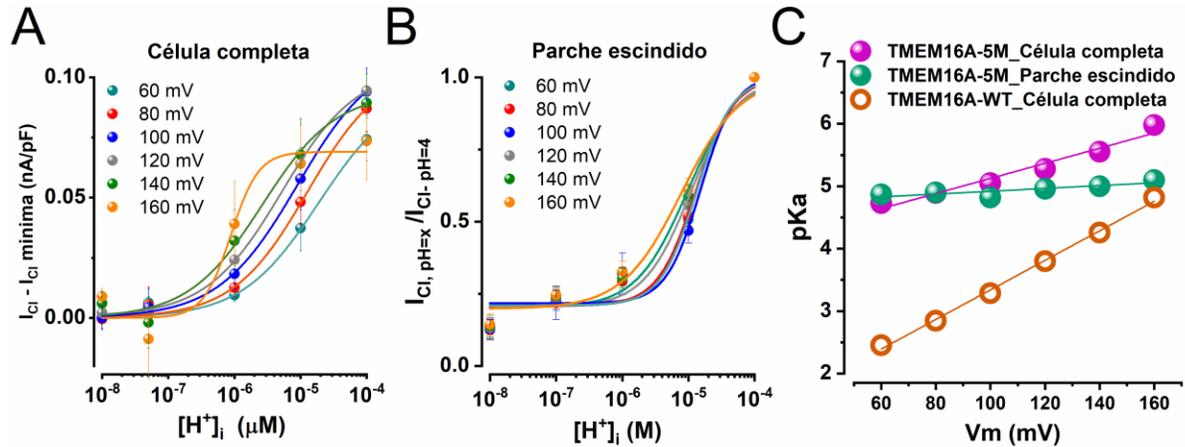


Figura 6-9 La mutación del sitio de pegado de Ca^{2+} no abate por completo la dependencia con el V_m de la pK_a . **A-B** Curvas de titulación del canal TMEM16A-5M a los V_m desde +60 a +160 mV. Las curvas fueron construidas usando la I_{Cl, V_m} de registros en configuración de célula completa (**A**) y parche escindido (**B**), y después fueron ajustadas a la ecuación de Hill (ecuación 1) para determinar los valores de la constante de equilibrio de protonación K . **C** La dependencia con el V_m de pK_a fue obtenida del canal TMEM16A-5M. Las esferas moradas y verdes muestran los valores de pK_a a diferentes V_m calculados usando la configuración de célula completa o parche escindido. Las líneas continuas indican el ajuste a la ecuación 4 para obtener los parámetros pK_0 y δ . Los valores correspondientes para célula completa y parche escindido fueron $3.91 \pm 0.14/0.71 \pm 0.72$ y $4.69 \pm 0.08/0.13 \pm 0.04$, respectivamente. Con finalidad de comparar la curva de dependencia con el V_m del pK_a para el canal TMEM16A WT se muestra en naranja.

La Figura 6-9C muestra los valores de pK_a en función de V_m (morado= célula completa; verde= parche escindido). Los valores de pK_a caen en un intervalo de 4.7 a 6 (el intervalo para los datos de parche escindido es muy pequeño). Esto indica que otros residuos Glu y Asp están protonados, de lo contrario se anularía por completo la dependencia con el V_m .

Las curvas de pK_a - V_m se ajustaron a la ecuación 4 para estimar el pK_0 y la sensibilidad al V_m (δ). Los valores para estos parámetros pK_0/δ fueron $4.69 \pm 0.08/0.13 \pm 0.04$ (parche escindido) y $3.91 \pm 0.14/0.70 \pm 0.07$ (célula completa). Por lo tanto, comparado con el silvestre (graficado en naranja) la protonación en el canal 5M es menos dependiente de V_m . Esta pérdida en la dependencia con V_m también ilustra el hecho de que este canal está parcialmente abierto a bajas $[\text{H}^+]_i$. Es decir, que al mutar los residuos ácidos disminuye la dependencia con el V_m debida a la titulación de TMEM16A. Esto apoya la idea de que el sitio de pegado de Ca^{2+} es el blanco del H^+ intracelular. Además, la actividad del canal TMEM16A-5M se incrementó bajo condiciones ácidas por un mecanismo de protonación con débil dependencia con el V_m .

6.2.5 La protonación dependiente de V_m del sitio de pegado de Ca^{2+} facilita la activación de TMEM16A por V_m debido al incremento en la probabilidad de apertura

Para comprender mejor el mecanismo por el cual el H^+ intracelular activa al canal TMEM16A, se determinó si la protonación del sitio de unión de Ca^{2+} incrementa la probabilidad de apertura. Para evaluar este punto, se hicieron curvas I_{Cl,V_m} - V_m de registros usando parche escindido y los parches se expusieron a pH_i 7.3 y 4.0.

Para activar al canal se usó el protocolo de rampa que consiste en el cambio de V_m desde -100 mV hasta +200 mV durante 635 ms. Se empleó pH_i 4.0 debido a que bajo esta condición el 64 % del tiempo las cadenas laterales del Glu está en un estado protonado, asumiendo que el pK_a del Glu es 4.25.

La Figura 6-10A muestra dos curvas I_{Cl,V_m} - V_m obtenidas de registros en parche escindido a partir de células HEK-293 que expresan en canal TMEM16A silvestre (izquierda) o el canal TMEM16A-5M (derecha). A pH_i 7.3 el canal silvestre muestra una pequeña I_{Cl,V_m} en todo el rango de V_m . Sin embargo, una vez que el parche se expone a pH_i 4.0 la I_{Cl,V_m} se potencia dando como resultado una corriente con rectificación saliente.

Similar a esto, en el canal 5M (derecha) la I_{Cl,V_m} se incrementó cuando se cambió la solución de pH_i 7.3 a 4.0 con una pequeña alteración en el potencial de inversión ($\Delta V_r = 4.95 \pm 0.8$ para WT y $\Delta V_r = 4.9 \pm 0.9$ mV para 5M). Para determinar si la probabilidad de apertura se incrementó debido a la acidificación, calculamos el cociente de I_{Cl,V_m} entre pH_i 4.0 y 7.3 ($I_{pH_i=4}/I_{pH_i=7.3}$).

Este valor es directamente proporcional al cambio en la probabilidad de apertura inducida por la acidificación a cada V_m . Estos cocientes se muestran en la Figura 7-10B. En el canal silvestre la probabilidad de apertura incrementa 3 veces a 0 mV y 14 veces a 200 mV. Esto resalta el efecto de la protonación dependiente de V_m sobre la probabilidad de apertura.

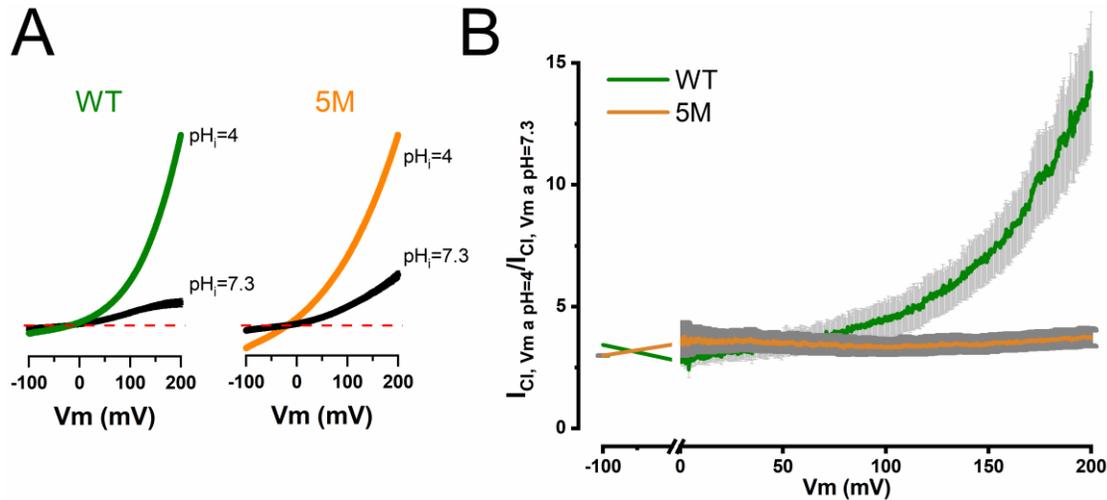


Figura 6-10 Acidificación intracelular facilita la activación de TMEM16A por incremento en la probabilidad de apertura. **A** Relación $I_{Cl, Vm} - Vm$ obtenida de parche escindido obtenido de células HEK-293 que expresan el canal TMEM16A WT (izquierda) o TMEM16A-5M (derecha). El lado citosólico de cada parche fue expuesto secuencialmente a las soluciones a pH 7.3 y después a 4.0. Las curvas $I_{Cl, Vm} - Vm$ fueron generadas aplicando un protocolo de rampa que varía desde -100 hasta +200 mV en 624 ms. Experimentos pareados fueron normalizados con la corriente obtenida a +200 mV y pH_i = 4.0, posteriormente fueron promediadas. El potencial de inversión fue: -36.2 ± 1.4 a pH_i = 7.3 y -31.3 ± 1.4 para pH_i = 4.0 para WT y -28.3 ± 1.5 a pH_i = 7.3 y -23.4 ± 1.6 a pH_i = 4 para la mutante 5M. $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i = 140/40$ mM, pH_e = 7.3 y $[Ca^{2+}]_i = 0$ en todos los casos. **B** Cociente de $I_{Cl, Vm}$ registrada a pH_i 4.0 entre $I_{Cl, Vm}$ registrada a 7.3 fue usado para determinar la probabilidad de apertura a cada Vm después de la acidificación intracelular. La potenciación de la probabilidad de apertura para el canal WT (línea verde; n = 10) y el canal 5M (línea naranja; n = 13) fue inducida por acidificación a pH_i = 4.0.

Sin embargo, el cociente $I_{pH=4}/I_{pH=7.3}$ para el canal 5M fue independiente de Vm (naranja), aunque la acidificación produce un incremento de 3.5 veces en la probabilidad de apertura en el rango desde -100 hasta +200 mV. Por lo tanto, la protonación es suficiente para garantizar la activación dependiente de Vm del canal TMEM16A en ausencia de Ca²⁺ intracelular.

Además, los datos de titulación indican que la activación de TMEM16A se ve reforzada por la protonación independiente de Vm. Los datos descritos muestran que la activación de TMEM16A en ausencia de Ca²⁺ se potencia por la mutación de los residuos ácidos del sitio de pegado de Ca²⁺.

6.2.6 La protonación dependiente del Vm o la mutación en el sitio de pegado de Ca²⁺ corre la dependencia con el Vm de TMEM16A favoreciéndola.

Dada la fuerte activación de los canales 4M y 5M a pH_i 7.3, se registraron corrientes de cola para analizar el efecto de la acidificación sobre la activación dependiente de Vm. Se registraron las corrientes de cola a +100 mV con un protocolo P/8 en células

que expresaron los canales silvestre, 4M y 5M y las células se dializaron con una solución interna a $pH_i=4.0$. Debido a que la I_{Cl, V_m} alcanza el estado estacionario muy rápido, se emplearon solo 20 ms en los pulsos de despolarización (Figura 6-11A).

La activación dependiente de V_m se midió usando el valor de $V_{0.5}$ (determinado ajustando la ecuación de Boltzmann a las curva de corriente de cola normalizadas en función de V_m). Los valores de $V_{0.5}$ fueron los mismos para los canales silvestre y 5M (Figura 6-11B). Estos valores estuvieron en el rango 129 a 140 mV para el silvestre, 111 a 167 mV para 4M y 117 a 149 mV para 5M.

Los valores de $V_{0.5}$ a pH_i 7.3 fueron más positivos para los tres canales, indicando que la acidificación corre la dependencia con el V_m . Aunque los valores de $V_{0.5}$ para los canales 4M y 5M tuvieron una diferencia de 17 mV a pH_i 7.3, el análisis estadístico indico que a $p<0.04$ los valores no son diferentes.

Sin embargo, esta tendencia junto con el efecto de pH_i 4.0 sobre el canal 4M sugieren que la protonación o mutación del residuo E654 facilita la activación por V_m . El valor de $V_{0.5}$ estimado para el canal silvestre a pH_i 7.3 se obtuvo ajustando la ecuación 5 a las curvas $I_{Cl, V_m}-V_m$. Este valor se graficó con esferas vacías color azul en la Figura 6-11C.

Estos resultados y los obtenidos a pH_i 4.0 (esferas llenas color azul) indican que los protones intracelulares corren la dependencia con el V_m por más de -100 mV. Esto significa que el canal es más sensible a V_m y por lo tanto se facilita la activación del canal.

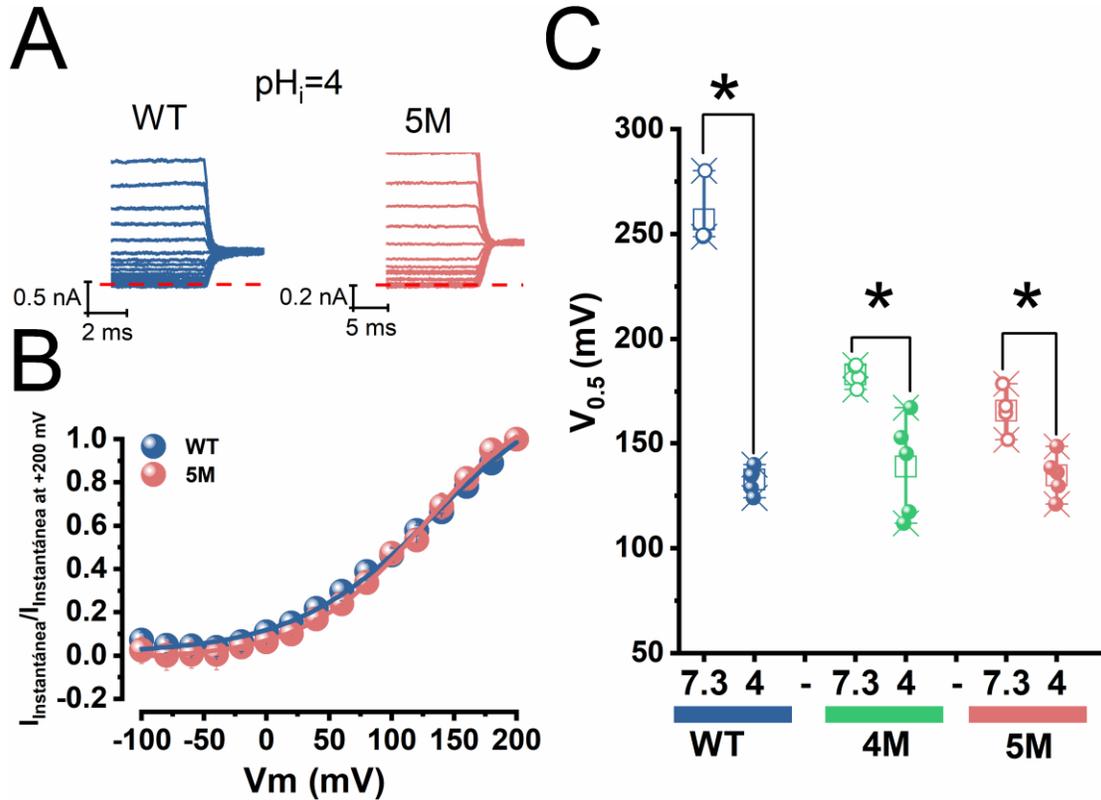


Figura 6-11 Los residuos ácidos del sitio de unión de Ca²⁺ controlan la activación dependiente de V_m de TMEM16A. **A** Trazos representativos de corrientes de cola registradas a +100 mV obtenidos de dos células que expresan el canal WT (azul) y el canal 5M (rosa). Por claridad solo se graficaron los últimos 10 ms de las corrientes generadas por pulsos despolarizantes. Las corrientes fueron registradas usando un protocolo P/8 en células dializadas con una solución interna a pH_i = 4.0. [Cl⁻]_e/[Cl⁻]_i = 140/40 mM, pH_e = 7.3 y [Ca²⁺]_i = 0 en todos los casos. **B** Curvas de activación construidas con las corrientes de cola mostradas en A. Las corrientes de cola fueron normalizadas usando el valor a +200 mV. Líneas continuas indican en ajuste a la ecuación de Boltzmann. A partir del ajuste se obtuvieron los valores de V_{0.5} = 134.14 ± 9.8 mV y z = 0.02 para WT y V_{0.5} = 126.6 ± 5.6 mV y z = 0.02 para 5M. **(C)** Valores de V_{0.5} para los canales WT (azul, n = 4), 4M (verde, n = 4), y 5M (rosa, n = 4) tanto a pH_i 7.3 (símbolos abiertos) como a 4.0 (símbolos cerrados). Los valores de V_{0.5} fueron calculados como se indica en A y B. Los valores de V_{0.5} para WT a pH_i 7.3 (n = 6) fueron estimados ajustando la ecuación 4 a las curvas I_{Cl,vm} - V_m. Diferencias estadísticas se muestran con un asterisco, p = 0.04.

6.3 CONCLUSIÓN

La protonación dependiente de V_m facilita la activación del canal TMEM16A por V_m en ausencia de Ca²⁺.

Estas conclusiones se obtienen a partir de los resultados arriba descritos:

1. La constante de equilibrio de la reacción de protonación es dependiente de V_m.

2. El principal sitio sobre el cual actúa el H^+ lo constituyen los aminoácidos ácidos que forman parte del sitio de pegado de Ca^{2+} . Sin embargo, no son los únicos. Los datos indican que hay otra región sensible a los protones cuya aportación a la activación por V_m es menor.
3. La protonación dependiente de V_m de los ácidos glutámicos del sitio de pegado de Ca^{2+} incrementa la probabilidad de apertura de TMEM16A.
4. La protonación dependiente de V_m corre a la izquierda la curva de activación. Esto significa que se modifica la sensibilidad del canal a V_m favoreciéndola.

7 *DISCUSIÓN*

7.1 ACTIVACIÓN POR VOLTAJE DE TMEM16A EN AUSENCIA DE Ca^{2+}

La activación de TMEM16A es un mecanismo complejo que requiere de incrementos en la concentración de Ca^{2+} intracelular, de despolarizaciones en la membrana, de la concentración extracelular de aniones permeantes, de la concentración extracelular e intracelular de protones y del contenido de PIP2 de la membrana plasmática (6, 30, 158).

El proceso de activación del canal inicia con la interacción directa de dos iones Ca^{2+} con el sitio de unión a Ca^{2+} de alta afinidad formado por los residuos N650, N651, N730, E654, E702, E705, E734 y D738 en cada monómero (113, 151, 163). Esta interacción Ca^{2+} -canal es dependiente del V_m , debido a que la disociación de Ca^{2+} además de ser lenta es V_m -dependiente (6).

Los iones permeantes por su lado aceleran el proceso de apertura y enlentecen el cierre lo cual debe incrementar la probabilidad de apertura. Los protones extracelulares, aunque interaccionan con la proteína fuera del campo eléctrico, por un mecanismo aún desconocido, pueden incrementar la probabilidad de apertura del canal activado en presencia de Ca^{2+} . En presencia de Ca^{2+} intracelular, los protones intracelulares disminuyen la probabilidad de apertura debido a que impiden el pegado del Ca^{2+} . Finalmente, el PIP2 de manera cooperativa coadyuva al Ca^{2+} para mantener al canal en el estado abierto. Por lo tanto, la activación del canal en condiciones fisiológicas es el resultado del balance de la intensidad de los efectos que ejerzan los moduladores positivos y los moduladores negativos.

El efecto del V_m sobre la probabilidad de apertura fue rápidamente determinado. Los experimentos de control de V_m mostraron que, a potenciales negativos, cercanos al fisiológico, el canal requería más Ca^{2+} para alcanzar el 50% de apertura mientras que a V_m positivos se observa lo contrario. La idea de que el efecto del V_m es sobre la unión del Ca^{2+} también se consideró desde las etapas iniciales del

estudio de este canal al encontrarse que el efecto del Vm se pierde cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular está en el orden de 5-10 μM (158). La consecuencia de estos hallazgos es que los modelos que se utilizaban para explicar el mecanismo de activación no consideraban etapas que llevaran al estado abierto en ausencia de Ca^{2+} .

Una de las observaciones que se hicieron es que el canal podía llegar al estado abierto aun en ausencia de Ca^{2+} . Sin embargo, este mecanismo se desconocía.

Si bien en presencia de Ca^{2+} es muy complicado separar la contribución del Vm a la activación del canal. Experimentalmente es posible hacerlo de al menos dos maneras. Por un lado, es posible exponer la cara citosólica del canal a una condición de 0 Ca^{2+} . Esto se logra usando altas concentración de quelantes de Ca^{2+} como se realizó en este trabajo usando 25.24 mM de EGTA. Tomando en cuenta que la afinidad de este quelante está en el orden de los 90-110 nM, es posible asumir que con la concentración de EGTA utilizada y el no agregar Ca^{2+} a la solución, la concentración de Ca^{2+} libre es cercana al 0. Por otro lado, se utilizó 5 mM de BAPTA-K. Este es un quelante con una afinidad semejante a aquella del EGTA, pero su velocidad de quelación es mucho más rápida. La solución con BAPTA-K tampoco tenía Ca^{2+} , razón por la cual se consideró que esta solución también tiene 0 calcio libre. Con ambas soluciones se obtuvo los mismos resultados.

La segunda manera de separar la contribución de la unión de Ca^{2+} a la activación del canal fue mediante mutagénesis. Se mutaron todos los residuos que unen con alta afinidad al Ca^{2+} y se realizaron experimentos en condiciones de 0 Ca^{2+} arriba descritos. En esta última condición podemos considerar que no hay sitios de unión a Ca^{2+} . Por lo tanto, estas son condiciones muy exigentes para eliminar la participación del Ca^{2+} en la activación del canal y así poder evaluar la activación por Vm. En esta tesis se demuestra que ambas condiciones llevan a la misma conclusión, el canal TMEM16A se puede abrir en ausencia de Ca^{2+} intracelular al cambiar el potencial hacia valores positivos. Se caracterizó esta vía de activación. Las siguientes observaciones permiten concluir que TMEM16A se abre por efecto del Vm en ausencia de Ca^{2+} intracelular:

1. En ausencia de Ca^{2+} y con 25.24 mM de EGTA o 5 mM de BAPTA-K fue posible activar corrientes salientes solo en células HEK 293 que expresan al canal TMEM16A.
2. Las corrientes registradas en ausencia de Ca^{2+} responden a aniones más permeables que Cl^- mostrando la misma secuencia de selectividad que el canal activado en presencia de Ca^{2+} .
3. Las corrientes provenientes de la activación por V_m se inhibieron por los bloqueadores de TMEM16A ácido tánico y ácido antraceno 9 carboxílico.

Todos estos resultados dejan en claro que las corrientes aquí descritas provienen de la activación por V_m del canal TMEM16A. Estos datos muestran que, aunque el canal puede activarse por V_m , esta activación es pequeña, de aproximadamente 10 veces menor comparada con la activación por Ca^{2+} . Esto podría indicar que el canal tiene una dependencia con el V_m intrínseca pobre, ya que la activación por V_m por sí misma no lleva al canal a un estado plenamente conductivo.

Por otro lado, hay diferencias notables en la cinética de activación. La corriente activada por V_m en ausencia de Ca^{2+} se activa y desactiva muy rápido. La corriente se mantiene constante durante el tiempo del estímulo y finalmente no se observan corrientes de cola características de la activación por Ca^{2+} . Esta cinética es muy distinta a aquella que depende del tiempo en presencia de Ca^{2+} . Otro de los aspectos que es destacable es que la corriente a potenciales negativos es casi nula. Esto sugiere que cuando el canal se abre en ausencia de Ca^{2+} intracelular, el canal se convierte en rectificador debido a que la probabilidad de apertura del canal es muy baja y casi constante a todos los potenciales. La corriente incrementa porque la conductividad del canal incrementa a potenciales positivos. Esto es, la rectificación proviene de una rectificación en la conductancia. Esto es inusual, ya que a la mayoría de los canales les toma un tiempo llegar al estado de máxima probabilidad de apertura, así como al estado cerrado total (cinética de activación y desactivación). En este caso aparentemente el canal se activa de manera

instantánea y se cierra igual. Además de que se convierte en un canal con flujo casi unidireccional en dirección entrante.

7.2 PAPEL DE LOS RESIDUOS DEL PRIMERA ASA INTRACELULAR EN LA ACTIVACIÓN POR VOLTAJE: COMUNICACIÓN BIDIRECCIONAL CON EL SITIO DE UNIÓN A Ca^{2+} .

La dependencia intrínseca con el Vm de TMEM16A ha sido materia de estudio por varios grupos (119, 157, 158). Uno de los focos de atención ha sido el papel que juegan los residuos del primer asa intracelular. De todos los residuos que forman el asa, los residuos ⁴⁴⁴EEEEAVK⁴⁵¹ han recibido más atención ya que forman un segmento cargado negativamente y contiene el segmento de empalme C que está involucrado tanto en la regulación intrínseca con el Vm como en el acople dual de activación por Vm y Ca^{2+} . Algo interesante, es que fisiológicamente existe la isoforma del canal que no tiene el segmento EAVK. Esta isoforma se expresa principalmente en cerebro y en músculo esquelético en donde podría participar en la regulación de la actividad eléctrica.

En este trabajo se reevaluó el papel de todos estos residuos de una manera sistemática mediante delección completa o parcial de EAVK, delecciones acumuladas de los ácidos glutámicos y mutaciones que cambian la carga de negativo a positivo. La eliminación completa de los residuos EAVK sin afectar los sitios de unión a Ca^{2+} no favorece la activación por Vm, al contrario, observamos que la activación es casi imperceptible, además modifica la sensibilidad a Ca^{2+} . Inesperadamente, cuando en el canal sin EAVK y se mutan los ácidos glutámicos E702 y E705 a glutaminas, la actividad del canal incrementa aproximadamente 6 veces. Esto sugiere que el segmento de empalme alternativo C y los sitios de unión a Ca^{2+} podrían interactuar. Se pueden proponer los siguientes escenarios:

1. Que el segmento C actúe sobre el sitio de unión a Ca^{2+} con un tipo de modulación a larga distancia.
2. Que el sitio de unión a Ca^{2+} module la región del segmento C.
3. Que haya algún tipo de comunicación bidireccional que permita que ambos se modulen a distancia.

Debido a que al eliminar al segmento C, la sensibilidad a Ca^{2+} y al V_m se ven alteradas, es posible que el primer caso es el relevante (49, 158). Sin embargo, el hecho que al mutar el sitio de unión a Ca^{2+} se incremente la activación del canal, sugiere que hay una comunicación bidireccional. Esto propone que cuando el sitio de unión a Ca^{2+} está vacío, se favorece la apertura del canal por V_m . Por el contrario, cuando el Ca^{2+} está unido, la activación por V_m se disminuye. Esto explica por qué el canal en condiciones de muy bajo Ca^{2+} , tiene una rectificación pronunciada que se acentúa aún más en ausencia de Ca^{2+} . De acuerdo con esta idea, está el hecho que en ausencia de Ca^{2+} la mutante TMEM16A-E702Q-E705Q no induce el mismo comportamiento comparado con la mutante TMEM16A-E702Q-E705Q- Δ EAVK ya que la primera mutante tiene una activación 10 veces menor. Esta mutante tiene el segmento EAVK. Esto indica que el V_m induce un re-arreglo conformacional que lleva a una mayor apertura del canal que requiere la participación de los sitios de unión a Ca^{2+} y de los residuos EAVK. Una posibilidad podría ser que esta región este participando como un sitio transitorio de almacenamiento de Ca^{2+} , como se ha reportado para otras regiones de la proteína. Por ejemplo, se ha demostrado que la sensibilidad por Ca^{2+} disminuye dramáticamente al eliminar los aminoácidos 285-297 ubicados en el N-terminal (146). En este sentido, los cuatro ácidos glutámicos que anteceden el segmento EAVK podrían funcionar como reservorio transitorio de Ca^{2+} , aunque no sería el único medio por el cual el canal pueda tener acceso a Ca^{2+} .

En este trabajo se construyó la mutación y eliminación de estos residuo. Como resultado no se observó alguna alteración en la activación por V_m . En caso de que participaran en algún proceso moderatorio quizá podría ser en la modulación en el pegado de Ca^{2+} . Datos experimentales del 2011 por Xiao et al. muestran que al mutar estos residuos por Ala la pendiente de la relación $V_{0.5}$ - $[\text{Ca}^{2+}]$ se redujo 3 veces, y esta reducción puede deberse a cualquiera de las siguientes razones: a) reducción en la afinidad por Ca^{2+} o b) disminución en la estabilidad del estado abierto por Ca^{2+} . Es posible que este segmento ⁴⁴⁴EEEEEE⁴⁴⁸ participa más en la modulación de la activación por Ca^{2+} que en la activación solo por V_m en ausencia de Ca^{2+} .

Otro resultado que apoya el papel del segmento EAVK en la modulación de la activación por V_m es el análisis de las mutantes I641A y Q645A ubicadas en el poro. Estas mutantes se activan por V_m . Cuando se elimina el segmento EAVK se reduce notablemente la actividad del canal.

Aún quedan abiertas las preguntas ¿Cuál es el mecanismo mediante el cual los residuos EAVK regulan la activación de TMEM16A? Más trabajo experimental es necesario para entender cómo este primer asa intracelular modula la activación por V_m , así como la sensibilidad a Ca^{2+} . ¿Y cuál es el mecanismo de acción sobre el sitio de pegado de Ca^{2+} , de tal manera que altera la sensibilidad a Ca^{2+} ?

7.3 PROTONACIÓN DEPENDIENTE DE V_m PERMITE LA ACTIVACIÓN DE TMEM16A POR VOLTAJE EN AUSENCIA DE Ca^{2+} INTRACELULAR.

La activación de TMEM16A en ausencia de Ca^{2+} se puede llevar a cabo por fuertes despolarizaciones, una elevación en la temperatura, mutación en los residuos I637 y Q645 en la sexta hélice transmembranal en la isoforma ac, y eliminar el segmento EAVK en la primera asa intracelular (27, 34, 119, 158).

Dado que la acidificación intracelular reduce la activación de TMEM16A debido a que el H^+ compite con el Ca^{2+} por el sitio de alta afinidad para Ca^{2+} localizado dentro del campo eléctrico, se propuso la hipótesis que TMEM16A podría activarse debido a la protonación dependiente de V_m del sitio de pegado de Ca^{2+} . Esto es justo lo que se encontró: la dependencia con el V_m es debida a la protonación dependiente de V_m del sitio de pegado de Ca^{2+} . Conforme se acidifica el lado citosólico, se activa TMEM16A por V_m y resulta en una I_{Cl, V_m} grande. Esta corriente es rectificante saliente y carece de cinética.

La constante de equilibrio de la reacción de protonación es dependiente de V_m y la probabilidad de apertura bajo condiciones ácidas incrementa. Esto sugiere fuertemente que el efecto de los protones intracelulares es directo sobre el canal. Este efecto, la potenciación inducida por la acidificación citosólica se reduce después de mutar los residuos Glu y Asp en el sitio de unión de Ca^{2+} . Esto sugiere que el H^+ titula estos residuos.

No obstante, en el canal TMEM16A cuyos residuos que forman el sitio de unión de Ca^{2+} se cambiaron por glutaminas (TMEM16A-5M), la acidificación intracelular aún potencia la activación del canal, aunque en este caso el efecto fue independiente del Vm. El pKa estimado para esta activación secundaria esta entre 4.5 y 6 y sugiere la protonación de residuos His y probablemente Asp localizados en el lado citosólico de la proteína. Estos datos son consistentes con el mecanismo de activación propuesto en la Figura 7-1.

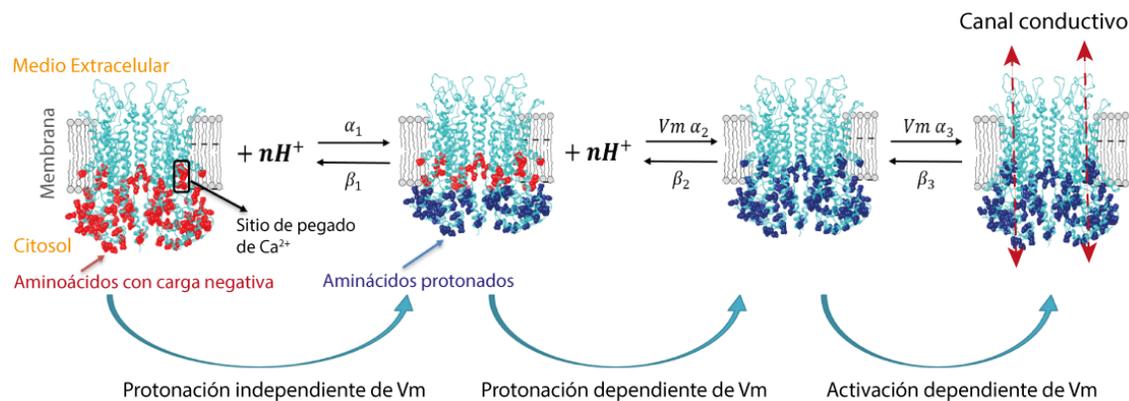


Figura 7-1 Representación esquemática del mecanismo de activación por protonación dependiente e independiente de Vm. Cian = canal, rojo = residuos ácidos intracelulares no protonados, azul = residuos ácidos intracelulares protonados, gris = membrana plasmática. La estructura 5OYB en presencia de Ca^{2+} fue modificada de (113) (Descrito en el texto principal)

Proponemos que la activación del canal en presencia de protones sucede en tres etapas. La primera es una protonación independiente del Vm mientras que la segunda una protonación dependiente de Vm. Y finalmente el canal para abrirse pasa por una tercera etapa que es también dependiente del Vm. El H^+ intracelular interactúa con los residuos ácidos (en rojo en la Figura 7-1) localizados en el lado citosólico de la proteína TMEM16A (en cian en el esquema, embebida en la membrana en gris). Algunos de estos residuos se encuentran fuera del campo eléctrico mientras que los residuos del sitio de unión a Ca^{2+} se encuentran dentro del campo eléctrico. Al inicio del experimento, el H^+ podrá interactuar con los residuos ácidos citosólicos de manera independiente de Vm ($K_1 = \beta_1/\alpha_1$). Al momento de aplicar el protocolo de estímulos, se aplicaron pulsos de Vm despolarizantes que vuelven positiva la cara intracelular de la membrana. Esto impulsa a los H^+ para que se muevan hacia la membrana donde se encuentra el

canal y donde pueden interactuar con los residuos ácidos del sitio de unión de Ca^{2+} ($K_2 = \beta_2/\alpha_2$). Esto constituye la etapa dependiente del V_m . Una vez que estos residuos son protonados (Figura 7-1, en azul marino), el canal llega al estado conductivo a través de una transición dependiente de V_m ($K_3 = \beta_3/\alpha_3$) y genera I_{Cl, V_m} .

Este mecanismo explica cómo surge la interacción entre el H^+ y el canal. Es evidente que la región citosólica de la proteína siempre estará en contacto con los H^+ intracelulares de tal forma que llegar al estado protonado independiente de V_m debe ser fácil.

Es importante mencionar que ocurre lo mismo con el Ca^{2+} . Sin embargo, el Ca^{2+} tiene mayor afinidad que el H^+ por el sitio. Así que ante un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, el Ca^{2+} se unirá preferentemente al canal, activándolo. En condiciones de ausencia de Ca^{2+} , con una concentración fisiológica de H^+ , cambios en el potencial impulsarían al protón a unirse al canal y activarlo, aunque esta activación es muy reducida, sin embargo, esta activación incrementa ante un aumento en la concentración de H^+ intracelular.

El efecto del H^+ intracelular observado en TMEM16A es comparable con lo descrito en los canales de potasio hSLO1 (Canal de potasio de gran conductancia activado por V_m y Ca^{2+}) o también conocidos como BK (7). Ambos canales son activados en ausencia de Ca^{2+} intracelular por acidificación y en ambos casos el blanco del H^+ es el sitio de unión de Ca^{2+} . Es interesante que en los canales BK el blanco del H^+ intracelular son dos residuos de His, así como un Asp localizados en el dominio RCK1 (dominio regulador de la conductancia de potasio localizado en la región intracelular). Al mutar las His se abate la activación debida al H^+ . De acuerdo con esto, la constante de equilibrio de protonación en los canales BK tiene un pK_a cerca de 6.5 a +100 mV y muestra dependencia con el V_m disminuida (7). En TMEM16A, el H^+ lo activa por mecanismos dependientes e independientes de V_m . El valor de pK_a independiente de V_m es de 5.0 a +100 mV el cual puede sugerir la titulación de residuos como Glu, Cys o His como en el caso de los canales BK.

Se ha propuesto que la activación completa de TMEM16A por Ca^{2+} intracelular se lleva a cabo en dos pasos. Primero, al unirse el Ca^{2+} neutraliza el potencial electrostático generado por los residuos ácidos del sitio de pegado de Ca^{2+} . Segundo, después de unirse el Ca^{2+} induce el movimiento de la hélice transmembranal 6 (TM6) desde la hélice 4 en dirección a la TM8 (91). Este proceso parece ser asistido por fosfatidilinositol 4,5 difosfato (4, 42, 148). La importancia de la neutralización del potencial electrostático por Ca^{2+} está ilustrado en la mutante TMEM16A-G644P. En esta mutante, se sugiere que la hélice TM6 está en la posición “abierta” pero el potencial electrostático está intacto debido a que no hay Ca^{2+} . En estas condiciones, la corriente generada muestra una fuerte rectificación saliente que se elimina a medida que se incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular (91). Es decir, el potencial electrostático genera una barrera al movimiento de los aniones permeantes. Sin embargo, se ha propuesto que esta barrera impide la salida de los aniones, pero no la entrada. En este trabajo se mutaron cinco de los residuos acídicos del sitio de unión a Ca^{2+} a glutamina (TMEM16A-5M). En este caso, debido a que todas las cargas están neutralizadas, el potencial electrostático también ha sido neutralizado. Sin embargo, la corriente activada por V_m muestra una fuerte rectificación saliente. Esto sugiere que neutralizar el potencial electrostático no es suficiente para eliminar la rectificación. Esta idea también se apoya por la fuerte rectificación saliente observada bajo condiciones intracelulares acídicas, en las cuales se elimina parcialmente el potencial electrostático.

Un dato importante es que las corrientes generadas por las mutantes I641A o Q645A muestran curso temporal y tienen corrientes de cola aun en ausencia de Ca^{2+} . Sin embargo, al remover a EAVK, el curso temporal y las corrientes de colas se eliminan y el canal es un rectificador saliente fuerte. Este dato también sugiere que el potencial electrostático debido a las cargas negativas del sitio de unión a Ca^{2+} no es el único que participa en la rectificación. Otra posible explicación es que en la mutante TMEM16A-5M, TM6 puede mantenerse unido a TM4 impidiendo el flujo de iones desde dentro de la célula hacia afuera y esto puede producir la rectificación observada.

7.4 IMPORTANCIA FISIOLÓGICA

Aunque aún no podemos describir cuál es la consecuencia fisiológica de la regulación de TMEM16A por H^+ , esta regulación podría participar en diversos procesos celulares. La activación de TMEM16A por V_m en ausencia de Ca^{2+} ocurre en menos de 1 ms. Este valor está dentro de la escala de tiempo del potencial de acción de células excitables. La rápida activación de TMEM16A puede regular la actividad eléctrica al inducir despolarización en la membrana o bien al acelerar la repolarización en el potencial de acción. Esto se ha observado en neuronas del ganglio de la raíz dorsal, en neuronas colinérgicas de la habénula media y en células del músculo (25, 69). Por lo tanto, la activación de TMEM16A permite a las neuronas responder al estímulo térmico, controlar el comportamiento relacionado con la ansiedad y aumentar la frecuencia de los potenciales de acción en las células del músculo esquelético del pez cebra (40). Otra posibilidad donde la activación de TMEM16A podría ser importante es en cáncer. Las células cancerosas sobre expresan los canales TMEM16A y experimentan un gradiente de pH que facilita la migración celular y la progresión del cáncer. En estas células el lado extracelular es ácido mientras que el citosol es alcalino y esto favorece la actividad de TMEM16A.

8 **CONCLUSIONES**

En este trabajo demuestro que el canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ intracelular TMEM16A se activa por V_m en ausencia de Ca²⁺.

El motivo ⁴⁴⁴EEEEAVK⁴⁵¹ localizado en la primera asa intracelular podría funcionar como un modulador alostérico cuando el canal se activa por V_m y por Ca²⁺.

El H⁺ intracelular permite al canal activarse por V_m en ausencia de Ca²⁺ intracelular, mediante un mecanismo que incluye titulación independiente de V_m de los residuos citosólicos y una titulación V_m-dependiente de los residuos ácidos localizados en el sitio de unión de Ca²⁺.

Fisiológicamente el canal se activaría por incrementos en la concentración de Ca²⁺, sin embargo, en condiciones donde la concentración interna de Ca²⁺ es muy baja, el canal podría activarse por V_m, en donde tienen una participación muy importante los H⁺ cuya concentración no cambia en condiciones fisiológicas en la célula. No podemos decir cuál de los dos iones (Ca²⁺ o H⁺) es mejor para activar al canal debido a que las condiciones en las que cada uno actúa son diferentes, esto es en condiciones fisiológicas no hay competencia entre estos.

9 *TRABAJO A FUTURO*

El mecanismo de regulación del segmento EAVK en la activación de TMEM16A por Ca^{2+} y V_m no ha sido descrito. En este trabajo se ha propuesto que hay comunicación bidireccional entre el segmento EAVK y el sitio de pegado de Ca^{2+} , sin embargo, espacialmente ambas regiones no están cerca una de la otra como para generar interacciones. ¿Cómo el segmento EAVK modula la activación por Ca^{2+} y por V_m de TMEM16A?

Para intentar dar respuesta a esta pregunta proponemos evaluar el papel del segmento “c” en diversas isoformas, así como evaluar mutantes de EAVK y otras regiones involucradas en la activación por Ca^{2+} y por H^+ que nos permitan analizar con detalle la modulación. Un ejemplo de estas mutantes es la I641A sobre la isoforma a y la isoforma ac del canal TMEM16A.

10 REFERENCIAS

1. **Abascal F, Zardoya R.** LRRC8 proteins share a common ancestor with pannexins, and may form hexameric channels involved in cell-cell communication. *BioEssays* 34: 551–560, 2012. doi: 10.1002/bies.201100173.
2. **Adachi S, Uchida S, Ito H, Hata M, Hiroe M, Marumo F, Sasaki S.** Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. [Online]. *J Biol Chem* 269: 17677–83, 1994. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8021279> [22 Jun. 2020].
3. **Alexander SPH, Peters JA, Kelly E, Marrion N V., Faccenda E, Harding SD, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, Davies JA.** THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Ligand-gated ion channels. *Br J Pharmacol* 174: S130–S159, 2017. doi: 10.1111/bph.13879.
4. **Arreola J, Hartzell HC.** Wasted TMEM16A channels are rescued by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Cell Calcium* 84, 2019. doi: 10.1016/j.ceca.2019.102103.
5. **Arreola J, Melvin JE, Begenisich T.** Inhibition of Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels from secretory epithelial cells by low internal pH. *J Membr Biol* 147, 1995. doi: 10.1007/BF00235400.
6. **Arreola J, Melvin JE, Begenisich T.** Activation of calcium-dependent chloride channels in rat parotid acinar cells. *J Gen Physiol* 108: 35–47, 1996. doi: 10.1085/jgp.108.1.35.
7. **Avdonin V, Tang XD, Hoshi T.** Stimulatory action of internal protons on Slo1 BK channels. *Biophys J* 84: 2969–2980, 2003. doi: 10.1016/S0006-3495(03)70023-X.
8. **Ayoub C, Wasylyk C, Li Y, Thomas E, Marisa L, Robé A, Roux M, Abecassis J, De Reyniès A, Wasylyk B.** ANO1 amplification and expression in HNSCC with a high propensity for future distant metastasis and its functions in HNSCC cell lines. *Br J Cancer* 103: 715–726, 2010. doi: 10.1038/sj.bjc.6605823.
9. **Bader CR, Bertrand D, Schlichter R.** Calcium-activated chloride current in cultured sensory and parasympathetic quail neurones. *J Physiol* 394: 125–148, 1987. doi: 10.1113/jphysiol.1987.sp016863.
10. **Barnes S, Deschenes MC.** Contribution of Ca and Ca-activated Cl channels to regenerative depolarization and membrane bistability of cone photoreceptors. *J Neurophysiol* 68: 745–755, 1992. doi: 10.1152/jn.1992.68.3.745.
11. **Barnes S, Hille B.** Ionic channels of the inner segment of tiger salamander cone photoreceptors. *J Gen Physiol* 94: 719–743, 1989. doi: 10.1085/jgp.94.4.719.
12. **Barro-Soria R, Aldehni F, Almaça J, Witzgall R, Schreiber R, Kunzelmann K.** ER-localized bestrophin 1 activates Ca²⁺-dependent ion channels TMEM16A and SK4 possibly by acting as a counterion channel. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 459: 485–497, 2010. doi: 10.1007/s00424-009-0745-0.
13. **Bean BP.** The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 8:

- 451–465, 2007. doi: 10.1038/nrn2148.
14. **Bers DM.** Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415: 198–205, 2002. doi: 10.1038/415198a.
 15. **Brandt S, Jentsch TJ.** CIC-6 and CIC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Lett* 377: 15–20, 1995. doi: 10.1016/0014-5793(95)01298-2.
 16. **Britschgi A, Bill A, Brinkhaus H, Rothwell C, Clay I, Duss S, Rebhan M, Raman P, Guy CT, Wetzel K, George E, Popa MO, Lilley S, Choudhury H, Gosling M, Wang L, Fitzgerald S, Borawski J, Baffoe J, Labow M, Gaither LA, Bentires-Alj M.** Calcium-activated chloride channel ANO1 promotes breast cancer progression by activating EGFR and CAMK signaling. .
 17. **Brunner JD, Lim NK, Schenck S, Duerst A, Dutzler R.** X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. *Nature* 516: 207–212, 2014. doi: 10.1038/nature13984.
 18. **Burgos CF, Yévenes GE, Aguayo LG.** Structure and pharmacologic modulation of inhibitory glycine receptors. *Mol. Pharmacol.* 90 American Society for Pharmacology and Experimental Therapy: 318–325, 2016.
 19. **Cao Q, Liu F, Ji K, Liu N, He Y, Zhang W, Wang L.** MicroRNA-381 inhibits the metastasis of gastric cancer by targeting TMEM16A expression. *J Exp Clin Cancer Res* 36: 29, 2017. doi: 10.1186/s13046-017-0499-z.
 20. **Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galletta LJV.** TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science (80-)* 322: 590–594, 2008. doi: 10.1126/science.1163518.
 21. **Carneiro A, Isinger A, Karlsson A, Johansson J, Jönsson G, Bendahl PO, Falkenback D, Halvarsson B, Nilbert M.** Prognostic impact of array-based genomic profiles in esophageal squamous cell cancer. *BMC Cancer* 8: 98, 2008. doi: 10.1186/1471-2407-8-98.
 22. **Catalán MA, Kondo Y, Peñ A-Munzenmayer G, Jaramillo Y, Liu F, Choi S, Crandall E, Borok Z, Flodby P, Shull GE, Melvin JE.** A fluid secretion pathway unmasked by acinar-specific tmem16a gene ablation in the adult mouse salivary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 2263–2268, 2015. doi: 10.1073/pnas.1415739112.
 23. **Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D.** The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816–824, 1997. doi: 10.1038/39807.
 24. **Chiang KJ, Tsai JC, Liu D, Lin CH, Chiu HL, Chou KR.** Efficacy of cognitive-behavioral therapy in patients with bipolar disorder: A metaanalysis of randomized controlled trials. *PLoS One* 12, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0176849.
 25. **Cho C, Lee S, Kim A, Yarishkin O, Ryoo K, Lee Y, Jung H, Yang E, Lee DY, Lee B, Kim H, Oh U, Im H, Hwang EM, Park J.** TMEM16A expression in cholinergic neurons of the medial habenula mediates anxiety-related behaviors. .
 26. **Cho H, Oh U.** Anoctamin 1 Mediates Thermal Pain as a Heat Sensor. *Curr*

- Neuropharmacol* 11: 641–651, 2013. doi: 10.2174/1570159x113119990038.
27. **Cho H, Yang YD, Lee J, Lee B, Kim T, Jang Y, Back SK, Na HS, Harfe BD, Wang F, Raouf R, Wood JN, Oh U.** The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat Neurosci* 15: 1015–1021, 2012. doi: 10.1038/nn.3111.
 28. **Chun H, Cho H, Choi J, Lee J, Kim SM, Kim H, Oh U.** Protons inhibit anoctamin 1 by competing with calcium. *Cell Calcium* 58: 431–441, 2015. doi: 10.1016/j.ceca.2015.06.011.
 29. **Chung MK, Lee H, Caterina MJ.** Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *J Biol Chem* 278: 32037–32046, 2003. doi: 10.1074/jbc.M303251200.
 30. **Contreras-Vite JA, Cruz-Rangel S, De Jesús-Pérez JJ, Figueroa IAA, Rodríguez-Menchaca AA, Pérez-Cornejo P, Hartzell HC, Arreola J.** Revealing the activation pathway for TMEM16A chloride channels from macroscopic currents and kinetic models. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 468: 1241–1257, 2016. doi: 10.1007/s00424-016-1830-9.
 31. **Cordero-Martínez J, Reyes-Miguel T, Rodríguez-Páez L, Garduño-Siciliano L, Maldonado-García D, Roa-Espitia AL, Hernández-González EO.** TMEM16A inhibition impedes capacitation and acquisition of hyperactivated motility in guinea pig sperm. *J Cell Biochem* 119: 5944–5959, 2018. doi: 10.1002/jcb.26789.
 32. **Crottès D, Jan LY.** The multifaceted role of TMEM16A in cancer. *Cell Calcium*: 2019.
 33. **Crutzen R, Virreira M, Markadieu N, Shlyonsky V, Sener A, Malaisse WJ, Beauwens R, Boom A, Golstein PE.** Anoctamin 1 (Ano1) is required for glucose-induced membrane potential oscillations and insulin secretion by murine β -cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 468: 573–91, 2016. doi: 10.1007/s00424-015-1758-5.
 34. **Cruz-Rangel S, De Jesús-Pérez JJ, Contreras-Vite JA, Pérez-Cornejo P, Hartzell HCC, Arreola J.** Gating modes of calcium-activated chloride channels TMEM16A and TMEM16B. *J Physiol* 593: 5283–5298, 2015. doi: 10.1113/JP271256.
 35. **Cunningham SA, Awayda MS, Bubien JK, Ismailov II, Arrate MP, Berdiev BK, Benos DJ, Fuller CM.** Cloning of an epithelial chloride channel from bovine trachea. *J Biol Chem* 270: 31016–31026, 1995. doi: 10.1074/jbc.270.52.31016.
 36. **Dang S, Feng S, Tien J, Peters CJ, Bulkley D, Lolicato M, Zhao J, Zuberbühler K, Ye W, Qi L, Chen T, Craik CS, Jan YN, Minor DL, Cheng Y, Jan LY.** Cryo-EM structures of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Nature* 552: 426–429, 2017. doi: 10.1038/nature25024.
 37. **Davis AJ, Forrest AS, Jepps TA, Valencik ML, Wiwchar M, Singer CA, Sones WR, Greenwood IA, Leblanc N.** Expression profile and protein translation of TMEM16A in murine smooth muscle. *Am J Physiol - Cell Physiol* 299, 2010. doi: 10.1152/ajpcell.00018.2010.
 38. **Davis AJ, Shi J, Pritchard HAT, Chadha PS, Leblanc N, Vasilikostas G, Yao Z, Verkman AS, Albert AP, Greenwood IA.** Potent vasorelaxant activity of the

- TMEM16A inhibitor T16A(inh) -A01. *Br J Pharmacol* 168: 773–84, 2013. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02199.x.
39. **Dawson DC, Smith SS, Mansoura MK.** CFTR: Mechanism of anion conduction. *Physiol. Rev.* 79 American Physiological Society: 1999.
 40. **Dayal A, Ng SFJ, Grabner M.** Ca²⁺-activated Cl⁻ channel TMEM16A/ANO1 identified in zebrafish skeletal muscle is crucial for action potential acceleration. *Nat Commun* 10, 2019. doi: 10.1038/s41467-018-07918-z.
 41. **De Jesús-Pérez JJ, Castro-Chong A, Shieh RC, Hernández-Carballo CY, De Santiago-Castillo JA, Arreola J.** Gating the glutamate gate of CLC-2 chloride channel by pore occupancy. *J Gen Physiol* 147: 25–37, 2016. doi: 10.1085/jgp.201511424.
 42. **De Jesús-Pérez JJ, Cruz-Rangel S, Espino-Saldaña ÁE, Martínez-Torres A, Qu Z, Hartzell HC, Corral-Fernandez NE, Pérez-Cornejo P, Arreola J.** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, cholesterol, and fatty acids modulate the calcium-activated chloride channel TMEM16A (ANO1). *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1863: 299–312, 2018. doi: 10.1016/j.bbalip.2017.12.009.
 43. **De La Fuente R, Namkung W, Mills A, Verkman AS.** Small-molecule screen identifies inhibitors of a human intestinal calcium-activated chloride channel. *Mol Pharmacol* 73: 758–768, 2008. doi: 10.1124/mol.107.043208.
 44. **Dixit R, Kemp C, Kulich S, Seethala R, Chiosea S, Ling S, Ha PK, Duvvuri U.** TMEM16A/ANO1 is differentially expressed in HPV-negative versus HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma through promoter methylation. *Sci Rep* 5: 1–10, 2015. doi: 10.1038/srep16657.
 45. **Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R.** X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415: 287–294, 2002. doi: 10.1038/415287a.
 46. **Dutzler R, Campbell EB, MacKinnon R.** Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science (80-)* 300: 108–112, 2003. doi: 10.1126/science.1082708.
 47. **Duvvuri U, Shiwarski DJ, Xiao D, Bertrand C, Huang X, Edinger RS, Rock JR, Harfe BD, Henson BJ, Kunzelmann K, Schreiber R, Seethala RS, Egloff AM, Chen X, Lui VW, Grandis JR, Gollin SM.** TMEM16A induces MAPK and contributes directly to tumorigenesis and cancer progression. *Cancer Res* 72: 3270–3281, 2012. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0475-T.
 48. **Estévez R, Jentsch T.** CLC chloride channels: correlating structure with function. *Curr Opin Struct Biol* 12: 531–539, 2002. doi: 10.1016/S0959-440X(02)00358-5.
 49. **Ferrera L, Caputo A, Ubbi I, Bussani E, Zegarra-Moran O, Ravazzolo R, Pagani F, Galiotta LJV.** Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing. *J Biol Chem* 284: 33360–33368, 2009. doi: 10.1074/jbc.M109.046607.
 50. **Forrest AS, Joyce TC, Huebner ML, Ayon RJ, Wiwchar M, Joyce J, Freitas N, Davis AJ, Ye L, Duan DD, Singer CA, Valencik ML, Greenwood IA, Leblanc N.** Increased TMEM16A-encoded calcium-activated chloride channel activity is associated with pulmonary hypertension. *Am J Physiol Physiol* 303: C1229–C1243, 2012. doi: 10.1152/ajpcell.00044.2012.

51. **Furukawa T, Ogura T, Katayama Y, Hiraoka M.** Characteristics of rabbit ClC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. *Am J Physiol - Cell Physiol* 274, 1998. doi: 10.1152/ajpcell.1998.274.2.c500.
52. **Gadsby DC, Nairn AC.** Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol. Rev.* 79 American Physiological Society: 1999.
53. **Garcia MAS, Yang N, Quinton PM.** Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion. *J Clin Invest* 119: 2613–2622, 2009. doi: 10.1172/JCI38662.
54. **Gibson A, Lewis AP, Affleck K, Aitken AJ, Meldrum E, Thompson N.** HCLCA1 and mCLCA3 are secreted non-integral membrane proteins and therefore are not ion channels. *J Biol Chem* 280: 27205–27212, 2005. doi: 10.1074/jbc.M504654200.
55. **Gomez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Bardsley MR, Lorincz A, Pozo MJ, Pasricha PJ, Van De Rijn M, West RB, Sarr MG, Kendrick ML, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Ordog T, Farrugia G.** Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 296, 2009. doi: 10.1152/ajpgi.00074.2009.
56. **Govindpani K, Guzmán BCF, Vinnakota C, Waldvogel HJ, Faull RL, Kwakowsky A.** Towards a better understanding of GABAergic remodeling in alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 18 MDPI AG: 2017.
57. **Guan L, Song Y, Gao J, Gao J, Wang KW.** Inhibition of calcium-activated chloride channel ANO1 suppresses proliferation and induces apoptosis of epithelium originated cancer cells. *Oncotarget* 7: 78619–78630, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.12524.
58. **Guo S, Chen Y, Pang C, Wang X, Qi J, Mo L, Zhang H, An H, Zhan Y.** Ginsenoside Rb1, a novel activator of the TMEM16A chloride channel, augments the contraction of guinea pig ileum. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 469: 681–692, 2017. doi: 10.1007/s00424-017-1934-x.
59. **Gyobu S, Miyata H, Ikawa M, Yamazaki D, Takeshima H, Suzuki J, Nagata S.** A Role of TMEM16E Carrying a Scrambling Domain in Sperm Motility. *Mol Cell Biol* 36: 645–659, 2016. doi: 10.1128/mcb.00919-15.
60. **Hartzell C, Putzier I, Arreola J.** CALCIUM-ACTIVATED CHLORIDE CHANNELS. *Annu Rev Physiol* 67: 719–758, 2005. doi: 10.1146/annurev.physiol.67.032003.154341.
61. **He Y, Li H, Chen Y, Li P, Gao L, Zheng Y, Sun Y, Chen J, Qian X.** Expression of anoctamin 1 is associated with advanced tumor stage in patients with non-small cell lung cancer and predicts recurrence after surgery. *Clin Transl Oncol* 19: 1091–1098, 2017. doi: 10.1007/s12094-017-1643-0.
62. **Heinze C, Seniuk A, Sokolov M V., Huebner AK, Klementowicz AE, Sziártó IA, Schleifenbaum J, Vitzthum H, Gollasch M, Ehmke H, Schroeder BC, Hübner CA.** Disruption of vascular Ca²⁺-activated chloride currents lowers blood pressure. *J Clin Invest* 124: 675–686, 2014. doi: 10.1172/JCI70025.
63. **Hermans L, Leunissen I, Pauwels L, Cuypers K, Peeters R, Puts NAJ, Edden RAE, Swinnen SP.** Brain GABA levels are associated with inhibitory control deficits

in older adults. *J Neurosci* 38: 7844–7851, 2018. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0760-18.2018.

64. **Hermida-Prado F, Menéndez S, Albornoz-Afanasyev P, Granda-Diaz R, Álvarez-Teijeiro S, Villaronga M, Allonca E, Alonso-Durán L, León X, Alemany L, Mena M, del-Rio-Ibisate N, Astudillo A, Rodríguez R, Rodrigo J, García-Pedrero J.** Distinctive Expression and Amplification of Genes at 11q13 in Relation to HPV Status with Impact on Survival in Head and Neck Cancer Patients. *J Clin Med* 7: 501, 2018. doi: 10.3390/jcm7120501.
65. **Hernández-Carballo CY, De Santiago-Castillo JA, Rosales-Saavedra T, Pérez-Cornejo P, Arreola J.** Control of volume-sensitive chloride channel inactivation by the coupled action of intracellular chloride and extracellular protons. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 460: 633–644, 2010. doi: 10.1007/s00424-010-0842-0.
66. **Hernandez CC, Macdonald RL.** A Structural look at GABA A receptor mutations linked to epilepsy syndromes. *Brain Res.* 1714 Elsevier B.V.: 234–247, 2019.
67. **Hille B.** *Ion Channels of Excitable Membranes*. third edit. Sinauer Associates Is an Imprint of Oxford University Press, 2001.
68. **Hille B, Dickson EJ, Kruse M, Vivas O, Suh BC.** Phosphoinositides regulate ion channels. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851 Elsevier B.V.: 844–856, 2015.
69. **Hong GS, Lee SH, Lee B, Choi JH, Oh SJ, Jang Y, Hwang EM, Kim H, Jung J, Kim IB, Oh U.** ANO1/TMEM16A regulates process maturation in radial glial cells in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 12494–12499, 2019. doi: 10.1073/pnas.1901067116.
70. **Huang F, Rock JR, Harfe BD, Cheng T, Huang X, Jan YN, Jan LY.** Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21413–21418, 2009. doi: 10.1073/pnas.0911935106.
71. **Huang F, Zhang H, Wu M, Yang H, Kudo M, Peters CJ, Woodruff PG, Solberg OD, Donne ML, Huang X, Sheppard D, Fahy J V., Wolters PJ, Hogan BLM, Finkbeiner WE, Li M, Jan Y-NY-N, Jan LY, Rock JR.** Calcium-activated chloride channel TMEM16A modulates mucin secretion and airway smooth muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci* 109: 16354–16359, 2012. doi: 10.1073/pnas.1214596109.
72. **Huang P, Liu J, Di A, Robinson NC, Musch MW, Kaetzel MA, Nelson DJ.** Regulation of Human CLC-3 Channels by Multifunctional Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* 276: 20093–20100, 2001. doi: 10.1074/jbc.M009376200.
73. **Hübner CA, Schroeder BC, Ehmke H.** Regulation of vascular tone and arterial blood pressure: role of chloride transport in vascular smooth muscle. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 467 Springer Verlag: 605–614, 2015.
74. **Hwang SJ, Blair PJ a, Britton FC, O’Driscoll KE, Hennig G, Bayguinov YR, Rock JR, Harfe BD, Sanders KM, Ward SM.** Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles. *J Physiol* 587: 4887–904, 2009. doi: 10.1113/jphysiol.2009.176198.

75. **Hyzinski-García MC, Rudkouskaya A, Mongin AA.** LRRC8A protein is indispensable for swelling-activated and ATP-induced release of excitatory amino acids in rat astrocytes. *J Physiol* 592: 4855–4862, 2014. doi: 10.1113/jphysiol.2014.278887.
76. **Jaffe LA, Cross NL.** Electrical Properties of Vertebrate Oocyte Membranes. *Biol Reprod* 30: 50–54, 1984. doi: 10.1095/biolreprod30.1.50.
77. **Jeng G, Aggarwal M, Yu WP, Chen TY.** Independent activation of distinct pores in dimeric TMEM16A channels. *J Gen Physiol* 148: 393–404, 2016. doi: 10.1085/jgp.201611651.
78. **Jentsch TJ.** VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17 Nature Publishing Group: 293–307, 2016.
79. **Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G.** Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* 348: 510–514, 1990. doi: 10.1038/348510a0.
80. **Ji Q, Guo S, Wang X, Pang C, Zhan Y, Chen Y, An H.** Recent advances in TMEM16A: Structure, function, and disease. *J. Cell. Physiol.* 234 Wiley-Liss Inc.: 7856–7873, 2019.
81. **Jia L, Liu W, Guan L, Lu M, Wang K.** Inhibition of Calcium-Activated Chloride Channel ANO1/TMEM16A Suppresses Tumor Growth and Invasion in Human Lung Cancer. *PLoS One* 10: e0136584, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0136584.
82. **Jiang Y, Yu B, Yang H, Ma T.** Shikonin inhibits intestinal calcium-activated chloride channels and prevents rotaviral diarrhea. *Front Pharmacol* 7, 2016. doi: 10.3389/fphar.2016.00270.
83. **Jin X, Shah S, Liu Y, Zhang H, Lees M, Fu Z, Lippiat JD, Beech DJ, Sivaprasadarao A, Baldwin SA, Zhang H, Gamper N.** Activation of the Cl-Channel ANO1 by localized calcium signals in nociceptive sensory neurons requires coupling with the IP3 receptor. *Sci Signal* 6, 2013. doi: 10.1126/scisignal.2004184.
84. **Jin Y, Blikslager AT.** CIC-2 regulation of intestinal barrier function: Translation of basic science to therapeutic target. *Tissue Barriers* 3: 1–11, 2015. doi: 10.1080/21688370.2015.1105906.
85. **Kawasaki M, Suzuki M, Uchida S, Sasaki S, Marumo F.** *Stable and Functional Expression of the CIC-3 Chloride Channel in Somatic Cell Lines.* 1995.
86. **Kidd JF, Thorn P.** Intracellular Ca²⁺ and Cl⁻ Channel Activation in Secretory Cells. *Annu Rev Physiol* 62: 493–513, 2000. doi: 10.1146/annurev.physiol.62.1.493.
87. **Kieferle S, Fong P, Bens M, Vandewalle A, Jentsch TJ.** Two highly homologous members of the CIC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6943–6947, 1994. doi: 10.1073/pnas.91.15.6943.
88. **Kim S, Ma L, Yu CR.** Requirement of calcium-activated chloride channels in the activation of mouse vomeronasal neurons. *Nat Commun* 2, 2011. doi: 10.1038/ncomms1368.

89. **Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA.** Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci* 10: 1583–1591, 1990. doi: 10.1523/jneurosci.10-05-01583.1990.
90. **Kunzelmann K, Ousingsawat J, Benedetto R, Cabrita I, Schreiber R.** Contribution of Anoctamins to Cell Survival and Cell Death. *Cancers (Basel)* 11: 382, 2019. doi: 10.3390/cancers11030382.
91. **Lam AKM, Dutzler R.** Calcium-dependent electrostatic control of anion access to the pore of the calcium-activated chloride channel TMEM16A. *Elife* 7, 2018. doi: 10.7554/eLife.39122.
92. **Le SC, Jia Z, Chen J, Yang H.** Molecular basis of PIP2-dependent regulation of the Ca²⁺-activated chloride channel TMEM16A. *Nat Commun* 10, 2019. doi: 10.1038/s41467-019-11784-8.
93. **Leblanc N, Ledoux J, Saleh S, Sanguinetti A, Angermann J, O'Driscoll K, Britton F, Perrino BA, Greenwood IA.** Regulation of calcium-activated chloride channels in smooth muscle cells: A complex picture is emerging. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 83 Can J Physiol Pharmacol: 541–556, 2005.
94. **Lee B, Cho H, Jung J, Yang YD, Yang DJ, Oh U.** Anoctamin 1 contributes to inflammatory and nerve-injury induced hypersensitivity. *Mol Pain* 10, 2014. doi: 10.1186/1744-8069-10-5.
95. **Liu B, Linley JE, Du X, Zhang X, Ooi L, Zhang H, Gamper N.** The acute nociceptive signals induced by bradykinin in rat sensory neurons are mediated by inhibition of M-type K⁺ channels and activation of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Clin Invest* 120: 1240–1252, 2010. doi: 10.1172/JCI41084.
96. **Liu J, Liu Y, Ren Y, Kang L, Zhang L.** Transmembrane protein with unknown function 16A overexpression promotes glioma formation through the nuclear factor- κ B signaling pathway. *Mol Med Rep* 9: 1068–1074, 2014. doi: 10.3892/mmr.2014.1888.
97. **Mall M, Bleich M, Kuehr J, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K.** CFTR-mediated inhibition of epithelial Na⁺ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 277, 1999. doi: 10.1152/ajpgi.1999.277.3.g709.
98. **Malysz J, Gibbons SJ, Saravanaperumal SA, Du P, Eisenman ST, Cao C, Oh U, Saur D, Klein S, Ordog T, Farrugia G.** Conditional genetic deletion of Ano1 in interstitial cells of cajal impairs Ca²⁺ transients and slow waves in adult mouse small intestine. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 312: G228–G245, 2017. doi: 10.1152/ajpgi.00363.2016.
99. **Mason SJ, Paradiso AM, Boucher RC.** Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Br J Pharmacol* 103: 1649–1656, 1991. doi: 10.1111/j.1476-5381.1991.tb09842.x.
100. **Miledi R.** A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc London - Biol Sci* 215: 491–497, 1982. doi: 10.1098/rspb.1982.0056.
101. **Moghaddam HS, Zare-Shahabadi A, Rahmani F, Rezaei N.** Neurotransmission

- systems in Parkinson's disease. *Rev Neurosci* 28: 509–536, 2017. doi: 10.1515/revneuro-2016-0068.
102. **Mroz MS, Keely SJ.** Epidermal growth factor chronically upregulates Ca²⁺-dependent Cl⁻ conductance and TMEM16A expression in intestinal epithelial cells. *J Physiol* 590: 1907–1920, 2012. doi: 10.1113/jphysiol.2011.226126.
 103. **Namkung W, Thiagarajah JR, Phuan PW, Verkman AS.** Inhibition of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels by gallotannins as a possible molecular basis for health benefits of red wine and green tea. *FASEB J* 24: 4178–4186, 2010. doi: 10.1096/fj.10-160648.
 104. **Namkung W, Yao Z, Finkbeiner WE, Verkman AS.** Small-molecule activators of TMEM16A, a calcium-activated chloride channel, stimulate epithelial chloride secretion and intestinal contraction. *FASEB J* 25: 4048–4062, 2011. doi: 10.1096/fj.11-191627.
 105. **Ni YL, Kuan AS, Chen TY.** Activation and inhibition of TMEM16A calcium-activated chloride channels. *PLoS One* 9: 4–6, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0086734.
 106. **Oh SJ, Hwang SJ, Jung J, Yu K, Kim J, Choi JY, Hartzell HC, Roh EJ, Justin Lee C.** Monna, a potent and selective blocker for transmembrane protein with unknown function 16/anoctamin-1. *Mol Pharmacol* 84: 726–735, 2013. doi: 10.1124/mol.113.087502.
 107. **Okada Y, Sato K, Numata T.** Pathophysiology and puzzles of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel. In: *Journal of Physiology*. *J Physiol*, 2009, p. 2141–2149.
 108. **Orta G, Ferreira G, José O, Treviño CL, Beltrán C, Darszon A.** Human spermatozoa possess a calcium-dependent chloride channel that may participate in the acrosomal reaction. *J Physiol* 590: 2659–2675, 2012. doi: 10.1113/jphysiol.2011.224485.
 109. **Park YR, Lee ST, Kim SL, Zhu SM, Lee MR, Kim SH, Kim IH, Lee SO, Seo SY, Kim SW.** Down-regulation of miR-9 promotes epithelial mesenchymal transition via regulating anoctamin-1 (ANO1) in CRC cells. *Cancer Genet* 231–232: 22–31, 2019. doi: 10.1016/j.cancergen.2018.12.004.
 110. **Parker I, Miledi R.** Changes in intracellular calcium and in membrane currents evoked by injection of inositol trisphosphate into *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc London - Biol Sci* 228: 307–315, 1986. doi: 10.1098/rspb.1986.0057.
 111. **Pasantes-Morales H, Murray RA, Sanchez-Olea R, Moran J.** Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. II. Permeability pathway to amino acids and polyols. *Am J Physiol - Cell Physiol* 266, 1994. doi: 10.1152/ajpcell.1994.266.1.c172.
 112. **Pattle SB, Utjesanovic N, Togo A, Wells L, Conn B, Monaghan H, Junor E, Johannessen I, Cuschieri K, Talbot S.** Copy number gain of 11q13.3 genes associates with pathological stage in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Genes, Chromosom Cancer* 56: 185–198, 2017. doi: 10.1002/gcc.22425.
 113. **Paulino C, Kalienkova V, Lam AKM, Neldner Y, Dutzler R.** Activation mechanism of the calcium-activated chloride channel TMEM16A revealed by cryo-EM. *Nature*

552: 421–425, 2017. doi: 10.1038/nature24652.

114. **Paulino C, Neldner Y, Lam AKM, Kalienkova V, Brunner JD, Schenck S, Dutzler R.** Structural basis for anion conduction in the calcium-activated chloride channel TMEM16A. *Elife* 6: 1–23, 2017. doi: 10.7554/eLife.26232.
115. **Pedemonte N, Galletta LJ V.** Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). *Physiol Rev* 94: 419–59, 2014. doi: 10.1152/physrev.00039.2011.
116. **Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A.** A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108: 705–715, 2002. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00652-9.
117. **Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A.** A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science (80-)* 296: 2046–2049, 2002. doi: 10.1126/science.1073140.
118. **Perez-Cornejo P, De Santiago JA, Arreola J.** Permeant anions control gating of calcium-dependent chloride channels. *J Membr Biol* 198: 125–133, 2004. doi: 10.1007/s00232-004-0659-x.
119. **Peters CJ, Gilchrist JM, Tien J, Bethel NP, Qi L, Chen T, Wang L, Jan YN, Grabe M, Jan LY.** The Sixth Transmembrane Segment Is a Major Gating Component of the TMEM16A Calcium-Activated Chloride Channel. *Neuron* 97: 1063-1077.e4, 2018. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.048.
120. **Picollo A, Pusch M.** Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CIC-4 and CIC-5. *Nature* 436: 420–423, 2005. doi: 10.1038/nature03720.
121. **Pusch M, Steinmeyer K, Jentsch TJ.** Low single channel conductance of the major skeletal muscle chloride channel, CIC-1. *Biophys J* 66: 149–152, 1994. doi: 10.1016/S0006-3495(94)80753-2.
122. **Qiu Z, Dubin AE, Mathur J, Tu B, Reddy K, Miraglia LJ, Reinhardt J, Orth AP, Patapoutian A.** SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell* 157: 447–458, 2014. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.024.
123. **Qu Z, Wang B, Zhang Z, Ma L, Li D, Zhuang L, Chi J, Liu J.** Functions of ANO1/TMEM16A, Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in Regulation of Blood Pressure and Vascular Remodeling [Online]. *J Cardiol Ther* 3: 543–548, 2016. <http://www.ghrnet.org/index.php/jct/article/view/1809/2080> [24 Jun. 2020].
124. **Rinke I, Artmann J, Stein V.** CIC-2 voltage-gated channels constitute part of the background conductance and assist chloride extrusion. *J Neurosci* 30: 4776–4786, 2010. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6299-09.2010.
125. **Robinson NC, Huang P, Kaetzel MA, Lamb FS, Nelson DJ.** Identification of an N-terminal amino acid of the CLC-3 chloride channel critical in phosphorylation-dependent activation of a CaMKII-activated chloride current. *J Physiol* 556: 353–368, 2004. doi: 10.1113/jphysiol.2003.058032.
126. **Rodrigo JP, Menéndez ST, Hermida-Prado F, Álvarez-Teijeiro S, Villaronga MÁ, Alonso-Durán L, Vallina A, Martínez-Cambor P, Astudillo A, Suárez C,**

- Mariá Garcíá-Pedrero J.** Clinical significance of Anoctamin-1 gene at 11q13 in the development and progression of head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Rep* 5: 1–9, 2015. doi: 10.1038/srep15698.
127. **Romanenko VG, Catalán MA, Brown DA, Putzier I, Hartzell HC, Marmorstein AD, Gonzalez-Begne M, Rock JR, Harfe BD, Melvin JE.** Tmem16A encodes the Ca²⁺-activated Cl⁻ channel in mouse submandibular salivary gland acinar cells. *J Biol Chem* 285: 12990–13001, 2010. doi: 10.1074/jbc.M109.068544.
 128. **Ruiz C, Martins JR, Rudin F, Schneider S, Dietsche T, Fischer CA, Tornillo L, Terracciano LM, Schreiber R, Bubendorf L, Kunzelmann K.** Enhanced Expression of ANO1 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Causes Cell Migration and Correlates with Poor Prognosis. *PLoS One* 7: e43265, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0043265.
 129. **Sánchez-Solano A, Corral N, Segura-Covarrubias G, Guzmán-Hernández ML, Arechiga-Figueroa I, Cruz-Rangel S, Pérez-Cornejo P, Arreola J.** Regulation of the Ca²⁺-activated chloride channel Anoctamin-1 (TMEM16A) by Ca²⁺-induced interaction with FKBP12 and calcineurin. *Cell Calcium* 89: 102211, 2020. doi: 10.1016/j.ceca.2020.102211.
 130. **Schewe J, Seidel E, Forslund S, Marko L, Peters J, Muller DN, Fahlke C, Stölting G, Scholl U.** Elevated aldosterone and blood pressure in a mouse model of familial hyperaldosteronism with CIC-2 mutation. *Nat Commun* 10: 5155, 2019. doi: 10.1038/s41467-019-13033-4.
 131. **Schroeder BCBC, Cheng T, Jan YN, Jan LY.** Expression Cloning of TMEM16A as a Calcium-Activated Chloride Channel Subunit. *Cell* 134: 1019–1029, 2008. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.003.
 132. **Scott RH, McGuirk SM, Dolphin AC.** Modulation of divalent cation-activated chloride ion currents. *Br J Pharmacol* 94: 653–662, 1988. doi: 10.1111/j.1476-5381.1988.tb11572.x.
 133. **Seo Y, Park J, Kim M, Lee HK, Kim JH, Jeong JH, Namkung W.** Inhibition of ANO1/TMEM16A chloride channel by idebenone and its cytotoxicity to cancer cell lines. *PLoS One* 10, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0133656.
 134. **Shah S, Carver CM, Mullen P, Milne S, Lukacs V, Shapiro MS, Gamper N.** Local Ca²⁺ signals couple activation of TRPV1 and ANO1 sensory ion channels. *Sci Signal* 13, 2020. doi: 10.1126/scisignal.aaw7963.
 135. **Sheppard DN, Welsh MJ.** Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* 79 American Physiological Society: 1999.
 136. **Shi ZZ, Shang L, Jiang YY, Hao JJ, Zhang Y, Zhang TT, Lin DC, Liu SG, Wang BS, Gong T, Zhan QM, Wang MR.** Consistent and differential genetic aberrations between esophageal dysplasia and squamous cell carcinoma detected by array comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res* 19: 5867–5878, 2013. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3753.
 137. **Shiwerski DJ, Shao C, Bill A, Kim J, Xiao D, Bertrand CA, Seethala RS, Sano D, Myers JN, Ha P, Grandis J, Gaither LA, Puthenveedu MA, Duvvuri U.** To “grow” or “go”: TMEM16A expression as a switch between tumor growth and metastasis in SCCHN. *Clin Cancer Res* 20: 4673–4688, 2014. doi: 10.1158/1078-

0432.CCR-14-0363.

138. **Sík A, Smith RL, Freund TF.** Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neuroscience* 101: 51–65, 2000. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00360-2.
139. **Song Y, Gao J, Guan L, Chen X, Gao J, Wang K.** Inhibition of ANO1/TMEM16A induces apoptosis in human prostate carcinoma cells by activating TNF- α signaling. *Cell Death Dis* 9: 1–14, 2018. doi: 10.1038/s41419-018-0735-2.
140. **Stagg CJ, Bachtiar V, Johansen-Berg H.** The role of GABA in human motor learning. *Curr Biol* 21: 480–484, 2011. doi: 10.1016/j.cub.2011.01.069.
141. **Strege PR, Gibbons SJ, Mazzone A, Bernard CE, Beyder A, Farrugia G.** EAVK segment “c” sequence confers Ca²⁺-dependent changes to the kinetics of full-length human Ano1. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 312: G572–G579, 2017. doi: 10.1152/ajpgi.00429.2016.
142. **Sugahara K, Michikawa Y, Ishikawa K, Shoji Y, Iwakawa M, Shibahara T, Imai T.** Combination effects of distinct cores in 11q13 amplification region on cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 39: 761–769, 2011. doi: 10.3892/ijo.2011.1094.
143. **Sui Y, Sun M, Wu F, Yang L, Di W, Zhang G, Zhong L, Ma Z, Zheng J, Fang X, Ma T.** Inhibition of TMEM16A Expression Suppresses Growth and Invasion in Human Colorectal Cancer Cells. *PLoS One* 9: e115443, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0115443.
144. **Suzuki J, Fujii T, Imao T, Ishihara K, Kuba H, Nagata S.** Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM 16 protein family members. *J Biol Chem* 288: 13305–13316, 2013. doi: 10.1074/jbc.M113.457937.
145. **Ta CM, Acheson KE, Rorsman NJG, Jongkind RC, Tammaro P.** Contrasting effects of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on cloned TMEM16A and TMEM16B channels. *Br J Pharmacol* 174: 2984–2999, 2017. doi: 10.1111/bph.13913.
146. **Tak MH, Jang Y, Son WS, Yang YD, Oh U.** EF-hand like region in the N-terminus of anoctamin 1 modulates channel activity by Ca²⁺ and voltage. *Exp Neurol* 28: 658–669, 2019. doi: 10.5607/en.2019.28.6.658.
147. **Takayama Y, Tominaga M.** Involvement of TRPV1-ANO1 interactions in pain-enhancing mechanisms. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, 2018, p. 29–36.
148. **Tembo M, Wozniak KL, Bainbridge RE, Carlson AE.** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) and Ca²⁺ are both required to open the Cl channel TMEM16A. *J Biol Chem* 294: 12556–12564, 2019. doi: 10.1074/jbc.RA118.007128.
149. **Thomas-Gatewood C, Neeb ZP, Bulley S, Adebisi A, Bannister JP, Leo MD, Jaggari JH.** TMEM16A channels generate Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H1819-27, 2011. doi: 10.1152/ajpheart.00404.2011.
150. **Tian Y, Schreiber R, Kunzelmann K.** Anoctamins are a family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Cell Sci* 125: 4991–4998, 2012. doi: 10.1242/jcs.109553.

151. **Tien J, Peters CJ, Wong XM, Cheng T, Jan YN, Jan LY, Yang H. A** comprehensive search for calcium binding sites critical for TMEM16A calcium-activated chloride channel activity. *Elife* 3: 1–19, 2014. doi: 10.7554/eLife.02772.
152. **Tominaga M.** The Role of TRP Channels in Thermosensation. In: *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades.*, edited by Wolfgang B Liedtke and Stefan Heller. Taylor & Francis Group, LLC., p. 271–286.
153. **Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D.** The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531–543, 1998. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80564-4.
154. **Wang H, Yao F, Luo S, Ma K, Liu M, Bai L, Chen S, Song C, Wang T, Du Q, Wu H, Wei M, Fang Y, Xiao Q.** A mutual activation loop between the Ca²⁺-activated chloride channel TMEM16A and EGFR/STAT3 signaling promotes breast cancer tumorigenesis. *Cancer Lett* 455: 48–59, 2019. doi: 10.1016/j.canlet.2019.04.027.
155. **West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, Zhu S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R, Goldblum JR, Brown PO, Heinrich MC, Van De Rijn M.** The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol* 165: 107–113, 2004. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63279-8.
156. **Wu H, Wang H, Guan S, Zhang J, Chen Q, Wang X, Ma K, Zhao P, Zhao H, Yao W, Jin F, Xiao Q, Wei M.** Cell-specific regulation of proliferation by Ano 1/TMEM16A in breast cancer with different ER, PR, and HER2 status. *Oncotarget* 8: 84996–85013, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.18662.
157. **Xiao Q, Cui Y.** Acidic amino acids in the first intracellular loop contribute to voltage- and calcium- dependent gating of Anoctamin1/TMEM16A. *PLoS One* 9, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0099376.
158. **Xiao Q, Yu K, Perez-Cornejo P, Cui Y, Arreola J, Hartzell HC.** Voltage- and calcium-dependent gating of TMEM16A/Ano1 chloride channels are physically coupled by the first intracellular loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 8891–8896, 2011. doi: 10.1073/pnas.1102147108.
159. **Xu F, Deng L, Yang J, Chen H, Ma B, Pan K, Su C, Zhang J.** Knockdown of TMEM16A suppressed MAPK and inhibited cell proliferation and migration in hepatocellular carcinoma. *Onco Targets Ther* 9: 325, 2016. doi: 10.2147/OTT.S95985.
160. **Xu Z, Lefevre GM, Gavrilova O, Foster St. Claire MB, Riddick G, Felsenfeld G.** Mapping of long-range INS promoter interactions reveals a role for calcium-activated chloride channel ANO1 in insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci* 111: 16760–16765, 2014. doi: 10.1073/pnas.1419240111.
161. **Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, Park SP, Lee J, Lee B, Kim BM, Raouf R, Shin YK, Oh U.** TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455: 1210–1215, 2008. doi: 10.1038/nature07313.
162. **Yao Z, Namkung W, Ko EA, Park J, Tradtrantip L, Verkman AS.** Fractionation of a herbal antidiarrheal medicine reveals Eugenol as an inhibitor of Ca²⁺-activated

- Cl⁻ channel TMEM16A. *PLoS One* 7, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0038030.
163. **Yu K, Duran C, Qu Z, Cui YY, Hartzell HC.** Explaining calcium-dependent gating of anoctamin-1 chloride channels requires a revised topology. *Circ Res* 110: 990–999, 2012. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.264440.
164. **Zeng W, Lee MG, Muallem S.** Membrane-specific regulation of Cl⁻ channels by purinergic receptors in rat submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol Chem* 272: 32956–32965, 1997. doi: 10.1074/jbc.272.52.32956.
165. **Zhang Q, Liu M, Ruan J.** Metabolomics analysis reveals the metabolic and functional roles of flavonoids in light-sensitive tea leaves. *BMC Plant Biol* 17: 64, 2017. doi: 10.1186/s12870-017-1012-8.
166. **Saitou N, Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425, 1987. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
167. **Tamura K, Nei M, Kumar S.** Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci* 101: 11030–11035, 2004. doi: 10.1073/pnas.0404206101.
168. **Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K.** MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35: 1547–1549, 2018. doi: 10.1093/molbev/msy096.
169. **Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH, Ferrin TE.** UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci* 27: 14–25, 2018. doi: 10.1002/pro.3235.

11 APÉNDICE A

Alineamiento de TMEM16A y TMEM16B

hANO1	1	-----MIVNEKYSTLPA-----EDRSVHILNICAIEDLGYLPSEGTLNLSLVD--PDACRY
hANO2	1	MAAPGPRDIPLLPSPRRLLSPOAGSRGCGGPHGQQCLKPSPRAPGLGGSNRDPGPGCGEST--RSSVNNYLDANEPPSSARL
mANO1	1	-----MIVPEKYSTLPA-----EDRSVHIVNICAIEDLGYLPSEGTLNLSLVD--PDACRY
mANO2	1	MAAPGPRDIPLLPSPRRLLSRTVARGSGGPHGQQYCLKPSPRAPGQRNNSLHPSQVSRRESS--RDRSVNNYLDANEPPSSARL
hANO1	52	G-LYFIDGRKRVYILVYHRRPSSGNRLVRRVQHSDFPSGRVVKQDHPPLPGKASLDAGSGEPPMDYHEDDRFRREEVEGNLEAGL
hANO2	88	SRMRFIDNRKVDYILAVHYRIRGVLHAGCPGHSLAVSNNGEAGKEREG---GGPGDIELG--PDATPEERREOREEPEENLEAGL
mANO1	52	G-LYFIDGRKRVYILVYHRRPSSGNRLVRRVQHSDFPSGRVVKQDHPPLPGKASLDAGSGEPPMDYHEDDRFRREEVEGNLEAGL
mANO2	88	SRMRFIDNRKVDYILAVHYRIRGVLHAGCPGHSLAVSNNGEAGKEREG---GGPGDVELG--PDATPEERREOREEPEENLEAGL
hANO1	141	ELEKDEEDTRKHGVGFVRIHAPWVLCREAEFLKIKPTKKMYEINETRGLKIKINSVLQKIDDPQPVREHRPOTMERLSYPPSREKQ
hANO2	172	ELEKDEENKSGQSIFVRIHAPWQVLAAREAEFLKIKPTKKEMYEIKAGGSAKRFSAALQKLSHHPQPVREHSNRMKNLSYPPSREKM
mANO1	141	ELEKDEEDTRKHGVGFVRIHAPWVLCREAEFLKIKPTKKMYEINETRGLKIKINSVLQKIDDPQPVREHRPOTMERLSYPPSREKQ
mANO2	172	ELEKDEENKSGQSIFVRIHAPWQVLAAREAEFLKIKPTKKMYEIKAGGSAKRFSAALQKLSHHPQPVREHSNRMKNLSYPPSREKM
hANO1	230	HLDDTDEDFDFFDTSKTRSTIVVEILKRTCTRAKYMGITSLANGVYEAAYPLHDGYNGENVENDRKLLYDEWARYGVFYKQPIIDL
hANO2	262	YLNNQEKDFFDNATRSRIVVEILKRTACSRANNMGINSLIANNIYEAAYPLHDGYDSEGDMMNDRKLLYDEWARYGVFYKQPIIDL
mANO1	230	HLDDTDEDFDFFDTSKTRSTIVVEILKRTCTRAKYMGITSLANGVYEAAYPLHDGYNGENVENDRKLLYDEWARYGVFYKQPIIDL
mANO2	261	YLNNQEKDFFDNATRSRIVVEILKRTACSRANNMGINSLIANNIYEAAYPLHDGYDSEGDMMNDRKLLYDEWARYGVFYKQPIIDL
hANO1	320	VRKYFGEKIGLYFAWLGYTQMLIPASIVGIVFLYGCATIDENIPSMEMCDQRHNITMCPCLCDKCSYKNSACATARASHLFDNPAT
hANO2	352	VRKYFGEKIGLYFAWLGLYTSFLIPSSVIGVIVFLYGCATIDEDIPSRMCDQONAFMCPCLCDKCDYWNSSACGTARASHLFDNPAT
mANO1	320	VRKYFGEKIGLYFAWLGYTQMLIPASIVGIVFLYGCATIDENIPSMEMCDQRYNITMCPCLCDKCSYKNSACATARASHLFDNPAT
mANO2	351	VRKYFGEKIGLYFAWLGLYTSFLIPSSVIGVIVFLYGCATIDEDIPSRMCDQONAFMCPCLCDKCDYWNSSACGTARASHLFDNPAT
hANO1	410	VFFSFMALWAATFMEHWKRRKQMLNRFWDLTGPEEEEEAVKHEBRAEYEAARVLEKSLKKESRNKEKRRHIPPESTNKNKORVKTAMAGV
hANO2	442	VFFSFMALWAATFMEHWKRLQMLNRFWDLTGPEEEEEAAQHSRPEYETVWREKMLKESNCSA-----VOKLETNTEC
mANO1	410	VFFSFMALWAATFMEHWKRRKQMLNRFWDLTGPEEEEEAVKHEBRAEYEAARVLEKSLKKESRN-----VOKLEANNTEC
mANO2	441	VFFSFMALWAATFMEHWKRLQMLNRFWDLTGPEEEEEAAQHSRPEYETVWREKMLKESNCSA-----VOKLEANNTEC
hANO1	500	-KLTQKVKLWDRDFPPIYLTNLVSIEMIAITFAIVLGVIIYRISMAAALANSSPVSRSNRRVTVTATAVIINLVVILLDEYGCAR
hANO2	518	GDEDEDKLTWDRDFPPIYLMNFASILEMIAITFISIVEGVIVYRIATAAALSINK--ATRSNRRVTVTATAVIINLVVILLDEYGAAR
mANO1	474	-KEDQKVKLWDRDFPPIYLTNLVSIEMIAITFAIVLGVIIYRISMAAALANSSPVSRSNRRVTVTATAVIINLVVILLDEYGCAR
mANO2	517	-DEDEDKLTWDRDFPPIYLMNFASILEMIAITFISIVEGVIVYRIATAAALSINK--ATRSNRRVTVTATAVIINLVVILLDEYGAAR
hANO1	589	WLTKIEVPKTEKFEERLIFKAFLLKEFNYSYPIFYVAFPKGRFVGRPGDYVYIFRSRMEECAPGGCLMELCQLSIIMLGKQLIQNNI
hANO2	606	WLTKIEVPKTEQFEERLILKAFLLKEFNAYSPIFYVAFPKGRFVGRPGSYVYIFEDGRMEECAPGGCLMELCQLSIIMLGKQLIQNNI
mANO1	563	WLTKIEVPKTEKFEERLIFKAFLLKEFNYSYPIFYVAFPKGRFVGRPGDYVYIFRSRMEECAPGGCLMELCQLSIIMLGKQLIQNNI
mANO2	604	WLTKIEVPKTEQFEERLILKAFLLKEFNAYSPIFYVAFPKGRFVGRPGSYVYIFEDGRMEECAPGGCLMELCQLSIIMLGKQLIQNNI
hANO1	679	FEIGVPKKKLIRRLKLDTEAGEEDSARSHPEQNDLDYSLPDTGLTPEYMEMIIQPGFVTLFVASFPLAPFALLNNTIEVRLDAKKE
hANO2	696	FEIGVPKKKLIRRLKLDTEAGEEDSARSHPEQNDLDYSLPDTGLTPEYMEMIIQPGFVTLFVASFPLAPFALLNNTIEVRLDAKKE
mANO1	653	FEIGVPKKKLIRRLKLDTEAGEEDSARSHPEQNDLDYSLPDTGLTPEYMEMIIQPGFVTLFVASFPLAPFALLNNTIEVRLDAKKE
mANO2	694	FEIGVPKKKLIRRLKLDTEAGEEDSARSHPEQNDLDYSLPDTGLTPEYMEMIIQPGFVTLFVASFPLAPFALLNNTIEVRLDAKKE
hANO1	769	VTELRRPDAVRAKDIGIWNILRGIGKLAVINAFVISTSDFIPLRVLYMYSKNGTMHGFVNHTLSSFNVSDFQNGTAEENDPLDLGYE
hANO2	786	VTELRRPDAVRTKDIGIWNIDILSGIGKFSVINAFVIAITSDFIPLRVLYMYSYSHNGTMHGFVNHTLSSFNVSQQLKEGTCPENS-QFDQE
mANO1	743	VTELRRPDAVRAKDIGIWNILRGIGKLAVINAFVISTSDFIPLRVLYMYSKNGTMHGFVNHTLSSFNVSDFQNGTAEENDPLDLGYE
mANO2	784	VTELRRPDAVRTKDIGIWNIDILSGIGKFSVINAFVIAITSDFIPLRVLYMYSYSHNGTMHGFVNHTLSSFNVSQQLKEGTCPENS-QFDQE
hANO1	859	VQICRDKDYREPPWAPNVEYFSSKQVWLSARLAFAVIFQNLVMEISVIVDWWIPDIPTDISDQIKERKSLVFLFMREEQKQLLDITW
hANO2	875	VQFCRDKDYREPPWAPNVEYFSSKQVWLSARLAFAVIFQNLVMEISVIVDWWIPDIPTDISDQIKERKSLVFLFMREEQKQLLDITW
mANO1	833	VQICRDKDYREPPWAPNVEYFSSKQVWLSARLAFAVIFQNLVMEISVIVDWWIPDIPTDISDQIKERKSLVFLFMREEQKQLLDITW
mANO2	873	VQFCRDKDYREPPWAPNVEYFSSKQVWLSARLAFAVIFQNLVMEISVIVDWWIPDIPTDISDQIKERKSLVFLFMREEQKQLLDITW
hANO1	949	MEERQKDEPPQNHENTKACF---DSLGSPAFSHAYHGGVLT
hANO2	965	ALRSFGGDRS-RSMAASSAPSGOSOLGSMSSGSOHTNV-
mANO1	923	MEERQKDEPPQNHENTKACF---EAGDGSVPSYEHGDAL
mANO2	963	TQSSQGGDRSRRSMAASSAPSGOSOLGSMSSGSOHTNV-

Se alinean las secuencias tanto de humano (h) como de ratón (m) para cada una de las proteínas TMEM16A y TMEM16B. Se uso el software T-Coffee

12 APÉNDICE B

Publicaciones

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), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62860-9>

Sánchez-Solano, A., Corral, N., **Segura-Covarrubias, G.**, Guzmán-Hernández, M. L., Arechiga-Figueroa, I., Cruz-Rangel, S., Pérez-Cornejo, P., & Arreola, J. (2020). Regulation of the Ca²⁺-activated chloride channel Anoctamin-1 (TMEM16A) by Ca²⁺-induced interaction with FKBP12 and calcineurin. *Cell Calcium*, 89, 102211. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102211>

13 APÉNDICE C

Presentaciones en congresos

Guadalupe Segura-Covarrubias, Iván Aréchiga Figueroa, José J. De Jesús-Pérez, Alfredo Sánchez- Solano, Ángeles E. Espino-Saldaña, Patricia Pérez-Cornejo, Ataúlfo Martínez-Torres and Jorge Arreola (2019). “**Voltage-dependent gating of TMEM16A in absence of intracellular calcium**”. **(Conferencia)**, XXI Congreso de la Rama de Bioenergética y Biomembranas. Noviembre 2019.

Guadalupe Segura-Covarrubias, Silvia Cruz Rangel, Edith Espino Saldaña, José Juan De Jesús Pérez, Ataúlfo Martínez Torres, Patricia Pérez Cornejo, Jorge Arreola (2017). “**Voltage-dependent activation of TMEM16A, a calcium-activated chloride channel**” **(Poster)** Emerging Concepts in Ion Channels Biophysics, Ciudad de México (octubre 2017)