



# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

## **ANÁLISIS CINÉTICO DE LOS CANALES DE CLORURO ACTIVADOS POR CALCIO**

**Tesis que presenta el M. EN C. Juan Antonio Contreras Vite**

**Para obtener el grado de Doctor en Ciencias en el área de Física**

### **Director de Tesis:**

**Dr. Jorge Arreola Gómez (IF-UASLP)**

### **Asesores Internos:**

**Dr. José Elías Pérez López (IF-UASLP)**

**Dr. José A. Méndez Cabañas (IF-UASLP)**

**Dr. Ricardo Guirado López (IF-UASLP)**

### **Asesor Externo:**

**Dr. Braulio González Medina (IPICYT)**

**JUNIO DE 2016**

*Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí con el apoyo de CONACyT (Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología) a través de una beca con número 229968.*

## *Agradecimientos*

*A mi madre Angelina Vite Salinas por todo el amor, el cariño, las enseñanzas, por su apoyo incondicional en todo momento, por guiarme y mostrarme como se recorre el camino en esta vida. TE AMO...GRACIAS por todo Mami hermosa!*

*A mi esposa Norma Paola Márquez Garrido por tu apoyo, comprensión, aliento, cuidados y por estar conmigo en los momentos difíciles... GRACIAS mi Amosis TE AMO!*

*A mi hija Yatziri Danaé Contreras Márquez por ser mi "motorsito" que me impulsa y motiva a trabajar con empeño día a día, GRACIAS mi princesa hermosa, TE AMO!*

*A mi hermano Bernardo Contreras Vite por todo tu apoyo cuando más es necesario, por cariño y tu enorme corazón que compartes con todos nosotros, GRACIAS hermano!*

*A mi hermano Efren Contreras Vite por todo tu apoyo y cariño, GRACIAS hermano!*

*Al Dr. Jorge Arreola por el apoyo en la realización de este trabajo.*

*A mi primo querido Luis Enrique Vite Rangel por la maravillosa edición de este trabajo, GRACIAS hermano!*

*A la memoria de mi abuelito Efren Vite Lara, abuelito aquí esta su Doctor...GRACIAS por Todo!*

*A mi Dios por siempre estar conmigo y darme la luz del cielo que es magia que habita en mi corazón!*

# Contenido

Resumen .....	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Capítulo 1. Fundamentos.....	11
1.I  Canales iónicos.....	11
Capítulo 2. Los Canales de Cloruro activados por Calcio (CaCCs).....	16
2.I  Propiedades Generales de los CaCCs.....	16
2.II  Estructura de TMEM16A.....	17
2.III  Activación de TMEM16A causada por cambios en $V_m$ , $[Ca^{2+}]_i$ y $[Cl^-]_e$ .....	20
Capítulo 3. Modelos de Estados Discretos de Markov.....	27
3.I  Estados conformacionales de los canales.....	27
3.II  Las frecuencias de transición dependen de la energía de activación.....	28
3.III  Modelo de dos estados.....	31
3.IV  Modelo de m estados.....	33
Capítulo 4. Planteamiento del Problema.....	35
4.I  Limitaciones de los modelos previamente propuestos para describir el mecanismo de apertura y cierre de los CaCCs.....	35
5.I  Objetivo General.....	40
5.II  Objetivos específicos.....	40
Capítulo 6. Metodología.....	41
6.I  Análisis y Modelado.....	41

6.II	Metodología para obtener los datos experimentales. La técnica de experimental “Patch Clamp”.	43
6.III	Selección de los datos experimentales usados.	45
Capítulo 7. Resultados.		47
7.I	Análisis cinético de la apertura y cierre de TMEM16A.	47
7.II	TMEM16A se activa por $V_m$ en ausencia de $Ca^{2+}$ intracelular.	48
7.III	Unión del ion de $Cl^-$ desde el medio extracelular	52
7.IV	Unión de los iones de $Ca^{2+}$ desde el medio intracelular	53
7.V	Puede el modelo de 8 estados explicar la activación de TMEM16A?	57
7.VI	El modelo de 12 estados explica la activación de TMEM16A.	61
7.VII	El modelo de 12 estados y sus frecuencias de transición predicen propiedades estacionaras que son consistentes con los datos experimentales	67
Capítulo 8. Predicciones del modelo de 12 estados.		71
8.I	Los cambios en $[Cl^-]_e$ no regulan la sensibilidad por $Ca^{2+}$ de TMEM16A.	71
Capítulo 9. Rutas de activación de TMEM16A.		73
9.I	Activación dependiente de $V_m$ en ausencia de $Ca^{2+}$ intracelular.	73
9.II	Activación dependiente de $V_m$ y en presencia de $Ca^{2+}$ intracelular	75
Capítulo 10. Discusión		79
10.I	Dependencia con el $V_m$	80
10.II	Unión del $Ca^{2+}$	80
10.III	El efecto del $Cl^-$ extracelular.	82
10.IV	Estabilización del estado abierto y mecanismo dual de activación.	82
Capítulo 11. Conclusiones		84
Capítulo 12. Trabajo a Futuro.		85
12.I	Origen de la dependencia con el $V_m$ de TMEM16A	85

12.II	Análisis Cinético del mecanismo de apertura y cierre de TMEM16B.....	85
	Bibliografía.....	89
	Tablas.....	94
	Figuras.....	95
	Apéndice.....	102
A.1	Probabilidad de Ocupación de los Estados del Esquema IV.....	102

# Resumen

---

TMEM16A (ANO1) y TMEM16B (ANO2) son unidades estructurales de los canales de cloruro activados por calcio (CaCCs). El movimiento del ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) a través de TMEM16A desempeña un papel importante en varias funciones celulares tales como: la regulación de la contracción de músculos suaves, regulación de la excitabilidad cardiaca y neuronal, secreción de saliva, influencia en el crecimiento y proliferación de tumores en muchos tipos de cáncer. Se sabe que el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A es regulado por la combinación de factores como son cambios en el voltaje de membrana positivos ( $V_m$ ), cambios en la concentración de calcio del medio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) y cambios en la concentración de cloruro del medio extracelular ( $[\text{Cl}^-]_e$ ). Para poder entender el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A, en este trabajo se realizó un análisis de la cinética de la corriente de cloruro ( $I_{\text{Cl}}$ ) generada por TMEM16A cuando se expresó en células HEK293. Esto permitió a su vez construir modelos de Estados Discretos de Markov para describir y entender el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A debido al acoplamiento de  $V_m$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y  $[\text{Cl}^-]_e$ . De los distintos modelos probados, un modelo de 12 estados reprodujo exitosamente las propiedades de activación de TMEM16A. Nuestro modelo establece que para activarse, TMEM16A requiere de la unión directa, secuencial y modulada por el  $V_m$  de dos iones de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio intracelular. Por otra parte, el papel del  $\text{Cl}^-$  extracelular sobre el mecanismo de apertura de TMEM16A es el de favorecer la configuración abierta que el canal logra por la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  y la acción del  $V_m$ . Interesantes predicciones emanan del modelo de 12 estados; (1) el  $\text{Cl}^-$  extracelular no cambia la sensibilidad por  $\text{Ca}^{2+}$  del canal, esto fue corroborado experimentalmente, y que más bien el papel del  $\text{Cl}^-$  extracelular estabiliza la apertura del canal lograda por  $\text{Ca}^{2+}$ , (2) sugiere una participación directa del ion  $\text{Cl}^-$  como responsable de propiciar la activación dependiente del voltaje del canal.

# Abstract

---

TMEM16A (ANO1) and TMEM16B (ANO2) are structural components of calcium-activated chloride channels. Cl<sup>-</sup> movement through TMEM16A regulates several physiological and pathophysiological processes such as smooth muscle contraction, cardiac and neuronal excitability, salivary secretion, tumour growth and cancer progression. Gating of TMEM16A is complex because involves the interplay between increases in intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ), membrane depolarization, extracellular Cl<sup>-</sup> or permeant anions. Our goal here was to understand how these variables regulate TMEM16A gating. For this purpose we developed different discrete states Markov models. We found that a 12-states Markov model explains correctly TMEM16A activation properties caused by the coupling of changes on voltage membrane ( $V_m$ ),  $[Ca^{2+}]_i$  and  $[Cl^-]_e$ . The 12-states model establishes that TMEM16A activation is achieved by as a sequential, direct and  $V_m$ -dependent binding of two Ca<sup>2+</sup> ions coupled to a  $V_m$ -dependent binding of an external Cl<sup>-</sup> ion, with  $V_m$ -dependent transitions between states. Interestingly our model predicts that (1) extracellular Cl<sup>-</sup> does not alter the apparent Ca<sup>2+</sup> affinity of TMEM16A, which was experimentally corroborated, instead extracellular Cl<sup>-</sup> acts by stabilizing the open configuration induced by Ca<sup>2+</sup> and (2) Cl<sup>-</sup> ions contribute to the  $V_m$  dependence of activation.



# Introducción

---

Los canales iónicos de cloruro activados por calcio intracelular (CaCCs) son proteínas que permiten el flujo del ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) entre los medios intra y extracelulares. Desde su descubrimiento (Miledi, 1982), se ha hecho un análisis de su mecanismo de apertura y cierre debido a variaciones en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y variaciones en  $V_m$  (Arreola *et al.*, 1996; Nilius *et al.*, 1997; Kuruma & Hartzell, 2000). La importancia del estudio de estos canales radica en el papel que tiene la corriente de  $\text{Cl}^-$  en diversas funciones celulares tales como: transducción sensorial (Kleene, 1997, Mckleskey & Gold, 1999) regulación de la excitabilidad cardiaca y neuronal (Frings *et al.*, 2000; Hartzell *et al.*, 2005), secreción de fluido epitelial (Duan *et al.*, 2009; Romanenko *et al.*, 2010), proliferación celular y tumorigénesis (Duvvurin *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2014). No obstante, la identidad molecular de dichas proteínas permaneció desconocida hasta el año 2008 cuando tres grupos de investigadores (Caputo *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008), de manera independiente, identificaron a una familia de proteínas (actualmente conocido como TMEM16 o Anoctaminas), cuyos miembros nombrados como TMEM16A (ANO1) y TMEM16B (ANO2) son componentes estructurales de los CaCCs. Cuando TMEM16A se expresa en sistemas heterólogos por ejemplo, células HEK293, la  $I_{\text{Cl}}$  que genera exhibe todas las propiedades biofísicas mostradas por los CaCCs endógenos. Es un rectificador saliente de  $I_{\text{Cl}}$  para bajas concentraciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Caputo *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008), y al igual que los CaCCs endógenos, su corriente es abatida por bloqueadores como; ácido niflumico, 5-nitro-2-(-fenilpropilamino)-benzoato y ácido 4,4'-diisotiocianato-estibeno-2,2'-disulfónico.

TMEM16A es activada por la combinación de estímulos de  $V_m$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Caputo *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2011; Terashima *et al.*, 2013). No obstante, se ha demostrado que la activación de TMEM16A en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es posible (Xiao *et al.*, 2011). Este hecho abre la puerta a la posibilidad de que la activación de estos canales ante condiciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i=0 \mu\text{M}$  se deba a la existencia de sensores intrínsecos de voltaje, lo cual explicaría la dependencia con el voltaje del mecanismo de apertura y cierre de este canal. No obstante, nuestros datos experimentales

sugieren la posibilidad de que TMEM16A no posea sensores intrínsecos de voltaje y que la dependencia con el voltaje este conferida por mecanismos diferentes. Por otro lado, las dificultades en identificar los sitios de unión para el  $\text{Ca}^{2+}$  aunado con la existencia de varios sitios de unión intrínsecos a calmodulina (CAM) sobre la secuencia de TMEM16A ha llevado a pensar que la sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  de este canal viene conferida de manera extrínseca por CAM (Tian *et al.*, 2011; Vocke *et al.*, 2013). Esta hipótesis se ha topado con la evidencia de que para canales TMEM16A a los cuales se les han mutado los sitios de unión a CAM, las corrientes generadas por estos canales mutantes no se ven afectadas (Yu *et al.*, 2012), lo cual fortalece la idea de que el sensado por el  $\text{Ca}^{2+}$  en TMEM16A se estaría llevando a cabo por la unión directa del  $\text{Ca}^{2+}$ . Asimismo, en experimentos de mutagénesis se ha logrado identificar a varios aminoácidos que son muy importantes en el sensado del  $\text{Ca}^{2+}$  (Yu *et al.*, 2012; Tien *et al.*, 2014). Muy recientemente, la estructura cristalográfica de la escramblasa nhTMEM16, miembro de la familia de proteínas TMEM16, reveló la existencia de un sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  en cada una de sus dos subunidades (Brunner *et al.*, 2014). Aunque las funciones de la escramblasa son muy distintas a la de los canales iónicos de la familia (Picollo *et al.*, 2014), la región donde se encuentran los posibles sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  está altamente conservada entre los miembros de la familia, lo cual sugiere entonces que estos sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  estarían presentes también en TMEM16A. Todos estos elementos fortalecen aún más el hecho de que el sensado por el  $\text{Ca}^{2+}$  en TMEM16A es debido a la unión directa del  $\text{Ca}^{2+}$ .

Recientemente se ha encontrado que los cambios en  $[\text{Cl}^-]_e$  también modifican las propiedades de activación de estos canales (Xiao *et al.*, 2011) y que el efecto acoplado de aplicaciones de  $V_m$  de larga duración (20 s) con altas concentraciones de  $\text{Cl}^-$  externo inducen un segundo componente en la cinética de  $I_{\text{Cl}}$  generada por canales TMEM16A lo cual está asociado con un mecanismo dual de activación (Cruz-Rangel *et al.*, 2015).

Para poder entender el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A, en este trabajo fue realizado un análisis de la cinética de la  $I_{\text{Cl}}$  generada por TMEM16A cuando se expresó en células HEK293. Esto permitió construir modelos de Estados Discretos de Markov para describir el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A ante el acoplamiento de  $V_m$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y  $[\text{Cl}^-]_e$ . De los distintos modelos probados, un modelo de 12 estados reprodujo

exitosamente las propiedades de activación de TMEM16A. El modelo establece que para activarse, TMEM16A requiere de la unión directa, secuencial y modulada por el  $V_m$  de dos iones de  $Ca^{2+}$  del medio intracelular. Por otra parte, el efecto del  $Cl^-$  extracelular sobre la activación de TMEM16A es el de favorecer la configuración abierta que el canal logra por la unión del  $Ca^{2+}$  y la acción del  $V_m$ . Interesantes predicciones emanan del modelo: (1) el  $Cl^-$  extracelular estabiliza la apertura del canal lograda por  $Ca^{2+}$ , (2) sugiere una participación directa del ion  $Cl^-$  como responsable de propiciar la activación voltaje dependiente del canal.

# Capítulo 1. Fundamentos.

## 1.1 Canales iónicos.

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que forman un poro que se abre y se cierra en respuesta a estímulos tales como diferencias de voltaje a través de la membrana celular ( $V_m$ ), por la unión o de alguna molécula en dominios específicos del canal (activación por ligandos), por efecto mecánico sobre la membrana, o por cambios en la temperatura del ambiente celular. La Figura 1 muestra una representación de un canal iónico cuya respuesta se debe a la unión de un ligando, en este caso un ion de  $Ca^{2+}$ . La apertura del canal permite el flujo de iones (en color azul) a través de su poro el cual está representado por las barras color gris de la Figura.

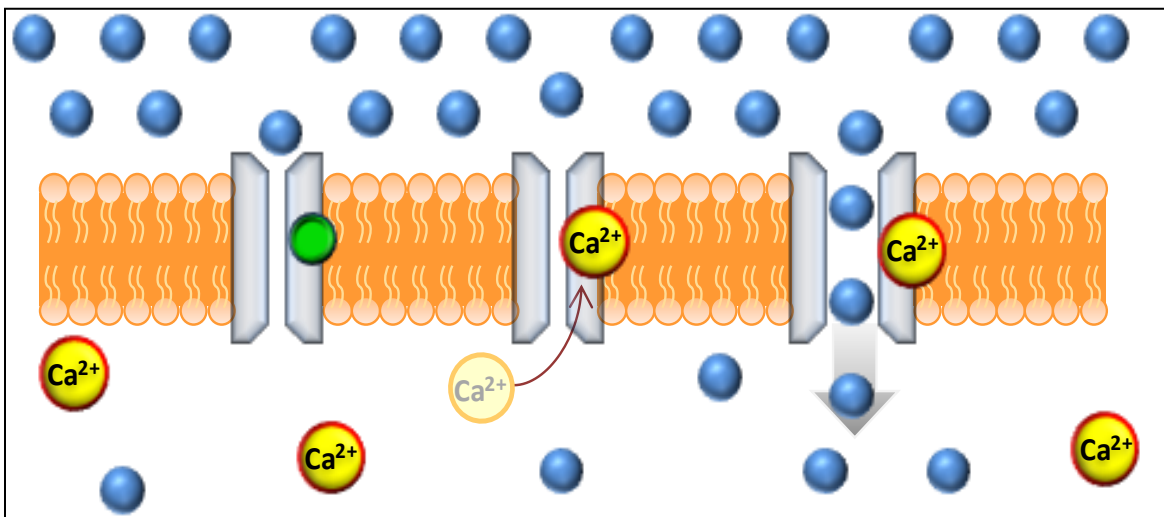


Figura 1. Representación de un canal iónico activado por  $Ca^{2+}$ . El canal se ilustra por barras grises y se encuentra embebido en la membrana plasmática representada por la franja horizontal color naranja. La región que se encuentra entre las barras representa la vía de permeación a través de la cual los iones (esferas azules) pasaran ya sea hacia el exterior o al interior de la célula. El sitio de unión del  $Ca^{2+}$  se ilustra con el círculo verde. Este sitio se encuentra localizado en una parte del canal que estaría dentro de la membrana, por lo que la probabilidad de ocupación del sitio depende del voltaje de membrana. El primer caso muestra el canal cerrado sin  $Ca^{2+}$  unido. El segundo caso muestra la unión del  $Ca^{2+}$  sobre el canal cerrado. El tercer caso muestra un canal abierto con  $Ca^{2+}$  unido y los iones fluyendo de acuerdo al gradiente electroquímico.

El intercambio de iones entre los medios intra y extracelular causado por la apertura de los canales iónicos juega un importante papel en el proceso de señalización celular, pues la capacidad de los canales para detectar estímulos de carácter térmico, químico, eléctrico y mecánico se traduce en impulsos eléctricos (Hille, 1978). Otro aspecto relevante asociado con los canales iónicos son las denominadas canalopatías, las cuales son enfermedades causadas por mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas (Ashcroft 2000; Dworakowska & Dolowy, 2000; Graves, 2006; Kuo & Ehrlich, 2012). Por ejemplo, se ha demostrado que mutaciones en los genes que codifican para el canal de cloruro ClC-1 presente en el musculo esquelético están involucradas en dos formas de miotonía humana; congénita y generalizada. Ambas miotonías se caracterizan por la dificultad en relajar los músculos una vez que se ha llevado a cabo una contracción. Es por este tipo de hechos que resulta relevante el estudio de las propiedades estructurales y funcionales de los canales iónicos. Una manera de llevar a cabo dicho estudio es mediante la corriente iónica que fluye a través de estas de proteínas.

La corriente iónica debida a un reducido número de canales embebidos en la membrana celular, es denominada corriente unitaria, la cual se define como:

$$i = gP_0(V_m - V_e) \quad \text{Ecuación 1}$$

donde  $g$  es la conductancia de canal único,  $P_0$  es la probabilidad de apertura del canal, ésta dependerá del tiempo y podría depender de factores tales como el voltaje, cambios en la temperatura del ambiente celular, etc.  $V_m$  es el voltaje de membrana,  $V_e$  es el voltaje de equilibrio que está determinado por el gradiente de concentraciones  $C$  de los iones permeantes y está dado por la ecuación de *Nernst*:

$$V_e = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[C]_e}{[C]_i} \right) \quad \text{Ecuación 2}$$

aquí  $z$  es la valencia del ion,  $F$  es la constante de Faraday,  $T$  es la temperatura y  $R$  es la constante universal de los gases.

La corriente macroscópica se define como la resultante de la apertura de  $N_C$  canales y está dada como:

$$I = N_C P_O g (V_m - V_e) \quad \text{Ecuación 3}$$

En el desarrollo de este trabajo fueron usados registros de corriente macroscópica, por lo que de aquí en adelante solo se hará alusión a este tipo de corriente. En la gráfica de la Figura 2 se muestra un ejemplo de un registro típico de la corriente macroscópica generada por canales iónicos que permiten el paso de  $\text{Cl}^-$  a través de su poro. El protocolo usado para generar la respuesta de los canales consta de escalones de voltaje de duración variable como aquel mostrado en la parte superior de la Figura. El protocolo comienza con la aplicación de un estímulo de  $V_m=0$  mV con duración de algunos cuantos mili segundos. En esta etapa, no hay un flujo de iones a través de los canales, como lo indica el valor cero de la  $I_{\text{Cl}}$  en la gráfica. Posterior al estímulo de 0 mV, son aplicados escalones de voltaje que abarcan un rango de -100 a +100 mV en pasos de 20 mV. Para este lapso del protocolo se puede apreciar un flujo de corriente positiva y negativa. La corriente positiva se debe a la entrada de los iones a la célula, mientras que la corriente negativa se debe a la salida de iones de la célula (Sackmann *et al.*, 1995). Nótese que para  $V_m$  positivos la corriente se sostiene mientras dura la aplicación de los estímulos, pero para  $V_m$  negativos la corriente cae eventualmente a cero. Lo anterior es debido a que la apertura de los canales es favorecida por los  $V_m$  positivos, en tanto que el cierre es favorecido por  $V_m$  negativos. Finalmente es aplicada una repolarización a -100 mV para la cual se observa una corriente negativa.

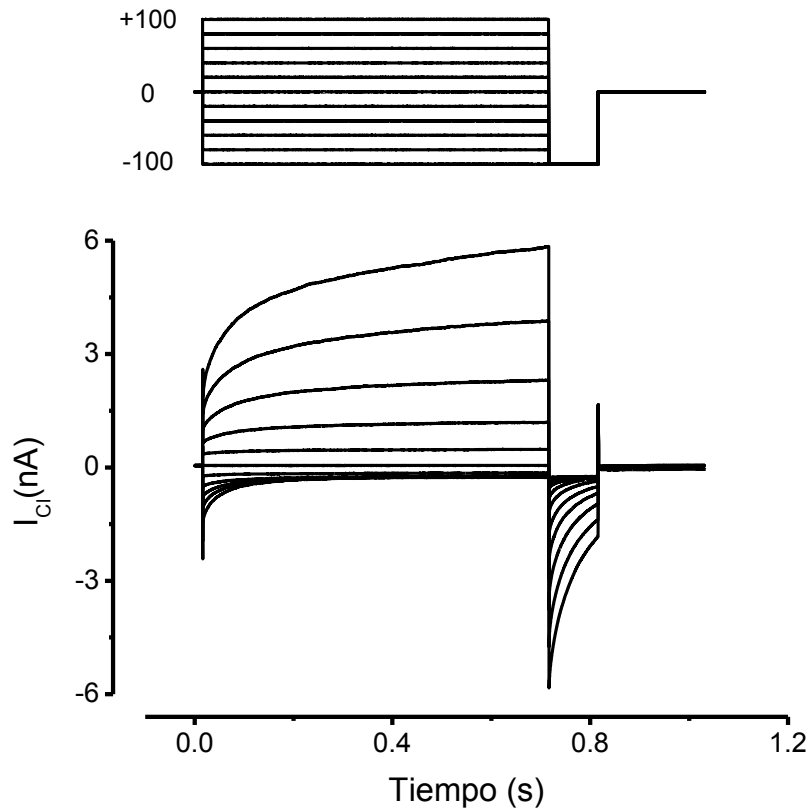


Figura 2. Trazo promedio típico de la corriente iónica obtenida usando la técnica experimental de “Patch-Clamp”. Corriente generada por el ion de cloruro (Cl<sup>-</sup>) obtenida de una célula que expreso canales iónicos de cloruro activados por V<sub>m</sub> y calcio intracelular. El registro de la corriente iónica se hizo bajo la configuración de “whole cell” usando la técnica de “Patch-Clamp”. El protocolo usado para generar la respuesta de los canales consta de escalones de voltaje de duración variable como aquel mostrado en la parte superior de esta Figura. El protocolo comienza con la aplicación de un estímulo de V<sub>m</sub>=0 mV con duración de algunos cuantos mili segundos. En esta etapa, no hay un flujo de iones a través de los canales, como puede observarse en la gráfica. Posterior al estímulo de 0 mV, son aplicados escalones de voltaje que abarcan un rango de -100 a +100 mV en pasos de 20 mV. Para este lapso del protocolo se puede apreciar un flujo de corriente positiva y negativa. La corriente positiva se debe a la entrada de los iones a la célula, mientras que la corriente negativa se debe a la salida de iones de la célula. Nótese que para V<sub>m</sub> positivos la corriente se sostiene mientras dura la aplicación de los estímulos, pero para V<sub>m</sub> negativos la corriente cae eventualmente a cero. Lo anterior es debido a que la apertura de los canales es favorecida por los V<sub>m</sub> positivos, en tanto que el cierre es favorecido por V<sub>m</sub> negativos. Finalmente es aplicada una repolarización a -100 mV para la cual se observa una corriente negativa.

La corriente iónica nos permite evaluar importantes propiedades de los canales tales como su cinética de apertura y cierre, el proceso de permeación de los iones a través de su poro, así como su probabilidad de apertura. En el desarrollo de este trabajo estamos interesados particularmente en estudiar la probabilidad de apertura, ésta la podemos estimar con base a la corriente de iones que fluyen a través del poro de los canales. Iónica mediante la denominada conductancia macroscópica, la cual está dada como:

$$G = N_C g P_O \quad \text{Ecuación 4}$$

Combinando la Ecuación 4 con la 2 se tiene entonces que la corriente iónica en términos de la conductancia macroscópica es:

$$I = (V_m - V_e)G \quad \text{Ecuación 5}$$

Entonces,  $G = I/(V_m - V_e)$ , esto es, podemos determinar a  $G$  usando la corriente macroscópica y ésta será proporcional a  $P_O$  siempre y cuando  $g$  no cambie con el  $V_m$ . Estas sencillas ecuaciones también nos dicen que el curso temporal de la conductancia macroscópica,  $G(t)$ , nos proporciona la información del curso temporal de  $P_O$  a cada voltaje. La conductancia dada por la Ecuación 4 resulta muy útil para propósitos descriptivos, sin embargo, ésta al no ser derivada de algún modelo que tome en cuenta los factores que la determinan, obviamente poco o nada de información nos proporcionará respecto al mecanismo de activación de los canales iónicos. Es por esta razón que es necesario buscar herramientas teóricas que nos puedan proporcionar información relativa a esos procesos que subyacen en el mecanismo de apertura y cierre de los canales iónicos.



# Capítulo 2. Los Canales de Cloruro activados por Calcio (CaCCs)

---

## 2.1 Propiedades Generales de los CaCCs

Los canales iónicos de cloruro activados por calcio intracelular (CaCCs) son proteínas transmembranales que permiten el flujo de  $\text{Cl}^-$  a través de su poro. Desde su descubrimiento (Miledi, 1982; Miledi & Parker, 1984), se han estudiado sus propiedades de activación por efecto de variar  $V_m$  y la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Arreola *et al.*, 1996; Nilius *et al.*, 1997; Kuruma & Hartzell, 2000). La importancia del estudio de estos canales radica en el papel que juega la corriente de  $\text{Cl}^-$  en diversas funciones celulares tales como: la transducción sensorial, (Kleene *et al.*, 1997; McCleskey & Gold., 1999; Cia *et al.*, 2005) regulación de la excitabilidad cardiaca y neuronal (Frings *et al.*, 2000; Hartzell *et al.*, 2005), secreción de fluido epitelial (Duan *et al.*, 2009; Romanenko *et al.*, 2010), proliferación celular y tumorigénesis (Duvvuri *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2014). No obstante, la identidad molecular de dichas proteínas permaneció desconocida hasta que en el año 2008 tres grupos de investigadores, de manera independiente identificaron a una familia de proteínas denominada Transmembrane member 16 que renombraron como TMEM16 o Anoctaminas cuyos miembros TMEM16A (ANO1) y TMEM16B (ANO2) son CaCCs (Caputo *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Cuando TMEM16A se expresa en sistemas heterólogos por ejemplo, células HEK293, la  $I_{\text{Cl}}$  que genera exhibe todas las propiedades de activación mostradas por los CaCCs endógenos. Su probabilidad de apertura aumenta al incrementar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y por la aplicación de pulsos positivos de  $V_m$  (Caputo *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008), y al igual que los CaCCs endógenos, su corriente es abatida por bloqueadores como; ácido niflumico, 5-nitro-2-(-fenilpropilamino)-benzoato y ácido 4,4'-diisotiocianato-estibeno-2,2'-disulfónico.

## 2.II Estructura de TMEM16A.

Algunas investigaciones enfocadas en determinar la arquitectura de TMEM16A han establecido que su forma es la de un homodímero (Sheridan *et al.*, 2011; Malvezzi *et al.*, 2013; Terashima *et al.*, 2013). No obstante, la posibilidad de que pueda ser un heterodímero no ha sido descartada. Existen al menos cuatro isoformas de TMEM16A que pueden poseer un número de entre 712 y 1004 residuos aminoácidos dependiendo del número de exones (a, b, c y d) presentes (Hartzell *et al.*, 2009). La topología más reciente de TMEM16A propuesta con base a su estructura secundaria se ilustra en la Figura 3. Esta topología predice la existencia de ocho segmentos transmembranales (TM's) y que los extremos amino (N) y carboxy (C) terminal se encuentran del lado citosólico (Das *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2012). En la Figura también se ha señalado con círculos color verde la ubicación de algunos residuos que se ha demostrado son importantes en la sensibilidad por  $\text{Ca}^{2+}$  del canal tales como: residuos E705 y E702 (Yu *et al.*, 2012), E734 y D738 (Tien *et al.*, 2014), así como I735, V752 y A754 (Scudieri *et al.*, 2013). Asimismo, se ha indicado la ubicación de la secuencia de residuos  $_{444}\text{EEEEEEAVK}_{451}$  en la primera asa intracelular, la cual llamo la atención por su semejanza con los dominios específicos de sensado a  $\text{Ca}^{2+}$  de otros canales activados por calcio como es el caso de los BK o los Best1 (Xiao *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2009). En la Figura también se muestra la probable horquilla formada por los extremos amino y carboxy terminal de TM7a ubicada en la región citosólica, la cual podría albergar iones de  $\text{Ca}^{2+}$  como se muestra en la Figura.

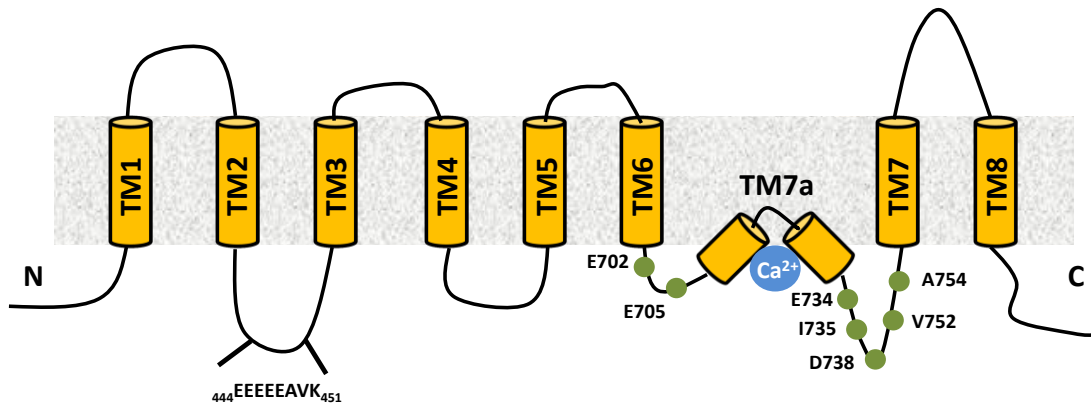


Figura 3. Modelo topológico de TMEM16A. Este modelo fue dibujado de acuerdo a la topología propuesta por (Tien *et al.* 2014). La estructura secundaria de TMEM16A predice la existencia de ocho segmentos transmembranales (TM's). En esta topología los extremos amino (N) y carboxy (C) terminal se encuentran del lado citosólico. En el modelo se indican sobre la primera asa intracelular con dos barras los residuos  $^{444}$ EEEEAVK $_{451}$ , mientras que con esferas color verde los residuos E702, E705, E734, I735, D738, V752 y A754 que son importantes en el sentido del  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual es representado por la esfera azul.

Estos modelos topológicos sirven como una buena referencia para tratar de entender el papel que juegan ciertos elementos (tales como el grupo de residuos aminoácidos señalados arriba) en el mecanismo de apertura y cierre de los canales. Recientemente, la obtención de la estructura cristalográfica de la escramblasa nhTMEM16, miembro de la familia de proteínas TMEM16, ha sido un punto de partida importante para intentar elucidar la posible estructura de TMEM16A e intentar entender un poco mejor el funcionamiento de esta proteína. En la Figura 4 se muestra el modelo estructural de TMEM16A obtenido por homología con la estructura cristalográfica de la escramblasa nhTMEM16 (Cruz-Rangel *et al.*, 2015). La Figura 4-A muestra a los dos homodímeros en la representación de listones (colores café y gris metálico) vistos desde el centro de la bicapa lipídica. En la Figura también se indica en color verde a los residuos aminoácidos que podrían formar el sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ ; E702, E705, E734, D738 (Yu *et al.*, 2012; Tien *et al.*, 2014). En la Figura 4-B se muestra un monómero rotado 70 grados respecto al eje perpendicular a la bicapa lipídica. En la estructura de TMEM16A se cree que hay una hendidura hidrofílica que se sugiere podría ser la ruta de permeación ya que el residuo K588 (indicado en color fucsia) que participa en la selectividad iónica está situado en medio de dicha hendidura (Yu *et al.*, 2012; Reyes *et al.*, 2014). Además, los residuos ubicados en la parte superior de la hendidura, los cuales se ha que forman un vestíbulo; G628-M632 y I636-Q637 (Yu *et al.*, 2012) mostrados en color rojo, aquellos residuos que contribuye a la selectividad iónica;

R515, K603, R621, y R788 (Peters *et al.*, 2015) en color azul celeste, además, en color verde se distinguen los residuos E702, E705, E734, D738 relacionados con los posibles sitios de union a  $\text{Ca}^{2+}$  (Yu *et al.* 2012; Tien *et al.* 2014). Finalmente en color café son mostrados los residuos  $_{444}\text{EEEEEEAVK}_{451}$  que regulan la sensibilidad con  $V_m$  y  $\text{Ca}^{2+}$  del canal (Xiao *et al.* 2011).

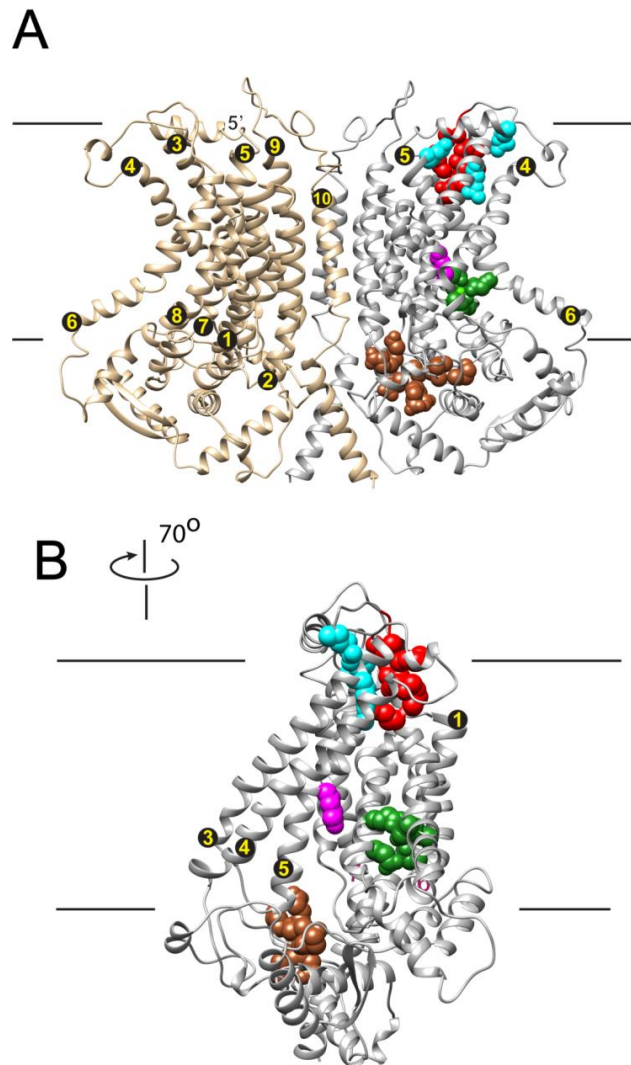


Figura 4. Modelo estructural de TMEM16A construido por homología con el modelo estructural de la escramblasa nhTME16 (Brunner *et al.* 2014) como se describe por Yu *et al.* 2015. (A) TMEM16A vista respecto al centro de la bicapa lipidica la cual se indica por las lineas solidas horizontales color negro, además, tambien se indica con numeros a las alfa helices y los homodimeros aparecen en color bronce y plata. (B) Uno de los monomeros de TMEM16A rotado 70 grados respecto al eje y visto desde la bicapa lipidica. esta vista muestra la hendidura hidrofílica descrita por Brunner *et al.* (2014). En rojo: vestibulo del canal constituido por los residuos G628-M632 y I636-Q637 (Yu *et al.* 2012). Azul celeste: residuos relacionados con la selectividad ionica K603, R621, R787 (Peters *et al.* 2015). Fucsia: residuo K588 asociado con la selectividad ionica (Yang *et al.* 2012). Verde: residuos E702, E705, E734, D738 relacionados con los posibles sitios de union a  $\text{Ca}^{2+}$  (Yu *et al.* 2012; Tien *et al.* 2014). Cafe: residuos  $_{444}\text{EEEEEEAVK}_{451}$  (Xiao *et al.* 2011.). Figura tomada de Cruz-Rangel *et al.*, 2015.

Aunque las funciones de la escramblasa son muy distintas a la de los canales iónicos de la familia TMEM16A, la región donde se encuentran los posibles sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  está altamente conservada entre los miembros de la familia. Todos estos elementos fortalecen la idea de que el sensado por el  $\text{Ca}^{2+}$  en TMEM16A se estaría llevando a cabo por la unión directa del  $\text{Ca}^{2+}$  a tales sitios.

### 2.III Activación de TMEM16A causada por cambios en $V_m$ , $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y $[\text{Cl}^-]_e$ .

#### Activación en ausencia de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular.

Como ya se ha mencionado, la activación de TMEM16A responde a una combinación de cambios en  $V_m$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y  $[\text{Cl}^-]_e$ . No obstante, se ha demostrado que el canal puede activarse solo por  $V_m$  en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Xiao *et al.*, 2011). En la Figura 6-A se muestran trazos representativos del comportamiento de la  $I_{\text{Cl}}$  la cual fue obtenida de diferentes células HEK293 que expresaron canales TMEM16A y que fueron dializadas con la  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 0 \mu\text{M}$  indicada y usando el protocolo de voltaje mostrado en la parte superior de la Figura 7-A. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el curso temporal de la  $I_{\text{Cl}}$  es casi plano para todo  $V_m$ , además, de que los canales solo muestran respuesta ante la aplicación de  $V_m$  positivos mayores a +50 mV como lo indica la relación  $I_{\text{Cl}}-V_m$  en la Figura 7-B.

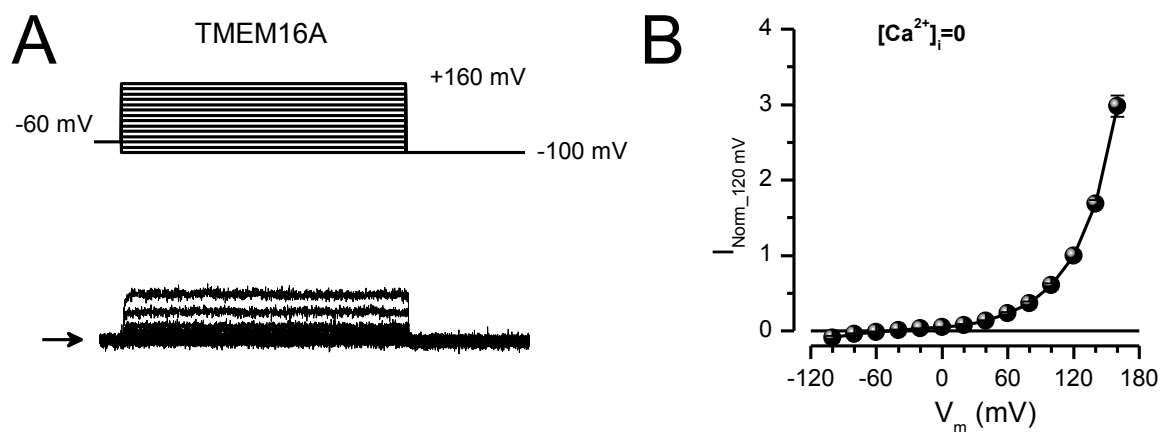
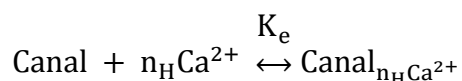


Figura 5. Activación de TMEM16A causada por el  $V_m$ , y en ausencia de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . (A) Trazos típicos de la  $I_{\text{Cl}}$  obtenida de células HEK293 que expresaron canales TMEM16A y que fueron estimuladas con escalones de voltaje de -100, a +160 mV, en incrementos de 20 mV como lo indica el protocolo de voltaje mostrado en la parte superior de los registros. La flecha negra a un costado de los registros indica el valor cero de la corriente. (B) Curvas  $I_{\text{Cl}}-V_m$  obtenidas para los  $V_m$  indicados. La figura fue construida con datos del Lab del Dr. Jorge Arreola.

### La activación en presencia de $\text{Ca}^{2+}$ depende del $V_m$ .

Por otro lado, el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  provoca un aumento en la amplitud de la corriente iónica para todo  $V_m$ , así como un cambio en la cinética de la  $I_{\text{Cl}}$ , Figura 8-A. Usando los valores de la  $I_{\text{Cl}}$  de cada pulso de voltaje se puede determinar la dependencia con el  $\text{Ca}^{2+}$  de la activación de TMEM16A a diferentes  $V_m$ . Estos datos son mostrados en la Figura 6-B en términos de la densidad de corriente (símbolos) vs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a los  $V_m$  indicados. Se puede observar que a bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , la corriente es muy pequeña, y muy grande para altas concentraciones. Este comportamiento es típico de aquellos canales activados por agonistas y puede representarse por el siguiente esquema:



donde  $n_H$  es el probable número de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  que se unirían al canal,  $K_e$  es la constante de equilibrio. Existe una expresión obtenida de manera empírica, llamada Ecuación de *Hill* (Hill, 1913), que describe que la respuesta  $R$  de los canales causada por agonistas está dada como:

$$R = \frac{V_{\text{max}}}{\left(1 + \left(\frac{\text{EC}_{50}}{[\text{Ca}^{2+}]_i}\right)^{n_H}\right)} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde  $V_{\text{max}}$ ,  $\text{EC}_{50}$  (valor de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  para el que  $R=0.5$ ) y  $n_H$  (coeficiente de *Hill*) son parámetros por determinar en el ajuste. Ya que no se mide directamente la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre los canales y si su respuesta a causa del  $\text{Ca}^{2+}$ , la  $K_e$  en realidad es la  $\text{EC}_{50}$ , esto es la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria para alcanzar el 50 % de la respuesta. Por otro parte, el coeficiente de *Hill* proporciona una estimación del probable número de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  que se unirían al canal para propiciar dicha respuesta. Las líneas solidas en color rojo, negro y azul en la Figura 6-B son el resultado de un ajuste global a los datos experimentales usando la Ecuación 6. La Figura 6-C muestra los valores de  $\text{EC}_{50}$  y  $n_H$  estimados del ajuste y graficados en función del  $V_m$ . Los datos muestran que un número aproximado de dos iones se estarían uniendo por canal para conferir su respuesta por efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Es importante señalar que  $n_H$  es solo una estimación y que de manera rigurosa no puede ser

considerada como el número real de iones que se unen al canal (Weiss, 1997). No obstante, esta información está de acuerdo con aquellos datos inferidos del modelo estructural de TMEM16A obtenido por homología con la escramblasa nhTMEM16, ver sección 2.II. Como lo indica la Figura 8-C,

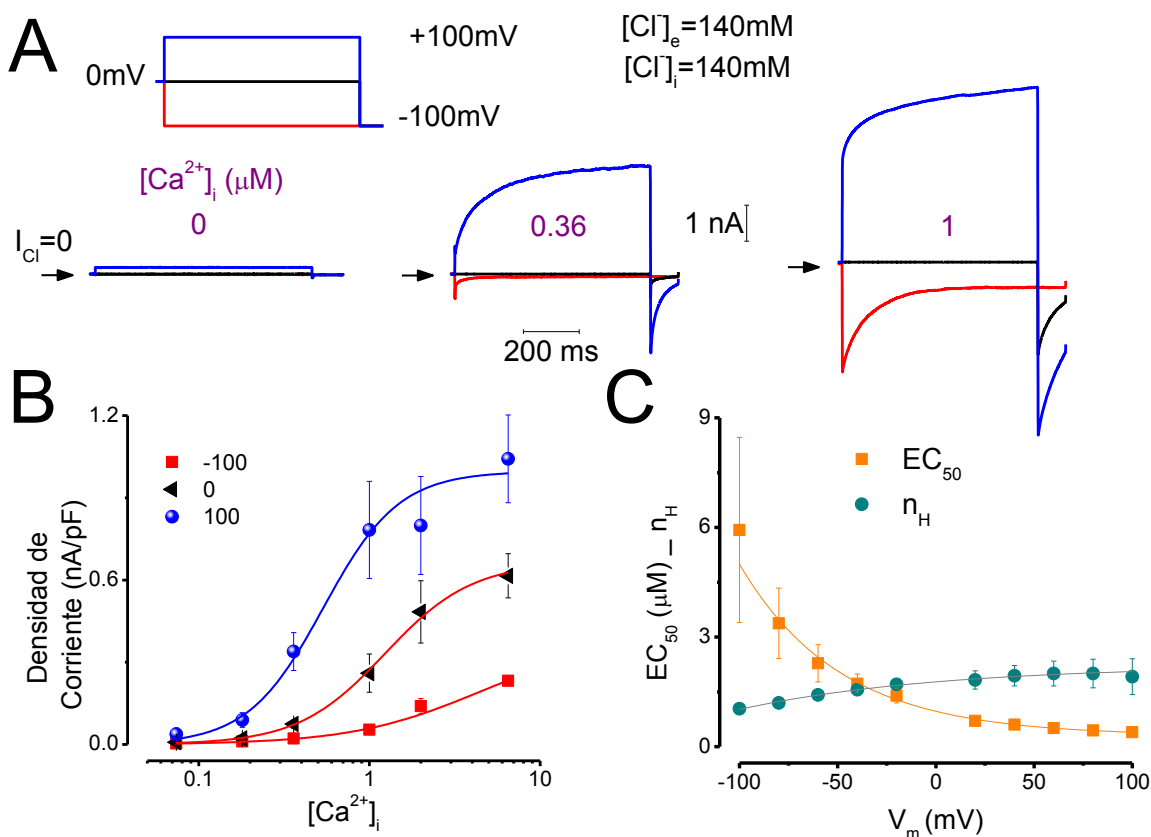


Figura 6. Activación de TMEM16A causada por el  $V_m$  y cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . (A) Trazos típicos de la  $I_{\text{Cl}}$  obtenida de células HEK293 que expresaron canales TMEM16A y que fueron estimuladas con escalones de voltaje de -100, 0 y +100 mV, dializadas con las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  indicadas. La flecha negra a un costado de los registros indica el valor cero de la corriente. (B) Curvas Dosis-Respuesta en función de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (símbolos) para los  $V_m$  indicados y ajustadas por la Ecuación de Hill (líneas solidas). (C) Valores de  $EC_{50}$  y  $n_H$  estimados del ajuste de Hill a los datos mostrados en C. Figura tomada de Xiao *et al.*, 2011.

Por otro lado, el hecho de que la  $EC_{50}$  muestre una dependencia con el  $V_m$ , y al ser ésta una medida de la respuesta de los canales causada por los procesos de asociación/disociación del  $\text{Ca}^{2+}$ , entonces esto sugiere que dichos procesos de asociación y disociación pueden tener dependencia con el  $V_m$ . Para evaluar esta posibilidad, el grupo del Dr. Criss Hartzell llevo a cabo experimentos de *perfusión rápida*. En este tipo de experimentos, segmentos

escindidos de membrana fueron expuestos a una rápida aplicación y remoción (aproximadamente 5 ms) de una alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $20 \mu\text{M}$ ) bajo estímulos de  $V_m$  tipo escalón que comprendieron voltajes desde  $-120$  a  $+120$  mV en incrementos de  $20$  mV. Estudiando la cinética de activación y desactivación de  $I_{\text{Cl}}$  ante la La Figura 8-A muestra trazos representativos del comportamiento de  $I_{\text{Cl}}$  ante la aplicación (trazos de la izquierda) y remoción (trazos de la derecha) de  $20 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ . En la Figura 8-B muestran las constantes de tiempo ( $\tau$ 's) tiempo de activación ( $\tau_{\text{Act}}$ ) y desactivación ( $\tau_{\text{Deact}}$ ) de  $I_{\text{Cl}}$  en función de  $V_m$ . Estas constantes de tiempo son estimadas al ajustar funciones mono exponenciales a los trazos de  $I_{\text{Cl}}$  durante las fases de aplicación y remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  y están estrechamente relacionadas con los procesos de asociación y disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el canal (Xiao *et al.*, 2011). Los resultados muestran que el proceso de disociación elucidado por  $\tau_{\text{Act}}$  es independiente de  $V_m$ , mientras que el proceso de asociación elucidado por  $\tau_{\text{Deact}}$  es dependiente de  $V_m$ .

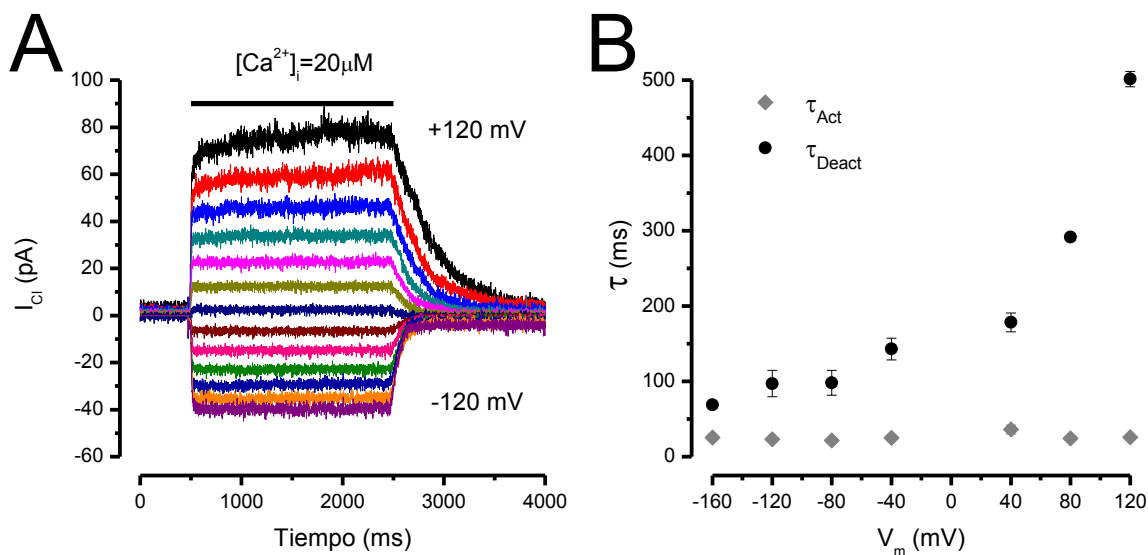


Figura 7. Perfusión rápida. (A) Trazo típico de  $I_{\text{Cl}}$  en respuesta a la aplicación y remoción (indicada por la barra negra) de  $20 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  para diferentes pasos de  $V_m$  que variaron en un rango de  $-120$  a  $+120$  mV en incrementos de  $20$  mV. (B) Constantes de tiempo estimadas a partir de A. La  $\tau_{\text{Act}}$  fue estimada al ajustar funciones mono exponenciales a los trazos de  $I_{\text{Cl}}$  durante la fase de aplicación  $\text{Ca}^{2+}$ , en tanto que  $\tau_{\text{Deact}}$  se estimó al ajustar funciones mono exponenciales a trazos de en la etapa de remoción del  $\text{Ca}^{2+}$ .



## Altas concentraciones de cloruro extracelular facilitan la apertura de TMEM16A.

Para ilustrar el efecto sobre la probabilidad de apertura de TMEM16A que causan las variaciones de la  $[Cl^-]_e$ , en la Figura 8-A se muestran trazos promedio de la  $I_{Cl}$  obtenida de células que se expusieron secuencialmente a un cambio en la  $[Cl^-]_e$  de un valor de 140 a 10 mM y usando el protocolo de voltaje que aparece en la parte superior de la Figura. Como era de esperarse al disminuir la  $[Cl^-]_e$  habrá una menor cantidad de iones de  $Cl^-$  que fluyan a través de los canales, por lo tanto la  $I_{Cl}$  disminuye considerablemente ante esta reducción en  $[Cl^-]_e$ , sin embargo, lo que no es obvio es que la probabilidad de apertura de los canales cambie ante estas variaciones de  $Cl^-$  del medio extracelular. En la Figura 8-B se muestran las curvas de conductancia normalizadas ( $G_{Norm}$ ) como función de  $V_m$  para las concentraciones de  $Cl^-$  externo indicadas y con  $[Ca^{2+}]_i=0.2 \mu M$ , las cuales fueron construidas usando registros de  $I_{Cl}$  como los mostrados en el panel A. De manera muy similar a lo que ocurre con los incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$ , se puede observar que la probabilidad de apertura de los canales muestra un incremento ante la aplicación de estímulos de  $V_m$  cada vez más positivos y al llevar la  $[Cl^-]_e$  de 10 a 140 mM. Estos datos sugieren que el  $Cl^-$  extracelular contribuye en la dependencia con el  $V_m$  dentro del mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A.

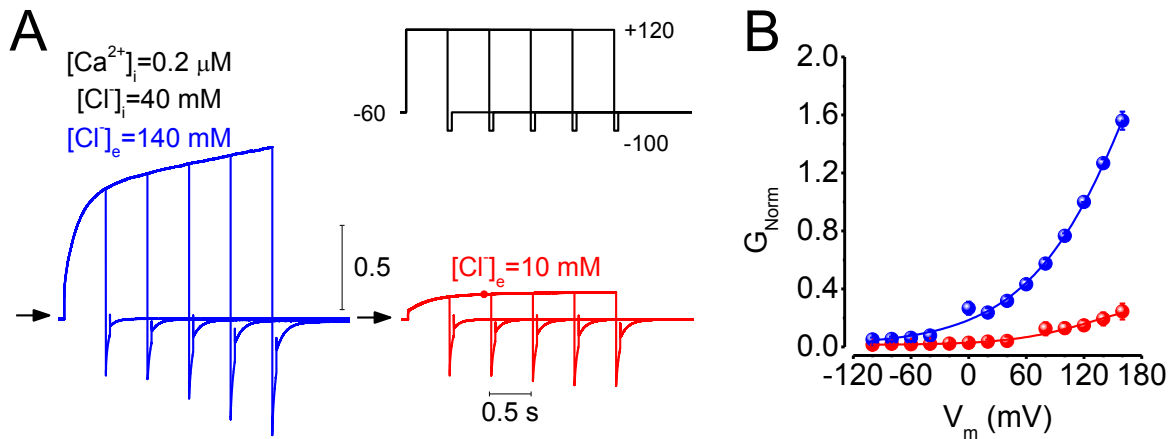


Figura 8. Dependencia con el  $V_m$  y  $[Cl^-]_e$  de la activación de TMEM16A. (A) Trazos promedio normalizados de la  $I_{Cl}$  obtenida para células que fueron secuencialmente expuestas a las  $[Cl^-]_e$  indicadas y usando el protocolo de voltaje indicado en la parte superior. (B) Curvas de conductancia en función de  $V_m$  para las  $[Cl^-]_e$  indicadas. La conductancia a cada  $V_m$  fue normalizada al valor obtenido a +180 mV para la condición  $[Cl^-]_e=140 \text{ mM}$ . Las líneas solidas son ajustes individuales con funciones Boltzmann para cada conjunto de datos. Los trazos fueron normalizados respecto al valor máximo de la  $I_{Cl}$  obtenida a la condición de  $[Cl^-]_e=140 \text{ mM}$ . La figura fue construida con datos del Lab del Dr. Jorge Arreola.

**La apertura de TMEM16A causada por despolarizaciones prolongadas muestra que el curso temporal de la corriente tiene dos componentes, uno rápido y uno lento; Mecanismo dual de activación.**

Recientemente se ha observado que la aplicación de pulsos de  $V_m$  de larga duración (20 s) inducen un interesante cambio en la cinética de  $I_{Cl}$  obtenida de células expuestas a 140 mM de  $Cl^-$  extracelular (Cruz- Rangel *et al.*, 2015). En la Figura 9 se presentan trazos promedio de la  $I_{Cl}$  obtenidos de células HEK293 que fueron secuencialmente expuestas a pulsos de  $V_m$  de corta duración (0.5 s) y larga duración (20 s). El curso temporal de  $I_{Cl}$  para pulsos cortos de  $V_m$  presenta un comportamiento que puede ser descrito por funciones mono-exponenciales. Por ejemplo, la corriente medida a -100 mV después del pre-pulso de voltaje a +140 mV, fue ajustada con una mono exponencial (línea solida color rojo, véase trazo insertado al pie de la Figura 9-A) cuya constante de tiempo de decaimiento fue  $\tau = 46$  ms. Sin embargo, después de 3 s,  $I_{Cl}$  modificó su tendencia, mantuvo un incremento paulatino. Para este caso, la  $I_{Cl}$  medida después del pre-pulso de voltaje a + 140 mV fue ajustada con una función bi-exponencial caracterizada por constantes de tiempo lenta y rápida ( $\tau_s$  y  $\tau_f$ ) = 2.6 s y 150.7 ms, respectivamente (línea solida color rojo, véase trazo insertado al pie de la Figura 9-A). Por lo tanto, la aplicación de pulsos de larga duración induce un segundo componente en el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A. Pero los estímulos de voltaje de larga duración no solo inducen el mecanismo dual de activación en TMEM16A, sino que también provocan un incremento en su probabilidad de apertura. En la Figura 9-B se muestra la dependencia con  $V_m$  del cociente de valores de  $I_{Cl,20}/I_{Cl,0.5}$  calculado al final de los estímulos de voltaje con duración de 20 s y 0.5 s, respectivamente. Este cociente  $I_{Cl,20}/I_{Cl,0.5}$  es proporcional al cociente de probabilidades de apertura, y como se puede observar en la Figura, para  $V_m > +80$  mV el cociente comienza a incrementar por arriba de 1 y llegando a alcanzar el valor de 2.8 para  $V_m = +140$  mV. Este mismo cambio lo sufre la probabilidad de apertura de los canales, por lo tanto los pulsos de voltaje de larga duración provocan un incremento en la probabilidad de apertura del canal iónico TMEM16A.

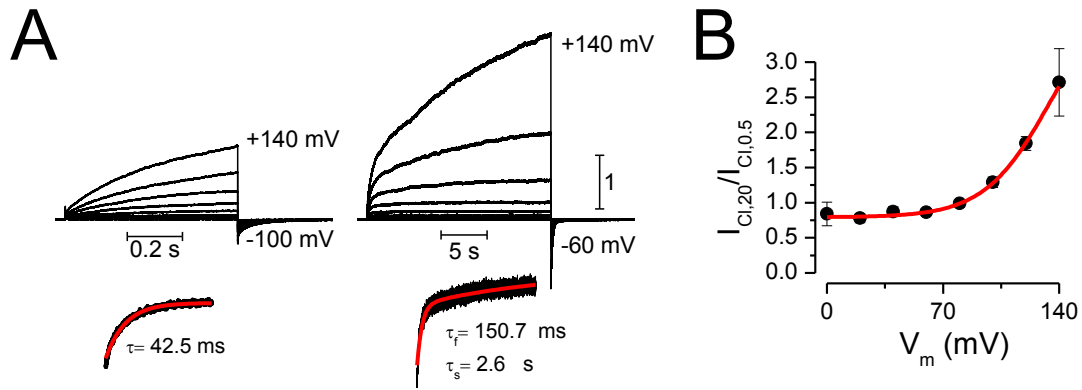


Figura 9. Mecanismo dual de activación de TMEM16A. (A) Trazos promedio de la  $I_{Cl}$  obtenida de células HEK293 transfectadas con TMEM16A, estimuladas con pulsos de voltaje con duración de 0.5 s (izquierda) seguidos de pulsos con duración de 20 s (derecha). La  $I_{Cl}$  medida después del pre-pulso de voltaje a +140 mV fue ajustada con una función bi-exponencial caracterizada por constantes de tiempo lenta y rápida ( $\tau_s$  y  $\tau_r$ ) = 2.6 s y 150.7 ms, respectivamente. Por lo tanto, la aplicación de pulsos de larga duración induce un segundo componente en el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A (B) Cociente de valores de  $I_{Cl,20}/I_{Cl,0.5}$  tomados al final de los estímulos de voltaje con duración de 20 s y 0.5 s, respectivamente. El cociente  $I_{Cl,20}/I_{Cl,0.5}$  es proporcional al cociente de probabilidades de apertura y por tanto refleja como la aplicación pulsos de voltaje de larga duración provoca un incremento en la probabilidad de apertura de TMEM16A. Los trazos fueron normalizados respecto al valor de la  $I_{Cl}$  obtenida a la condición de  $[Cl^-]_e=140$  mM y a +120 mV del pulso con duración de 0.5 s. Figura tomada de Cruz-Rangel- *et al.*, 2015.

La información hasta ahora presentada muestra las propiedades básicas de activación de TMEM16A por efecto de  $V_m$ ,  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Cl^-]_e$ , que son fundamentales en el desarrollo de éste trabajo.

# Capítulo 3. Modelos de Estados Discretos de Markov

---

## 3.1 Estados conformacionales de los canales.

El mecanismo de apertura y cierre de los canales iónicos es de naturaleza aleatoria. Se ha demostrado que esta importante característica de estas proteínas puede ser descrita de manera exitosa usando el enfoque teórico de los procesos homogéneos de Markov (Colquhoun & Hawkes, 1977; Hille, 1978; Korn & Horn, 1988; Sansom *et al.*, 1989). No obstante, existen algunos enfoques teóricos alternativos tales como los modelos fractales, difusión, exponenciales (Korn & Horn, 1988) que han sido útiles para intentar describir y entender el mecanismo de apertura y cierre de los canales iónicos. Sin embargo, los que mejor han ajustado a los datos experimentales han sido los modelos de procesos de Markov (Colquhoun & Hawkes, 1977; Hille, 1978; Korn & Horn, 1988; Sansom *et al.*, 1989). Además, de que algunas evidencias experimentales respaldan el uso de ésta teoría (Sakkman *et al.*, 1989). A continuación se presentan de manera muy breve los elementos básicos de la teoría de los procesos de Markov.

Sea  $X(t)$  un proceso estocástico en el tiempo, el cual toma valores en un espacio de estados  $\zeta$  que puede ser discreto o continuo. El proceso estocástico  $X(t)$  se dice que es un proceso de *Markov* si para  $t_1 < t_2 < \dots < t_n < t_{n+1}$ , la distribución asociada a  $(X(t_1), X(t_2), \dots, X(t_n), X(t_{n+1}))$  es tal que:

$$P[X(t_{n+1}) = j_{n+1} \mid X(t_1) = j_1, X(t_2) = j_2, \dots, X(t_n) = j_n] \quad \text{Ecuación 7}$$

donde la barra vertical dentro del paréntesis significa “condicionado a”. Un proceso de *Markov* es *homogéneo* cuando su distribución asociada  $P$ , no depende de  $t$ .

Se define la probabilidad de transición entre el  $i$ -ésimo y  $j$ -ésimo estado del proceso como:

$$p(i, j) = P[X(t_{n+1}) = j \mid X(t_n) = i] \quad \text{Ecuación 8}$$

$$\sum_{j \in \zeta} p(i, j) = 1 \quad i \in \zeta \quad \text{Ecuación 9}$$

La definición muestra que para procesos *markovianos* la probabilidad de transición hacia algún estado será posible solo a partir de sus estados vecinos. Así mismo, usando la expresión 8 se puede definir la tasa de transición o frecuencia de transición entre los estados *i*-ésimo y *j*-ésimo como:

$$k_{ij} = \lim_{\tau \rightarrow 0} \left( \frac{P[X(t+\tau)=j \mid X(t)=i]}{\tau} \right) \quad j \neq i \quad \text{Ecuación 10}$$

donde por conveniencia se define  $k_{ii} = 0$ .

Con estas bases se pueden formar cadenas de estados que representen y describan el mecanismo de apertura y cierre de los canales iónicos. Las frecuencias de transición en general dependerán de los factores que propicien la transición hacia uno u otro estado conformacional del canal o canales, estos factores pueden ser  $V_m$ , concentración de ligandos, cambios en la temperatura del ambiente celular, entre otros.

### 3.II Las frecuencias de transición dependen de la energía de activación.

La forma de las frecuencias de transición que se usan en este trabajo provienen de la Teoría de Transición de Estados (TST por sus siglas en Inglés *Transition State Theory*) propuesta por *Henry Eyring* (Eyring, 1935a, 1935b). Dicha teoría establece que la tasa de conversión de un complejo molecular en su fase denominada reactante (R) a aquella denominada como activa (A) es posible cuando el reactante logra adquirir una energía suficiente como para vencer la llamada barrera energética (B) que separa al complejo de las fases R y A. De acuerdo a *Eyring*, la diferencia entre los complejos activados y los no activados es la existencia de un grado de libertad traslacional adicional a los tres que posee un complejo “ordinario”. Dicho grado de libertad adicional determina la proximidad que tendrá el complejo molecular para acercarse a la barrera energética, cruzarla, y entonces adquirir su fase activa. La tasa de conversión  $k_{TST}$ , estará dada por la constante de equilibrio ( $K_{TST}$ ) de la reacción entre los complejos reactantes y los activados por longitud de proximidad multiplicada por la frecuencia ( $f_{TST}$ ) con la cual cruce la barrera B:

$$k_{TST} = K_{TST} f_{TST} = K_{TST} \frac{v}{\delta} \quad \text{Ecuación 11}$$

aquí  $v$  es la velocidad promedio con la que los complejos reactantes cruzan la barrera energética B y  $\delta$  es longitud de proximidad a dicha barrera.

La probabilidad de ocurrencia del complejo activado en la cima de la barrera energética está dada por la función de partición del grado de libertad traslacional adicional (Eyring, 1935), esto es:

$$Z_{A\_tras} = \frac{\delta(2\pi mk_B T)^{1/2}}{h} \quad \text{Ecuación 12}$$

donde  $m$  es la masa efectiva del complejo molecular,  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura y  $h$  es la constante de Planck.

Por otro lado, la velocidad promedio con la que los complejos reactantes cruzan la barrera energética está dada por:

$$v = \sqrt{\frac{k_B T}{2\pi m}} \quad \text{Ecuación 13}$$

Usando las Ecuaciones 17 y 18 en 16, la tasa de conversión  $k_{TST}$  queda dada como:

$$k_{TST} = K^* \frac{\delta(2\pi mk_B T)^{1/2}}{h} \sqrt{\frac{k_B T}{2\pi m}} \frac{1}{\delta} = K^* \frac{k_B T}{h} \quad \text{Ecuación 14}$$

donde  $K^*$  es la constante de equilibrio de una molécula hipotética a la cual se le ha reemplazado un grado de libertad vibracional por el grado de libertad traslacional adicional relacionado con la proximidad a la barrera energética B.

La constante de equilibrio  $K^*$  se puede expresar en términos de las funciones de partición de los complejos moleculares en sus fases o estados R y A (Eyring, 1935a, 1935b) del siguiente modo:

$$K^* = \frac{Z'_A}{Z_R} e^{\frac{(-\Delta E)}{k_B T}} = \frac{Z'_A}{Z'_R Z_{R\_vib}} e^{\frac{(-\Delta E)}{k_B T}} \quad \text{Ecuación 15}$$

con  $\Delta E$  la energía de activación,  $Z'_A$  es la función de partición del complejo activado y denotada con una el signo primado (') para indicar que falta la componente  $Z_{A\_tras}$ . De

manera análoga,  $Z'_R$  es la función de partición del complejo reactante y denotada con una el signo primado (') para indicar la falta de la componente  $Z_{R\_vib}$  que aparece justo a un lado.

La componente  $Z_{R\_vib}$  puede ser estimada (Eyring, 1935a, 1935b) y está dada como:

$$Z_{R\_vib} = \frac{2\pi k_B T}{h \omega_R} \quad \text{Ecuación 16}$$

donde  $\omega_R$  es la frecuencia de oscilación del complejo molecular en la fase R.

Por otro lado, al tomar en consideración que la entropía de activación está dada como  $\Delta S = k_B \ln(Z'_A/Z'_R)$ , así como las Ecuaciones 20 y 21, se tiene que la tasa de conversión  $k_{TST}$  dada por la Ecuación 19 adquiere la forma:

$$k_{TST} = \frac{\omega_R}{2\pi} e^{\frac{(-\Delta G)}{k_B T}} \quad \text{Ecuación 17}$$

con  $\Delta G = \Delta H - \Delta S$  la energía de activación de Gibbs. Cualquier otra contribución a la energía de activación tal como efectos de voltaje  $V$  o potencial químico  $\mu$  debe ser sumado a  $\Delta G$ . Con estas consideraciones se tendrá entonces que la energía de activación puede escribirse como:  $\Delta W = \Delta G + \Delta qV + \Delta n\mu$ , donde  $\Delta q$  es la carga,  $\Delta n$  el número de ligandos,  $V$  es voltaje y  $\mu$  es el potencial químico.

Eyring reconoció que la tasa de conversión podía verse afectada por fluctuaciones térmicas del entorno del complejo molecular reactante, lo cual podría generar una reducción en la tasa de conversión. Para resolver este problema Eyring introdujo el “coeficiente de transmisión  $\kappa$ ” que considera la probabilidad de que los complejos que logren alcanzar la barrera y por tanto la conversión no regresen a la fase reactante. Así las frecuencias de transición quedan del siguiente modo;

$$k = \kappa k_{TST} = \kappa \frac{\omega_R}{2\pi} e^{\frac{(-\Delta W)}{k_B T}} \quad \text{Ecuación 18}$$

Por lo tanto para aquellos casos, como en los canales iónicos, en los que la tasa de transición o frecuencia de transición entre dos estados  $i, j$  dependa solo del voltaje, se tendrá que:

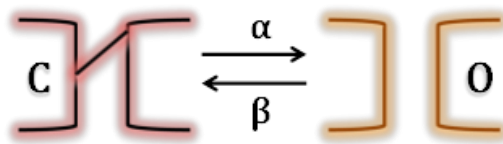
$$k_{ij} = k_0 e^{-\frac{\Delta q_{ij} V}{k_B T}} \quad \text{Ecuación 19}$$

y con el factor pre-exponencial dado por  $k_0 = \kappa \frac{\omega_R}{2\pi} e^{\frac{(-\Delta G)}{k_B T}}$ , donde es posible ver que  $k = k_0$  cuando  $V=0$ .

En el desarrollo de este trabajo, la dependencia con el voltaje en las frecuencias de transición estarán dadas como lo indica la Ecuación 19.

### 3.III Modelo de dos estados.

Los modelos de estados discretos de *Markov* o cadenas de *Markov* (también conocidos como modelos cinéticos) son constructos donde cada uno de sus componentes o estados representan a los posibles estados conformacionales que el canal posee y que pueden ser visitados en el proceso de apertura y cierre. El modelo más sencillo que se puede construir para describir el mecanismo de apertura y cierre de un canal es aquel que está compuesto por solo dos estados, uno cerrado representado por C y otro abierto representado por O. En el Esquema 1 se muestra una representación de las configuraciones cerrada y abierta de un canal. Las transiciones entre C y O están representadas para este caso por  $\alpha$  y  $\beta$  las cuales están definidas de manera general por la Ec. 10.



Esquema 1

A partir de este sencillo esquema es posible construir las ecuaciones que gobiernan el comportamiento temporal de las probabilidades de ocurrencia  $P_C$  y  $P_O$  de los estados C y O, respectivamente, y dadas como:

$$\frac{dP_O(t)}{dt} = -\beta P_O(t) + \alpha P_C(t) \quad \text{Ecuación 20}$$



$$\frac{dP_C(t)}{dt} = \beta P_O(t) - \alpha P_C(t) \quad \text{Ecuación 21}$$

Las ecuaciones 11 y 12 forman un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden acoplado. Es posible representar este sistema de ecuaciones en forma matricial. La representación matricial resulta más conveniente para describir la situación general, en la cual el sistema bajo estudio pueda poseer un gran número de estados. Entonces se tiene que:

$$\frac{d\mathbf{P}(t)}{dt} = \begin{pmatrix} \frac{dP(t)_A}{dt} \\ \frac{dP(t)_C}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\beta & \alpha \\ \beta & -\alpha \end{pmatrix} \begin{pmatrix} P_O(t) \\ P_C(t) \end{pmatrix} = \mathbf{S}\mathbf{P}(t) \quad \text{Ecuación 22}$$

donde  $\mathbf{P}(t)$  es el vector de probabilidades y  $\mathbf{S}$  es la matriz de coeficientes.

Al resolver para la probabilidad de apertura del canal de dos estados, se tiene que  $P_A$  está dada como:

$$P_O(t) = \left( \frac{\alpha}{\alpha + \beta} \right) - \left( \frac{\alpha}{\alpha + \beta} - P_O(0) \right) e^{\left( \frac{-t}{\tau} \right)} \quad \text{Ecuación 23}$$

donde  $\tau = \frac{1}{\alpha + \beta}$ , es la constante de tiempo de activación.

En este sencillo ejemplo resulta fácil encontrar una solución explícita para las probabilidades de ocupación de los dos estados. Sin embargo, cuando los sistemas bajo estudio suponen la presencia de más estados resulta cada vez más complicado encontrar soluciones explícitas. De hecho, para sistemas que requieran ser modelados por más de cuatro estados solo es posible resolver las ecuaciones diferenciales de manera numérica (Blanchard *et al.*, 2011).

### 3.IV Modelo de m estados.

En general, si se considera que los canales pueden transitar por un número m de estados, entonces tendremos un sistema de m ecuaciones diferenciales lineales acopladas dado como:

$$\begin{pmatrix} \frac{dP_1(t)}{dt} \\ \vdots \\ \frac{dP_m(t)}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} & \dots & a_{1m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{m1} & \dots & a_{mm} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} P_1(t) \\ \vdots \\ P_m(t) \end{pmatrix} \quad \text{Ecuación 24}$$

donde las  $a_{ij}$  con  $i, j = 1, 2, \dots, m$  son las frecuencias de transición asociadas a las distintas transiciones. De manera compacta, el conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas se puede denotar de forma vectorial como:

$$\frac{d\mathbf{P}(t)}{dt} = \mathbf{A}\mathbf{P}(t) \quad \text{Ecuación 25}$$

donde  $\mathbf{P}(t)$  es el vector de probabilidades,  $\mathbf{A}$  es la matriz de coeficientes dada por:

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} a_{11} & \dots & a_{1m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{m1} & \dots & a_{mm} \end{pmatrix} \quad \text{Ecuación 26}$$

La solución general del sistema de ecuaciones dado por la Ecuación 11 puede determinarse al estimar los eigenvalores de  $\mathbf{A}$  y luego sus eigenvectores asociados. Si  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_m$  son eigenvalores reales y distintos, cuyos eigenvectores respectivos son  $Q_1, Q_2, \dots, Q_m$ , entonces las soluciones:

$$\begin{aligned} P(t)_1 &= e^{\lambda_1 t} Q_1 \\ &\vdots \\ P(t)_m &= e^{\lambda_m t} Q_m \end{aligned} \quad \text{Ecuación 27}$$

son linealmente independientes y la solución general estará dada como:

$$P(t) = k_1 P(t)_1 + \dots + k_m P(t)_m = \sum_{l=1}^m k_l e^{\lambda_l t} Q_l \quad \text{Ecuación 28}$$

donde  $k_1, \dots, k_m$  son constantes que dependen de la condición inicial del sistema.

Cuando los modelos contienen más de cuatro estados, para el polinomio característico asociado a la matriz de coeficientes  $\mathbf{A}$ , solo es posible encontrar soluciones de manera numérica, no se tiene una expresión analítica como (9) (Blanchard *et al.*, 2011).

# Capítulo 4. Planteamiento del Problema.

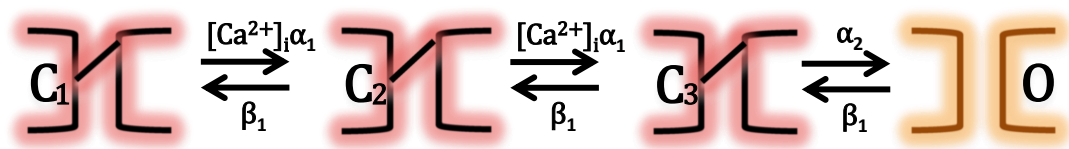
---

TMEM16A (ANO1) es constituyente molecular de los canales de cloruro activados por calcio intracelular (CaCCs) (Caputo *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). El movimiento del ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) a través del poro de TMEM16A desempeña un papel importante en diversas funciones celulares (Hartzell *et al.*, 2005; Duvvuri *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2014). El mecanismo de activación que permite el flujo de  $\text{Cl}^-$  a través de TMEM16A es regulado por un acoplamiento de estímulos de voltaje de la membrana celular ( $V_m$ ), cambios en la concentración de calcio del medio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) y cambios en la concentración de cloruro del medio extracelular ( $[\text{Cl}^-]_e$ ). Se ha sugerido que TMEM16A requiere la unión directa y secuencial de al menos dos iones de  $\text{Ca}^{2+}$  para lograr activarse (refs). La unión de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el canal puede estar o no regulada por el  $V_m$ . No obstante, en la actualidad es desconocido el modo en el que el acoplamiento de  $V_m$ , cambios en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y  $[\text{Cl}^-]_e$  causan la apertura y cierre del canal iónico TMEM16A. Para tratar de entender el mecanismo de apertura y cierre de estos canales se requiere de un modelo que pueda integrar las variables conocidas que participan en la activación. Actualmente solo existen algunos modelos que consideran el efecto del  $V_m$  y  $\text{Ca}^{2+}$  para intentar describir dicho mecanismo, pero esos modelos no contemplan los cambios en  $[\text{Cl}^-]_e$  ni tampoco consideran que TMEM16A puede activarse solo por  $V_m$  bajo condiciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i=0 \mu\text{M}$ . En la siguiente sección se presentan y discuten brevemente los modelos existentes para describir el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A causado solo por variaciones en  $V_m$  y cambios en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

## 4.I Limitaciones de los modelos previamente propuestos para describir el mecanismo de apertura y cierre de los CaCCs.

En la literatura científica son pocos los ejemplos que ilustran la búsqueda de enfoques cuantitativos y en especial de modelos *markovianos* para la descripción del mecanismo de

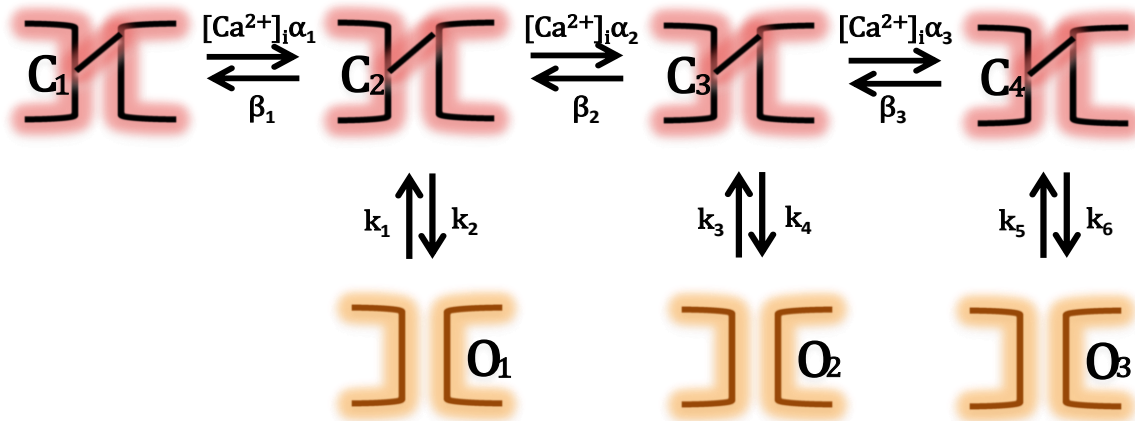
apertura y cierre de los CaCCs y particularmente para TMEM16A. En este apartado presentamos algunos de los modelos existentes propuestos para describir el mecanismo de apertura y cierre de los CaCCs. Uno de los primeros modelos fue el de Arreola *et al.*, 1996, quienes basándose en sus estudios sobre la activación dependiente de  $V_m$  y  $Ca^{2+}$  de los CaCCs endógenos de células acinares de la glándula parótida de ratón propusieron un modelo que constaba de cuatro estados; tres estados cerrados (C) y uno abierto (O). El Esquema 2 ilustra los estados conformacionales que los CaCCs podrían visitar en su proceso de apertura y cierre.



Esquema 2

aquí  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$  son las frecuencias de transición y de acuerdo con Arreola *et al.*, 1996, algunas o todas pueden tener una dependencia con  $V_m$ . El mecanismo de activación propuesto en este modelo establece que debe suscitarse una unión secuencial y tal vez modulada por el  $V_m$  de dos iones de  $Ca^{2+}$  sobre el canal en su conformación cerrada (C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>). Bajo la condición previamente señalada, el canal podrá ser capaz de transitar a la configuración abierta (O). Este modelo puede reproducir varias propiedades de activación de los CaCCs, tales como curvas dosis-respuesta y cinética de activación y desactivación de la  $I_{Cl}$  para bajas concentraciones de  $Ca^{2+}$  (0.1  $\mu$ M-0.25  $\mu$ M). Sin embargo, este modelo falla al predecir las cinéticas de activación y desactivación de la  $I_{Cl}$  para altas concentraciones de  $Ca^{2+}$ .

Posteriormente, Kuruma and Hartzell., 2000, propondrían un modelo un poco más extenso para intentar describir las propiedades de activación de los CaCCs de ovocitos de *Xenopus*. El modelo propuesto consta de siete estados, de los cuales cuatro son cerrados (C) y tres abiertos (O) como se ilustra en el Esquema 3.



Esquema 3

aquí  $\alpha_j$  y  $\beta_j$  con  $j=1,2,3$  son las frecuencias de transición que no dependen del voltaje, en cambio  $k_i$ , con  $i=1,2,3,4,5$  y  $6$  son dependientes del  $V_m$ .

En este caso el mecanismo de activación propuesto considera que se necesita la unión secuencial de tres iones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el canal en su conformación cerrada. A diferencia del modelo anterior, la asociación o disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  al canal no se considera como un proceso que pueda ser dependiente del  $V_m$ . Además, es permitida la transición dependiente del  $V_m$  a configuraciones abiertas a partir de aquellas cerradas con un la unión de un ion de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el canal. Este modelo fue capaz de reproducir correctamente muchas propiedades de activación del canal para concentraciones de  $\text{Ca}^{2+} \geq 0.5 \mu\text{M}$ . Los autores admiten no haber probado su modelo a bajas concentraciones, aunque en una revisión posterior (Hartzell *et al.*, 2005) se afirma que este modelo no era capaz de reproducir la cinética de desactivación de  $I_{\text{Cl}}$  a bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Otro modelo existente fue aquel propuesto por Haase *et al.*, 2006. Este modelo es muy similar al de Arreola *et al.*, 1996. Posee tres estados cerrados (C) y uno abierto (O) y en él también se considera la unión secuencial de dos iones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el canal. La diferencia radica en que en este modelo se incluyó un estado más denotado por **I** para tomar en cuenta lo que los autores afirman se trata de una etapa inactiva del canal, la cual es observada en la cinética de la  $I_{\text{Cl}}$  que ellos reportaron. El Esquema 4 ilustra el modelo de Haase *et al.*, 2006.



Esquema 4

Para este caso la dependencia con el  $V_m$  está incluida en las frecuencias de transición  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_3$ , en tanto que las constantes  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  se consideraron independientes del  $V_m$ . El modelo propuesto por Haase *et al.*, 2006, satisfactoriamente reproduce muchos de sus datos tales como curvas dosis-respuesta y cinética de activación de la  $I_{Cl}$  para algunas condiciones de  $[Ca^{2+}]_i$ . No obstante, no muestran ni hacen señalamiento respecto a cómo se comporta su modelo para la fase de desactivación de la  $I_{Cl}$  para diferentes condiciones experimentales.

Un aspecto relevante que tienen en común los modelos anteriores es que en ellos postulan, con base a información experimental, como mecanismo de activación la unión secuencial de dos iones de  $Ca^{2+}$  sobre el canal. En el caso de los modelos de Arreola *et al.*, 1996 y Haase *et al.*, 2006, dicha unión o asociación puede estar regulado por el  $V_m$ . Por otro lado, Kuruma and Hartzell, 2000 con base a sus experimentos de perfusión rápida establecieron que la unión de los iones de  $Ca^{2+}$  al canal es un procesos independiente del  $V_m$ , pero que las transiciones directas de los estados cerrados-abiertos tendrían dependencia con el  $V_m$ .

Recientemente, se ha sido descrito que la activación de TMEM16A por efectos de  $V_m$  en ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular (ver Figura 6-A) (Xiao *et al.*, 2011). Esto trae consigo relevantes implicaciones en la búsqueda de modelos válidos para describir el mecanismo de apertura y cierre de los CaCCs. Primero se establece que es necesario incluir elementos que consideren la apertura del canal en ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular. Por otro lado, el hecho de que el canal se pueda abrir solo a causa de  $V_m$ , hace suponer: (1) La posible existencia de un sensor intrínseco de voltaje o un mecanismo no convencional mediante el cual el canal pudiera adquirir la dependencia con  $V_m$ . (2) Cualquier modelo que se proponga explicar la apertura y cierre de los CaCCs debe contemplar una vía de activación que tome en cuenta la apertura del canal en ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular. (3) Cualquier modelo deberá ser capaz de explicar las propiedades de activación descritas en la sección

Activación de TMEM16A causada por cambios en  $V_m$ ,  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Cl^-]_e$ . Lo expuesto en este capítulo nos lleva a plantear nuestro objetivo de proyecto de tesis.



# Capítulo 5 Objetivos

---

## 5.I Objetivo General

Con base a las propiedades de la cinética de activación y desactivación de la  $I_{Cl}$  generada por canales de cloruro TMEM16A, se desea construir un modelo matemático usando un enfoque de procesos homogéneos de Markov (cadenas de Markov) que nos permita entender y describir el mecanismo de apertura y cierre de estos canales causado por el acoplamiento de  $V_m$ , cambios en  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Cl^-]_e$ .

## 5.II Objetivos específicos.

- Hacer una selección de registros de la  $I_{Cl}$  ante diferentes condiciones de  $V_m$ ,  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Cl^-]_e$ , y que a partir de esos registros nos sea posible estudiar las propiedades de activación y desactivación de dichos canales.
- De cada conjunto de registros se obtuvo un trazo promedio. Estos trazos promedio reflejaran de mejor manera el comportamiento de la activación y desactivación de los canales iónicos bajo estudio.
- Con los trazos promedio de cada conjunto de datos considerado se formó una plantilla representativa de las propiedades de activación y desactivación de los canales TMEM16A (ver sección 7.II).
- Con base a las propiedades de la cinética de activación y desactivación de la  $I_{Cl}$ , diseñamos varios modelos matemáticos (ver sección de metodología, capítulo 7) para evaluar su capacidad para describir las propiedades de activación de los canales iónicos TMEM16A.

# Capítulo 6. Metodología.

---

## 6.1 Análisis y Modelado.

Diferentes modelos fueron construidos usando el enfoque teórico de Estados Discretos de Markov. Cada modelo tenía  $S$  distintos estados cerrados y abiertos conectados por frecuencias de transición dadas como:  $k = k_0 * e^{-\frac{\Delta qV}{k_B T}}$ , donde  $k_0$  y  $q$  los parámetros por determinar. Para extraer el valor más óptimo de los distintos parámetros asociados con las frecuencias de transición asociadas con un modelo dado, realizamos ajustes globales de conjuntos de datos experimentales usando el software especializado IChMASCOT (Covarrubias *et al.*, 2008; Dougherty *et al.*, 2008; Sánchez Rodríguez *et al.*, 2012). El conjunto de datos incluyó un amplio rango de condiciones experimentales para tener una muestra representativa de dichos datos que nos permitiera obtener valores numéricos representativos de los parámetros de las diferentes frecuencias de transición. El programa IChMASCOT fue alimentado directamente con datos experimentales y el modelo que se desea poner a prueba, así como también con variables experimentales tales como:  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $[Cl^-]_e$ ,  $[Cl^-]_i$ , protocolos de  $V_m$ , y temperatura (la cual se mantuvo constante para todos los ajustes), como es ilustrado en la Figura 10. Ya construido el modelo, declarados sus parámetros asociados por determinar e incluido el conjunto de datos experimentales, el programa provee de una respuesta del modelo para las condiciones iniciales que hemos establecido mediante valores numéricos de partida en los diferentes parámetros asociados al modelo. En esta etapa, el programa realiza un proceso de minimización  $\chi^2$  entre los datos experimentales y la respuesta del modelo para poder estimar los valores numéricos de los parámetros que mejor ajusten de manera simultánea a los datos experimentales. La calidad de los ajustes hechos por algún modelo dado se indica por el coeficiente de regresión  $R^2$ , el cual es una medida cuantitativa de la bondad del ajuste a los datos experimentales.

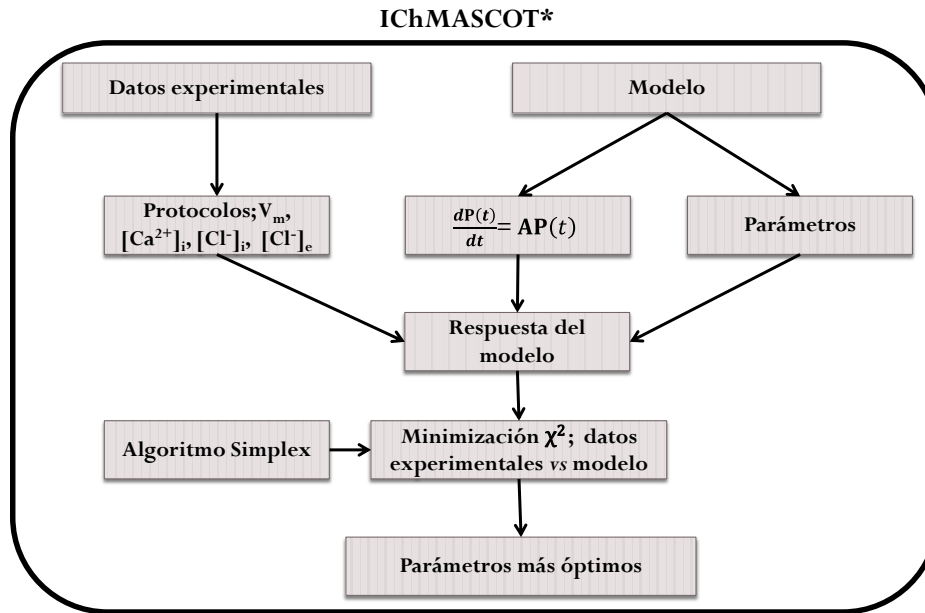


Figura 10. Estimación de los valores numéricos de los parámetros asociados a los modelos. Esquematización del proceso de ajuste de datos experimentales realizado con el software IChMASCOT para lograr determinar los parámetros asociados a las frecuencias de transición de cada uno de los modelos probados.

Los datos experimentales fueron proporcionados por el Lab. del Dr. Jorge Arreola Gómez del Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y por el Lab. del Dr. Criss Hartzell del Depto. de Biología Celular de la Universidad de Emory, Atlanta, USA.

Cada ajuste global fue repetido (15 veces) y el valor numérico obtenido para los parámetros de las frecuencias de transición fue promediado. Los valores promedio fueron usados para reproducir las propiedades de activación de TMEM16A con el software IonChannelLab (Santiago-Castillo *et al.*, 2010) con cada modelo.

Las Figuras y ajustes fueron hechos usando el software Origin (Origin Lab, Northampton, MA).

## 6.II Metodología para obtener los datos experimentales. La técnica de experimental “Patch Clamp”.

Una de las técnicas más populares y eficientes para estudiar a los canales iónicos es la técnica de “Patch Clamp” que fue desarrollada por Erwin Neher y Bert Sakmann en 1976 (Sakmann *et al.*, 1995). Es con el uso de esta técnica que se puede registrar el flujo de iones a través de canales iónicos embebidos en la membrana celular. Esto se logra mediante el uso de micropipetas de vidrio con finos cuellos que se ponen en contacto con la membrana celular (Figura 11-A) para lograr un sello de alta resistencia (1-5 G $\Omega$ ) entre el cuello de la micropipeta y la superficie de la membrana celular. Aplicando una leve succión sobre la membrana a través de la micropipeta se logra la configuración denominada “cell-attached” (Figura 11-B). Partiendo de la configuración de “cell-attached” es posible obtener otras configuraciones. Al romper mediante otra leve succión el pedazo de membrana contenido en la boca de la micropipeta se logra la configuración denominada “whole-cell” (Figura 11-C). Esta configuración nos permite registrar la actividad de los canales presentes en toda la superficie de la membrana. Otras variantes pueden ser logradas. Por ejemplo, partiendo de la configuración de “cell-attached” y con un movimiento repentino para alejar la micropipeta de la superficie de membrana se consigue un parche aislado por la boca de la pipeta. A esta configuración se le llama “inside-out-patch” (Figura 11-D).

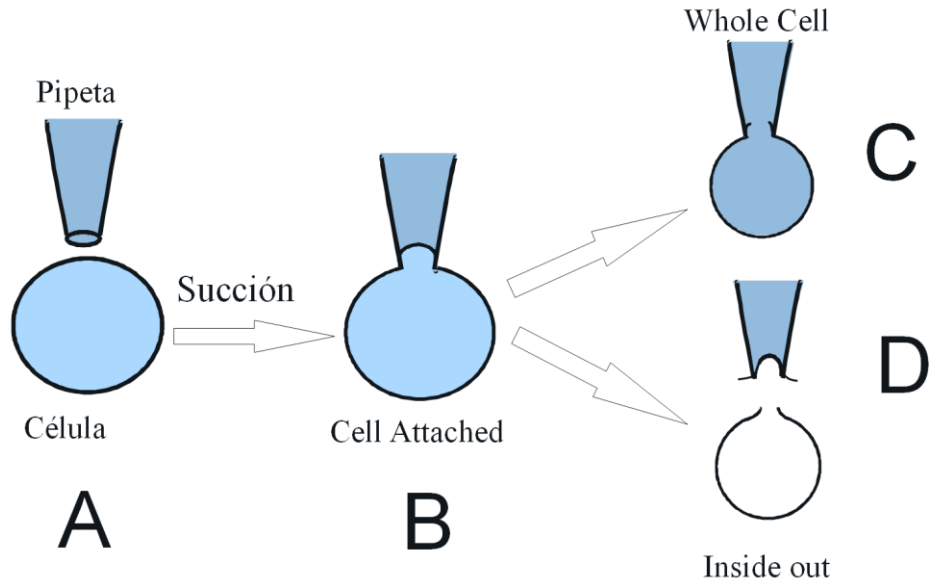


Figura 11. La técnica de Patch Clamp. Esta técnica consiste básicamente en imponer diferencias de voltaje a través de la membrana con el uso de dos electrodos. Uno de ellos está en el baño y aterriza el medio extracelular o baño. El otro electrodo se encuentra dentro de micropipetas de vidrio y es por donde se aplican las variaciones del voltaje deseados. Las micropipetas de vidrio con finos cuellos que se ponen en contacto con la membrana celular y forman un sello de alta resistencia. (A) Preparación de la célula. (B) Configuración de “cell-attached”, la cual permite el registro de corrientes de un pequeño número de canales. (C) Configuración denominada “whole-cell” lograda después de romper mediante una leve succión el pedazo de membrana contenido en la boca de la micropipeta. (D) Configuración de “inside-out-patch” lograda mediante la escisión de segmentos de membrana con un movimiento repentino para alejar la micropipeta de la superficie

La técnica experimental de “Patch-Clamp” permite el registro de corrientes de un reducido número o un gran número de canales presentes la membrana celular. El flujo iónico es registrado por dos electrodos, uno de ellos se encuentra dentro de la micropipeta y es con el que se aplican las variaciones de voltaje deseado. El otro electrodo se encuentra en el medio extracelular aterrizado como lo ilustra la Figura 12. Los electrodos están conectados a un set electrónico que registra, amplifica y digitaliza la señal para eventualmente visualizarla en una computadora a través de un software especializado. La corriente iónica registrada está determinada por los elementos del sistema que forman el circuito, tales como el número de canales presentes en la membrana, su resistencia al flujo de iones a través de su poro y por supuesto la diferencia de potencial o voltaje que induce el flujo de los iones.

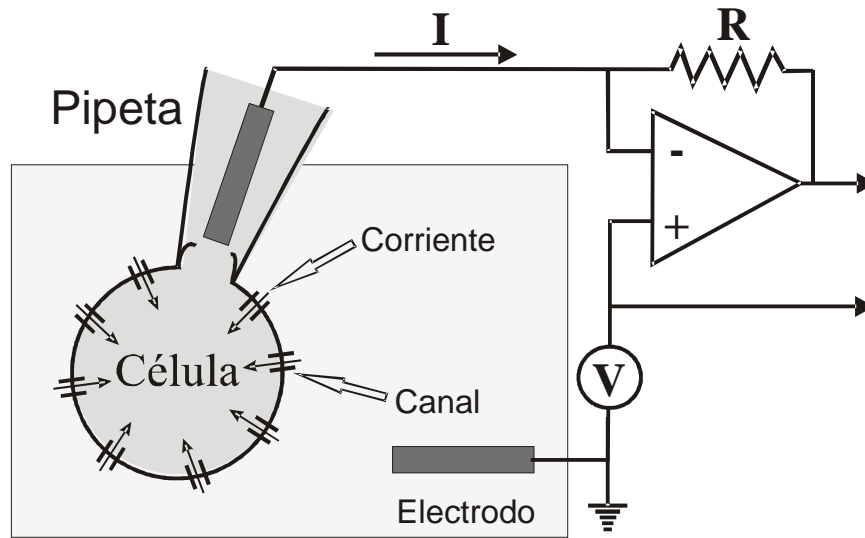


Figura 12. La técnica de Patch Clamp. Esta técnica consiste básicamente en imponer diferencias de voltaje a través de la membrana con el uso de dos electrodos. Uno de ellos está en el baño y aterriza el medio extracelular o baño. El otro electrodo se encuentra dentro de micropipetas de vidrio y es por donde se aplican las variaciones del voltaje deseados. Las micropipetas de vidrio con finos cuellos que se ponen en contacto con la membrana celular y forman un sello de alta resistencia. (A) Preparación de la célula. (B) Configuración de “cell-attached”, la cual permite el registro de corrientes de un pequeño número de canales. (C) Configuración denominada “whole-cell” lograda después de romper mediante una leve succión el pedazo de membrana contenido en la boca de la micropipeta. (D) Configuración de “inside-out-patch” lograda mediante la escisión de segmentos de membrana con un movimiento repentino para alejar la micropipeta de la superficie

### 6.III Selección de los datos experimentales usados

El conjunto de datos experimentales que gentilmente fueron proporcionaron por los grupos del Dr. Jorge Arreola Gómez y el Dr. Criss H. Hartzell para la realización de este trabajo tienen como características principales lo siguiente:

- Son el resultado de promedios de  $n$  experimentos (con  $n \geq 5$ ), lo cual es un importante aspecto de los datos, pues reflejan las características de interés en nuestro análisis de la cinética de apertura y cierre del canal.
- Abarcan un amplio rango de condiciones experimentales, lo cual es importante para que la descripción de la apertura y cierre del canal sea más completa. Los datos usados se enlistan enseguida:

1. Trazos promedio de  $I_{Cl}$  registrada a diferentes  $[Ca^{2+}]_i$  (0, 0.2 y 1  $\mu M$ ) obtenidos usando protocolos de escalones de voltaje que comprendieron un rango de entre -100 a +160 mV en incrementos de 20 mV con duración de 0.5 s sobre células expuestas a condiciones de  $Cl^-$  ( $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i = 140 \text{ mM} / 40 \text{ mM}$ ) para  $[Ca^{2+}]_i = 0, 0.2 \mu M$  y ( $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i = 140 \text{ mM} / 140 \text{ mM}$ ) para  $[Ca^{2+}]_i = 1 \mu M$ .
2. Trazo representativo de la  $I_{Cl}$  obtenida por perfusión rápida de 20  $\mu M$   $Ca^{2+}$  sobre parches de membrana en la configuración “inside out” sujetos a  $V_m$  en el rango de -100 y +100 mV bajo condiciones simétricas de  $Cl^-$  ( $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i = 140 \text{ mM} / 140 \text{ mM}$ ).
3. Trazos promedio de la  $I_{Cl}$  registrada a  $[Ca^{2+}]_i = 0.2 \mu M$  obtenidos usando estímulos de  $V_m$  de 3 s para células expuestas a diferentes  $[Cl^-]_e$  (1, 10 y 140 mM) manteniendo la  $[Cl^-]_i$  a un valor de 40 mM
4. Trazos promedio de la  $I_{Cl}$  registrada ante la aplicación de pulsos de  $V_m$  de larga duración (20 s) que comprendieron un rango de entre -20 a +140 mV para condiciones de  $[Ca^{2+}]_i = 0.2 \mu M$  y  $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i = 30$  o 140 mM / 40 mM.
5. Trazos promedio de las relaciones  $I_{Cl}-V_m$  obtenidas del estado estacionario para las condiciones de  $[Ca^{2+}]_i = 0 \mu M$  y  $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i = 30$  o 140 mM / 40 mM.

# Capítulo 7. Resultados.

---

## 7.1 Análisis cinético de la apertura y cierre de TMEM16A.

En esta sección se presenta la manera en la que se construyó el modelo que proponemos para describir el mecanismo de apertura y cierre TMEM16A basado en un análisis cinético de  $I_{Cl}$ . Para este cometido fueron consideradas las siguientes observaciones y suposiciones:

- a. El Canal se abre en ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular
- b. La probabilidad de apertura del canal aumenta al incrementar el  $Ca^{2+}$  intracelular
- c. El voltaje disminuye la concentración de  $Ca^{2+}$  necesario para obtener el 50% de la respuesta máxima
- d. Se requiere al menos la unión de dos iones de  $Ca^{2+}$  para activar el canal
- e. La apertura de los canales aumenta al incrementar la concentración extracelular de cloruro.
- f. Los iones de  $Cl^-$  extracelular participan en la regulación del mecanismo de apertura y cierre del canal. En este trabajo se considera solo un ion de  $Cl^-$  extracelular dentro del análisis.
- g. Es de importancia mencionar que en nuestros modelos no se considera el efecto del  $Cl^-$  de medio intracelular sobre el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A, esta suposición se justifica por la limitada información relativa a este hecho.

Se diseñaron varios modelos para describir el mecanismo de apertura de TMEM16A, algunos de ellos se exponen brevemente a continuación. Aunque muchos de estos modelos son capaces de describir algunos aspectos importantes de la activación de TMEM16A, la mayoría de ellos no tienen un grado de validez suficiente para ser considerado como una opción fiable en la descripción de los datos. No obstante, pueden llegar a ser útiles para la descripción de nuestra lógica de construcción y nos condujeron eventualmente a desarrollar un modelo de 12 estados, el cual satisfactoriamente reprodujo las propiedades de activación de TMEM16A por el acoplamiento de  $V_m$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$ .



## 7.II TMEM16A se activa por $V_m$ en ausencia de $Ca^{2+}$ intracelular.

Como ya se ha señalado, cualquier propuesta de modelo que tengamos en mente para describir el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A debe contemplar una vía que represente su activación en ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular. Este hecho puede ser representado por un modelo de 2 estados, como aquel representado por el Esquema 1. Para este caso, las frecuencias de transición son  $\alpha_0$  y  $\beta_0$ .

La solución para la probabilidad  $P_O$  de encontrar a los canales en el estado abierto para la condición de estado estable está dada por la ecuación 29 considerando que  $t$  tiende a infinito:

$$P_O = \frac{\alpha_0}{\alpha_0 + \beta_0} = \frac{1}{1 + \beta_0/\alpha_0} \quad \text{Ecuación 29}$$

De la Ec. 29 es posible notar que para que la  $P_O$  del canal pueda ser dependiente del voltaje,  $\alpha_0$  o  $\beta_0$  o ambas tiene que ser dependientes del  $V_m$ . Para este caso se asume que la forma de las frecuencias de transición es de carácter exponencial con  $V_m$ , como lo expresa la Ecuación 24 (Eyring, 1935a, 1935b), esto es:



$$\alpha_0 = a * e^{\frac{z_f F V_m}{RT}} \quad y \quad \beta_0 = b * e^{-\frac{z_r F V_m}{RT}} \quad \text{Ecuación 30}$$

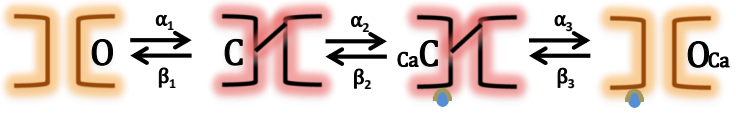
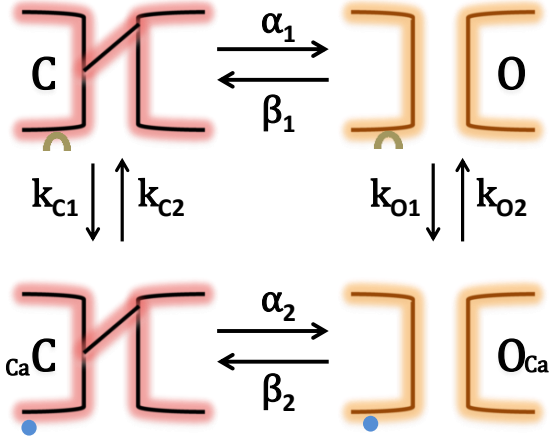
donde  $a$  y  $b$  son los valores de  $\alpha_0$  y  $\beta_0$  a  $V_m=0$ ,  $z_f$ ,  $z_r$  son las cargas aparentes asociadas con las transiciones dadas,  $F$  es la constante de Faraday,  $R$  es la constante de los gases y  $T$  es la temperatura.

Puesto que la probabilidad de apertura es una propiedad intrínseca del canal, el hecho de que el canal se pueda abrir en ausencia de  $Ca^{2+}$  sugiere que el canal podría tener un mecanismo de sensado intrínseco de voltaje, mismo que se ve reflejado en la dependencia con  $V_m$  de las frecuencias de transición. Como se ha mostrado arriba, la apertura de los canales incrementa ante el aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular, por lo tanto, el efecto del  $Ca^{2+}$  sobre las configuraciones cerrada y abierta del canal, ilustradas en el Esquema 4, puede ser tomado en cuenta en distintas formas. En la Tabla 1 se presentan algunos modelos que son el resultado de considerar la unión del  $Ca^{2+}$  ya sea sobre el estado cerrado (C), el abierto

(O) o en ambos. A pesar de que estos modelos son inconsistentes con la evidencia experimental que establece que al menos dos iones de  $\text{Ca}^{2+}$  serían requeridos para propiciar la respuesta de los canales (Arreola *et al.*, 1996; Niliusr *et al.*, 1997; Kuruma & Hartzell, 2000; Haase & Hartung, 2006; Brunner *et al.*, 2014), la mayoría de estos modelos son capaces de reproducir muchas de las propiedades de activación de TMEM16A causadas por efecto de  $V_m$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Tabla 1). Es importante hacer notar que los modelos ilustrados por los Esquemas 5, 6 y 7 de la Tabla 1 representan propuestas aceptables y funcionales para intentar describir el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A, pero estas propuestas no poseen una validez que permita tomarlas como una buena propuesta. Para ilustrar de manera más clara la última afirmación tomemos como ejemplo el Esquema 7. Este Esquema consta de dos estados cerrados y dos abiertos que están conectados por las frecuencias de transición  $\alpha_i$ ,  $\beta_i$  con  $i = 1, 2, 3$ , donde todas poseen una dependencia con  $V_m$  y además también  $\alpha_2 = \alpha_2([\text{Ca}^{2+}]_i)$ . Este esquema establece que el mecanismo de apertura y cierre del canal puede darse en dos modos independientes. Aquel en el que estímulos de  $V_m$  propicien su transición directa del estado cerrado (C) al abierto (O) y viceversa, y en el que a la configuración cerrada se una un ion de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $C_{\text{Ca}}$ ) de manera dependiente del  $V_m$  para eventualmente alcanzar una configuración abierta ( $O_{\text{Ca}}$ ) que también es dependiente del  $V_m$ . Pero dentro de este mecanismo, ¿qué hay de distinto entre el estado cerrado (C) y el estado abierto (O) tal que para esta propuesta, la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  es preferencial para el estado cerrado? y ¿Por qué no es posible en el Esquema 7 establecer una transición del estado O al estado  $O_{\text{Ca}}$ ? No tenemos algo que nos impida considerar o no la existencia de los eventos antes indicados, pero descartarlos con antelación resulta en un marco probabilístico menos completo y como consecuencia con menor validez para intentar resolver nuestro problema. Precisamente el Esquema 8 de la Tabla 1 refleja lo que en las líneas anteriores se expuso. Este Esquema (al igual que los demás en la Tabla 1) es también inconsistente con la evidencia experimental que indica la unión de dos iones de  $\text{Ca}^{2+}$  al canal para inducir su respuesta. Sin embargo, este modelo puede ser capaz de reproducir varias de las propiedades de activación de TMEM16A por efecto de  $V_m$  y  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Para cerrar la discusión relativa a la validez de algún modelo propuesto, es importante señalar que los esquemas propuestos por Arreola *et al.*, 1996, Haase *et al.*, 2006, y Kuruma and Hartzell., 2000 son perfectamente aceptables y consistentes con las bases experimentales, no obstante

como puede notarse contienen elementos (más allá de aquellos como el no tomar en cuenta factores importantes en el mecanismo de apertura y cierre y las fallas inherentes a cualquier propuesta teórica) que limita su validez.

Esquema	Limitaciones	Alcances
<p>5</p> 	<p>No reproduce la perfusión rápida para <math>V_m</math> negativos y el comportamiento de <math>EC_{50}</math> es sobrestimado.</p>	<p>Reproduce propiedades tales como: cinética de <math>I_{Cl}</math> a diferentes <math>V_m</math> y <math>[Ca^{2+}]_i</math>, apertura del canal en ausencia de <math>Ca^{2+}</math>.</p>
<p>6</p> 	<p>La apertura del canal es muy rápida y los valores de <math>EC_{50}</math> están sobrestimados.</p>	<p>Reproduce la cinética de <math>I_{Cl}</math> a condiciones de bajo <math>[Ca^{2+}]_i</math>, apertura del canal en ausencia de <math>Ca^{2+}</math> y la perfusión rápida.</p>

<p>7</p> 	<p>No reproduce la cinética de <math>I_{Cl}</math> a baja <math>[Ca^{2+}]_i &lt; 1 \mu M</math>.</p>	<p>Reproduce la cinética de <math>I_{Cl}</math> para diferentes condiciones de <math>V_m</math> y <math>Ca^{2+}</math>. La cinética de <math>I_{Cl}</math> es buena para altas <math>[Ca^{2+}]_i \geq 10 \mu M</math>.</p>
<p>8</p> 	<p>No reproduce la cinética de <math>I_{Cl}</math> para <math>[Ca^{2+}]_i &gt; 1 \mu M</math>. El comportamiento de la perfusión rápida a <math>V_m \leq -120 mV</math> falla.</p>	<p>Reproduce la cinética de activación y desactivación de <math>I_{Cl}</math> para diferentes condiciones de <math>V_m</math> y <math>Ca^{2+}</math>. La perfusión rápida para <math>V_m \geq -80 mV</math>. Las curvas dosis-respuesta a diferentes valores de <math>V_m</math>. La cinética de</p>

		<p>es buena para <math>[Ca^{2+}]_i \leq 1 \mu M</math>.</p>
--	--	---

Tabla 1. Modelos propuestos para describir el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A regulado por cambios en el  $V_m$  y cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ .

El mecanismo de apertura y cierre de los CaCCs es complejo como para pretender describirlo con los sencillos Esquemas mostrados en la Tabla 1. Sin embargo, es partiendo de sencillos Esquemas que se pueden construir buenas propuestas. Por ejemplo, el modelo representado por el Esquema 1 establece que en ausencia de  $Cl^-$  y  $Ca^{2+}$  intracelular, TMEM16A podría estar en alguno de los dos estados C y O para el cual las frecuencias de transición  $\alpha_0$  y  $\beta_0$  o ambas tienen que ser dependientes del  $V_m$ . En condiciones experimentales donde se encuentran los iones  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$ , ambos estados conformacionales son susceptibles de interactuar con los iones de  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$ . Debido a la imposibilidad en determinar que ion puede unirse primero al canal se consideran las dos posibilidades como se describe enseguida.

### 7.III Unión del ion de $Cl^-$ desde el medio extracelular

Dado que los experimentos fueron hechos ante soluciones externas e internas que contenían  $Cl^-$ , en ausencia o presencia de  $Ca^{2+}$  intracelular podríamos pensar que los estados

conformaciones C y O podrían ser susceptibles de aceptar primero a un ion de  $\text{Cl}^-$ . Así que, cuando  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 0 \mu\text{M}$  y haya presencia de iones de  $\text{Cl}^-$  en ambos lados de la membrana, para un canal que este experimentando transiciones entre los estados C y O podría unirse un ion de  $\text{Cl}^-$  y adquirir las configuraciones  $\text{C}_{\text{Cl}}$  y  $\text{O}_{\text{Cl}}$  como se representa en el Esquema de la Figura 13. Las reacciones de asociación y disociación del  $\text{Cl}^-$  en el estado cerrado ( $\text{C} \rightleftharpoons \text{C}_{\text{Cl}}$ ) estarán controladas por las frecuencias de transición  $[\text{Cl}^-]_e k_{\text{CCl1}}$  y  $k_{\text{CCl2}}$ , mientras que aquellas del estado abierto ( $\text{O} \rightleftharpoons \text{O}_{\text{Cl}}$ ) por  $[\text{Cl}^-]_e k_{\text{OCl1}}$  y  $k_{\text{OCl2}}$ , respectivamente. Por otro lado,  $\alpha_{\text{Cl1}}$  y  $\beta_{\text{Cl1}}$  son las frecuencias de transición que controlan las conversiones  $\text{C}_{\text{Cl}} \rightleftharpoons \text{O}_{\text{Cl}}$ . y todas las frecuencias de transición dependerán de  $V_m$ . El Esquema mostrado en la Figura 13 describirá el mecanismo de apertura y cierre del canal a causa del  $V_m$  y el  $\text{Cl}^-$  extracelular en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

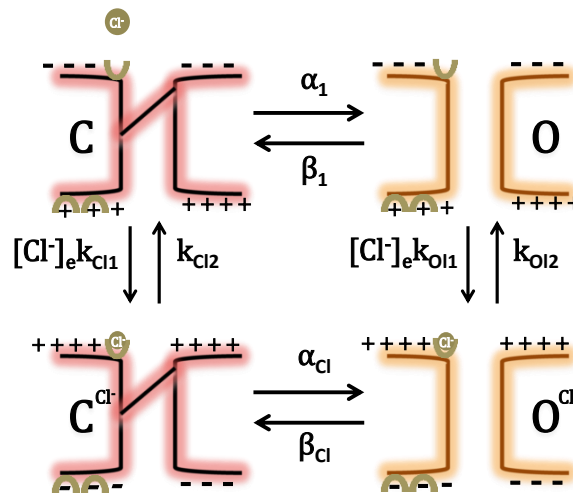


Figura 13. Representación de las configuraciones logradas por la unión de un ion de  $\text{Cl}^-$  sobre los estados cerrado y abierto del canal. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y  $\text{Cl}^-$  externo la activación de TMEM16A dependiente de  $V_m$  fue representada como una reacción cinética entre dos estados; cerrado C y abierto O. Las transiciones entre C y O están controladas por las frecuencias  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ , las cuales tienen dependencia exponencial con  $V_m$ . Si se considera que el  $\text{Cl}^-$  externo se une primero al canal, como es representado por la esfera color verde, se inducirán dos estados conformacionales más;  $\text{C}_{\text{Cl}}$  y  $\text{O}_{\text{Cl}}$ . Las transiciones  $\text{C} \rightleftharpoons \text{C}_{\text{Cl}}$  están controladas por las frecuencias  $[\text{Cl}^-]_e k_{\text{CCl1}}$  y  $k_{\text{CCl2}}$ , mientras que las transiciones  $\text{O} \rightleftharpoons \text{O}_{\text{Cl}}$  por  $[\text{Cl}^-]_e k_{\text{OCl1}}$  y  $k_{\text{OCl2}}$ . Finalmente  $\alpha_{\text{Cl}}$  y  $\beta_{\text{Cl}}$  son las frecuencias de transición que controlan la reacción  $\text{C}_{\text{Cl}} \rightleftharpoons \text{O}_{\text{Cl}}$ .

#### 7.IV Unión de los iones de $\text{Ca}^{2+}$ desde el medio intracelular

Por otro lado, si ocurriera primero la unión de un ion de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre cualquiera de las configuraciones cerrada o abierta del canal, entonces podría adquirir las configuraciones

$C_{Ca}$  y  $O_{Ca}$  como se representa en el Esquema de la Figura 14. La afinidad del  $Ca^{2+}$  por sus sitios de unión sobre el canal es dependiente del  $V_m$ , entonces los procesos de asociación y disociación del  $Ca^{2+}$  deben o pueden tener dependencia con  $V_m$ . Consideramos que las frecuencias de transición  $k_{O1}$  y  $k_{C1}$  que están involucradas en la asociación del  $Ca^{2+}$  sobre las configuraciones abierta y cerrada, respectivamente, son independientes del  $V_m$ . Esta suposición se justifica por la observación experimental de que la constante de tiempo de activación de los CaCCs es independiente de  $V_m$  (Kuruma & Hartzell, 2000; Xiao *et al.*, 2011). Por otra parte, la constante de tiempo de cierre de los CaCCs presenta un comportamiento que es dependiente de  $V_m$ . Por lo tanto, se consideró que las frecuencias de transición  $k_{O2}$  y  $k_{C2}$  que están involucradas en la disociación del  $Ca^{2+}$  son dependientes del  $V_m$ .

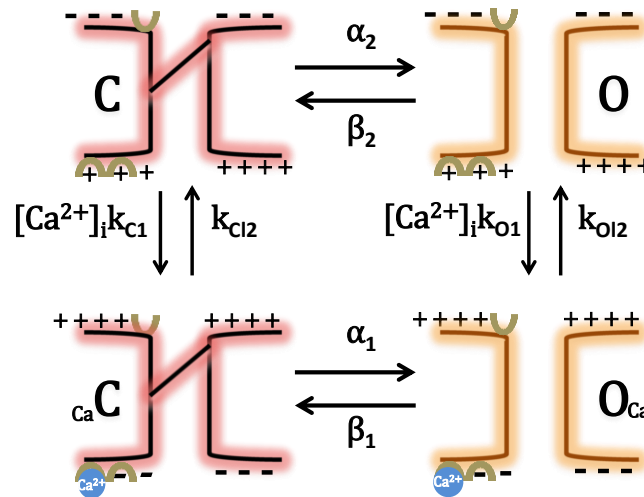


Figura 14. Representación de las configuraciones logradas por la unión de un ion de  $Ca^{2+}$  sobre los estados cerrado y abierto del canal. Si se considera que el  $Ca^{2+}$  intracelular se une primero al canal, como es representado por la esfera color azul, se inducirán dos estados conformacionales más;  $C_{Ca}$  y  $O_{Ca}$ . Las transiciones  $C \rightleftharpoons C_{Ca}$  están controladas por las frecuencias  $[Ca^{2+}]_i k_{C1}$  y  $k_{C12}$ , mientras que las transiciones  $O \rightleftharpoons O_{Ca}$  por  $[Ca^{2+}]_i k_{O1}$  y  $k_{O12}$ , además,  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  son las frecuencias de transición que controlan la reacción  $C_{Ca} \rightleftharpoons O_{Ca}$ .

Los esquemas mostrados en las Figura 13 y Figura 14 representarían la condición donde se han unido un ion de  $Cl^-$  o un ion de  $Ca^{2+}$  de manera dependiente con  $V_m$ . Por lo tanto, estos Esquemas en principio ya incluyen la dependencia con  $V_m$  y  $Cl^-$  (Figura 13) o la dependencia con  $V_m$  y  $Ca^{2+}$  (Figura 14). Sin embargo, los factores  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$  no son independientes sobre el mecanismo de apertura y cierre de los canales. Por lo tanto, estos Esquemas pueden extenderse para considerar la unión conjunta de  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$ . Por ejemplo,

si iones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se agregan, como sucede en los experimentos de perfusión rápida o son liberados de fuentes intracelulares como el retículo endoplásmico, el canal podría visitar estados adicionales cerrados y/o abiertos inducidos por la asociación de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  más iones de  $\text{Cl}^-$ . Estos pasos se ilustran en el Esquema de la Figura 15. En este caso las frecuencias de transición que controlan las reacciones  ${}_{\text{Ca}}\text{C} \rightleftharpoons {}_{\text{Cl}}\text{C}_{\text{Ca}}$  son  $[\text{Cl}^-]_e k_{\text{CCl}3}$  y  $k_{\text{CCl}4}$ , mientras que aquellas que determinan  ${}_{\text{Ca}}\text{O} \rightleftharpoons {}_{\text{Cl}}\text{O}_{\text{Ca}}$  están controladas por  $[\text{Cl}^-]_e k_{\text{OCl}3}$  y  $k_{\text{OCl}4}$ . Por otra parte,  $[\text{Ca}^{2+}]_i k_{\text{O}1}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_i k_{\text{O}1\text{Cl}}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_i k_{\text{C}1\text{Cl}}$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_i k_{\text{C}1}$  son las frecuencias de transición de asociación del  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que  $k_{\text{O}2}$ ,  $k_{\text{O}2\text{Cl}}$ ,  $k_{\text{C}2\text{Cl}}$  y  $k_{\text{C}1}$  son las frecuencias de transición que controlan la disociación del  $\text{Ca}^{2+}$ . Los subíndices  $\text{Cl}^-$  indican estados ocupados por el ion de  $\text{Cl}^-$  o las frecuencias de transición involucradas con la unión del  $\text{Cl}^-$ . Finalmente  $\alpha_i$ ,  $\beta_i$ ,  $\alpha_{\text{Cl}i}$ ,  $\beta_{\text{Cl}i}$  con  $i=1,2$  son las frecuencias de transición que controlan las reacciones  $\text{C} \rightleftharpoons \text{O}$  sin y con  $\text{Cl}^-$ , respectivamente.



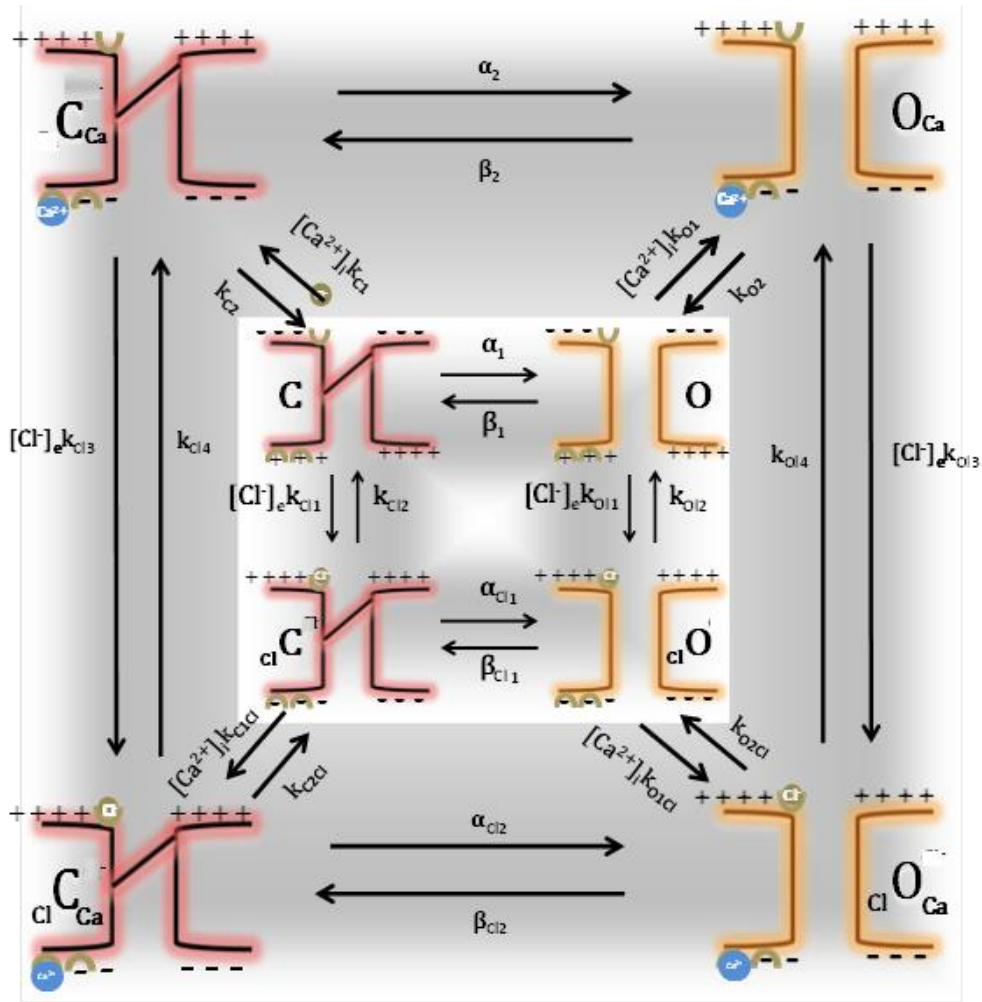


Figura 15. Representación de las configuraciones logradas por la unión conjunta de un ion de Ca<sup>2+</sup> y un ion de Cl<sup>-</sup> sobre los estados cerrado y abierto del canal. Si se asume que el Cl<sup>-</sup> extracelular se ha unido al canal y enseguida ocurre la unión del Ca<sup>2+</sup> como es representado por la esfera color azul, se inducirán cuatro estados conformacionales más; C<sub>Ca</sub>, O<sub>Ca</sub>, C<sub>Cl</sub> y O<sub>Cl</sub>. Las frecuencias de transición que controlan las reacciones C<sub>Ca</sub> ↔ C<sub>Cl</sub>Ca son [Cl<sup>-</sup>]<sub>e</sub>k<sub>Cl3</sub> y k<sub>Cl4</sub>, mientras que aquellas que determinan C<sub>Ca</sub> ↔ O<sub>Ca</sub> están controladas por [Cl<sup>-</sup>]<sub>e</sub>k<sub>Cl1</sub> y k<sub>Cl2</sub>. Por otra parte, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>k<sub>Ca1</sub>, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>k<sub>Ca2</sub>, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>k<sub>CaCl1</sub> y [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>k<sub>CaCl2</sub> son las frecuencias de transición de asociación del Ca<sup>2+</sup>, en tanto que k<sub>Ca2</sub>, k<sub>CaCl1</sub>, k<sub>CaCl2</sub> y k<sub>Cl1</sub> son las frecuencias de transición que controlan la disociación del Ca<sup>2+</sup>. Los subíndices Cl<sup>-</sup> indican estados ocupados por el ion de Cl<sup>-</sup> o las frecuencias de transición involucradas con la unión del Cl<sup>-</sup>. Finalmente α<sub>i</sub>, β<sub>i</sub>, α<sub>Cl*i*</sub>, β<sub>Cl*i*</sub> con i=1,2 son las frecuencias de transición que controlan las reacciones C ↔ O sin y con Cl<sup>-</sup>, respectivamente. Aquellos ciclos enmarcados por las líneas punteadas color verde no satisfacen la reversibilidad microscópica (Tolmann, 1979).

## 7.V Puede el modelo de 8 estados explicar la activación de TMEM16A?

Por lo tanto, se puede ver ahora que el modelo de 8 estados de la Figura 15 contiene las tres variables que se están considerando en este trabajo;  $V_m$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$ . En esta etapa decidimos evaluar si el modelo de 8 estados que incluye la unión de un solo ion de  $Ca^{2+}$  con dependencia de  $V_m$  y presencia de  $Cl^-$  podría servir para describir el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A, ya que como se afirma en la Tabla 1, el sencillo modelo representado por el Esquema 8 logró aproximar relativamente bien varias propiedades de activación del canal y posiblemente la acción del  $Cl^-$  pueda ser cooperativa en la respuesta del canal hacia su activación. Entonces el modelo de 8 estados fue implementado en el software IChMASCOT (Covarrubias *et al.*, 2008; Dougherty *et al.*, 2008; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012) para realizar un ajuste global de los datos y así extraer los valores numéricos más óptimos de los parámetros asociados con las frecuencias de transición del modelo. Los datos usados en el procedimiento de ajuste fueron descritos en la sección 5.11. La Figura 16 muestra que el modelo de 8 estados (líneas gris) pudo reproducir la cinética de activación e inactivación de la  $I_{Cl}$  generada por TMEM16A (líneas negras), para las condiciones de  $[Ca^{2+}]_i$  0, 0.2 y 1  $\mu M$  y para las condiciones de voltaje indicadas, Figura 16-A, B, C. Sin embargo, no fue capaz de reproducir correctamente la cinética de activación e inactivación de  $I_{Cl}$  para altas  $[Ca^{2+}]_i$  tales como 20  $\mu M$  (Figura 16-D). Además, éste modelo logra describir con gran aproximación la cinética de  $I_{Cl}$  generadas con pulsos de 3 s para condiciones de  $[Cl^-]_e = 1, 10$  mM (Figura 16-A) y pulsos de 20 s de duración ante condiciones de  $[Cl^-]_e = 30, 140$  mM (Figura 16-B). La Tabla 2 enlista los valores numéricos de los parámetros de las frecuencias de transición usadas para realizar el ajuste global a los datos experimentales.

Frecuencia de transición	Expresión	Parametro	Valor del parametro a 0 mV
$\alpha_1$	$\alpha_{1,0} e^{\frac{z_\alpha FV_m}{RT}}$	$\alpha_{1,0} (s^{-1})$	0.0023 (0.00191 ± 0.0003)
		$z_\alpha$	0.1064(0.1245 ± 0.0064)
$\beta_1$	$\beta_{1,0} e^{\frac{-z_\beta FV_m}{RT}}$	$\beta_{1,0} (s^{-1})$	14676.0293(15176.28743 ± 1160.7801)
		$z_\beta$	0.084 (0.08787 ± 0.0013)
$k_{O1}$	$k_{O1,0} e^{\frac{z_1 FV_m}{RT}}$	$k_{O1,0} (s^{-1} \mu^{-1})$	118.733 (143.5514 ± 24.8247)
		$z_1$	0.0008 (0.00333 ± 0.0024)
$k_{O2}$	$k_{O2,0} e^{\frac{-z_2 FV_m}{RT}}$	$k_{O2,0} (s^{-1})$	0.0009 (0.00137 ± 0.0002)
		$z_2$	0.5346 (0.5671 ± 0.0275)
$\alpha_{Cl1}$	$k_{1,0} e^{\frac{z_{l1} FV_m}{RT}}$	$k_{1,0} (s^{-1})$	0.0287 (0.02624 ± 0.0046)
		$z_{l1}$	0.1817 (0.20718 ± 0.0253)
$\beta_{Cl1}$	$k_{2,0} e^{\frac{-z_{l2} FV_m}{RT}}$	$k_{2,0} (s^{-1})$	60838.8 (67235.5963 ± 6480.1665)
		$z_{l2}$	0.7109 (0.7737 ± 0.0627)
$k_{CCl1}$	$k_{+Cl,0} e^{\frac{z_{+Cl} FV_m}{RT}}$	$k_{+Cl,0} (s^{-1} M^{-1})$	0.0064 (0.0076 ± 0.0014)
		$z_{+Cl}$	0.0665 (0.0748 ± 0.0052)
$k_{CCl2}$	$k_{-Cl,0} e^{\frac{-z_{-Cl} FV_m}{RT}}$	$k_{-Cl,0} (s^{-1})$	0.0008 (0.0008 ± 3.3X10 <sup>-6</sup> )
		$z_{-Cl,0}$	0.1479 (0.19505 ± 0.0488)

$k_{OCI1}$	$k_{+OI,0} e^{\frac{z_{+OI} F V m}{RT}}$	$k_{+OI,0} (s^{-1} M^{-1})$	0.0001 (0.0003 ± 0.0001)
		$z_{+OI}$	0.1795 (0.1939 ± 0.0565)
$k_{OCI2}$	$k_{-OI,0} e^{\frac{-z_{-OI} F V m}{RT}}$	$k_{-OI,0} (s^{-1})$	3366.6467 (3819.5205 ± 529.4714)
		$z_{-OI}$	0.1191 (0.12496 ± 0.0024)
<b>B</b>			
$k_{C1} = k_{O1}$	$k_{C2} = \frac{l}{L} k_{O2}$	$\alpha_2 = l \alpha_1$	$\beta_2 = L \beta_1$
$k_{C1Cl} = \frac{h}{H} k_{O1}$	$k_{C2Cl} = \frac{l}{L} k_{O2}$	$\alpha_{Cl2} = \frac{Hml}{M} \alpha_{Cl1}$	$\beta_{Cl2} = hL \beta_{Cl1}$
$k_{OCI3} = m k_{OCI1}$	$k_{OCI4} = M k_{OCI2}$	$k_{O1Cl} = \frac{m}{M} k_{O1}$	$k_{O2Cl} = k_{O2}$
$k_{CCl3} = h k_{CCl1}$	$k_{CCl4} = H k_{CCl2}$	$l = 8.8049$ (9.6585 ± 1.1204)	$m = 33.1978$ (36.4868 ± 7.8644)
		$L = 0.0006$ (0.0006 ± 5 × 10 <sup>-5</sup> )	$M = 1.0082$ (1.1194 ± 0.1929)
		$h = 0.0341$ (0.0346 ± 0.0055)	$H = 312.1575$ (288.916 ± 23.2829)

Tabla 2. Valores de los parámetros asociados con las frecuencias de transición del modelo de 8 estados obtenidos del ajuste global a los datos de TMEM16A.

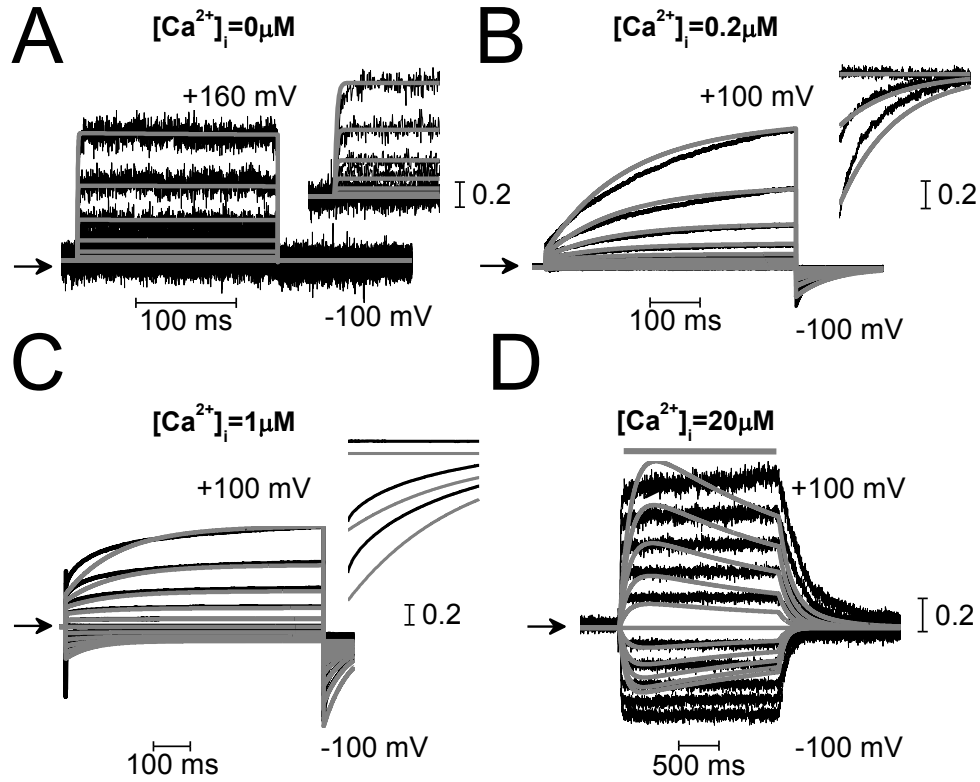


Figura 16. Ajuste global del modelo de ocho estados a registros promedio de la  $I_{Cl}$  generada por TMEM16A y obtenidos ante diferentes condiciones de  $V_m$  y  $[Ca^{2+}]_i$ . Las líneas solidas color gris representan los ajustes hechos con IChMASCOT, mientras que las líneas en color negro representan los datos experimentales. (A-C) Registros normalizados de la  $I_{Cl}$  obtenidos en la configuración de “whole cell” para células dializadas con  $[Ca^{2+}]_i$  de 0  $\mu$ M, 0.2  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 20  $\mu$ M usando un protocolo de escalones de voltaje en un rango de -100 a +160 mV para el caso de 0  $\mu$ M y para el resto de los registros el voltaje vario en un rango de -100 a +100 mV, en todos los caso el incremento de los escalones de voltaje fue de 20 mV. (D) Trazos representativo de la  $I_{Cl}$  obtenida de segmentos escindidos de membrana expuestos a la aplicación y lavado rápido de 20  $\mu$ M de  $Ca^{2+}$ . La barra color gris sobre los trazos de la  $I_{Cl}$  indica el periodo de tiempo de aplicación del  $Ca^{2+}$ . El coeficiente de regresión fue  $R^2 = 0.95$  para el ajuste simultaneo. Los registros de  $I_{Cl}$  con  $[Ca^{2+}]_i = 1$  y 20  $\mu$ M se obtuvieron de células expuestas a condiciones simétricas de 140mM de  $Cl^-$  y el resto fueron de células expuestas a condiciones  $[Cl^-]_o/[Cl^-]_i$ : 140/40 mM.

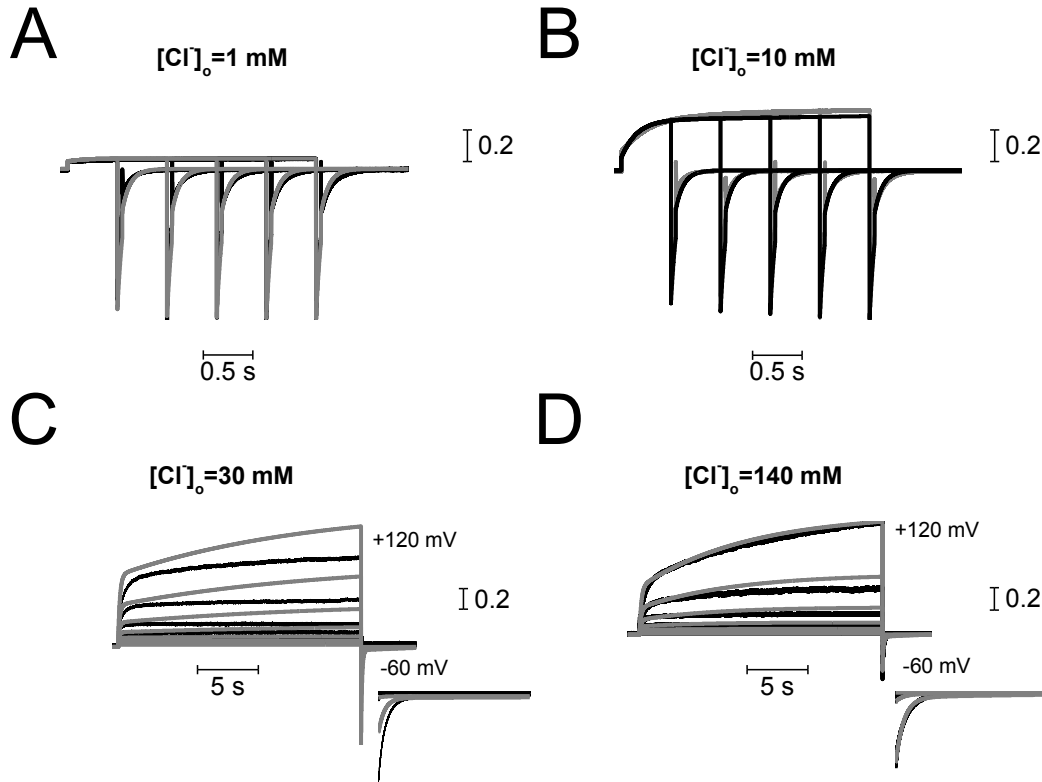


Figura 17. Ajuste global del modelo de 8 estados a registros promedio de la  $I_{Cl}$  generada por TMEM16A obtenidos usando la configuración de “whole cell” ante diferentes condiciones de  $V_m$  y  $[Cl]_o$ . Las líneas solidas color gris representan los ajustes hechos con IChMASCOT, mientras que las líneas en color negro representan los datos experimentales. (A, B) Registros de  $I_{Cl}$  obtenida de células expuestas a  $[Cl]_o=1$  y 10 mM y dializadas  $[Ca^{2+}]_i=0.2 \mu M$ ; usando un protocolo de voltajes como el mostrado en la Figura 8. (C, D) Registros de  $I_{Cl}$  obtenida con pulsos de 20 s sobre células expuestas a  $[Cl]_o=30$  y 140 mM y dializadas  $[Ca^{2+}]_i=0.2 \mu M$  usando un protocolo de escalones de voltaje en un rango de -20 a 120 mV con pasos de 20 mV. El valor del coeficiente de regresión en este caso fue de  $R^2= 0.95$  para el ajuste global simultaneo.

## 7.VI El modelo de 12 estados explica la activación de TMEM16A

Dado que el modelo de 8 estados no es capaz de reproducir los experimentos de perfusión rápida, y al ser estos un distintivo importante que refleja las características de los procesos de asociación y disociación del  $Ca^{2+}$  sobre el canal y esto a su vez de la mano con el hecho señalado anteriormente en el que se establece que para que TMEM16A alcance una activación completa se requiere de que al menos dos iones de  $Ca^{2+}$  se unan por al canal. Así, cuando se considera la unión adicional y secuencial de un ion de  $Ca^{2+}$  en la configuración de 8 estados, se tendrá como resultado una configuración con 12 estados, como lo muestra el Esquema de la Figura 18. En este caso asumimos que para cada estado,

ya sea abierto o cerrado, la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  ocurre con la misma afinidad individual en cada estado conformacional. Esto significa que las transiciones adicionales que conducen a los estados cerrados y abiertos con dos iones de  $\text{Ca}^{2+}$  son controladas por las mismas frecuencias de transición establecidas en los Esquemas mostrados en la Figura 13 y Figura 15, es decir;  $[\text{Ca}^{2+}]_i k_{\text{O}1}$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_i k_{\text{C}1}$  controlan la asociación del  $\text{Ca}^{2+}$  en las reacciones  $\text{O} \rightleftharpoons \text{O}_{\text{Ca}}$  y  $\text{C} \rightleftharpoons \text{C}_{\text{Ca}}$ , respectivamente, en ausencia de  $\text{Cl}^-$ , mientras que  $[\text{Ca}^{2+}]_i k_{\text{O}1\text{Cl}}$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_i k_{\text{C}1\text{Cl}}$  son las frecuencias de transición que controlan la asociación del  $\text{Ca}^{2+}$  en las reacciones  ${}_{\text{Cl}}\text{O} \rightleftharpoons {}_{\text{Cl}}\text{O}_{\text{Ca}}$  y  ${}_{\text{Cl}}\text{C} \rightleftharpoons {}_{\text{Cl}}\text{C}_{\text{Ca}}$  en presencia de  $\text{Cl}^-$ , en tanto que  $k_{\text{O}2}$ ,  $k_{\text{C}2}$ ,  $k_{\text{O}2\text{Cl}}$  y  $k_{\text{C}2\text{Cl}}$  son las constantes de disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia y presencia de  $\text{Cl}^-$ , respectivamente. Por otra parte, las frecuencias de transición  $[\text{Cl}^-]_e k_{\text{O}13}$ ,  $[\text{Cl}^-]_e k_{\text{O}15}$ ,  $[\text{Cl}^-]_e k_{\text{C}13}$  y  $[\text{Cl}^-]_e k_{\text{C}15}$  controlan los procesos de asociación del  $\text{Cl}^-$  en las reacciones  $\text{O}_{\text{Ca}} \rightleftharpoons {}_{\text{Cl}}\text{O}_{\text{Ca}}$  y  $\text{C}_{\text{Ca}} \rightleftharpoons {}_{\text{Cl}}\text{C}_{\text{Ca}}$ , y los procesos de disociación del  $\text{Cl}^-$  quedan determinados por las frecuencias de transición  $k_{\text{O}14}$ ,  $k_{\text{O}16}$ ,  $k_{\text{C}13}$  y  $k_{\text{C}16}$ , todos estos procesos ocurren en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Finalmente, las reacciones  ${}_{\text{Cl}}\text{C} \rightleftharpoons {}_{\text{Cl}}\text{O}_{\text{Ca}}$  y  ${}_{\text{Cl}}\text{C} \rightleftharpoons {}_{\text{Cl}}\text{O}_{2\text{Ca}}$  están reguladas por las frecuencias de transición  $\alpha_{\text{Cl}i}$ ,  $\beta_{\text{Cl}i}$  con  $i=1, 2, 3$ .

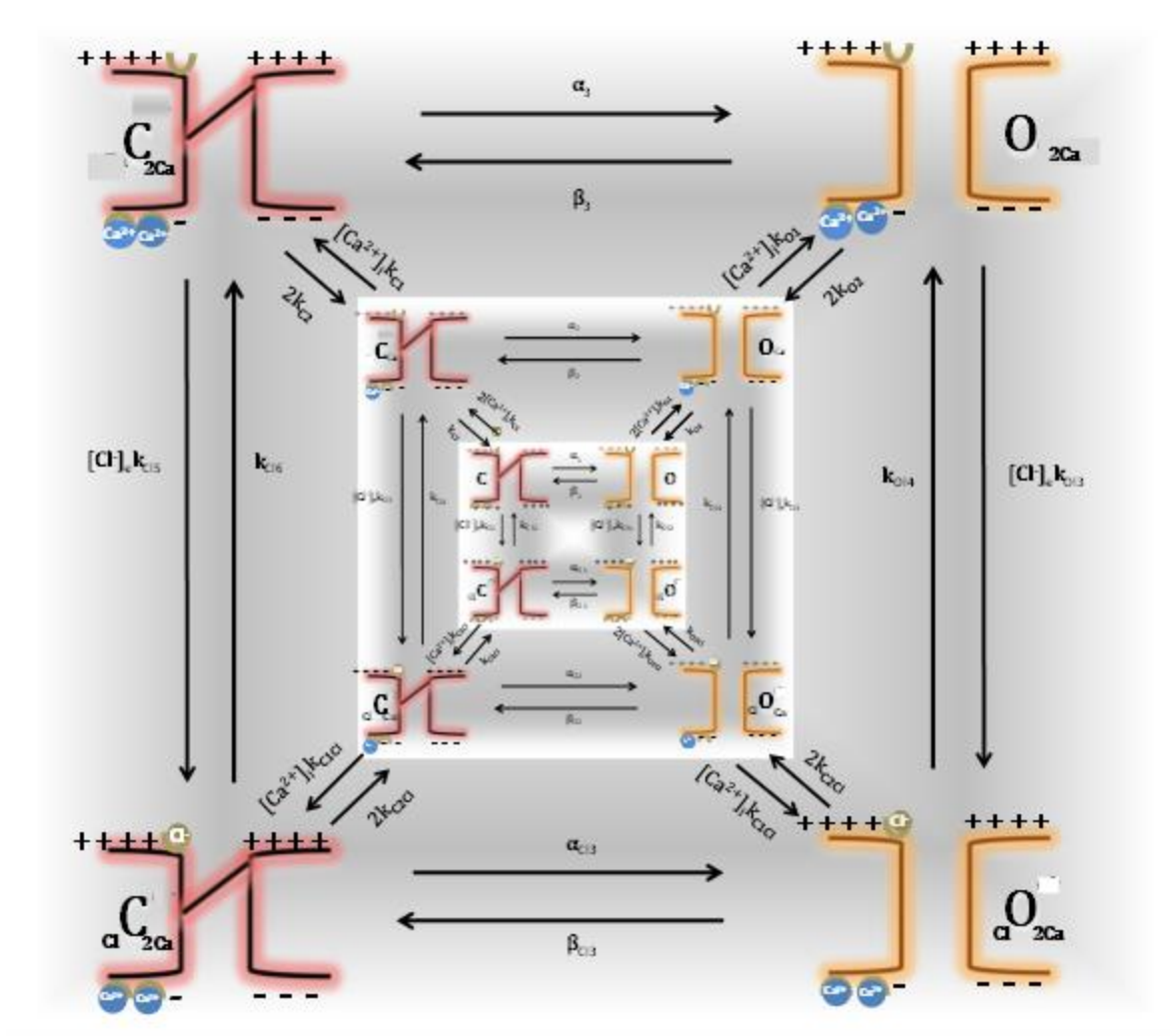


Figura 18. Configuración lograda por la unión de un ion de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la configuración de 8 estados. Si se asume que el  $\text{Cl}^-$  extracelular se ha unido al canal y enseguida ocurre la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre una configuración ya se inducirán cuatro estados conformacionales más;  $\text{C}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{O}_{\text{Ca}}$ ,  $_{\text{Cl}}\text{C}_{\text{Ca}}$  y  $_{\text{Cl}}\text{O}_{\text{Ca}}$ . Las frecuencias de transición que controlan las reacciones  $_{\text{Cl}}\text{C} \rightleftharpoons _{\text{Cl}}\text{C}_{\text{Ca}}$  son  $[\text{Cl}^-]_{\text{e}} k_{\text{CCl3}}$  y  $k_{\text{CCl4}}$ , mientras que aquellas que determinan  $_{\text{Cl}}\text{C} \rightleftharpoons _{\text{Cl}}\text{O}_{\text{Ca}}$  están controladas por  $[\text{Cl}^-]_{\text{e}} k_{\text{OCl3}}$  y  $k_{\text{OCl4}}$ . Por otra parte,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{e}} k_{\text{O1}}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{e}} k_{\text{O1Cl}}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{e}} k_{\text{ClCl1}}$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{e}} k_{\text{Cl1}}$  son las frecuencias de transición de asociación del  $\text{Ca}^{2+}$ , en tanto que  $k_{\text{O2}}$ ,  $k_{\text{O2Cl}}$ ,  $k_{\text{C2Cl}}$  y  $k_{\text{C1}}$  son las frecuencias de transición que controlan la disociación del  $\text{Ca}^{2+}$ . Los subíndices Cl indican estados ocupados por el ion de  $\text{Cl}^-$  o las frecuencias de transición involucradas con la unión del  $\text{Cl}^-$ . Finalmente, las reacciones  $_{\text{Cl}}\text{C} \rightleftharpoons _{\text{Cl}}\text{O}_{\text{Ca}}$  y  $_{\text{Cl}}\text{C} \rightleftharpoons _{\text{Cl}}\text{O}_{2\text{Ca}}$  están definidas por las frecuencias de transición  $\alpha_{\text{Cl}i}$ ,  $\beta_{\text{Cl}i}$  con  $i=2, 3$ .

Sin embargo, también cabe la posibilidad de que la unión de los dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  puede ocurrir antes de que el ion  $\text{Cl}^-$  se logre unir primero al canal. Por lo tanto, cuando ambos iones, tanto el de  $\text{Ca}^{2+}$  como el de  $\text{Cl}^-$  están presentes, para un canal que transita entre los estados C y O podría suceder que primero se le unan los dos iones de  $\text{Ca}^{2+}$  de manera secuencial y modulada por el  $V_m$  en cada conformación, como se muestra en el Esquema de la Figura 19. Este Esquema representaría aquella condición experimental usada para



registrar  $I_{Cl}$  sobre células bañadas en solución sin  $Cl^-$  y dializadas con solución que contenía  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$ . Las transiciones a los estados C y O con uno o dos iones de  $Ca^{2+}$  asociados son controladas por las frecuencias de transición  $[Ca^{2+}]_i k_{C1}$ ,  $k_{C2}$ ,  $[Ca^{2+}]_i k_{O1}$  y  $k_{O2}$  dado que asumimos la misma afinidad individual del  $Ca^{2+}$  para el estado C o para el estado O.

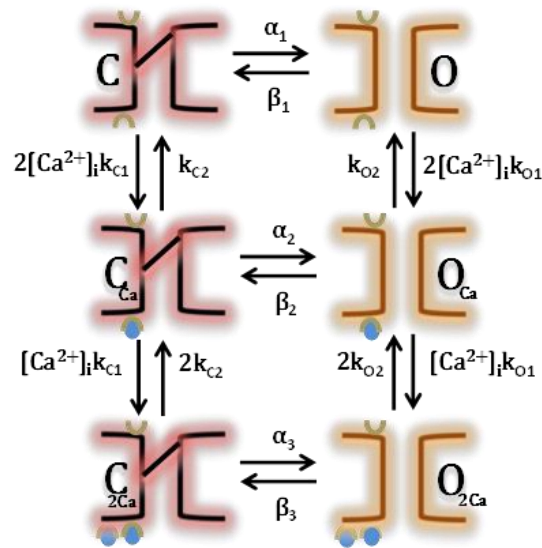


Figura 19. Configuración lograda por la unión secuencial de dos iones de  $Ca^{2+}$  en ausencia de  $Cl^-$ . En ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular y  $Cl^-$  externo la activación de TMEM16A dependiente de  $V_m$  fue representada como una reacción cinética entre dos estados; cerrado C y abierto O. Las transiciones entre C y O están controladas por las frecuencias  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ , las cuales tienen dependencia exponencial con  $V_m$ . Si se considera que el  $Ca^{2+}$  intracelular se une primero al canal, como es representado por la esfera color azul, se inducirán dos estados conformacionales más;  $C_{Ca}$  y  $O_{Ca}$ . Las transiciones  $C \rightleftharpoons C_{Ca}$  están controladas por las frecuencias  $[Ca^{2+}]_i k_{C1}$  y  $k_{C2}$ , mientras que las transiciones  $O \rightleftharpoons O_{Ca}$  por  $[Ca^{2+}]_i k_{O1}$  y  $k_{O2}$ , además,  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  son las frecuencias de transición que controlan la reacción  $C_{Ca} \rightleftharpoons O_{Ca}$ .

Entonces, la unión adicional de un  $Cl^-$  externo sobre las conformaciones ilustradas en el Esquema mostrado en la Figura 19 conducirá también al modelo de 12 estados. El efecto de la unión del  $Ca^{2+}$  sobre alguna transición dada o sobre la asociación del  $Cl^-$  en cualquier estado conformacional está explícitamente incluido en los casos apropiados por factores de peso. Así el parámetro  $l$  se usó para pesar el efecto del  $Ca^{2+}$  sobre la transición  $C_{Ca} \rightleftharpoons O_{Ca}$  mientras que  $L$  fue usado para la transición inversa;  $h$  y  $H$  fueron usados para pesar el efecto del  $Ca^{2+}$  sobre la asociación y disociación del  $Cl^-$  en las transiciones  $C_{Ca} \rightleftharpoons_{Cl} C_{Ca}$ ;  $m$  y  $M$  fueron usados para una transición similar a lo que ocurre entre los estados abiertos  $O_{Ca} \rightleftharpoons_{Cl} O_{Ca}$ . Estos parámetros de peso escalan las frecuencias de transición apropiadas como es indicado por las expresiones que describen cada transición en las Tablas 2 y 3. Debido a que el  $Cl^-$  permea, se espera que no todos los ciclos que se contemplan en el modelo de 12

estados satisfagan el principio de reversibilidad microscópica (Tolmann, 1979). Los ciclos concéntricos resaltados por las franjas grises no satisfacen la reversibilidad, el resto la satisfacen.

Para probar el modelo de 12 estados, realizamos un ajuste global para el mismo conjunto de datos probados con el modelo de 8 estados y así poder obtener los valores numéricos de los parámetros asociados con las frecuencias de transición del modelo de 12 estados. La Figura 20 muestra los resultados del ajuste global simultaneo (líneas solidas color gris) a los datos experimentales (líneas solidas color negro) obtenidos para diferentes condiciones de  $V_m$  y con la  $[Ca^{2+}]_i$  de 0  $\mu M$  (A), 0.2  $\mu M$  (B), 1  $\mu M$  (C) y 20  $\mu M$  (D). A diferencia de lo que ocurrió con el modelo de 8 estados, el modelo de 12 estados ajusto mucho mejor la cinética de la  $I_{Cl}$  generada por los experimentos de perfusión rápida (Figura 20-D). Por otro lado, en la Figura 21 se muestra como el modelo de 12 estados también logró describir correctamente la cinética de la  $I_{Cl}$  obtenida para diferentes condiciones de  $V_m$  y las condiciones de  $[Cl^-]_e = 1$  mM (A), 10 mM (B) ante pulsos de voltaje con duración de 3 s. Asimismo, el modelo de 12 estados logra describir la cinética de  $I_{Cl}$  ante la aplicación de voltajes de larga duración para  $[Cl^-]_e$  de 30 mM (C) y 140 mM (D). En ambos modelos, tanto el de 8 como el de 12 estados, se presentan problemas en reproducir correctamente la activación de la  $I_{Cl}$  generada bajo condiciones de  $[Cl^-]_e = 30$  mM. El coeficiente de regresión  $R^2$  tuvo un valor de 0.98 comparada con 0.95 que se obtuvo con el modelo de 8 estados, lo cual indica que el modelo de 12 estados ajusto de mejor manera el conjunto de datos experimentales.

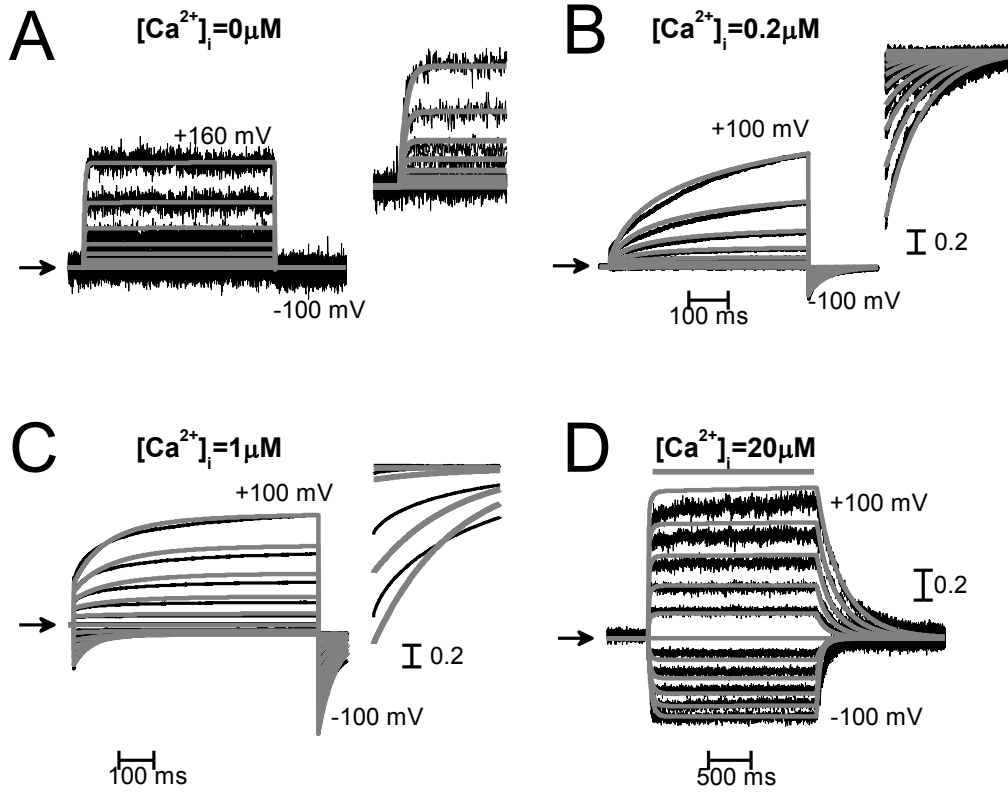


Figura 20. Ajuste global del modelo de 12 estados a registros promedio de la  $I_{Cl}$  generada por TMEM16A y obtenidos ante diferentes condiciones de  $V_m$  y  $[Ca^{2+}]_i$ . Las líneas solidas color gris representan los ajustes hechos con IChMASCOT, mientras que las líneas en color negro representan los datos experimentales. (A-C) Registros normalizados de la  $I_{Cl}$  obtenidos en la configuración de “whole cell” para células dializadas con  $[Ca^{2+}]_i$  de 0  $\mu M$ , 0.2  $\mu M$ , 1  $\mu M$  y 20  $\mu M$  usando un protocolo de escalones de voltaje en un rango de -100 a +160 mV para el caso de 0  $\mu M$  y para el resto de los registros el voltaje vario en un rango de -100 a +100 mV, en todos los caso el incremento de los escalones de voltaje fue de 20 mV. (D) Trazos representativo de la  $I_{Cl}$  obtenida de segmentos escindidos de membrana expuestos a la aplicación y lavado rapido de 20  $\mu M$  de  $Ca^{2+}$ . La barra color gris sobre los trazos de la  $I_{Cl}$  indica el periodo de tiempo de aplicación del  $Ca^{2+}$ . El coeficiente de regresión fue  $R^2 = 0.98$  para el ajuste simultaneo. Los registros de  $I_{Cl}$  con  $[Ca^{2+}]_i = 1$  y 20  $\mu M$  se obtuvieron de células expuestas a condiciones simétricas de 140mM de  $Cl^-$  y el resto fueron de células expuestas a condiciones  $[Cl^-]_o/[Cl^-]_i$ ; 140/40 mM. Figura tomada de Contreras-Vite JA *et al.*, 2016.

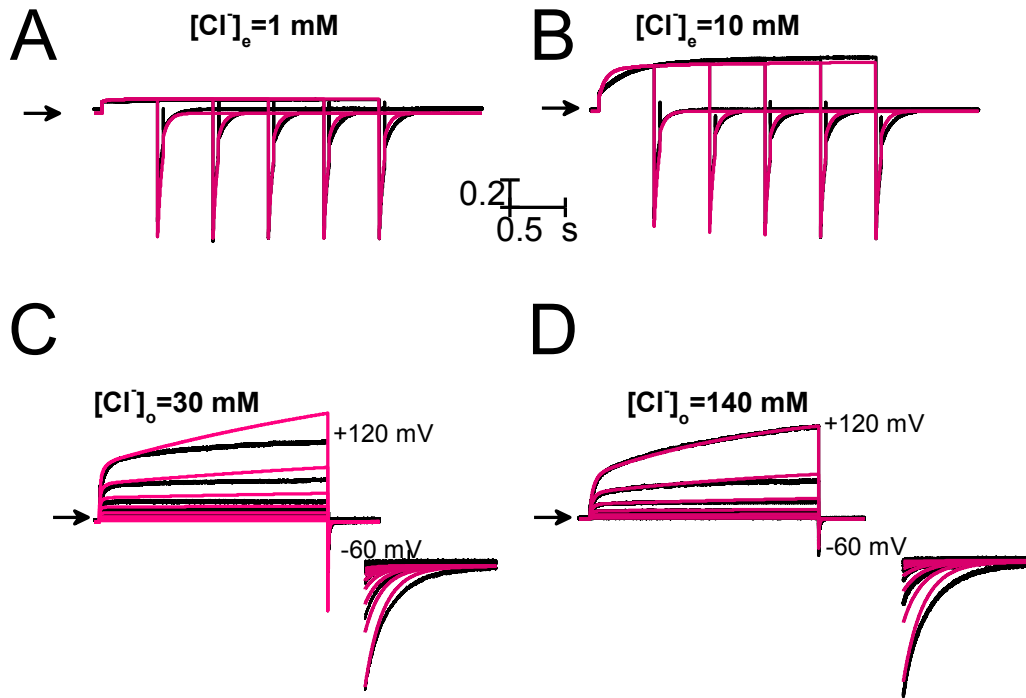


Figura 21. Ajuste global del modelo de 12 estados a registros promedio de la  $I_{Cl}$  generada por TMEM16A obtenidos ante diferentes condiciones de  $V_m$  y  $[Cl]_e$ . Las líneas solidas color gris representan los ajustes hechos con IChMASCOT, mientras que las líneas en color negro representan los datos experimentales. (A, B) Registros de  $I_{Cl}$  obtenida de células expuestas a  $[Cl]_e=1$  y  $10$  mM y dializadas  $[Ca^{2+}]_i=0.2 \mu M_i$  usando un protocolo de voltajes como el mostrado en la Figura 8. (C, D) Registros de  $I_{Cl}$  obtenida con pulsos de  $20$  s sobre células expuestas a  $[Cl]_e=30$  y  $140$  mM y dializadas  $[Ca^{2+}]_i=0.2 \mu M_i$  usando un protocolo de escalones de voltaje en un rango de  $-20$  a  $120$  mV con pasos de  $20$  mV. El valor del coeficiente de regresión en este caso fue de  $R^2=0.98$  para el ajuste global simultaneo. Figura tomada de Contreras-Vite JA *et al.*, 2016.

### 7.VII El modelo de 12 estados y sus frecuencias de transición predicen propiedades estacionaras que son consistentes con los datos experimentales

Los parámetros estimados para cada frecuencia de transición asociada al modelo de 12 estados se listan en la Tabla 3. Este conjunto de valores se usaron para reproducir propiedades de activación de TMEM16A en estado estacionario que clásicamente son reportadas en la literatura científica tales como las relaciones  $I_{Cl}-V_m$ , las curvas dosis-respuesta y la  $EC_{50}$  vs  $V_m$ , ya que estas propiedades son marcas características de estos canales iónicos. La Figura 22 muestra empalmados los valores estimados por el modelo de 12 estados (líneas solidas color gris) al conjuntos de datos experimentales (símbolos). Se

muestran las relaciones de densidad de corriente vs  $V_m$  a diferentes  $[Ca^{2+}]_i$  (A), las curvas de densidad de corriente como función de  $[Ca^{2+}]_i$  (curvas dosis-respuesta) para diferentes  $V_m$  (B), la dependencia con  $V_m$  de la  $EC_{50}$  y del coeficiente de Hill ( $n_H$ ) (C). El modelo provee de valores muy cercanos a los valores de las curvas de densidad de corriente vs  $V_m$  a diferentes  $[Ca^{2+}]_i$ . Sin embargo, el modelo se desvía de los datos de las curvas dosis-respuesta para los valores negativos de  $V_m$ . Asimismo, los valores de la  $EC_{50}$  estimados por el modelo son ligeramente diferentes a los datos experimentales.

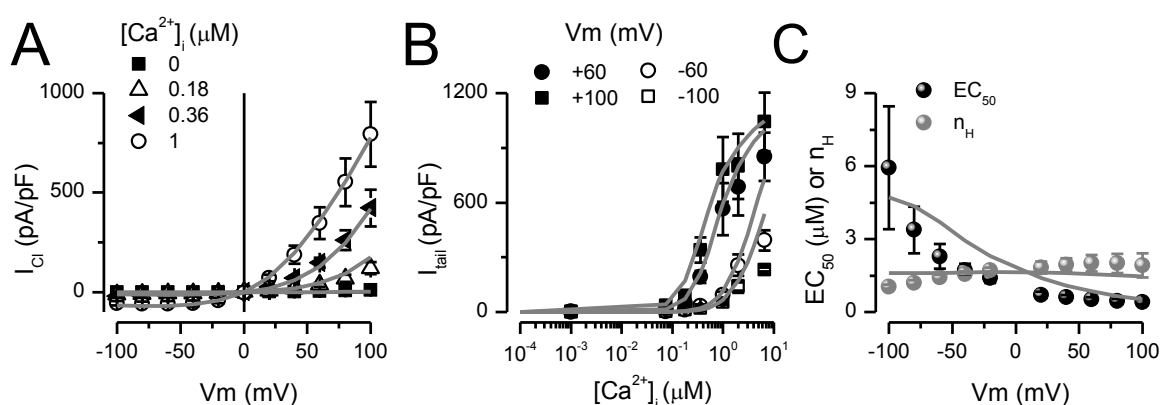


Figura 22. El modelo de 12 estados reproduce las propiedades clásicas de activación de TMEM16A causadas por  $V_m$  y  $[Ca^{2+}]_i$ . (A) Comparación directa entre los valores obtenidos del modelo (líneas continuas color gris) vs los datos obtenidos a partir de los experimentos (símbolos). (A) Relaciones Densidad de Corriente vs  $V_m$  para la  $[Ca^{2+}]_i$  indicada. (B) Densidad de corriente como función de  $[Ca^{2+}]_i$  (en escala logarítmica) para el  $V_m$  indicado. (C)  $EC_{50}$  vs  $V_m$ .  $R^2=0.98$  para el ajuste simultáneo. La Tabla 3 enlista los valores de cada parámetro de las frecuencias de transición y los pesos de los parámetros  $h$ ,  $H$ ,  $l$ ,  $L$ ,  $m$  y  $M$  que resultaron del ajuste global y que fueron usados para reproducir los datos mostrados en esta figura. Tomada de Contreras-Vite JA *et al.*, 2016.

A			
Frecuencia de transición	Expresión	Parametro	Valor del parametro a 0 mV
$\alpha_1$	$\alpha_{1,0} e^{\frac{z_\alpha F V_m}{RT}}$	$\alpha_{1,0}$ ( $s^{-1}$ )	0.0077 (0.00803±0.00064)
		$z_\alpha$	0 (0±0)
$\beta_1$	$\beta_{1,0} e^{\frac{-z_\beta F V_m}{RT}}$	$\beta_{1,0}$ ( $s^{-1}$ )	917.1288 (875.07±51.77)
		$z_\beta$	0.0064 (0.01133±0.0021)

$k_{O1}$	$k_{O1,0}e^{\frac{z_1FVm}{RT}}$	$k_{O1,0}(s^{-1} \mu M^{-1})$	597.9439 (583.58±14.41)
		$z_1$	0 (0±0)
$k_{O2}$	$k_{O2,0}e^{\frac{-z_2FVm}{RT}}$	$k_{O2,0} (s^{-1})$	2.8530 (2.8547±0.0189)
		$z_2$	0.1684 (0.166±0.00118)
$\alpha_{Cu}$	$k_{1,0}e^{\frac{z_{11}FVm}{RT}}$	$k_{1,0} (s^{-1})$	1.8872 (1.9349±0.0708)
		$z_{11}$	0.1111 (0.1141±0.00403)
$\beta_{Cu}$	$k_{2,0}e^{\frac{-z_{12}FVm}{RT}}$	$k_{2,0} (s^{-1})$	5955.783 (5769.96±207.83)
		$z_{12}$	0.3291 (0.3272±0.00346)
$k_{CCl1}$	$k_{+Cl,0}e^{\frac{z_{+Cl}FVm}{RT}}$	$k_{+Cl,0}(s^{-1} mM^{-1})$	$1.143 \times 10^{-6}$ ( $1.14 \times 10^{-6} \pm 9.17 \times 10^{-8}$ )
		$z_{+Cl}$	0.1986 (0.2112±0.0238)
$k_{CCl2}$	$k_{-Cl,0}e^{\frac{-z_{-Cl}FVm}{RT}}$	$k_{-Cl,0} (s^{-1})$	0.0009 ( $8.52 \times 10^{-4} \pm 1.28 \times 10^{-5}$ )
		$z_{-Cl,0}$	0.0427 (0.04847±0.0098)
$k_{OCu}$	$k_{+Ol,0}e^{\frac{z_{+Ol}FVm}{RT}}$	$k_{+Ol,0} (s^{-1} M^{-1})$	1.1947 (1.1495±0.0459)
		$z_{+Ol}$	0.6485 (0.65±0.0026)
$k_{OCl2}$	$k_{-Ol,0}e^{\frac{-z_{-Ol}FVm}{RT}}$	$k_{-Ol,0}$	3.4987 (3.443±0.1096)
		$z_{-Ol}$	0.0300 (0.0308±0.00054)
<b>B</b>			
$\alpha_2 = l\alpha_1$	$\alpha_3 = l^2\alpha_1$	$\beta_2 = L\beta_1$	$\beta_3 = L^2\beta_1$
$k_{CCl3} = hk_{CCl1}$	$k_{CCl5} = h^2k_{CCl1}$	$k_{CCl4} = Hk_{CCl2}$	$k_{CCl6} = H^2k_{CCl2}$

$k_{OC13} = mk_{OC11}$	$k_{OC15} = m^2k_{OC11}$	$k_{OC14} = Mk_{OC12}$	$k_{OC16} = M^2k_{OC12}$	
$k_{C1C1} = \frac{h}{H}k_{O1}$	$k_{C2C1} = \frac{l}{L}k_{O2}$	$k_{O1C1} = \frac{m}{M}k_{O1}$	$k_{O2C1} = k_{O2}$	
$\alpha_{C12} = \frac{Hml}{M}\alpha_{C11}$	$\alpha_{C13} = \frac{Hml^2}{M^2}\alpha_{C11}$	$\beta_{C12} = hL\beta_{C11}$	$\beta_{C13} = (hL)^2\beta_{C11}$	
$k_{C1} = k_{O1}$	$k_{C2} = \frac{l}{L}k_{O2}$	$l = 41.6411$ (42.04±1.7)	$m = 0.0102$ (0.010±0.00023)	$h = 0.3367$ (0.342±0.018)
		$L = 0.1284$ (0.134±0.004)	$M = 0.0632$ (0.064±0.001)	$H = 14.2956$ (14.2±0.70)

Tabla 3. Valores de cada parámetro de las frecuencias de transición asociados al modelo de 12 estados y obtenidos del ajuste global a los datos experimentales de la activación de TMEM16A. Los valores listados se obtuvieron al ajustar el modelo de 12 estados a los datos promedio de TMEM16A. Tabla de valores tomada de Contreras-Vite JA *et al.*, 2016.

# Capítulo 8. Predicciones del modelo de 12 estados.

---

## 8.I Los cambios en $[Cl^-]_e$ no regulan la sensibilidad por $Ca^{2+}$ de TMEM16A.

Ha sido mostrado que aniones más permeantes que el  $Cl^-$  modifican las propiedades de apertura y cierre de los CaCCs (Perez-Cornejo *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2011; Betto *et al.*, 2014). Por ejemplo el  $SCN^-$  acelera el tiempo de apertura y hace más lento el cierre de los canales. Betto *et al.*, 2014 encontraron que en TMEM16B (Ano2), los aniones más permeantes que el  $Cl^-$  no solo modificaban las propiedades de apertura y cierre de estos canales, sino además, encontraron cambios en su  $EC_{50}$ , lo cual significa que aniones como el  $SCN^-$  modifican la sensibilidad por  $Ca^{2+}$  en los canales TMEM16B. Ya que nuestro modelo de 12 estados describe correctamente las propiedades de activación de TMEM16A causada por el acoplamiento de  $V_m$ , cambios en  $[Ca^{2+}]_i$  y cambios en  $[Cl^-]_e$ , decidimos evaluar la sensibilidad a  $Ca^{2+}$  de TMEM16A a través de la  $EC_{50}$  pero ante un cambio en  $[Cl^-]_e$  de un valor de 30 a 140 mM. Encontramos que el modelo pronosticó que para -60 mV, los valores de  $EC_{50}$  estimados fueron de 3.1  $\mu M$  ( $[Cl^-]_e=30$  mM) y 3.5  $\mu M$  ( $[Cl^-]_e=140$  mM), mientras que a +60 mV se obtuvieron valores de  $EC_{50}$  de 0.95  $\mu M$  ( $[Cl^-]_e=30$  mM) y 0.85  $\mu M$  ( $[Cl^-]_e=140$  mM). Con esta información decidimos verificar experimentalmente si las predicciones del modelo eran correctas. Para llevar a cabo esto, el grupo del Dr. Jorge Arreola realizo experimentos de perfusión rápida. En la Figura 23 se muestran trazos representativos de la  $I_{Cl}$  registrada en la configuración “inside-out” sobre parches escindidos expuestos a soluciones que contenían  $[Cl^-]_e=140$  mM (A) y  $[Cl^-]_e=30$  mM (B) sujetos a un voltaje de mantenimiento de  $\pm 60$  mV mientras la  $[Ca^{2+}]_i$  fue cambiada entre cero y los valores indicados. Con base a los trazos de la  $I_{Cl}$  fueron construidas las curvas dosis-respuesta mostradas en el panel C. Las líneas continuas sobrepuestas a los datos (símbolos) corresponden a las predicciones hechas por el modelo de 12 estados. Como se



puede observar, las predicciones del modelo caen prácticamente sobre los datos obtenidos a partir de los experimentos. Al realizar un ajuste con la ecuación de *Hill* (no mostrado para mayor claridad) a los datos obtenidos experimentalmente, se determinaron los valores de la  $EC_{50}$ , los cuales son mostrados en la Figura 23-D junto a aquellos valores que el modelo pronosticó (líneas continuas). Es posible ver que para  $V_m$  negativo el pronostico se desvía un poco respecto a los valores calculado a a partir de los experimentos, por ejemplo, a -60 mV y para la condición  $[Cl^-]_e=30$  mM, la  $EC_{50}$  tuvo un valor de  $2.7 \pm 0.29$   $\mu$ M comparado con 3.1  $\mu$ M que predice el modelo, mientras que para a +60 mV los valores son más próximos entre sí, donde la  $EC_{50}$  fue de  $0.85 \pm 0.7$   $\mu$ M y 0.95  $\mu$ M para el dato experimental y modelo, respectivamente.

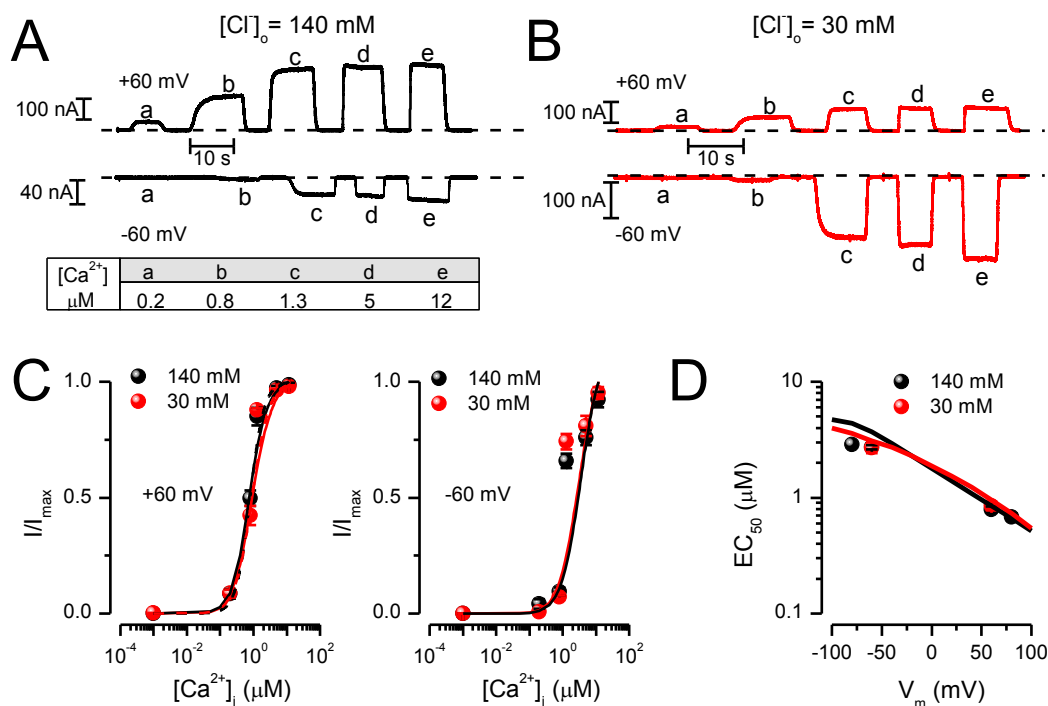


Figura 23. Efecto sobre la sensibilidad con  $Ca^{2+}$  de TMEM16A causada por cambios en la  $[Cl^-]_e$ . (A-B) Registros característicos de la  $I_{Cl}$  obtenida en la configuración "inside-out" sobre parches escindidos expuestos a soluciones que contenían  $[Cl^-]_e=140$  mM y  $[Cl^-]_e=30$  mM sujetos a un voltaje de mantenimiento de  $\pm 60$  mV mientras la  $[Ca^{2+}]_i$  fue cambiada entre cero y los valores indicados en el recuadro al pie de los registros. (C) Curvas dosis-respuesta obtenidas a partir de los registros mostrados en A y B. Los símbolos representan los valores experimentales y las líneas continuas son las predicciones del modelo de 12 estados. (D) Valores de la  $EC_{50}$  estimados a partir de los experimentos (símbolos) comparados directamente con aquellos valores estimados a partir del modelo de 12 estados (líneas solidas). Los valores de la  $EC_{50}$  fueron calculados mediante el ajuste de la ecuación de *Hill* (no mostrado) a los datos que aparecen en C. Figura tomada de Contreras-Vite JA *et al.*, 2016.

# Capítulo 9. Rutas de activación de TMEM16A.

---

## 9.I Activación dependiente de $V_m$ en ausencia de $Ca^{2+}$ intracelular

Como se ha señalado anteriormente, la activación de TMEM16A por efectos de  $V_m$  en ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular (ver Figura 6-A y 15-A) encierra interesantes aspectos relacionados con la posibilidad de que exista de un sensor intrínseco de voltaje o un mecanismo desconocido que sea el responsable de conferir la dependencia con  $V_m$  a TMEM16A. La evidencia experimental sugiere que en TMEM16A no existe complejo molecular responsable de la dependencia con  $V_m$  del canal, lo cual deja abierta la opción de que dicho procesos sea llevado a cabo de distinta manera. A este respecto, el modelo de 12 estados es capaz de proveer de una alternativa. El mecanismo de apertura y cierre para esta condición estaría descrito por los estados C, O,  $C_{Cl}$  y  $c_{Cl}O$ . Al resolver las Ecuaciones diferenciales A3, A4, A11 y A12 (véase Apéndice), evaluamos la dependencia temporal de la probabilidad de ocupación de los estados C, O,  $C_{Cl}$  y  $c_{Cl}O$ , y así poder determinar la ruta o rutas de activación seguida por los canales. La Figura 24 muestra las probabilidades de ocupación  $P_C$ ,  $P_O$ ,  $P_{C_{Cl}}$  y  $P_{c_{Cl}O}$  calculadas para las condiciones de  $[Cl^-]_e = 30$  mM (color rojo), 140 mM (color negro),  $[Cl^-]_i = 40$  mM, para un estímulo de prueba  $V_m = +120$  mV con duración de 1 s. Las gráficas de la Figura 24 muestran que la dependencia temporal de  $P_C$  y  $P_{C_{Cl}}$  se comportan de un modo que es prácticamente constante, alcanzando valores de 0.782 y 0.217, respectivamente. En tanto que  $P_{c_{Cl}O}$  parte de un valor de 0 cuando el  $V_m = -100$  mV y cambia ante la aplicación del pulso de  $V_m$  de +120 mV a un valor de 0.0008, el cual se mantiene hasta la repolarización a -100 mV donde nuevamente cae a 0. Por su parte,  $P_O$  mantiene un valor que es siempre 0 a cualquier voltaje. Cuando se redujo la concentración de  $Cl^-$  extracelular a un valor de 30 mM, el curso temporal de las probabilidades se preserva, no obstante, se observó que  $P_C$  se incrementó a un valor de 0.941, mientras que  $P_{C_{Cl}}$  y  $P_{c_{Cl}O}$  cayeron a valores de 0.057 y 0.0002, respectivamente. Estos resultados muestran que el modelo establece que en ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular, la activación de TMEM16A estará determinada fundamentalmente por la ocupación del estado  $c_{Cl}O$  por parte de canales

que previamente ocuparon el estado  $C_{Cl}$ . Entonces, podemos establecer que la ruta de activación más probable de TMEM16A bajo condiciones de cero  $Ca^{2+}$  está dada por  $C \rightarrow C_{Cl} \rightarrow O_{Cl}$  como es indicado por las flechas color negro (140 mM) y rojo (30 mM) sobre el esquema del centro en la Figura 24.

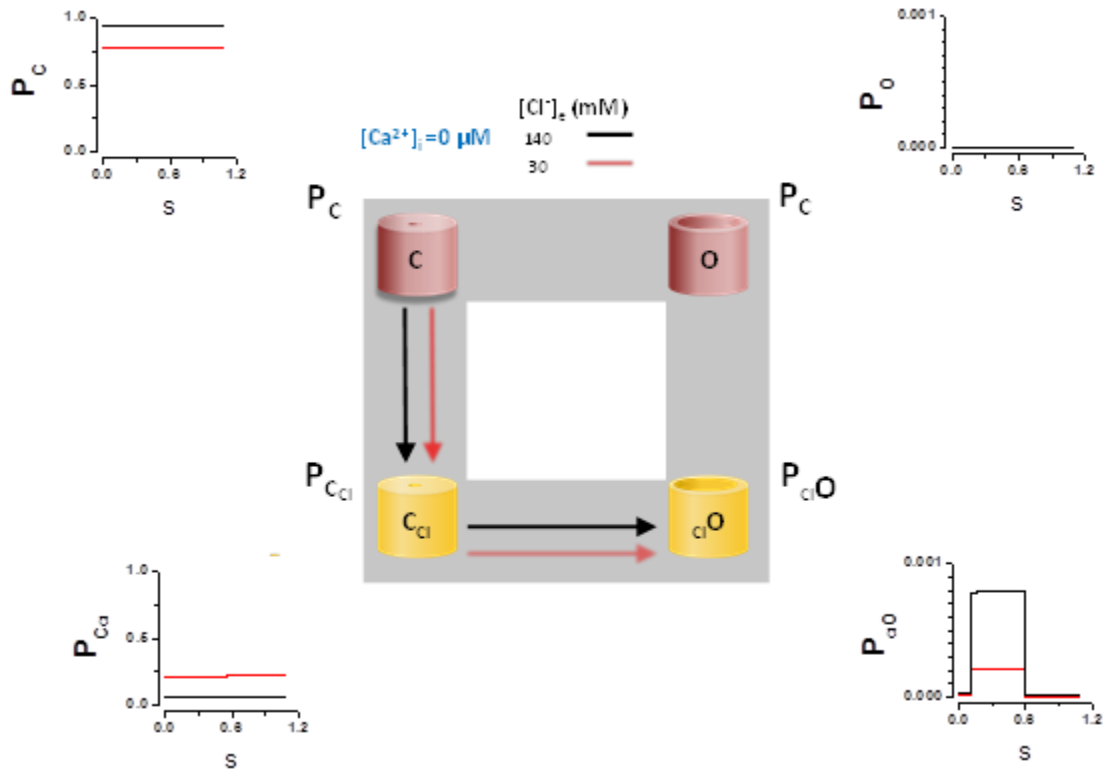


Figura 24. Activación de TMEM16A dependiente de  $V_m$  y en ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular. Probabilidad de ocupación como función del tiempo para los estados C,  $C_{Cl}$ , O y  $C_{Cl}O$ . Las probabilidades de ocupación de los estados  $P_C$ ,  $P_O$ ,  $P_{C_{Cl}}$  y  $P_{C_{Cl}O}$  fueron calculadas para  $[Cl^-]_e=30$  y 140 mM,  $[Cl^-]_i=40$  mM y  $[Ca^{2+}]_i=0$  usando un protocolo de escalones de  $V_m$  mostrado en la parte superior del panel. Cuando se calcularon las probabilidades de ocupación de los estados C, O,  $C_{Cl}$  y  $C_{Cl}O$  para la condición de 140 mM de  $Cl^-$  extracelular, sus valores fueron de 0.782, 0, 0.217 y 0.0008, respectivamente. Al reducir la concentración de  $Cl^-$  extracelular a un valor de 30 mM, se observó que  $P_C$  se incrementó a un valor de 0.941, mientras que  $P_{C_{Cl}}$  y  $P_{C_{Cl}O}$  cayeron a valores de 0.057 y 0.0002, respectivamente. Lo anterior aunado con el hecho de que  $P_O$  para el estado O siempre es cero demuestra que el modelo predice que para lograr la activación de TMEM16A bajo condiciones de cero  $Ca^{2+}$ , es necesario que los iones de  $Cl^-$  se unan en algún dominio específico del canal. Asimismo, podemos establecer que la ruta de activación más probable de TMEM16A bajo condiciones de cero  $Ca^{2+}$ , está dada por  $C \rightarrow C_{Cl} \rightarrow O_{Cl}$  como es mostrado por las flechas color negro (140 mM) y rojo (30 mM) sobre el esquema del centro.

## 9.II Activación dependiente de $V_m$ y en presencia de $Ca^{2+}$ intracelular

Para elucidar el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A en presencia de  $Ca^{2+}$  intracelular, realizamos nuevamente el ejercicio de calcular el curso temporal de la probabilidad de ocupación de los 12 estados del modelo. Calculamos las probabilidades para las siguientes condiciones experimentales:  $[Cl^-]_e = 30$  mM,  $140$  mM  $[Cl^-]_i = 40$  mM,  $[Ca^{2+}]_i = 0.2$   $\mu$ M, y un pulso de  $20$  s a  $+120$  mV seguido de una repolarización a  $-60$  mV. Estas condiciones son similares a aquellas de los datos experimentales mostrados en la Figura 9. Estas condiciones representan un caso general, pues el pulso largo contiene a los pulsos de corta duración que comúnmente son usados en los reportes de la literatura científica para evaluar las propiedades de activaciones de estos canales iónicos. En la Figura 25- se muestra la dependencia temporal de la probabilidad de ocupación para los diferentes estados del modelo para  $[Cl^-]_e = 140$  o  $30$  mM. Los estados cuyo curso temporal de su la probabilidad de ocupación fue más sensible ante el cambio de  $[Cl^-]_e$  fueron C,  $C_{Cl}$ ,  $C_{Ca}$ ,  $ClO_{Ca}$ ,  $C_{2Ca}$  y  $ClO_{2Ca}$ . Por ejemplo, al inicio del protocolo de voltaje cuando el valor de  $V_m = -60$  mV y bajo una condición de  $[Cl^-]_e = 140$  mM, la probabilidad de ocupación del estado C fue de  $0.65$ . Este fracción cae de manera monótona hasta un valor de  $0.12$  ante la aplicación de  $V_m = +120$  mV. Esto indica una desocupación paulatina del estado C a causa de la aplicación de voltaje positivo. Posteriormente, ante la repolarización a  $V_m = -60$  mV, la probabilidad de ocupación incrementa a  $0.20$  donde se mantiene el resto del tiempo de estímulo. Cuando la  $[Cl^-]_e$  se redujo a  $30$  mM, se puede apreciar que en la etapa inicial del protocolo de voltaje, la probabilidad de ocupación del estado C fue de  $0.79$ , lo cual representa un incremento de casi un  $15\%$  respecto a lo mostrado cuando  $[Cl^-]_e$  fue de  $140$  mM. Por su parte, la probabilidad de desocupación de C cuando el estímulo de voltaje se fijó a  $+120$  mV decreció gradualmente hasta  $0.35$  al final del pulso de voltaje. Esto representa prácticamente un  $30\%$  menos en relación a lo observado bajo la condición de  $[Cl^-]_e = 140$  mM. Asimismo, ante la repolarización de  $-60$  mV, la probabilidad de ocupación de este estado llego a ser de  $0.58$ , lo cual es casi un  $30\%$  más en relación a lo que ocurre con  $140$  mM. Importante es el hecho de que los estados  $O_{2Ca}$  y  $ClO_{2Ca}$  mostraron una notoria sensibilidad ante el cambio de  $[Cl^-]_e$  cuando se redujo de  $140$  a  $30$  mM. Para  $[Cl^-]_e = 140$  mM, la probabilidad de ocupación del estado  $_{2Ca}O$  llego a tener un valor de  $0.038$  a un

tiempo de aproximadamente 0.2 s y después decayó lentamente a un valor de 0.012. En contraste, el estado  ${}_{2Ca}O_{Cl}$  incremento en forma monótona alcanzando un valor máximo de 0.37 al final del estímulo positivo de voltaje con duración de 20 s. Cuando  $[Cl^-]_e$  se fijó a 30 mM, la probabilidad de ocupación del estado  ${}_{2Ca}O_{Cl}$  decreció considerablemente a un valor de 0.16, mientras que la del estado  ${}_{2Ca}O$  aumentó ligeramente a valores de 0.049 después de 0.2 s para después disminuir lentamente a 0.035. Estos cálculos muestran que el efecto del alto  $Cl^-$  externo es la de incrementar la probabilidad de ocupación del estado  ${}_{2Ca}O_{Cl}$ , lo cual da origen al comportamiento dual de activación, y cuando el  $Cl^-$  externo es bajo, el canal permanece la mayor parte del tiempo ocupando el estado  ${}_{2Ca}O$ .

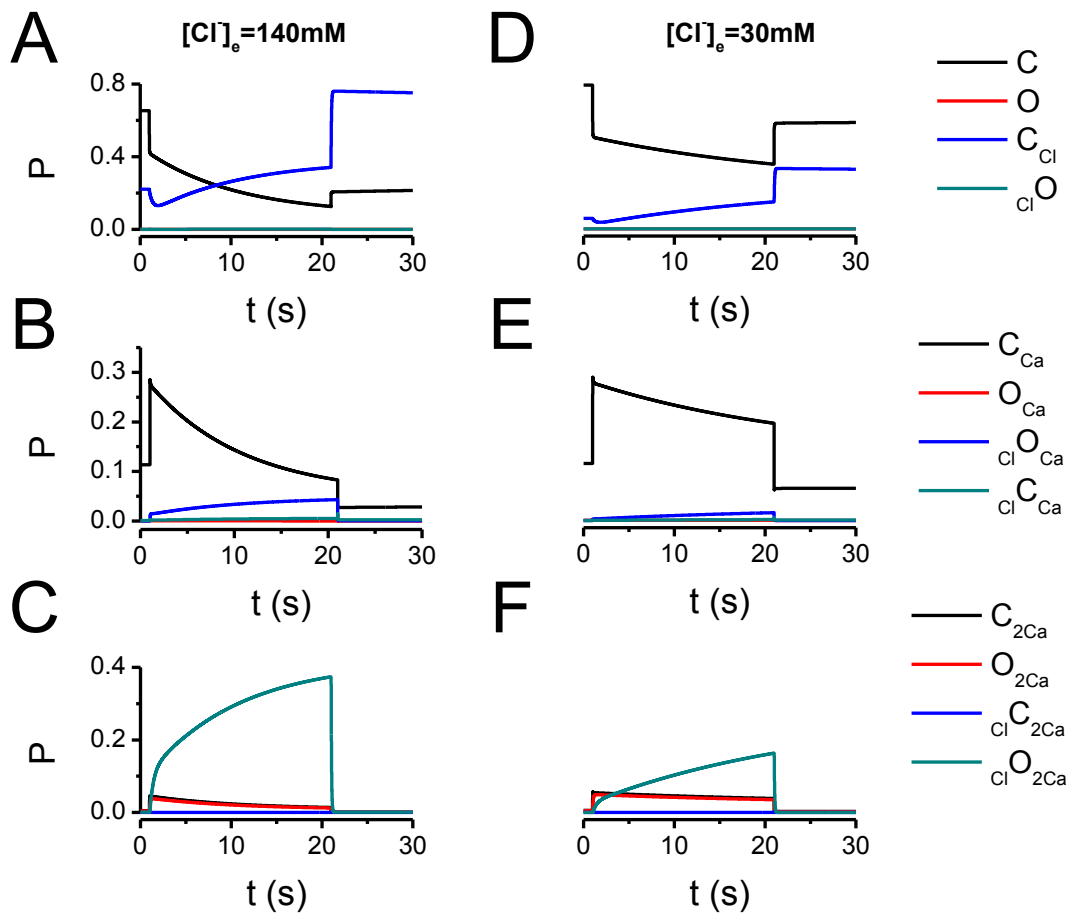


Figura 25. Activación de TMEM16A dependiente de  $V_m$  y en presencia de  $Ca^{2+}$  intracelular. Probabilidad de ocupación como función del tiempo para los 12 estados del modelo. Las probabilidad de ocupación de los estados fueron calculados para  $[Cl^-]_e=140$  mM (A-C) y  $[Cl^-]_e=30$  mM (D-F). Las ecuaciones diferenciales 1 a 12 (Apéndice) fueron integradas numéricamente y los cálculos se hicieron para las condiciones de  $[Ca^{2+}]_i = 0.2$   $\mu$ M, y pulsos de 20 s a +120 mV seguidos por una repolarización a -60 mV. Los estados cuyo curso temporal de su la probabilidad de ocupación fue más sensible ante el cambio de  $[Cl^-]_e$  fueron C,  $C_{Cl}$ ,  $C_{Ca}$ ,  $ClO_{Ca}$ ,  $C_{2Ca}$  y  $ClO_{2Ca}$ . Estos cálculos muestran que el efecto del alto  $Cl^-$  externo es la de incrementar la probabilidad de ocupación del estado  ${}_{2Ca}O_{Cl}$  (C, F), lo cual da origen al comportamiento dual de activación, y cuando el  $Cl^-$  externo es bajo, el canal permanece la mayor parte del tiempo ocupando el estado  $O_{2Ca}$ .

El cálculo de las probabilidades de ocupación de los distintos estados del modelo también nos ayuda a establecer las rutas más probables que sigue TMEM16A en su activación, como es ilustrado en el esquema de la Figura 26. El esquema muestra los diferentes estados que podría visitar en canal en su proceso de apertura. La dependencia temporal de la probabilidad de ocupación de los diferentes estados fue usado para establecer las rutas de activación más dominantes que se suceden. Particularmente, estamos interesados en conocer cómo llegan los canales a ocupar el estado  ${}_{2Ca}O_{Cl}$ . Nuestro análisis indica que ocurre a través de dos procesos; (1) Aquel determinado por la transición  $O_{2Ca} \rightleftharpoons {}_{Cl}O_{2Ca}$ , el cual es dominante para tiempos menores a 5 s. En este proceso, el mecanismo de activación dominante es aquel en el que ocurre primero la unión secuencial y regulada por el  $V_m$  de los dos iones de  $Ca^{2+}$  sobre el estado cerrado del canal. Una vez que se ha logrado la unión de los iones de  $Ca^{2+}$  ocurre la transición hacia el estado abierto, y finalmente en la configuración abierta inducida por  $V_m$  y  $Ca^{2+}$  ocurrirá la unión del ion de  $Cl^-$ , esto es, se sigue la ruta  $C \rightarrow C_{Ca} \rightarrow C_{2Ca} \rightarrow O_{2Ca} \rightarrow {}_{Cl}O_{2Ca}$  así es indicado por las flechas para las condiciones de  $[Cl^-]_e=140$  (flecha negra) y 30 mM (flecha roja) sobre el esquema de la Figura 24. (2) El otro proceso es dominante para tiempos mayores a 5 s y para éste, el mecanismo de activación está determinado por la unión del  $Cl^-$  sobre la configuración cerrada del canal, enseguida ocurre la unión del primer ion de  $Ca^{2+}$  sobre la misma configuración cerrada, en esta etapa ocurre la transición hacia el estado abierto y aquí finalmente ocurre la unión del segundo ion de  $Ca^{2+}$ , y todo el proceso es regulado por  $V_m$ . Este mecanismo está comprendido en la ruta de activación  $C_{Cl} \rightarrow {}_{Cl}C_{Ca} \rightarrow {}_{Cl}O_{Ca} \rightarrow {}_{Cl}O_{2Ca}$  como es indicado por las flechas para las condiciones de  $[Cl^-]_e=140$  (flecha rosa) y 30 mM (flecha gris).

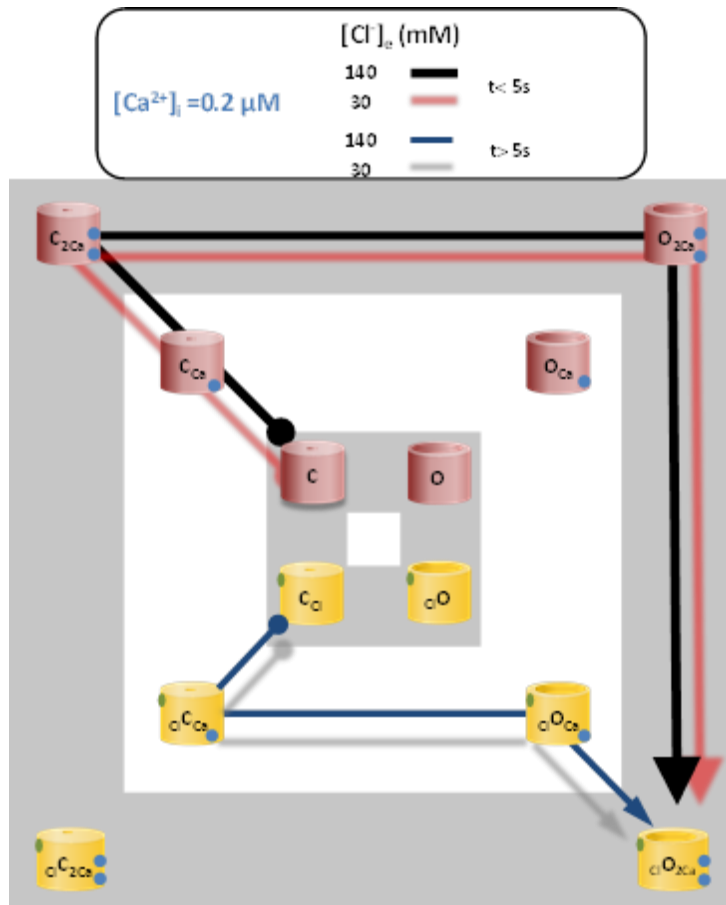


Figura 26. Rutas de activación para TMEM16A. El esquema muestra los diferentes estados que podría visitar en canal en su proceso de apertura. La dependencia temporal de la probabilidad de ocupación de los diferentes estados fue usada para establecer las rutas de activación más dominantes. Un aspecto importante que deriva del análisis de ocupación de los estados del modelo es el relativo a la ocupación del estado  ${}_{2Ca}O_{Cl}$  lo cual ocurre a través de dos procesos. (1) El determinado por la transición  $O_{2Ca} \rightleftharpoons {}_{Cl}O_{2Ca}$ , el cual es dominante para tiempos menores a 5 s. En este proceso, el mecanismo de activación dominante es aquel en el que ocurre primero la unión secuencial y regulada por el  $V_m$  de los dos iones de  $Ca^{2+}$  sobre el estado cerrado del canal. Una vez que se ha logrado la unión de los iones de  $Ca^{2+}$  ocurre la transición hacia el estado abierto, y finalmente en la configuración abierta inducida por  $V_m$  y  $Ca^{2+}$  ocurrirá la unión del ion de  $Cl^-$ , esto es, se sigue la ruta  $C \rightarrow C_{Ca} \rightarrow C_{2Ca} \rightarrow O_{2Ca} \rightarrow {}_{Cl}O_{2Ca}$  como se indica por las flechas para las condiciones de  $[Cl^-]_e$  indicadas. (2) El otro proceso es dominante para tiempos mayores a 5 s y para éste, el mecanismo de activación está determinado por la unión del  $Cl^-$  sobre la configuración cerrada del canal, enseguida ocurre la unión del primer ion de  $Ca^{2+}$  sobre la misma configuración cerrada, en esta etapa ocurre la transición hacia el estado abierto y aquí finalmente ocurre la unión del segundo ion de  $Ca^{2+}$ , y todo el proceso es regulado por  $V_m$ . Este mecanismo está comprendido en la ruta de activación  $C_{Cl} \rightarrow {}_{Cl}C_{Ca} \rightarrow {}_{Cl}O_{Ca} \rightarrow {}_{Cl}O_{2Ca}$ .

# Capítulo 10. Discusión

---

Varios modelos cinéticos se han propuesto previamente para explicar la dependencia con  $V_m$  y  $Ca^{2+}$  de la apertura y cierre de los CaCCs. Sin embargo, estos modelos incluyeron reacciones del tipo  $C \rightleftharpoons C_{Ca}$  que son dependientes del  $Ca^{2+}$ , las cuales ocurren antes de la apertura del canal sin considerar una transición  $C \rightleftharpoons O$  en ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular y tampoco el papel del  $Cl^-$  externo. Así, este tipo de modelos predicen que la probabilidad de apertura será siempre igual a cero para cualquier  $V_m$  cuando  $[Ca^{2+}]_i = 0 \mu M$ . Esto no es el caso de acuerdo a evidencia experimental y debe de tomarse en cuenta para explicar el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A en ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular. En este trabajo, proponemos un modelo de estados discretos de Markov alternativo que considera la dependencia de  $V_m$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$  sobre el mecanismo de apertura y cierre del canal. Nuestro modelo propone que a cualquier  $V_m$ , TMEM16A transita entre los estados C y O en ausencia de  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$ . Posteriormente, un mínimo de dos iones de  $Ca^{2+}$  se unen directamente a los estados C y O en un modo dependiente del  $V_m$  seguido por la interacción de un ion externo de  $Cl^-$  para que la apertura y cierre ocurra. O de manera alternativa, un ion externo de  $Cl^-$  podría unirse a C y O seguido de la unión secuencial dependiente del  $V_m$  de dos iones de  $Ca^{2+}$ . Cualquiera de los dos procesos conduce al modelo de 12 estados, como se muestra en la Figura 19. Este modelo considera que durante la apertura y cierre, el canal puede visitar hasta doce estados conformacionales. Las transiciones entre los estados son dependientes del  $V_m$ , del  $Ca^{2+}$  y del  $Cl^-$ . La dependencia con el  $V_m$  se ha incluido de forma convencional, esto es, usando frecuencias de transición que son funciones exponenciales del  $V_m$  tal como fue descrito por Eyring.

Este modelo no es perfecto, por simplicidad asumimos que el  $Ca^{2+}$  se une a dos sitios en cualquiera de las dos conformaciones cerrada (C) o abierta (O) y que la afinidad individual por cada sitio será la misma. Esto podría no ser el caso, como lo sugieren mutaciones localizadas en diferentes partes de la proteína que alteran su sensibilidad por el  $Ca^{2+}$  (Ferrera *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012; Tien *et al.*, 2014). Faltan refinamientos del modelo tales como, la inclusión correcta del número de sitios de unión a  $Ca^{2+}$  y sus correspondientes afinidades combinadas con interacciones alostéricas de



procesos dependientes de  $V_m$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$  así como datos estructurales. El hecho de contar con un modelo nos permite explicar cómo las tres variables responsables de la apertura y cierre del canal interactúan para lograr que el canal llegue al estado abierto. A continuación se discuten estos aspectos.

## 10.I Dependencia con el $V_m$

Un elemento importante para entender el mecanismo de apertura y cierre del canal, es descubrir su fuente de dependencia con el  $V_m$ . Hasta ahora no hay evidencia de la presencia de corrientes generadas por algún sensor intrínseco de voltaje, esto sugeriría que la dependencia con  $V_m$  podría estar conferida de un modo distinto al que se ha reportado en canales de  $K^+$ ,  $Na^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ . En estos casos está demostrado que el sensor intrínseco de  $V_m$  es el responsable de la sensibilidad al potencial eléctrico. En la construcción del modelo de 12 estados, la activación causada solo por  $V_m$  y en ausencia de  $Ca^{2+}$  fue contemplada en el ciclo  $C \rightleftharpoons O \rightleftharpoons C_{Cl} \rightleftharpoons c_{Cl}O$ . Muy interesante fue que el ajuste global de todos los datos incluidos en el modelo revelaron que es el ion  $Cl^-$  el que podría generar la respuesta dependiente del  $V_m$  al unirse a un dominio específico del canal y así propiciar su apertura. Esto lo muestra el análisis de las probabilidades de ocupación de los diferentes estados que el canal o canales podrían visitar como lo muestra la Figura 24. En otros canales de  $Cl^-$ , tal como en el CIC-0 y el CIC-2 se ha propuesto que su dependencia con el  $V_m$  es conferida por el mismo anión permeante (Push *et al.*, 1995; Chen & Miller, 1996; Engh *et al.*, 2007; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010), esto podría ser también el caso del canal de  $Cl^-$  TMEM16A como lo sugieren nuestros resultados.

## 10.II Unión del $Ca^{2+}$ .

Debido a las dificultades en identificar a lo de sitios de unión para el  $Ca^{2+}$  aunado con la existencia de sitios intrínsecos de unión a calmodulina (CAM) sobre la secuencia de

TMEM16A, lo cual llevo a contemplar la posibilidad de que la sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  de TMEM16A estuviera conferida de manera extrínseca por CAM (Tian *et al.*, 2011; Vocke *et al.*, 2013). Empero, fue demostrado que para canales TMEM16A para los cuales fueron mutados los sitios de unión a CAM, las corrientes generadas por estos canales mutantes no sufrieron cambios. Por otra parte, mediante experimentos de mutagénesis se ha logrado identificar a varios aminoácidos que son muy importantes en el sensado del  $\text{Ca}^{2+}$  (Yu *et al.*, 2012; Tien *et al.*, 2014), además, de que recientemente la estructura cristalográfica de la escramblasa nhTMEM16, miembro de la familia de proteínas TMEM16, reveló la existencia de un sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  en cada una de sus dos subunidades (Brunner *et al.*, 2014). Aunque las funciones de la escramblasa son muy distintas a la de los canales iónicos de la familia, la región donde se encuentran los posibles sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  está altamente conservada entre los miembros de la familia. Todos estos elementos apoyan el hecho de que el sensado por el  $\text{Ca}^{2+}$  en TMEM16A se lleva a cabo por la unión directa del  $\text{Ca}^{2+}$  a tales sitios. En acuerdo con estas bases experimentales, el mecanismo de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  propuesto por nuestro modelo de 12 estados considera que se necesita la unión secuencial y directa de dos iones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el canal para propiciar su respuesta. Basados en experimentos de perfusión rápida de  $\text{Ca}^{2+}$  para los cuales las constantes de tiempo de activación y desactivación fueron independiente y dependiente de  $V_m$ , respectivamente, el modelo de 12 estados establece que la unión o asociación del  $\text{Ca}^{2+}$ , la cual está controlada por las frecuencias de transición  $[\text{Ca}^{2+}]_i k_{C1}$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_i k_{O1}$  es un proceso que no depende del  $V_m$ . Por otro lado la disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  esta dictado por las frecuencias de transición  $k_{C2}$  y  $k_{O2}$  que son dependientes de  $V_m$ . La constante de velocidad de cierre, de acuerdo al modelo, pronostica que el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular permanecerá unido al canal a voltajes positivos. Esto está de acuerdo con los datos experimentales obtenidos del lavado rápido del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Xiao *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012). Estos datos muestran que a voltajes positivos de membrana, el curso temporal de la disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  es un proceso muy lento. Además, a medida que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  incrementa, el cierre del canal se vuelve más lento a  $V_m$  negativos (Arreola *et al.*, 1996; Kuruma & Hartzell, 2000; Xiao *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012), sugiriendo que el estado abierto seria estabilizado cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  es muy alto.

### 10.III El efecto del $\text{Cl}^-$ extracelular.

**Cambio en la sensibilidad por  $\text{Ca}^{2+}$  del canal.** Se ha demostrado en TMEM16B (ANO2) que la presencia de aniones más permeantes que el  $\text{Cl}^-$  modifica la sensibilidad por  $\text{Ca}^{2+}$  en este canal. Por ejemplo, al cambiar el  $\text{Cl}^-$  por  $\text{SCN}^-$ , el valor de la  $\text{EC}_{50}$  a  $\pm 100$  mV se redujo aproximadamente 2 veces en ambas condiciones de voltaje. Una hipótesis sugerida por *Betto* y colaboradores para explicar sus resultados es que el  $\text{SCN}^-$  podría unirse con mayor afinidad que el  $\text{Cl}^-$  a un sitio de unión dentro o fuera del poro y así modular el mecanismo de apertura y cierre del canal de una manera alostérica. En este trabajo evaluamos si el cambio de la  $[\text{Cl}^-]_e$  modificaba la sensibilidad por  $\text{Ca}^{2+}$  de TMEM16A, de tal forma que su  $\text{EC}_{50}$  se modificará ante variaciones de la  $[\text{Cl}^-]_e$ . Los datos experimentales indicaron que cuando se cambió la  $[\text{Cl}^-]_e$  de un valor de 30 a 140 mM, la  $\text{EC}_{50}$  no mostró cambios significativos bajo variaciones en  $[\text{Cl}^-]_e$  cuando se evaluó para las condiciones de  $\pm 60$  mV. Esto significa que la sensibilidad por  $\text{Ca}^{2+}$  de TMEM16A no es afectada por los cambios en  $[\text{Cl}^-]_e$ .

### 10.IV Estabilización del estado abierto y mecanismo dual de activación.

Basados en el cálculo de la probabilidad de ocupación de cada estado del modelo de 12 estados, se encontró que el incremento del  $\text{Cl}^-$  externo de 30 a 140 mM aumentó la ocupación del estado  ${}_{2\text{Ca}}\text{O}_{\text{Cl}}$  implicando que el canal permanece más tiempo en este estado. De hecho al aumentar la  $[\text{Cl}^-]_e$  de 30 a 140 mM, la probabilidad de ocupación de los estados  ${}_{2\text{Ca}}\text{O}_{\text{Cl}} + {}_{2\text{Ca}}\text{O}$  aumento de 0.21 a 0.39, lo cual implica en que el canal permanece más tiempo con  $\text{Ca}^{2+}$  unido. Esto implica que la apertura y cierre lento observado con largas despolarizaciones en células bañadas en un medio que contenía alto externo  $\text{Cl}^-$  se debe a la ocupación paulatina del estado  ${}_{2\text{Ca}}\text{O}_{\text{Cl}}$ . Importante es señalar que la ocupación del estado  ${}_{2\text{Ca}}\text{O}_{\text{Cl}}$  ocurre a través de dos procesos, aquel determinado por la transición  $\text{O}_{2\text{Ca}} \rightleftharpoons \text{ClO}_{2\text{Ca}}$ , el cual es dominante para tiempos menores a 5 s. En este proceso, el mecanismo de activación dominante es aquel en el que ocurre primero la unión secuencial y regulada por el  $V_m$  de los dos iones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el estado cerrado del canal. Una vez que se ha logrado la unión de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  ocurre la transición hacia el estado abierto, y finalmente en la

configuración abierta inducida por  $V_m$  y  $Ca^{2+}$  ocurrirá la unión del ion de  $Cl^-$ , esto es, se sigue la ruta  $C \rightarrow C_{Ca} \rightarrow C_{2Ca} \rightarrow O_{2Ca} \rightarrow ClO_{2Ca}$  como se indica por las flechas sobre el esquema de la Figura 26. El otro proceso es dominante para tiempos mayores a 5 s y para éste, el mecanismo de activación está determinado por la unión del  $Cl^-$  sobre la configuración cerrada del canal, enseguida ocurre la unión del primer ion de  $Ca^{2+}$  sobre la misma configuración cerrada, en esta etapa ocurre la transición hacia el estado abierto y aquí finalmente ocurre la unión del segundo ion de  $Ca^{2+}$ , y todo el proceso es regulado por  $V_m$ . Este mecanismo está comprendido en la ruta de activación  $C_{Cl} \rightarrow ClC_{Ca} \rightarrow ClO_{Ca} \rightarrow ClO_{2Ca}$ .

A pesar de que el modelo de 12 estados es capaz de reproducir correctamente las propiedades de activación de TMEM16A a causa de cambios en  $V_m$ ,  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Cl^-]_e$ , presenta algunas limitaciones tales como el comportamiento de la  $EC_{50}$  como función del  $V_m$  para los valores más negativos de  $V_m$  (ver Figura ), así como también la cinética de activación del canal para condiciones de  $[Cl^-]_e=30$  mM (ver Figura ). Una posibilidad para explicar estas limitaciones se encuentra en las frecuencias de transición, las cuales hemos asumido con dependencias en  $V_m$  y las concentraciones de iones relativamente simples. Por ejemplo, las concentraciones de  $Cl^-$  extracelular varían linealmente, esto podría no ser el caso para condiciones bajas de  $Cl^-$ . Asimismo, los factores de peso  $l$ ,  $L$ ,  $h$ ,  $H$ ,  $m$ , y  $M$  se han considerado constantes, lo cual en general podría no ser así. No obstante, al ser estos factores los encargados de establecer las interacciones alostericas se requiere de mayor información estructural de canal que nos permita establecer el origen de dichas interacciones. Finalmente, el modelo contempla el papel de un solo ion sobre los efectos de apertura y cierre del canal, sin embargo, se sabe de la existencia de al menos dos sitios de unión para aniones dentro del poro de TMEM16A, por lo que podría haber al menos dos iones más que podrían estar regulando mecanismo de apertura y cierre de estos canales a través del proceso de permeación.

# Capítulo 11. Conclusiones

---

En este trabajo proponemos que las propiedades de activación del canal de cloruro activado por calcio intracelular TMEM16A causadas por el acoplamiento de  $V_m$ , cambios en  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Cl^-]_e$  se pueden describir por un modelo cinético de 12 estados. Este modelo establece que para que TMEM16A logre su apertura, se requiere de la unión directa, secuencial y modulada por el  $V_m$  de dos iones de  $Ca^{2+}$ , y que el efecto del  $Cl^-$  desde el lado extracelular sobre activación de TMEM16A es la de favorecer la configuración abierta del canal lograda por la unión directa de los iones de  $Ca^{2+}$ . El modelo de 12 estados, además de reproducir las propiedades básicas de activación de TMEM16A clásicas causadas por el acoplamiento de  $V_m$ , cambios en  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Cl^-]_e$ , es capaz de explicar el mecanismo de activación dual generado por el efecto conjunto de aplicaciones de voltaje de larga duración y altas  $[Cl^-]_e$ . De acuerdo a nuestro modelo, el mecanismo de activación dual es debido a la ocupación paulatina del estado conformacional  $_{Cl}O_{2Ca}$  durante la transición  $O_{2Ca} \rightleftharpoons _{Cl}O_{2Ca}$  para  $t < 5$  s y a través de la transición  $_{Cl}O_{Ca} \rightleftharpoons _{Cl}O_{2Ca}$  para  $t > 5$  s. Así, el modelo de 12 estados establece que en la activación de TMEM16A para escalas de tiempo cortas, ocurre primero la asociación de los iones de  $Ca^{2+}$  seguida de la asociación del  $Cl^-$ , ambos procesos modulados por el  $V_m$ . En cambio, en la activación de TMEM16A para escalas de tiempo de larga duración, ocurre primero la asociación del  $Cl^-$  y después la asociación de los iones de  $Ca^{2+}$ .

Una importante característica del modelo de 12 estados es su capacidad predictiva, ya que establece correctamente la consecuencia neta de los cambios de la  $[Cl^-]_e$  sobre la sensibilidad por  $Ca^{2+}$  de TMEM16A, esto es, la  $EC_{50}$  no es afectada por las variaciones de  $[Cl^-]_e$ . Este importante resultado fue corroborado experimentalmente por el grupo del Dr. Jorge Arreola.

# Capítulo 12. Trabajo a Futuro

---

## 12.I Origen de la dependencia con el $V_m$ de TMEM16A

La predicción del modelo de 12 estados relativa a que el origen de la dependencia con el  $V_m$  de TMEM16A podría estar conferido directamente por el anión permeante constituye un interesante tema por abordar. Como se mencionó en la sección de discusión, en otros canales de  $\text{Cl}^-$  como el CIC-0 y el CIC-2 se ha establecido con mucha fortaleza que el  $\text{Cl}^-$  al situarse en probables sitios de unión dentro del poro es quien confiere la dependencia con el  $V_m$  en estos canales (Push *et al.*, 1995; Chen & Miller, 1996; Engh *et al.*, 2007; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010; De Jesús-Pérez *et al.*, 2015). En el caso de los CaCCs, estudios con bloqueadores han permitido generar hipótesis de la posible existencia de sitios de unión dentro del poro en los cuales los aniones permeantes pudieran unirse en su viaje a través del poro del canal (Qu & Hartzell, 2000; Reyes *et al.*, 2014). Por tal motivo resulta de interés proponer modelos que consideren el proceso de permeabilidad dentro del mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A.

## 12.II Análisis Cinético del mecanismo de apertura y cierre de TMEM16B.

TMEM16B: Por otro lado, como fue señalado al comienzo de este trabajo, se ha identificado también a TMEM16B como componente estructural de los CaCCs. Al igual que TMEM16A, el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16B es regulado por cambios en la concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y variaciones de  $V_m$  (Betto *et al.*, 2014) y cambios en la  $[\text{Cl}^-]_o$  (Cruz-Rangel *et al.*, 2015). Sin embargo, existen diferencias en sus propiedades de activación. La cinética de activación y desactivación de las  $I_{\text{Cl}}$  generadas por TMEM16B son más rápidas en comparación a las de TMEM16A. Además, TMEM16B tiene menos sensibilidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ , esto es, requiere de mayor  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  para su activación (Scudieri *et al.*, 2013). Recientemente, se ha descrito que TMEM16B tiene un mecanismo dual de apertura y cierre que es regulado por el  $\text{Cl}^-$  extracelular (Cruz-Rangel *et al.*, 2015). Así

entonces, al igual que TMEM16A, el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16B está regulado por el acoplamiento de  $V_m$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$ . Entonces, dadas las similitudes que existen entre estos canales, es posible que el modelo de 12 estados que reproduce las propiedades de apertura y cierre de TMEM16A también deba ser capaz de reproducir aquellas propiedades de apertura y cierre de TMEM16B. En una primera etapa, un ajuste parcial a los datos experimentales de la activación de TMEM16B ha mostrado ser muy alentadores. La Figura 27 muestra sobrepuestos los trazos de  $I_{Cl}$  generadas por TMEM16B para distintas condiciones de  $V_m$  y bajo condiciones de  $[Cl^-]_e = 140$  y  $30$  mM para  $[Ca^{2+}]_i = 2.5$   $\mu M$ . Como puede observarse, el modelo (trazos color negro) ajusta bastante bien el comportamiento de los datos experimentales (trazos color azul). No obstante, información adicional tal como curvas dosis-respuesta, curvas de conductancia en función del  $V_m$  y registros de  $I_{Cl}$  en ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular, es requerida para completar el análisis de las propiedades de apertura y cierre de TMEM16B.

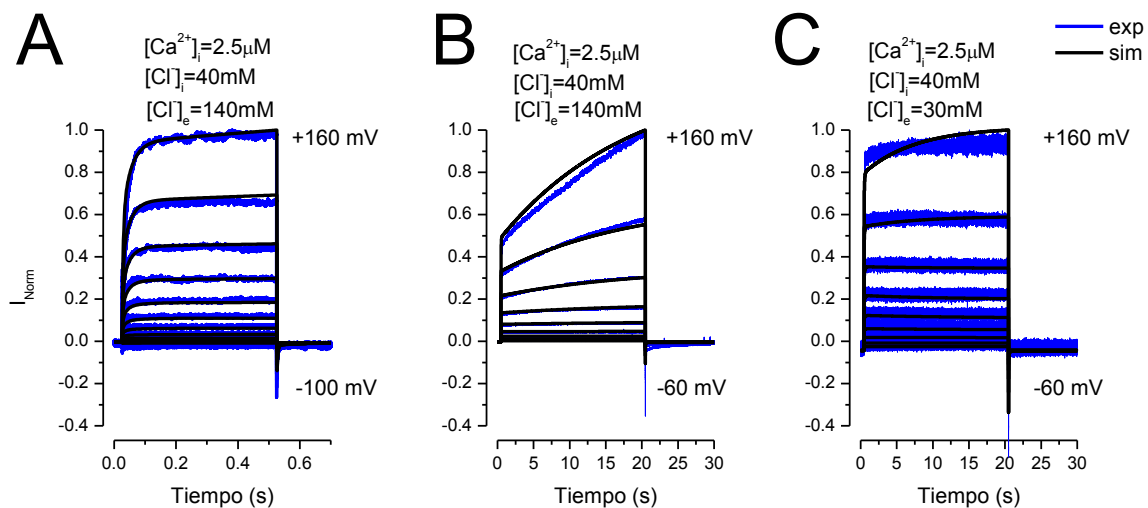


Figura 27. Ajuste global del modelo de 12 estados a trazos promedio de la  $I_{Cl}$  obtenida de células que expresaron TMEM16B (Trazos experimentales proporcionados por el grupo del Dr. Jorge Arreola). Las líneas solidas color negro son el resultado del ajuste hecho por *ICHMASCOT* a los datos experimentales que están en color azul y que fueron obtenidos a  $[Ca^{2+}]_i$  indicada. (A) Ajustes para los registros normalizados de  $I_{Cl}$  que se obtuvieron con pulsos de 0.5 s para  $V_m$  que fueron desde  $-120$  a  $-160$  mV en incrementos de 20 mV. (B) Ajuste para los registros normalizados de la  $I_{Cl}$  inducidos por la aplicación de pulsos de 20 s para  $[Cl^-]_e = 140$  y (C) 30 mM.

# Publicaciones

---

*Gating Modes of Calcium-Activated Chloride Channels TMEM16A and TMEM16B*, Silvia Cruz-Rangel, José J. De Jesús Pérez, **Juan A. Contreras-Vite**, Patricia Pérez-Cornejo, H. Criss Hartzell and Jorge Arreola. *Journal of Physiology* (2015). 24:528398. doi:10.1113/JP271256, PMID: 2672843

*Revealing the activation pathways for TMEM16A chloride channel from macroscopic current and kinetic models*, **Juan A. Contreras-Vite**, Silvia Cruz-Rangel, José J. De Jesús Pérez, Iván A. Aréchiga Figueroa, Aldo A. Rodríguez-Menchaca, Patricia Pérez-Cornejo, H. Criss Hartzell and Jorge Arreola. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* (2016). doi: 10.1007/s00424-016-1830-9

# Presentaciones en congresos

---

2012 Nacional de Física, *Dependencia con el Voltaje del Canal de Cloruro CIC-2*; **Juan Antonio Contreras Vite**, José A. De Santiago Castillo, Jorge E. Sánchez Rodríguez, Pablo G. Nieto Delgado, Jorge Arreola. <http://cnf.smf.mx/>

2013 Nacional de Física, *Cinética de la Activación de TMEM16A/Ano1 por cambios en  $[Ca^{2+}]_i$  y Voltaje*; **Juan Antonio Contreras Vite**, José A. De Santiago Castillo, Criss Hartzell, Gloria Patricia Pérez Cornejo, Jorge Arreola Gómez. <http://cnf.smf.mx/>

2014 Nacional de Física, *Predicción de la Activación de TMEM16A Usando un Enfoque de Procesos Estocásticos Discretos*; **Juan Antonio Contreras**



**Vite**, José A. De Santiago Castillo, Criss Hartzell, Gloria Patricia Pérez Cornejo, Jorge Arreola Gómez. <http://cnf.smf.mx/>

2015      Internacional de la Sociedad Americana de Biofísica; *Extracellular Chloride Regulates TMEM16A Gating*; **Juan A. Contreras-Vite**, Silvia Cruz-Rangel, Patricia Pérez-Cornejo, H. Criss Hartzell and Jorge Arreola. *Biophysical Journal*. [Volume](#) 108. Issue 2, Supplement 1, p441a, 27 January 2015. <http://www.cell.com/biophysj/abstract/S0006-3495%2814%2903621-2>

2015      Internacional de las Sociedades Canadiense, Americana y Mexicana de Física Canadian-American-Mexican (CAM) Graduate Student Physics Conference; *A Discrete-State Markov Model for Channel Protein TMEM16A/ANO1*; **Juan A. Contreras-Vite**, Silvia Cruz-Rangel, Patricia Pérez-Cornejo, H. Criss Hartzell and Jorge Arreola. <http://cam2015.smf.mx/index>

## Bibliografia

- Arreola J, Melvin JE & Begenisich T (1996). Activation of calcium-dependent chloride channels in rat parotid acinar cells. *J Gen Physiol* **108**, 35–47.
- Ashcroft F (2000). *Ion channels and disease: channelopathies*. Available at: <http://www.nature.com/ncb/webfocus/disease/books2000.html>.
- Betto G, Cherian OL, Pifferi S, Cenedese V, Boccaccio A & Menini A (2014). Interactions between permeation and gating in the TMEM16B/anoctamin2 calcium-activated chloride channel. *J Gen Physiol* **143**, 703–718.
- Blanchard P, Devaney RL & Hall GR (2011). *Differential equations*, Fourth ed. ed. Cole B. Boston.
- Brunner JD, Lim NK, Schenck S, Duerst A & Dutzler R (2014). X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. *Nature* **516**, 207–212.
- Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeiffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O & Galletta LJ V (2008). TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science (80- )* **322**, 590–594.
- Chen TY & Miller C (1996). Nonequilibrium gating and voltage dependence of the ClC-0 Cl<sup>-</sup> channel. *J Gen Physiol* **108**, 237–250.
- Cia D, Bordais A, Varela C, Forster V, Sahel J a, Rendon A & Picaud S (2005). Voltage-gated channels and calcium homeostasis in mammalian rod photoreceptors. *J Neurophysiol* **93**, 1468–1475.
- Colquhoun D & Hawkes AG (1977). Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channels. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **199**, 231–262.
- Covarrubias M, Bhattacharji A, De Santiago-Castillo JA, Dougherty K, Kaulin YA, Naphuket TR & Wang G (2008). The neuronal Kv4 channel complex. *Neurochem Res* **33**, 1558–1567.
- Cruz Rangel S, De Jesús Pérez JJ, Contreras Vite JA, Pérez Cornejo P, Hartzell H & Arreola J (2015). Gating modes of calcium-activated chloride channels TMEM16A and TMEM16B. *J Physiol* **24**, 5283–5298.
- Cui J, Yang H & Lee US (2009). Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cell Mol Life Sci* **66**, 852–875.
- Das S, Hahn Y, Walker DA, Nagata S, Willingham MC, Peehl DM, Bera TK, Lee B & Pastan I (2008). Topology of NGEF, a prostate-specific cell:cell junction protein widely expressed in many cancers of different grade level. *Cancer Res* **68**, 6306–6312.

- Dougherty K, De Santiago-Castillo J a & Covarrubias M (2008). Gating charge immobilization in Kv4.2 channels: the basis of closed-state inactivation. *J Gen Physiol* **131**, 257–273.
- Duan D (2009). Phenomics of cardiac chloride channels: the systematic study of chloride channel function in the heart. *J Physiol* **587**, 2163–2177.
- Duvvuri U, Shiwarski DJ, Xiao D, Bertrand C, Huang X, Edinger RS, Rock JR, Harfe BD, Henson BJ, Kunzelmann K, Schreiber R, Seethala RS, Egloff AM, Chen X, Lui VW, Grandis JR & Gollin SM (2012). TMEM16A induces MAPK and contributes directly to tumorigenesis and cancer progression. *Cancer Res* **72**, 3270–3281.
- Dworakowska B & Dołowy K (2000). Ion channels-related diseases. *Acta Biochim Pol* **47**, 685–703.
- Engh AM, Faraldo-Gomez JD & Maduke M (2007). The Mechanism of Fast-Gate Opening in CIC-0. *J Gen Physiol* **130**, 335–349.
- Eyring H (1935a). The Activated Complex in Chemical Reactions. *J Chem Phys* **445**, 107–115.
- Eyring H (1935b). The Activated Complex and the Absolute Rate of Chemical Reactions. *Chem Rev* **17**, 65–77.
- Ferrera L, Caputo A, Ubbi I, Bussani E, Zegarra-Moran O, Ravazzolo R, Pagani F & Galletta LJ V (2009). Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing. *J Biol Chem* **284**, 33360–33368.
- Frings S, Reuter D & Kleene SJ (2000). Neuronal Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels--homing in on an elusive channel species. *Prog Neurobiol* **60**, 247–289.
- Graves TD (2006). Ion channels and epilepsy. *Q J Med* **99**, 201–217.
- Haase A & Hartung K (2006). Activation and inactivation kinetics of a Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> current: photolytic Ca<sup>2+</sup> concentration and voltage jump experiments. *Pflugers Arch* **452**, 81–90.
- Hartzell C, Putzier I & Arreola J (2005). Calcium-activated chloride channels. *Annu Rev Physiol* **67**, 719–758.
- Hartzell HC, Yu K, Xiao Q, Chien L-T & Qu Z (2009). Anoctamin/TMEM16 family members are Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *J Physiol* **587**, 2127–2139.
- Hill AV (1913). The Combinations of Haemoglobin with Oxygen and with Carbon Monoxide. *Biochem J* **7**, 471–480.

- Hille B (1978). Ionic Channels in Excitable membranes. *Biophys J* **22**, 283–294.
- De Jesús Pérez JJ, Castro-Chong A, Shieh R, Hernández Carballo CY, de Santiago Castillos JA & Arreola J (2016). Gating the glutamate gate of CLC-2 chloride channel by pore occupancy. *J Gen Physiol* **1**, 25–37.
- Kleene SJ (1997). High-gain, low-noise amplification in olfactory transduction. *Biophys J* **73**, 1110–1117.
- Korn SJ & Horn R (1988). Statistical discrimination of fractal and markov models of single-channel gating. *Biophys J* **54**, 871–877.
- Kuo IY & Ehrlich BE (2012). Ion Channels in Renal Disease. *Chem Rev* **112**, 6353–6372.
- Kuruma A & Hartzell HC (2000). Bimodal control of a Ca<sup>2+</sup>-activated Cl channel by different Ca<sup>2+</sup> signals. *J Gen Physiol* **115**, 59–80.
- Malvezzi M, Chalal M, Janjusevic R, Picollo A, Terashima H, Menon AK & Accardi A (2013). Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid scrambling by a reconstituted TMEM16 ion channel. *Nat Commun* **4**, 2367.
- McCleskey EW & Gold MS (1999). Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol* **61**, 835–856.
- Miledi R (1982). A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **215**, 491–497.
- Miledi R & Parker I (1984). Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **357**, 173–183.
- Nilius B, Prenen J, Voets T, Van Den Bremt K, Eggermont J & Droogmans G (1997). Kinetic and pharmacological properties of the calcium-activated chloride-current in macrovascular endothelial cells. *Cell Calcium* **22**, 53–63.
- Perez-Cornejo P, De Santiago JA & Arreola J (2004). Permeant anions control gating of calcium-dependent chloride channels. *J Membr Biol* **198**, 125–133.
- Peters CJ, Yu H, Tien J, Jan YN, Li M & Jan LY (2015). Four basic residues critical for the ion selectivity and pore blocker sensitivity of TMEM16A calcium-activated chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 3547–3552.
- Picollo A, Malvezzi M & Accardi A (2014). TMEM16 Proteins: Unknown Structure and Confusing Functions. *J Mol Biol* **427**, 94–105.
- Pusch M, Ludewig U, Rehfeldt A & Jentsch TJ (1995). Gating of the voltage-dependent chloride channel CLC-0 by the permeant anion. *Nature* **373**, 527–531.

- Qu Z & Hartzell HC (2000). Anion permeation in Ca(2+)-activated Cl(-) channels. *J Gen Physiol* **116**, 825–844.
- Qu Z, Yao W, Yao R, Liu X, Yu K & Hartzell C (2014). The Ca(2+) -activated Cl(-) channel, ANO1 (TMEM16A), is a double-edged sword in cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Med* **1**, 1–9.
- Reyes JP, López-Rodríguez A, Espino-Saldaña AE, Huanosta-Gutiérrez A, Miledi R & Martínez-Torres A (2014). Anion permeation in calcium-activated chloride channels formed by TMEM16A from *Xenopus tropicalis*. *Pflugers Arch Eur J Physiol* **466**, 1769–1777.
- Romanenko VG, Catalán MA, Brown DA, Putzier I, Hartzell HC, Marmorstein AD, Gonzalez-Begne M, Rock JR, Harfe BD & Melvin JE (2010). Tmem16A encodes the Ca2+-activated Cl- channel in mouse submandibular salivary gland acinar cells. *J Biol Chem* **285**, 12990–13001.
- Sakmann B, Neher E & Jackson MB (1995). *Single-Channel Recording*. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3774295&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> \n<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-1229-9> \n<http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-4419-1229-9> \n<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-1229-9>
- Sánchez-Rodríguez JE, De Santiago-Castillo JA & Arreola J (2010). Permeant anions contribute to voltage dependence of ClC-2 chloride channel by interacting with the protopore gate. *J Physiol* **588**, 2545–2556.
- Sánchez-Rodríguez JE, De Santiago-Castillo JA, Contreras-Vite JA, Nieto-Delgado PG, Castro-Chong A & Arreola J (2012). Sequential interaction of chloride and proton ions with the fast gate steer the voltage-dependent gating in ClC-2 chloride channels. *J Physiol* **590**, 4239–4253.
- Sansom MS, Ball FG, Kerry CJ, McGee R, Ramsey RL & Usherwood PNR (1989). Markov, fractal, diffusion, and related models of ion channel gating: A comparison with experimental data from two ion channels. *Biophys J* **56**, 1229–1243.
- Santiago-Castillo JA, Covarrubias M, Sánchez-Rodríguez JE, Perez-Cornejo P & Arreola J (2010). Simulating complex ion channel kinetics with IonChannelLab. *Channels (Austin)* **4**, 422–428.
- Schroeder BC, Cheng T, Jan YN & Jan LY (2008). Expression Cloning of TMEM16A as a Calcium-Activated Chloride Channel Subunit. *Cell* **134**, 1019–1029.
- Scudieri P, Sondo E, Caci E, Ravazzolo R & Galletta LJ (2013). TMEM16A-TMEM16B chimeras to investigate the structure-function relationship of calcium-activated chloride channels. *Biochem J*; DOI: 10.1042/BJ20130348.

- Sheridan JT, Worthington EN, Yu K, Gabriel SE, Hartzell HC & Tarran R (2011). Characterization of the oligomeric structure of the Ca(2+)-activated Cl<sup>-</sup> channel Ano1/TMEM16A. *J Biol Chem* **286**, 1381–1388.
- Terashima H, Picollo A & Accardi A (2013). Purified TMEM16A is sufficient to form Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 19354–19359.
- Tian Y, Kongsuphol P, Hug M, Ousingsawat J, Witzgall R, Schreiber R & Kunzelmann K (2011). Calmodulin-dependent activation of the epithelial calcium-dependent chloride channel TMEM16A. *FASEB J* **25**, 1058–1068.
- Tien J, Peters CJ, Wong XM, Cheng T, Jan YN, Jan LY & Yang H (2014). A comprehensive search for calcium binding sites critical for TMEM16A calcium-activated chloride channel activity. *Elife* **3**, 1–19.
- Tolmann R (1979). *The Principles of Statistical Mechanics*. Oxford University Press, New York.
- Vocke K, Dauner K, Hahn A, Ulbrich A, Broecker J, Keller S, Frings S & Möhrlein F (2013). Calmodulin-dependent activation and inactivation of anoctamin calcium-gated chloride channels. *J Gen Physiol* **142**, 381–404.
- Weiss JN (1997). The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J* **11**, 835–841.
- Xiao Q, Prussia A, Yu K, Cui Y & Hartzell HC (2008). Regulation of bestrophin Cl channels by calcium: role of the C terminus. *J Gen Physiol* **132**, 681–692.
- Xiao Q, Yu K, Perez-Cornejo P, Cui Y, Arreola J & Hartzell HC (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**, 8891–8896.
- Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim W-S, Park SP, Lee J, Lee B, Kim B-M, Raouf R, Shin YK & Oh U (2008). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* **455**, 1210–1215.
- Yu K, Duran C, Qu Z, Cui YY & Hartzell HC (2012). Explaining calcium-dependent gating of anoctamin-1 chloride channels requires a revised topology. *Circ Res* **110**, 990–999.

## Tablas

*Tabla 1. Modelos propuestos para describir el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A regulado por cambios en el  $V_m$  y cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ .* 52

*Tabla 2. Valores de los parámetros asociados con las frecuencias de transición del modelo de 8 estados obtenidos del ajuste global a los datos de TMEM16A.* 59

*Tabla 3. Valores de cada parámetro de las frecuencias de transición asociados al modelo de 12 estados y obtenidos del ajuste global a los datos experimentales de la activación de TMEM16A. Los valores listados se obtuvieron al ajustar el modelo de 12 estados a los datos promedio de TMEM16A. Tabla de valores tomada de Contreras-Vite JA et al., 2016.* 70

## Figuras

Figura 1. Representación de un canal iónico activado por  $\text{Ca}^{2+}$ . El canal se ilustra por barras grises y se encuentra embebido en la membrana plasmática representada por la franja horizontal color naranja. La región que se encuentra entre las barras representa la vía de permeación a través de la cual los iones (esferas azules) pasaran ya sea hacia el exterior o al interior de la célula. El sitio de unión del  $\text{Ca}^{2+}$  se ilustra con el círculo verde. Este sitio se encuentra localizado en una parte del canal que estaría dentro de la membrana, por lo que la probabilidad de ocupación del sitio depende del voltaje de membrana. El primer caso muestra el canal cerrado sin  $\text{Ca}^{2+}$  unido. El segundo caso muestra la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el canal cerrado. El tercer caso muestra un canal abierto con  $\text{Ca}^{2+}$  unido y los iones fluyendo de acuerdo al gradiente electroquímico. \_\_\_\_\_ 11

Figura 2. La técnica de Patch Clamp. La pipeta está conectada a la entrada negativa de un amplificador cuya entrada positiva se conecta al voltaje de comando  $V$ , en su modalidad de “whole cell”. \_\_\_\_\_ ¡Error!

### **Marcador no definido.**

Figura 3. Trazo promedio típico de la corriente iónica obtenida usando la técnica experimental de “Patch-Clamp”. Corriente generada por el ion de cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) obtenida de una célula que expone canales iónicos de cloruro activados por  $V_m$  y calcio intracelular. El registro de la corriente iónica se hizo bajo la configuración de “whole cell” usando la técnica de “Patch-Clamp”. El protocolo usado para generar la respuesta de los canales consta de escalones de voltaje de duración variable como aquel mostrado en la parte superior de esta Figura. El protocolo comienza con la aplicación de un estímulo de  $V_m=0$  mV con duración de algunos cuantos mili segundos. En esta etapa, no hay un flujo de iones a través de los canales, como puede observarse en la gráfica. Posterior al estímulo de 0 mV, son aplicados escalones de voltaje que abarcan un rango de -100 a +100 mV en pasos de 20 mV. Para este lapso del protocolo se puede apreciar un flujo de corriente positiva y negativa. La corriente positiva se debe a la entrada de los iones a la célula, mientras que la corriente negativa se debe a la salida de iones de la célula. Nótese que para  $V_m$  positivos la corriente se sostiene mientras dura la aplicación de los estímulos, pero para  $V_m$  negativos la corriente cae eventualmente a cero. Lo anterior es debido a que la apertura de los canales es favorecida por los  $V_m$  positivos, en tanto que el cierre es favorecido por  $V_m$  negativos. Finalmente es aplicada una repolarización a -100 mV para la cual se observa una corriente negativa. \_\_\_\_\_ 14

Figura 4. Modelo topológico de TMEM16A. Este modelo fue dibujado de acuerdo a la topología propuesta por (Tien et al. 2014). La estructura secundaria de TMEM16A predice la existencia de ocho segmentos transmembranales (TM's). En esta topología los extremos amino (N) y carboxy (C) terminal se encuentran del lado citosólico. En el modelo se indican sobre la primera asa intracelular con dos barras los residuos  $_{44}\text{EEEEAVK}_{451}$ , mientras que con esferas color verde los residuos E702, E705, E734, I735, D738, V752 y A754 que son importantes en el sensado del  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual es representado por la esfera azul. \_\_\_\_\_ 18

Figura 5. Modelo estructural de TMEM16A construido por homología con el modelo estructural de la escramblasa nhTME16 (Brunner et al. 2014) como se describe por Yu et al. 2015. (A) TMEM16A vista respecto al centro de la bicapa lipídica la cual se indica por las líneas sólidas horizontales color negro,



además, también se indica con números a las alfa hélices y los homodímeros aparecen en color bronce y plata. (B) Uno de los monómeros de TMEM16A rotado 70 grados respecto al eje y visto desde la bicapa lipídica. esta vista muestra la hendidura hidrofílica descrita por Brunner et al. (2014). En rojo: vestibulo del canal constituido por los residuos G628-M632 y I636-Q637 (Yu et al. 2012). Azul celeste: residuos relacionados con la selectividad iónica K603, R621, R787 (Peters et al. 2015). Fucsia: residuo K588 asociado con la selectividad iónica (Yang et al. 2012). Verde: residuos E702, E705, E734, D738 relacionados con los posibles sitios de unión a  $Ca^{2+}$  (Yu et al. 2012; Tien et al. 2014). Café: residuos  $^{444}$ EEEEAVK $^{451}$  (Xiao et al. 2011). Figura tomada de Cruz-Rangel et al., 2015. \_\_\_\_\_ 19

Figura 6. Activación de TMEM16A causada por el  $V_m$ , y en ausencia de  $[Ca^{2+}]_i$ . (A) Trazos típicos de la  $I_{Cl}$  obtenida de células HEK293 que expresaron canales TMEM16A y que fueron estimuladas con escalones de voltaje de -100, a +160 mV, en incrementos de 20 mV como lo indica el protocolo de voltaje mostrado en la parte superior de los registros. La flecha negra a un costado de los registros indica el valor cero de la corriente. (B) Curvas  $I_{Cl}$ - $V_m$  obtenidas para los  $V_m$  indicados La figura fue construida con datos del Lab del Dr. Jorge Arreola. \_\_\_\_\_ 20

Figura 7. Activación de TMEM16A causada por el  $V_m$ , y cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ . (A) Trazos típicos de la  $I_{Cl}$  obtenida de células HEK293 que expresaron canales TMEM16A y que fueron estimuladas con escalones de voltaje de -100, 0 y +100 mV, dializadas con las  $[Ca^{2+}]_i$  indicadas. La flecha negra a un costado de los registros indica el valor cero de la corriente. (B) Curvas Dosis-Respuesta en función de  $[Ca^{2+}]_i$  (símbolos) para los  $V_m$  indicados y ajustadas por la Ecuación de Hill (líneas sólidas). (C) Valores de  $EC_{50}$  y  $n_H$  estimados del ajuste de Hill a los datos mostrados en C. Figura tomada de Xiao et al., 2011. \_\_\_\_\_ 22

Figura 8. Perfusión rápida. (A) Trazo típico de  $I_{Cl}$  en respuesta a la aplicación y remoción (indicada por la barra negra) de 20  $\mu$ M de  $Ca^{2+}$  para diferentes pasos de  $V_m$  que variaron en un rango de -120 a +120 mV en incrementos de 20 mV. (B) Constantes de tiempo estimadas a partir de A. La  $\tau_{Act}$  fue estimada al ajustar funciones mono exponenciales a los trazos de  $I_{Cl}$  durante la fase de aplicación  $Ca^{2+}$ , en tanto que  $\tau_{Deact}$  se estimó al ajustar funciones mono exponenciales a trazos de en la etapa de remoción del  $Ca^{2+}$ . \_\_\_\_\_ 23

Figura 9. Dependencia con el  $V_m$  y  $[Cl]_e$  de la activación de TMEM16A. (A) Trazos promedio normalizados de la  $I_{Cl}$  obtenida para células que fueron secuencialmente expuestas a las  $[Cl]_e$  indicadas y usando el protocolo de voltaje indicado en la parte superior. (B) Curvas de conductancia en función de  $V_m$  para las  $[Cl]_e$  indicadas. La conductancia a cada  $V_m$  fue normalizada al valor obtenido a +180 mV para la condición  $[Cl]_e=140$  mM. Las líneas sólidas son ajustes individuales con funciones Boltzmann para cada conjunto de datos. Los trazos fueron normalizados respecto al valor máximo de la  $I_{Cl}$  obtenida a la condición de  $[Cl]_e=140$  mM. La figura fue construida con datos del Lab del Dr. Jorge Arreola. \_\_\_\_\_ 24

Figura 10. Mecanismo dual de activación de TMEM16A. (A) Trazos promedio de la  $I_{Cl}$  obtenida de células HEK293 transfectadas con TMEM16A, estimuladas con pulsos de voltaje con duración de 0.5 s (izquierda) seguidos de pulsos con duración de 20 s (derecha). La  $I_{Cl}$  medida después del pre-pulso de voltaje a +140 mV fue ajustada con una función bi-exponencial caracterizada por constantes de tiempo lenta y rápida ( $\tau_s$  y  $\tau_f$ ) = 2.6 s y 150.7 ms, respectivamente. Por lo tanto, la aplicación de pulsos de larga duración induce un segundo componente en el mecanismo de apertura y cierre de TMEM16A (B) Cociente de valores de  $I_{Cl,20}$ /

$I_{Cl,0.5}$  tomados al final de los estímulos de voltaje con duración de 20 s y 0.5 s, respectivamente. El cociente  $I_{Cl,20}/I_{Cl,0.5}$  es proporcional al cociente de probabilidades de apertura y por tanto refleja como la aplicación pulsos de voltaje de larga duración provoca un incremento en la probabilidad de apertura de TMEM16A. Los trazos fueron normalizados respecto al valor de la  $I_{Cl}$  obtenida a la condición de  $[Cl^-]_e=140$  mM y a +120 mV del pulso con duración de 0.5 s. Figura tomada de Cruz-Rangel- et al., 2015. \_\_\_\_\_ 26

Figura 11. Estimación de los valores numéricos de los parámetros asociados a los modelos. Esquematisación del proceso de ajuste de datos experimentales realizado con el software IChMASCOT para lograr determinar los parámetros asociados a las frecuencias de transición de cada uno de los modelos probados. \_\_\_\_\_ 42

Figura 12. La técnica de Patch Clamp. Esta técnica consiste básicamente en imponer diferencias de voltaje a través de la membrana con el uso de dos electrodos. Uno de ellos está en el baño y aterriza el medio extracelular o baño. El otro electrodo se encuentra dentro de micropipetas de vidrio y es por donde se aplican las variaciones del voltaje deseados. Las micropipetas de vidrio con finos cuellos que se ponen en contacto con la membrana celular y forman un sello de alta resistencia. (A) Preparación de la célula. (B) Configuración de “cell-attached”, la cual permite el registro de corrientes de un pequeño número de canales. (C) Configuración denominada “whole-cell” lograda después de romper mediante una leve succión el pedazo de membrana contenido en la boca de la micropipeta. (D) Configuración de “inside-out-patch” lograda mediante la escisión de segmentos de membrana con un movimiento repentino para alejar la micropipeta de la superficie \_\_\_\_\_ 44

Figura 13. Representación de las configuraciones logradas por la unión de un ion de  $Cl^-$  sobre los estados cerrado y abierto del canal. En ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular y  $Cl^-$  externo la activación de TMEM16A dependiente de  $V_m$  fue representada como una reacción cinética entre dos estados; cerrado C y abierto O. Las transiciones entre C y O están controladas por las frecuencias  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ , las cuales tienen dependencia exponencial con  $V_m$ . Si se considera que el  $Cl^-$  externo se une primero al canal, como es representado por la esfera color verde, se inducirán dos estados conformacionales más;  $C_{Cl}$  y  $O_{Cl}$ . Las transiciones  $C \rightleftharpoons C_{Cl}$  están controladas por las frecuencias  $[Cl^-]_e k_{CCl1}$  y  $k_{CCl2}$ , mientras que las transiciones  $O \rightleftharpoons O_{Cl}$  por  $[Cl^-]_e k_{OCl1}$  y  $k_{OCl2}$ . Finalmente  $\alpha_{Cl1}$  y  $\beta_{Cl1}$  son las frecuencias de transición que controlan la reacción  $C_{Cl} \rightleftharpoons O_{Cl}$ . \_\_\_\_\_ 53

Figura 14. Representación de las configuraciones logradas por la unión de un ion de  $Ca^{2+}$  sobre los estados cerrado y abierto del canal. Si se considera que el  $Ca^{2+}$  intracelular se une primero al canal, como es representado por la esfera color azul, se inducirán dos estados conformacionales más;  $C_{Ca}$  y  $O_{Ca}$ . Las transiciones  $C \rightleftharpoons C_{Ca}$  están controladas por las frecuencias  $[Ca^{2+}]_i k_{C1}$  y  $k_{C2}$ , mientras que las transiciones  $O \rightleftharpoons O_{Ca}$  por  $[Ca^{2+}]_i k_{O1}$  y  $k_{O2}$ , además,  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  son las frecuencias de transición que controlan la reacción  $C_{Ca} \rightleftharpoons O_{Ca}$ . \_\_\_\_\_ 54

Figura 15. Representación de las configuraciones logradas por la unión conjunta de un ion de  $Ca^{2+}$  y un ion de  $Cl^-$  sobre los estados cerrado y abierto del canal. Si se asume que el  $Cl^-$  extracelular se ha unido al canal y enseguida ocurre la unión del  $Ca^{2+}$  como es representado por la esfera color azul, se inducirán cuatro estados conformacionales más;  $C_{Ca, Cl}$ ,  $O_{Ca, Cl}$ ,  $C_{Cl}$  y  $O_{Cl}$ . Las frecuencias de transición que controlan las reacciones  $C_{Ca} \rightleftharpoons C_{Cl}$  son  $[Cl^-]_e k_{CCl3}$  y  $k_{CCl4}$ , mientras que aquellas que determinan  $C_{Ca} \rightleftharpoons O_{Ca}$  están controladas por  $[Cl^-]_e k_{OCl3}$  y  $k_{OCl4}$ . Por otra parte,  $[Ca^{2+}]_i k_{O1}$ ,  $[Ca^{2+}]_i k_{O1c}$ ,  $[Ca^{2+}]_i k_{C1c1}$  y  $[Ca^{2+}]_i k_{C1}$  son las

frecuencias de transición de asociación del  $Ca^{2+}$ , en tanto que  $k_{O_2}$ ,  $k_{O_2Cl}$ ,  $k_{C_2Cl}$  y  $k_{Cl}$  son las frecuencias de transición que controlan la disociación del  $Ca^{2+}$ . Los subíndices  $Cl$  indican estados ocupados por el ion de  $Cl$  o las frecuencias de transición involucradas con la unión del  $Cl$ . Finalmente  $\alpha_i$ ,  $\beta_i$ ,  $\alpha_{Cl_i}$ ,  $\beta_{Cl_i}$  con  $i=1,2$  son las frecuencias de transición que controlan las reacciones  $C \rightleftharpoons O$  sin y con  $Cl$ , respectivamente. Aquellos ciclos enmarcados por las líneas punteadas color verde no satisfacen la reversibilidad microscópica (Tolmann, 1979). . \_\_\_\_\_ 56

Figura 16. Ajuste global del modelo de ocho 8 estados a registros promedio de la  $I_{Cl}$  generada por TMEM16A y obtenidos ante diferentes condiciones de  $V_m$  y  $[Ca^{2+}]_i$ . Las líneas solidas color gris representan los ajustes hechos con IChMASCOT, mientras que las líneas en color negro representan los datos experimentales. (A-C) Registros normalizados de la  $I_{Cl}$  obtenidos en la configuración de "whole cell" para células dializadas con  $[Ca^{2+}]_i$  de 0  $\mu M$ , 0.2  $\mu M$ , 1  $\mu M$  y 20  $\mu M$  usando un protocolo de escalones de voltaje en un rango de -100 a +160 mV para el caso de 0  $\mu M$  y para el resto de los registros el voltaje vario en un rango de -100 a +100 mV, en todos los caso el incremento de los escalones de voltaje fue de 20 mV. (D) Trazos representativo de la  $I_{Cl}$  obtenida de segmentos escindidos de membrana expuestos a la aplicación y lavado rápido de 20  $\mu M$  de  $Ca^{2+}$ . La barra color gris sobre los trazos de la  $I_{Cl}$  indica el periodo de tiempo de aplicación del  $Ca^{2+}$ . El coeficiente de regresión fue  $R^2 = 0.95$  para el ajuste simultaneo. Los registros de  $I_{Cl}$  con  $[Ca^{2+}]_i = 1$  y 20  $\mu M$  se obtuvieron de células expuestas a condiciones simétricas de 140mM de  $Cl^-$  y el resto fueron de células expuestas a condiciones  $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i$  140/40 mM. \_\_\_\_\_ 60

Figura 17. Ajuste global del modelo de 8 estados a registros promedio de la  $I_{Cl}$  generada por TMEM16A obtenidos usando la configuración de "whole cell" ante diferentes condiciones de  $V_m$  y  $[Cl^-]_e$ . Las líneas solidas color gris representan los ajustes hechos con IChMASCOT, mientras que las líneas en color negro representan los datos experimentales. (A, B) Registros de  $I_{Cl}$  obtenida de células expuestas a  $[Cl^-]_e = 1$  y 10 mM y dializadas  $[Ca^{2+}]_i = 0.2 \mu M$  usando un protocolo de voltajes como el mostrado en la Figura 9. (C, D) Registros de  $I_{Cl}$  obtenida con pulsos de 20 s sobre células expuestas a  $[Cl^-]_e = 30$  y 140 mM y dializadas  $[Ca^{2+}]_i = 0.2 \mu M$  usando un protocolo de escalones de voltaje en un rango de -20 a 120 mV con pasos de 20 mV. El valor del coeficiente de regresión en este caso fue de  $R^2 = 0.95$  para el ajuste global simultaneo. \_\_\_\_ 61

Figura 18. Configuración lograda por la unión de un ion de  $Ca^{2+}$  sobre la configuración de 8 estados. Si se asume que el  $Cl^-$  extracelular se ha unido al canal y enseguida ocurre la unión del  $Ca^{2+}$  sobre una configuración ya se inducirán cuatro estados conformacionales más;  $C_{Ca}$ ,  $O_{Ca}$ ,  $ClC_{Ca}$  y  $ClO_{Ca}$ . Las frecuencias de transición que controlan las reacciones  $CaC \rightleftharpoons ClC_{Ca}$  son  $[Cl^-]_e k_{CCl_3}$  y  $k_{CCl_4}$ , mientras que aquellas que determinan  $CaO \rightleftharpoons ClO_{Ca}$  están controladas por  $[Cl^-]_e k_{OCl_3}$  y  $k_{OCl_4}$ . Por otra parte,  $[Ca^{2+}]_i k_{O_1}$ ,  $[Ca^{2+}]_i k_{O_1Cl}$ ,  $[Ca^{2+}]_i k_{Cl_1}$  y  $[Ca^{2+}]_i k_{Cl}$  son las frecuencias de transición de asociación del  $Ca^{2+}$ , en tanto que  $k_{O_2}$ ,  $k_{O_2Cl}$ ,  $k_{C_2Cl}$  y  $k_{Cl}$  son las frecuencias de transición que controlan la disociación del  $Ca^{2+}$ . Los subíndices  $Cl$  indican estados ocupados por el ion de  $Cl^-$  o las frecuencias de transición involucradas con la unión del  $Cl^-$ . Finalmente, las reacciones  $ClC \rightleftharpoons ClO_{Ca}$  y  $ClC \rightleftharpoons ClO_{2Ca}$  están definidas por las frecuencias de transición  $\alpha_{Cl_i}$ ,  $\beta_{Cl_i}$  con  $i=2, 3$ . Todos los ciclos, excepto los que están encerrados por la líneas puntadas en color verde, satisfacen la reversibilidad microscópica (Tolman, 1979). \_\_\_\_\_ 63

Figura 19. Configuración lograda por la unión secuencial de dos iones de  $Ca^{2+}$  en ausencia de  $Cl^-$ . En ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular y  $Cl^-$  externo la activación de TMEM16A dependiente de  $V_m$  fue representada como una reacción cinética entre dos estados; cerrado C y abierto O. Las transiciones entre C y O están controladas por las frecuencias  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ , las cuales tienen dependencia exponencial con  $V_m$ . Si se considera que el  $Ca^{2+}$  intracelular se une primero al canal, como es representado por la esfera color azul, se inducirán dos estados conformacionales más;  $C_{Ca}$  y  $O_{Ca}$ . Las transiciones  $C \rightleftharpoons C_{Ca}$  están controladas por las frecuencias  $[Ca^{2+}]_i k_{C1}$  y  $k_{C2}$ , mientras que las transiciones  $O \rightleftharpoons O_{Ca}$  por  $[Ca^{2+}]_i k_{O1}$  y  $k_{O2}$ , además,  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  son las frecuencias de transición que controlan la reacción  $C_{Ca} \rightleftharpoons O_{Ca}$ . \_\_\_\_\_ 64

Figura 20. Ajuste global del modelo de 12 estados a registros promedio de la  $I_{Cl}$  generada por TMEM16A y obtenidos ante diferentes condiciones de  $V_m$  y  $[Ca^{2+}]_i$ . Las líneas solidas color gris representan los ajustes hechos con IChMASCOT, mientras que las líneas en color negro representan los datos experimentales. (A-C) Registros normalizados de la  $I_{Cl}$  obtenidos en la configuración de "whole cell" para células dializadas con  $[Ca^{2+}]_i$  de 0  $\mu M$ , 0.2  $\mu M$ , 1  $\mu M$  y 20  $\mu M$  usando un protocolo de escalones de voltaje en un rango de -100 a +160 mV para el caso de 0  $\mu M$  y para el resto de los registros el voltaje vario en un rango de -100 a +100 mV, en todos los caso el incremento de los escalones de voltaje fue de 20 mV. (D) Trazos representativo de la  $I_{Cl}$  obtenida de segmentos escindidos de membrana expuestos a la aplicación y lavado rapido de 20  $\mu M$  de  $Ca^{2+}$ . La barra color gris sobre los trazos de la  $I_{Cl}$  indica el periodo de tiempo de aplicación del  $Ca^{2+}$ . El coeficiente de regresión fue  $R^2 = 0.98$  para el ajuste simultaneo. Los registros de  $I_{Cl}$  con  $[Ca^{2+}]_i = 1$  y 20  $\mu M$  se obtuvieron de células expuestas a condiciones simétricas de 140mM de  $Cl^-$  y el resto fueron de células expuestas a condiciones  $[Cl^-]_e/[Cl^-]_i$  140/40 mM. Figura tomada de Contreras-Vite JA et al., 2016. \_\_\_\_\_ 66

Figura 21. Ajuste global del modelo de 12 estados a registros promedio de la  $I_{Cl}$  generada por TMEM16A obtenidos ante diferentes condiciones de  $V_m$  y  $[Cl^-]_e$ . Las líneas solidas color gris representan los ajustes hechos con IChMASCOT, mientras que las líneas en color negro representan los datos experimentales. (A, B) Registros de  $I_{Cl}$  obtenida de células expuestas a  $[Cl^-]_e = 1$  y 10 mM y dializadas  $[Ca^{2+}]_i = 0.2 \mu M$ , usando un protocolo de voltajes como el mostrado en la Figura 9. (C, D) Registros de  $I_{Cl}$  obtenida con pulsos de 20 s sobre células expuestas a  $[Cl^-]_e = 30$  y 140 mM y dializadas  $[Ca^{2+}]_i = 0.2 \mu M$ , usando un protocolo de escalones de voltaje en un rango de -20 a 120 mV con pasos de 20 mV. El valor del coeficiente de regresión en este caso fue de  $R^2 = 0.98$  para el ajuste global simultaneo. Figura tomada de Contreras-Vite JA et al., 2016. \_\_\_\_\_ 67

Figura 22. El modelo de 12 estados reproduce las propiedades clásicas de activación de TMEM16A causadas por  $V_m$  y  $[Ca^{2+}]_i$ . (A) Comparación directa entre los valores obtenidos del modelo (líneas continuas color gris) vs los datos obtenidos a partir de los experimentos (símbolos ■). (A) Relaciones Densidad de Corriente vs  $V_m$  para la  $[Ca^{2+}]_i$  indicada. (B) Densidad de corriente como función de  $[Ca^{2+}]_i$  (en escala logarítmica) para el  $V_m$  indicado. (C)  $EC_{50}$  vs  $V_m$ .  $R^2 = 0.98$  para el ajuste simultaneo. La Tabla 3 enlista los valores de cada parámetro de las frecuencias de transición y los pesos de los parámetros h, H, l, L, m y M que resultaron del ajuste global y que fueron usados para reproducir los datos mostrados en esta figura. Tomada de Contreras-Vite JA et al., 2016. \_\_\_\_\_ 68

Figura 23. Efecto sobre la sensibilidad con  $Ca^{2+}$  de TMEM16A causada por cambios en la  $[Cl^-]_e$ . (A-B) Registros característicos de la  $I_{Cl}$  obtenida en la configuración “inside-out” sobre parches escindidos expuestos a soluciones que contenían  $[Cl^-]_e=140$  mM y  $[Cl^-]_e=30$  mM sujetos a un voltaje de mantenimiento de  $\pm 60$  mV mientras la  $[Ca^{2+}]_i$  fue cambiada entre cero y los valores indicados en el recuadro al pie de los registros. (C) Curvas dosis-respuesta obtenidas a partir de los registros mostrados en A y B. Los símbolos representan los valores experimentales y las líneas continuas son las predicciones del modelo de 12 estados. (D) Valores de la  $EC_{50}$  estimados a partir de los experimentos (símbolos) comparados directamente con aquellos valores estimados a partir del modelo de 12 estados (líneas solidas). Los valores de la  $EC_{50}$  fueron calculados mediante el ajuste de la ecuación de Hill (no mostrado) a los datos que aparecen en C. Figura tomada de Contreras-Vite JA et al., 2016. \_\_\_\_\_ 72

Figura 24. Activación de TMEM16A dependiente de  $V_m$  y en ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular. Probabilidad de ocupación como función del tiempo para los estados C,  $C_{Cl}$ , O y  $O_{Cl}$ . Las probabilidades de ocupación de los estados PC, PO,  $PC_{Cl}$  y  $PC_{Cl}O$  fueron calculados para  $[Cl^-]_e=30$  y 140 mM,  $[Cl^-]_i=40$  mM y  $[Ca^{2+}]_i=0$  usando un protocolo de escalones de  $V_m$  mostrado en la parte superior del panel. Cuando se calcularon las probabilidades de ocupación estados  $P_C$ ,  $P_O$ ,  $P_{CCl}$  y  $P_{ClO}$  de canales sobre los estados C, O,  $C_{Cl}$  y  $O_{Cl}$  para la condición de 140 mM de  $Cl^-$  extracelular, sus valores fueron de 0.782, 0, 0.217 y 0.0008, respectivamente. Al reducir la concentración de  $Cl^-$  extracelular a un valor de 30 mM, se observó que  $P_C$  se incrementó a un valor de 0.941, mientras que  $P_{CCl}$  y  $P_{ClO}$  cayeron a valores de 0.057 y 0.0002, respectivamente. Lo anterior aunado con el hecho de que  $P_O$  para el estado O siempre es cero demuestra que el modelo predice que para lograr la activación de TMEM16A bajo condiciones de cero  $Ca^{2+}$ , es necesario que los iones de  $Cl^-$  se unan en algún dominio específico del canal. Asimismo, podemos establecer que la ruta de activación más probable de TMEM16A bajo condiciones de cero  $Ca^{2+}$ , está dada por  $C \rightarrow C_{Cl} \rightarrow O_{Cl}$  como es mostrado por las flechas color negro (140 mM) y rojo (30 mM) sobre el esquema del centro. \_\_\_\_\_ 74

Figura 25. Activación de TMEM16A dependiente de  $V_m$  y en presencia de  $Ca^{2+}$  intracelular. Probabilidad de ocupación como función del tiempo para los 12 estados del modelo. Las probabilidades de ocupación de los estados fueron calculados para  $[Cl^-]_e=140$  mM (A-C) y  $[Cl^-]_e=30$  mM (D-F). Las ecuaciones diferenciales 1 a 12 (Apéndice) fueron integradas numéricamente y los cálculos se hicieron para las condiciones de  $[Ca^{2+}]_i = 0.2$   $\mu$ M, y pulsos de 20 s a +120 mV seguidos por una repolarización a -60 mV. Los estados cuyo curso temporal de su la probabilidad de ocupación fue más sensible ante el cambio de  $[Cl^-]_e$  fueron C,  $C_{Cl}$ ,  $C_{Ca}$ ,  $ClO_{Ca}$ ,  $C_{2Ca}$  y  $ClO_{2Ca}$ . Estos cálculos muestran que el efecto del alto  $Cl^-$  externo es la de incrementar la probabilidad de ocupación del estado  ${}_{2Ca}O_{Cl}$  (C, F), lo cual da origen al comportamiento dual de activación, y cuando el  $Cl^-$  externo es bajo, el canal permanece la mayor parte del tiempo ocupando el estado  $O_{2Ca}$ . \_\_\_\_\_ 76

Figura 26. Rutas de activación para TMEM16A. El esquema muestra los diferentes estados que podría visitar en canal en su proceso de apertura. La dependencia temporal de la probabilidad de ocupación de los diferentes estados fue usada para establecer las rutas de activación más dominantes. Un aspecto importante que deriva del análisis de ocupación de los estados del modelo es el relativo a la ocupación del estado  ${}_{2Ca}O_{Cl}$  lo cual ocurre a través de dos procesos. (1) El determinado por la transición  $O_{2Ca} \xleftrightarrow{Cl^-} ClO_{2Ca}$ , el cual es dominante para tiempos menores a 5 s. En este proceso, el mecanismo de activación dominante es aquel en el

que ocurre primero la unión secuencial y regulada por el  $V_m$  de los dos iones de  $Ca^{2+}$  sobre el estado cerrado del canal. Una vez que se ha logrado la unión de los iones de  $Ca^{2+}$  ocurre la transición hacia el estado abierto, y finalmente en la configuración abierta inducida por  $V_m$  y  $Ca^{2+}$  ocurrirá la unión del ion de  $Cl^-$ , esto es, se sigue la ruta  $C \rightarrow C_{Ca} \rightarrow C_{2Ca} \rightarrow O_{2Ca} \rightarrow_{Cl^-} O_{2Ca}$  como se indica por las flechas para las condiciones de  $[Cl^-]_e$  indicadas. (2) El otro proceso es dominante para tiempos mayores a 5 s y para éste, el mecanismo de activación está determinado por la unión del  $Cl^-$  sobre la configuración cerrada del canal, enseguida ocurre la unión del primer ion de  $Ca^{2+}$  sobre la misma configuración cerrada, en esta etapa ocurre la transición hacia el estado abierto y aquí finalmente ocurre la unión del segundo ion de  $Ca^{2+}$ , y todo el proceso es regulado por  $V_m$ . Este mecanismo está comprendido en la ruta de activación  $C_{Cl^-} \rightarrow_{Cl^-} C_{Ca} \rightarrow_{Cl^-} O_{Ca} \rightarrow_{Cl^-} O_{2Ca}$ . 78

Figura 27. Ajuste global del modelo de 12 estados a trazos promedio de la  $I_{Cl}$  obtenida de células que expresaron TMEM16B (Trazos experimentales proporcionados por el grupo del Dr. Jorge Arreola). Las líneas solidas color negro son el resultado del ajuste hecho por IChMASCOT a los datos experimentales que están en color azul y que fueron obtenidos a  $[Ca^{2+}]_i$  indicada. (A) Ajustes para los registros normalizados de  $I_{Cl}$  que se obtuvieron con pulsos de 0.5 s para  $V_m$  que fueron desde -120 a -160 mV en incrementos de 20 mV. (B) Ajuste para los registros normalizados de la  $I_{Cl}$  inducidos por la aplicación de pulsos de 20 s para  $[Cl^-]_e=140$  y (C) 30 mM. \_\_\_\_\_ 86

# Apéndice

## A.1 Probabilidad de Ocupación de los Estados del Modelo de 12 estados

El curso temporal de la probabilidad de ocupación de cada uno de los 12 estados del Esquema 7 está dado por las siguientes ecuaciones diferenciales:

Ecuación A1. Estado  $C_{Ca}$

$$\frac{dP_{C_{Ca}}}{dt} = -(k_{C2} + \alpha_2 + [Cl^-]_e \cdot k_{CCl3} + [Ca^{2+}]_i \cdot k_{C1}) \cdot P_{C_{Ca}} + \beta_2 \cdot P_{CaO} + 2 \cdot [Ca^{2+}]_i \cdot k_{C1} \cdot P_C + K_{CCl4} \cdot P_{ClC_{Ca}} + 2 \cdot k_{C2} \cdot P_{C2Ca}$$

Ecuación A2. Estado  $CaO$

$$\frac{dP_{CaO}}{dt} = -(k_{O2} + \beta_2 + [Cl^-]_e \cdot k_{OCl3} + [Ca^{2+}]_i \cdot k_{O1}) \cdot P_{CaO} + \alpha_2 \cdot P_{C_{Ca}} + 2 \cdot [Ca^{2+}]_i \cdot k_{O1} \cdot P_O + k_{OCl4} \cdot P_{CaOCl} + 2 \cdot k_{O2} \cdot P_{2CaO}$$

Ecuación A3. Estado  $C$

$$\frac{dP_C}{dt} = -(\alpha_1 + [Cl^-]_e \cdot k_{CCl1} + 2 \cdot [Ca^{2+}]_i \cdot k_{C1}) \cdot P_C + k_{C2} \cdot P_{C_{Ca}} + \beta_1 \cdot P_O + k_{CCl2} \cdot P_{C_{Cl}}$$

Ecuación A4. Estado  $O$

$$\frac{dP_O}{dt} = -(\beta_1 + [Cl^-]_e \cdot k_{OCl1} + 2 \cdot [Ca^{2+}]_i \cdot k_{O1}) \cdot P_O + k_{O2} \cdot P_{CaO} + \alpha_1 \cdot P_C + k_{OCl2} \cdot P_{O_{Cl}}$$

Ecuación A5. Estado  $CaO_{Cl}$

$$\frac{dP_{CaO_{Cl}}}{dt} = -(k_{O2Cl} + \beta_{Cl2} + k_{OCl4} + [Ca^{2+}]_i \cdot k_{O1Cl}) \cdot P_{CaO_{Cl}} + [Cl^-]_e \cdot k_{OCl3} \cdot P_{CaO} + 2 \cdot [Ca^{2+}]_i \cdot k_{O1Cl} \cdot P_{ClO} + \alpha_{Cl2} \cdot P_{ClC_{Ca}} + 2 \cdot k_{O2Cl} \cdot P_{2CaO_{Cl}}$$

Ecuación A6. Estado  $_{Cl}C_{Ca}$

$$\frac{dP_{_{Cl}C_{Ca}}}{dt} = -(k_{C_2Cl} + \alpha_{Cl_2} + k_{CCl_4} + [Ca^{2+}]_i \cdot k_{C_1Cl}) \cdot P_{_{Cl}C_{Ca}} + [Cl^-]_e \cdot k_{CCl_3} \cdot P_{C_{Ca}} \\ + 2 \cdot [Ca^{2+}]_i \cdot k_{C_1Cl} \cdot P_{C_{Cl}} + \beta_{Cl_2} \cdot P_{_{Ca}O_{Cl}} + 2 \cdot k_{C_2Cl} \cdot P_{_{Cl}C_2Ca}$$

Ecuación A7. Estado  $C_2Ca$

$$\frac{dP_{C_2Ca}}{dt} = -(2 \cdot k_{C_2} + \alpha_3 + [Cl^-]_e \cdot k_{CCl_5}) \cdot P_{C_2Ca} + \beta_3 \cdot P_{_{2Ca}O} + [Ca^{2+}]_i \cdot k_{C_1} \cdot P_{C_{Ca}} \\ + K_{CCl_6} \cdot P_{_{Cl}C_2Ca}$$

Ecuación A8. Estado  $O_2Ca$

$$\frac{dP_{O_2Ca}}{dt} = -(2 \cdot k_{O_2} + \beta_3 + [Cl^-]_e \cdot k_{OCl_5}) \cdot P_{_{2Ca}O} + \alpha_3 \cdot P_{C_2Ca} + [Ca^{2+}]_i \cdot k_{O_1} \cdot P_{_{Ca}O} \\ + K_{OCl_6} \cdot P_{_{2Ca}O_{Cl}}$$

Ecuación A9. Estado  $_{Cl}C_2Ca$

$$\frac{dP_{_{Cl}C_2Ca}}{dt} = -(2 \cdot k_{C_2Cl} + \alpha_{Cl_3} + k_{CCl_6}) \cdot P_{_{Cl}C_2Ca} + \beta_{Cl_3} \cdot P_{_{2Ca}O_{Cl}} + [Ca^{2+}]_i \cdot k_{C_1Cl} \\ \cdot P_{_{Cl}C_{Ca}} + [Cl^-]_e \cdot k_{CCl_5} \cdot P_{C_2Ca}$$

Ecuación A10. Estado  $_{2Ca}O_{Cl}$

$$\frac{dP_{_{2Ca}O_{Cl}}}{dt} = -(2 \cdot k_{O_2Cl} + \beta_{Cl_3} + k_{OCl_6}) \cdot P_{_{2Ca}O_{Cl}} + \alpha_{Cl_3} \cdot P_{_{Cl}C_2Ca} + [Ca^{2+}]_i \cdot k_{O_1Cl} \\ \cdot P_{_{Cl}O_{Ca}} + [Cl^-]_e \cdot k_{OCl_5} \cdot P_{O_2Ca}$$

Ecuación A11. Estado  $C_{Cl}$

$$\frac{dP_{C_{Cl}}}{dt} = -(k_{CCl_2} + \alpha_{Cl_1} + 2 \cdot [Ca^{2+}]_i \cdot k_{C_1Cl}) \cdot P_{C_{Cl}} + [Cl^-]_e \cdot k_{CCl_1} \cdot P_C + \beta_{Cl_1} \cdot P_{_{Cl}O} \\ + k_{C_2Cl} \cdot P_{_{Cl}C_{Ca}}$$

Ecuación A12. Estado  $_{Cl}O$



$$\frac{dP_{clO}}{dt} = -(k_{OCl2} + \beta_{Cl1} + 2 \cdot [Ca^{2+}]_i \cdot k_{O1Cl}) \cdot P_{clO} + [Cl^-]_e \cdot k_{OCl1} \cdot P_O + \alpha_{Cl1} \cdot P_{Ccl} + k_{O2Cl} \cdot P_{caOCl}$$

Para simular la probabilidad de ocupación de un estado dado las ecuaciones diferenciales fueron numéricamente integradas (DotNumerics: Ordinary Differential Equations for C#) usando el método BDF de Gear (Formulas de diferenciación de retroceso). La solución para la probabilidad de ocupación fue hecha para un conjunto de condiciones experimentales que incluían voltaje, concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$ , concentraciones intracelulares y extracelulares de  $[Cl^-]$ . El conjunto de frecuencias de transición junto con sus correspondientes valores listados en la Tabla 3 fueron también incluidas para obtener la probabilidad de ocupación.