



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA Y FARMACOLÓGICA DEL
CANAL DE CLORURO TMEM16A DE *XENOPUS TROPICALIS*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
ARELI HUANOSTA GUTIÉRREZ

TUTOR
DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. FRANCISCO VÁZQUEZ CUEVAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.

DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

JURIQUILLA, QUERÉTARO, ABRIL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi padre,

luna llena en un lienzo sin pincel

Mis letras no se decoloran en tus cuadros

A mi madre,

Mi despertar, mi luz, mi paz

Tienes el milagro de la vida en tus ojos

A mi Tali,

Mi infancia dormida

Mi confidente y compañera

A mi Alex,

Compañero de sueños

De una tormenta haces un cielo azul.

A ti

Que estas dentro de nuestros sueños,
Nuestro imperio dormido,
 hoy descansa tu alma...

No hizo falta una mirada para extrañar tus alas
Y en tu breve paso por la vida
 París, dejaste huellas en una noche estrellada

No sé si me lo contó el mar
 cuando estábamos en la playa
No sé si un fuerte viento
 te arrancó de mi, o sólo retrasó tu llegada

O es que el tiempo pisa aquellos sueños que se acaban..

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Ataúlfo Martínez Torres y con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, número de becario 335550.

Con gran admiración y cariño a mi tutor, Dr. Ataúlfo Martínez. Gracias por compartir sus conocimientos, su dedicación, paciencia y motivación durante el desarrollo de mis experimentos y en la elaboración de esta tesis.

A mi comité tutorial, Dr. Arturo Hernández y Dr. Francisco Vázquez quienes siguieron mis avances a lo largo de mi doctorado, gracias por su orientación que para mí fue fundamental para tener una formación completa.

Al comité sinodal, Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, Dra. Stéphanie Colette Thebault, Dr. Gerardo Rojas Piloni y Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez; gracias por su apoyo, correcciones y sus valiosas observaciones.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico, gracias por sus consejos y su invaluable orientación. A todos mis compañeros de laboratorio D15 en el INB, en especial a Edith Espino, mil gracias por su apoyo. Y a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en el logro de mis objetivos.

A mis padres, quienes me enseñaron que con constancia y disciplina se consigue todo. Gracias por creer en mí, por su amor y por estar conmigo.

A mi hermana, mi compañera de juegos, todo cambia menos los lazos que nos unen, siempre estás en mi corazón! Leonardo y Rafael, gracias por compartir grandes momentos y seguir mis pasos.

A mi compañero de sueños, mi mejor amigo, el hombre de mi vida, gracias Alex por seguir mis pasos y continuar conmigo en este viaje! Aunque todo se derrumbe tú eres mi refugio, un lugar seguro, mi fuerza para vivir. Gracias por envolverme con cariño y alegría cada vez que lo necesito!

A mi segunda familia, Fam. Bautista-Orozco, gracias por acompañarme en este camino, en especial a Virginia Orozco y Evodio Bautista, con quienes he compartido hermosos momentos que llevo siempre en mi corazón.

A mis cómplices, mis amigos, compañeros de viajes gracias Eri, Josué, Hugo, Abraham, Amanda, Ana Julia, Miguel, Juan Carlos, Jimena, Raquel, Angie, Cindy, Lucy.

INDICE	Página
LISTA DE FIGURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
ABREVIACIONES	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Canales de cloruro activados por calcio (CaCC)	8
1.2. Papel de los CaCC	9
1.3. La proteína TMEM16A es correlato molecular de los CaCCs	11
1.4. Enfermedades asociadas a TMEM16A	13
1.4.1. TMEM16A y el cáncer	13
1.4.2. TMEM16A en la fibrosis quística	14
1.4.3. TMEM16A y su relación con los infartos cerebrales	14
1.4.4. TMEM16A y su relación con la nocicepción	15
1.5. La familia TMEM16A	15
1.6. Isoformas de TMEM16A	17
1.7. Estructura y topología de la proteína TMEM16A	18
1.7.1. Estructura del poro	19

1.7.2. Mecanismo de regulación de TMEM16A	20
1.8. Farmacología de los CaCCs	24
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
2.1.1. Expresión y distribución de xtTMEM16A	26
2.1.2. Mutación sitio-dirigida y selectividad aniónica de xtTMEM16A	28
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVO GENERAL	31
4.1. Objetivos específicos	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1. Obtención de ovocitos de <i>X. tropicalis</i>	32
5.2. Inyección de ovocitos	32
5.3. Registro de ovocitos	34
5.4. Las isoformas de xtTMEM16A	35
5.5. Transformación de bacterias competentes	35
5.6. Expresión heteróloga en células HEK-293	36
5.6.1. Mantenimiento de la línea celular HEK-293	36
5.6.2. Transfección transitoria de las isoformas xtTEMEM16A	37
5.6.3. Registro electrofisiológico de células HEK-293	38
5.6.4. Adquisición y análisis de datos	40

6. RESULTADOS	42
6.1. Activación de las corrientes CaCC en ovocitos de <i>X. tropicalis</i>	42
6.2. Caracterización farmacológica de las corrientes CaCC en ovocitos de <i>X. tropicalis</i>	45
6.3. Propiedades electrofisiológicas de las isoformas de xtTMEM16A expresadas en células HEK-293	47
6.4. Distribución de la proteína xtTMEM16A en ovocitos <i>X. tropicalis</i> y en células HEK-293	51
6.5. Caracterización farmacológica de xtTMEM16A expresadas en células HEK-293	55
6.6. Dependencia de voltaje de los bloqueadores en la proteína xtTMEM16A	57
7. DISCUSIÓN	64
8. CONCLUSIONES	69
9. APÉNDICE 1	70
10. BIBLIOGRAFÍA	73

LISTA DE FIGURAS

Figura

1. Árbol filogenético de la familia TMEM16	16
2. Modelo topológico de TMEM16A y sus dominios de regulación	22
3. Estructura básica de algunos bloqueadores de los CaCC	25
4. Corriente T_{out} en ovocitos de <i>X. tropicalis</i> .y PCR de TMEM16A	27
5. Localización de los aminoácidos mutados en xtTMEM16A y sus implicaciones funcionales	29
6. Obtención de los ovocitos de <i>X. tropicalis</i>	33
7. Transfección de las isoformas xtTMEM16A en células HEK-293	38
8. Corrientes I_{CaCC} en ovocitos de <i>X. tropicalis</i> y de <i>X. laevis</i>	43
9. Las corrientes CaCC en ovocitos de <i>X. tropicalis</i> se inhiben al sustituir el Ca^{2+} extracelular por Mn^{2+}	44
10. Sensibilidad de las corrientes I_{CaCC} a distintos bloqueadores	46
11. Modelo topológico de xtTMEM16A y sus isoformas	48
12. Expresión funcional de las variantes de TMEM16A	49
13. Relación I-V y tasas de activación e inactivación de las variantes xtTMEM16A	50
14. Expresión de xtTMEM16A(13) acoplada a GFP en células HEK-293 (xtTMEM16A(13)-GFP)	52
15. Distribución de xtTMEM16A(13)-GFP en ovocitos de <i>X. laevis</i> .	54

16. Sensibilidad de las corrientes I_{CaCC} a distintos bloqueadores en células HEK-293 transfectadas con xtTMEM16A(13) (WT) y la doble mutante xtTMEM16A(R646E+R761E) (DM)	56
17. Dependencia de voltaje del bloqueador 9AC	59
18. Dependencia de voltaje del inhibidor T16A _{inh} -A01	60
19. Fracción del potencial eléctrico (δ) que experimenta un bloqueador en el poro del canal	61
20. Consideración de dos rangos de voltaje para el ajuste de la fracción del potencial eléctrico δ que experimenta 9AC en el poro del canal	63
A1. Relación I-V de las variantes xtTMEM16A(13) y (xtTMEM16A(13)-GFP)	70
A2. Curvas dosis-respuesta obtenidas a partir de las gráficas de las fig 16 y 17	71
A3. Trazos representativos de las cinéticas de activación y desactivación de las 5 variantes	72

Resumen

Los canales de Cl^- activados por Ca^{2+} (CaCC) se expresan ampliamente en una variedad de tejidos y juegan un papel fundamental en diversos procesos. A pesar de que fueron descritos en los años 1980s, fue hasta el 2008 cuando se identificó a la proteína TMEM16A como el correlato molecular de los CaCCs y desde entonces se han realizado diversas investigaciones en torno al funcionamiento del canal en varias especies de vertebrados. En nuestro grupo de trabajo, se identificaron 5 variantes de TMEM16A en la rana *Xenopus tropicalis* (xtTMEM16A) derivadas de eventos de *splicing* alternativo. En el presente trabajo se propone realizar la caracterización electrofisiológica y farmacológica de las corrientes endógenas CaCC en ovocitos de *X. tropicalis* así como de las variantes de TMEM16A expresadas en células HEK-293.

Mostramos que los ovocitos de *X. tropicalis* generan corrientes con características de los CaCC: son dependientes de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular y del de voltaje. Las corrientes presentaron una rectificación saliente y se obtuvieron densidades de corriente promedio de 48.18 ± 8.22 nA/pF a +120 mV. El análisis farmacológico mostró que los bloqueadores DIDS, NFA y 9AC inhibieron la corriente con una IC_{50} (medida a +120 mV) de: 52.9, 57.9 y 66.3 μM , respectivamente. Por otro lado, las 5 variantes xtTMEM16A expresadas independientemente en células HEK293 presentaron I_{CaCC} con una rectificación saliente y una densidad de corriente a +140 mV de 9.15 ± 0.82 nA/pF. Si bien las cinéticas de activación y desactivación de las variantes de xtTMEM16A son similares entre ellas, las variantes xtTMEM16A(1d, 13) y xtTMEM16A(1d, 13, 15) presentan una corriente activada al inicio del pulso hiperpolarizante a -100 mV que no presentan las demás variantes.

Por otra parte, recientemente, en nuestro grupo de trabajo mostramos que mutaciones en los residuos R646 y R761 (R646E+R761E) alteran la selectividad aniónica. Dado que se conoce poco acerca de la estructura del poro de TMEM16A, determinamos si las mutaciones R646E+R761E, alteran la afinidad y dependencia de voltaje en relación al bloqueo de los fármacos planteados anteriormente, a través del registro electrofisiológico en células HEK-293 transfectadas con las variantes DM = xtTMEM16A(R646E+R761E) y WT = xtTMEM16A(13). Las curvas I-V obtenidas muestran una rectificación saliente a voltajes positivos y una inhibición de la corriente dependiente del voltaje y de la concentración del bloqueador. Cabe precisar que 9AC y T16A_{inh}-A01 provocan una inhibición de la I_{CaCC} a concentraciones $> 100 \mu\text{M}$ y $> 10 \mu\text{M}$,

respectivamente. Además, encontramos diferencias significativas entre la inhibición con ambos bloqueadores entre las variantes WT y DM. En el caso de DIDS, no encontramos diferencia significativa en la inhibición entre WT y DM.

Dado que encontramos que el bloqueo de las I_{CaCC} por 9AC y T16A_{inh}-A01 es dependiente de voltaje, se examinó si los bloqueadores ejecutan su acción en los residuos R646 y R761 que se propone son importantes en la selectividad del canal. Este análisis se realizó mediante la fracción del potencial eléctrico δ . Los valores de δ para T16A_{inh}-A01 no varían significativamente. En cambio, los valores de δ para el bloqueador 9AC son distintos: $\delta=0.32$ para WT y $\delta=0.49$ para la DM y esta diferencia es estadísticamente significativa. Entonces, si se considera que δ permite estimar la interacción eléctrica del bloqueador dentro del poro, significa que 9AC se une en sitios distintos en WT y la DM. Por lo tanto, proponemos que la interacción entre los residuos mutados R646 y R761 permite que 9AC se una en un sitio más profundo en el poro.

En conclusión, nuestros resultados muestran las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de TMEM16A de *X. tropicalis* y sus variantes derivados de eventos de *splicing* alternativo y brindan información importante acerca de la interacción de algunos bloqueadores con el poro para el entendimiento del papel funcional de la proteína.

Abstract

Calcium activated chloride channels (CaCC) are widely expressed in a variety of tissues and are involved in many important functions. Despite being initially described in the early 1980s, it was until 2008 when three independent groups identified TMEM16A as the molecular component of the CaCC. TMEM16A has been studied in several species of vertebrates. We have recently identified 5 alternative spliced variants for TMEM16A in *Xenopus tropicalis* (xtTMEM16A). However, their functional properties have not been described. Thus, this work aims to determine the electrophysiological properties of the endogenous CaCC currents from *X. tropicalis* oocytes and to characterize xtTMEM16A variants in HEK-293 cells.

Our results show that the CaCC current in *X. tropicalis* oocytes present hallmarks of the the CaCC current (I_{CaCC}). They are activated by cytosolic Ca^{2+} and exhibit voltage dependence. They exhibit outward rectification and current density measured at +120 mV was 48.18 ± 8.22 nA/pF. On the other hand, the electrophysiological characterization of the 5 alternative spliced variants xtTMEM16A shows that the I_{CaCC} measured at +140 mV has a current density of 9.15 ± 0.82 nA/pF. Additionally, our results show that there is no evident difference with regard to activation and deactivation kinetics of the five variants of xtTMEM16A. However, xtTMEM16A(1d, 13) and (1d, 13, 15) showed a transient current when the membrane was brought to -100 mV.

Further, we have recently shown that mutations of the pore-located positively charged amino acids, R646 and R761, to glutamate affect the properties of the pore channel. Thus, to gain additional insight into the mechanisms of pore blockage, we tested whether mutations R761E and R646E modify the voltage dependence of TMEM16A to several Cl^- channel blockers. To this end, HEK-293 cells were transfected with DM=xtTMEM16A(R646E+R761E) and WT=xtTMEM16A(13) and the I-V relationships were analyzed. The results show an outward rectifying current with increasing blocker concentration and voltage dependence. Interestingly, only A9C and T16A_{inh}-A01 show concentration-dependent block concentrations $> 100 \mu M$ and $> 10 \mu M$ respectively. We found no differences when DIDS was used.

Given that there is a voltage-dependent block of the current by A9C and T16A_{inh}-A01, we aimed to determine if mutations R761E and R646E alter the properties of the pore. We

estimated the fraction of the voltage field (δ). The calculated δ for A9C was 0.32 for xtTMEM16A(13) variant and 0.49 for xtTMEM16A(R646E+R761E) variant. If we consider that δ estimates the electric interaction of the blocker inside the pore, then our results suggest that 9AC binds deeper in the pore, probably due to its interaction with the R761 and R646 residues.

In conclusion, our results describe the electrophysiological and pharmacological properties of TMEM16A of *X. tropicalis* and its alternative splice variants. Thus, these findings and our studies on the channel blocker's interactions between R761E and R646E residues could be an important advance towards the understanding of this protein.

Abreviaciones

9AC: ácido antraceno-9-carboxílico

ANO1: Anoctamina-1

CaCC: Canal de cloruro activado por calcio

CFTR: Conductancia transmembrana de la fibrosis quística

DIDS: 4,4'-Diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfonato

GFP: proteína verde fluorescente

HEK-293: Human Embryonic Kidney cells

I_{CaCC} : corriente de cloruro activada por calcio

NFA: ácido niflúmico

PKC: proteína cinasa c

RCBM: motivo regulador de unión a calmodulina

TM: transmembranales

T_{out} : corriente transitoria de salida

T16A_{inh}-A01: inhibidor específico de TMEM16A

VGCC: canales de calcio dependientes de voltaje

xtMEM16A: TMEM16A de *Xenopus tropicalis*

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace varias décadas se reconoce la importancia de los canales selectivos a aniones; sin embargo, hasta hace relativamente poco tiempo, los canales de cloruro comenzaron a recibir mayor atención, debido en parte a que el mal funcionamiento de estos conduce al desarrollo de diversas enfermedades como la fibrosis quística, infartos cerebrales e hipertensión pulmonar. Los canales de cloruro permiten la difusión de aniones a través de la membrana y se encuentran implicados en diversas funciones importantes. Los canales de cloruro pueden dividirse en varios grupos estructural y funcionalmente diferentes. A continuación, se describirá de manera general la importancia de uno de tales grupos, los canales de cloruro activados por Ca^{2+} (CaCC), se describirán también sus propiedades, su relación con algunas enfermedades, su estructura, sus mecanismos de regulación y propiedades farmacológicas.

1.1. Canales de cloruro activados por calcio

Los canales iónicos son proteínas integrales de la membrana que permiten el paso selectivo de los iones en presencia de algún estímulo. En el caso particular de los canales de cloruro, es este ion el permeante debido a que es el anión más abundante en los organismos en condiciones fisiológicas (Jentsch, Stein et al. 2002); sin embargo, estos canales permiten el paso de otros aniones como I^- , SCN^- , NO_3^- , Br^- , F^- . Desde el punto de vista funcional, los canales de cloruro pueden dividirse de acuerdo al estímulo que los activa en cinco clases (Jentsch, Stein et al. 2002): (i) Canales de cloruro reguladores de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) que son activados por un aumento en la concentración intracelular del AMP cíclico; (ii) La familia de canales activados por voltaje CLC; (iii) Canales activados por neurotransmisores inhibitorios que se unen a receptores específicos como GABA_A y glicina; (iv) Canales que son activados por cambios en el volumen celular y (v) Canales que son activados por un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (CaCC). Estos últimos son de particular interés para este trabajo y han sido encontrados en distintos tipos celulares como ovocitos de

anfibios, neuronas, células del músculo liso y cardiaco, células endoteliales y epiteliales (Miledi and Parker 1984; Nilius, Prenen et al. 1997; Begenisich and Melvin 1998; Hartzell, Putzier et al. 2005; Duran, Thompson et al. 2009; Huang, Xiao et al. 2012).

La probabilidad de apertura de los CaCC aumenta cuando hay un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. De hecho, los CaCC son activados por un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y por cambios en el potencial de membrana. Los niveles de Ca^{2+} citosólico necesarios para activar los CaCC están en el rango de 100-600 nM, aunque se han encontrado casos en los que CaCC se activan por niveles de Ca^{2+} en el orden micromolar (Kleene and Gesteland 1991; Arreola, Melvin et al. 1996; Arreola, Park et al. 1996; Gomez-Hernandez, Stuhmer et al. 1997; Qu, Wei et al. 2003; Hartzell, Putzier et al. 2005). Como la activación del canal no depende sólo de Ca^{2+} sino además del potencial de membrana (Arreola, Melvin et al. 1996; Qu, Wei et al. 2003), las concentraciones medias de Ca^{2+} necesarias para activar al canal (EC_{50}) van de 0.4 μM a voltajes positivos (+60 mV) y 2.6 μM a voltajes negativos (-60 mV) (Qu, Wei et al. 2003; Schroeder, Cheng et al. 2008).

Las características típicas de estos canales son: 1) presentar una rectificación saliente en respuesta a voltajes positivos, 2) presentar una activación dependiente de la concentración de Ca^{2+} intracelular que aumenta con una despolarización de la membrana y 3) seguir un cociente de permeabilidad a diversos aniones, $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^-$ glutamato (Machaca and Haun 2000; Qu and Hartzell 2000); $\text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ (Large and Wang 1996; Qu and Hartzell 2000); $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{gluconato}$ (Reyes, Lopez-Rodriguez et al. 2013).

1.2. Papel de los CaCC

Los CaCCs fueron descritos inicialmente en los años 80's cuando Cross y colaboradores observaron que la inyección de Ca^{2+} o bien de un ionóforo de Ca^{2+} en los ovocitos de *Rana pipiens*, generaba una transición del potencial de membrana a un voltaje positivo (Cross 1981; Schlichter and Elinson 1981). Posteriormente, se describieron y caracterizaron las corrientes generadas por los CaCC en los ovocitos de *Xenopus laevis* (Miledi 1982; Barish 1983; Miledi and

Parker 1984). En 1982, Miledi observó que al llevar el potencial de membrana de los ovocitos a potenciales positivos (+20 mV), se genera una corriente transitoria de salida (T_{out}) (Miledi 1982). Asimismo, Parker y Miledi observaron que la amplitud de la corriente aumenta si se aumenta la concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular, y que la amplitud de la corriente también aumenta si se inyecta Ca^{2+} directamente al interior del ovocito (Miledi and Parker 1984). Más aún, esta corriente desaparece si se sustituye el Ca^{2+} por Mn^{2+} en el medio extracelular, por lo que concluyeron que la generación de la corriente T_{out} depende de la entrada de Ca^{2+} .

Los CaCC juegan un papel muy importante en los ovocitos en el proceso de fertilización. Durante esta, ocurre un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular como resultado de la liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares del ovocito. El Ca^{2+} intracelular activa los CaCC, despolariza la membrana y es este cambio en el potencial eléctrico lo que impide la polispermia (Cross and Elinson 1980; Miledi 1982; Barish 1983). Sin embargo, los CaCC no solo están presentes en los ovocitos; Bader y colaboradores describieron CaCCs en los fotorreceptores de salamandra (Bader, Bertrand et al. 1982). Esta corriente de los CaCC ha sido estudiada principalmente en los conos de la retina, donde se ha mostrado que la entrada de Ca^{2+} por la despolarización de la membrana, activa esta corriente (Lalonde, Kelly et al. 2008). También se ha mostrado que los CaCC regulan la transmisión sináptica estabilizando el potencial de acción en las terminales de los fotorreceptores. (Maricq and Korenbrot 1988; Jeon, Paik et al. 2013).

Otra función en la que participan los CaCC es en la contracción del músculo liso. El Ca^{2+} del medio extracelular y el liberado intracelularmente activan corrientes de cloruro que inducen una despolarización de la membrana celular activando los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCC), cuya apertura promueve la entrada de Ca^{2+} y genera la contracción del músculo liso (Lamb and Barna 1998). En otros tejidos como en las glándulas salivares, la apertura de canales de cloruro inicia la secreción de fluidos. Uno de los canales de cloruro que participa en este proceso es activado por Ca^{2+} intracelular y es de suma importancia ya que la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular inicia la secreción del fluido de las células acinares (Arreola, Melvin et al. 1996; Arreola, Park et al. 1996; Melvin 1999; Melvin, Yule et al. 2005).

Por otra parte, los estudios electrofisiológicos de los CaCCs se han realizado en diversos tipos celulares como las neuronas piramidales del hipocampo donde posiblemente modulen los potenciales de acción (Huang, Xiao et al. 2012). Huang y colaboradores observaron que la

entrada de Ca^{2+} a través de los VGCC, activa canales de cloruro generando una corriente seguida de una corriente de cola cuyo potencial de reversión coincide con el potencial de equilibrio del cloro. Además, la corriente de cola generada por estos canales es inhibida por bloqueadores típicos de canales de cloruro (Huang, Xiao et al. 2012).

Los CaCC también están presentes en neuronas sensoriales del sistema olfativo donde la transducción de una molécula odorante a una respuesta eléctrica (despolarización) involucra dos corrientes: la entrada de cationes a través de canales activados por nucleótidos cíclicos y la entrada de cloruro a través de los CaCC (Kleene 2008; Stephan, Shum et al. 2009). Debido a la acumulación de cloruro en estas neuronas (Kaneko, Putzier et al. 2004), la conductancia de cloruro amplifica la señal (Lowe and Gold 1993). Por otro lado, los CaCC también se expresan en el soma de entre el 45 % y 90 % de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) y están implicados en el procesamiento de algunas señales sensoriales (Mayer 1985; Andre, Boukhaddaoui et al. 2003).

De manera notable, en el 2008, Rock y colaboradores generaron un ratón que carece del gen *TMEM16A* (*TMEM16A*^{-/-}) (Rock, Futtner et al. 2008). Los animales *TMEM16A*^{-/-} mueren en el día 9 postnatal debido al colapso de la tráquea. En estos, se observa una disminución de la secreción epitelial del cloro en las vías respiratorias (Rock, O'Neal et al. 2009) y una disminución drástica de la actividad eléctrica y de la contractibilidad del intestino y el estómago (Huang, Rock et al. 2009; Hwang, Blair et al. 2009; Ousingsawat, Martins et al. 2009). Por lo anterior, destaca el rol crucial de *TMEM16A* en el funcionamiento de las vías respiratorias y la peristalsis del tracto gastrointestinal.

1.3. La proteína *TMEM16A* es correlato molecular de los CaCCs

Hasta ahora se ha presentado de manera general, la importancia y el papel de los CaCC y resalta la pregunta, ¿Cuántos tipos de CaCC hay en los distintos tipos celulares? Por muchos años se buscaron y se propusieron diversos canales como candidatos moleculares a ser el CaCC. No fue sino hasta el 2008, que tres grupos de investigación independientes mostraron que la

proteína TMEM16A (Transmembrane 16A) es el correlato molecular de los CaCC (Caputo, Caci et al. 2008; Schroeder, Cheng et al. 2008; Yang, Cho et al. 2008). El grupo de investigadores formado por Yang y colaboradores, seleccionaron a TMEM16A después de realizar una búsqueda bioinformática de una variedad de canales con múltiples dominios transmembranales y diversas isoformas. Así, ellos mostraron que la expresión de TMEM16A en células HEK-293 junto con el receptor de endotelina A, genera corrientes I_{CaCC} con una EC_{50} de 2.6 μ M de calcio a -60 mV (Yang, Cho et al. 2008). En ese trabajo, se observó que las corrientes de TMEM16A presentan un potencial de reversión que corresponde al potencial de equilibrio de cloruro y que pueden ser inhibidas con los bloqueadores de canales de cloruro más utilizados (DIDS, NFA, 9AC). Por lo que los autores concluyeron que TMEM16A genera corrientes con propiedades clásicas de los CaCC (Yang, Cho et al. 2008).

Caputo y colaboradores, identificaron a TMEM16A a partir de un análisis de expresión global en un microarreglo de RNAm (Caputo, Caci et al. 2008). Estos autores observaron que los CaCC se sobre expresan en células humanas epiteliales bronquiales y que bajo la estimulación con interleucina-4 (IL-4) se genera una corriente I_{CaCC} . Además, expresaron TMEM16A en diversas líneas celulares y mostraron que estas generan corrientes de cloruro con propiedades clásicas de los CaCC. Por otro lado, al suprimir la expresión del gen TMEM16A mediante siRNA, se inhibieron las I_{CaCC} (Caputo, Caci et al. 2008).

Finalmente, el grupo formado por Schroeder y colaboradores, identificó a TMEM16A como el correlato de los CaCC utilizando ovocitos de ajolote (*Ambystoma mexicanum*) como sistema de expresión (Schroeder, Cheng et al. 2008). Los autores aislaron el gen de TMEM16A de ovocitos de *X. laevis* y de ratón, mostrando que ambos generan corrientes I_{CaCC} al ser expresados en ovocitos de ajolote y en células HEK-293. Asimismo estas corrientes tienen un perfil farmacológico similar al de los canales CaCC endógenos de ovocitos de *X. laevis* (NFA>DIDS>NPPB>DPC) (Schroeder, Cheng et al. 2008). Por otro lado, estos mismos autores mostraron que TMEM16A se expresa en células de las glándulas mamarias y salivales, células en las que se han registrado I_{CaCC} (Schroeder, Cheng et al. 2008).

1.4. Enfermedades asociadas a TMEM16A

Antes del descubrimiento de TMEM16A como posible CaCC, se observó que diversos miembros de la familia de TMEM16 se sobre expresan en algunos tipos de cáncer. Sin duda, ese hallazgo despertó el interés en el estudio de esta proteína. Además, hoy en día se sabe que el transporte de cloruro a través de la membrana resulta de suma importancia debido a que un transporte inadecuado de este ion puede generar enfermedades como la fibrosis quística, la epilepsia, entre otras (Planells-Cases and Jentsch 2009). A continuación se presenta de manera breve, la asociación que se ha encontrado entre TMEM16A y algunas enfermedades.

1.4.1. TMEM16A y el cáncer

Inicialmente, TMEM16A fue nombrado de diversas maneras, por ejemplo, DOG1 porque se encontró altamente expresada en el tumor del estroma gastrointestinal (GIST) (West, Corless et al. 2004). También ha sido asociado a otros tipos de cáncer, como el cáncer oral (de ahí se le atribuyó el nombre de ORAOV2), cáncer de vesícula biliar, cáncer de cabeza y cuello (Huang, Gollin et al. 2002; West, Corless et al. 2004; Carles, Millon et al. 2006; Britschgi, Bill et al. 2013). En un estudio reciente, se encontró que TMEM16A se expresa de manera exacerbada en células humanas escamosas de carcinoma y en GIST (Ruiz, Martins et al. 2012). También se ha observado la sobreexpresión de TMEM16A en cáncer de mama (Britschgi, Bill et al. 2013). Actualmente se sabe que la sobreexpresión de TMEM16A es un fenómeno relacionado a varios tipos de tumores, por lo que se ha considerado que TMEM16A podría ser un blanco terapéutico valioso, no obstante, los mecanismos de esta sobreexpresión no han sido comprendidos del todo.

1.4.2. TMEM16A en la fibrosis quística

La fibrosis quística es una enfermedad genética causada por mutaciones en el gen que codifica el canal de cloruro CFTR (Riordan 2008). La fibrosis quística afecta varios órganos, principalmente el pulmón. Aunque la patogénesis de la enfermedad no se ha entendido del todo, se sabe que la pérdida de la función del canal CFTR en la fibrosis quística favorece la colonización de bacterias en la superficie de las vías respiratorias (Clunes and Boucher 2007). Las células epiteliales de la vía respiratoria tienen dos canales de cloruro, uno es el canal CFTR, regulado por cAMP y otro, el TMEM16A regulado por las concentraciones de Ca^{2+} del citosol. TMEM16A se expresa principalmente en células calciformes y su localización podría ser importante en la liberación de las mucinas (Huang, Zhang et al. 2012). La activación de TMEM16A con agentes farmacológicos podría prevenir los efectos primarios en la fibrosis quística ya que se podría antagonizar la inflamación. Esto último sugiere la importancia de realizar una caracterización farmacológica de TMEM16A.

1.4.3. TMEM16A y su relación con los infartos cerebrales

Se define a un infarto cerebral como una pérdida rápida de las funciones cerebrales debido a la muerte neuronal causada por el bloqueo o la ruptura de vasos sanguíneos. Algunos estudios recientes muestran evidencia de que los canales de cloruro están muy relacionados con algunos factores de riesgo de infarto. Por ejemplo, TMEM16A está expresado en células del músculo liso vascular y estas células tienen canales con propiedades de los CaCC (Thomas-Gatewood, Neeb et al. 2011). Por otro lado, recientemente se encontró que en las células del músculo liso vascular de las arterias de ratas hipertensas 2k2c, se reduce la expresión de TMEM16A y disminuye la corriente I_{ClCa} (Zhang, Zhang et al. 2012). Además, se mostró que la actividad de la I_{ClCa} correlaciona negativamente con la presión sanguínea durante el desarrollo de la hipertensión (Wang, Yang et al. 2012). De manera que, la actividad de los CaCC desempeña un papel importante en las células del músculo liso vascular y podrían ser una estrategia terapéutica en enfermedades cardiovasculares como los infartos.

1.4.4. TMEM16A y su relación con la nocicepción

Como ya se mencionó, TMEM16A se expresa en neuronas del DRG y se sabe que está implicado en la modulación de las señales sensoriales. En el 2010, Lui y colaboradores, destacaron el papel de los CaCC en neuronas nociceptivas. Estos investigadores, describieron la activación de los CaCC a través de la bradiquinina (Liu, 2010). La bradiquinina es una sustancia inflamatoria que se libera en los sitios donde hay daño en el tejido o inflamación. En las neuronas del DRG, la bradiquinina actúa en los receptores B2 acoplados a proteína Gq y estimulan la fosfolipasa C, la producción de IP3 e induce la liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares (Cockcroft, Chowienczyk et al. 1994). En consecuencia, se abren los CaCC y junto con la activación de los canales de potasio KV7, repolarizan la membrana y aumentan la tasa de disparo de potenciales de acción. Por otra parte, se ha mostrado el papel de TMEM16A como sensor de temperatura en estas neuronas debido a que cuando se está por encima de los 44°C se activan las I_{CaCC} aún en ausencia de Ca^{2+} (Cho, Yang et al. 2012). De manera que TMEM16A está implicado en la modulación de las señales sensoriales y contribuye a la sensibilidad del calor, por lo que TMEM16A puede ser un blanco terapéutico importante para los tratamientos analgésicos.

1.5. La familia TMEM16A

A la proteína TMEM16A, también se le conoce como Anoctamina-1 (ANO1) debido a que este canal es selectivo para aniones y originalmente se predijo que tiene ocho segmentos transmembranales (ano-octa) (Yang, Cho et al. 2008). Los miembros de la familia TMEM16A se encuentran en todos los eucariotes incluyendo mamíferos, moscas, gusanos, plantas, levaduras y protozoa (Hartzell, Yu et al. 2009). En mamíferos, TMEM16A pertenece a una familia de 10 miembros (Figura 1) denotados de la A a la K, excluyendo I y están compuestos de entre 800 a 1000 residuos aminoacídicos (Hartzell, Putzier et al. 2005; Hartzell, Yu et al. 2009). El análisis filogenético mostró que TMEM16A y TMEM16B comparten 56 % de similitud (Milenkovic,

Brockmann et al. 2010; Wang, Alam et al. 2013). Por otro lado, TMEM16H/K podrían formar una subfamilia de las proteínas TMEM16 porque se encuentran distantes de los otros 8 miembros de la familia, mientras que TMEM16C/D y TMEM16E/F forman dos subgrupos separados (Pedemonte and Galietta 2014).

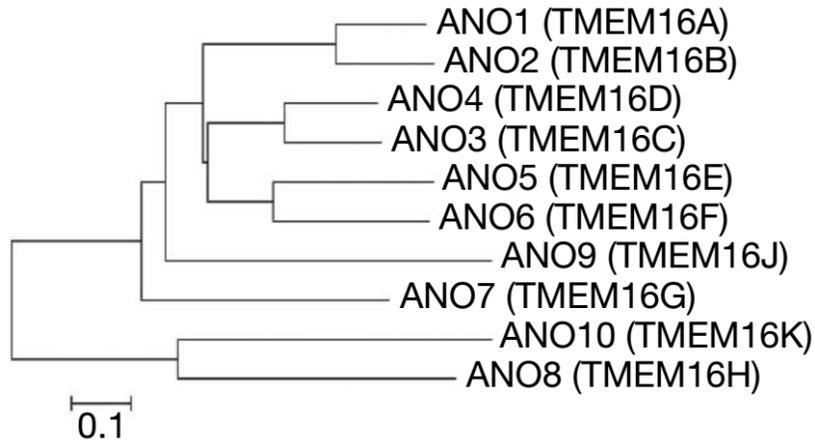


Figura 1. Árbol filogenético de la familia TMEM16. Tomado de (Yang, Cho et al. 2008). La barra de escala representa 0.1 sustituciones de nucleótidos por sitio.

Además, la familia de TMEM16A conserva una alta identidad de los aminoácidos que forman los supuestos segmentos transmembranales. Cabe señalar que la familia de TMEM16A se encuentra en diversos organismos y existen homólogos en varios animales como insectos, anemonas, nematodos e incluso en eucariontes unicelulares como levaduras, en donde se describió su papel en la tolerancia a altas concentraciones extracelulares de sal (Milenkovic, Brockmann et al. 2010). La identidad en la secuencia de TMEM16A entre distintas especies de vertebrados es del 70 % y entre rata y ratón es del 99 %. TMEM16A en humano tiene una alta homología con su ortólogo en ratón (el 91 % de identidad en la secuencia aminoacídica); y en rata se ha encontrado que hay 123 aminoácidos adicionales en el amino terminal (Yang, Cho et al. 2008). Es importante mencionar que la familia TMEM16A no es homóloga de otras familias

de canales iónicos por lo que resulta sumamente difícil poder hacer una descripción de su estructura basándose en el modelaje por homología.

1.6. Isoformas de TMEM16A

El transcrito primario de TMEM16A presenta eventos de *splicing* alternativo en mamíferos, lo que resulta en la generación de múltiples isoformas. Por ejemplo, TMEM16A humano (hTMEM16A) posee 4 exones alternativos por lo que hay muchas isoformas de TMEM16A generadas por la presencia o ausencia de estos (Caputo, Caci et al. 2008; Ferrera, Caputo et al. 2009; Sondo, Scudieri et al. 2014). Los 4 exones alternativos fueron nombrados: a, 6b, 13 y 15 y codifican para regiones intracelulares de la proteína. Los segmentos a y 6b se localizan en el segmento amino terminal mientras que los exones 13 y 15 se encuentran en la primer asa intracelular (Ferrera, Caputo et al. 2009). Se mostró además, que las cuatro isoformas de hTMEM16A poseen distintas propiedades en la dependencia a voltaje y a Ca^{2+} (Xiao, Yu et al. 2011).

Otro aspecto importante que se ha observado es que las isoformas de TMEM16A se expresan específicamente en ciertos tejidos y tienen propiedades electrofisiológicas distintas. Por ejemplo, se encontró una variante que carece del exón alternativo 14, poco expresada en tejido humano (Ferrera, Caputo et al. 2009). Esta variante tiene un sitio que potencialmente puede ser fosforilado por la proteína cinasa C (O'Driscoll, Pipe et al. 2011). Por otro lado, la presencia del exón 6b genera un canal de cloruro que tiene una menor sensibilidad a Ca^{2+} citosólico (Ferrera, Caputo et al. 2009) y la ausencia del exón 13 genera un canal que se activa poco a voltajes positivos y que tiene baja sensibilidad a Ca^{2+} (Ferrera, Caputo et al. 2009). Existe también una isoforma llamada TMEM16A(0) que no tiene ningún exón alternativo, expresada mayoritariamente en testículo humano (Sondo, Scudieri et al. 2014), la cual tiene diferente dependencia de voltaje así como en selectividad iónica (Ferrera, Scudieri et al. 2011).

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se encontró que TMEM16A en *X. tropicalis* (xtTMEM16A) presenta 4 exones alternativos, 1b, 1d, 13 y 15 (Figura 10A) (Huanosta-Gutierrez,

Espino-Saldana et al. 2014). La presencia o ausencia de estos exones alternativos da lugar a 5 isoformas de la proteína xtTMEM16A (Figura 10B). Es interesante destacar que los exones 1b y 1d en *X. tropicalis*, no tienen homólogos en TMEM16A de humano. Además la secuencia de residuos aminoacídicos EAVK que corresponden al exón 13 (se discutirá más adelante), que se encuentra en hTMEM16A, varía en dos residuos aminoacídicos (GMVK) en xtTMEM16A.

1.7. Estructura y topología de la proteína TMEM16A

Una de las razones por las que se llevó tanto tiempo descubrir los genes que codifican para los CaCC es que los canales de cloruro son estructuralmente diversos y muy diferentes a otros canales iónicos, como los canales de potasio o sodio por ejemplo. Debido a que aún no se conoce la estructura cristalográfica de TMEM16A, se han planteado diversos modelos topológicos basados en el perfil hidropático de la proteína. Estas predicciones han sido posibles en parte por el hecho de que la estructura homodimérica de TMEM16A es parecida a la de los canales de cloruro CLC y los CFTR (Middleton, Pheasant et al. 1996; Fahlke, Knittle et al. 1997; Vergani, Lockless et al. 2005). De manera que se predice que TMEM16A tiene 8 segmentos transmembranales (TM) con los extremos amino y carboxilo en la región intracelular. Se ha propuesto además, que hay un asa reentrante entre el dominio TM5 y TM6 que podría formar el poro del canal y que es de suma importancia para la selectividad iónica (Yu, Duran et al.; Yang, Cho et al. 2008; Galietta 2009; Yu, Duran et al. 2012).

La estructura cuaternaria de muchos canales iónicos está formada por complejos de proteínas que se ensamblan por diversas subunidades idénticas o muy similares que forman el poro del canal. Diversos grupos sugieren que TMEM16A forma un homodímero (Fallah, Romer et al. 2010; Sheridan, Worthington et al. 2014): Fallah y colaboradores mostraron la interacción proteína-proteína mediante la electroforesis nativa con azul de coomassie en un gel de poliacrilamida y encontraron la presencia de complejos de alto peso molecular de TMEM16A que sugieren la formación de un homodímero (Fallah, Romer et al. 2011). En otro estudio, Sheridan y colaboradores marcaron TMEM16A con dos proteínas fluorescentes, mCherry y la proteína verde fluorescente, GFP; entonces mediante la transferencia de energía de resonancia

de Förster (FRET) mostraron la interacción física entre dos proteínas TMEM16A marcadas (Sheridan, Worthington et al. 2014). Más aún, algunos miembros de la familia de TMEM16 (A,B,F) comparten la estructura homodimérica así como un dominio de dimerización en el amino terminal (Figura 2) que, es suficiente, pero no necesario (Ertongur-Fauth, Hochheimer et al. 2014) para la dimerización de la proteína así como para su ensamble (Tien, Lee et al. 2013; Vocke, Dauner et al. 2013). Por otro lado, se ha encontrado en un alineamiento de las proteínas TMEM16A, que hay un segmento que está altamente conservado y que se encuentra en el carboxilo terminal. Esta región ha sido llamada dominio de función desconocida 590 (DUF590) o bien dominio anoctamina (Hartzell, Yu et al. 2009). Aún no se conoce si dos subunidades de TMEM16A forman un canal de un solo poro o un canal de dos poros.

Recientemente, se propuso que los CaCC son de naturaleza multi-iónica y nuestro grupo de trabajo mostró que ese es el caso de TMEM16A de *X. tropicalis* (Reyes, Lopez-Rodriguez et al. 2013). De manera particular, se mostró que existen al menos tres sitios de unión del cloruro y la importancia de los residuos R761 y R646 en la interacción con los aniones (Reyes, Lopez-Rodriguez et al. 2013).

1.7.1 Estructura del poro

La capacidad de algunos canales para seleccionar un solo tipo de ión es una propiedad que depende del estado del canal así como de los sitios de unión de los iones en el canal. No obstante, debido a que aún no se conoce la estructura cristalográfica de TMEM16A, se han planteado diversos mecanismos de selectividad en el poro de TMEM16A. Primero, como ya se mencionó, se ha planteado que hay un asa re-entrante entre los segmentos TM5 y TM6 que consta de 103 aminoácidos y que ha sido propuesta como el poro del canal (Yang, Cho et al. 2008). Sin embargo, en 2012 Yu y colaboradores propusieron un modelo topológico alternativo del poro de TMEM16A en el que la región entre el quinto y sexto segmento transmembranal cruza completamente la membrana y forma un sexto segmento transmembranal (Yu, Duran et al. 2012). Además, propusieron que el asa entre el nuevo segmento TM y TM6 es intracelular

(Yu, Duran et al. 2012). Segundo, aun cuando no se sabe con exactitud el mecanismo de permeabilidad de los aniones en TMEM16A, los estudios donde se han realizado mutaciones, han permitido elucidar en parte este mecanismo. En este sentido, se sabe que el poro de TMEM16A posee residuos cargados positivamente que están altamente conservados entre las variantes de hTMEM16A: R621, K645 y K668 (Yang, Cho et al. 2008). Se ha postulado que estos residuos forman un anillo de selectividad en el que una mutación en cualquiera de los residuos podría generar cambios en las propiedades del canal (Yang, Cho et al. 2008). En el 2008, Yang y colaboradores mutaron estos residuos por glutamato lo que resultó en una alteración en la permeabilidad de distintos iones. En particular, la mutante R621E generó canales no selectivos en los que la permeabilidad al ion sodio ($\text{PNa}^+/\text{PCl}^-$) fue de 0.93 en comparación con 0.03 en la proteína silvestre. Finalmente, los CaCC permiten el paso de diversos iones relativamente grandes como $\text{C}(\text{CN})_3^-$ por lo que es natural pensar que el poro de los CaCC debe tener un diámetro al menos de esas dimensiones. El estudio realizado para elucidar el tamaño del poro fue realizado por Qu y Hartzel; ellos plantearon que el poro es un cono elíptico donde la zona más amplia mira hacia la región extracelular y las dimensiones del poro son de aproximadamente 0.6 x 0.94 nm (Qu and Hartzell 2001).

1.7.2. Mecanismos de regulación de TMEM16A

Dado que TMEM16A es un canal regulado por la concentración de Ca^{2+} intracelular y por voltaje, es de suponerse que hay un sitio sensor de voltaje así como un sitio de unión a Ca^{2+} . Si bien aún no se comprende el mecanismo mediante el cual el Ca^{2+} abre el canal, las aproximaciones mediante mutaciones han permitido la determinación de varios sitios que modulan su sensibilidad a Ca^{2+} y al voltaje del canal (Ferrera 2009, Xiao 2011, Cenedese 2012, Yu 2012).

Sin duda, uno de los retos más grandes ha sido encontrar y describir el sitio de unión a Ca^{2+} en los CaCC. Los CaCC son altamente sensibles a los niveles de Ca^{2+} y son activados por la elevación de la concentración de Ca^{2+} citosólico en el rango de 100-600 nM e incluso en el rango micromolar (Kleene and Gesteland 1991; Arreola, Melvin et al. 1996; Qu, Wei et al. 2003; Boese,

Aziz et al. 2004). Sin embargo, no se han encontrado sitios de unión a Ca^{2+} canónicos como “EF-hands” o sitios de unión a calmodulina que modulen el mecanismo de apertura del canal. En los últimos años se han estudiado diversos residuos aminoacídicos o fragmentos que podrían modular la activación del canal. Por ejemplo, Xiao y colaboradores encontraron que al suprimir los residuos EAVK (uno de los exones alternativos en hTMEM16A) encontrados en la primer asa intracelular (Figura 2), hay una disminución en la afinidad por Ca^{2+} (Xiao, Yu et al. 2011; Xiao and Cui 2014). En cambio, una mutación de 4 ácidos glutámicos (EEEE/AAAA) altamente conservados entre las especies de la familia de TMEM16 y que se encuentran adyacentes a EAVK (figura 2) son cruciales para la sensibilidad al voltaje de hTMEM16A (Xiao, Yu et al. 2011; Xiao and Cui 2014). Recientemente se han identificado diversos sitios de unión a Ca^{2+} en TMEM16A; por ejemplo, Yu y colaboradores encontraron que la región entre los residuos aminoacídicos 650 y 706, contiene dos ácidos glutámicos altamente conservados E702 y E705 (Figura 2) que podrían modificar la manera en la que se une el Ca^{2+} (Yu, Duran et al. 2012; Scudieri, Sondo et al. 2013). Los autores realizaron mutaciones en los ácidos glutámicos por glutaminas y mostraron que la sensibilidad a Ca^{2+} varía del rango micromolar a milimolar (Yu, Duran et al. 2012). Más aún, dado que la tercer asa intracelular parece tener sitios con sensibilidad a Ca^{2+} , un estudio reciente propuso que las dos hélices paralelas en la tercer asa intracelular de TMEM16A tienen aminoácidos con cargas opuestas y esto podría estar involucrado en la activación de TMEM16A inducida por Ca^{2+} (Lee, Jung et al. 2014). Los autores explican que en el estado cerrado del canal, las dos hélices se unen debido a la interacción entre las cargas opuestas de estas; sin embargo, conforme ocurre un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , la unión de Ca^{2+} a una hélice interfiere con la interacción iónica que había entre las dos hélices (Lee, Jung et al. 2014).

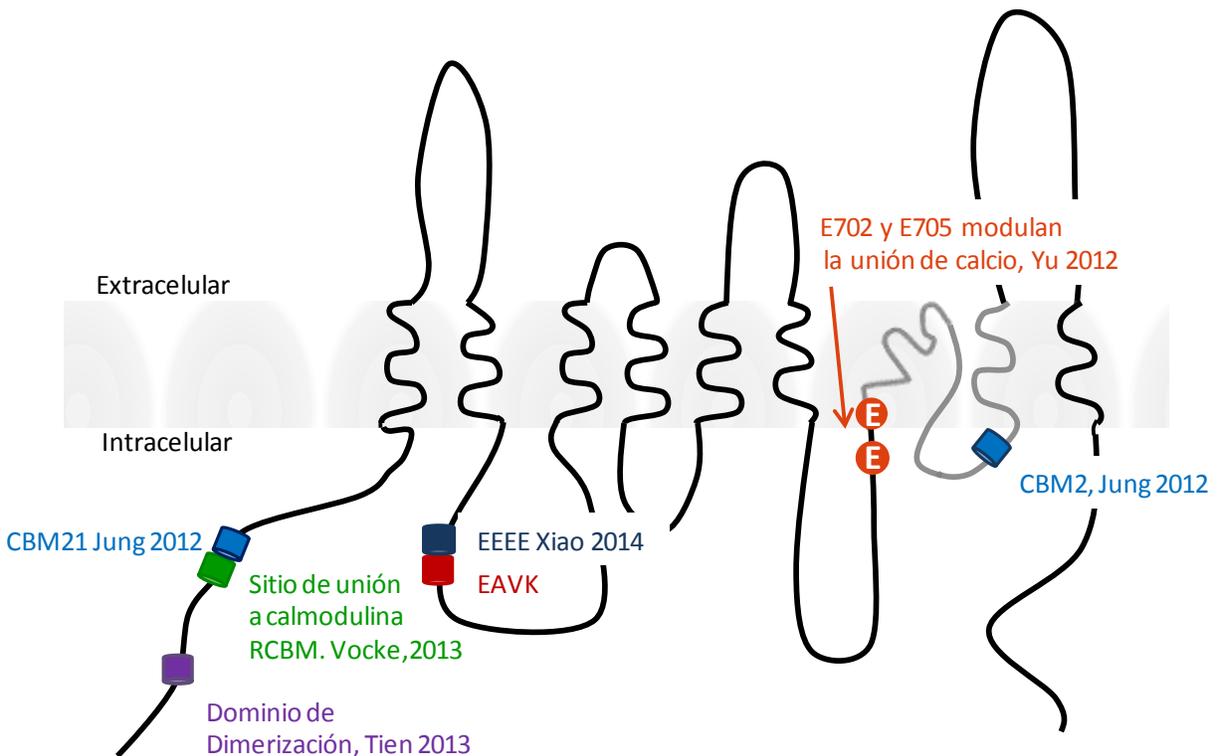


Figura 2. Modelo topológico de TMEM16A y sus dominios de regulación. Algunos miembros de la familia de TMEM16 (A, B, F) comparten un dominio de dimerización en el amino terminal que es suficiente para la dimerización así como para su ensamblaje; (Tien, 2013). Se ha encontrado además un sitio denominado motivo regulador de unión a calmodulina (RCBM) que parece estar involucrado en la modulación del canal por calmodulina; Vocke, 2013. La selectividad aniónica de TMEM16A es modulada por el complejo Ca^{2+} /calmodulina y se identificaron dos dominios de unión a calmodulina nombrados CBM1 y CBM2; Jung, 2012. Se ha observado que ocurre una disminución en la afinidad por Ca^{2+} debido a la eliminación de los residuos EAVK (Xiao, 2014). Una mutación de 4 ácidos glutámicos (EEEE/AAAA) adyacentes a EAVK son cruciales para la sensibilidad al voltaje (Xiao, 2014). Dos ácidos glutámicos E702 y E705 altamente conservados podrían modular la unión de Ca^{2+} (Yu, 2012).

Posiblemente, TMEM16A no posee un sitio de unión a Ca^{2+} específico o bien, el sitio de unión se localiza en una subunidad accesoria como la calmodulina que se sabe puede participar en la regulación de diversos procesos mediados por Ca^{2+} . En algunos estudios se ha mostrado que se requiere de calmodulina para la activación de los canales endógenos CaCC de una línea celular derivada de neuronas olfativas (Kaneko, Mohrlen et al. 2006). En otro estudio se encontró que la proteína TMEM16A tiene un sitio de unión a calmodulina en el exón alternativo

6b, en este estudio los autores muestran que las corrientes generadas por hTMEM16A disminuyen en presencia de inhibidores de calmodulina (Tian, Kongsuphol et al. 2010). Sin embargo, Vocke y colaboradores encontraron un sitio en el amino terminal de TMEM16A denominado motivo regulador de unión a calmodulina (RCBM, Figura 2) que parece estar involucrado en la activación del canal (Vocke, Dauner et al. 2013). Adicionalmente, recientemente se encontró otro sitio de modulación del canal por calmodulina (Jung, Nam et al. 2012). En este estudio, los autores mostraron que la selectividad aniónica de hTMEM16A es modulada por el complejo Ca^{2+} /calmodulina y se identificaron dos dominios de unión a calmodulina nombrados CBM1 en el amino terminal, que se traslapa con RCBM (Figura 2) y CBM2 localizado antes de TM7 (Jung, Nam et al. 2012).

Aun cuando el canal TMEM16A no parece presentar esta región sensible a voltaje equivalente a la presentada por otros canales dependientes de voltaje, donde generalmente el sensor está conformado por una serie de residuos aminoacídicos básicos (argininas o lisinas), se ha mostrado que TMEM16A presenta una región sensible a los cambios en el voltaje. Como ya ha sido mencionado, una mutación de 4 ácidos glutámicos (EEEE/AAAA) mostró que estos son cruciales para la sensibilidad al voltaje de hTMEM16A (Xiao, Yu et al. 2011; Xiao and Cui 2014). Sin embargo, en otro estudio se encontró que la remoción de los residuos EEEEE inhibe la dependencia de voltaje de hTMEM16A (Xiao and Cui 2014), por lo que el dominio EEEEEVK (Figura 2) podría tener un papel como modulador alostérico más que como un sitio de unión a Ca^{2+} . Finalmente, Ferrera y colaboradores mostraron que una isoforma, hTMEM16A (0), no es activada por voltaje (Ferrera, Scudieri et al. 2011).

De manera que, la activación del canal ocurre debido a un mecanismo complejo de interacción entre la concentración intracelular de Ca^{2+} y un cambio en el voltaje (Arreola, Melvin et al. 1996; Qu, Wei et al. 2003). Por ejemplo se ha observado que la sensibilidad del canal al Ca^{2+} es dependiente de voltaje. La EC_{50} para Ca^{2+} de TMEM16A disminuye 1.5 veces cuando se varía el voltaje de -100 mV a +100 mV (Xiao, Yu et al. 2011); pero, aún no se ha identificado el sensor de voltaje.

1.8. Farmacología de los CaCCs

La importancia de los CaCC en numerosas enfermedades, así como en diversas funciones en varios tipos celulares demanda el uso de bloqueadores específicos y potentes para estos canales. No obstante, los fármacos utilizados en la caracterización de los CaCC no son altamente específicos y es bien sabido que los bloqueadores requieren altas concentraciones lo que genera efectos secundarios y efectos sobre otros canales. Por ejemplo, el caso del ácido niflúmico (NFA, Figura 3), un bloqueador de los canales de cloruro ampliamente utilizado, también bloquea canales de potasio y genera un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Ottolia and Toro 1994; Wang, Dixon et al. 1997; Greenwood and Leblanc 2007). Wang y colaboradores, mostraron que NFA bloquea las corrientes de potasio generadas por la expresión los canales Kv4.2 y Kv4.3 en ovocitos de *X. laevis* (Wang, Dixon et al. 1997). En cambio, los canales de potasio dependientes de Ca^{2+} , son activados por NFA, en particular se ha encontrado que NFA afecta canales de calcio tipo T (Espinosa, Lopez-Gonzalez et al. 1999; Greenwood and Leblanc 2007). Por otro lado, se ha observado que el ácido 4, 4'-diisotiocianatostilben 2, 2'-disulfónico (DIDS, Figura 3) bloquea canales aniónicos regulados por volumen (VRAC) en algunos tipos celulares (Xu, Kim et al. 1997).

En los últimos años se han utilizado ampliamente diversos bloqueadores como NFA, DIDS, ácido antraceno-9-carboxílico (9AC) (Figura 3) cuyo mecanismo de inhibición aún no ha sido descrito completamente (Qu and Hartzell 2001). Sin embargo, los estudios realizados por diversos grupos, han mostrado que estos bloqueadores inhiben la corriente generada por TMEM16A con una potencia en el rango medio micromolar y son compuestos no específicos cuyos blancos son en general los canales de cloruro (Caputo, Caci et al. 2008; Schroeder, Cheng et al. 2008; Yang, Cho et al. 2008; Bradley, Fedigan et al. 2014).

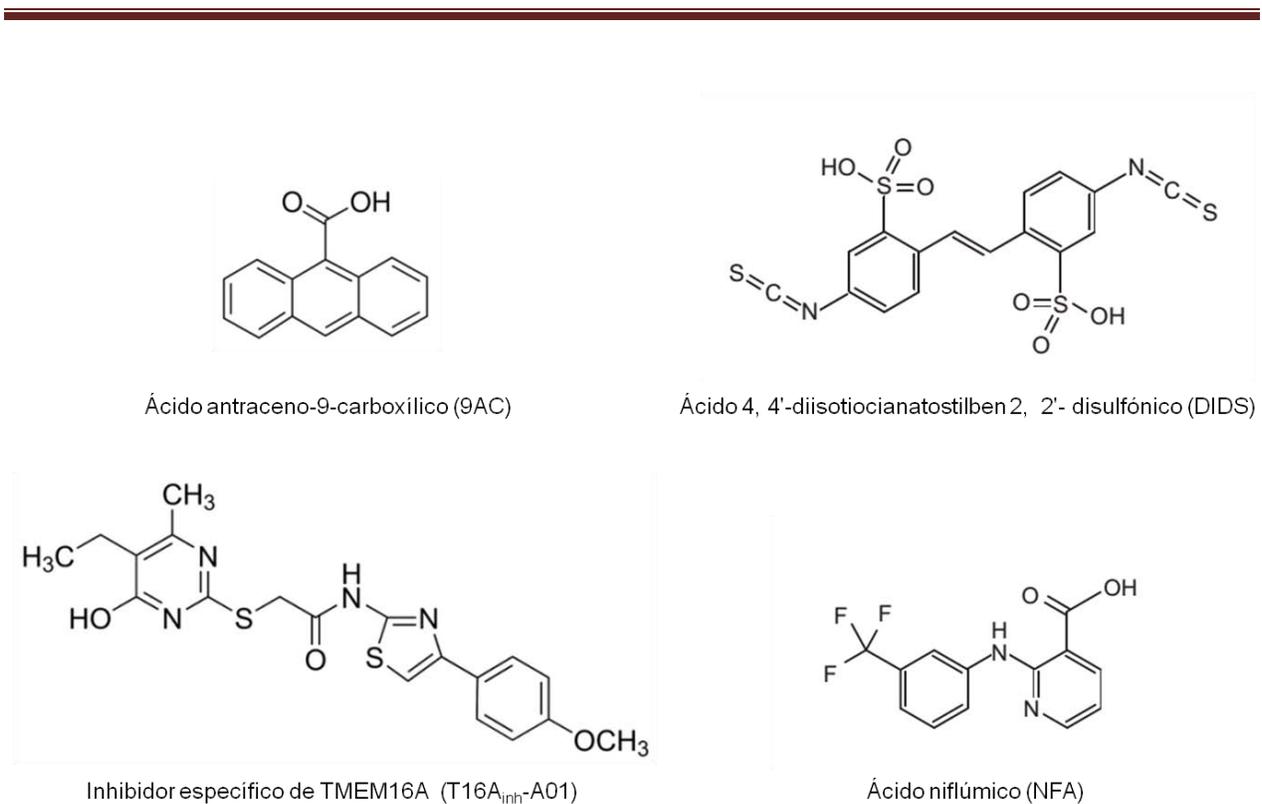


Figura 3. Estructura básica de algunos bloqueadores de los CaCC. Ácido antraceno-9-carboxílico (9AC), ácido 4, 4'-diisotiocianatostilben 2, 2'- disulfónico (DIDS), el inhibidor específico de TMEM16A, T16A_{inh}-A01 y ácido niflúmico (NFA).

Recientemente, Namkung y colaboradores encontraron nuevos moduladores de TMEM16A. Después de realizar una amplia revisión de alrededor de 110,000 compuestos, encontraron la molécula T16A_{inh}-A01 (Figura 3) que bloqueó las corrientes generadas por TMEM16A con una IC₅₀ de $\approx 1 \mu\text{M}$ (Namkung, Phuan et al. 2011). El inhibidor específico de TMEM16A, T16A_{inh}-A01 ha sido probado en diversos tejidos y se ha encontrado una IC₅₀ de 1 a 2 μM (Namkung, Phuan et al. 2011; Scudieri, Sondo et al. 2011; Davis, Shi et al. 2012; Bradley, Fedigan et al. 2014).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1.1 Expresión y distribución de xtTMEM16A en diversos tejidos de *Xenopus tropicalis*

El modelo de estudio que se utiliza en el presente trabajo son los ovocitos de la rana *X. tropicalis*. Es importante señalar que se ha caracterizado en ovocitos una corriente de salida T_{out} que es una respuesta de los CaCC endógenos del ovocito, y recientemente, mostramos que esta corriente está presente solamente en 5-10 % de los ovocitos de *X. tropicalis* a pesar de que el gen TMEM16A sí se expresa en los ovocitos (Figura 4) (Ochoa-de la Paz, Espino-Saldana et al. 2013; Pereida 2013). Además, se mostró que la microinyección de Ca^{2+} en el ovocito activa una corriente I_{CaCC} que no es generada exclusivamente por Cl^- (Pereida 2013). Estos hallazgos nos han llevado a plantear un estudio más profundo de las propiedades de las corrientes endógenas en los ovocitos de *X. tropicalis*.

Además, el gen TMEM16A genera varias isoformas a través del mecanismo de splicing alternativo. Al igual que en la proteína TMEM16A de humano, en nuestro grupo de trabajo se ha identificado que en los ovocitos de la rana *X. tropicalis*, TMEM16A presenta 4 segmentos que son incluidos o excluidos por eventos de *splicing* alternativo (Reyes, Lopez-Rodriguez et al. 2013) resultando en la generación de 5 variantes con características que no han sido descritas hasta la fecha. Los 4 exones alternativos encontrados se describirán más adelante y se nombraron de acuerdo al exón correspondiente en humano: 1b, 1d, 13 y 15 (Figura 10). Es importante notar que los exones 1b y 1d no tienen un homólogo en humano pues estos exones se localizan en una región muy variable del canal, el amino terminal. Estas variantes de xtTMEM16A se distribuyen diferencialmente en varios tejidos de *X. tropicalis* (Reyes, Lopez-Rodriguez et al. 2013). Así, la expresión del exón 1b se observó en la mayoría de los tejidos excepto el hígado y pulmón aunque se observa una baja expresión en músculo esquelético, intestino delgado y ovocitos. Asimismo, las isoformas que carecen del exón 1d están presentes en varios tejidos analizados excepto en el cerebro, el hígado y el músculo. El exón 13 permite

generar dos variantes, una que incluye al exón y otra que lo excluye y ambas están presentes solamente en el cerebro y músculo esquelético. Finalmente, el exón 15 está presente en todos los órganos excepto en ovocitos. Se encontró que xtMEM16A(13,15) es la isoforma predominante en los ovocitos seguida de xtMEM16A(1d,13,15) y xtMEM16A(1b,13,15).

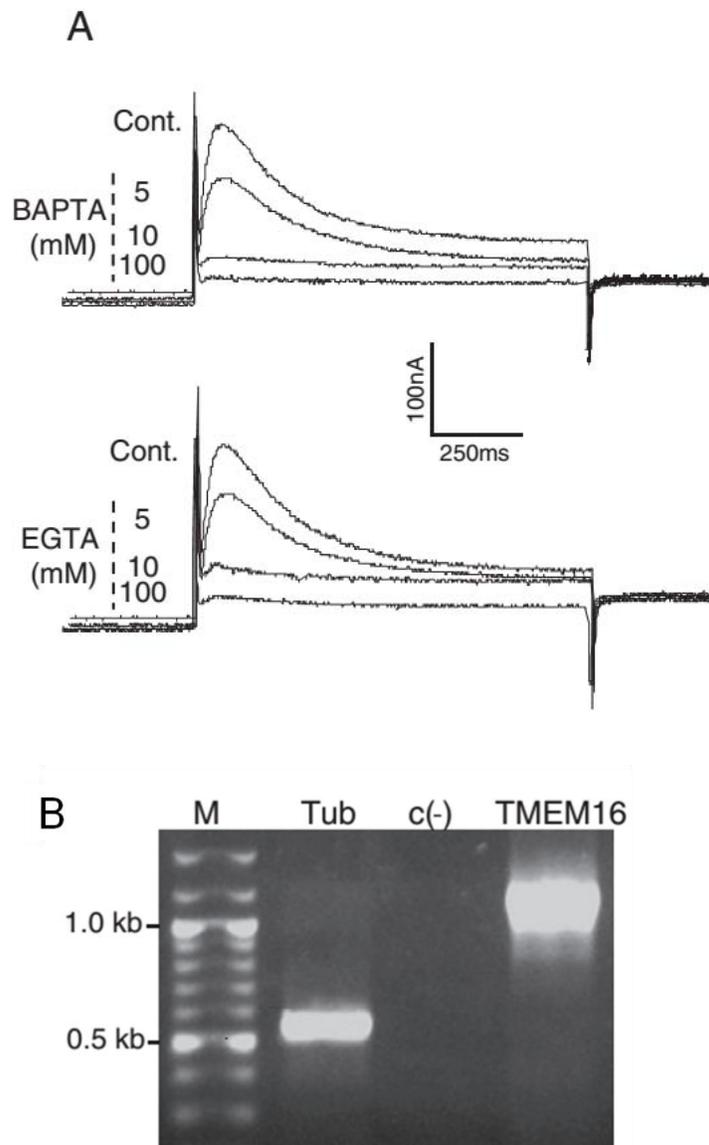


Figura 4. Corriente T_{out} en ovocitos de *X. tropicalis*.y PCR de TMEM16A A. Corriente generada por un ovocito al despolarizar la membrana a +25 mV por 2 seg. Esta corriente T_{out} fue inhibida al inyectar al ovocito los quelantes de calcio BAPTA o EGTA. B. RT-PCR mostrando la expresión del RNAm de TMEM16A en ovocitos de *X. tropicalis*.

Considerando que la corriente T_{out} se registra sólo en una fracción de ovocitos de *X. tropicalis* (Pereida 2013), en este trabajo se propone realizar la caracterización funcional de las corrientes endógenas CaCC y de las variantes de xtTMEM16A expresadas en un sistema heterólogo.

Por otra parte, proponemos establecer un modelo experimental que permita identificar el mecanismo de acción y detalles estructurales de la región del poro que determinan la interacción de algunos bloqueadores de CaCC. El planteamiento de este modelo se describe en el apartado 5.8.

2.1.2. Mutación sitio-dirigida y selectividad aniónica de xtTMEM16A

Como se refirió en los párrafos anteriores, los estudios donde se han realizado mutaciones en TMEM16A han permitido elucidar en parte el mecanismo de permeabilidad del poro del canal. Por ejemplo, Yang y colaboradores mostraron que una mutación en el residuo aminoacídico R621 por un ácido glutámico, genera una alteración en la selectividad aniónica (Yang, Cho et al. 2008). Dicha mutación se realizó en TMEM16A de ratón, de manera que tomando en cuenta la homología con TMEM16A de *X. tropicalis*, el residuo aminoacídico con posición R621 correspondería a R761 en xtTMEM16A. Basándonos en este antecedente, en nuestro grupo se generaron mutaciones sitio-dirigidas de los residuos que se predice forman el anillo de selectividad del poro (Reyes, Lopez-Rodriguez et al. 2013). Las mutaciones sitio dirigidas se realizaron cambiando, uno a uno, los residuos R646, R761, R813 y K780 por ácidos glutámicos (Figura 5A) considerando que un cambio en la carga del residuo podría generar alteraciones en el canal. En este trabajo, se mostró que una mutación en los residuos del poro R761 y R646 (R646E+R761E, llamada doble mutante) alteran la selectividad aniónica (Figura 5B) de tal manera que la variante xtTMEM16A(R646E+R761E), desplaza las curvas del potencial de reversión vs la fracción molar de la predicción de Goldman-Hodking-Katz (Reyes, Lopez-Rodriguez et al. 2013).

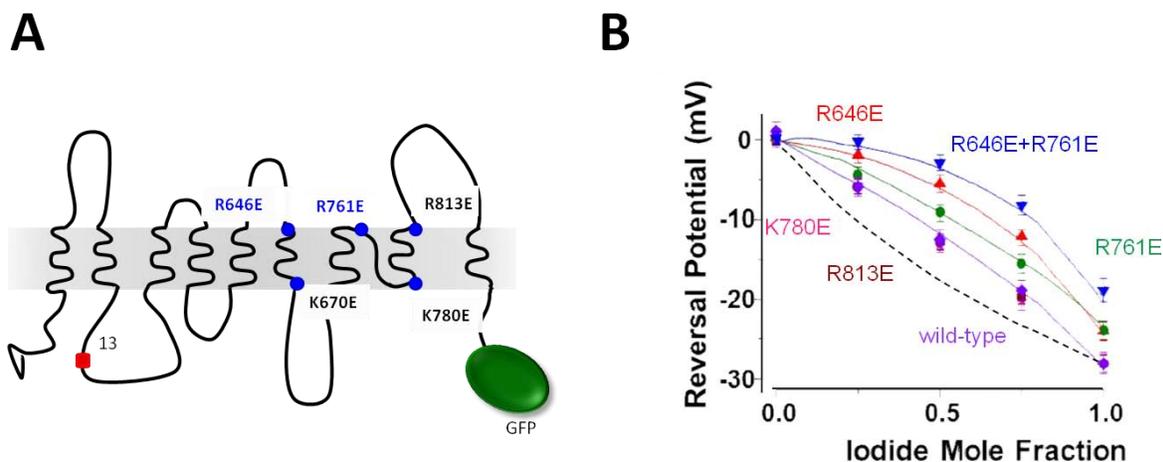


Figura 5. Localización de los aminoácidos mutados en xtMEM16A y sus implicaciones funcionales. **A.** Modelo topológico de xtMEM16A. En rojo se muestra el exón alternativo 13 encontrado en ovocitos de *X. tropicalis*. En azul y negro se muestran los residuos R646, R761, R813 y K780 que fueron mutados por ácido glutámico y en verde se muestra la proteína verde fluorescente acoplada al carboxilo terminal de xtMEM16A. **B.** La variante xtMEM16A(R646E+R761E), desplaza las curvas del potencial de reversión vs la fracción molar de la predicción de Goldman-Hodging-Katz. Modificado de (Reyes, Lopez-Rodriguez et al. 2013).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la farmacología de los CaCC es muy ambigua debido a que las diferentes sensibilidades a bloqueadores dependen de la preparación biológica y del sistema de expresión utilizado. En este proyecto, se utilizaron cuatro bloqueadores de canales de Cl^- : DIDS, NFA, 9-AC y T16A_{inh}-A01; para los cuales se cuenta con evidencia previa de que actúan a nivel del poro aniónico de los CaCC. Entonces, para identificar el mecanismo de acción y detalles estructurales de la región del poro de xtMEM16A que determinan la unión de los bloqueadores, en este proyecto se realizó un estudio dirigido a conocer las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas en un sistema de expresión nativo y en un sistema de expresión heterólogo. Respecto a las mutaciones en los residuos del poro generados por nuestro grupo y dado que las observaciones se desvían de la predicción de Goldman-Hodging-Katz (Reyes, Lopez-Rodriguez et al. 2013), se puede inferir que los aniones que permean el poro, interaccionan con TMEM16A. Por tanto, estudiamos si estas mutaciones, R761E y R646E alteran la afinidad y dependencia de voltaje en relación al bloqueo de los fármacos propuestos. Este modelo experimental podría ayudarnos a esclarecer el mecanismo de acción y detalles estructurales de la región del poro que determinan la unión de los bloqueadores y nos permitirá profundizar en la comprensión de las propiedades del canal TMEM16A.

3. HIPÓTESIS

1.- Las variantes de TMEM16A de *X. tropicalis* expresadas heterológamente en células HEK-293, tienen características electrofisiológicas y farmacológicas similares a las corrientes CaCC endógenas de ovocitos.

2.- Las mutaciones en los residuos R646E y R761E de xtTMEM16A, resultan en cambios en la sensibilidad del canal a los bloqueadores DIDS, T16A_{inh}-A01 y 9AC respecto a la variante sin mutaciones

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de las corrientes CaCC de ovocitos de *X. tropicalis* y de las variantes xtTMEM16A expresadas de manera heteróloga en células HEK-293.

Determinar la contribución de los residuos R646 y R761 de xtTMEM16A que forman parte del poro del canal en el bloqueo farmacológico.

4.1. Objetivos específicos

- Caracterizar el efecto de los bloqueadores de canales de Cl⁻ sobre la respuesta de las corrientes CaCC endógenas del ovocito de *X. tropicalis*.
- Caracterizar las propiedades electrofisiológicas de las variantes de TMEM16A de *X. tropicalis* expresadas en células HEK-293.
- Determinar la contribución de los residuos R646 y R761 en el bloqueo farmacológico utilizando la variante xtTMEM16A y la doble mutante xtTMEM16A(R646E+R761E) expresada en células HEK-293.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de ovocitos de *X. tropicalis*

Todos los animales se manipularon de acuerdo a la guía del cuidado animal de la Universidad Nacional Autónoma de México y fue aprobado por el comité de Bioética del Instituto de Neurobiología. Para la obtención de los ovocitos, primero se anestesiaron ranas *X. tropicalis* por inmersión en Tricaína metano sulfonato (MS-222) al 0.1 % durante 10-15 minutos. Posteriormente, se realizó una pequeña incisión en el abdomen de la rana (Figura 6A) para coleccionar los ovocitos sin dañarlos. Los ovocitos extraídos se colocaron en una caja Petri con una solución de Barth (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM $\text{Ca}_2(\text{NO})_3$, 0.4 mM CaCl_2 , 2.4 mM NaHCO_3 , 0.82 mM MgSO_4 y 5 mM de HEPES; pH 7.4 adicionado con 0.1 mg/ml de sulfato de gentamicina). La remoción de las células foliculares que cubren a los ovocitos se realizó manualmente mediante unas pinzas de punta fina (Figura 6B). Los ovocitos utilizados fueron únicamente los que estaban en los estadios de desarrollo V/ VI y se mantuvieron en una caja Petri a 16°C en solución de Barth hasta el momento del registro. Finalmente, la rana fue suturada y devuelta a un estanque donde su recuperación fue monitoreada por un período de dos semanas.

5.2. Inyección de ovocitos

Para determinar la distribución de TMEM16A en los ovocitos, se aislaron por disección ovocitos en estadios V y VI de ranas *X. laevis* como ya se describió anteriormente. La remoción de las células foliculares se realizó colocando los ovocitos en 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de colagenasa tipo I durante 35 minutos en agitación constante a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, los ovocitos se lavaron varias veces con solución Ringer normal y se almacenaron en solución de Barth a 16°C. Para rastrear e identificar la proteína TMEM16A en los ovocitos, se utilizó una

quimera con la variante xtMEM16A(13) (descrita en la sección 6.5) acoplada a la proteína verde fluorescente (GFP), esta quimera se denominó: xtMEM16A(13)-GFP. El día siguiente, se microinyectaron 18 nL del cDNA de xtMEM16A(13)-GFP (a una concentración de 500 ng/ μ L) en el núcleo de los ovocitos. Para la inyección de los ovocitos, se utilizó el micro inyector Nanoliter 2000 (World Precision Instruments). Como control positivo, se inyectaron ovocitos con GFP bajo las mismas condiciones.

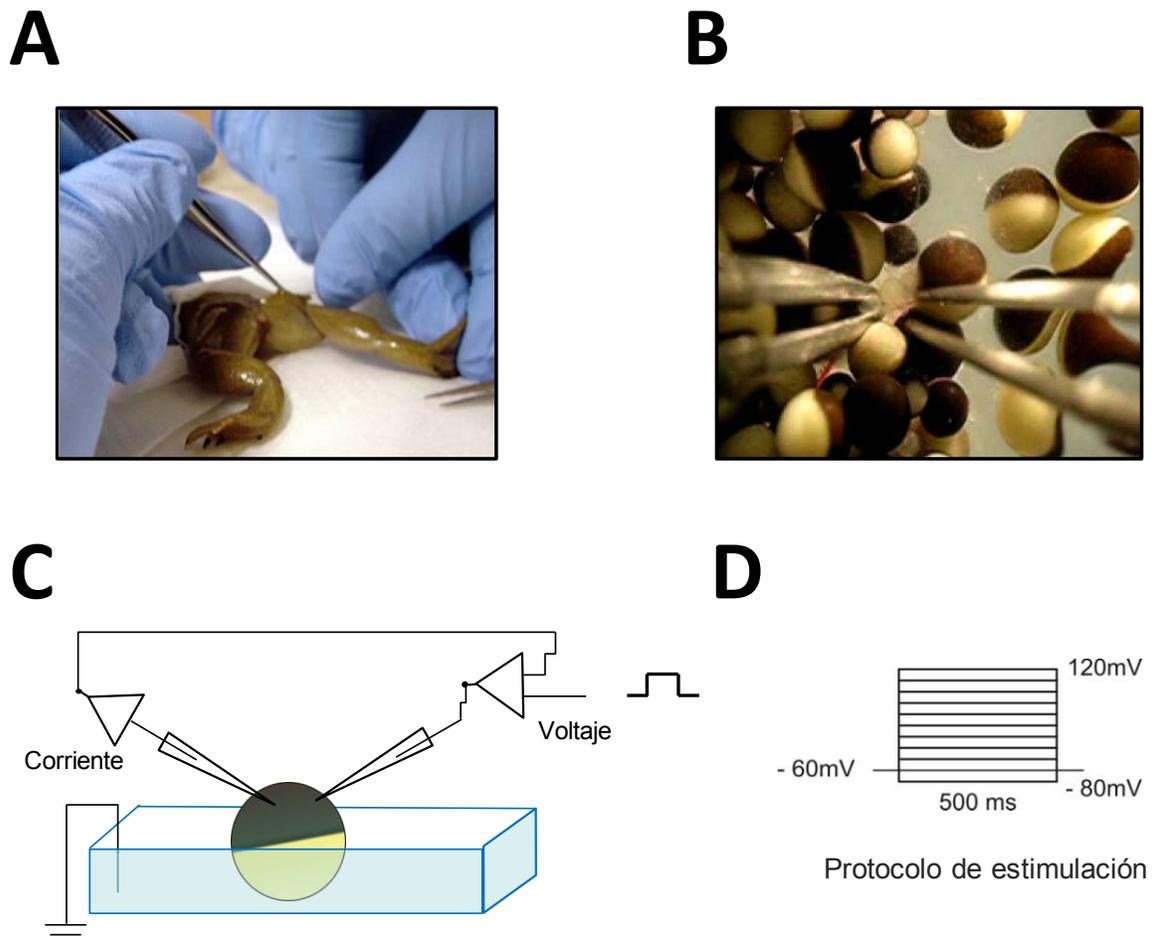


Figura 6. Obtención de los ovocitos de *X. tropicalis*. **A.** Los ovocitos se aislaron por disección de ranas *X. tropicalis* mediante una pequeña incisión en el abdomen suficiente para coleccionar los ovocitos. **B.** La remoción de las células foliculares que cubren a los ovocitos se realizó manualmente mediante unas pinzas de punta fina. **C.** Los registros electrofisiológicos se realizaron mediante la técnica de voltaje por dos electrodos dentro de 1-3 días después de la extracción de los ovocitos. **D.** Protocolo de estimulación.

Después de la inyección del cDNA, los ovocitos se mantuvieron a 16 °C en solución de Barth. Los ovocitos que expresaron xtTMEM16A(13)-GFP se observaron 48, 72 y 96 horas después de la inyección en un microscopio confocal (LSM 510 META Zeiss) con un objetivo EC Plan-Neofluar 20x/0.5 M27 y 488 nm para la excitación de la proteína GFP.

5.3. Registro de ovocitos

Los registros electrofisiológicos se realizaron a temperatura ambiente (21-23 °C) dentro de 1-3 días después de la extracción de los ovocitos. Las corrientes se registraron mediante la técnica de fijación voltaje con dos electrodos (Figura 6C). Los electrodos de registro se fabricaron utilizando capilares de borosilicato (Sutter Instruments) con un estirador de pipetas Sutter Instrument modelo P-97. Los electrodos fueron llenados con una solución 3 M de KCl y en esta solución su resistencia fue de 1-2 MΩ. Para la activación de las corrientes endógenas en los ovocitos, se utilizó un protocolo de pasos de voltaje de -80 mV a 120 mV con incrementos de 20 mV, un potencial de mantenimiento de -60 mV y una duración de 500 ms. El potencial de mantenimiento fue de -60 mV. Los datos fueron adquiridos con un amplificador Axoclamp-2B (Axon Instruments) controlado mediante el programa pClamp 10.3 y una Digidata 1440A (Molecular Devices). Para realizar el intercambio de soluciones, se utilizó un sistema de perfusión mediante gravedad (5-10 ml/minuto) y una cámara de registro de 0.5 ml. La solución extracelular utilizada para los experimentos tiene la siguiente composición (Solución Ringer normal): 115 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂ y 5 mM HEPES (pH 7.4). Con la finalidad de optimizar la entrada de Ca²⁺ al citoplasma del ovocito a través de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (VACC) presentes en la membrana (Weber 1999), se utilizó una solución extracelular con 10 mM de Ca²⁺ 10 mM (115 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM CaCl₂ y 5 mM HEPES, pH 7.4) Para comprobar si la entrada de Ca²⁺ a través de los VACC es responsable de la activación de la I_{CaCC}, la solución Ringer normal fue sustituida por una solución 10 mM Mn²⁺ en algunos experimentos (115 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Mn²⁺ y 5 mM HEPES, pH 7.4). Para la caracterización farmacológica se utilizaron los siguientes bloqueadores: NFA, DIDS y 9AC.

5.4. Las isoformas de xtTMEM16A

Como ya se había mencionado, en nuestro grupo de trabajo, se identificaron 5 variantes por *splicing* alternativo de la secuencia codificante de xtTMEM16A con número de acceso KF983358, KF983359, KF983360, KF983361 y KF747702 en el GenBank (Reyes, Lopez-Rodriguez et al. 2013; Huanosta-Gutierrez, Espino-Saldana et al. 2014). Dichas variantes fueron clonadas en el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen™). Con la finalidad de estimar la eficiencia de transfección e identificar a las células transfectadas por epifluorescencia, estas se cotransfectaron con un plásmido pCherry como se describe en la sección 5.6.2. Además, se construyó una quimera con la variante xtTMEM16A(13), que sólo presenta un exón alternativo, acoplada a GFP (xtTMEM16A(13)-GFP) utilizando el plásmido pEGFPN1. Esta variante xtTMEM16A(13) se utilizó en los registros de la sección 6.6 (denominada variante silvestre o WT) y fue caracterizada electrofisiológicamente para demostrar que GFP no altera las propiedades del canal (Ver Figura A1). La caracterización funcional se llevó a cabo en células HEK-293 (Human Embryonic Kidney 293) transfectadas con cada una de las construcciones.

5.5. Transformación de bacterias competentes

El plásmido que contiene el cDNA de xtTMEM16A se utilizó para transformar bacterias competentes *E. coli* XL1-Blue que fueron provistas por la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología, UNAM. Para transformar las bacterias *E. coli*, se siguió el siguiente protocolo: se descongelaron las células competentes en hielo. Posteriormente, se transfirieron 100 µl de las células competentes a tubos Eppendorf de 1.5 ml, se mezclaron con 1 ng de DNA de xtTMEM16A y se incubaron por 30 minutos en hielo. A continuación, se colocó el plásmido a 42 °C durante 90 segundos para someterlo a un shock térmico y se regresó el tubo Eppendorf al hielo durante 5 minutos. En seguida se añadió a cada tubo 500 µl de medio SOC (2 % triptona, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa) y se dejó incubando a 37 °C durante 1 hora en agitación. Después de este lapso de tiempo, se tomaron 100 µl de la

mezcla y se sembraron en una placa con Agar-LB-antibiótico (kanamicina ó ampicilina) procurando que se cubriera toda la superficie del agar. Posteriormente, se incubó la placa de agar a 37 °C durante 16 horas. Una vez obtenidas las colonias en las placas, se tomó una colonia de bacterias asiladas y se colocó para su propagación en 50 ml de medio LB adicionado con 150 µl de kanamicina (ó 200 µl de ampicilina) y se dejó incubar a 37 °C durante 20 horas en agitación constante. La purificación del plásmido se llevó a cabo mediante el kit Plasmid Plus Midi kit 100 (QIAGEN). Se colocaron 25 ml de las bacterias transformadas en medio LB y se centrifugó a 10,000 rpm a temperatura ambiente por 2 minutos. Se decantó y el sobrenadante se procesó siguiendo las instrucciones del kit Plasmid Plus Midi Kit.

5.6. Expresión heteróloga en células HEK-293

La caracterización electrofisiológica de xtTMEM16A se realizó en células HEK-293 ya que esta línea celular no expresa de manera endógena los canales de cloruro dependientes de Ca^{2+} por lo que permite la fácil caracterización de corrientes generadas por la proteína xtTMEM16A.

5.6.1. Mantenimiento de la línea celular HEK-293

Las células HEK-293 se mantuvieron en botellas para el cultivo de células T-25 a 37 °C en una atmósfera húmeda de 95 % O_2 – 5 % de CO_2 utilizando medio de cultivo DMEM (Dubelcco's modified Eagle's medium, Gibco) que contiene: 4.5 g/L D glucosa, L-Glutamina y 110 mg/L piruvato de sodio suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco) y 1 % de penicilina y estreptomina (Gibco). El medio de cultivo se cambió cada 3 días y cuando las células alcanzaron un 90 % de confluencia en la botella T-25, se re sembraron a una menor densidad. Para transferir las células, se retiró el medio DMEM, se lavaron con buffer fosfato salino (PBS), se agregaron 2 ml de EDTA-tripsina (Gibco) y se incubaron a 37 °C durante 1-2 minutos. Una vez que las células se despegaron, la actividad de la tripsina se inhibió con 4 ml de DMEM

adicionado con 10 % de SFB y se separaron los agregados de células utilizando una pipeta Pasteur estéril. Una parte de las células se re suspendieron en botellas estériles T-25 con medio fresco. La otra parte de las células se sembró a una confluencia de 30-40 % sobre cubreobjetos de 1 cm x 0.5 cm previamente tratados con poli-L-lisina (Sigma) para su transfección ulterior. Toda la manipulación de la línea celular se realizó en una campana de flujo laminar con material estéril.

5.6.2. Transfección transitoria de las isoformas xtMEM16A

Para realizar la transfección, las células HEK-293 se sembraron previamente como se describió en la sección anterior. Cinco horas después, se realizó la transfección del plásmido con las isoformas de xtMEM16A utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante: se diluyeron 2 µg de plásmido en 250 µl de medio de cultivo sin suero en un tubo Eppendorf (tubo A, Figura 7) y en otro tubo Eppendorf (tubo B, Figura 6), se diluyeron 9 µl de Lipofectamina 2000 en 250 µl de medio de cultivo sin suero. Se dejaron incubar ambos tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se vertió el contenido del tubo B en el tubo A y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, se añadieron los 500 µl de la mezcla de transfección a las células previamente sembradas (Figura 7). En el caso de las isoformas que no están acopladas a GFP, se realizó una cotransfección con el plásmido pmCherry (tubo C, Figura 7) en una relación 3:1. Como control positivo de la transfección, se utilizó un plásmido que expresa GFP (pEGFP N1). La mezcla se incubó con las células 4-5 horas a 37 °C en la incubadora y al final de este periodo de tiempo, se reemplazó todo el medio por DMEM suplementado con SFB. Los registros electrofisiológicos se realizaron a temperatura ambiente 24-48 horas después de la transfección.

El marcaje de la membrana con FM4-64 se realizó 24 horas después de la transfección con xtMEM16A(13)-GFP. Las células HEK-293 fueron incubadas en hielo por 1 minuto con 20 µg/ml de FM4-64FX (Molecular Probes) diluido en solución salina balanceada de Hank sin Ca²⁺ o Mg²⁺. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal (LSM 510 META Zeiss). Se utilizó un objetivo EC Plan-Neofluor 40x/NA 1.35 de inmersión en aceite y se excitó GFP con una

longitud de onda de 488 nm y FM4-64FX con 561 nm. Las rebanadas ópticas fueron de 2 μm y el análisis de datos se realizó mediante el software Image J (National Institutes of Health). Como control positivo se transfectó solamente GFP.

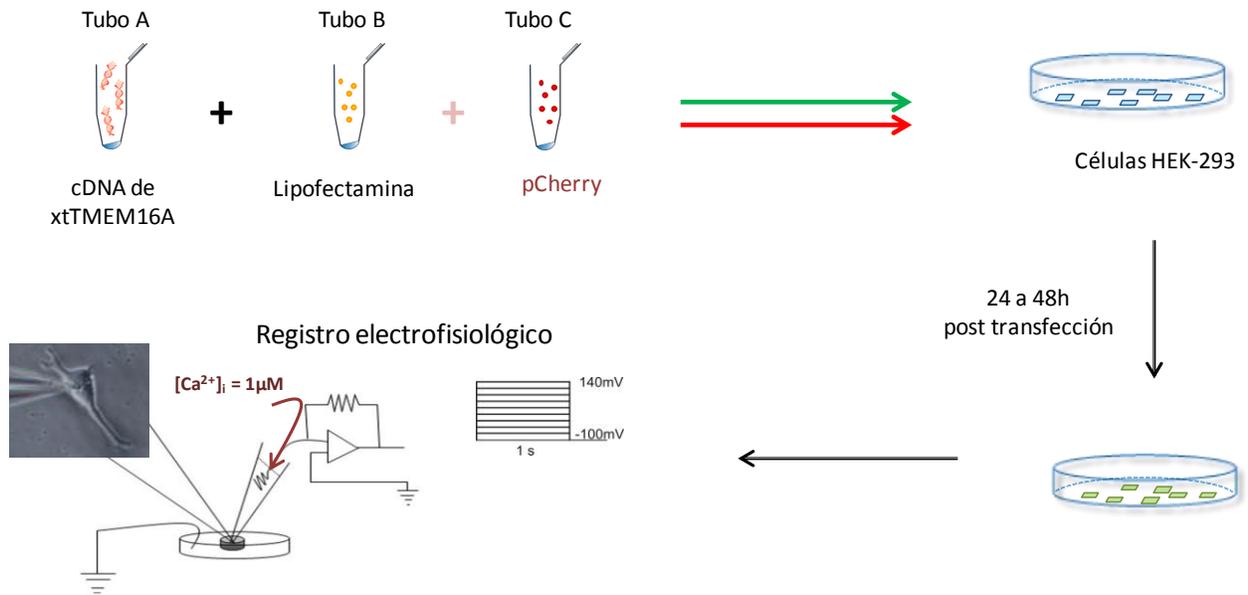


Figura 7. Transfección de las isoformas xtMEM16A en células HEK-293. El cDNA de las isoformas de xtMEM16A se mezcló con Lipofectamina y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, se añadió la mezcla de transfección a las células previamente sembradas y 24-48 horas después de la transfección se realizó el registro electrofisiológico.

5.7. Registro electrofisiológico de células HEK-293

Para realizar el registro se colocaron los cubreobjetos con las células 24-48 horas después de la transfección en una cámara de registro rectangular. Las células se mantuvieron a temperatura ambiente (21-23 $^{\circ}\text{C}$) y se perfundieron por gravedad a una velocidad de 1-2 ml/minuto con una solución extracelular de composición: 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 4 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES (pH 7.3). El líquido en la cámara se mantuvo constante mediante una

aguja hipodérmica conectada a un sistema de succión. Los electrodos de registro se fabricaron con capilares de borosilicato (Sutter Instruments) con un estirador de pipetas modelo P-97 de Sutter Instruments y tuvieron una resistencia de 4-6 M Ω . La solución intracelular tiene la siguiente composición: 150 mM NaCl, 9 mM CaCl₂, 10 mM EGTA, 4 mM MgCl₂, 10 mM HEPES (pH 7.4). Se estimó que la concentración libre de Ca²⁺ en esta solución es de \approx 1 μ M mediante el uso del software Winmaxc32 (Patton, Stanford University, USA).

Para la caracterización de las corrientes en células HEK-293 se utilizó un protocolo de pasos de voltaje que van desde -100 mV hasta +140 mV con incrementos de 30 mV y con una duración de 1 segundo. Para observar la cinética de desactivación de la corriente de cola, se realizó una repolarización a -100 mV (Figura 7). El potencial de mantenimiento fue de -60 mV. Para evaluar el efecto de los bloqueadores a distintos voltajes, se utilizó un protocolo de rampas de voltaje de -70 mV a 130 mV durante 1 segundo y un protocolo de dos pulsos de voltaje (100 mV y 140 mV) con una duración de 1 segundo. Los datos fueron adquiridos mediante un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments) controlado mediante el programa pClamp versión 8.0 (Axon Instruments). Para la adquisición y procesamiento de datos se utilizó un convertidor A/D Digidata 1200 (Axon Instruments).

Para la farmacología se utilizó el bloqueador 9AC y T16A_{inh}-A01. Con el fin de construir la curva dosis respuesta, los bloqueadores se aplicaron en el baño extracelular a distintas concentraciones: 9AC a concentraciones de 3, 10, 30, 100 y 300 μ M y T16A_{inh}-A01 a concentraciones de 0.3, 1, 3, 10 y 30 μ M. Los cambios de soluciones se realizaron mediante un sistema de perfusión por gravedad que permitió realizar cambios rápidos de soluciones. Antes de registrar las células, éstas se observaron en un microscopio de epifluorescencia para identificar a las células transfectadas de manera que sólo se registraron aquellas células que presentaron fluorescencia.

5.8. Adquisición y análisis de datos

En el caso de los registros de ovocitos, la adquisición de datos se realizó con el programa pClamp 10.3 (Axon Instruments) y en los registros de células HEK-293 con el programa pClamp 8.0. Estos programas permitieron diseñar los protocolos de estimulación eléctrica. La presentación gráfica de los datos así como el análisis se realizaron con los programas ORIGIN 8.0 y GraphPad Prism 5.

Para calcular el efecto de los bloqueadores en los registros en ovocitos, se midió el máximo de la amplitud de la corriente a 120 mV. Para calcular la relación dosis respuesta en los bloqueadores DIDS, NFA, 9AC y T16A_{inh}-A01, se realizó un cociente de la máxima amplitud entre la amplitud de la corriente en presencia del bloqueador. Los datos se ajustaron a una ecuación de Hill. Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando la prueba estadística ANOVA de una vía seguida de una prueba posterior de comparación múltiple Bonferroni y se consideró como estadísticamente significativo un valor de $P < 0.05$. Todos los datos se presentaron como la media \pm error estándar de la media (SEM). En todos los casos, n indica el número de ovocitos (células) y N indica el número de ranas evaluadas.

En los registros en células HEK-293, las constantes de activación y desactivación se calcularon mediante el ajuste exponencial de las corrientes activadas a +100 mV o las corrientes de cola a -100 mV. Para evaluar si existe alguna diferencia entre las corrientes activadas durante los pulsos hiperpolarizantes, se obtuvo la relación (I_{start} / I_{end}) de la amplitud de la corriente medida al inicio del pulso (I_{start}) a -100 mV con respecto a la corriente medida al final del pulso (I_{end}) como se indica en la Figura 13. Tanto en las células HEK-293 como en los ovocitos, se calculó la densidad de corriente (pA/pF) mediante el cociente de la amplitud máxima de la corriente entre la capacitancia de la membrana (densidad de corriente = I_{max} / C_m).

Para caracterizar el efecto los bloqueadores (9AC y T16A_{inh}-01) sobre la respuesta de los canales xTMEM16A, se estimó la fracción del potencial eléctrico (δ) que experimenta cada bloqueador en el poro del canal. El δ se calculó en base a la dependencia de la constante de disociación (K_i) con el voltaje de acuerdo al modelo descrito inicialmente por Woodhull (Woodhull 1973; Hille 1992). Para aplicar el modelo, se utilizó un protocolo de rampas de -70 mV a 130 mV durante 1

segundo. Bajo este protocolo se obtuvo una relación corriente-voltaje de las I_{ClCa} (Figuras 17A-B-18A-B), el cociente de la corriente en presencia del bloqueador entre la corriente en ausencia del bloqueador ($I/I_{BLOQ=0}$) y los valores del cociente $I/I_{BLOQ=0}$ se graficaron en función del voltaje (Figura 17C-18C). Las corrientes $I/I_{BLOQ=0}$ a distintos potenciales se graficaron en función de la concentración del bloqueador para determinar la constante de disociación K_i (Figura A2 APENDICE). Las constantes de disociación se calcularon ajustando los valores a la siguiente ecuación (Ecuación 1):

$$\frac{I}{I_{BLOQ=0}} = I_{min} + \frac{(I_{max} - I_{min})}{\left\{1 + \left(\frac{[BLOQ]}{K_i}\right)^n\right\}}$$

Donde I_{max} e I_{min} son las amplitudes máximas y mínimas, K_i es la constante de disociación, $[BLOQ]$ es el bloqueador y n es la pendiente. Finalmente, los valores calculados de K_i se graficaron en función del voltaje y se ajustaron a la siguiente ecuación (Ecuación 2):

$$\log K_i(V) = \frac{zF\delta}{2.303RT} V + \log K_i(V_{I=0})$$

Donde $K_i(V)$ se calcula de los valores obtenidos de la ecuación anterior a cada voltaje, z es la carga eléctrica del bloqueador, R la constante de los gases ideales, T la temperatura en grados Kelvin, F la constante de Faraday. La ecuación establece la fracción de campo eléctrico transmembranal que experimenta el bloqueador en el poro del canal. Entonces, la distancia eléctrica δ se estima a partir de la pendiente (m) de la recta.

Por lo tanto, $\delta = 2.303RTm/zF$

A partir de este análisis, se puede tener una aproximación de los sitios de unión del inhibidor en el canal (Qu and Hartzell 2001).

6. RESULTADOS

6.1. Activación de las corrientes I_{CaCC} en ovocitos de *X. tropicalis*

Para lograr el primer objetivo de esta tesis que es: caracterizar el efecto de los bloqueadores de canales de Cl^- sobre la respuesta de las corrientes CaCC endógenas del ovocito de *X. tropicalis*, primero establecimos un protocolo que nos permitiera evaluar las corrientes I_{CaCC} . Como ya se había mencionado, Miledi observó en los ovocitos una corriente transitoria de salida (T_{out}) en los ovocitos de *X. laevis* (Miledi 1982). Esta misma corriente fue observada cuando se aplica un pulso de potencial positivo +20 mV (Figura 8A). Sin embargo, aun cuando la T_{out} se ha observado en los ovocitos de *X. tropicalis* (Pereida 2013), en nuestro laboratorio, esta corriente se observó solamente en 5-10 % de los ovocitos de *X. tropicalis* examinados, Figura 4A (Ochoa-de la Paz, Espino-Saldana et al. 2013). El número limitado de ovocitos que presentan T_{out} puede ser debido a un escaso número de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en la membrana. Esta limitante nos llevó a probar otro protocolo de estimulación con pasos de voltaje de -80 mV a +120 mV (Figura 8B) como se describió en la metodología. Asimismo con la finalidad de optimizar la entrada de Ca^{2+} al interior del ovocito, se utilizó una solución con una alta concentración de Ca^{2+} extracelular (10 mM) y se observó que la amplitud de la corriente aumentaba significativamente (Contrastar Figura 8B y 8C).

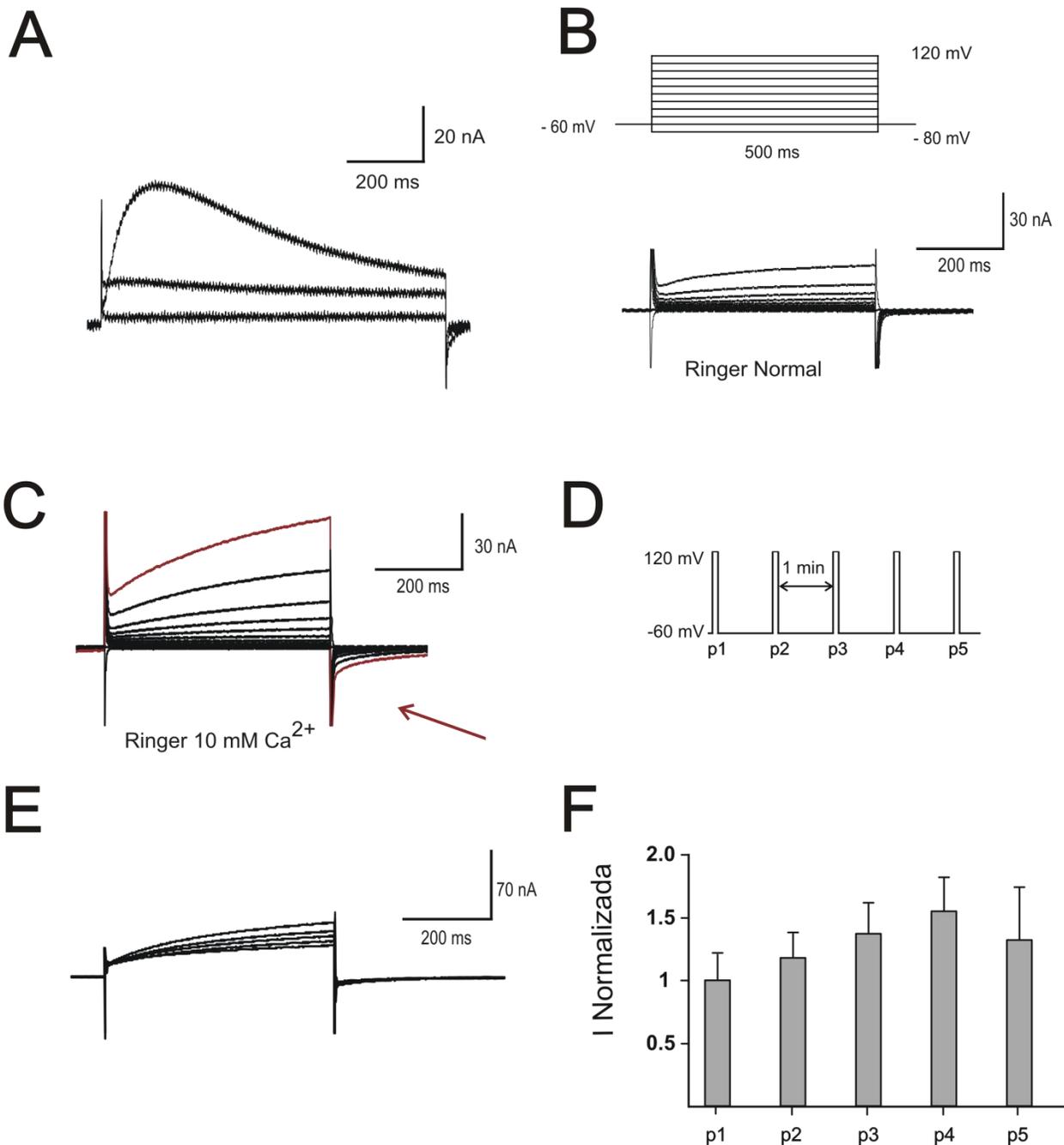


Figura 8. Corrientes I_{CaCC} en ovocitos de *X. tropicalis* y de *X. laevis*. **A.** Trazos representativos de la activación de la corriente transitoria de salida T_{out} en ovocitos de *X. laevis* **B.** Protocolo utilizado para activar las corrientes I_{CaCC} y trazos representativos de las corrientes I_{CaCC} en un ovocito de *X. tropicalis*; registros en solución extracelular Ringer normal (1.8 mM de Ca^{2+}) y **C** registros en solución 10 mM de Ca^{2+} . La flecha roja indica la corriente de inactivación de I_{CaCC} **D.** Protocolo de pulsos despolarizantes consecutivos con intervalos de 1 minuto entre cada uno **E.** Trazos representativos de los cambios en la amplitud de la corriente. **F.** Amplitud normalizada de las corrientes I_{CaCC} ante pulsos consecutivos despolarizantes de 120 mV. No se observaron cambios significativos en la amplitud. ($P < 0.05$, $n = 7$, $N = 5$).

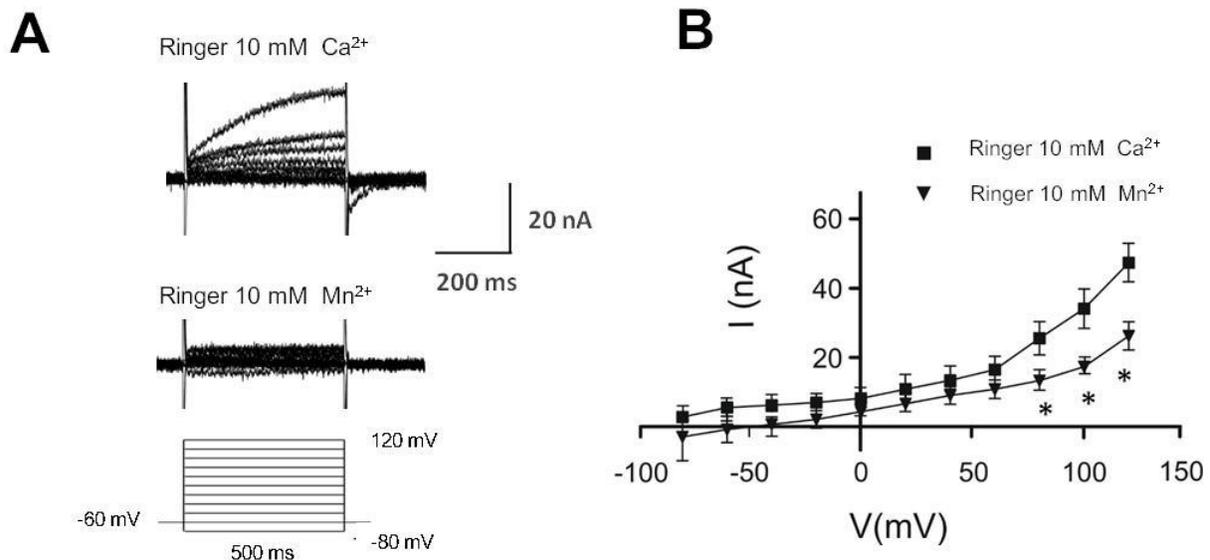


Figura 9. Las corrientes CaCC en ovocitos de *X. tropicalis* se inhiben al sustituir el Ca^{2+} extracelular por Mn^{2+} . **A.** Trazos representativos de la activación de las corrientes endógenas en solución Ringer 10 mM de Ca^{2+} y la sustitución del Ca^{2+} en la solución por Mn^{2+} (10 mM). Se utilizó un protocolo de pasos de voltaje con una duración de 500 ms desde -80 mV hasta +120 mV. **B.** Curva Corriente-Voltaje correspondiente a las corrientes endógenas CaCC en ovocitos de *X. tropicalis*, la amplitud de la corriente fue medida al final del pulso. n= 7, N=5, * muestra una diferencia significativa, $P < 0.05$, ANOVA de una vía y prueba *post-hoc* de Bonferroni.

Cuando el ovocito se sometió a un protocolo de pasos de voltaje (de -80 mV a +120 mV), se generaron corrientes que mostraron rectificación saliente dependiente de voltaje. La I_{CaCC} presentan una densidad de corriente promedio de 48.18 ± 8.22 nA/pF a +120 mV. Es conocido que la Tout de ovocitos de *X. laevis* no desensibiliza cuando es activada a través de la aplicación de pulsos consecutivos de voltaje (Parker y Miledi, 1984), por lo que para mostrar que no hay un aumento o disminución de la amplitud de la corriente en los ovocitos de *X. tropicalis*, se aplicaron cinco pulsos de voltaje de -60 a 120 mV (con una duración de 500 ms) con un intervalo entre ellos de un minuto (Figura 8D) en solución extracelular 10 mM de Ca^{2+} . Bajo este protocolo, se observa que una tendencia de la amplitud de la corriente a aumentar, pero no es estadísticamente significativa (ANOVA de una vía y prueba *post-hoc* de Bonferroni (Figura 8E,F).

En el 90 % de los ovocitos, la constante de activación medida en la I_{CaCC} a +120 mV es de $\tau_{act} \approx 188.39 \pm 12.68$ ms (Figura 8C en rojo).

Para evaluar si la corriente es dependiente del Ca^{2+} extracelular, se registraron los ovocitos en una solución en la que se sustituyó completamente el Ca^{2+} por Mn^{2+} . A +120 mV, se encontró una reducción de la amplitud de la corriente de un 50% (Figura 9), lo que sugiere que la mayoría de los canales responsables de la activación de la corriente CaCC son dependientes del Ca^{2+} . Pero además revela la presencia de un segundo componente que es independiente de calcio (Ochoa de la Paz et al 2013).

6.2. Caracterización farmacológica de las corrientes CaCC en ovocitos de *X. tropicalis*

Una vez establecido un protocolo que nos permitió obtener corrientes endógenas I_{CaCC} en los ovocitos, se caracterizó el efecto de los bloqueadores de canales de cloruro: 9AC, DIDS y NFA. Para construir la curva dosis-respuesta, se aplicaron los bloqueadores en el baño extracelular durante 5 minutos a distintas concentraciones: 3, 10, 30, 100 y 300 μ M. Los registros se realizaron en una solución extracelular con 10 mM de Ca^{2+} y la amplitud de la respuesta se normalizó con respecto a la máxima obtenida en ausencia del bloqueador.

La I_{CaCC} muestra diferencias en la sensibilidad a los distintos bloqueadores. Como se observa en los trazos representativos de la Figura 10 A-D, la inhibición de las corrientes a la máxima concentración del bloqueador es del: 71 % para 9AC, 57 % para DIDS y 69 % para NFA. Cabe comentar que no ocurre un bloqueo completo como ya ha sido reportado en otros trabajos (White and Aylwin 1990; Qu and Hartzell 2001; Bradley, Fedigan et al. 2014). Los bloqueadores inhiben la corriente del canal de manera dependiente de la concentración (Figura 10E) con una IC_{50} medida a +120 mV de: DIDS (52.9 μ M), NFA (57.9 μ M) y 9-AC (66.3 μ M).

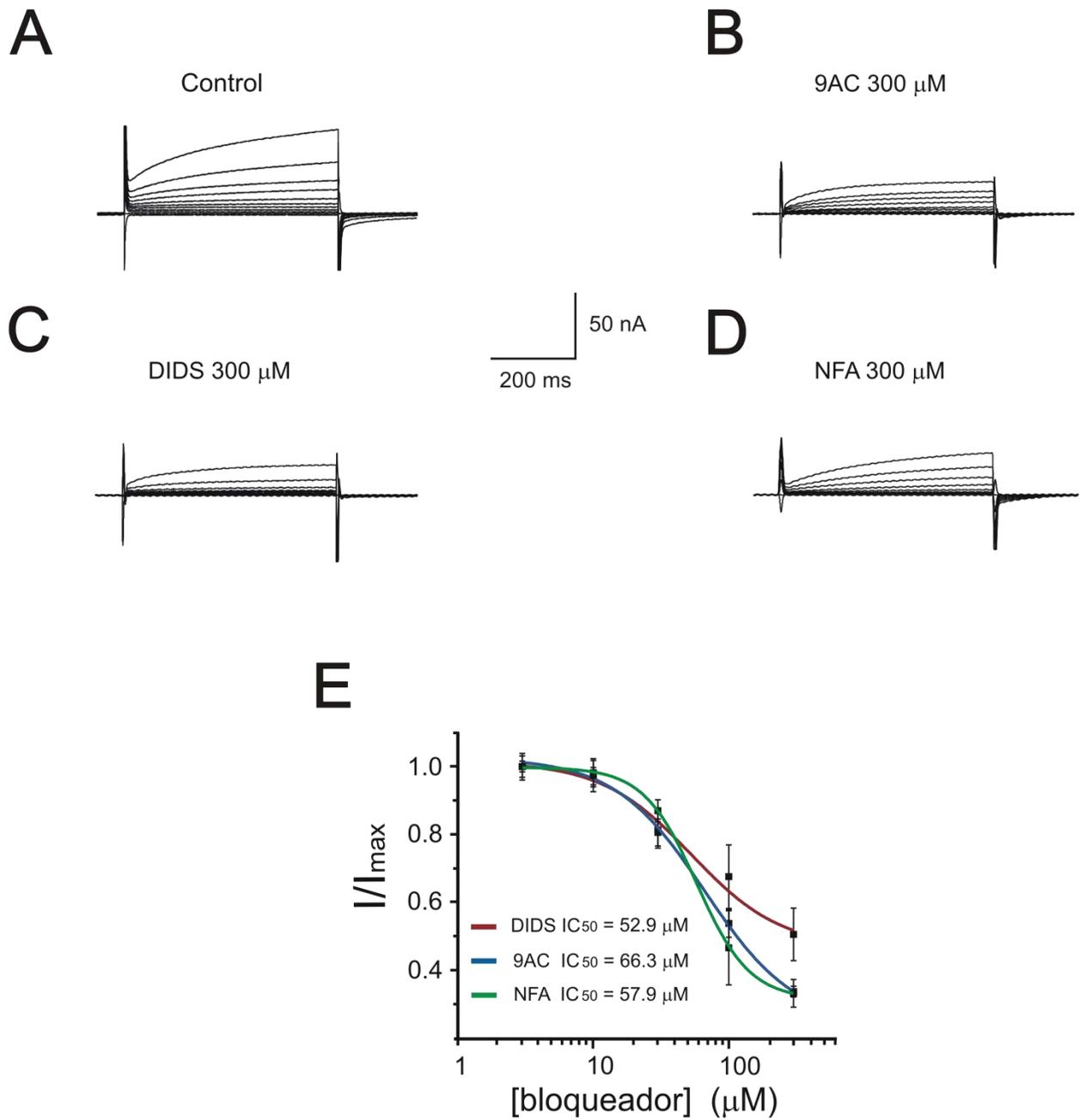
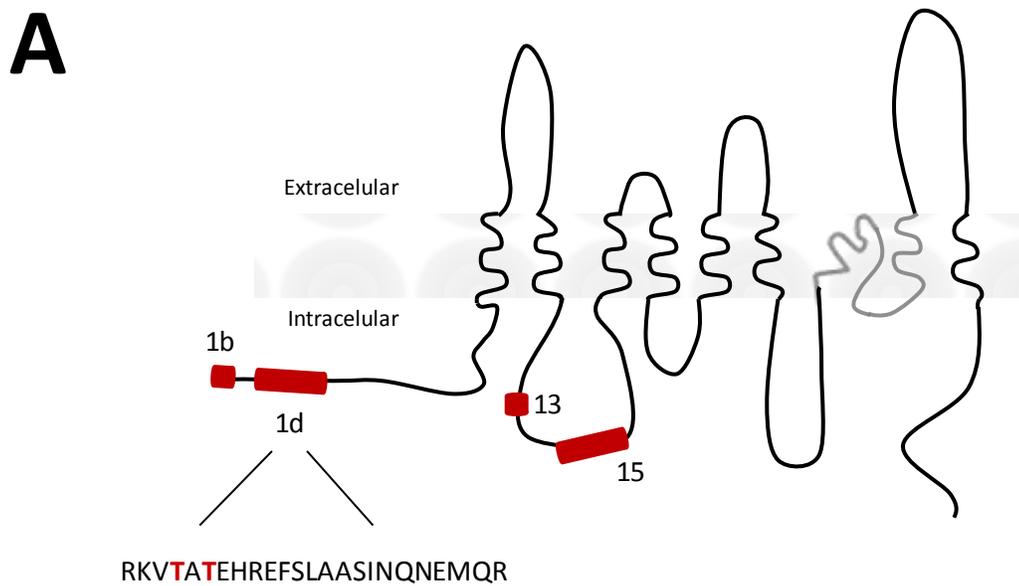


Figura 9. Sensibilidad de las corrientes I_{CaCC} a distintos bloqueadores. **A.** Trazo representativo de las corrientes evocadas en una solución con 10 mM de Ca^{2+} en ausencia de los bloqueadores y **B-D**, en presencia de los bloqueadores 9AC, DIDS y NFA, respectivamente. **E.** Curva dosis respuesta de los bloqueadores DIDS, NFA y 9AC. La amplitud de la respuesta se normalizó con respecto a la máxima obtenida en ausencia del bloqueador. $n=5$, $N=4$.

6.3. Propiedades electrofisiológicas de las isoformas de xtTMEM16A expresadas en células HEK-293

Como se refirió, xtTMEM16A presenta eventos de *splicing* alternativo. En la Figura 11 se muestra el modelo topológico de xtTMEM16A, en rojo se muestra la posición de los 4 exones alternativos encontrados en *X. tropicalis*. Los exones alternativos 1b y 1d se encuentran localizados en el amino terminal de xtTMEM16A mientras que los exones 13 y 15 se sitúan en el asa intracelular entre TM2 y TM3. Las 5 variantes han sido nombradas de acuerdo a los exones alternativos presentes (+) o ausentes (-) en el canal (Tabla de la figura 11B).

La caracterización electrofisiológica de las variantes de xtTMEM16A se realizó en células HEK-293 y los registros se realizaron 24-48 horas después de la transfección del plásmido. A las 24 horas después de la transfección, se pudo observar la expresión de la proteína en la membrana celular (Figura 12 A). En la figura 12 B, se muestran trazos representativos de las corrientes generadas por un protocolo de pasos de voltaje desde -100 mV hasta +140 mV. Para cada pulso, la amplitud de la corriente es máxima al final del pulso. A +140 mV, la densidad de corriente para las 5 isoformas fue comparable, de 9.15 ± 0.82 nA/pF en promedio.



B

Variante de xtTMEM16A	Exón 1b	Exón 1d	Exón 13	Exón 15
TMEM16A (13, 15)	-	-	+	+
TMEM16A (13)	-	-	+	-
TMEM16A (1b,13,15)	+	-	+	+
TMEM16A (1d,13)	-	+	+	-
TMEM16A (1d,13,15)	-	+	+	+

Figura 11. Modelo topológico de xtTMEM16A y sus isoformas. **A.** En rojo se muestran los segmentos codificados por los 4 exones alternativos encontrados en ovocitos de *X. tropicalis*. En el inserto de la figura se muestra la secuencia aminoacídica del exón 1d. Los residuos de treonina T, indicados en rojo, son blancos potenciales de fosforilación. **B.** Relación de las variantes de xtTMEM16A de acuerdo al exón presente (+) o ausente (-).

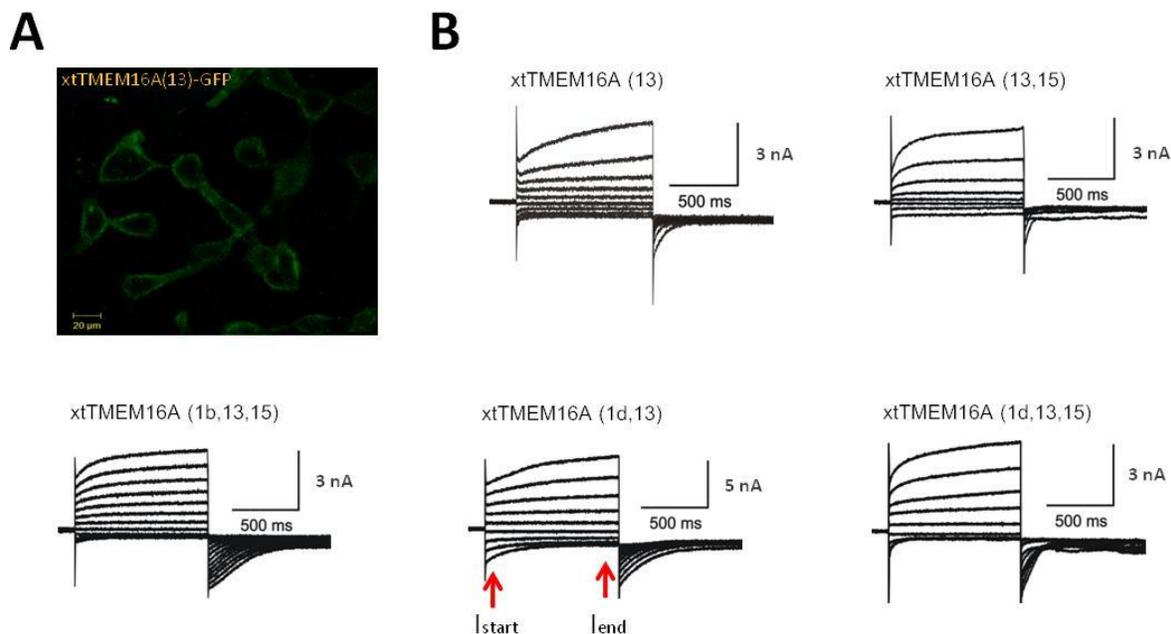


Figura 12. Expresión funcional de las variantes de TMEM16A. **A.** Análisis de la expresión de xtTMEM16A(13) acoplada a GFP (xtTMEM16A(13)-GFP) en la membrana celular de células HEK-293. La fluorescencia se observa en la periferia de las células HEK-293. **B.** Trazos representativos de las corrientes generadas por las 5 variantes de xtTMEM16A expresadas en células HEK-293. Las corrientes fueron generadas con pasos de voltaje de -100 mV a 140 mV con incrementos de 30 mV y la concentración de Ca^{2+} libre intracelular fue de $1\mu\text{M}$. Las flechas rojas indican la amplitud de las corrientes medidas al inicio (I_{start}) y al final del pulso a -100 mV (I_{end}). Estas amplitudes se usaron para calcular ($I_{\text{start}}/I_{\text{end}}$).

Las curvas corriente-voltaje para las variantes se obtuvieron midiendo el valor de la amplitud de la corriente al final de cada pulso (Figura 12 B). Las corrientes generadas por la expresión de las variantes de xtTMEM16A presentan una rectificación saliente a +60 mV y presentan una amplitud máxima a voltajes positivos (Figura 13 A). como se muestra en las curvas corriente-voltaje para todas las isoformas, no presentan diferencias significativas en cuanto a la amplitud de las corrientes a distintos voltajes.

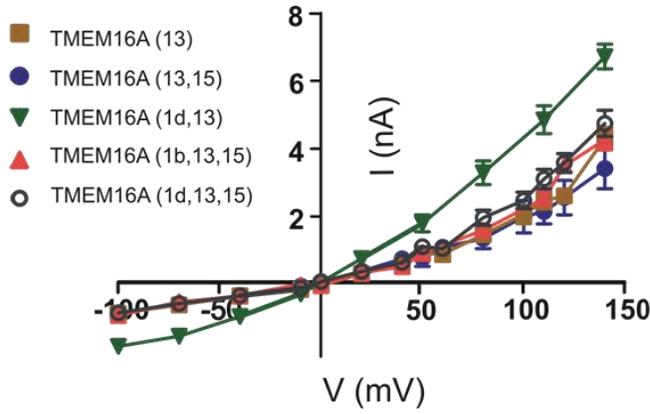
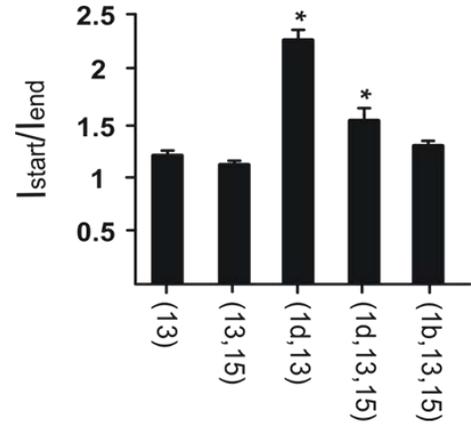
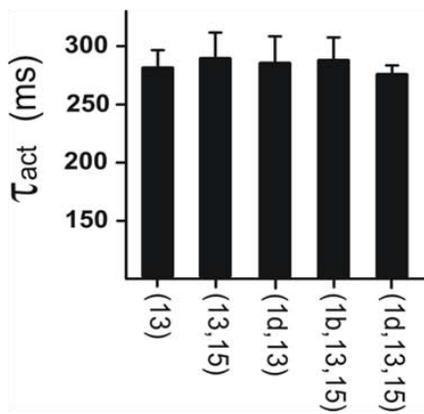
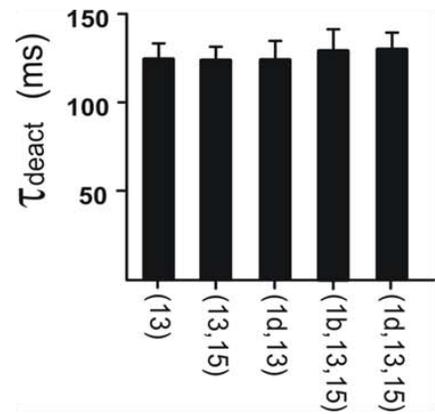
A**B****C****D**

Figura 13. Relación I-V y tasas de activación e inactivación de las variantes xtTMEM16A. **A.** Curva corriente-voltaje de las 5 variantes de xtTMEM16A, negro TMEM16A (1d,13,15), rosa TMEM16A (1b,13,15), verde TMEM16A (1d,13), violeta TMEM16A (13,15), amarillo TMEM16A (13) n=7. **B.** Cociente (I_{start}/I_{end}) que denota la magnitud de la corriente generada por el pulso a -100 mV. El cociente (I_{start}/I_{end}) se calculó midiendo la amplitud de la corriente medida al inicio del pulso (I_{start}) a -100 mV con respecto a la corriente medida al final del pulso (I_{end}), n=5, * indica diferencias significativas entre las variantes xtTMEM16A (1d,13), xtTMEM16A (1d,13,15) y el resto de las variantes. $p < 0.05$ **C.** Constantes de activación calculada a +140 mV (τ_{act}) para las 5 isoformas y **D.** desactivación a -100 mV (τ_{deact}) para las 5 isoformas. n=5 en cada caso.

Por otro lado, se evaluó la cinética de activación (τ_{act}) a +140 mV y desactivación (τ_{deact}) a -100 mV mediante el ajuste exponencial de las corrientes. No se encontraron diferencias en estas

cinéticas para las 5 isoformas de xtTMEM16A (Figura 13C-D). En la Figura A3 se muestran trazos representativos de las cinéticas de activación y desactivación de las 5 variantes cuando son activadas con un pulso a +140 mV. En las variantes que presentan el exón alternativo 1d como xtTMEM16A(1d,13) y xtTMEM16A (1d,13,15), el pulso hiperpolarizante a -100 mV generó una corriente transitoria, la cual probablemente se debe a un grupo de canales que están abiertos al potencial de mantenimiento y que se cierran gradualmente a -100 mV. La amplitud de estas corrientes se midió al inicio del pulso (I_{start}) y al final del pulso (I_{end}) (Flechas rojas, Figura 12B). Para evaluar las diferencias entre estas características, se determinó el cociente (I_{start}/I_{end}) que denota la magnitud de la corriente generada por el pulso a -100 mV. Como se muestra en la Figura 13 B, el cociente (I_{start}/I_{end}) de las isoformas xtTMEM16A (1d, 13) es 2.25 ± 0.09 y de xtTMEM16A (1d, 13, 15) es 1.5 ± 0.11 mientras que para las demás isoformas los valores son menores y van de 1.09 ± 0.03 para xtTMEM16A (13, 15) a 1.27 ± 0.04 para xtTMEM16A (1b, 13, 15). Es importante destacar que el exón 1d codifica para una secuencia aminoacídica con dos sitios potencialmente fosforilables, que corresponden a dos residuos de treonina que podrían conferir propiedades distintas en el canal.

6.4. Distribución de la proteína xtTMEM16A en ovocitos y en células HEK-293

Con la finalidad de observar la distribución celular de xtTMEM16A, se transfectaron células HEK-293 con la variante xtTMEM16A(13)-GFP; 24 horas después de la transfección se marcó la membrana plasmática con FM4-64. Se observó que xtTMEM16A(13)-GFP co-localiza parcialmente con el marcador de membrana FM4-64 en la membrana de las células transfectadas (Figura 14) mientras que no hay una colocación cuando se realizó una transfección con el plásmido control (GFP). En el panel superior izquierdo de la Figura 14, se observa la distribución de xtTMEM16A(13)-GFP en células HEK-293 y en el panel derecho se observa la expresión de GFP (control). La expresión de xtTMEM16A(13)-GFP se aprecia solamente en la membrana celular de las células HEK-293 mientras que GFP se aprecia en toda la célula (Figura 14). Además, observamos que xtTMEM16A(13)-GFP también se encuentra intracelularmente, posiblemente en vesículas. Este efecto se aprecia mejor en la vista ortogonal de la Figura 14.

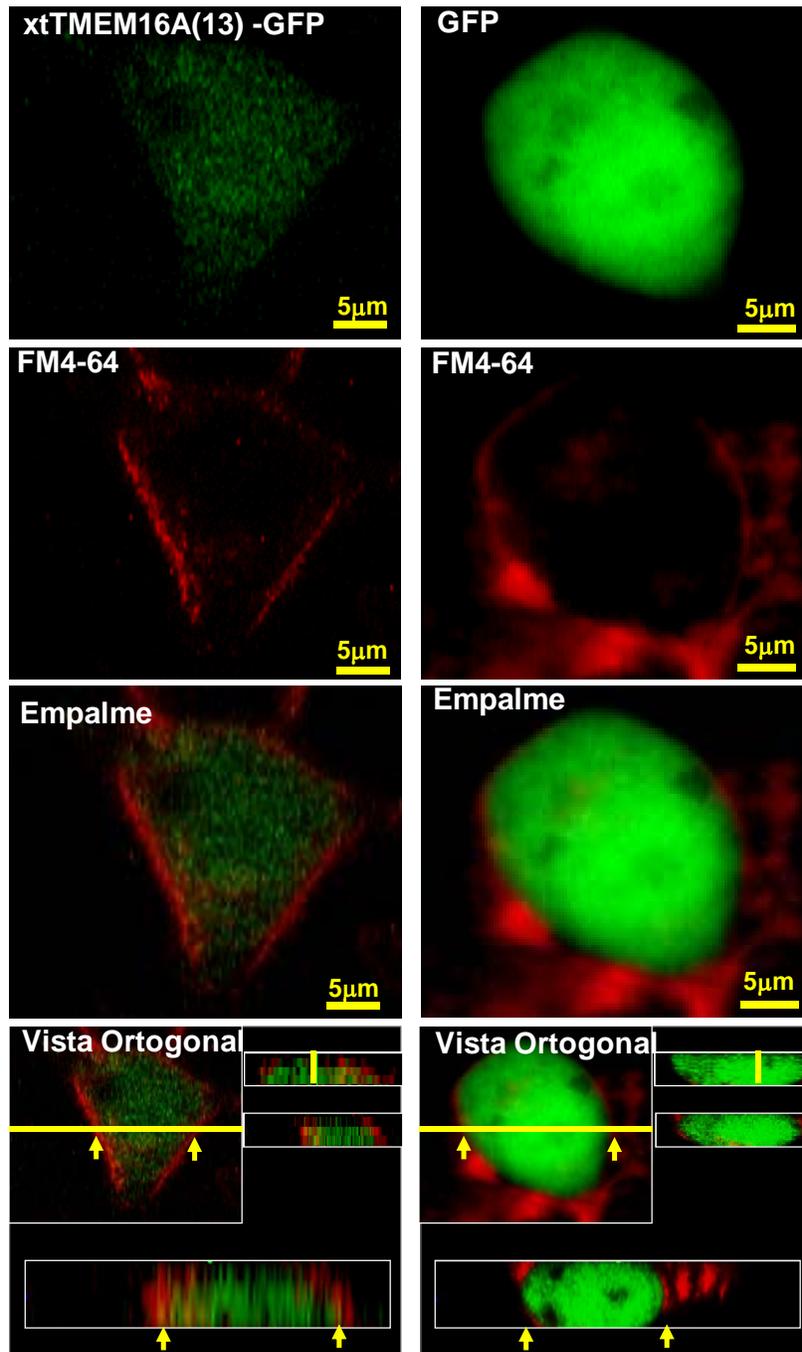


Figura 14. Expresión de xtMEM16A(13) acoplada a GFP en células HEK-293 (xtMEM16A(13)-GFP). xtMEM16A(13)-GFP colocaliza con FM4-4 en la membrana plasmática de células HEK-293 transfectadas (panel izquierdo) y se observa en el empalme y en las flechas amarillas de la vista ortogonal. No hay colocalización en la célula transfectada únicamente con GFP. En la vista ortogonal se aprecian mejor estas diferencias.

Las corrientes oscilatorias de cloruro generadas por los ovocitos podrían deberse a un patrón de distribución diferencial de TMEM16A a lo largo de la membrana plasmática que recibe ondas de Ca^{2+} que son liberadas del retículo endoplásmico (Marchant and Parker 2001). Se ha descrito que en los ovocitos de *X. laevis*, la distribución de los CaCC es asimétrica y las corrientes de cloruro de mayor amplitud son las registradas en el polo animal (Miledi and Parker 1984). Por lo tanto, con la finalidad de determinar la distribución de TMEM16A en los ovocitos, se inyectó la isoforma xtTMEM16A(13)-GFP en el núcleo de los ovocitos de *X. laevis* y se observó la expresión 72 horas después utilizando un microscopio confocal. Así, se encontró que la distribución de xtTMEM16A(13)-GFP en los ovocitos es principalmente en el hemisferio animal mientras que su presencia es menor en el hemisferio vegetal (Figura 15). Este resultado es consistente con la distribución diferencial de los CaCC y en los registros electrofisiológicos correspondientes (Miledi and Parker 1984).

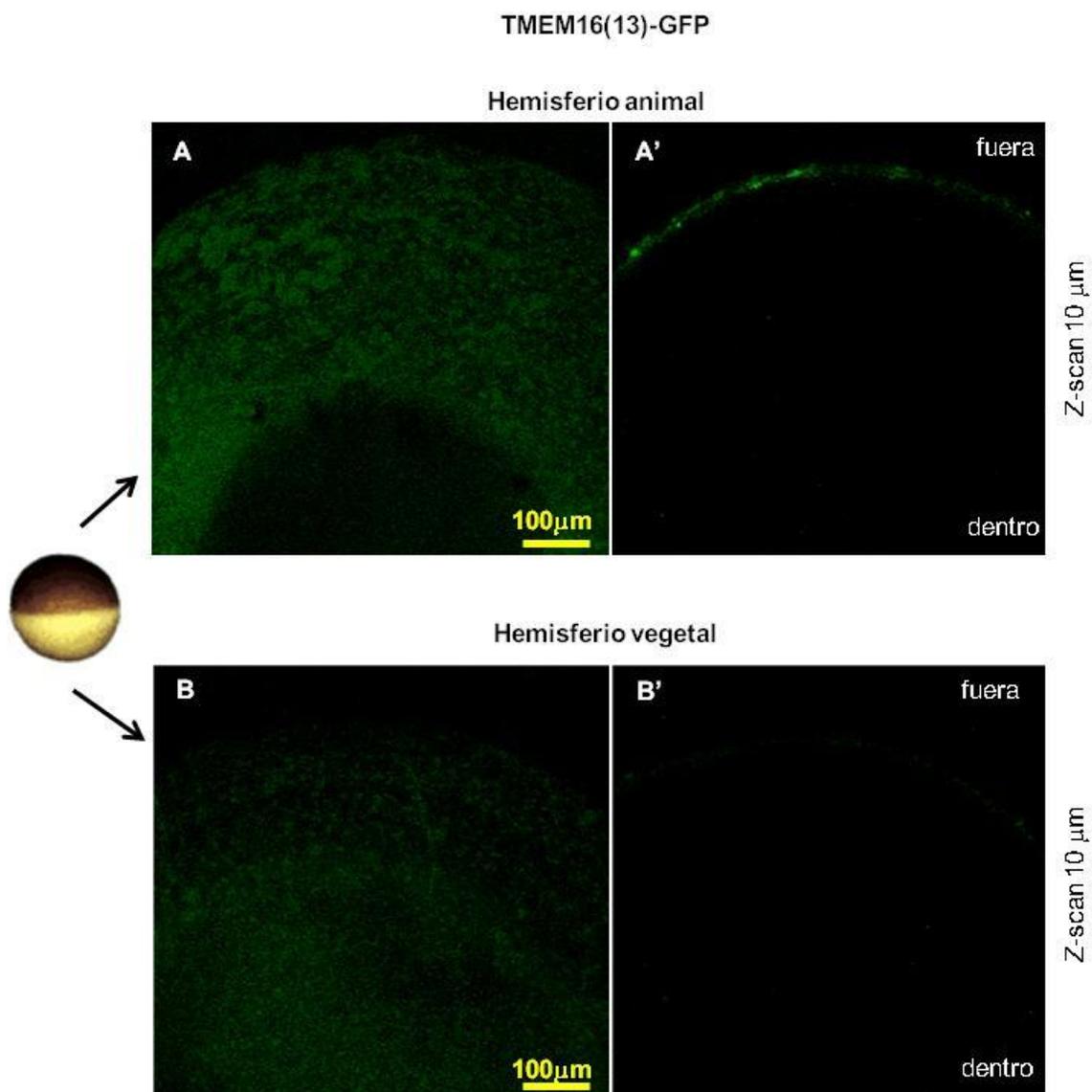


Figura 15. Distribución de xtMEM16A(13)-GFP en ovocitos de *X. laevis*. **A'**. Se muestra una sección del hemisferio animal del ovocito expresando xtMEM16A(13)-GFP. **A**. Vista de una región de la superficie del polo animal del ovocito. **B'**. Se muestra una sección del hemisferio vegetal del ovocito expresando xtMEM16A(13)-GFP. **B'** Vista de una región de la superficie del polo vegetal del ovocito.

6.5. Caracterización farmacológica de xtTMEM16A expresada en células HEK-293

Para profundizar en la comprensión de las propiedades funcionales y farmacológicas del canal xtTMEM16A, se planteó esclarecer el mecanismo de acción y detalles estructurales de la región del poro que determinan la unión de los bloqueadores 9AC, DIDS, y T16A_{inh}-A01. Como ya se había mencionado, recientemente nuestro grupo de trabajo mostró que una mutación en los residuos del poro R761 y R646 (R646E+R761E, llamada doble mutante, DM) altera la selectividad aniónica. La DM desplaza las curvas del potencial de reversión vs la fracción molar de la predicción de Goldman-Hodking-Katz (Figura 5) (Reyes, Lopez-Rodriguez et al. 2013). Dado que esta desviación de la predicción de Goldman-Hodking-Katz puede implicar la interacción de los aniones que permean con el poro, nos propusimos estudiar si estas mutaciones alteran la afinidad y dependencia de voltaje en relación al bloqueo de los fármacos propuestos.

Para caracterizar el efecto de estos bloqueadores sobre la respuesta en las corrientes generadas por xtTMEM16A(13) y la variante (xtTMEM16A(R646E+R761E)), se utilizaron células HEK-293. Los registros se realizaron 24-48 horas después de la transfección de la variante silvestre (WT= xtTMEM16A(13) y la doble mutante (DM= xtTMEM16A(R646E+R761E)). Las curvas dosis-respuesta para las variantes fueron obtenidas utilizando un protocolo de activación y midiendo la amplitud de la corriente al final del pulso en condiciones control y en presencia del bloqueador. La amplitud de la respuesta fue normalizada con respecto a la máxima obtenida en ausencia del bloqueador (control). Los bloqueadores fueron aplicados en el baño extracelular durante 1-2 minutos y 9AC, DIDS y T16A_{inh}-A01 se usaron a distintas concentraciones: 3, 10, 30, 100 y 300 μ M para el caso de 9AC. Dado que no se observó una diferencia significativa en el bloqueo entre la variante WT y la DM para DIDS, se utilizó una concentración más elevada de 1 mM y para el caso del inhibidor T16A_{inh}-A01, se usaron las concentraciones: 0.3, 1, 3, 10 y 30 μ M.

En la Figura 16 A-C se muestran trazos representativos de las corrientes generadas por un pulso de voltaje de -100 a +140 mV en condiciones control y en presencia del bloqueador a la máxima concentración utilizada tanto para la variante WT (en rojo) como para la DM (en verde). La inhibición de las corrientes a esta concentración del bloqueador 9AC fue del 79 % para la variante WT mientras que para la DM fue del 66 % (Figura 16 A, D). Para T16A_{inh}-A01, el porcentaje de inhibición fue de 77 % para la WT mientras que para la DM sólo fue del 62 %

(Figura 16 B, E). En ambos casos encontramos diferencias significativas en la inhibición entre WT y DM pero estas diferencias sólo fueron observables a altas concentraciones del bloqueador. En el caso de DIDS, no encontramos diferencias significativas en la inhibición entre WT (77 %) y DM (73 %) (Figura 16 C, F).

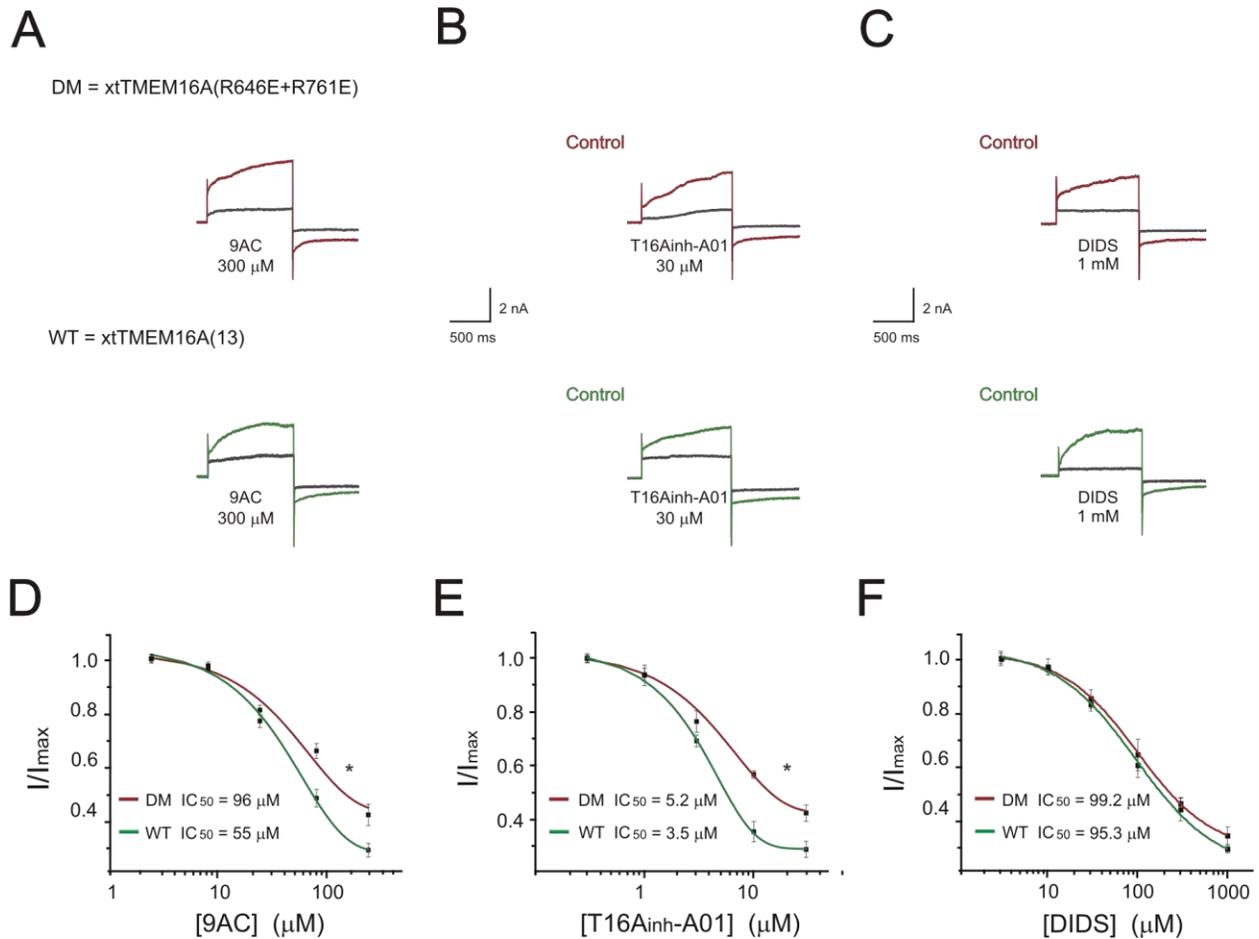


Figura 16. Sensibilidad de las corrientes I_{cacc} a distintos bloqueadores en células HEK-293 transfectadas con xtTMEM16A(13) (WT) y la doble mutante xtTMEM16A(R646E+R761E) (DM). A-C. Trazos representativos para las corrientes evocadas en solución control (rojo y verde) y en presencia de los bloqueadores 9AC, T16A_{inh}-A01 y DIDS respectivamente (trazos grises). Las corrientes fueron evocadas por un pulso de voltaje de -100 a 140 mV en condiciones control y en presencia del bloqueador a la máxima concentración utilizada tanto para la variante xtTMEM16A(13) (en rojo) como para xtTMEM16A(R646E+R761E) (en verde). D-F. Relación dosis respuesta para los bloqueadores 9AC, T16A_{inh}-A01 y DIDS respectivamente. La amplitud de la respuesta fue normalizada con respecto a la máxima obtenida en ausencia del bloqueador. Los datos se muestran como la media \pm SEM . n=5 , * muestra una diferencia significativa, P < 0.05.

Los valores de IC_{50} se muestran en la Figura 16D-F. Para el bloqueador 9AC, el valor de IC_{50} entre WT y DM es diferente y esta diferencia es estadísticamente significativa a 100 μ M y 300 μ M (Figura 16 D). Para T16A_{inh}-A01 se observan diferencias para dos concentraciones: 10 μ M y 30 μ M (Figura 15E). Para el DIDS, los valores de IC_{50} entre WT y DM no presentan diferencias, como se puede observar en las curvas dosis-respuesta (Figura 15 F).

6.6. Dependencia de voltaje de los bloqueadores en la proteína xtTMEM16A

Para determinar si el bloqueo de 9AC y T16A_{inh}-A01 es dependiente de voltaje, se construyeron curvas corriente-voltaje (I-V) utilizando un protocolo de rampas de voltaje de -70 mV a 130 mV (ver materiales y métodos) tanto en ausencia del bloqueador, como en presencia de éste.

Las curvas I-V muestran una rectificación saliente a voltajes positivos y muestran una inhibición de la corriente dependiente del voltaje y de la concentración del bloqueador (Figuras 17 y 18). En la figura 17 y 18 se muestran las curvas I-V en condiciones control (en negro) y en presencia del bloqueador 9AC (Figura 17) y del inhibidor específico T16A_{inh}-A01 (Figura 18) tanto para la variante WT = xtTMEM16A(13) (Figura 17A y 18A) como para la doble mutante DM = xtTMEM16A(R646E+R761E) (Figura 17B y 18B). Para el bloqueador 9AC, se inhiben las corrientes a voltajes positivos (> 10 mV) y la máxima inhibición ocurre a 300 μ M para la variante WT. Al igual que en las curvas dosis-respuesta (Figura 16), la diferencia en la inhibición del bloqueador es significativa a altas concentraciones (100 μ M y 300 μ M) hecho que se refleja en una mayor separación entre las curvas I-V para la variante WT (línea azul claro a 300 μ M y naranja a 100 μ M, Figura 17 B) como para DM (línea azul oscuro a 300 μ M y roja a 100 μ M, Figura 17 A).

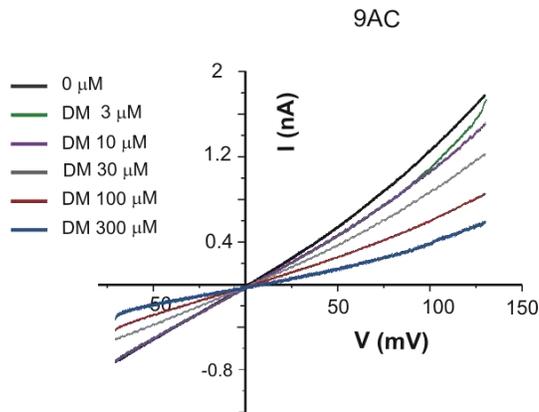
En el caso del inhibidor específico, la presencia del bloqueador inhibe las corrientes a voltajes positivos (> 10 mV) al igual que 9AC (Figura 18) y la máxima inhibición ocurre a 30 μ M para la variante WT. Sin embargo, no ocurre un bloqueo dependiente de la concentración como en el

caso de 9AC. En este caso ocurre una menor inhibición entre las concentraciones a 10 μM para la variante WT y 30 μM para DM por lo que las tendencias en la Figura 18C se traslapan.

Para calcular δ , cada curva I-V se expresó como el cociente de la corriente en presencia del bloqueador entre la corriente en ausencia del bloqueador ($I/I_{\text{BLOQ}=0}$) y los valores del cociente $I/I_{\text{BLOQ}=0}$ se graficaron en función del voltaje (Figura 17C y 18C). Para 9AC, la amplitud de la corriente se mantiene casi constante a concentraciones bajas: 3, 10 y 30 μM , pero comienza a disminuir a voltajes positivos a partir de 30 μM alcanzando la máxima disminución al voltaje más positivo y a la concentración de 300 μM (Figura 17C). Lo mismo ocurre para el caso del inhibidor específico T16A_{inh}-A01; resulta más evidente una disminución en la amplitud de la corriente y dependencia de voltaje en presencia de 30 μM de T16A_{inh}-A01 (Figura 18C). También es evidente un traslape en las amplitudes de las corrientes en presencia de T16A_{inh}-A01 a 10 y 30 μM a partir de ~ 50 mV (Figura 18C). Por lo tanto, se concluye que la inhibición de la corriente I_{CaCC} por 9AC y T16A_{inh}-A01 ocurre a concentraciones en el orden micromolar y es dependiente de voltaje.

A

DM = xtTMEM16A(R646E+R761E)

**B**

WT = xtTMEM16A(13)

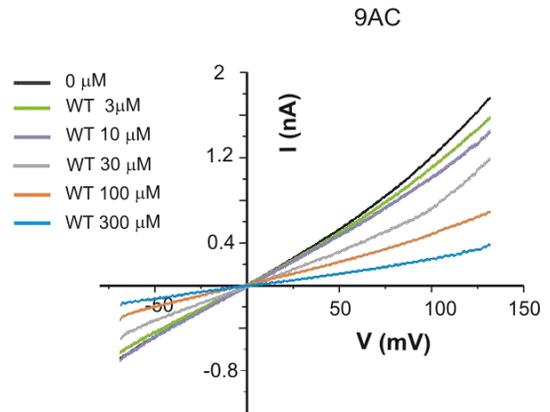
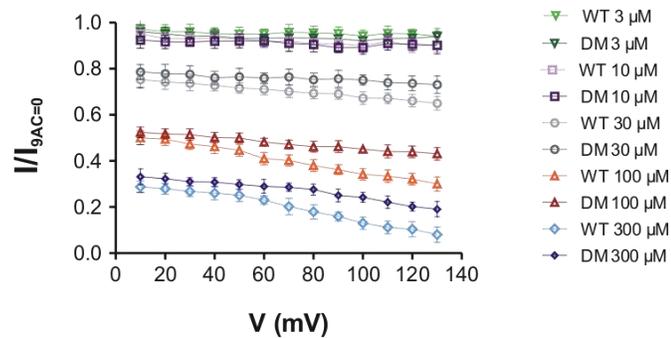
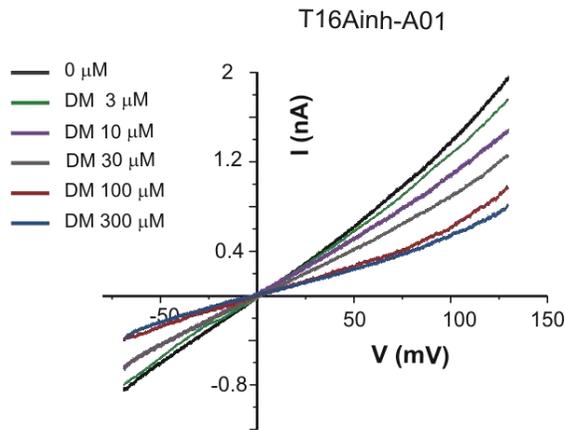
**C**

Figura 17. Dependencia de voltaje del bloqueador 9AC. A. Curvas corriente voltaje (I-V) para el bloqueador 9AC a distintas concentraciones. En colores se muestran las curvas I-V para las dos variantes xtTMEM16A(13) (colores claros) como para xtTMEM16A(R646E+R761E) (colores oscuros). $n = 4$ B. Valores del cociente $I/I_{\text{BLOQ}=0}$ en función del voltaje, $I/I_{\text{BLOQ}=0}$ se obtuvo del cociente entre cada curva I-V en presencia del bloqueador entre la corriente en ausencia del bloqueador ($I/I_{\text{BLOQ}=0}$). $n = 5$. WT = xtTMEM16A(13) y DM = xtTMEM16A(R646E+R761E). $n=5$

A

DM = xtTMEM16A(R646E+R761E)

**B**

WT = xtTMEM16A(13)

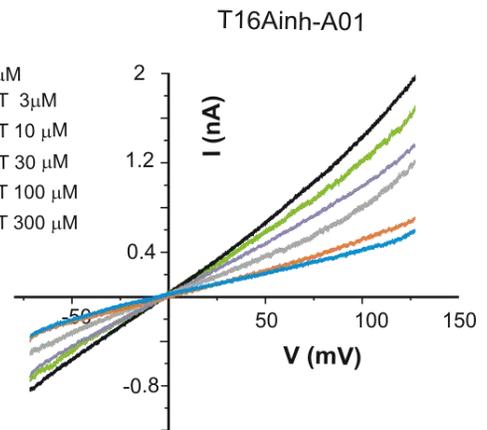
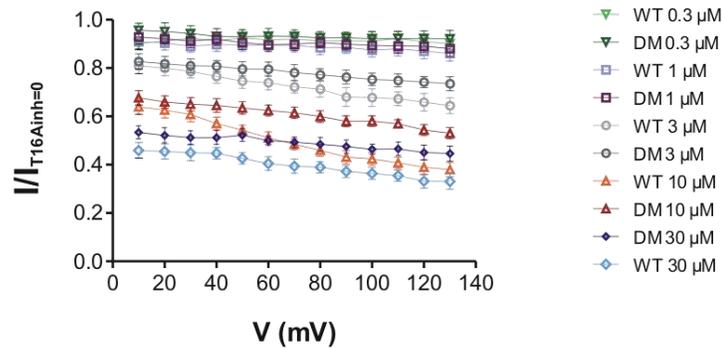
**C**

Figura 18. Dependencia de voltaje del inhibidor T16A_{inh}-A01. A. Curvas corriente voltaje (I-V) para el inhibidor T16A_{inh}-A01 a distintas concentraciones. En colores se muestran las curvas I-V para las dos variantes xtTMEM16A(13) (colores claros) como para xtTMEM16A(R646E+R761E) (colores oscuros). n=5 B. Valores del cociente $I/I_{BLOQ=0}$ en función del voltaje, $I/I_{BLOQ=0}$ se obtuvo del cociente entre cada curva I-V en presencia del bloqueador entre la corriente en ausencia del bloqueador ($I/I_{BLOQ=0}$). n=5. WT= xtTMEM16A(13) y DM = xtTMEM16A(R646E+R761E). n=5

Continuando con el cálculo de δ , los valores del cociente $I/I_{\text{BLOQ}=0}$ de las Figuras 17C y 18C, se graficaron en función de la concentración del bloqueador y se realizó un ajuste para determinar la K_i . Este ajuste se realizó para todas las concentraciones y para cada voltaje, de tal manera que obtuvimos una familia de curvas dosis-respuesta en el rango de voltajes de 10 a 130 mV. El ajuste de acuerdo a la ecuación 1 (ver materiales y métodos), nos generó un valor de K_i para cada voltaje. Este análisis se realizó para los experimentos hechos con el bloqueador 9AC, para la variante WT (Figura A2A) y la DM (Figura A2B), así como para los experimentos hechos con el inhibidor T16A_{inh}-A01, para la variante WT (Figura A2C) y la DM (Figura A2D). Posteriormente, se estimó la δ que experimenta el bloqueador en el poro del canal: si los valores de K_i se ajustan a la ecuación 2 (ver materiales y métodos), se obtiene el valor de δ de la pendiente de la curva. En la figura 19 se muestran los valores de δ para la variante WT y DM para el inhibidor T16A_{inh}-A01 y para el bloqueador 9AC.

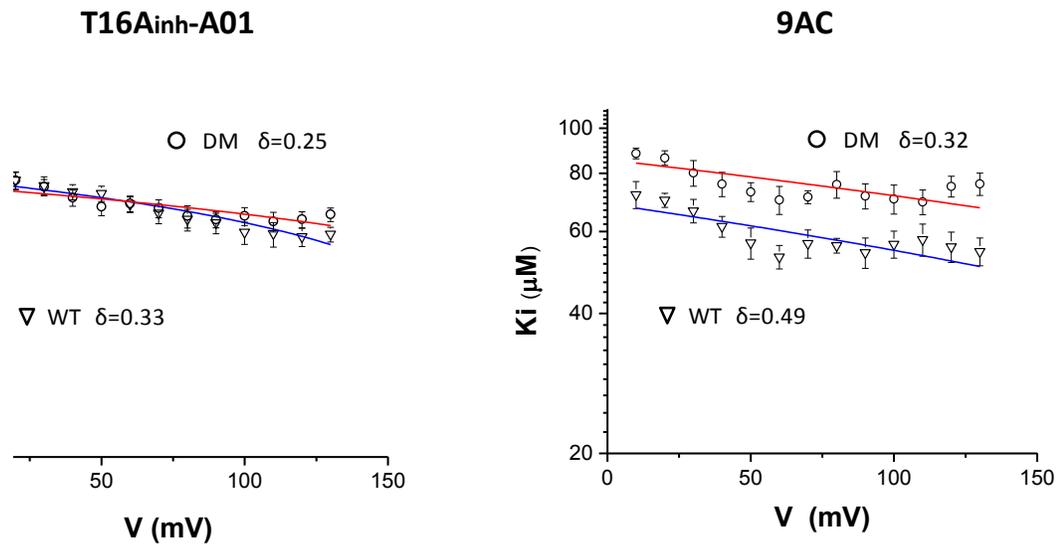


Figura 19. Fracción del potencial eléctrico (δ) que experimenta un bloqueador en el poro del canal. A. Las constantes de disociación para: A. el inhibidor específico T16A_{inh}-A01 y B. el bloqueador 9AC; se graficaron en función del voltaje y se ajustaron a la ecuación 2 (en materiales y métodos), δ se calculó de la pendiente de la curva tanto para la variante xtTMEM16A(13) como para xtTMEM16A(R646E+R761E). Los datos se muestran como la media \pm SEM. n=5.

Para el inhibidor T16A_{inh}-A01, las variaciones en la K_i no son diferentes entre la WT y DM como se observa en el ajuste de las rectas en la Figura 19A. Tampoco los valores del potencial eléctrico son diferentes entre WT y DM ($\delta=0.33$ y 0.25 , respectivamente, Figura 19A). Entonces, podemos concluir que δ en este caso revelaría que los residuos aminoacídicos mutados (R646E+R761E) no juegan un papel importante en el bloqueo farmacológico del poro de xtTMEM16A por el inhibidor T16A_{inh}-A01.

Para el bloqueador 9AC, las constantes de disociación entre WT y DM si varían. Para la variante WT las K_i disminuyen de $72 \mu\text{M}$ a 10 mV a $54 \mu\text{M}$ a 130 mV mientras que en DM, la disminución es menor: de $88 \mu\text{M}$ a 10 mV hasta $76 \mu\text{M}$ a 130 mV (Figura 19B). Además, los δ para 9AC son de $\delta=0.32$ para la variante WT y $\delta=0.49$ en el caso de DM (Figura 19) y presentan diferencias significativas (ANOVA de una vía y post-hoc de comparación múltiple Bonferroni, $p < 0.05$, $n=5$) entre WT y DM (ANOVA de una vía y post-hoc de comparación múltiple Bonferroni, $p < 0.05$, $n=5$) lo que indicaría que 9AC interacciona de manera distinta con los residuos R646 y R761 probablemente uniéndose en un sitio más profundo en la WT.

Es importante notar que en la Figura 19 para 9AC podría considerarse realizar el ajuste de dos rectas como se muestra en la Figura 20. El reajuste considera 2 rectas en dos rangos de voltaje: de 10 a 60 mV para WT y DM y otro rango de voltajes, de 60 a 140 mV para WT y DM. El reajuste genera 4 valores de δ para 9AC: $\delta=0.57$ para la variante WT y $\delta=0.44$ para la DM en el rango de voltajes $+10-60 \text{ mV}$. Si se considera este rango de voltajes como fisiológico, estos valores de δ pueden interpretarse como en el análisis anterior: 9AC interacciona de manera distinta con los residuos R646 y R761 probablemente uniéndose en un sitio más profundo en la variante WT. Por otro lado, los valores de δ en el rango $60-140 \text{ mV}$ son: $\delta=0.16$ para la variante WT y $\delta=0.12$ para la DM. No varían entre ellos lo que puede significar que la interacción entre 9AC y el poro del canal en ese rango de voltajes lleva al bloqueador a un sitio menos profundo en el poro.

9AC

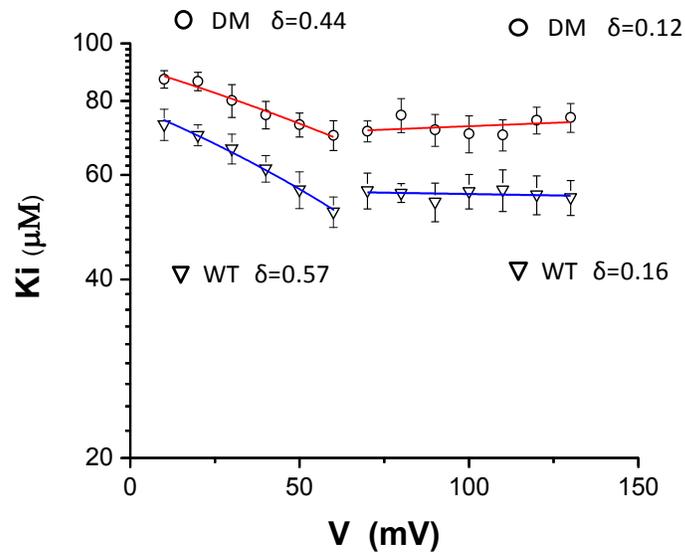


Figura 20. Consideración de dos rangos de voltaje para el ajuste de la fracción del potencial eléctrico δ que experimenta 9AC en el poro del canal. Las constantes de disociación para el bloqueador 9AC se graficaron en función del voltaje y se ajustaron dos rectas en dos rangos de voltaje, de 10 a 60 mV y de 60 a 140 mV. Los datos se muestran como la media \pm SEM. $n=5$.

7. DISCUSIÓN

La proteína TMEM16A se expresa en numerosos tejidos, participando en varios procesos importantes y está involucrada en diversas enfermedades. Si bien se han realizado algunos estudios en torno a la comprensión del funcionamiento del canal, poco se sabe aún de la estructura del poro de TMEM16A y menos aún de las propiedades electrofisiológicas de estos canales endógenos en los ovocitos de *X. tropicalis*.

En este trabajo mostramos que los ovocitos de *X. tropicalis* generan corrientes de cloruro dependientes de voltaje. Estas corrientes son dependientes de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular y son resultado de la activación de xtTMEM16A (Huanosta-Gutierrez, Espino-Saldana et al. 2014). Además mostramos que estas corrientes son inhibidas por algunos bloqueadores de canales de cloruro de manera dependiente de la concentración. (Huanosta-Gutierrez, Espino-Saldana et al. 2014). En particular se utilizaron tres bloqueadores en ovocitos: DIDS, NFA y 9AC. Los bloqueadores inhibieron la corriente I_{CaCC} endógena en los ovocitos de *X. tropicalis* (Figura 3) con una IC_{50} medida a +120 mV de: DIDS (52.9 μM), NFA (57.9 μM) y 9-AC (66.3 μM). Sin embargo, la inhibición de estas corrientes es parcial. Este efecto puede ser debido a la diferente sensibilidad de las diversas corrientes endógenas mencionadas previamente (Ochoa-de la Paz, Espino-Saldana et al. 2013). A pesar de que existen grandes variaciones en los valores de IC_{50} para los CaCC, los valores de IC_{50} encontrados en este trabajo, se encuentran en un rango de concentraciones reportadas por otros grupos: 16–250 μM para DIDS, 2–44 μM para NFA, 276–1000 μM para A9C (Hartzell, Putzier et al. 2005; Bradley, Fedigan et al. 2014).

Es importante considerar la interpretación de los resultados obtenidos cuando se utilizan bloqueadores como NFA (considerado como bloqueador “específico” de canales de cloruro) debido a que modifica las propiedades cinéticas de otros canales. Por ejemplo, NFA bloquea los canales de potasio en ovocitos de *X. laevis* (Wang, Dixon et al. 1997) y los canales de potasio dependientes de Ca^{2+} (Greenwood and Leblanc 2007). Asimismo, se ha mostrado que en algunos tipos celulares, como los miocitos, DIDS bloquea canales aniónicos regulados por volumen (Xu, Kim et al. 1997).

A lo largo del estudio de los canales aniónicos, se ha utilizado ampliamente el bloqueador NFA, no obstante, una de las razones por la que no utilizamos este bloqueador en la caracterización farmacológica de las variantes xtTMEM16A en células HEK-293 es que este genera distintos efectos. Así, además de la modulación de los canales de potasio por NFA, se ha visto que los efectos de este fármaco dependen del potencial de membrana, de la concentración de Ca^{2+} intracelular libre, del estado de fosforilación del canal así como del tipo celular (Hogg, Wang et al. 1994; Piper, Greenwood et al. 2002; Ledoux, Greenwood et al. 2005; Wiwchar, Ayon et al. 2009). Por ejemplo, se ha visto que NFA estimula corrientes I_{CaCC} que enmascaran su efecto inhibitorio a potenciales negativos (Piper, Greenwood et al. 2002; Wiwchar, Ayon et al. 2009).

xtTMEM16A(13)-GFP se encontró preferencialmente en el hemisferio animal de los ovocitos, consistente con observaciones previas que mostraron electrofisiológicamente que la corriente CaCC es más robusta en el mismo hemisferio (Miledi and Parker 1984). Por otra parte, observamos la expresión de xtTMEM16A(13)-GFP en la membrana plasmática de células HEK-293 transfectadas con esta quimera aunque no en toda la membrana plasmática como se puede observar en la Figura 14. Además, encontramos que la expresión de xtTMEM16A(13)-GFP se aprecia también en compartimentos intracelulares de las células HEK-293, esta observación contrasta con lo reportado por Vocke y colaboradores quienes localizaron TMEM16A-GFP sobre todo en la membrana celular (Vocke, Dauner et al. 2013). Sin embargo, nuestras observaciones indican que TMEM16A tiene una amplia distribución en compartimentos intracelulares, lo que sugiere un papel de la proteína en algún proceso de señalización intracelular o bien, esta distribución podría ser consecuencia del tráfico natural de la proteína desde el retículo endoplásmico hasta la membrana celular, o tal vez cumpla una función como proteína de andamiaje como se ha descrito para una proteína ortóloga de la familia de TMEM16 (Manford, Stefan et al. 2012).

En este trabajo se describieron las características electrofisiológicas de 5 variantes de xtTMEM16A clonados de ovocitos expresadas en células HEK293. Nuestros resultados muestran que no hay diferencias significativas entre las cinéticas de activación y desactivación entre las células transfectadas con las variantes xtTMEM16A. Sin embargo, las variantes xtTMEM16A(1d, 13) y xtTMEM16A(1d, 13, 15) presentan una corriente activada al inicio del pulso

hiperpolarizante a -100 mV y cuyo análisis se realizó mediante el cociente (I_{start}/I_{end}) que denota la magnitud de la corriente generada por el pulso a -100 mV. Estas diferencias entre xtTMEM16A(1d, 13) y xtTMEM16A(1d, 13, 15) y las demás variantes, probablemente se deben a un grupo de canales que están abiertos al potencial de mantenimiento y que se cierran gradualmente a -100 mV. Es importante destacar que la presencia del exón 1d (Figura 11A) en estas variantes podría explicar estas propiedades funcionales ya que codifica para una secuencia aminoacídica con dos residuos de treonina potencialmente fosforilables (RKVTATEHREFSLAASINQNMQR, Figura 11A) por proteína cinasa c (PKC) y casein cinasa II (CK2) (Cohen 2000). Respecto a esto, se sabe que muchos receptores contienen residuos de treoninas, que luego de su fosforilación, interaccionan con otras proteínas de la cascada de señalización intracelular. Estos receptores contienen dominios consenso de fosforilación para cAMP, cGMP, PKC y CK2. De hecho, ya ha sido reportado que los extremos amino y carboxilo terminal de TMEM16A tienen secuencias consenso de fosforilación para proteínas cinasas como protein cinasa A (PKA), PKC y CAMK y ERK1, 2 (Kunzelmann, Kongsuphol et al. 2009).

Hasta ahora se han estudiado diversos sitios de fosforilación en la estructura primaria de TMEM16A. Es posible que los sitios de fosforilación de TMEM16A pudiesen jugar un papel importante en la regulación y actividad del canal. Recientemente se estudió el papel de la fosforilación en TMEM16A utilizando diversos inhibidores de cinasas (Tian, Kongsuphol et al. 2010), sin embargo, ninguno de estos compuestos disminuyó la corriente generada por TMEM16A. La diversidad en la secuencia de las isoformas xtTMEM16A encontradas por nuestro grupo de trabajo, no sugieren diferencias funcionales obvias por lo que se requerirán de un mayor número de estudios que permitan identificar las diferencias entre estas variantes como una posible diferencia en la dependencia de Ca^{2+} como se ha descrito por otros grupos (Ferrera, Caputo et al. 2009).

Para profundizar en la comprensión de las propiedades funcionales y farmacológicas del canal xtTMEM16A, en el presente trabajo se caracterizaron los efectos de los bloqueadores 9AC, DIDS, y T16A_{inh}-A01 sobre xtTMEM16A(13) y el doble mutante xtTMEM16A(R646E+R761E). Las IC₅₀ obtenidas para los distintos bloqueadores se encuentran en el rango reportadas por otros grupos, para T16A_{inh}-A01 se ha reportado una IC₅₀ \approx 1-2 μ M (Hartzell, Putzier et al. 2005; Namkung, Phuan et al. 2011; Davis, Shi et al. 2012; Bradley, Fedigan et al. 2014). Si bien las

discrepancias en la farmacología de los CaCCs podrían deberse a diferentes secuencias aminoacídicas de estos, también es posible que las diferencias radiquen en el sistema de expresión (i.e., efectos de asociación con otras proteínas presentes en los diversos sistemas). De hecho, los valores de IC_{50} encontrados en este trabajo presentan algunas diferencias entre los dos sistemas de expresión: DIDS (52.9 μ M en ovocitos y 99.2 μ M en células HEK-293) y 9-AC (66.3 μ M en ovocitos y 55 μ M en células HEK-293). En contraste, Yang y colaboradores mostraron que las corrientes generadas por TMEM16A en células HEK-293 son bloqueadas completamente por DIDS 10 μ M (Yang, Cho et al. 2008). Por otro lado, también mostramos que el bloqueo de la corriente de xtTMEM16A por 9AC y para el inhibidor T16A_{inh}-A01 es dependiente de voltaje y presenta diferencias significativas solamente a altas concentraciones del bloqueador (Figuras 17, 18).

Dado que el bloqueo de 9AC y T16A_{inh}-A01 es dependiente de voltaje, en este trabajo se examinó si los bloqueadores ejecutan su acción en dos residuos aminoacídicos que se propone son importantes en la selectividad del canal. Este análisis se realizó mediante un modelo que considera que: 1) el sitio de unión del bloqueador está dentro del poro del canal, 2) atraviesa el campo eléctrico de la membrana celular, 3) interacciona eléctricamente dentro del poro. Como se predice de las curvas dosis respuesta (Figura 16), en el caso de T16A_{inh}-A01 los valores de δ no varían en gran medida entre la variante TMEM16A(13), $\delta=0.33$ y la doble mutante TMEM16A(R646E+R761E), $\delta=0.25$ de manera que estos residuos aminoacídicos no juegan un papel importante en el bloqueo farmacológico del poro de xtTMEM16A. Pero, como el tamaño del bloqueador afecta la dependencia de voltaje podría ser también que en el caso del inhibidor T16A_{inh}-A01 donde los valores de δ son pequeños, este no se une al canal en un sitio suficientemente profundo del poro como para interaccionar de manera notable con los residuos que han sido mutados (R646 y R761). Otra hipótesis es que probablemente, el sitio de unión del inhibidor T16A_{inh}-A01 no está dentro del campo eléctrico de la membrana, pero ocurre una interacción entre el campo eléctrico y el bloqueador que altera la afinidad o la disponibilidad del sitio. De manera que ocurre una dependencia de voltaje aun cuando el sitio de unión se encuentre en una región externa en el poro del canal.

Sin embargo, los valores de δ para el bloqueador 9AC son de $\delta=0.32$ para la variante xtTMEM16A(13) y $\delta=0.49$ para la doble mutante y estos valores no difieren en gran medida a los

encontrados por Qu y Hartzel ($\delta=0.6$) (Qu and Hartzell 2001). Entonces, si se considera el sitio de unión del bloqueador iniciando en la región extracelular, hay una dependencia de voltaje del bloqueo que aumenta de manera proporcional a la distancia eléctrica δ , es decir valores de δ cercanos a 1. Esto significa que δ indica la profundidad a la que se une el bloqueador en el poro del canal y por lo tanto la interacción entre los residuos mutados R646 y R761 permite que 9AC se una en un sitio más profundo en el poro.

Es importante mencionar además, que estos resultados indican un bloqueo dependiente de voltaje que resulta más evidente a voltajes positivos, de manera que puede suponerse que el bloqueador no está dentro del poro a potenciales negativos. Además, cabe mencionar que si ocurre una interacción entre el bloqueador y el poro del canal, debe considerarse el tamaño del poro. Entonces, recordemos que se ha propuesto que el poro de los CaCC es un cono elíptico con dimensiones de aproximadamente 0.6 x 0.94 nm (Qu and Hartzell 2001) por lo que debe considerarse siempre el tamaño del bloqueador. En este sentido, se encontraron discrepancias entre la posible interacción de los bloqueadores con el poro del canal pues según lo propuesto por Qu y Hartzel, 9AC y DIDS tienen tamaños moleculares pequeños, sin embargo nosotros no encontramos ninguna diferencia para los valores de δ entre la variante TMEM16A(13) y la doble mutante TMEM16A(R646E+R761E). Sin duda alguna, se requieren de más estudios para determinar la estructura del poro pues este estudio sólo permite evaluar la interacción de dos residuos con el bloqueador.

8. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran las características funcionales del canal TMEM16A de *X. tropicalis* y nos llevaron a concluir que:

- Las corrientes endógenas CaCC de los ovocitos de *X. tropicalis* son inhibidas parcialmente por los bloqueadores de canales de cloruro.
- xtTMEM16A(13)-GFP se localiza principalmente en el hemisferio animal de los ovocitos mientras que en HEK293, se localiza tanto en la membrana plasmática como en vesículas intracelulares.
- Las cinco isoformas de xtTMEM16A expresadas en células HEK-293 forman canales funcionales y son dependientes de voltaje.
- No se encontraron diferencias significativas entre las cinéticas de activación y desactivación entre las variantes xtTMEM16A expresadas en células HEK-293.
- Las variantes xtTMEM16A(1d, 13) y xtTMEM16A(1d, 13, 15) presentan una corriente activada a voltajes hiperpolarizantes (a -100 mV) probablemente debido a un grupo de canales que están abiertos al potencial de mantenimiento y que se cierran gradualmente a -100 mV.
- El bloqueo de la corriente de xtTMEM16A en células HEK-293 para 9AC y para 16A_{inh}-A01 es dependiente de voltaje y presenta diferencias significativas solamente a altas concentraciones de los bloqueadores.
- Los valores del potencial eléctrico δ entre la variante xtTMEM16A(13) y la doble mutante xtTMEM16A(R646E+R761E) son diferentes en presencia de 9AC, lo que indica que la interacción entre los residuos mutados R646 y R761 permite que 9AC se una en un sitio más profundo en el poro.

9. APÉNDICE 1

La variante xtTMEM16A(13) y (xtTMEM16A(13)-GFP) fueron caracterizadas electrofisiológicamente para mostrar que GFP no altera las propiedades del canal. Se utilizó un protocolo de pasos de voltaje de -100 mV a 150 mV. Las curvas corriente-voltaje se obtuvieron midiendo el valor de la amplitud de la corriente al final de cada pulso. Las corrientes generadas por la expresión de las variantes de xtTMEM16A(13) y (xtTMEM16A(13)-GFP) no presentan diferencias significativas entre ellas (n=6).

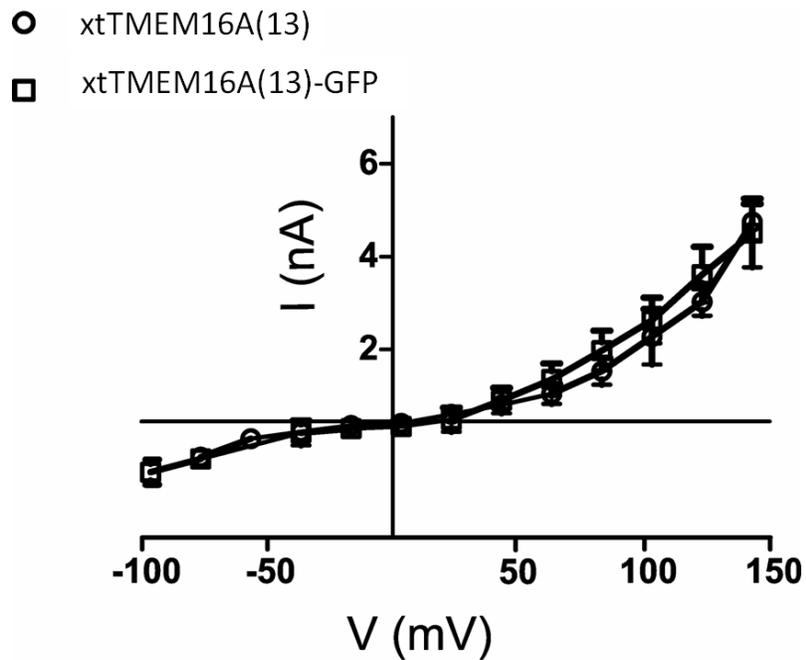


Figura A1. Relación I-V de las variantes xtTMEM16A(13) y (xtTMEM16A(13)-GFP). Se utilizó un protocolo de pasos de voltaje de -100 mV a 150 mV y se midió el valor de la amplitud de la corriente al final de cada pulso. No se observan diferencias significativas entre las variantes xtTMEM16A(13) y TMEM16A(13)-GFP. n=6

Los datos de las figuras 17B y 18B se graficaron en función de la concentración del bloqueador y se determinó la constante de disociación ajustando los valores a la ecuación 1 (descrita en materiales y métodos). Para el bloqueador 9AC, la constante de disociación disminuye de 72 μ M a 10 mV hasta 54 μ M a 130 mV en la variante xtTMEM16A(13) mientras que en la doble mutante, la disminución es menor; de 88 μ M a 10 mV hasta 76 μ M a 130 mV (Figura 19A-B). Sin embargo, para el inhibidor T16A_{inh}-A01 estas variaciones en la K_i no son tan evidentes lo que hace suponer que la interacción del inhibidor con el poro del canal es menos específica (Figura 19C-D).

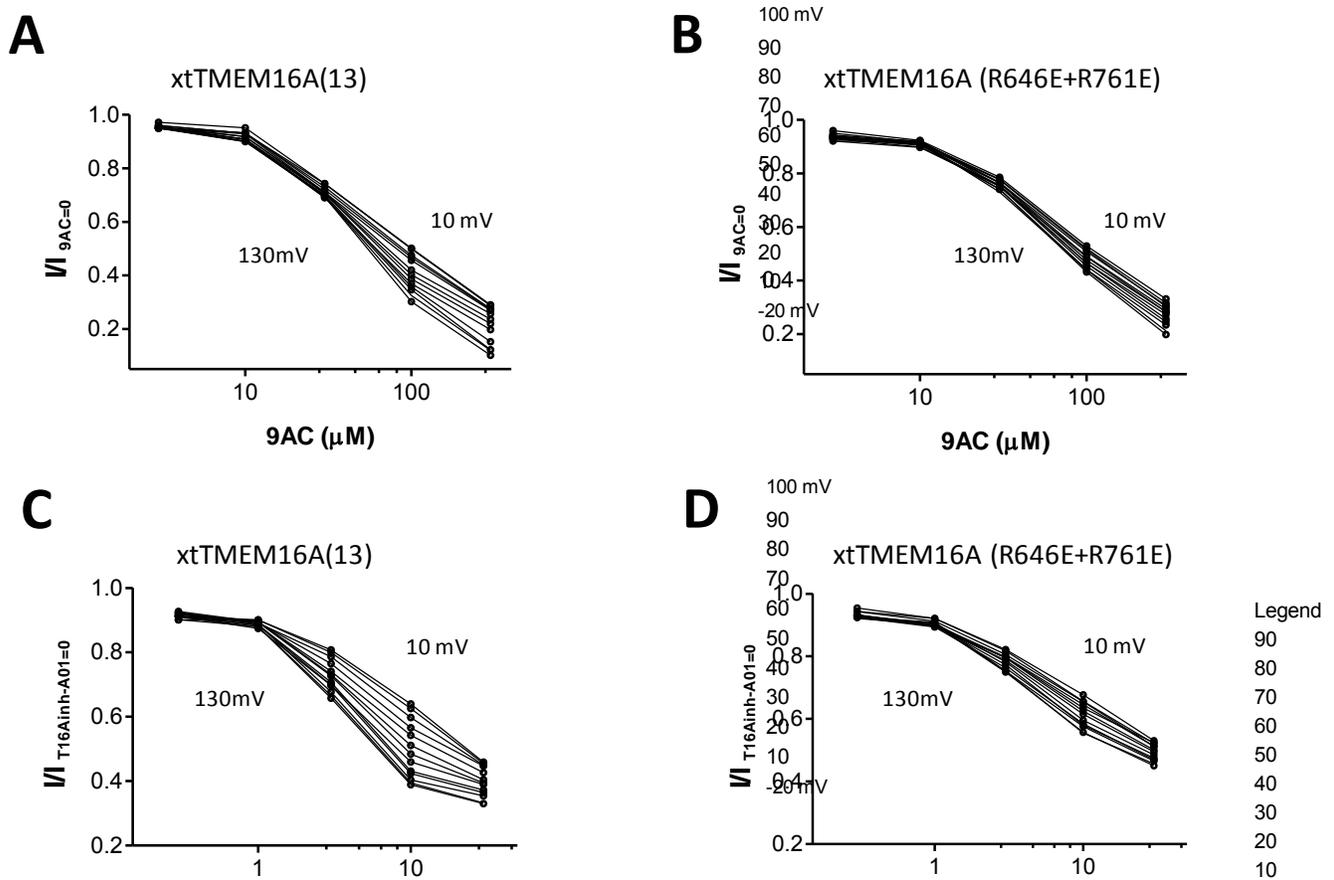


Figura A2. Curvas dosis-respuesta obtenidas a partir de las gráficas de las figuras 17 y 18. A-B Curvas dosis-respuesta para la variante xtTMEM16A (13) y xtTMEM16A(R646E+R761E) en presencia del bloqueador 9AC y **C-D.** Curvas para la variante xtTMEM16A (13) y xtTMEM16A(R646E+R761E) en presencia del inhibidor T16A_{inh}-A01. n=4

En la caracterización de las corrientes en células HEK-293, se evaluó la cinética de activación (τ_{act}) a +140 mV y desactivación (τ_{deact}) a -100 mV mediante el ajuste exponencial de las corrientes. La figura A3 muestra trazos representativos de las cinéticas de activación y desactivación de las 5 variantes.

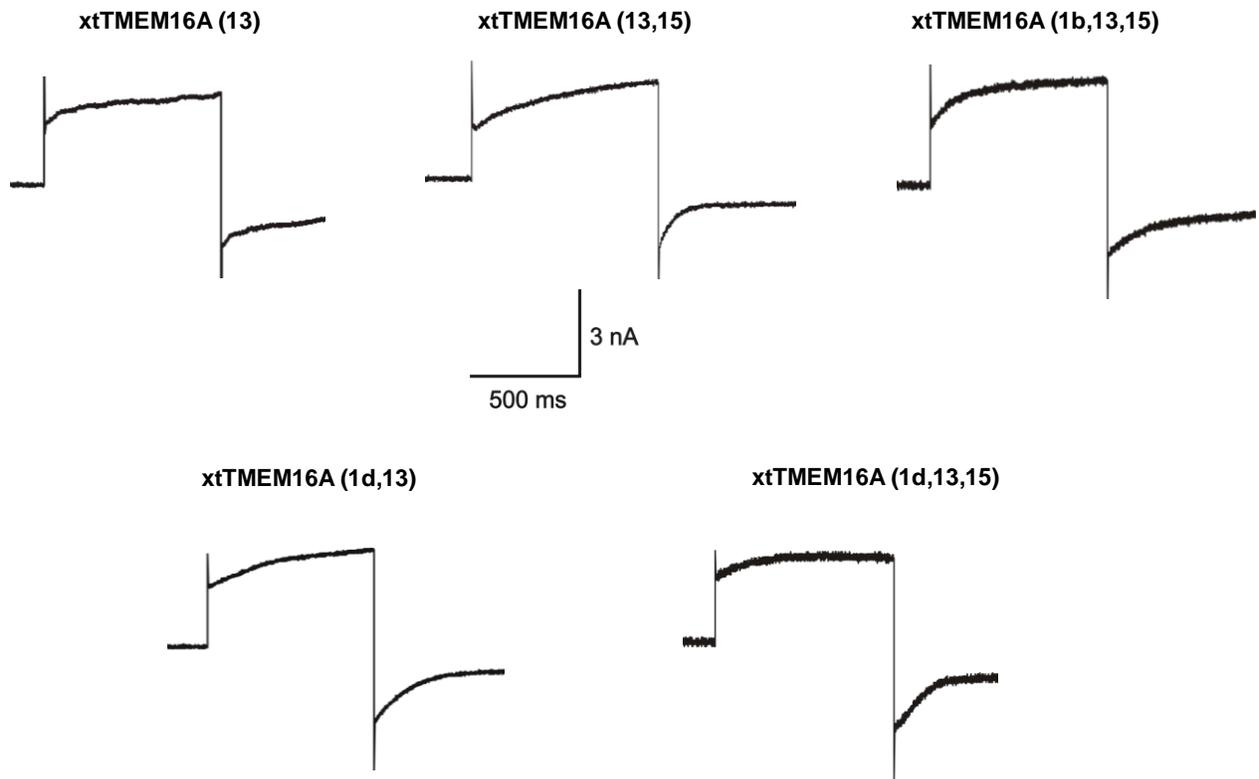


Figura A3. Trazos representativos de las cinéticas de activación y desactivación de las 5 variantes. Las corrientes fueron generadas un pulso de voltaje de +140 mV y una repolarización a -100 mV. La concentración de Ca^{2+} libre intracelular fue de $1\mu M$.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Andre, S., H. Boukhaddaoui, et al. (2003). "Axotomy-induced expression of calcium-activated chloride current in subpopulations of mouse dorsal root ganglion neurons." J Neurophysiol **90**(6): 3764-73.
- Arreola, J., J. E. Melvin, et al. (1996). "Activation of calcium-dependent chloride channels in rat parotid acinar cells." J Gen Physiol **108**(1): 35-47.
- Arreola, J., K. Park, et al. (1996). "Three distinct chloride channels control anion movements in rat parotid acinar cells." J Physiol **490 (Pt 2)**: 351-62.
- Bader, C. R., D. Bertrand, et al. (1982). "Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina." J Physiol **331**: 253-84.
- Barish, M. E. (1983). "A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte." J Physiol **342**: 309-25.
- Begenisich, T. and J. E. Melvin (1998). "Regulation of chloride channels in secretory epithelia." J Membr Biol **163**(2): 77-85.
- Boese, S. H., O. Aziz, et al. (2004). "Kinetics and regulation of a Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in mouse renal inner medullary collecting duct cells." Am J Physiol Renal Physiol **286**(4): F682-92.
- Bradley, E., S. Fedigan, et al. (2014). "Pharmacological characterization of TMEM16A currents." Channels (Austin) **8**(3).
- Britschgi, A., A. Bill, et al. (2013). "Calcium-activated chloride channel ANO1 promotes breast cancer progression by activating EGFR and CAMK signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(11): E1026-34.
- Caputo, A., E. Caci, et al. (2008). "TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity." Science **322**(5901): 590-4.
- Carles, A., R. Millon, et al. (2006). "Head and neck squamous cell carcinoma transcriptome analysis by comprehensive validated differential display." Oncogene **25**(12): 1821-31.
- Clunes, M. T. and R. C. Boucher (2007). "Cystic Fibrosis: The Mechanisms of Pathogenesis of an Inherited Lung Disorder." Drug Discov Today Dis Mech **4**(2): 63-72.
- Cockcroft, J. R., P. J. Chowienczyk, et al. (1994). "Inhibition of bradykinin-induced vasodilation in human forearm vasculature by icatibant, a potent B2-receptor antagonist." Br J Clin Pharmacol **38**(4): 317-21.
- Cohen, P. (2000). "The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update." Trends Biochem Sci **25**(12): 596-601.
- Cross, N. L. (1981). "Initiation of the activation potential by an increase in intracellular calcium in eggs of the frog, *Rana pipiens*." Dev Biol **85**(2): 380-4.
- Cross, N. L. and R. P. Elinson (1980). "A fast block to polyspermy in frogs mediated by changes in the membrane potential." Dev Biol **75**(1): 187-98.
- Cho, H., Y. D. Yang, et al. (2012). "The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons." Nat Neurosci **15**(7): 1015-21.
- Davis, A. J., J. Shi, et al. (2012). "Potent vasorelaxant activity of the TMEM16A inhibitor T16A(inh) -A01." Br J Pharmacol **168**(3): 773-84.
- Duran, C., C. H. Thompson, et al. (2009). "Chloride channels: often enigmatic, rarely predictable." Annu Rev Physiol **72**: 95-121.
- Ertongur-Fauth, T., A. Hochheimer, et al. (2014). "A novel TMEM16A splice variant lacking the dimerization domain contributes to calcium-activated chloride secretion in human sweat gland epithelial cells." Exp Dermatol.

-
- Espinosa, F., I. Lopez-Gonzalez, et al. (1999). "Anion channel blockers differentially affect T-type Ca(2+) currents of mouse spermatogenic cells, alpha1E currents expressed in Xenopus oocytes and the sperm acrosome reaction." *Dev Genet* **25**(2): 103-14.
- Fahlke, C., T. Knittle, et al. (1997). "Subunit stoichiometry of human muscle chloride channels." *J Gen Physiol* **109**(1): 93-104.
- Fallah, G., T. Romer, et al. (2010). "TMEM16A(a)/anoctamin-1 shares a homodimeric architecture with CLC chloride channels." *Mol Cell Proteomics* **10**(2): M110 004697.
- Fallah, G., T. Romer, et al. (2011). "TMEM16A(a)/anoctamin-1 shares a homodimeric architecture with CLC chloride channels." *Mol Cell Proteomics* **10**(2): M110 004697.
- Ferrera, L., A. Caputo, et al. (2009). "Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing." *J Biol Chem* **284**(48): 33360-8.
- Ferrera, L., P. Scudieri, et al. (2011). "A minimal isoform of the TMEM16A protein associated with chloride channel activity." *Biochim Biophys Acta* **1808**(9): 2214-23.
- Galiotta, L. J. (2009). "The TMEM16 protein family: a new class of chloride channels?" *Biophys J* **97**(12): 3047-53.
- Gomez-Hernandez, J. M., W. Stuhmer, et al. (1997). "Calcium dependence and distribution of calcium-activated chloride channels in Xenopus oocytes." *J Physiol* **502** (Pt 3): 569-74.
- Greenwood, I. A. and N. Leblanc (2007). "Overlapping pharmacology of Ca²⁺-activated Cl⁻ and K⁺ channels." *Trends Pharmacol Sci* **28**(1): 1-5.
- Hartzell, C., I. Putzier, et al. (2005). "Calcium-activated chloride channels." *Annu Rev Physiol* **67**: 719-58.
- Hartzell, H. C., K. Yu, et al. (2009). "Anoctamin/TMEM16 family members are Ca²⁺-activated Cl⁻ channels." *J Physiol* **587**(Pt 10): 2127-39.
- Hille, B. (1992). *Ion channels of Excitable Membranes*. Sunderland, MA, Sinauer Associates.
- Hogg, R. C., Q. Wang, et al. (1994). "Action of niflumic acid on evoked and spontaneous calcium-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein." *Br J Pharmacol* **112**(3): 977-84.
- Huang, F., J. R. Rock, et al. (2009). "Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(50): 21413-8.
- Huang, F., H. Zhang, et al. (2012). "Calcium-activated chloride channel TMEM16A modulates mucin secretion and airway smooth muscle contraction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(40): 16354-9.
- Huang, W. C., S. Xiao, et al. (2012). "Calcium-activated chloride channels (CaCCs) regulate action potential and synaptic response in hippocampal neurons." *Neuron* **74**(1): 179-92.
- Huang, X., S. M. Gollin, et al. (2002). "High-resolution mapping of the 11q13 amplicon and identification of a gene, TAOS1, that is amplified and overexpressed in oral cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17): 11369-74.
- Huanosta-Gutierrez, A., A. E. Espino-Saldana, et al. (2014). "TMEM16A alternative splicing isoforms in Xenopus tropicalis: distribution and functional properties." *Biochem Biophys Res Commun* **446**(4): 1096-101.
- Hwang, S. J., P. J. Blair, et al. (2009). "Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles." *J Physiol* **587**(Pt 20): 4887-904.
- Jentsch, T. J., V. Stein, et al. (2002). "Molecular structure and physiological function of chloride channels." *Physiol Rev* **82**(2): 503-68.
- Jeon, J. H., S. S. Paik, et al. (2013). "Presynaptic Localization and Possible Function of Calcium-Activated Chloride Channel Anoctamin 1 in the Mammalian Retina." *PLoS One* **8**(6): e67989.
- Jung, J., J. H. Nam, et al. (2012). "Dynamic modulation of ANO1/TMEM16A HCO₃⁻ permeability by Ca²⁺/calmodulin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(1): 360-5.

-
- Kaneko, H., F. Mohrlen, et al. (2006). "Calmodulin contributes to gating control in olfactory calcium-activated chloride channels." *J Gen Physiol* **127**(6): 737-48.
- Kaneko, H., I. Putzier, et al. (2004). "Chloride accumulation in mammalian olfactory sensory neurons." *J Neurosci* **24**(36): 7931-8.
- Kleene, S. J. (2008). "The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia." *Chem Senses* **33**(9): 839-59.
- Kleene, S. J. and R. C. Gesteland (1991). "Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia." *J Neurosci* **11**(11): 3624-9.
- Kunzelmann, K., P. Kongsuphol, et al. (2009). "Bestrophin and TMEM16-Ca(2+) activated Cl(-) channels with different functions." *Cell Calcium* **46**(4): 233-41.
- Lalonde, M. R., M. E. Kelly, et al. (2008). "Calcium-activated chloride channels in the retina." *Channels (Austin)* **2**(4): 252-60.
- Lamb, F. S. and T. J. Barna (1998). "Chloride ion currents contribute functionally to norepinephrine-induced vascular contraction." *Am J Physiol* **275**(1 Pt 2): H151-60.
- Large, W. A. and Q. Wang (1996). "Characteristics and physiological role of the Ca(2+)-activated Cl-conductance in smooth muscle." *Am J Physiol* **271**(2 Pt 1): C435-54.
- Ledoux, J., I. A. Greenwood, et al. (2005). "Dynamics of Ca²⁺-dependent Cl⁻ channel modulation by niflumic acid in rabbit coronary arterial myocytes." *Mol Pharmacol* **67**(1): 163-73.
- Lee, J., J. Jung, et al. (2014). "Two helices in the third intracellular loop determine anoctamin 1 (TMEM16A) activation by calcium." *Pflugers Arch*.
- Liu, Y., H. Zhang, et al. "Characterization of the effects of Cl channel modulators on TMEM16A and bestrophin-1 Ca activated Cl channels." *Pflugers Arch*.
- Lowe, G. and G. H. Gold (1993). "Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells." *Nature* **366**(6452): 283-6.
- Machaca, K. and S. Haun (2000). "Store-operated calcium entry inactivates at the germinal vesicle breakdown stage of *Xenopus* meiosis." *J Biol Chem* **275**(49): 38710-5.
- Manford, A. G., C. J. Stefan, et al. (2012). "ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology." *Dev Cell* **23**(6): 1129-40.
- Marchant, J. S. and I. Parker (2001). "Xenopus tropicalis oocytes as an advantageous model system for the study of intracellular Ca(2+) signalling." *Br J Pharmacol* **132**(7): 1396-410.
- Maricq, A. V. and J. I. Korenbrot (1988). "Calcium and calcium-dependent chloride currents generate action potentials in solitary cone photoreceptors." *Neuron* **1**(6): 503-15.
- Mayer, M. L. (1985). "A calcium-activated chloride current generates the after-depolarization of rat sensory neurones in culture." *J Physiol* **364**: 217-39.
- Melvin, J. E. (1999). "Chloride channels and salivary gland function." *Crit Rev Oral Biol Med* **10**(2): 199-209.
- Melvin, J. E., D. Yule, et al. (2005). "Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells." *Annu Rev Physiol* **67**: 445-69.
- Middleton, R. E., D. J. Pheasant, et al. (1996). "Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel." *Nature* **383**(6598): 337-40.
- Miledi, R. (1982). "A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **215**(1201): 491-7.
- Miledi, R. and I. Parker (1984). "Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes." *J Physiol* **357**: 173-83.
- Milenkovic, V. M., M. Brockmann, et al. (2010). "Evolution and functional divergence of the anoctamin family of membrane proteins." *BMC Evol Biol* **10**: 319.

-
- Namkung, W., P. W. Phuan, et al. (2011). "TMEM16A inhibitors reveal TMEM16A as a minor component of calcium-activated chloride channel conductance in airway and intestinal epithelial cells." J Biol Chem **286**(3): 2365-74.
- Nilius, B., J. Prenen, et al. (1997). "Calcium-activated chloride channels in bovine pulmonary artery endothelial cells." J Physiol **498 (Pt 2)**: 381-96.
- O'Driscoll, K. E., R. A. Pipe, et al. (2011). "Increased complexity of Tmem16a/Anoctamin 1 transcript alternative splicing." BMC Mol Biol **12**: 35.
- Ochoa-de la Paz, L. D., A. E. Espino-Saldana, et al. (2013). "Characterization of an outward rectifying chloride current of *Xenopus tropicalis* oocytes." Biochim Biophys Acta **1828**(8): 1743-53.
- Ottolia, M. and L. Toro (1994). "Potentiation of large conductance KCa channels by niflumic, flufenamic, and mefenamic acids." Biophys J **67**(6): 2272-9.
- Ousingsawat, J., J. R. Martins, et al. (2009). "Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca²⁺-dependent chloride transport." J Biol Chem **284**(42): 28698-703.
- Pedemonte, N. and L. J. Galiotta (2014). "Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins)." Physiol Rev **94**(2): 419-59.
- Pereida, E. (2013). Caracterización de la corriente activada por microinyección de calcio en ovocitos de *Xenopus tropicalis*. Unidad Académica de Ciencias Químicas. Zacatecas, México, UNAM. **Tesis de Licenciatura**: 40.
- Piper, A. S., I. A. Greenwood, et al. (2002). "Dual effect of blocking agents on Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells." J Physiol **539**(Pt 1): 119-31.
- Planells-Cases, R. and T. J. Jentsch (2009). "Chloride channelopathies." Biochim Biophys Acta **1792**(3): 173-89.
- Qu, Z. and H. C. Hartzell (2000). "Anion permeation in Ca²⁺-activated Cl⁻ channels." J Gen Physiol **116**(6): 825-44.
- Qu, Z. and H. C. Hartzell (2001). "Functional geometry of the permeation pathway of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels inferred from analysis of voltage-dependent block." J Biol Chem **276**(21): 18423-9.
- Qu, Z., R. W. Wei, et al. (2003). "Characterization of Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in mouse kidney inner medullary collecting duct cells." Am J Physiol Renal Physiol **285**(2): F326-35.
- Reyes, J. P., A. Lopez-Rodriguez, et al. (2013). "Anion permeation in calcium-activated chloride channels formed by TMEM16A from *Xenopus tropicalis*." Pflugers Arch **466**(9): 1769-77.
- Riordan, J. R. (2008). "CFTR function and prospects for therapy." Annu Rev Biochem **77**: 701-26.
- Rock, J. R., C. R. Futtner, et al. (2008). "The transmembrane protein TMEM16A is required for normal development of the murine trachea." Dev Biol **321**(1): 141-9.
- Rock, J. R., W. K. O'Neal, et al. (2009). "Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca²⁺-regulated Cl⁻ secretory channel in mouse airways." J Biol Chem **284**(22): 14875-80.
- Ruiz, C., J. R. Martins, et al. (2012). "Enhanced expression of ANO1 in head and neck squamous cell carcinoma causes cell migration and correlates with poor prognosis." PLoS One **7**(8): e43265.
- Scudieri, P., E. Sondo, et al. (2013). "TMEM16A-TMEM16B chimaeras to investigate the structure-function relationship of calcium-activated chloride channels." Biochem J **452**(3): 443-55.
- Scudieri, P., E. Sondo, et al. (2011). "The anoctamin family: TMEM16A and TMEM16B as calcium-activated chloride channels." Exp Physiol **97**(2): 177-83.
- Schroeder, B. C., T. Cheng, et al. (2008). "Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit." Cell **134**(6): 1019-29.
- Sheridan, J. T., E. N. Worthington, et al. (2014). "Characterization of the oligomeric structure of the Ca²⁺-activated Cl⁻ channel Ano1/TMEM16A." J Biol Chem **286**(2): 1381-8.

-
- Sondo, E., P. Scudieri, et al. (2014). "Non-canonical translation start sites in the TMEM16A chloride channel." *Biochim Biophys Acta* **1838**(1 Pt B): 89-97.
- Stephan, A. B., E. Y. Shum, et al. (2009). "ANO2 is the ciliary calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(28): 11776-81.
- Thomas-Gatewood, C., Z. P. Neeb, et al. (2011). "TMEM16A channels generate Ca²⁺(+)-activated Cl⁻ currents in cerebral artery smooth muscle cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**(5): H1819-27.
- Tian, Y., P. Kongsuphol, et al. (2010). "Calmodulin-dependent activation of the epithelial calcium-dependent chloride channel TMEM16A." *FASEB J* **25**(3): 1058-68.
- Tien, J., H. Y. Lee, et al. (2013). "Identification of a dimerization domain in the TMEM16A calcium-activated chloride channel (CaCC)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(16): 6352-7.
- Vergani, P., S. W. Lockless, et al. (2005). "CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains." *Nature* **433**(7028): 876-80.
- Vocke, K., K. Dauner, et al. (2013). "Calmodulin-dependent activation and inactivation of anoctamin calcium-gated chloride channels." *J Gen Physiol* **142**(4): 381-404.
- Wang, H. S., J. E. Dixon, et al. (1997). "Unexpected and differential effects of Cl⁻ channel blockers on the Kv4.3 and Kv4.2 K⁺ channels. Implications for the study of the I_(to2) current." *Circ Res* **81**(5): 711-8.
- Wang, M., H. Yang, et al. (2012). "Downregulation of TMEM16A calcium-activated chloride channel contributes to cerebrovascular remodeling during hypertension by promoting basilar smooth muscle cell proliferation." *Circulation* **125**(5): 697-707.
- Wang, Y., T. Alam, et al. (2013). "Phylogenetic, expression, and functional analyses of anoctamin homologs in *Caenorhabditis elegans*." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **305**(11): R1376-89.
- Weber, W. (1999). "Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art." *Biochim Biophys Acta* **1421**(2): 213-33.
- West, R. B., C. L. Corless, et al. (2004). "The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status." *Am J Pathol* **165**(1): 107-13.
- White, M. M. and M. Aylwin (1990). "Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca²⁺(+)-activated Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes." *Mol Pharmacol* **37**(5): 720-4.
- Wiwchar, M., R. Ayon, et al. (2009). "Phosphorylation alters the pharmacology of Ca²⁺(+)-activated Cl⁻ channels in rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells." *Br J Pharmacol* **158**(5): 1356-65.
- Woodhull, A. M. (1973). "Ionic blockage of sodium channels in nerve." *J Gen Physiol* **61**(6): 687-708.
- Xiao, Q. and Y. Cui (2014). "Acidic amino acids in the first intracellular loop contribute to voltage- and calcium- dependent gating of anoctamin1/TMEM16A." *PLoS One* **9**(6): e99376.
- Xiao, Q., K. Yu, et al. (2011). "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**(21): 8891-6.
- Xu, W. X., S. J. Kim, et al. (1997). "Volume-sensitive chloride current activated by hyposmotic swelling in antral gastric myocytes of the guinea-pig." *Pflugers Arch* **435**(1): 9-19.
- Yang, Y. D., H. Cho, et al. (2008). "TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance." *Nature* **455**(7217): 1210-5.
- Yu, K., C. Duran, et al. (2012). "Explaining calcium-dependent gating of anoctamin-1 chloride channels requires a revised topology." *Circ Res* **110**(7): 990-9.
- Zhang, Y. P., H. Zhang, et al. (2012). "Chloride channels in stroke." *Acta Pharmacol Sin* **34**(1): 17-23.