

Programa de doctorat Biologia i patologia cel·lulars

Bienni 2003-2005

Universitat de Barcelona

**Comportament funcional heterogeni
de les mutacions *missense* a l'extrem
N-terminal de CFTR**

Tesi doctoral

Co-Directors de tesi

Gemma González Gené

Dra. Teresa Casals i Dr. Josep M. Aran

Centre de Genètica Mèdica i Molecular

Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

Barcelona, 2008

A la meva mare

Agraïments

Mai m'hagués imaginat que arribat aquest moment tingués tants records i tant per agrair. Intento fer un repàs de tot el que he viscut durant aquesta etapa, de tot el que he après professionalment i personalment, i veig una llista interminable. Tot plegat ha estat gràcies a la gent que he tingut al meu voltant, sense vosaltres no ho hagués aconseguit. Procuraré no deixar-me a ningú (encara que amb la meua capacitat de dispersió no serà fàcil) i demanar-vos que pugui seguir agraint-vos tot el vostre suport durant molt de temps.

En primer lloc, m'agradaria agrair a la Tere i al Josep d'haver-me donat aquesta oportunitat. Per deixar-me participar en aquest projecte que m'ha permès créixer científicament i per ensenyar-me els vostres coneixements que em van permetre poder desenvolupar-lo.

A la gent de Genètica, als que estan i als que ja han marxat, a tots els que vau compartir amb mi aquell espai tan laberíntic, però alhora tan entranyable. Sempre vaig poder comptar amb la vostra ajuda i suport quan ho vaig necessitar. Heu sigut tants que em resulta casi impossible nombrar-vos a tots, així que si m'ho permeteu em dedicaré als que més mals de cap van haver de suportar fora i dins del laboratori. Sandra i Juanjo, gràcies per ser uns bons i divertits companys de lab. Sara, gracias por ser mi maestrilla en biología molecular. Javi y Loli, gracias por dejarme urgir en vuestra nevera y por echarme una mano cuando lo necesité. Benja, Montse i Nonia, sempre recordaré quan us vaig conèixer acabada d'arribar al lab, i què fàcilment em vau integrar. David, moltes hores al laboratori i fora compartides, molts moments difícils de resumir, però tots tenen en comú que van ser molt especials. Edu i Carles, al primer per saber transmetre la seva il·lusió per la ciència, no canviïs mai!; i al segon per ser tan encantador (Edu, tú també ets encantador). Marga, sempre intentant donar seny i canya, ja va bé de tant en tant. A les meves nenes, aiiii, que puc dir de les meves nenes que ja no els hi hagi dit en les nostres nits de bailoteo. Ens vam trobar i vam connectar, i encara que soni molt empalagós, va sorgir una molt bona amistat. Itzi, mi flor preferida; Vane C., la meua nena estressada però que sempre troba un racó per escoltar-me; Mon, con nadie me habia desfibrilado tan a gusto; Gollumeta, la pèl-roja més divertida que he conegut mai; Nadia, la pequeña Nadia i Vane V., una altra floreta con una sonrisa muy contagiosa y un corazón muy grande.

Rafael, que grande es mi Rafael. Sin ti los primeros años de tesi no hubieran sido lo mismo (¿a quien le hubiera robado soluciones?), tantas risas compartidas y siempre entendiste mis momentos surrealistas. Añadir que como compañero de piso

también vales un montón y que soportaste con dignidad mi bata a cuadros. Por cierto, cuando sea doctora me presentarás al duendecillo de los erlenmeyers????.

Aubi, la inventora del meu pseudònim "flipy", la meva companya de penes i alegries, i una persona que encara que no s'ho cregui, sempre la tindrè com un referent de gran doctora.

Als de bellvitge, moltes gràcies per acollir-me i fer-me sentir com a casa. Aquella estada que anava a ser curta i que va acabar perllongant-se fins gairebé tres anys, la va convertir en moments que mai oblidaré. Tantes hores en el set-up, on va haver de sentir-me cantar el triki-triki-tri, entenc que devia ser molt dur. Gràcies per "los martes con lili" que van donar molt de si. I per totes les nostres sortides a l'exterior per conèixer món.

Carles moltes gràcies per permetre que m'instal·lés tant de temps en el set-up; Joan, Inma, Mireia, Alex i Adriana, gràcies per fer-me sentir un més del laboratori; Benja, gràcies per instruir-me en l'art del confocal; Jonatan i Anna, gràcies per deixar-me entrar a la vostra dimensió desconeguda; Artur Llobet, gràcies per ensenyar-me el complicat món de l'anàlisi dels registres, sense tu no hagués sabut que fer amb tots aquells resultats. I, evidentment, als Solsonites, per tantes hores compartides, per la vostra ajuda incondicional i per acceptar-me tal com soc. Laia, la meva greca que va haver de renunciar a l'èxit en el món de la música per continuar la seva aventura científica a l'altra banda de l'oceà; Xenia, la gòtica que de tant en tant deixava la seva foscor per il·luminar; Saki, amb els seus rinxols i el seu somriure, gràcies per la teva generositat; Laurikis, moltes gràcies per obrir-me el teu cor i deixar-me veure que darrera de la Laura guerrera hi ha un tros de pa (no t'amoïnis que no li direm a ningú), ets un sol; Marc, el meu confident, un bon amic, i un bon company de laboratori. Sempre disposat tant a ajudar-me amb el set-up, amb les cèl·lules o amb el que calgués, com a convidar-me a disfrutar d'un bon menjar, una bona pel·lícula o de les nostres infinites xerrades; Artur Escalada, el meu mestre del patch, el que em va convertir en un "jedi" del patch, amb la seva paciència i els seus coneixements vaig aprendre una tècnica que em resultava impossible. Gràcies també per ser un bon amic.

Jordi, moltes gràcies per haver estat al meu costat, per fer-me riure, per suportar-me i per la teva paciència, per animar-me i consolar-me. En definitiva, moltes gràcies per ser com ets.

A la gent del LRT2, per escoltar-me en els últims moments, en les últimes correccions i en els moments de nervis de l'última etapa.

Als meus amics, Marta, Mar, biòlegs, etc..., que segurament van patir menys que la resta per compartir-me en els moments d'oci, però que com sempre van estar ben aprop.

A la meva família, als meus tiets, a les meves cosines, a la meva iaia i al meu avi, i en especial a la meva mare, que sense ella i el seu sacrifici mai hauria arribat aquest moment, i a qui li estaré eternament agraïda.

I finalment al Marcel, per patir d'aprop l'última etapa i possiblement la més dura de compartir. Per ajudar-me en les correccions i els últims retocs de la tesi. Per cuidar-me quan estava esgotada. Per perdonar-me i comprendre el meu nerviosisme. Per compartir amb mi la teva vida, i sobretot per estimar-me. Perquè al poc de coneix-se'ns ja em vaig enamorar de tu.

Índex

Introducció

| | |
|---|----|
| I-1. Fibrosi Quística | 23 |
| I-2. Antecedents de la malaltia | 23 |
| I-3. Manifestacions clíniques de la fibrosi quística..... | 24 |
| I-3.1 Sistema respiratori | 25 |
| I-3.2. Sistema digestiu | 28 |
| I-3.3. Aparell reproductor | 28 |
| I-3.4. Glàndules sudorípares | 29 |
| I-4. Diagnòstic de la malaltia | 29 |
| I-5. El gen <i>CFTR</i> | 31 |
| I-5.1. Estructura del gen | 31 |
| I-5.2. Regulació de l'expressió gènica..... | 32 |
| I-5.3. Classificació de mutacions <i>CFTR</i> | 32 |
| I-6. La proteïna CFTR..... | 33 |
| I-6.1. Biogènesi | 33 |
| I-6.1.1. Síntesi, modificacions post-traduccionals i plegament de la proteïna . | 34 |
| I-6.1.2 Degradació de la proteïna..... | 36 |
| I-6.1.3 Tràfic intracel·lular de CFTR..... | 39 |
| I-6.2. Estructura i funció electrofisiològica del canal CFTR..... | 44 |
| I-6.2.1. Els dominis d'unió a nucleòtid | 45 |
| I-6.2.2. El domini Regulador | 49 |
| I-6.2.3. Els dominis transmembrana..... | 51 |
| I-6.2.4. Reguladors de l'activitat electrofisiològica del canal CFTR..... | 53 |
| I-6.2.5. CFTR regulador d'altres canals | 55 |
| I-7. Alteracions en la biogènesi i l'activitat del canal CFTR per mutacions FQ | 56 |
| I-8. Relació entre la disfunció resultant de mutacions CFTR i l'afectació clínica dels pacients cap a una correlació genotip-fenotip | 58 |
| I-9. Teràpies per la Fibrosi Quística | 60 |
| I-9.1. Teràpies futures a nivell molecular | 61 |
| I-9.1.1 Teràpies específiques segons la mutació..... | 62 |
| I-9.1.2 Teràpia gènica | 63 |
| Objectius | 67 |

Materials i mètodes

| | |
|--|----|
| M-1. Clonatge i expressió de mutacions de sentit erroni | 73 |
| M-1.1. Vectors d'expressió | 73 |
| M-1.2. Mutagènesi dirigida | 74 |
| M-1.2.1. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR) | 75 |
| M-1.2.2. Transformació de bacteris | 77 |
| M-1.2.3 Seqüenciació | 77 |
| M-1.3. Clonatges | 79 |
| M-1.4. Cultius cel·lulars eucariotes | 79 |
| M-1.5. Transfeccions | 80 |
| M-2. Anàlisi del processament i la localització de les proteïnes mutants | 80 |
| M-2.1 Control de transfecció | 80 |
| M-2.2. Obtenció i quantificació dels extractes proteics | 81 |
| M-2.3. Anàlisi del processament de las proteïnes mutants | 81 |
| M-2.4. Anàlisi de la localització de les proteïnes mutants | 82 |
| M-2.4.1. Detecció de la proteïna CFTR en la membrana citoplasmàtica | 82 |
| M-2.4.2. Detecció de la proteïna CFTR intracel·lular | 82 |
| M-2.4.3. Adquisició d'imatges | 83 |
| M-3. Mesura de l'activitat dels canals CFTR mutats | 83 |
| M-3.1. Com es mesura l'activitat de CFTR | 83 |
| M-3.2. Registres de patch-clamp en configuració <i>whole cell</i> | 84 |
| M-3.3. Registres de patch-clamp de canal únic en configuració <i>excised inside-out</i> | 85 |
| M-3.4. Anàlisi dels registres de canal únic | 86 |
| M-3.5. Anàlisi estadístic | 87 |
| M-4. Composició de les solucions | 88 |

Resultats

| | |
|---|----|
| R-1. Descripció de les mutacions analitzades | 95 |
| R-1.1. Localització en el canal CFTR | 95 |
| R-1.2. Anàlisi de la conservació dels aminoàcids mutats | 96 |
| R-2. Clonatge i expressió de les diferents mutacions de canvi de sentit estudiades | 97 |
| R-2.1. Clonatge de les mutacions | 97 |
| R-2.2. Control de transfecció | 97 |

| | |
|---|-----|
| R-3. Caracterització de l'efecte de les mutacions en la biogènesi del canal CFTR .. | 98 |
| R-3.1. Processament post-traducciona l de les mutacions a l'extrem N-terminal | 98 |
| R-3.2. Distribució cel·lular | 102 |
| R-4. Anàlisi de l'activitat dels canals CFTR mutats | 105 |
| R-4.1. Electrofisiologia de les mutacions CFTR a l'extrem N-terminal. Configuració <i>whole cell</i> | 105 |
| R-4.2. Anàlisi de l'activitat de canal únic per les mutacions CFTR localitzades a la membrana citoplasmàtica | 111 |
| R-5. Resum de la caracterització funcional de les mutacions estudiades..... | 117 |
| R-6. Correlació entre els trets funcionals de les mutacions estudiades i l'afectació clínica dels pacients | 117 |
| Discussió | 123 |
| Conclusions | 135 |
| Bibliografia | 139 |
| Annex | 155 |

Abreviatures i acrònims

ABC: *ATP Binding Cassette*

ABCD: Agenesia bilateral de conductes deferents

ABP: *ATP Binding Pocket*

A2b-R: Receptor d'adenosina 2b

ADP: Adenosina 5'-difosfat

AMPc: Adenosina 3'-5'-monofosfat cíclica

AMPK: Adenosina monofosfat quinasa/ proteïna quinasa activada per AMP

AFT: Tripèptids estructurats per arginines

ASL: *airway surface liquid*

ATP: Adenosina 5'-trifosfat

AUCD: Agenesia unilateral de conductes deferents

AZ: Azoospermia

B: Bronquiectàcies

β2-AR: Receptor adrenèrgic β2

BCA: àcid bicinconínic

Br: Bronquitis

C: Capacitància

CaCC: *Calcium activated chloride channel*

CAL: *CFTR-associated ligand*

CAP70: *CFTR-associated protein, 70kDa*

cDNA: àcid desoxiribonucleic complementari

C/EBP: *CCAAT-enhancer binding protein*

CFTR: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

CHIP: *Carboxyl terminus of Hsp70 interacting protein*

CK2: Proteïna quinasa 2

COP: Complex del coatàmer

CRE: element de resposta a cAMP

Csps: *Cysteine-string proteins*

Cx: Conexina

Da: Dalton

DGGE: *denaturing gradient gel electrophoresis*

dHPLC: *denaturing high pressure liquid chromatography*

DHS: *DNasa I Hipersensitive site*

DMEM: medi d'Eagle modificat per Dulbecco

DNA: àcid desoxiribonucleic

D.O.: densitat òptica

DTT: 1,4-ditiotretitol-treo-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol

ECL: *enhanced chemiluminescence*

EDTA: àcid etilendiaminotetraacètic
ENaC: *Epithelial Sodium Channel*
ER: Reticle endoplasmàtic
ERAD: *Endoplasmic reticulum associated degradation*
ERC: Compartiment de reciclatge endosomal
ERQC: *Endoplasmic reticulum quality control*
FQ: Fibrosi Quística
G: Conductància
GFP: proteïna verda fluorescent
Gi: Proteïna inhibidora d'unió a GTP
Gs: Proteïna que uneix GTP
GTP: Guanosina 5'-trifosfat
Hepes: àcid N-2-hidroxiètilpiperazina-N'-2-etanosulfònic
HEK293: *Human Embryonic Kidney 293 cells*
HRP: *horseradish peroxidase*
Hsp: *Heat shock protein*
I: Intensitat de corrent
IL: Ili meconial
IP: Insuficiència pancreàtica
Kb: kilobases
LB: medi Luria Bertrani
mEq: miliequivalents
mRNA: àcid ribonucleic missatger
MSD: Membrane spanning domain / **TMD:** *Transmembrane domain*
N: Nombre de molècules
NBD: *Nucleotide binding domain*
NHERF: *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor*
PT: Pneumotorax
ORCC: *Outwardly rectifying chloride channel*
OZ: Oligozoospermia
PBS: *Phosphate buffered saline*
PC: Pancreatitis crònica
PCL: capa de líquid periciliar
PCR: reacció en cadena de la polimerasa
PFA: Paraformaldehid
PKA: proteïna quinasa dependent de AMPc
PKC: proteïna quinasa C
PMSF: fluorur de fenil metil sulfonil

Po: Probabilitat d'obertura

R: Domini regulador

ROMK: *Inward rectifier potassium channel*

SDS: dodecilsulfat sòdic

SDS-PAGE: electroforesi en gel de poliacrilamida en presència de SDS

SLC26: *Solute-linked carrier 26*

SNAP23: *Synaptosome associated 23kDa protein*

SP: suficiència pancreàtica

SSCP: *single strand conformation polymorphism assay*

SV40: *simian virus 40*

τ_0 : Temps mig d'obertura

TGN: *Trans Golgi Network*

t-SNAREs: *target soluble NSF attachment protein receptors*

V: Voltatge

WT: *Wild type*

Introducció

I-1. Fibrosi Quística

La Fibrosi Quística (FQ; MIM# 219700) és una de les malalties letals més comuns en les poblacions d'origen caucàsic, amb herència autosòmica recessiva. El seu fenotip clínic es caracteritza per l'acumulació de moc viscos en òrgans exocrins, amb conseqüències patològiques en el tracte respiratori, gastrointestinal i urogenital. La FQ té gran heterogeneïtat clínica.

Mutacions al gen *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* ABCC7; MIM# 602421) són responsables de la malaltia. Aproximadament, 1 de cada 2500 nadons manifesten la malaltia, amb una freqüència de 1/25 portadors de mutacions al gen *CFTR*, encara que dependrà de l'origen geogràfic i ètnic de les poblacions (1). Fins al moment, ja s'han descrit més de 1600 mutacions en el gen *CFTR* (veure **Cystic Fibrosis Mutation Database**: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). Gairebé el 70% dels al·lels mutants porten una deleció de tres parelles de bases al codó 508 (p.F508del).

I-2. Antecedents de la malaltia

El primer cop que s'emprà el terme Fibrosi Quística va ser per Dorothy Andersen al 1938 (2), ja que va observar un moc obstructiu en els conductes glandulars en la autòpsia d'uns infants desnodrits, que va denominar "Fibrosi quística del pàncrees" per poder distingir-los d'altres pacients celíacs. La malaltia es caracteritzava per la presència de lesions en el pàncrees i la pèrdua de secreció d'enzims pancreàtics que donaven lloc a una desnutrició, i en conseqüència van interpretar que aquestes alteracions provocaven una major vulnerabilitat a infeccions pulmonars. Al 1946, Andersen i Hodges van observar que es tractava d'una malaltia d'origen genètic i que es transmetia amb un patró autosòmic recessiu (3).

Més endavant, un jove pediatra, Paul di Sant' Agnese, va descriure per primer cop, que hi havia un excés de clorur sòdic en la suor dels nens afectats per FQ (4). Però no va ser fins 10 anys més tard que Gibson i Cooke (5) van establir un mètode de quantificació de la concentració de sals a la suor per poder ser utilitzat com a test de diagnòstic de la malaltia. L'any 1983, Paul Quinton va identificar el transport anormal de clorur en les glàndules de la suor de les cèl·lules epitelials (6); i al mateix temps, Knowles i col.laboradors (7) i Boucher i col.laboradors (8) van observar un increment en la reabsorció del sodi en l'epiteli respiratori.

El gen *CFTR* s'identificà per tècniques de clonatge posicional al 1989 (9-11). Tres grups de recerca van estar implicats, Lap-Chee Tsui i John Riordan del "Hospital for Sick Children", Toronto, i Francis Collins de la Universitat de Michigan. Va ser el primer gen trobat per clonatge posicional, la funció del qual es desconeixia completament. Un cop clonat, la dècada dels 90 es convertí en una època on s'avançà considerablement en el coneixement de l'estructura i la funció del producte del gen, convertint-se el gen i el seu producte en potencials dianes terapèutiques.

Actualment es diagnostiquen FQ aquells pacients que presenten una disfunció en el canal de clorur regulat per AMPc, és a dir, en el canal CFTR.

I-3. Manifestacions clíniques de la fibrosi quística

La FQ és una malaltia multisistèmica. Els símptomes de la malaltia no segueixen la mateixa severitat en tots els individus afectats, manifestant-se amb una gran variabilitat clínica. La pèrdua de funció pulmonar és el principal problema en els malalts amb FQ.

Tenint en compte la gran heterogeneïtat clínica observada entre els malalts amb FQ, *THE DIAGNOSTIC WORKING GROUP* va proposar la següent classificació (12), basada en els nivells de clorur a la suor i la presència de manifestacions clíniques associades a la malaltia: un diagnòstic de **Fibrosi Quística clàssica o típica** el rebran aquells pacients que presentin una o més característiques fenotípiques i valors de clorur a la suor superiors a 60 mEq/L. Les manifestacions clíniques poden ser: malaltia sinopulmonar crònica, alteracions gastrointestinals, síndromes de pèrdua de sal, i trastorns en el tracte genital masculí. Els malalts amb FQ clàssica podran tenir insuficiència pancreàtica (IP) exocrina o bé suficiència pancreàtica (SP).

Per altra banda, es diagnosticaran amb **Fibrosi Quística no-clàssica o atípica**, aquells pacients que tinguin afectat almenys un òrgan i que presentin un valor de clorur a la suor normal (30 mEq/L) o tocant el límit (30-60 mEq/L). Aquests individus requeriran una confirmació del diagnòstic mitjançant la detecció d'una mutació causant de la malaltia en cadascun dels gens *CFTR* o bé la quantificació directa del mal funcionament del canal CFTR a través de la mesura de la diferència del potencial nasal. Dins d'aquest grup trobem malalts amb manifestacions clíniques multiorgàniques, i també d'altres que només les presenten en un sol òrgan. La majoria d'aquests pacients presenten SP i severitat mitja en la pèrdua de funció pulmonar.

Tradicionalment, la FQ es diagnosticava en una edat primerenca, però darrerament existeix un nombre creixent de pacients diagnosticats en edat adulta, amb formes atípiques de la malaltia. Aquesta classificació pot ajudar al diagnòstic però no s'ha de considerar rígidament, ja que no existeix una barrera clara entre ambdós grups. La gran heterogeneïtat clínica pot ser deguda a diferents factors, a més del genotip CFTR, com els modificadors genètics, els factors ambientals, i fins i tot els efectes dels tractaments terapèutics.

I-3.1 Sistema respiratori

La patologia pulmonar és la major causa de morbiditat i mortalitat en els pacients amb FQ. Estudis patològics indiquen que els pacients amb FQ, en el seu naixement, tenen un fenotip pulmonar gairebé normal, a diferència del pàncrees i els intestins que ja poden trobar-se danyats.

Un tret característic de les vies respiratòries dels pacients amb FQ són les infeccions bacterianes recurrents, sent la soca predominant *Pseudomonas aeruginosa*, i una manca d'efectivitat dels mecanismes de defensa innats de les vies respiratòries.

El líquid de la superfície de les vies respiratòries, (*airway surface liquid*, **ASL**), està format per dues capes, una d'elles és una capa de mucositat i l'altra la capa de líquid periciliar (PCL), que presenta normalment la mateixa alçada que els cilis (7-10 μm) (veure figura 1). La capa de mucositat està constituïda per les mucines secretades d'alt pes molecular i permet que quedin atrapades les partícules inhalades. Aquesta capa es pot veure alterada per canvis en el contingut d'aigua, en la concentració d'ions i en el pH. La capa de PCL és finament regulada, de manera que tingui una viscositat apropiada per al correcte batec dels cilis, i poder lubricar el gel format per les mucines secretades des de la superfície cel·lular (13).

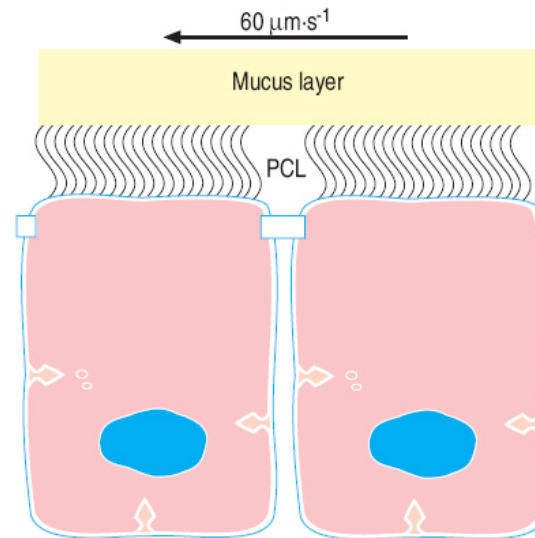


Figura 1. Esquema de les parts que constitueixen el líquid de la superfície de les vies respiratòries (ASL, sigles que provenen de *airway surface liquid*). Format per dues capes, la capa de líquid periciliar (PCL) i la capa de moc (*mucus layer*). En condicions normals la capa de moc és transportada a $60 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Adaptat de Boucher, *Eur. Respir. J.*, 2004 (14).

Tenint en compte el greu problema que suposa pels malalts FQ aquestes infeccions permanents, han estat proposades diverses hipòtesis sobre com les mutacions en el gen *CFTR* poden ser-ne la causa. Entre d'altres, hi ha la hipòtesi hipertònica, que es basa en la possible pèrdua d'activitat que poden patir els pèptids antimicrobians degut a la seva sensibilitat als canvis de concentració de les sals presents en l'ASL, necessitant per ser actius la capa hipotònica (50 mM NaCl) (15-17). Tot i així, sembla ser que després de nombrosos estudis intentant mesurar la tonicitat de ASL, no es detecten diferències entre pacients FQ i població control.

En els darrers anys, diversos estudis han proposat el moviment mecànic com el principal mecanisme de defensa contra les infeccions bacterianes. El transport del moc, degut al moviment mecànic ciliar, recanvia els bacteris de les vies respiratòries aproximadament cada 6 h en condicions normals; l'activitat antimicrobiana de la lactoferrina i el lisozim és suficient per evitar el creixement bacterià durant aquest interval de temps. Un transport eficient del moc requereix d'una capa de PCL ben definida i un volum d'ASL adequat. En el cas de les cèl·lules FQ, es creu que la pèrdua de funció dels canals *CFTR* i la manca d'inhibició dels canals de Na^+ (ENaC) provoca una depleció de PCL (ja que aquesta capa pateix una deshidratació), donant lloc a una acumulació de mucositat espessa, i per tant obstaculitzant el moviment ciliar. Estudis morfològics han mostrat que l'alçada de PCL en cèl·lules FQ és d'aproximadament $3 \mu\text{m}$ (14, 18).

L'epiteli normal té un bon consum d'oxigen, i no crea un gradient en la pressió de l'oxigen en la capa d'ASL (veure fig. 2a). En canvi, en l'epiteli FQ, la depleció de PCL i l'increment del gruix de la capa de moc viscós genera gradients d'hipòxia, degut a una disminució en la difusió de l'oxigen i a un increment en el seu consum per part de les cèl·lules epitelials (veure fig. 2b i 2c).

Les partícules inhalades, entre elles els patògens, queden retingudes en el moc viscós. *P. aeruginosa* té la capacitat de migrar a través d'aquest moc espès cap a les zones hipòxiques i un cop allà augmentar la secreció d'alginats per formar microcolònies, i finalment convertir-se en biofilm. Els neutròfils no poden penetrar aquest moc espès i els factors antimicrobians tenen grans dificultats en migrar, mantenint-se un ambient favorable per a la proliferació bacteriana (veure fig. 2d, 2e i 2f).

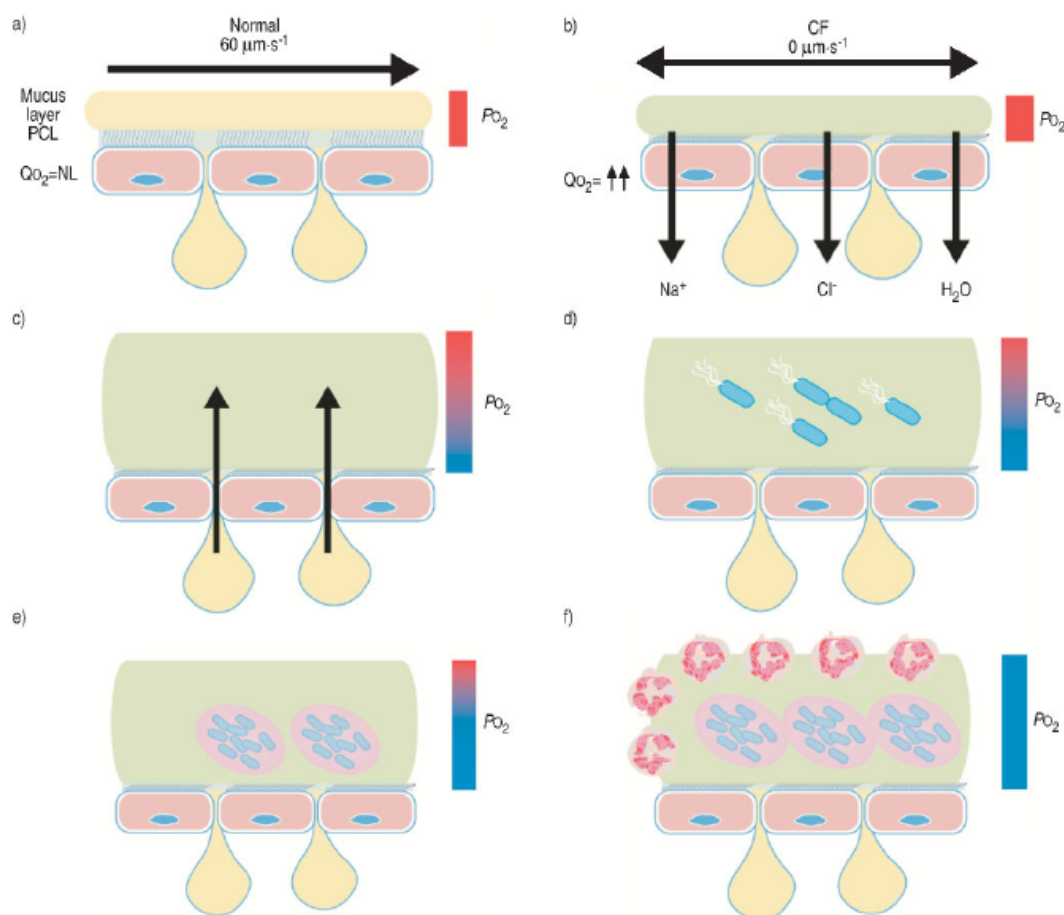


Figura 2. Esquema hipotètic dels processos que donen lloc a la colonització crònica de *Pseudomonas aeruginosa*. (2a) Volum adequat de la capa de ASL, per mantenir un consum d'oxigen. En les cèl·lules FQ (2b), la depleció de PCL provoca una reducció del transport de les mucines i (2c) una hipersecreció de moc, creant-se un gradient en la pressió parcial d'oxigen. (2d) *Pseudomonas aeruginosa* migra a través d'aquest moc, (2e) secretant

alginats, per formar microcolònies i més endavant biofilms. (2f) Els neutròfils no poden travessar aquesta capa de moc tan espès. Adaptada de Boucher, Eur. Respir. J., 2004 (14).

I-3.2. Sistema digestiu

Un 85% dels pacients FQ pateix IP des del naixement, i aproximadament un 3% acaben desenvolupant la pèrdua de la seva funció gradualment en el temps. El transport deficient de clorur i un intercanvi insuficient de bicarbonat degut a la disfunció de CFTR, provoquen una baixa secreció de suc pancreàtic.

L'obstrucció pancreàtica pot causar quists i destrucció del teixit; en estudis *postmortem*, el pàncrees d'aquests pacients mostra alteracions característiques que consisteixen en atròfia acinar, fibrosi, reemplaçament per greix i obstrucció dels conductes proximals. Amb l'edat el teixit apareix desorganitzat, amb obstrucció total dels conductes i desaparició dels acini degut a l'alliberació de les proteases. El resultat final és que el teixit pancreàtic es substituït per greix amb pèrdua funcional pancreàtica. A més, sembla que es promou la formació de taps proteics que també contribueixen a l'obstrucció ductal.

El dany del teixit pancreàtic i la pèrdua de secreció enzimàtica exocrina pancreàtica poden ocasionar una deficiència nutricional. L'obstrucció dels conductes pancreàtics i de les glàndules intestinals provoquen problemes digestius i una absorció pobre en greixos, proteïnes i vitamines, especialment en A, D, E i K. Tot plegat, comporta deficiències nutricionals i un retard en el creixement i el desenvolupament del nen (19). A més, molts nadons presenten una obstrucció intestinal severa (aproximadament un 15-20% dels nens amb FQ presenten ili meconial).

La secreció del fluid ductal es marcadament reduïda, provocant que els conductes es bloquegin degut a la precipitació enzimàtica i l'acumulació de moc. Pacients amb FQ, també presenten afectació hepàtica deguda al bloqueig dels conductes biliars per secrecions espesses, lligada normalment a IP.

I-3.3. Aparell reproductor

Un 98% dels pacients masculins presenten alteracions als conductes de Wolf (20). Els conductes deferents, l'epidídim i les vesícules seminals estan atrofiats o són absents, donant lloc a absència d'espermatozous (azoospermia obstructiva). Només un 2-3% dels homes afectats són fèrtils. L'agenèsia congènita de conductes

deferents, que comporta infertilitat, es pot donar de forma aïllada, o com una manifestació més de la malaltia (21, 22).

I-3.4. Glàndules sudorípares

Les glàndules sudorípares secreten aigua amb sals utilitzant dos mecanismes en paral·lel. El principal problema funcional en els malalts FQ és la dificultat que tenen en la reabsorció de clorur sòdic, sent el canal de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ el que compensa en part la pèrdua de sal. Les glàndules sudorípares dels pacients tenen una elevada concentració de clorur sòdic i potassi (23).

I-4. Diagnòstic de la malaltia

Un diagnòstic positiu de FQ a grans trets es basa en la detecció de nivells de clorur a la suor iguals o superiors a 60 mmol/l, lligat a criteris clínics, i a un genotip *CFTR* associat.

Si existeix una sospita clínica el diagnòstic s'iniciarà mitjançant un test de la suor; en el cas d'obtenir un resultat positiu, es realitzarà un segon test de suor confirmatiu (veure figura 3). Posteriorment, si els nivells de clorur a la suor confirmen el diagnòstic, es farà un test de DNA confirmatiu. I així seguidament fins obtenir un diagnòstic el més acurat possible (veure figura 3). En el cas dels pacients amb un test de suor dubtós, la mesura de la diferència de potencial nasal, pot servir d'ajuda per un diagnòstic correcte. En els casos en què la sospita clínica prové de manifestacions clíniques lleus relacionades amb un diagnòstic de FQ atípica, és més convenient començar per un test genètic.

El coneixement del gen responsable de FQ, permet fer una anàlisi mutacional del gen *CFTR*. Actualment, existeixen diversos tests comercials per detectar les mutacions més comuns que permeten identificar al voltant d'un 80% dels al·lels FQ. Existeixen altres proves de cribatge mutacional com els assaigs de DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), dHPLC (*denaturing high pressure liquid chromatography*), SSCP (*single strand conformation polymorphism*) i la seqüenciació directa. L'anàlisi molecular és essencial per la detecció de portadors i pel diagnòstic prenatal i preimplantacional.

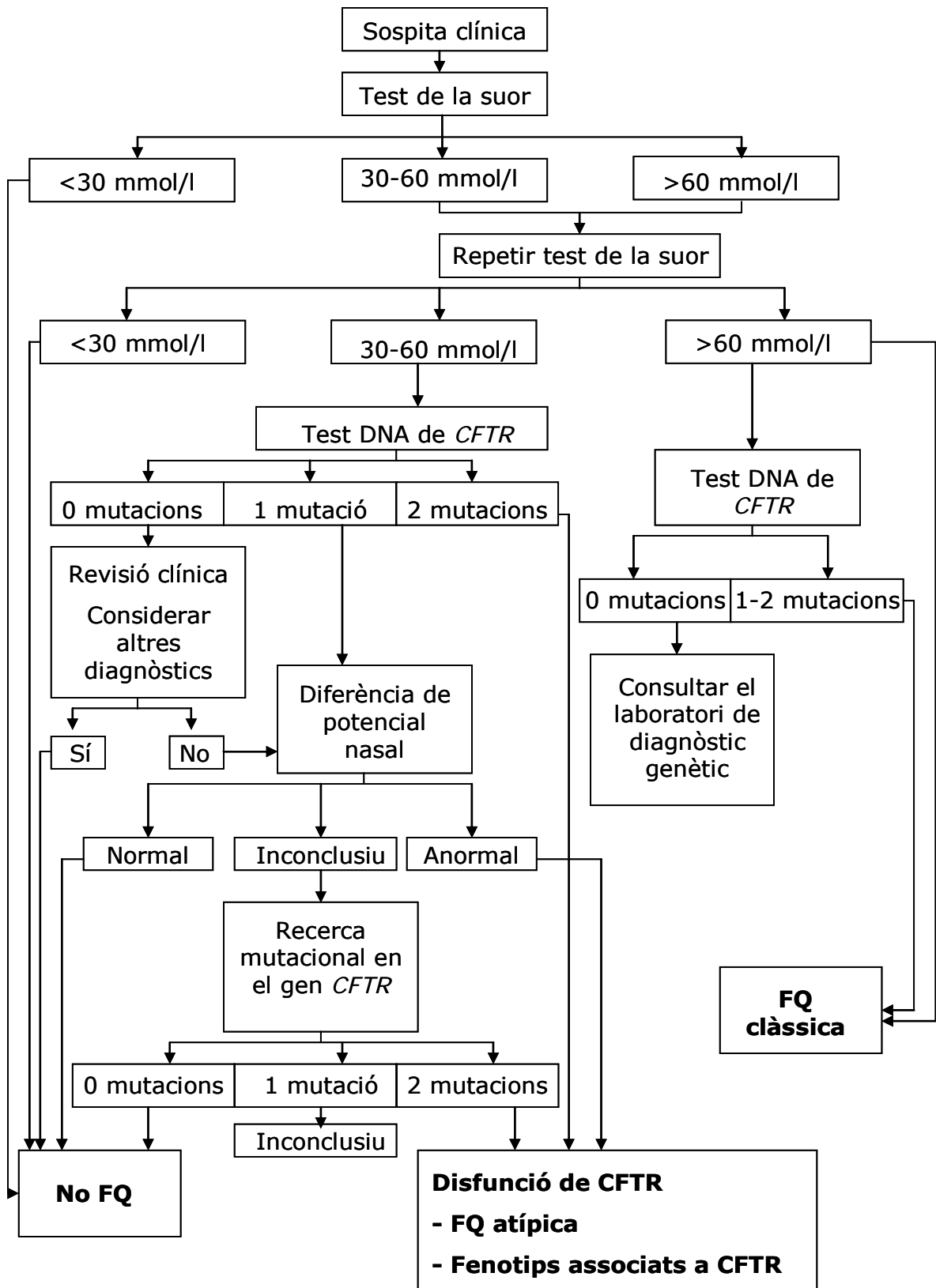


Figura 3. Algoritme per un diagnòstic confirmatiu de FQ, començant per un test de suor. Adaptada de Boeck De K, Thorax 2006 (12).

I-5. El gen *CFTR*

I-5.1. Estructura del gen

Al 1989, el gen responsable de la FQ va ser identificat per tècniques de clonatge posicional i es localitzà en el braç llarg del cromosoma 7 (7q31.2) (9-11). El gen de la FQ, que s'anomena *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (*CFTR*), té una mida d'aproximadament 190 kb (24), format per 27 exons que donen lloc a un transcrit de 6.1 kb (veure fig. 4). El gen codifica per una proteïna de 1480 aminoàcids (10).

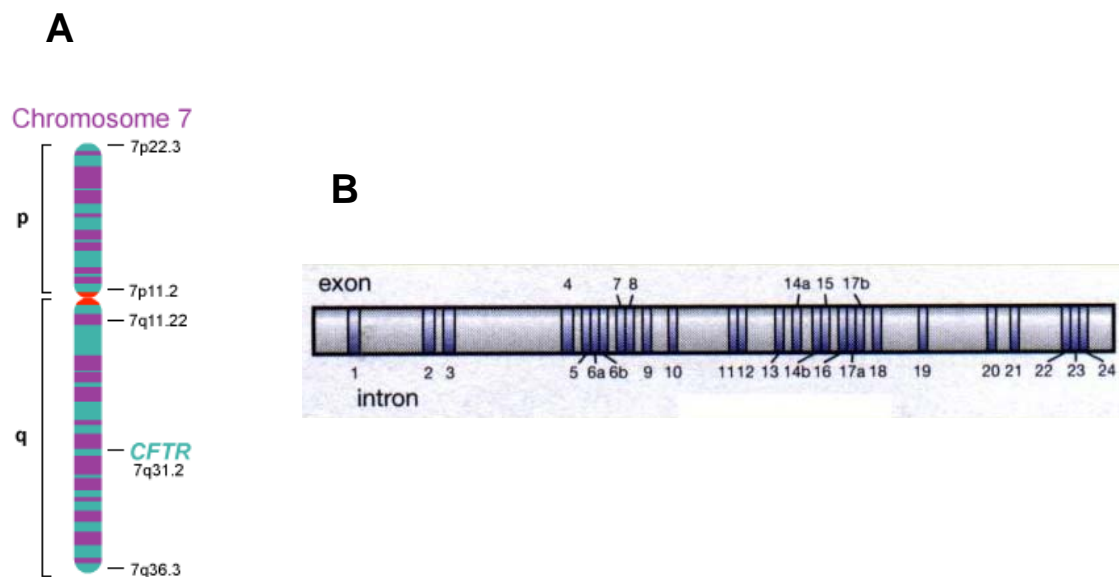


Figura 4. A) Localització del gen *CFTR* en el braç llarg del cromosoma 7, posició 7q31.2. Imatge obtinguda de la web www.thetech.org/genetics/ask. **B)** Esquema de l'estructura genòmica del gen *CFTR*.

L'anàlisi de 3.8 Kb de la seqüència genòmica anterior a l'exó 1 ha revelat la inexistència d'una caixa TATA, però també s'ha vist que existeix una zona rica en GC (65%), diferents llocs d'inici de transcripció, i potencials llocs d'unió dels factors de transcripció AP-1 i Sp1. També s'han detectat altres elements de regulació en aquesta regió com elements CRE (element de resposta a cAMP), C/EBP (*CCAAT-enhancer binding protein*) i elements de resposta a glucocorticoides (25).

I-5.2. Regulació de l'expressió gènica

El gen *CFTR* és regulat finament en el seu patró d'expressió espacial i temporal. El precís mecanisme de regulació encara no està completament resolt.

L'existència d'una gran varietat de llocs d'inici de la transcripció podria proporcionar una regulació específica de teixit i regulació temporal de l'expressió de *CFTR*, segons el tipus cel·lular, òrgan o organisme (26). També s'han observat dos exons alternatius a 5' en altres espècies, que podrien proveir a l'organisme d'una regulació a nivell del desenvolupament (25).

Diversos estudis han portat a la conclusió que la majoria d'elements reguladors de l'expressió del gen *CFTR* no es troben a la regió promotora. Per tant s'han analitzat les 190 Kb que ocupa el DNA genòmic de *CFTR* en busca d'altres elements reguladors, mitjançant la detecció de llocs hipersensibles a la DNasa I (DHS). Molts d'aquests llocs encara s'està comprovant si tenen un paper en la regulació del gen (25).

Un altre sistema de regulació del patró d'expressió específic de teixit i temporal que utilitzen les cèl·lules és mitjançant el procés d'empalmament alternatiu (26). El gen *CFTR* durant la seva transcripció pot patir diferents empalmaments alternatius, com la pèrdua de l'exó 4, de l'exó 5, de l'exó 9, de l'exó 12, la inserció de 119 pb a l'intró 10, i la pèrdua de 145 pb corresponents als exons 13 i 14, anomenat TRN-*CFTR*, que provoca un canvi de pauta de lectura i una codó de parada prematura a l'exó 14. L'empalmament alternatiu TRN-*CFTR* dona lloc a una proteïna truncada formada per l'extrem N-terminal, la primera regió transmembrana, el primer domini d'unió a nucleòtid i el domini regulador. La pèrdua de l'exó 5 s'expressa exclusivament al cor. La de l'exó 9 es troba majoritàriament als conductes deferents. La proteïna truncada TRN-*CFTR* es caracteritza per tenir una funció similar a la proteïna no truncada, però amb majors dificultats per arribar a la membrana cel·lular (27). L'expressió d'aquest transcrit és específica de teixit, a la mèdula renal, i temporal, durant el desenvolupament la proteïna no truncada va reemplaçant a la proteïna truncada (28).

I-5.3. Classificació de mutacions *CFTR*

Des del descobriment del gen *CFTR*, més de 1600 mutacions han estat descrites. De totes elles, menys de 20 mutacions tenen una freqüència superior al 0.1%, excepte la mutació p.F508del (amb una freqüència al voltant del 70%).

La gran majoria són mutacions puntuals de les quals: 42% són mutacions de sentit erroni (*missense*), 15% són petites insercions o delecions que afecten al marc de lectura (*frameshift*), 10% són mutacions sense sentit (*nonsense*), 12% són mutacions d'empalmament alternatiu (*splicing*), un 3% són grans delecions i insercions i un 0.5% són mutacions en la regió promotora (29).

Les mutacions en el gen *CFTR* es poden classificar en quatre grups segons les conseqüències clíniques a les han estat associades: 1. mutacions associades a FQ, 2. mutacions associades a fenotips clínics relacionats amb *CFTR*, 3. mutacions amb expressió clínica desconeguda o incerta, 4. mutacions sense expressió clínica (29).

I-6. La proteïna CFTR

I-6.1. Biogènesi

El gen *CFTR* codifica per una proteïna de membrana de 1480 aminoàcids, que pertany a la gran família dels transportadors ABC, sigles que provenen d'*ATP-Binding Cassette Transporters*, família de proteïnes que es troben tant en procariotes com en eucariotes. En tots els transportadors ABC trobem dominis d'unió a ATP, i utilitzen la seva energia per conduir molècules a través de la membrana. La proteïna CFTR presenta una estructura simètrica (veure fig.5), formada per dos motius repetits, cadascun d'ells format per una regió transmembrana (TMD), composta per sis α -hèlix, i una regió citosòlica hidrofílica d'unió a ATP (NBD). Aquests dos motius queden units mitjançant un domini regulador (R), citosòlic i hidrofílic, que és fosforilat per PKA i PKC. Estructura comú en tots els membres dels transportadors ABC, excepte el domini R, que només s'ha detectat a CFTR. Els extrems amino i carboxi terminal són citoplasmàtics.

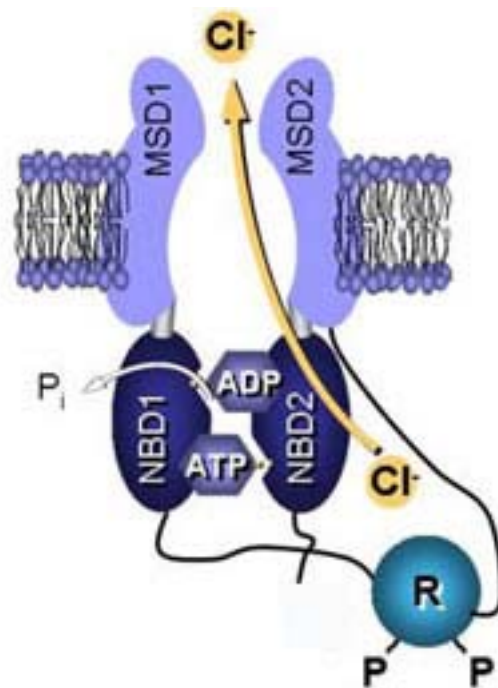


Figura 5. Representació esquemàtica de la proteïna CFTR, on podem observar els dos dominis transmembrana (MSD1 i MSD2), els dos dominis d'unió a nucleòtid (NBD1 i NBD2) i el domini regulador (R). Imatge adaptada de www.bristol.ac.uk/.../davidsheppard/photo1.jpg.

Durant el transport co-traduccional a través del translocó Sec 61, el polipèptid de CFTR s'integra en el reticle endoplasmàtic, on es durà a terme el procés de N-glicosilació; amb aquest procés la proteïna passarà d'un pes de 130 KDa a 145 KDa. Posteriorment, amb l'ajuda de molècules xaperones, com la calnexina, Hsp70 o Hsp90, el polipèptid adoptarà la conformació correcta, evitant la degradació del proteosoma, i serà conduït fins a l'aparell de Golgi. Un cop en aquest compartiment, la glicosilació serà modificada per donar lloc a una proteïna madura de 170 KDa. Aquesta conformació serà la que li permetrà ser transportada fins a la membrana citoplasmàtica i funcionar com a canal de clorur. Un cop a la membrana, la proteïna CFTR entrarà en cicles de reciclatge mitjançant endocitosi a través de vesícules de clatrina (30).

I-6.1.1. Síntesi, modificacions post-traduccionals i plegament de la proteïna

La biogènesi de CFTR comença en el reticle endoplasmàtic (ER), on troba l'ambient apropiat per la síntesi, l'oligomerització i el plegament; i s'obté la proteïna

correctament plegada amb les glicosilacions essencials, anomenant-se també a la proteïna resultant, forma precursora immadura. Aquest procés inicial requereix la coordinació entre els components del citosol, del lumen i de la bicapa lipídica del ER. Els segments transmembrana hauran de ser plegats acuradament, i sembla ser que la clau del seu plegament i de la correcta orientació depèn d'una bona associació amb els lípids de membrana. Tot plegat és facilitat pel complex format pel porus translocó Sec61 i el ribosoma. Aquest complex estableix principalment la topologia dels segments transmembrana i dels seus llaços hidrofílics connectors, durant els estadis inicials del plegament (31).

Tots els components del control de qualitat del plegament del ER (ERQC) actuen en coordinació amb els components responsables de la degradació associats al ER (ERAD), que s'encarreguen de marcar aquelles proteïnes mal plegades i així ser conduïdes a la via de degradació del proteosoma (32).

El correcte plegament de les proteïnes dependrà tant de la seqüència primària de la proteïna (factors intrínsecs estructurals) com de les molècules acompanyadores (factors extrínsecs) (33).

Factors intrínsecs estructurals

Hi ha estudis on mostren que la substitució de la glicina en la posició 550 per àcid glutàmic (G550E) o un àcid glutàmic a la 539 per una treonina (E539T), en cis amb F508del, permeten que la proteïna arribi fins la membrana citoplasmàtica i funcioni com a canal (34). En altres estudis han vist que substituint per lisines les quatre arginines (R₂₉QR₃₁, R₅₁₆YR₅₁₈, R₅₅₃AR₅₅₅, and R₇₆₄RR₇₆₆), que formen part de les seqüències senyalitzadores de retenció en el ER anomenades tripèptids estructurats per arginines (AFT), permeten que F508del es localitzi a la membrana citoplasmàtica i actuï parcialment com a canal (35).

Factors extrínsecs

Diverses proteïnes xaperones estan implicades en la regulació de la biosíntesi i del plegament de CFTR, encara que moltes d'elles tindran diferents efectes en CFTR segons com s'acomplexin entre elles. Les podem trobar en tots els compartiments cel·lulars.

Algunes xaperones acompanyen directament a CFTR, com la lectina calnexina, que es troba al lumen del ER, o com els complexos citosòlics Hsc-Hsp40/70 i Hsp90; i d'altres modulen l'efecte d'aquestes. Fins al moment s'han estudiat algunes d'elles, com Hsc70/Hsp70-Hdj-1/2 (36-38), calnexina (39, 40), CHIP (41), Hsp90 (42),

HspBP1 (43), Bag-2 (44), i recentment s'ha descobert també la implicació de la proteïna Aha-1 en el complex Hsp90 (45), però es creu que existeixen altres molècules encara per descobrir.

Els complexos Hsc70/Hsp70 i Hsp90 actuen com a primer punt de control en la biogènesi de la proteïna, facilitant el plegament i estabilitzant CFTR en les primeres etapes del seu processament. Hsc70/Hsp70 segons la proteïna amb la que interaccioni té una funció estabilitzadora, o bé un paper en la degradació de la proteïna CFTR, per exemple quan s'associa amb Hdj-1 o Hdj-2 afavoreix el plegament correcte de la proteïna (36, 37). El segon punt de control de qualitat en el processament de CFTR el tenim a través de la Calnexina, que també té un doble paper en la regulació del plegament de la proteïna (40). El cicle de control de qualitat de la calnexina comença amb el procés anomenat N-glicosilació, on estructures d'oligosacàrids formades per 14 unitats són adicionades per les oligosacariiltransferases a les regions consens Asn-X-Ser/Thr de les noves cadenes polipeptídiques que es van formant en el ER. La unió dels oligosacàrids tindrà lloc en les posicions aminoacídiques Asn894 i Asn900 de CFTR (40). Aquestes estructures formades per 2 N-acetilglucosamines (GlcNAc), 9 manoses (Man) i 3 glucoses (Glc), actuen com a codis de reconeixement dins del ER. Els tres residus de glucosa són els responsables de que es produeixi la unió de la calnexina a CFTR. Un cop la calnexina es troba unida a CFTR, l'estructura glucídica formada per GlcNAc₂-Man₉-Glc₃ serà reconeguda per les α -glucosidases I i II, que aniran tallant els residus de glucosa seqüencialment. La dissociació de la calnexina de CFTR serà simultània al procés d'eliminar el tercer residu de glucosa. Si el plegament de la proteïna és correcte, CFTR continuarà per la via de secreció cap a l'aparell de Golgi. Si el plegament és incorrecte, l'enzim UDP-glicoproteïna glucosiltransferasa (UGGT) ho reconeixerà i serà el responsable de tornar a glicosilar CFTR, forçant un altre cop la unió de la calnexina, i provocant que la proteïna CFTR torni al cicle de la calnexina, fins que s'aconsegueixi un plegament correcte. Es creu però, que en cada volta del cicle, alguna d'aquestes molècules mal plegades són reconegudes per l'enzim α -manosidasa, que s'encarrega de treure una manosa de la cadena glucídica, i això comporta la formació de l'isòmer Man8B que és reconegut per una altra lectina, i el condueix a la via de degradació del proteosoma (46).

I-6.1.2 Degradació de la proteïna

Moltes de les mutacions identificades en el gen *CFTR* afecten la capacitat de la proteïna a madurar i ser plegada correctament. Entre aquestes mutacions tenim la

mutació més freqüent, la p.F508del. La pèrdua d'aquest triplet en el NBD1 afecta el plegament de la proteïna en el ER, provocant la degradació prematura de la proteïna (32, 47). Farinha i Amaral proposen un nou model on tindríem dos vies de control diferents de la degradació de la proteïna CFTR amb una conformació incorrecta. Per una banda, el primer punt de control de qualitat, Hsc70, seria la via majoritària de degradació de la proteïna p.F508del, sent una via independent de calnexina. I per altra banda, la proteïna WT seguiria el seu processament, i abans de ser transportada a l'aparell de Golgi, una part seria degradada mitjançant calnexina (veure fig. 6) (39).

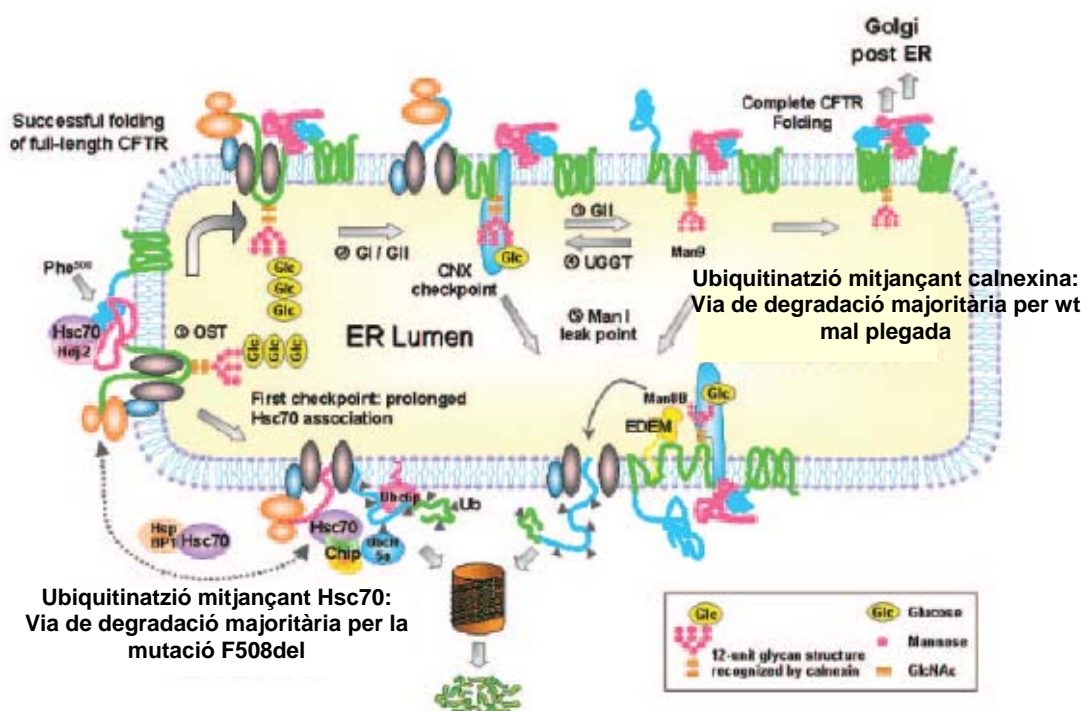


Figura 6. Farinha i Amaral proposen dos punts de control en el reticle endoplasmàtic. Una via inicial independent de calnexina (via de degradació majoritària de F508del) i associada a la xaperona Hsc70; i una via posterior dependent de calnexina, on es donarà el procés de N-glicosilació. Adaptat de Farinha & Amaral, 2005 (39)

Tot el conjunt de proteïna amb un plegament incorrecte serà degradat pel complex citosòlic del proteosoma 26S dependent de ubiquitina. El complex 26S està format per diferents proteases i ATPases. Aquest complex degradarà aquelles proteïnes marcades amb cadenes llargues d'ubiquitina.

La co-xaperona CHIP té un motiu *Telomere repeat binding factor* (TRF) d'unió a Hsc70, i un motiu U-box d'unió a E4, factor de la família dels poliubiquitinadors, que interacciona amb el complex del proteosoma. La sobreexpressió de la proteïna CHIP, dóna lloc a un increment de les molècules de CFTR marcades amb ubiquitina; sent el complex CHIP-Hsc70 el responsable de marcar les proteïnes de CFTR incorrectament plegades per a la seva degradació (41). Per altra banda HspBP1 interfereix en la degradació induïda per CHIP, afavorint la maduració de CFTR (43). Hi ha altres molècules xaperones que s'uneixen a Hsc70, com les Csps (*Cysteine-string proteins*) que modulen la biogènesi de CFTR. S'ha detectat la unió directa d'aquestes proteïnes a l'extrem N-terminal i al domini regulador de CFTR, tant en el ER com a la membrana citoplasmàtica, i la seva sobreexpressió evita el transport de CFTR a la membrana citoplasmàtica i disminueix la resposta de CFTR a l'estimulació per AMPc (48, 49).

La proteïna CFTR marcada per la seva degradació haurà de sortir al citosol, i per fer-ho utilitzarà el porus format pel translocó Sec61. Un obstacle important en la degradació de les proteïnes de membrana és fer accessible el substrat a les proteases citosòliques o extracitosòliques. La degradació de CFTR es podria iniciar en diversos llocs de la proteïna al mateix temps (50), sent CFTR accessible al proteosoma i a la seva degradació mitjançant diferents vies.

La proteïna p97, una de les ATPases del complex 26S, facilita la degradació dels segments transmembrana, ajudant a l'extracció de CFTR del ER i així fent accessible els segments transmembrana al proteosoma 26S. p97 no és imprescindible, però és molt important en la via de degradació dels TMD; en canvi la degradació dels dominis citosòlics de CFTR són completament independents de p97 (51). Recentment, s'ha demostrat que en combinació amb p97, la proteïna Derlin-1 també està implicada en reconèixer la proteïna CFTR mal plegada, concretament en etapes inicials de la seva biogènesi, segurament degut a que es capaç de detectar una inestabilitat estructural en el primer domini transmembrana de CFTR. Sun i col.laboradors (52) observen la capacitat de Derlin-1 de degradar els fragments N-terminal de CFTR, però quan aquests fragments, ja incorporen altres dominis de la proteïna, la seva eficàcia degradativa disminueix considerablement (53). Segons el sistema cel·lular que s'estudiï, només un 60% del total de les proteïnes es plegaran i maduraran correctament en el ER, i seran transportades a l'aparell de Golgi i posteriorment a la membrana cel·lular.

I-6.1.3 Tràfic intracel·lular de CFTR

En el "cicle de vida" de la proteïna CFTR es poden identificar fins a quatre vies de tràfic intracel·lular de la proteïna a diferents compartiments de la cèl·lula. En primer lloc tindríem la ruta de síntesi, maduració i tràfic des del ER; una altra ruta és el reciclatge de CFTR de la membrana fins als endosòmes primerencs; un cop reciclada, el retorn d'aquesta a la membrana citoplasmàtica seria la tercera; i per últim tindríem la via de CFTR endocitada i marcada per la seva degradació.

Ruta de síntesi, maduració i tràfic des del ER

Les proteïnes plegades correctament seran transportades des del ER fins les vesícules de l'aparell de Golgi i posteriorment fins la membrana citoplasmàtica mitjançant la maquinària del complex del coatàmer II (COPII). La proteïna CFTR necessita en la seva seqüència el motiu diacídic amb tirosina per a que el complex COPII la reconegui i la condueixi fins a l'aparell de Golgi. Wang i col·laboradors van detectar el motiu YKDAD, en els residus 563-567, en el NBD1 (54). Posteriorment, Yu i col·laboradors també van observar COPI en la biogènesi de CFTR, però a diferència de COPII, no es requereix pel transport fins a la membrana. Els autors suggereixen que podria actuar com a xaperona en el transport de reciclatge entre l'aparell de Golgi i ER (55). Estudis més recents sobre la implicació de COPI indiquen que alguns components, com β -COP, serien necessaris per a que CFTR pugui funcionar correctament com a canal de clorur (56).

Ruta d'endocitosi i reciclatge

La densitat de CFTR a la membrana també dependrà dels processos d'endocitosi i reciclatge, convertint-se en el segon mecanisme que té la cèl·lula per regular la secreció de clorur a través de CFTR en les cèl·lules epitelials. La proteïna CFTR és endocitada de la membrana exclusivament a través de vesícules de clatrina. No és pot excloure totalment la possibilitat de que existeixin quantitats molt petites de proteïna que siguin endocitades mitjançant caveoles, però si així fos, seria l'opció minoritària.

En general, CFTR és endocitada de la membrana amb una freqüència molt similar a receptors de nutrients o molècules senyalitzadores, proteïnes associades a una endocitosi a través de clatrina molt eficient. Si considerem la ràpida internalització de CFTR (5-10%/min) i la limitada taxa de proteïna traduïda, ens porta a la

conclusió que el retorn de proteïna endocitada a la membrana citoplasmàtica és un punt clau de control del nombre de canals a la membrana (57).

La clatrina està implicada en la internalització de CFTR. Aquest procés dependrà del reconeixement dels motius endocítics per part de l'adaptador clatrina heterotetramèric, anomenat complex AP-2 (57). Els motius d'endocitosi solen ser citoplasmàtics i formats per pocs aminoàcids, on els residus claus són de tamany gran i hidrofòbics. Hi ha majoritàriament dos tipus de senyals d'endocitosi identificats; els que tenen com a residu clau una tirosina, i els que tenen dues leucines. En la molècula CFTR, comparant les seqüències aminoacídiques de varies espècies, es detectà la presència d'un motiu amb tirosina (YXX ϕ), confirmant-se posteriorment, per mutagènesi dirigida que realment ¹⁴²⁴YDSI és un motiu d'internalització (58). Més tard, Hu i col·laboradors identificaren un altre motiu basat en dues leucines (¹⁴³⁰LL) (59). La subunitat μ 2 de AP-2 reconeix el motiu endocític. Aquesta associació és un requisit per a què es produeixi la concentració de CFTR en les petites invaginacions de la membrana citoplasmàtica (*clathrin coated pits, CCP*). Posteriorment, aquestes petites invaginacions donaran lloc a les vesícules de clatrina (*clathrin coated vesicles, CCV*), procés on intervé també la dinamina. Interrompre la unió de AP-2, o bé la que es produeix amb la dinamina, o la funció de Rab5 (veure funció en l'apartat Regulació el tràfic vesicular de CFTR), evita la internalització de CFTR (30).

Regulació del tràfic vesicular de CFTR

El procés d'endocitosi de CFTR i del seu reciclatge es troba finament regulat per diferents vies i molècules.

La proteïna quinasa depenent de cAMP (PKA) regula el reciclatge, ja que un increment en els nivells de cAMP dóna lloc a un increment en el nombre de molècules de CFTR a la membrana citoplasmàtica. cAMP/PKA té la capacitat de regular CFTR a dos nivells. En primer lloc activa la funció del canal CFTR a través de la fosforilació del seu domini regulador (incrementant la probabilitat d'obertura, P_o); i en segon lloc regula el tràfic de CFTR des de les vesícules on s'emmagatzema la proteïna a l'interior cel·lular fins la membrana citoplasmàtica (incrementant el nombre de molècules a la membrana) (57, 60). En alguns tipus cel·lulars, la capacitat de PKA de regular el tràfic de CFTR depèn de l'expressió de la proteïna WT, fallant en la seva capacitat de modular l'endocitosi (61). Curiosament, no existeixen evidències d'aquesta capacitat de regulació en cèl·lules de l'epiteli respiratori, suggerint que aquesta regulació dependria del tipus de teixit (62).

Diferents proteïnes Rab tenen la capacitat de regular el tràfic intracel·lular de CFTR (veure fig.7). Rab5 està implicada en el tràfic correcte de CFTR des de la membrana citoplasmàtica fins als endosomes primerencs. El control del trànsit dels endosomes primerencs fins al compartiment *Trans Golgi Network* (TGN), i també de la proteïna CFTR endocitada que torna a la membrana cel·lular el tindrà Rab11, reciclatge que serà facilitat per la interacció de Rab11 amb la miosina Vb (63). Una altra proteïna Rab, Rab7, serà l'encarregada de regular el tràfic dels endosomes primerencs fins als tardans, i dels tardans fins als lisosomes. Rab9, com a via alternativa, controlarà el trànsit de CFTR des dels endosomes tardans al TGN del Golgi, i des d'aquest compartiment a la membrana citoplasmàtica (30).

Rme-1 és una GTPasa que regula la sortida de CFTR del compartiment de reciclatge endosomal (ERC). Rme-1 no està implicada en l'endocitosis de CFTR, sinó en la regulació del seu reciclatge. La sobreexpressió de Rme-1 provoca que CFTR no surti del compartiment ERC i es mantingui fortament unit a ell, bloquejant el seu tràfic (64).

Els motors de miosina són una superfamília de proteïnes que es caracteritzen per utilitzar l'energia del ATP per moure's a elles mateixes i a les vesícules que porten unides pel citoesquelet de la cèl·lula. La miosina VI és l'única que es mou pel filament de l'actina-F en sentit contrari al de l'actina, per tant en el sentit de l'endocitosis. La miosina VI es requereix per l'endocitosis a través dels filaments d'actina, en canvi no afectarà al procés de reciclatge (65). Recentment, utilitzant ratolins transgènics que tenen afectada la proteïna miosina VI (Snell's Waltzer *Myo6^(sv/sv)*), s'ha pogut comprovar la implicació de la miosina VI en l'endocitosis apical de CFTR (66).

Els dominis PDZ consisteixen en pèptids molt conservats que tenen una seqüència de 80-100 aminoàcids, i intervenen fent de pont entre unions proteïna-proteïna, reconeixent petites seqüències consens, que normalment es localitzen a l'extrem C-terminal de les proteïnes. Aquests dominis es caracteritzen per tenir més d'una zona d'unió, permetent interaccions de proteïna-proteïna homotípiques i heterotípiques. Mitjançant aquestes interaccions, els dominis PDZ tenen com a funció unir i colocalitzar transportadors, canals i molècules senyalitzadores en compartiments específics de la cèl·lula, controlen la funció de canals i transportadors, i regulen el tràfic d'endocitosis (67). La seqüència d'unió del domini PDZ de l'extrem C-terminal de CFTR és Asp-Thr-Arg-Leu, que li permet unir-se a un gran nombre de proteïnes que també contenen en la seva seqüència aminoacídica un domini PDZ, com NHERF1 (*Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor isoform-1*), NHERF2, CAP70 (*CFTR-associated protein, 70 kDa*, també anomenada NHERF3), NHERF4 i CAL (*CFTR-associated ligand*). Aquestes interaccions dels dominis PDZ

implicades en el tràfic de proteïnes són dinàmiques i succeeixen a una escala de temps de segons o milisegons (68). NHERF-1 i NHERF-2 a través del seu domini ERM (que prové de les sigles *e*zrin/*r*adixin/*m*oesin) uneixen CFTR amb elements citoesquelètics, com l'actina, podent tenir un cert paper en l'anclatge de CFTR a la membrana apical de les cèl·lules. NHERF-1, a més, posseeix dos dominis PDZ, i s'ha especulat que podria intervenir en la dimerització de CFTR. CAL es troba localitzat majoritàriament en l'aparell de Golgi, especialment en el TGN. Segons resultats d'estudis realitzats per Cheng i col·laboradors (69) es podria trobar implicat en la retenció de CFTR a l'interior de la cèl·lula i la seva posterior degradació, enviant-la als lisosomes (69). Shank2, té la funció contrària a NHERF-1, i actua negativament sobre l'activitat de CFTR (68) .

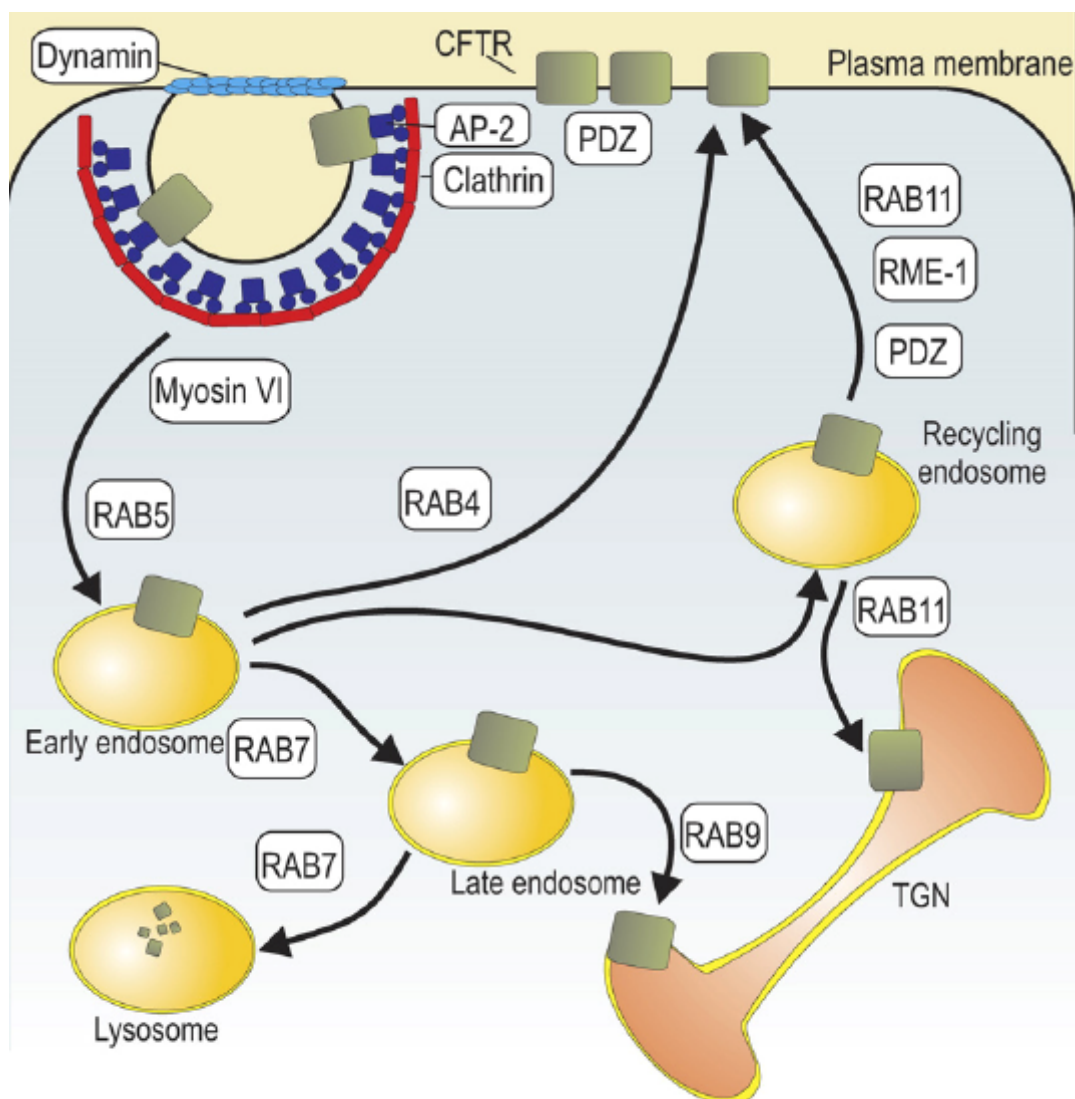


Figura 7 . Model esquemàtic del paper que juguen diferents molècules implicades en el reciclatge i trànsit intracel·lular de CFTR (proteïnes Rab, Miosina, Dinamina). Imatge obtinguda de la revisió *Endocytic trafficking of CFTR in health and disease*, Ameen et al, 2007 (30).

L'extrem N-terminal en l'endocitosis de CFTR

El paper que juga l'extrem N-terminal en tot aquest procés d'endocitosis i reciclatge de la membrana segueix sent poc clar.

Per una banda tenim l'efecte de les proteïnes t-SNAREs (*target soluble NSF attachment protein receptors*) que s'uneixen a l'extrem N-terminal. Ha estat demostrat que les t-SNAREs, Sintaxina 1A i SNAP23 s'uneixen a l'extrem N-terminal de CFTR, provocant una disminució de la funció de CFTR. La unió de la sintaxina 1A a CFTR succeeix amb una estequiometria de 1:1, i la interacció té lloc entre la tercera hèlix de la sintaxina 1A (aminoàcids 194-266) i l'extrem N-terminal de CFTR (aminoàcids 1-79). La interrupció d'aquesta unió comporta un increment en l'activitat de CFTR de 2 a 4 cops. S'ha observat que l'acció de SNAP-23 sobre CFTR es afectada sinèrgicament quan també actua la sintaxina 1A (70).

La discussió esdevé en el moment d'explicar com regulen l'activitat de CFTR. Existeixen dues teories: els efectes que s'observen són deguts a una alteració o reducció del nombre de canals a la superfície cel·lular, o és degut per un efecte directe en la obertura del canal. Existeix un estudi de Peters i col·laboradors, on s'observà que al co-expressar CFTR i sintaxina 1A en oòcits de *Xenopus*, la sintaxina 1A regula la inserció de CFTR des del reservori vesicular a la membrana citoplasmàtica (71). Concretament observen una disminució en la capacítancia de la membrana cel·lular, i una disminució del marcatge de CFTR a la membrana per immunofluorescència. D'altra banda, Chang i col·laboradors, utilitzant línees de cèl·lules epitelials que expressen endogenament CFTR i sintaxina 1A, detecten que possiblement la regulació la duu a terme alterant l'obertura del canal (72).

Un altre membre de la subfamília de les t-SNARE, la sintaxina 8, està implicada en el transport vesicular entre els endosomes primerencs fins als endosomes tardans. S'uneix també a l'extrem N-terminal i possiblement al domini regulador de CFTR, reduint els nivells de CFTR a la membrana citoplasmàtica (73). Un estudi molt recent evidencia que la sintaxina 8, formant un complex amb les proteïnes SNAREs, sintaxina 7, vti1b i VAMP8 són peces importants en el transport polaritzat de CFTR (74).

Un estudi recent, ha detectat una altra interacció directa proteïna-proteïna entre l'extrem N-terminal de CFTR i la filamina, una proteïna que forma part del citoesquelet de la cèl·lula (75). L'estudi es centra en la mutació S13F, detectada en pacients FQ. La presència d'aquesta mutació afecta a la interacció amb la filamina, provocant una desestabilització de la proteïna a la membrana citoplasmàtica, sent

internalitzada i acumulada prematurament en els lisosomes per a la seva posterior degradació.

Un efecte semblant ha estat descrit per les mutacions R31C i R31L, que tenen un efecte activador de l'endocitosi. Jurkuvenaite i col·laboradors (76) observen que una possible causa de l'activació de l'endocitosi podria ser degut a l'aparició d'un domini endocític, YxxC i YxxL, degut a aquestes mutacions, R31C i R31L, que introdueixen un residu hidrofòbic en la quarta posició, formant-se la seqüència consens d'internalització, YXXΦ, on Φ és un residu gran hidrofòbic i X és qualsevol residu (77).

Recentment, la caracterització funcional d'una nova mutació en CFTR (P67S) detectada en un pacient amb FQ atípica reafirma la implicació de l'extrem N-terminal en el procés d'endocitosi de CFTR (78). Utilitzant com a model d'expressió oòcits de *Xenopus laevis*, els autors detecten una reducció en el nombre de canals mutants a la membrana citoplasmàtica i una lleu reducció en la conductància del canal mutant, sense alterar la selectivitat iònica del canal, però l'anàlisi per *Western blot* indica un nivell d'expressió de proteïna mutant similar a la proteïna WT. Aquests resultats suggereixen que la disminució del nombre de canals no és deguda a un processament incorrecte de la proteïna mutant, sino a un increment del reciclatge de la proteïna a la membrana citoplasmàtica. Per conèixer el mecanisme o mecanismes que està afectant la pèrdua d'aquest residu es requeriria un estudi més exhaustiu.

I-6.2. Estructura i funció electrofisiològica del canal CFTR

El paper principal que desenvolupa el canal CFTR en la part apical de les cèl·lules epitelials és el transport de fluid transepitelial i electròlits a través de la membrana, activitat que ve regulada directament per la fosforilació de PKA. Aquest canal permet el trànsit d'ions de clorur a través d'ell en qualsevol direcció, i es caracteritza per tenir una baixa conductància unitària (la seva conductància és de 7-10 pS). En canvi, altres canals de clorur descrits prèviament a les cèl·lules epitelials condueixen els ions molt més ràpidament (30 pS) i preferencialment els ions entren a l'interior cel·lular. Una altra característica és la de no tenir una relació corrent voltatge lineal a valors de voltatge positius, sinó que rectifica cap a l'interior a potencials superiors de +50 mV, aproximadament. Les mateixes característiques intrínseques del propi porus de CFTR, podrien ser les responsables d'aquesta rectificació, facilitant el transport de clorur des de l'interior a l'exterior cel·lular, i

dificultant el pas en el sentit oposat (79). CFTR selecciona el pas dels anions per sobre dels cations, i presenta la següent seqüència de permeabilitat iònica: Br⁻ > Cl⁻ > I⁻ > F⁻.

A més d'aquesta activitat transportadora, CFTR regula altres canals i transportadors de les cèl·lules epitelials, com ENaC, ROMK1, ROMK2, ORCC, CaCC i altres transportadors de membrana (80).

A potencials fisiològics el canal té un comportament característic en la seva cinètica d'obertura, amb llargs períodes d'obertura que són interromputs per ràpids moviments de tancament i obertura, separats per llargs períodes de tancament (81).

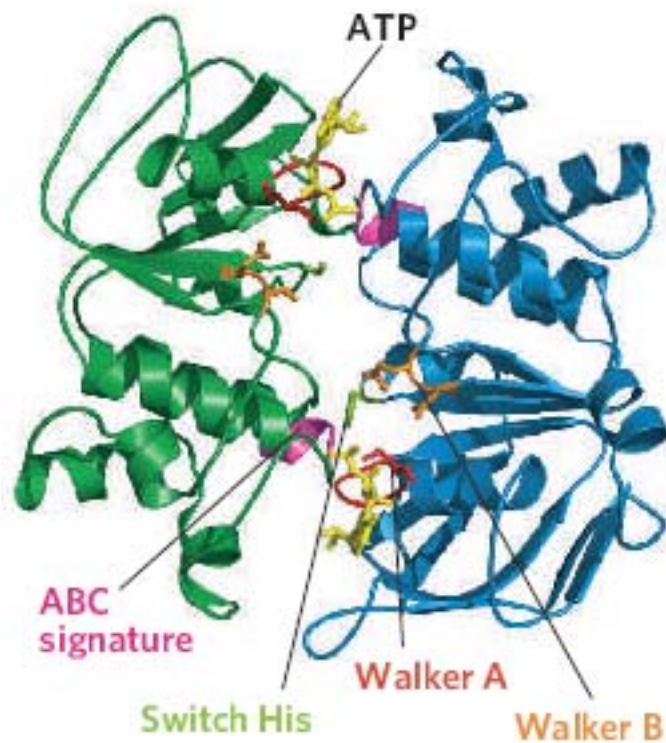
CFTR és un membre de la família dels transportadors ABC atípic, ja que actua com un canal iònic i, a més com un canal iònic que té ATP com a lligand, i utilitza la seva hidròlisi per regular l'obertura. Tenint en compte a més, la seva relativa intractabilitat per estudis bioquímics i estructurals, tot plegat comporta un obstacle per conèixer el seu mecanisme d'acció. Tot i això, la informació que tenim sobre la seva estructura i comportament ha estat obtinguda bàsicament amb dades electrofisiològiques, amb mesures de la unió i la hidròlisi d'ATP, amb estudis sobre la fosforilació duta a terme per la PKA i la PKC i les seves conseqüències, i amb altres estudis que ens permeten conèixer l'estructura d'alta resolució del domini NBD1 de ratolí, l'estructura tridimensional de baixa resolució de CFTR humana, i més recentment amb estudis d'homologia amb l'estructura d'altres proteïnes ABC de procariotes de les quals es té la seva estructura tridimensional (82).

I-6.2.1. Els dominis d'unió a nucleòtid

Per a l'activitat del canal CFTR es necessària la unió de la molècula d'ATP als dominis NBDs. Aquests dominis NBD, comuns als altres membres de la superfamília de transportadors ABC, presenten diversos motius d'unió a ATP i altres dominis comuns molt conservats i amb un plegament bàsic molt similar (83).

Entre aquests motius identificats tenim el motiu **Walker A**, format pels residus GSTGAGKTS i GRTGSGKST en el NBD1 i 2 respectivament, sent la lisina (K) la que interacciona amb el fosfat terminal del ATP; i el motiu **Walker B**, format per RAVYKDADLYLLDS i RSVLSKAKILLLDE en el NBD1 i 2 respectivament, on l'àcid aspàrtic (D) és l'encarregat de coordinar el magnesi o un altre catió divalent durant la hidròlisi (81). En el motiu **Walker B** també trobem que el residu continu a l'àcid aspàrtic té una càrrega diferent en cadascun dels dos NBDs; en el domini NBD2

tenim l'àcid glutàmic (E) que presenta càrrega negativa, i en canvi a la resta de NBD conservats (com en el NBD1 de CFTR) trobem sempre la serina (S) sense càrrega que confereix estabilitat a la unió amb ATP sense haver d'estar hidrolitzat. Una altra seqüència característica és el motiu altament conservat "**Signatura ABC**" (LSGGQ i LSHGH per NBD1 i 2 respectivament) (84) (veure fig. 8). Estudis basats en comparacions estructurals amb altres dominis NBDs de procariotes han evidenciat la gran importància del motiu "Signatura ABC" situat en un grup de tres hèlixs alfa, i sembla ser que rota quan la molècula d'ATP se li uneix. En el canal CFTR s'ha observat que els efectes de mutacions en aquest motiu són greus, com és el cas de la mutació G551D, la tercera mutació més comuna en pacients FQ, i que es troba en la seqüència signatura de NBD1 (85). Aquesta mutació dona lloc a una proteïna que arriba a la membrana citoplasmàtica però no respon a l'activació per part de PKA (86). La mutació F508del també es troba en el domini NBD1, i sembla ser que la pèrdua del triplet afectaria el lloc d'interacció d'aquest domini amb el domini transmembrana, segons els estudis estructurals de NBD1 de ratolí (87). Estudis recents s'han centrat en la possibilitat de que aquesta mutació estigui implicada en la unió d'altres molècules que s'uneixen a CFTR per regular-la. Aquests estudis han revelat que F508del impedeix la unió i la fosforilació per part de la quinasa CK2 al residu S511 de CFTR (88), afectant d'aquesta manera la regulació de la obertura del canal.



| | Walker A | Walker B |
|----------------------------|-----------------|-------------------|
| NBD1 | GSTGAGKTS | RAVYKDADLYLLDS |
| NBD2 | GRTGSGKST | RSVLSKAKILLLDE |
| Seqüència Signatura | | |
| NBD1 | LSGGQ | NBD2 LSHGH |

Figura 8 . Model predit per homologia de l'heterodímer format pels dominis NBD de CFTR (NBD1 en verd i NBD2 en blau), que es troben units per molècules d'ATP (en groc). Motius identificats: Walker A (en vermell), Walker B (en taronja) i el motiu signatura ABC (en lila). Figura adaptada de la revisió de Gadsby i col., 2006 (82)

Existeixen evidències directes de la interacció cap-cua entre els dos dominis NBD en canals CFTR funcionals; definint-se dos llocs d'unió d'ATP: **ABP1** (*ATP binding pocket 1*) format pels motius Walker A i Walker B del domini NBD1 i el motiu signatura ABC del domini NBD2, i **ABP2** (*ATP binding pocket 2*) format pels motius Walker A i Walker B del domini NBD2 i el motiu signatura ABC del domini NBD1, tal com es mostra a la figura 8 (89). Per analogia amb altres transportadors ABC, s'ha proposat que la dimerització dels dos dominis NBD mitjançant ATP dóna lloc a

l'obertura del canal, i que la hidròlisi de la molècula d'ATP en ABP2 provoca la dissociació del dímer, i per tant el tancament (90).

És acceptat que la hidròlisi d'ATP per part de ABP2 dóna lloc a la dissociació del dímer i al tancament posterior del canal. Però respecte al paper que juguen cadascun dels dominis en l'obertura, encara no existeix un consens general. Per una banda, hi ha la teoria de que és necessària la unió d'ATP als dos dominis per a que es produeixi l'obertura (89, 91-93). En canvi, altres proposen que és la unió d'ATP a ABP2 la que catalitza l'obertura del canal, mentre que la unió a ABP1 no es requereix (94-96).

Estudis bioquímics inicials (97, 98) suggereixen que l'associació-dissociació de la molècula d'ATP a ABP1 és massa lenta per ser la responsable de les transicions entre obertures i tancaments observades en els experiments electrofisiològics.

Seguint aquesta línia Vergani i col.laboradors (91) van generar els mutants K464A i K1250A (situats en cadascun dels motius walker A de cada domini NBD), i la mutació D1370N localitzada en el motiu Walker B en NBD2 i van analitzar la cinètica dels canals mutants a diferents concentracions d'ATP. Basant-se en les observacions d'aquests experiments, van proposar que és necessària la unió d'ATP als dos llocs d'unió dels dominis NBD per que es produeixi l'obertura del canal, i la hidròlisi d'ATP, que té lloc en ABP2, per al tancament.

D'altra banda, Zhou i col.laboradors (94) consideren que el lloc d'unió ABP1, a més de ser responsable de l'obertura del canal, mantindria la dimerització dels dos dominis NBD. Proposen que les diferències que existeixen entre els dominis NBD de CFTR i la resta de transportadors ABC té un sentit biològic, ja que per una molècula transportadora és preferible que els estats intermitjos durant el cicle de transport tinguin una vida mitja curta, però aquest mecanisme teòric, encara que ideal pels transportadors no es pot aplicar als canals iònics. Per tant, sembla lògic que la funció de ABP1 sigui estabilitzar els estats oberts del canal, de manera que poden passar molts més ions de clorur durant cada cicle d'obertura.

En contraposició als estudis anteriors, Bompadre i col.laboradors (96), detecten la presència de múltiples estats oberts i com la distribució d'aquests estats canvia segons la concentració d'ATP. La unió de la molècula d'ATP al domini ABP1 afecta l'estabilitat dels llargs temps d'obertura, però no es requereix per a que el canal s'obri. En canvi, és imprescindible la unió d'ATP a ABP2 per l'obertura del canal, sent característics els temps curts d'obertura per tenir ATP unit només a aquest domini. També proposen que els canals que tenen ocupat amb ATP els dos llocs d'unió presenten temps d'obertura molt més llargs que els que només tenen un sol lloc ocupat, i això explica com la concentració d'ATP varia la distribució dels dos estats d'obertura que es detecten.

En resum, la unió d'ATP als dos "caps" de NBD1 i NBD2, podria donar lloc a canvis conformacionals, afavorint la formació de l'heterodímer intramolecular cap-cua NBD1-NBD2. Aquests canvis conformacionals dels NBD en el citosol es transmeten a canvis estructurals dels dominis transmembrana, provocant finalment la obertura del canal, i permetent així el pas de clorur a través d'ell. Per altra banda, la hidròlisi de la molècula d'ATP que es troba unida al motiu Walker B del domini NBD2 permetria la dissociació del dímer, tornant a la conformació inicial anterior dels dominis transmembrana i per tant, el tancament del canal. El mecanisme, però, pel qual és manté obert el canal continua sent controvertit.

I-6.2.2. El domini Regulador

La regulació de l'obertura i el tancament del canal CFTR depèn de la unió i la hidròlisi d'ATP en els dominis NBD, però no és suficient per activar el canal. Prèviament és necessària la fosforilació del domini regulador (R) per part de les quinases PKA o PKC, i un cop fosforilat el domini R provoca un canvi estructural que permet que s'iniciï el procés d'obertura (99).

És acceptat de manera general que l'obertura del canal CFTR és dependent de la fosforilació del domini regulador (R) per part de PKA. L'activitat del canal CFTR incrementa fins 100 cops més, una vegada és fosforilat el domini R (CFTR sense ser fosforilada amb una concentració d'ATP saturant, té una probabilitat d'obertura de <0.003, en canvi quan CFTR és fosforilada, té una probabilitat d'obertura al voltant de 0.3). El domini R està format per 240 residus que interaccionen amb els dos dominis d'unió a nucleòtid (NBD1 i NBD2), i conté diverses serines en llocs consens susceptibles a la fosforilació per PKA i PKC (100). La fosforilació per part de PKC provoca una activació més modesta de CFTR (101), sent aquesta activació en el millor dels casos d'un 20% respecte a la que s'obté amb la fosforilació duta a terme per PKA. Han proposat que la fosforilació per part de PKC potenciaria i podria ser un prerrequisit per ser posteriorment activada CFTR per PKA (101).

La manera en què el domini R fosforilat controla l'obertura del canal encara no està prou clara. El fet que cap altra proteïna de la família ABC contingui un domini R, i que encara no s'hagi obtingut l'estructura terciària d'alta resolució de la proteïna, dificulten poder conèixer la forma i la localització d'aquest domini.

Un altre fet que obstaculitza conèixer com l'activitat d'aquest domini regula el canal, és el gran nombre de llocs susceptibles a ser fosforilats. Han estat descrites cinc serines que es fosforilen *in vivo* (les serines en les posicions 660, 700, 737, 795 i 813) (102, 103), i vuit *in vitro* (les cinc anteriors més les serines en les

posicions 712, 753 i 768) (104). Els primers estudis de mutagènesi en el domini regulador conclouien que l'existència de tants llocs de fosforilació tenien un paper redundant (102). Aquesta idea inicial de redundància va guanyar suport amb els treballs de Rich i col.laboradors (105), substituint les serines per àcid aspàrtic, i de Aleksandrov i col.laboradors (106), que les van substituir per àcid glutàmic; amb la intenció de mimetitzar les càrregues negatives. Tot plegat suggeria que la regulació de CFTR per fosforilació era la conseqüència electrostàtica de l'acumulació de càrregues negatives al domini R. Però, estudis posteriors tendeixen a postular que l'activació ve donada per accions específiques de les fosfoferines que provoquen canvis estructurals en el domini R, més que a una acumulació no específica de càrregues negatives. Aquesta proposta és recolzada per estudis que mostren reajustaments estructurals del domini R després de la fosforilació d'aquest (107, 108). A més, altres grups que han purificat el domini R de la proteïna han observat que aquest domini després de ser fosforilat és objecte de canvis conformacionals (109).

Per altra banda, existeixen els resultats obtinguts per Wilkinson i col.laboradors (110), on detecten que les serines en les posicions 737 i 768 tenen un efecte inhibidor en la funció del canal. El principal mecanisme d'inhibició de la fosfoferina 768 és a través de la reducció de la duració dels períodes d'obertura dels canals CFTR. Vais i col.laboradors (111) també observen que mutant les serines a alanines en les posicions 700, 795 i 813, la probabilitat d'obertura disminueix, i en les posicions 737 i 798, incrementa. Aquests autors proposen com a model que la fosforilació del domini R altera l'equilibri entre les formes de CFTR amb baixa afinitat i alta afinitat per la unió a les molècules d'ATP, és a dir, afecta a la unió d'ATP als NBD però no a la hidròlisi ni al tancament. La fosforilació indueix la unió del domini R amb altres domini (com l'extrem N-terminal de CFTR), i com a resultat dóna lloc a reordaments estructurals necessaris per a l'activació del canal (112).

L'associació física entre el domini R i l'extrem N-terminal podria ser requerida per l'activació del canal depenent de PKA i podria promoure la fosforilació del domini R. Naren i col.laboradors (113) identificaren una regió de l'extrem N-terminal (residus 46-60) que conté una sèrie de residus àcids (D47, E51, E54, D58) que regulen positivament l'activitat del canal. Aquests residus formen part de la superfície d'una hèlix alfa predita. La interacció entre el domini R i l'extrem N-terminal estableix l'activitat del canal. Posteriorment, proposaren que la regulació de l'obertura del canal per part de l'extrem N-terminal ve donada perquè facilita l'entrada a un estat d'obertura llarg de CFTR, o bé, l'estabilitza. A més, van observar que aquesta

modulació de l'extrem N-terminal apareix després de la unió d'ATP als dominis NBD, però anterior a la seva hidròlisi (114).

I-6.2.3. Els dominis transmembrana

La proteïna CFTR està formada, com ja s'ha comentat abans, per dos dominis transmembrana homòlegs i repetits, que contenen cadascun d'ells sis segments transmembrana, seguits cada domini TMD per un domini NBD. L'estructura cristal·litzada de baixa resolució obtinguda recentment, mostra que les dos regions transmembrana (TM) s'alineen formant un porus central, a través del qual els ions travessen la membrana. Però el que no s'ha aconseguit esbrinar és quines són exactament les regions TM que formen el porus, ni quantes molècules de CFTR el formen. Arribar a conèixer l'estructura quaternària de la proteïna és essencial per saber si existeix com a monòmer, com a dímer o com un complex multimèric a la membrana citoplasmàtica, ja que existeixen moltes controvèrsies al respecte.

Estudis bioquímics, d'imatge i electrofisiològics mostren que CFTR pot funcionar com a monòmer (115) i com a dímer. Imatges obtingudes per microscòpia electrònica de criofractura suggereixen que el porus de CFTR està format per dues molècules de CFTR. A més, s'ha detectat que dues molècules de CFTR es poden associar a través dels seus dominis PDZ situats en el seu extrem C-terminal utilitzant com a pont la unió als dominis PDZ de NHERF1 i NHERF2. No està gens clar, però, quina finalitat tindria l'estructura de dímer a la membrana. Sembla ser que l'associació a través d'aquests motius promou una activació de les obertures del canal. Es possible que l'increment d'activitat degut a la dimerització afavoreixi la interacció entre els dominis R (116). Altres estudis recolzen que es deu a una regulació de l'endocitosi de CFTR, donant la forma de dímer major estabilitat a la membrana (68). A més, en un altre estudi *in vivo* es defensa que la formació dels dímers és independent dels motius PDZ, i que es formen a través d'altres proteïnes com G β i la syntaxina 1A (117).

Tot i així, on no existeixen controvèrsies basant-se en estudis comparatius d'homologia amb altres proteïnes de la mateixa família, és que el porus està format per l'alineament de múltiples hèlix alfa (118-120).

Encara es desconeix quins segments TM formen el porus i quina funció tenen cadascun d'ells. S'han realitzat diversos estudis funcionals per entendre quins

residus contribueixen a la formació del porus i quins d'aquests interaccionen amb els ions que travessen el canal.

Fins al moment, la majoria de grups s'han centrat en l'estudi del paper de TMD1. Coincideixen en la idea de que l'estructura del porus és asimètrica, sent el primer domini TM el que juga un paper més important en la formació del porus, i en la seva permeabilitat.

Molts estudis apunten que les càrregues positives dels aminoàcids R334 i K335 en l'hèlix 6, promouen l'entrada dels anions cap a la boca del porus des de l'exterior cel·lular. L'efecte que poden tenir en la conducció i permeabilitat dels anions, l'hèlix 11 i les hèlixs compreses entre la 1 i la 5, encara no és clar. Per altra banda, la resta de regions transmembrana no han rebut gairebé cap atenció (de la 7 a la 10). Ge i col.laboradors (121) consideren que per tal d'assegurar un moviment ràpid dels ions clorur a través del porus, l'interior d'aquest hauria de presentar una sèrie de característiques que ajudessin als ions a situar-se còmodament a l'entrada del porus. I sembla ser que l'existència de càrregues positives tindria un paper clau en l'atracció d'aquests ions. En fer mutagènesi dirigida en diferents aminoàcids amb càrrega positiva situats als fragments transmembrana 1 i 6, per tal d'analitzar els efectes que produeixen en la relació corrent-voltatge, van proposar que la càrrega positiva de l'arginina (R334) situada en el TM6 podria atraure els ions cap al porus des de l'exterior cel·lular; i un altre aminoàcid carregat positivament, la lisina (K95) en el TM1, els atrau des de l'interior cel·lular. El mecanisme que proposen seria que les càrregues positives d'aquestes arginines i lisines, les quals es troben a la boca exterior i interior del porus, serien les responsables de l'atracció electrostàtica dels ions clorur, permetent l'acumulació de múltiples ions simultàniament. D'aquesta manera, els propis efectes de repulsió deguts a les càrregues negatives dels ions clorur entre ells acceleraria el pas pel porus. Així, els canals de CFTR s'assegurarien altes quantitats de transport d'ions a través del seu porus. Aquest model concordaria amb l'efecte que provoquen les mutacions en R334, en els individus FQ (122).

Prèviament, Akabas i col.laboradors (123), van utilitzar la mutagènesi dirigida per substituir cadascun dels aminoàcids compresos entre la posició 91 i la 99 per cisteïnes, per tal de comprovar quines d'aquestes cisteïnes tenien accés a agents metanotiosulfanats que reaccionen amb grups sulfidril, i així esbrinar quins aminoàcids d'aquesta regió podien estar situats en la cara externa del porus. Només les cisteïnes que havien substituït en les posicions G91, K95 i Q98 eren accessibles a aquests reactius. La conclusió d'aquests estudis va ser que aquests aminoàcids estan alineats en la cara externa del porus, i això coincidia amb la periodicitat dels residus formadors d'una estructura secundària d'hèlix alfa.

Sorprenentment, però, una construcció de CFTR sense els primers 118 aminoàcids donava lloc a canals que mantenien les propietats de conductància molt similars a la proteïna sencera (124).

Degut a aquestes controvèrsies, Mansoura i col.laboradors (125) van decidir tornar a analitzar el paper de TM1, TM5 i TM6, basant-se en les propietats de permeabilitat del canal a la formació d'un porus selectiu per anions, observant que TM5 i TM6 contribueixen a l'estructura del porus, i que TM1 és menys important per mantenir l'arquitectura del porus. Especialment, van detectar que G91 es troba suficientment lluny del lloc d'unió dels anions per no exercir cap efecte electrostàtic en la permeabilitat dels anions a través del porus.

El canal CFTR, com molts canals de clorur, selecciona pobrament respecte els petits anions que travessen el seu porus. Els anions halurs o pseudohalurs més grans que el Cl^- entren més fàcilment dins del canal que el clorur. Bàsicament, CFTR té la tasca de distingir el clorur i probablement el bicarbonat, de grans anions com fosfats o sulfats. Per exemple, l'anió SCN^- podria competir amb el Cl^- per passar pel porus. La pèrdua de la regulació de la conducció del bicarbonat i el descens del pH per part de CFTR podria contribuir al fenotip FQ en les cèl·lules epitelials respiratòries i en les del pàncrees (126).

A més, el canal CFTR és inhibït per una gran quantitat de substàncies que s'uneixen a l'entrada citoplasmàtica del porus, tapant físicament l'entrada del porus i impedit el pas dels ions Cl^- . La unió d'aquests bloquejadors del canal implica interaccions electrostàtiques amb càrregues positives, els llocs d'unió descrits fins al moment, els aminoàcids K95 i R303. Però sembla que cada lloc d'unió de bloquejador tindria un mecanisme d'actuació diferent (127). Els anions més petits s'unirien a K95, sent el bloqueig depenent del potencial de membrana i de la concentració de Cl^- extracel·lular. Les grans molècules, en canvi, bloquejarien el canal interactuant amb R303, no sent sensibles ni al potencial de membrana ni a la concentració de Cl^- .

I-6.2.4. Reguladors de l'activitat electrofisiològica del canal CFTR

La interacció física entre AMPK i CFTR, regula el canal CFTR. AMPK és una quinasa activada per l'increment de la relació AMP/ATP durant les situacions d'estrés i anòxia a la cèl·lula. L'activitat de AMPK és elevada en cèl·lules aïllades de pacients

FQ. Se sap que l'activació farmacològica de AMPK inhibeix la secreció pro-inflamatori de citocines, és per aquesta raó que es creu que l'activació d'aquesta quinasa en cèl·lules FQ és deguda a una resposta adaptativa per intentar reduir la inflamació (128).

La unió a CFTR té lloc entre els aminoàcids 1420 i 1457 de CFTR i l'extrem C-terminal de α 1-AMPK, i estudis inicials van detectar que l'acció de AMPK era essencial per la fosforilació de CFTR, inhibint l'activitat del canal sense afectar el nombre de canals a la membrana(128).

El receptor adrenèrgic β 2 (β 2-AR) i el receptor d'adenosina 2b (A2b-R) també tenen un paper important en la regulació de l'activitat de CFTR en les cèl·lules de l'epiteli respiratori (veure fig. 9a). NHERF1 uneix CFTR i β 2-AR a través dels seus dominis PDZ, i així, quan β 2-AR és activat per un agonista, incrementa els nivells de AMPc, i aquests activen PKA i en conseqüència CFTR. NHERF1 és l'encarregat d'organitzar el complex macromolecular, on estan implicats β 2-AR, la proteïna que uneix GTP (Gs), la adenilat ciclase, la proteïna ezrina i PKA. NHERF1 també es troba implicat en el complex d'activació que ve donat per A2b-R i PKA (68).

Per una altra banda, CFTR és inhibida pel receptor àcid-2 lisofosfatídic (LPA-2) a les cèl·lules epitelials de l'intestí (veure fig. 9b). En aquest cas és NHERF2 la que uneix CFTR a LPA-2 a través dels seus dominis PDZ. Al contrari del cas anterior, quan LPA-2 és activat per un agonista, redueix els nivells de AMPc a través de la proteïna inhibidora que uneix GTP (Gi), i d'aquesta manera reprimeix l'activació de CFTR mitjançant PKA (68).

Una altra molècula que inhibeix l'activitat de CFTR és Shank2. La inhibició de Shank2 sobre CFTR es podria deure a l'associació amb una fosfatasa, o bé per competició amb un altre domini PDZ que activés CFTR.

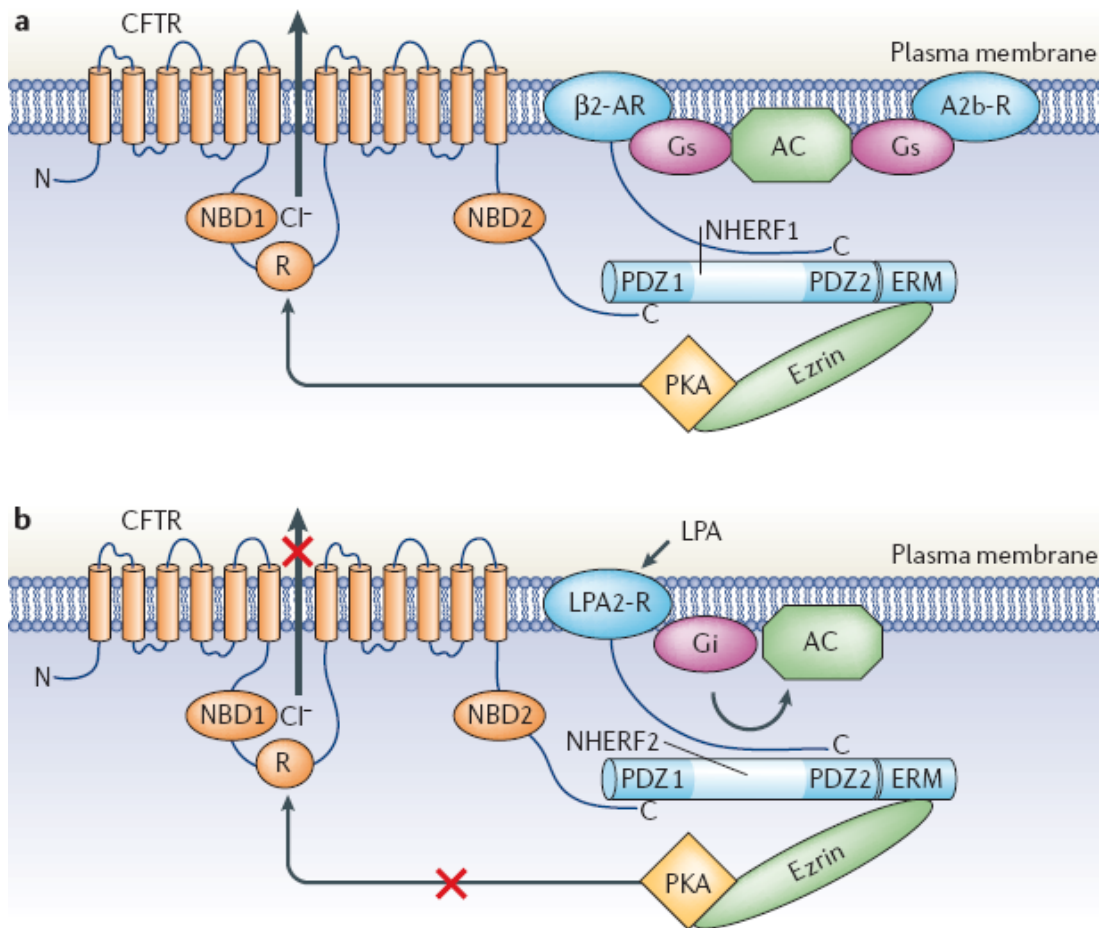


Figura 9. Complexes macromoleculares de regulació de l'activitat de CFTR. Regulació de l'activitat de CFTR mitjançant el receptor adrenèrgic $\beta 2$, el receptor d'adenosina 2b i pel receptor de l'àcid-2 lisofosfatídic. (9a) Els dos primers receptors activen CFTR. (9b) En canvi el receptor de l'àcid-2 lisofosfatídic inhibeix l'activitat del canal CFTR (68).

I-6.2.5. CFTR: regulador d'altres canals

La proteïna CFTR regula altres proteïnes transportadores, com els canals ENaC i de K^+ (ROMK1 i ROMK2), mecanismes de transport d'ATP, bescanviadors d'anions ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) i altres canals com l'aquaporina. Encara no és conegut gaire sobre el mecanisme que emprava CFTR per regular altres proteïnes, però se sap que es troben implicats en la formació de complexos macromoleculares de senyalització, que es troben dinàmicament regulats. Entre aquestes molècules de senyalització tenim les proteïnes amb dominis PDZ, com és el cas de NHERF1 i NHERF2. Per exemple, aquestes molècules incrementen la interacció física entre ROMK1 i CFTR (129). NHERF1, a més està implicat en la regulació recíproca entre CFTR i els transportadors de clorur-bicarbonat SLC26 (130).

El canal CFTR i el canal ENaC es regulen recíprocament. CFTR inhibeix ENaC (excepte en els conductes de la suor, on l'activa (131)), mentre que ENaC activa CFTR. Aquesta regulació mútua té una gran importància biològica degut a que el balanç correcte d'aigua i sals en el fluïd periciliar, per evitar que es dipositin els bacteris i altres agents nocius en l'epiteli pulmonar, es crea bàsicament a través de la secreció de clorur per part de CFTR, i la reabsorció de Na^+ per part de ENaC (132).

CFTR també té un paper en la regulació dels canals de clorur ORCC (133) (134). Estudis inicials ja mostraven que existia aquesta regulació, ja que quan es reintrodien còpies normals del canal CFTR en cèl·lules FQ, es corregia també l'activitat de ORCC. Però posteriorment es va veure que el mecanisme de regulació era a través de la implicació que té CFTR en el transport d'ATP des de l'interior cel·lular fins l'exterior, sent l'increment d'ATP en l'espai extracel·lular el responsable de l'activació de ORCC mitjançant PKA.

No hi ha cap dubte que CFTR pot controlar el transport d'ATP cap a l'exterior cel·lular, però no és coneix realment el mecanisme que emprava. El problema és saber si el transport d'ATP és a través del mateix canal o passa a través d'un altre mecanisme (135) però controlat indirectament per CFTR. A més cada cop hi ha més evidències de que existeix una relació entre CFTR i els receptors purinèrgics P2Y i P2X (134).

En teixits que es troben típicament afectats en pacients FQ, CFTR modula la funció de diverses connexines. Per exemple, sobre la Connexina 45 (Cx45) en cèl·lules exocrines del pàncrees, CFTR té la capacitat d'afectar la conductància i la sensibilitat a voltatge d'aquests canals. Resultats recents mostren que CFTR també exerceix una modulació similar sobre les connexines 32 i 40. S'ha especulat sobre el possible mecanisme de regulació de CFTR sobre aquestes connexines, sembla ser que la modulació de la Cx43 o la Cx45 seria per l'activació de TNF- α mitjançant cascades de senyalització, a través de les seves unions a proteïnes amb dominis PDZ, com EBP50 (136).

I-7. Alteracions en la biogènesi i l'activitat del canal CFTR per mutacions FQ

Mutacions en el *gen CFTR* són les responsables dels defectes en la proteïna CFTR, tant en la seva producció com en la seva funció, mitjançant diferents mecanismes moleculars. Per tant, tenint en compte això i el gran nombre de mutacions diferents que es detecten en pacients FQ, les mutacions es van classificar segons el

tipus de mecanisme molecular que condueix a les diferents alteracions en el canal CFTR. Inicialment, Welsh i Smith (137) les classificaren en 4 classes. Actualment, la classificació s'ha estès fins a 5 classes, basant-se en els nous coneixements que es té del funcionament i de la regulació de CFTR (Veure fig. 11).

Mutacions de Classe I; la presència de grans delecions o mutacions puntuals que donen lloc a la presència d'un codó de parada prematura, o bé a un canvi en el marc de lectura, que produeixen un RNA missatger inestable i que serà degradat pel mecanisme de *Nonsense-mediated decay* (NMD). Les mutacions de classe I es troben en un 25-30% del total d'al·lels mutants en pacients amb FQ.

Mutacions de Classe II; Les mutacions de classe II afecten als processaments de glicosilació i maduració en el ER i l'aparell de Golgi. Aquests processos provocaran la retenció de la proteïna en el ER i posteriorment la seva degradació (veure apartat Síntesi, modificacions post-traduccionals i plegament CFTR). La mutació F508del és una mutació de classe II.

Mutacions de Classe III; La fosforilació del domini regulador causa la unió d'ATP al domini d'unió a nucleòtid (NBD), permetent el transport de clorur (veure apartat Estructura i funció del canal CFTR).

Les mutacions de classe III, donen lloc a una proteïna que serà conduïda i inserida a la membrana citoplasmàtica, però serà resistent a la fosforilació del domini regulador o a la unió d'ATP. Un exemple d'aquesta classe de mutació és la G551D amb una freqüència de 3.1%, que es troba en el domini NBD1 de CFTR interferint en la hidròlisi de l'ATP.

Aquestes tres classes de mutacions donen lloc majoritàriament a un fenotip de FQ clàssic.

Mutacions de Classe IV; aquestes mutacions afecten a la conductància del canal, la presència de les mutacions de classe IV donen lloc a una reducció del transport de clorur. Pacients amb aquestes mutacions solen presentar un fenotip clínic mig o lleu. Incrementar la funció de CFTR en aquests casos seria suficient per millorar el fenotip.

Mutacions de Classe V; les mutacions que s'inclouen en aquest grup donen lloc a processos d'empalmament tant aberrants com correctes durant la transcripció del gen *CFTR*. Els nivells de transcrits variaran segons el pacient o segons l'òrgan dins

del mateix pacient. Segons la quantitat de transcrits correctes, el fenotip clínic del pacient variarà; a nivells alts presentarà un fenotip mig, i a nivells baixos, fenotip greu.

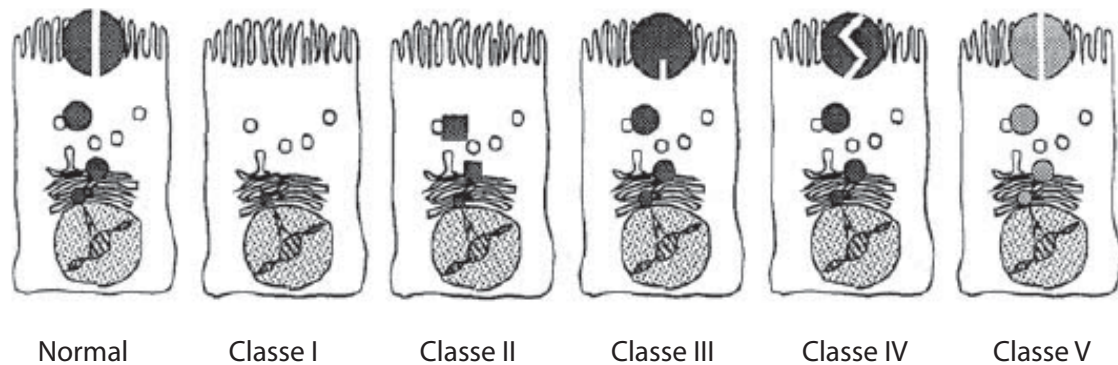


Figura 11. Representació esquemàtica de les 5 classes de mutacions que podem trobar en el gen *CFTR*. Imatge adaptada de la revisió Proesmans i col. 2008 (138).

I-8. Relació entre la disfunció resultant de mutacions CFTR i l'afectació clínica dels pacients: cap a una correlació genotip-fenotip

En molts casos les mutacions detectades en el gen són les úniques responsables de causar la malaltia, però la gran variabilitat en la clínica de FQ observada en malalts que presenten la mateixa combinació de mutacions, corrobora que a més del genotip *CFTR*, existeixen altres factors ambientals i genètics que afecten la gravetat de la malaltia.

La correlació genotip-fenotip pot ser utilitzada per determinar associacions a nivell poblacional, però no s'hauria d'emprar per a la prognosi del pacient individualment. L'impacte del genotip *CFTR* en el fenotip clínic serà específic d'òrgan. Per exemple, la capacitat de funcionament correcte del pàncrees exocrí té una bona correlació amb el genotip de *CFTR*, en canvi el nivell de gravetat de l'afectació pulmonar correlaciona molt poc amb el genotip de *CFTR* (139) (veure fig. 12).

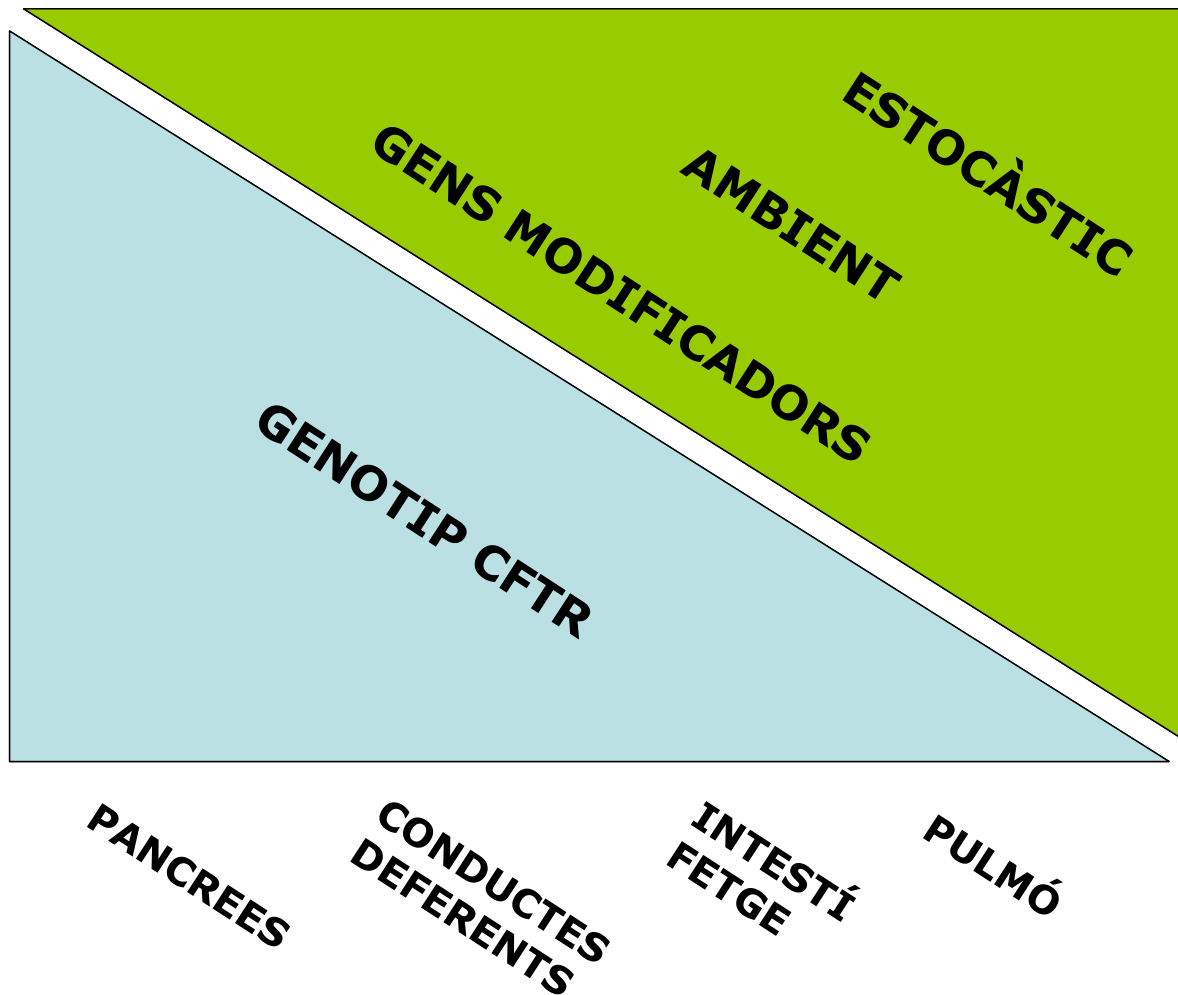


Figura 12. Esquema on s'il·lustra la contribució del genotip de CFTR en la gravetat de la malaltia segons l'òrgan afectat. Esquema adaptat de Cutting *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2005 (140).

Només unes poques mutacions determinen directament la manifestació clínica pulmonar. Aquest és el cas de pacients amb la mutació A455E, que tenen una taxa lenta de disminució de la funció pulmonar. Altres estudis mostren que certes mutacions correlacionen amb un baix risc de patir infeccions pulmonars per part de *Pseudomonas aeruginosa* (140). Però majoritàriament seran els factors ambientals els responsables de la variabilitat en la disfunció pulmonar.

A més dels factors ambientals, existeixen molts polimorfismes que poden modificar el fenotip pulmonar i es localitzen en gens candidats. Identificar aquests gens modificadors ens permetria entendre millor la variabilitat clínica de la malaltia, i identificar noves dianes pel tractament. La majoria d'aquests gens es troben implicats en la resposta immune als microorganismes patògens i en la inflamació. Molts investigadors s'han centrat en buscar aquests gens candidats. Els candidats es poden agrupar bàsicament en quatre grups: aquells que es troben directament

implicats en la funció de CFTR (receptor β -adrenèrgic); els que codifiquen per vies alternatives de transport de clorur (CIC-2); els que estan implicats en les respostes immune i inflamatòria (MBL, TNF- α), i els responsables de combatre el dany en el pulmó (TGF- β). Per exemple, ens trobem amb polimorfismes que donen lloc a alts nivells de TNF α que estan associats a un diagnòstic sever de la malaltia pulmonar (141).

I-9. Teràpies per la Fibrosi Quística

Un major coneixement del problema bàsic de la FQ està portant al plantejament de noves estratègies curatives, però fins al moment els tractaments es basen en la simptomatologia (138).

Al 1964, Mathews i col·laboradors (142) establiren tres línees bàsiques de tractament de la FQ, complementació nutricional, l'aclariment de les obstruccions de les vies respiratòries i teràpia antibiòtica contra les infeccions pulmonars.

Més d'un 85% dels pacients neixen amb IP. A més dels problemes funcionals del pàncrees, els malalts tenen problemes en l'absorció del greix, i en l'absorció de les vitamines solubles en greix, A, D, E i K, que han de ser complementades. Una dieta correcta i el tractament amb suplementos enzimàtics pancreàtics prevenen la malnutrició.

La clarificació de les secrecions espesses, és una de les inicials i principals teràpies en el tractament de la patologia pulmonar, on es combina la fisioteràpia de pit i mètodes farmacològics per disminuir la viscositat del moc. L'espessor del moc ve determinada per nombrosos factors, entre ells, la presència de DNA lliure, actina polimeritzada i mucines. El trencament del DNA en petits fragments redueix la viscositat, la DNasa humana recombinant (Pulmozyme) és el tractament més extensament utilitzat per reduir la viscositat del moc (138).

Per altra banda, el tractament amb antibiòtics específics ha estat fins ara la principal teràpia, però encara no s'ha trobat una teràpia efectiva per combatre les infeccions cròniques. La supressió de la inflamació farmacològicament es duu a terme amb tractaments amb esteroides a dies alterns o amb altes dosis d'ibuprofèn. Però quan els diferents tractaments perden la seva efectivitat i es produeix la colonització crònica, la pèrdua de funció pulmonar és progressiva. Hi ha un límit de funció respiratòria per determinar el trasplantament pulmonar. El primer trasplantament es realitzà al 1983 i més de 100 pacients amb FQ reben un pulmó nou cada any, segons dades del "CF Foundation Data Registry".

I-9.1. Teràpies futures a nivell molecular

Des del descobriment del gen *CFTR*, molts estudis s'han centrat en comprendre el defecte bàsic de la malaltia, per tal d'aplicar teràpies específiques segons la mutació, i solucionar el problema a nivell molecular. Existeixen dos possibles enfocaments per tal d'abordar la situació: utilitzar la teràpia gènica, i per exemple introduir una còpia normal del gen en les cèl·lules apropiades; o bé mitjançant teràpies específiques d'al·lel per tal de corregir el defecte específic de les formes mutants de *CFTR*.

Aconseguir un bon model animal ajudaria a provar les futures teràpies. Fins al moment existeixen 11 ratolins FQ que s'han caracteritzat (143). Tenint en compte que les mutacions detectades en *CFTR* generen una gran varietat de fenotips i de manifestacions clíniques diferents, resulta molt complicat generar un ratolí transgènic que pugui ser un excel·lent model que recapituli totes les afectacions clíniques que es donen en humans. Segons l'òrgan i el tret clínic que s'hagi volgut estudiar, els investigadors han tingut més o menys èxit en la generació de ratolins manipulats genèticament per poder ser utilitzats com a model de la malaltia. Per exemple, en el cas de les patologies del sistema digestiu existeix un ventall ampli respecte a l'èxit obtingut. El fenotip intestinal és un dels millors aconseguits en el model de ratolí; excepte alguns casos, la gran majoria presenten una patologia severa molt similar a la humana. En canvi, els ratolins FQ no són bons models per la patologia pulmonar, ja que la majoria d'ells tenen l'epiteli respiratori pulmonar amb la homeòstasi de ASL ben regulada i amb un moc no espès. Altres ratolins mostren canvis patològics pulmonars, però sense manifestar inflamació ni infeccions bacterianes. Només en un cas, un ratolí homozigot per la mutació G551D, *CFTR*^{tm1G551D}, va desenvolupar una desregulació de la inflamació dels seus pulmons, i una susceptibilitat inicial a *Pseudomonas aeruginosa*. Els investigadors han suggerit que existeix en ratolins una via alternativa de transport de clorur (143).

Molt recentment, un grup d'investigadors han aconseguit generar porcs *CFTR*^{-/-}. Aquests porcs defectius per *CFTR* presenten una patologia molt similar a la humana. Han detectat que desenvolupen ili meconial, destrucció del pàncrees exocrí, i la funció hepàtica afectada. Però, no han observat cap anormalitat en el seu sistema respiratori (144).

I-9.1.1 Teràpies específiques segons la mutació

El fet de que es necessitin nivells baixos de CFTR funcional (un 10% és suficient) per disminuir o fins i tot eliminar les principals manifestacions clíniques de la malaltia, afavoreix l'utilització de potenciadors o correctors de la funció de CFTR mutant. L'actual classificació de les mutacions, i el progressiu coneixement dels diferents mecanismes moleculars que poden alterar la proteïna, proporcionen una base per el desenvolupament de fàrmacs dirigits a cadascuna de les mutacions, proposant-se teràpies específiques per cada tipus de mutació en FQ.

Mutacions de Classe I; es coneix que els antibiòtics del tipus aminoglicosidases, a més de la seva activitat antimicrobiana, són efectius en afavorir que la maquinària transcripcional es salti les mutacions de codons prematurs de parada i en aquests llocs s'incorpori un aminoàcid. La gentamicina i altres aminoglicosidases poden restaurar la síntesi correcta de la proteïna CFTR. Dos assajos clínics s'han dut a terme administrant gentamicina a individus que tenien mutacions sense sentit en el gen *CFTR* (145, 146).

Un altre aspecte que cal tenir en compte és el fet de que la introducció d'un aminoàcid en el codó on hi havia parada prematura és a l'atzar. Per tant això pot convertir la mutació de classe I en una mutació de les altres classes. En aquest cas, s'hauria de combinar amb una altra teràpia adequada al nou tipus de mutació. A més, cal tenir en compte que actuen sense diana específica, podent afectar altres gens.

Mutacions de Classe II; Existeix un gran interès en identificar totes les molècules *xaperones* implicades en el plegament i el tràfic de la proteïna a la membrana; encara que moltes d'elles ja es coneixen, com Hsc70/Hsp70-Hdj-1/2 (36-38), Calnexina (39), CHIP (41), Hsp90 (42), HspBP1 (43) i Bag-2 (44). Algunes d'elles mantenen l'estructura de la proteïna, i d'altres promouen la seva ubiquitinització i degradació (veure apartat biogènesi de la proteïna). Molècules *xaperones* de baix pes molecular, com el glicerol, l'òxid de N-trimetilamina i l'aigua deuterada, són capaces d'estabilitzar la proteïna i incrementar la seva mobilitat durant l'associació amb els microtúbuls oligomèrics (147). Aquests compostos són coneguts com *xaperones* químiques. Desafortunadament en el cas del glicerol, les quantitats necessàries per rescatar el fenotip són molt altes, per tant aquest tractament vàlid *in vitro*, no és aplicable en la teràpia clínica, degut a la seva toxicitat. Altres alternatives al glicerol serien el mio-inositol, la betaïna i la taurina, ja que tenen una menor toxicitat (148).

Una via més refinada, seria la utilització de xaperones farmacològiques, que es distingeixen de les químiques degut a la seva especificitat. Un exemple de farmacoxaperones serien els compostos Benzo(c)quinolizinium (149).

L'associació de Hsp70 i calnexina a CFTR promou la seva degradació. La droga Sodi-4-fenilbutirat (4-PBA) promou el tràfic de la proteïna CFTR mutant F508del a la membrana (150). La seva acció es deguda a que provoca una disminució de Hsc70, impeding la formació de les unions CFTR-Hsc70 i un increment de Hsp70, afavorint la connexió de Hsp70 amb CFTR.

Mutacions de Classe III; Existeixen diversos compostos que augmenten l'activitat del canal CFTR; s'ha descrit que compostos com els inhibidors de les fosfodiesterases incrementen els nivells de cAMP, o bé els derivats de flavonoides augmenten l'activitat de CFTR en línies cel·lulars. Les alkyl-xantines (derivats de flavonoides), com el 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (CPX) i la genisteïna, són els més importants (151). La genisteïna és un potent activador de CFTR, i afecta la unió d'ATP a G551D. També tenim la droga milrinona, que és un inhibidor de les fosfodiesterases. La seva acció bloqueja cGMP i d'aquesta manera s'incrementen els nivells de cAMP i CFTR es activada (152).

Mutacions de Classe IV; Es pot incrementar la funció de CFTR, augmentant els nivells citosòlics de cAMP (per promoure la fosforilació de CFTR), inhibint l'activitat de les fosfatases (per bloquejar la defosforilació de CFTR), o bé interactuant directament amb CFTR (151).

Mutacions de Classe V; les mutacions que s'inclouen en aquest grup sempre produeixen una mica de CFTR normal, ja que donen lloc a processos d'empalmament tant aberrants com correctes. Els nivells de transcrits variaran segons el pacient o segons l'òrgan dins del mateix pacient.

El procés d'empalmament es regulat per complexos formats per diferents factors que s'uneixen a diferents motius d'empalmament. Per tant, seria interessant en primer lloc conèixer millor la maquinaria i la seva regulació.

I-9.1.2 Teràpia gènica

Un cop es descobrí el gen de la FQ, estudis *in vitro* demostraren que la introducció de DNA complementari (cDNA) de CFTR en cèl·lules afectades podia corregir el defecte del canal de clorur (153, 154), convertint-se la teràpia gènica en un tractament efectiu.

Existeixen diferents característiques d'aquesta malaltia que l'afavoreixen per ser una bona candidata per aquest tipus de teràpia. En primer lloc, la proteïna madura es localitza a la membrana apical de les cèl·lules epitelials de les vies respiratòries a les glàndules de les mucoses (155), per tant són potencialment accessibles a aerosols. En segon lloc, diferents estudis han evidenciat que es requereixen nivells mínims de CFTR per corregir la funció del canal de clorur, i amb un 10% de cèl·lules corregides és suficient per normalitzar el nivell de transport de clorur, encara que en el cas de l'absorció de sodi és necessita un percentatge molt més alt. I per últim, existeix la possibilitat de mesurar la funcionalitat del gen mitjançant assajos *in vivo* de l'activitat del canal de clorur amb mesures de les diferències de potencial nasal (153).

Estudis inicials en humans utilitzant vectors virals, com els derivats dels adenovirus (156-158) i vectors no virals, com lípids catiónics (159, 160), han aconseguit l'expressió del gen en les vies respiratòries. Encara que els resultats són encoratjadors, no són prou efectius, degut a una pobre eficiència de transfecció (161), una duració limitada de l'expressió del gen (162) i una resposta immune i inflamatòria als adenovirus (157, 161).

Objectius

Existeixen moltes evidències en la literatura on les mutacions de sentit erroni, independentment de la seva localització en el gen *CFTR*, poden afectar a la funció del canal CFTR a diferents nivells: biogènesi de la proteïna, transport i localització, propietats electrofisiològiques del canal, com la probabilitat d'obertura o la conductància, etc....

Diferents estudis d'estructura-activitat han suggerit també l'importància dels dos dominis transmembrana homòlegs pel seu paper estructural com a formadors del porus, i de l'extrem N-terminal de CFTR en la regulació de la proteïna, tant a nivell del tràfic com a nivell de l'obertura del canal.

Tenint en compte aquests antecedents en el present estudi s'han analitzat les conseqüències funcionals de vuit mutacions amb sentit erroni localitzades en la regió N-terminal de CFTR i que havien estat identificades majoritàriament a la població FQ espanyola.

Per dur a terme aquest estudi ens plantejarem els següents objectius específics:

1. La introducció de les vuit mutacions *missense* en el vector pCMVCFTRNot6.2wt, mitjançant mutagènesi dirigida, i la seva expressió en cèl·lules epitelials HEK293.
2. L'anàlisi del processament de les proteïnes mutants i la determinació del seu patró de maduració mitjançant Western blot.
3. L'estudi del tràfic cel·lular de cadascun dels mutants i la determinació de la seva localització subcel·lular mitjançant immunocitoquímica.
4. La caracterització funcional del canal CFTR utilitzant la tècnica de "Patch clamp" en configuració "whole cell" i en configuració "excised inside-out".
5. Relacionar els resultats de les mutacions analitzades en quant el comportament del canal CFTR amb el fenotip dels pacients, per establir una correlació genotip-fenotip més acurada.

Materials i mètodes

M-1. Clonatge i expressió de mutacions de sentit erroni

M-1.1. Vectors d'expressió

Per a l'expressió del gen *CFTR* i de *CFTR* amb la mutació p.F508del s'utilitzaren els vectors d'expressió pCMVCFTRNot6.2wt i pCMVCFTRNot6.2delF508, que contenen el cDNA de 6.2 Kb que codifica per la proteïna "wild type" de *CFTR* i per la proteïna mutant p.F508del, respectivament. Ambdós cDNAs estan clonats en el vector pCMV (Fig. M-1) de 3681 bp, inserits en el lloc de restricció de Not I, i van ser proporcionats per la Dra. Johanna Rommens (Hospital for Sick Children, Toronto, Canada). El vector pCMV conté tots els elements necessaris per a la correcta expressió en cèl·lules eucariotes: el promotor del citomegalovirus, un lloc de poliadenilació del virus SV40 i llocs de *splicing*.

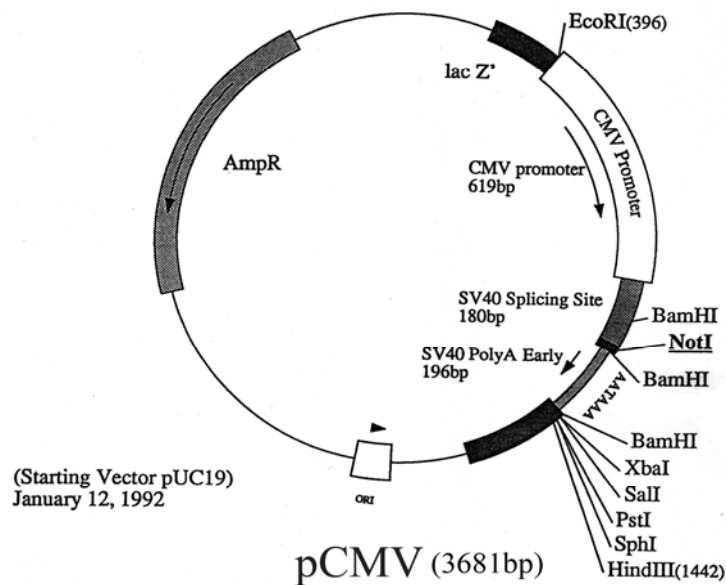


Figura M-1. Vector d'expressió pCMV. Esquema del plasmidi pCMV on es van inserir els cDNAs del gen *CFTR*, i del gen *CFTR* amb la mutació p.F508del, en el lloc de restricció de Not I. Cedit per la doctora Johanna Rommens, University of Toronto.

També s'utilitzà un altre vector d'expressió del gen de la proteïna verda fluorescent (EGFP): el vector d'expressió pEGFP-N1 (Genbank Accession number: U55762) (BD Biosciences, Clontech, CA), optimitzat per millorar la fluorescència i l'expressió de

la proteïna verda en cèl·lules de mamífers. Vam utilitzar aquest vector en paral·lel amb el de CFTR, com a marcador de cèl·lules transfectades (veure fig. M-2).

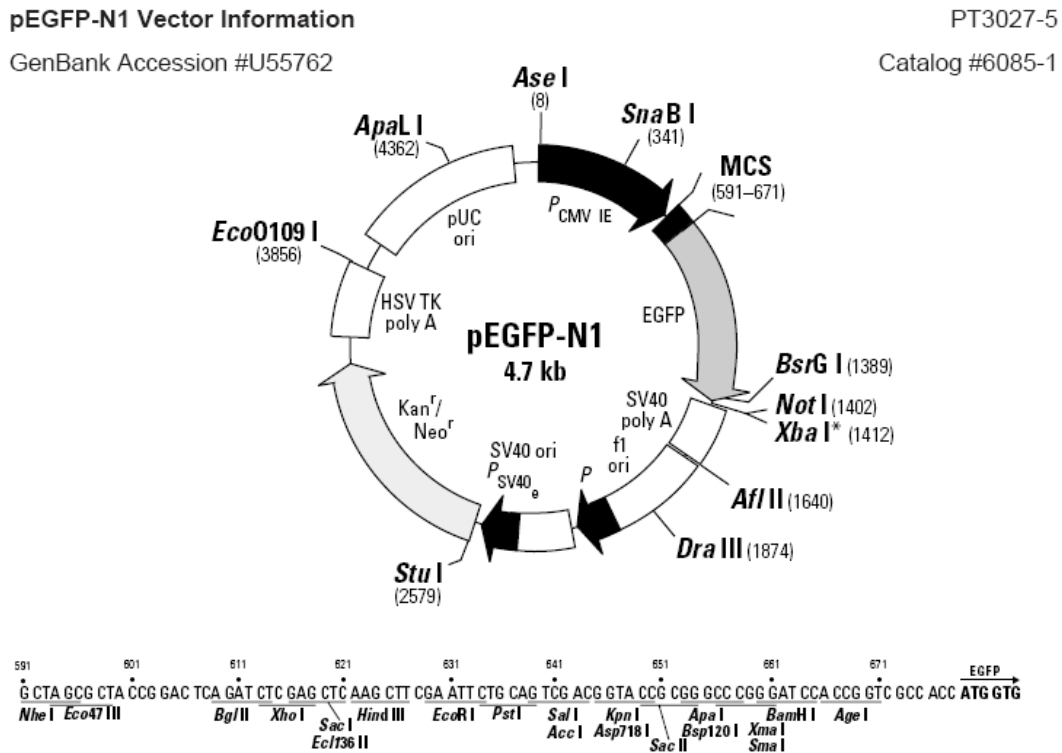


Figura M-2. Vector d'expressió pEGFP-N1. Esquema del vector d'expressió comercial pEGFP-N1 de Clontech.

M-1.2. Mutagènesi dirigida

Les mutacions puntuals en el gen *CFTR*, p.P5L, p.S50P, p.E60K, p.R75Q, p.G85E, p.G85V, p.Y89C i p.E92K es varen generar en el plasmidi pCMVCFTRNot6.2wt mitjançant mutagènesi dirigida per oligonucleòtid. S'utilitzà el kit "QuikChange™ XL-Site-Directed Mutagènesis" (Stratagene, La Jolla, Ca, USA), dissenyat específicament per aconseguir una mutagènesi dirigida eficient en plasmidis de gran tamany. El primer pas fou introduir el canvi puntual en la seqüència nucleotídica del cDNA mitjançant una PCR, després es varen digerir les cadenes parentals i posteriorment s'obtingueren còpies del nou plasmidi generat mitjançant la seva expressió en cèl·lules procariotes (veure Fig. M-3).

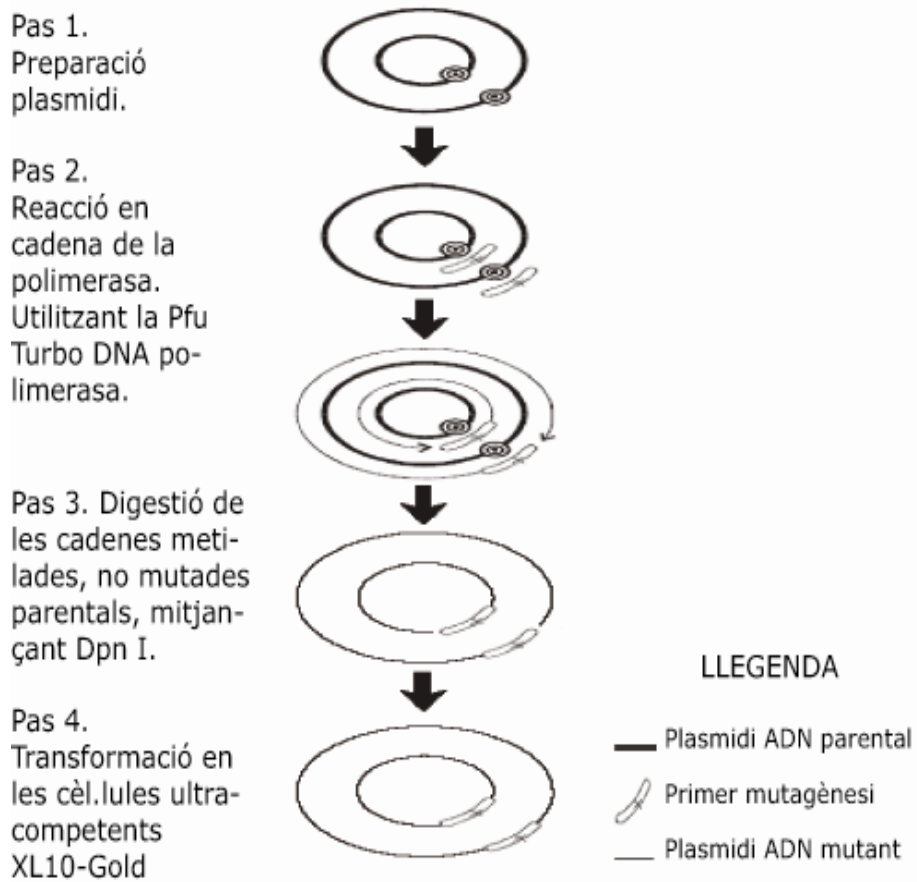


Figura M-3. Kit "QuikChange™ XL-Site-Directed Mutagenesis". Esquema-resum dels passos a seguir per a l'obtenció dels plasmidis mutants amb el Kit.

M-1.2.1. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Seguint les instruccions del kit, es dissenyaren les parelles d'oligonucleòtids adients per obtenir cadascuna de les mutacions puntuals (veure taula 1).

| Mutacions | Seqüència (5'>3') |
|-----------|---|
| p.P5L | CATGCAGAGGTTCGCT I TCTGGAAAAGGCCAG |
| p.S50P | GTTGATTCTGCTGACAATCTA C CTGAAAAATTGGAAAGAGAATG |
| p.E60K | GGAAAGAGAATGGGATAGAA A AGCTGGCTTCAAAGAAAAATC |
| p.R75Q | CTCATTAAATGCCCTTCGGC A ATGTTTTTTCTGGAGATTTATG |
| p.G85E | CTGGAGATTTATGTTCTATG A AATCTTTTTATATTTAGGGGAAG |
| p.G85V | CTGGAGATTTATGTTCTATG I AATCTTTTTATATTTAGGGGAAG |
| p.Y89C | CTGGAGATTTATGTTCTATG I AATCTTTTTATATTTAGGGGAAG |
| p.E92K | CTGGAGATTTATGTTCTATG I AATCTTTTTATATTTAGGGGAAG |

Taula 1. Encebadors de mutagènesi. A la columna de l'esquerra de la taula hi ha les diferents mutacions que es generaren per mutagènesi dirigida, i a la dreta els encebadors corresponents utilitzats per generar-les (només es mostren les seqüències d'oligonucleòtids direcció 5'>3'). En negreta es senyala el nucleòtid mutant.

Un cop dissenyats els encebadors per a cadascuna de les mutacions, es realitzà la PCR de mutagènesi de 18 cicles [50 s a 95°C (desnaturalització), 50 s a 60°C (hibridació) i 20 min a 68°C (elongació)]. Finalment es va fer un pas addicional d'elongació de 7 min a 68°C. Per a la reacció s'utilitzà l'enzim Pfu Turbo DNA polimerasa, que es caracteritza per replicar el DNA amb una gran fidelitat (proporcionat en el kit).

Posteriorment, el producte obtingut de la PCR es tractà amb l'enzim Dpn I, que digereix el DNA metilat, per tant degrada les còpies de DNA parental sense la mutació introduïda.

M-1.2.2. Transformació de bacteris

S'utilitzaren les cèl·lules ultracompetents XL 10-Gold per transformar amb el producte de la PCR de mutagènesi, i amplificar-ho.

Per cada transformació es va fer servir una alíquota de 45 µl de bacteris ultracompetents. S'afegia β-Mercaptoetanol, i seguidament el producte de la PCR, deixant-ho reposar en gel durant 30 min.

Passat aquest temps es feia un xoc tèrmic portant la barreja a 42°C durant 30 s. Es tornava immediatament al gel, i s'afegien 500 µl de medi LB enriquit amb NZY⁺ (veure: Composició de les solucions) i es feien créixer a 37°C durant 1 h en agitació a 225-250 rpm. Finalment, es sembraven 250 µl del cultiu en una placa de medi LB agar amb una concentració d'ampicil·lina de 50 µg/ml i s'incubava tota la nit a 37°C.

Les colònies obtingudes es feien créixer en tubs amb 3 ml de medi LB amb ampicil·lina a 37°C en agitació, i s'obtenia el seu DNA plasmídic amb el kit de mini-preps (Qiagen). Es feien stocks glicerolats de les colònies positives per a la seva conservació a -80°C.

M-1.2.3. Seqüenciació

Es verificà la incorporació del nucleòtid adient i l'absència de nucleòtids mutants a l'atzar en cadascun dels plasmidis mutants mitjançant seqüenciació automàtica del cDNA. S'utilitzà el seqüenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzers (Applied Biosystems,CA). S'emprà el reactiu Big dye v.3.1, que inclou el tampó de reacció, la DNA polimerasa, els dNTPs i els terminadors units a molècules fluorescents per poder realitzar les 13 reaccions de PCR de seqüenciació amb els encebadors corresponents (veure taula 2).

| Nom | Seqüència (5'>3') | Regió |
|--------|---------------------------|------------------------|
| E4R1 | TCTTATAAATCAAACATAACATAG | 5'UTR- Exó 4 ← |
| E7R2 | AAGTATCTCACATAGGCTGC | Exó 4 - Exó 7 ← |
| E7D1 | GTACAAACATGGTATGACTCT | Exó 7 - Exó 9 → |
| E8R1 | TCCCAGAAGGCTGTTACAT | Exó 7 - Exó 9 ← |
| E13R5 | GCCATCAGTTTACAGACACAG | Exó 9 - Exó 12 ← |
| E13R2 | TGTAAGGGAGTCTTTTGCACA | ½ Exó 13 ← |
| E13R1 | AAGTCTTCTTCGTTAATTTCTTC | ½ Exó 13 final ← |
| 13bi5' | CTCAATCCAATCAAACCTATACGAA | Exó 13 - Exó 15 → |
| E14D1 | TCGATATATTACTGTCCAC | Exó 14a - Exó 17a → |
| K19R | GGCATGTCAATGAACTTAAAGA | Exó 16 - Exó 19 ← |
| E19D1 | ATGCGATCTGTGAGCCGAG | Exó 19 - Exó 22 → |
| E22D1 | AAGCTTGACTTTGTCCTTG | Exó 22 - 3'UTR → |
| E22R1 | CTGGATCCAAATGAGCACTG | Exó 20- Exó 22 ← |

Taula 2. Encebadors de seqüenciació. En aquesta taula es mostren els oligonucleòtids emprats per a la seqüenciació del cDNA de CFTR, i la regió del cDNA que ens permet seqüenciar cadascun dels encebadors.

M-1.3. Clonatges

Les mutacions a l'atzar generades en els plasmidis amb les mutacions p.Y89C i p.E60K es trobaven en les posicions nucleotídiques 3581 i 3926 del cDNA de CFTR, respectivament. Així que s'escindí el fragment de plasmidi on es trobava la mutació puntual correcta i es clonà en el vector d'expressió pCMVCFTRNot6.2wt.

L'escissió del fragment es dugué a terme amb l'enzim de restricció BspEI. El vector té dues dianes de restricció per aquest enzim; una d'elles es troba en la posició 1130 en el cDNA de CFTR i l'altra es troba propera al promotor CMV, sent la seva diana de restricció T/CCGGA. Es digeriren pCMVCFTRNot6.2wt, pCMVCFTRNot6.2wt amb la mutació puntual p.Y89C i pCMVCFTRNot6.2wt amb la mutació puntual p.E60K. D'aquesta digestió s'obtingueren dos fragments per cadascun dels plasmidis, un fragment petit d'uns 3900 pb, i un fragment gran d'uns 5980 pb, que es feren córrer en una electroforesi en gel d'agarosa de baix punt de fusió al 1%. S'el·luïren i es purificaren les bandes corresponents al fragment gran de pCMVCFTRNot6.2wt i al fragment petit del plasmidi amb la mutació desitjada, amb el kit *MinElute Gel Extraction Kit* (Qiagen). Seguidament, es desfosforilà de 2 a 4 µg de DNA corresponents al fragment gran, amb fosfatasa alcalina (Roche) a 37°C durant 1 h. Un cop inactivada la fosfatasa alcalina amb el *MinElute Gel Extraction Kit* (Qiagen), es feu la lligació dels dos fragments amb la T4 DNA lligasa (Gibco) amb una proporció 3:1 d'insert respecte a vector, a temperatura ambient durant 4 h. El producte de la lligació es transformà en les cèl·lules ultracompetents XL-10 Gold i s'obtingué el DNA plasmídic, tal com s'indica en l'apartat 2.2.

La comprovació d'una correcta lligació, es feu en un primer pas mitjançant digestions amb tres enzims de restricció diferents, EcoRI, HindIII, XbaI. Posteriorment, els clons positius es seqüenciaren per comprovar que es mantenia la mutació desitjada, i que s'eliminava la mutació a l'atzar.

M-1.4. Cultius cel·lulars eucariotes

Tots els assajos en cultius cel·lulars eucariotes es varen fer en la línia cel·lular epitelial "Human Embryonic Kidney 293" (HEK293). Aquestes cèl·lules es mantingueren en un incubador, a 37°C i 5% CO₂, amb medi DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, Scotland) suplementat amb 10% de sèrum fetal boví, 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina i 2 mM de glutamina.

M-1.5. Transfeccions

Un estudi previ determinà el vehicle de transfecció no viral més eficient i menys tòxic en les cèl·lules HEK293. En aquest estudi comparatiu, utilitzant el gen reporter EGFP, es valoraren tres vectors no virals: Polyfect (Qiagen, Valencia, CA), Exgen 500™ [22KDa linear polyethylenimine (PEI)] (Euromedex, Souffelweyersheim, France) i GenePorter2™ (Gene Therapy Systems, San Diego, CA). L'anàlisi per citometria de flux de cèl·lules HEK293 transfectades amb el vector d'expressió pEGFP-N1 complexat amb qualsevol dels tres vectors no virals revelà que el vector més eficient era el Polyfect.

Així que seguint el protocol proveït per Qiagen, es sembraren 6×10^5 cèl·lules per pou en plaques de 6 pous, el dia abans de la transfecció. Les cèl·lules es co-transfectaren transitòriament amb 2 µg del plasmidi corresponent del gen *CFTR* i 200 ng del vector pEGFP-N1.

M-2. Anàlisi del processament i la localització de les proteïnes mutants

M-2.1 Control de transfecció

L'assaig de Western blot es feu amb els extractes proteics totals de cèl·lules transfectades transitòriament. Per tant, necessitàvem algun control de les eficiències de transfecció, per comprovar que cadascun dels extractes utilitzats provenia d'un pool de cèl·lules amb un percentatge de transfecció similar entre elles.

S'utilitzà la detecció de la proteïna verda fluorescent mitjançant citometria de flux, que fou transfectada alhora amb el plasmidi corresponent del gen *CFTR*. Les cèl·lules es desenganxaven de la placa de cultiu amb tripsina, i es rentaven dos cops amb PBS fred, una cinquena part s'analitzava en el citòmetre de flux, i la resta es reservava per obtenir l'extracte de proteïna total.

M-2.2. Obtenció i quantificació dels extractes proteics

48 hores després de la transfecció, les cèl·lules HEK293 es rentaven dos cops amb PBS fred, i es solubilitzaven amb 150 µl de tampó de lisi RIPA durant 20 min en gel. Els extractes cel·lulars lisats es centrifugaven a 14000 rpm durant 10 min a 4°C, i es recuperaven els sobrenedants, que contenien els extractes proteics totals.

La quantificació de la proteïna total es realitzava mitjançant la detecció de la reacció colorimètrica a 652 nm de l'assaig BCA (Pierce Biotechnology, IL, USA).

M-2.3. Anàlisi del processament de las proteïnes mutants

Es barrejava 50 µg d'extracte proteic amb la meitat de volum de tampó de càrrega 3X més DTT 15% i es fraccionava electroforèticament amb un gel d'acrilamida al 7.3% (MiniProtean; BioRad), segons el mètode de Laemmli (SDS-PAGE). El gel es transferia en mullat sobre una membrana Hybond-C extra (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) segons el mètode de Towi, durant 2 h a 100V. Es bloquejava la membrana durant 1 h a temperatura ambient amb la solució de bloqueig I, i després s'incubava amb l'anticòs monoclonal MAB1660 (R&D Systems, MN, USA) que reconeix el domini R del canal, diluït en solució de bloqueig (1:500) tota la nit a 4°C. Paral·lelament, es detectava la proteïna ubiqua Golgina de 97 kDa, com a control de normalització de càrrega, amb l'anticòs monoclonal anti-Golgina 97 (1:2000, Molecular Probes, Eugene, OR) a 4°C tota la nit. Es feien tres rentats de 10 min amb la solució de bloqueig I i després s'incubava la membrana amb l'anticòs secundari anti-ratolí generat en cabra i conjugat a peroxidasa (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), diluït en solució de bloqueig (1:2000), durant 1 h a temperatura ambient, per reconèixer ambdós anticossos primaris. Es feien tres rentats de 10 min amb la solució de bloqueig I, i es feia reaccionar la membrana amb ECL (Amersham Biosciences). La detecció de la quimioluminescència emesa es feu amb el sistema "Versadoc Imaging" (BioRad, CA, USA) a diversos temps.

La quantificació de la densitometria de les bandes corresponents a CFTR es feu amb el software "Quantity one" (BioRad).

M-2.4. Anàlisi de la localització de les proteïnes mutants

Es varen sembrar 3×10^5 cèl·lules HEK293 en cobreobjectes 24 h abans de ser transfectades. La transfecció es realitzà com s'indica a l'apartat M-1.5.

L'assaig d'immunocitoquímica s'inicià 48h després de la transfecció, com en el cas de l'obtenció dels extractes proteics.

M-2.4.1. Detecció de la proteïna CFTR en la membrana citoplasmàtica

Les cèl·lules HEK293 transfectades es rentaven dos cops amb PBS fred, i s'incubaven amb la solució de bloqueig II durant 1 h a 4°C, mantenint-se la membrana citoplasmàtica intacta. Seguidament, es feia el marcatge de la membrana citoplasmàtica, amb la Concanavalina A, lectina que reconeix glicoproteïnes de membrana, conjugada a Alexa Fluor 488 diluït en la solució de bloqueig II (5 µg/ml, Molecular Probes) durant 20 min a 4°C. Es feien tres rentats amb la solució de bloqueig en fred i es fixaven amb paraformaldehid 4%, 10 min a 4°C. Després de rentar-se les cèl·lules tres cops amb PBS a temperatura ambient, s'incubaven amb l'anticòs primari MAB1660 diluït en la solució d'incubació (1:1000) durant tota la nit a 4°C. Es feien tres rentats amb PBS a temperatura ambient i s'incubaven amb l'anticòs secundari anti-ratolí generat en cabra, i conjugat a Alexa Fluor 568 diluït en la solució d'incubació (1:500) 1 h 30 min a 4°C. Es feien tres rentats amb PBS i s'incubaven amb TO-PRO 3 en PBS (1:3000) 1 h a temperatura ambient, per tenyir els nuclis. Es rentaven tres cops amb PBS, i es muntaven els cobreobjectes amb el medi de muntatge Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA).

M-2.4.2. Detecció de la proteïna CFTR intracel·lular

Les cèl·lules transfectades HEK293 es rentaven dos cops amb PBS fred, i es fixaven amb paraformaldehid 4%, 10min a 4°C. Les cèl·lules fixades es bloquejaven amb la solució de bloqueig III, que alhora les permeabilitzava, durant 1h a temperatura ambient, i seguidament s'incubaven amb la concanavalina A conjugada a Alexa Fluor 488 diluïda amb PBS (5 µg/ml) 20 min a temperatura ambient. La detecció de

la proteïna CFTR i la tinció dels nuclis de les cèl·lules es realitzà seguint el mateix protocol que en l'apartat anterior.

M-2.4.3. Adquisició d'imatges

Les imatges s'adquiriren amb un microscopi confocal espectral model Leica TCS SL (Leica, Heidelberg, Germany). S'utilitzà l'objectiu d'immersió de 63X, emprant tres longituds d'ona d'excitació (Ar 488nm, He/Ne 543nm, He/Ne 633nm). Posteriorment, les imatges es tractaren amb el programa LCS leica Confocal Software.

M-3. Mesura de l'activitat dels canals CFTR mutats

M-3.1. Com es mesura l'activitat de CFTR

Qualsevol que sigui el sistema en que un vol fer una mesura elèctrica, aquest es pot considerar com un circuit elèctric equivalent, i per tant podran ser utilitzats definicions i paràmetres elèctrics. Això s'aplica també a les membranes biològiques compostes de canals iònics i fosfolípids, com un model de resistència en paral·lel amb un capacitor. La resistència ve de les propietats dels canals iònics inherents a la membrana i el capacitor recau en les propietats passives, principalment relacionades amb la composició dels fosfolípids. Matemàticament això pot ser expressat com:

$$I_m = I_{\text{ionic}} + C_m (dV/dt)$$

Això significa que el corrent mesurat és la suma de dos components. Estem interessats en el component iònic, el moviment d'ions a través de la membrana. L'altre component ve de l'anomenat corrent capacitatiu. Aquest corrent és només un transitori generat quan el capacitor de la membrana es carrega. Aquest és l'efecte elèctric mesurable del que passa en les dues cares de la membrana a nivell microscòpic; l'acumulació de carreges en un costat i la descarrega a l'altre, degut al diferent valor de potencial aplicat a cada banda. En alguns casos el corrent capacitatiu és un paràmetre útil per saber les propietats de la membrana o per calcular el tamany de la cèl·lula. Però en el moment de fixar un voltatge, per tal de

mesurar els canvis de corrent, el segon component de la formula és converteix en zero.

La tècnica de *Patch-clamp* és indubtablement el millor mètode per l'estudi del comportament dels canals iònics. Al 1976, Neher i Sakmann (163) van utilitzar per primer cop la tècnica de *Patch-clamp* en configuració *cell-attached* per l'estudi de canals catiónics activats per acetilcolina en musculatura esquelètica de granota. La capacitat d'aquesta tècnica de permetre registrar les corrents a través d'un o més canals en temps real és el que li confereix tant d'interès.

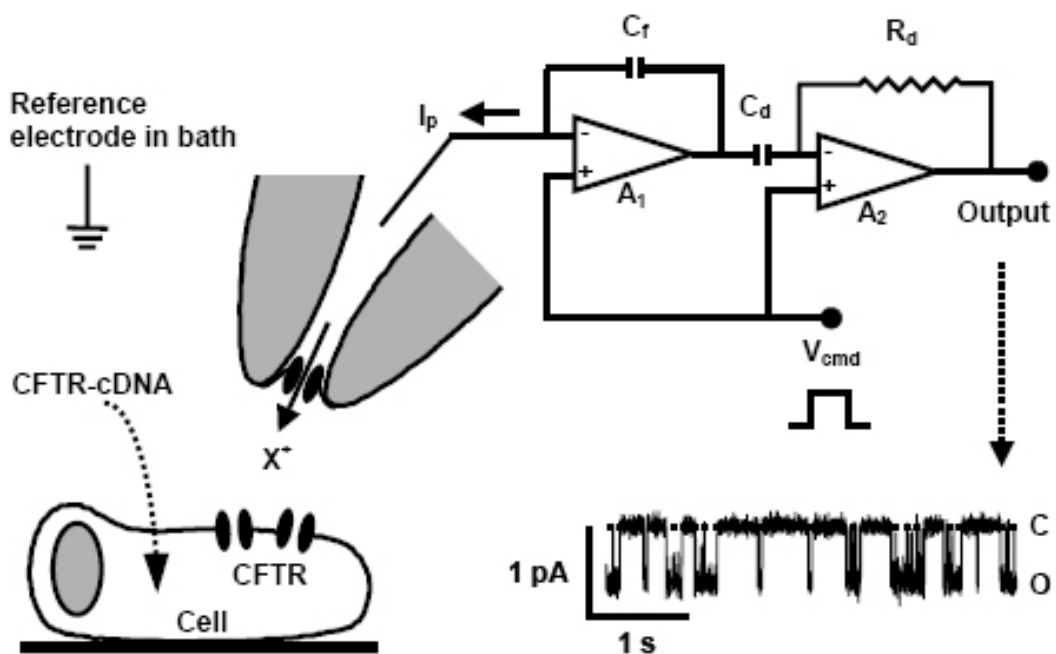


Figura M-4. Esquema del sistema de mesura de l'activitat elèctrica dels canals iònics, anomenat *Patch Clamp*.

M-3.2. Registres de patch-clamp en configuració *whole cell*

Les cèl·lules HEK293 transfectades amb el plasmidi corresponent del gen *CFTR* i el plasmidi pEGFP-N1 (seguint el protocol que s'indica en l'apartat M-1.5), es dipositaven en cobreobjectes. Els registres es realitzaven amb les cèl·lules que havien estat transfectades prèviament a l'adquisició dels registres (entre 8 i 36 h

prèvies, ja que 8 h era el temps mínim per poder detectar l'expressió de la proteïna verda fluorescent en el microscopi de fluorescència).

Els cobreobjectes es transferien a la cambreta de registre on es realitzaven els experiments a temperatura ambient. Les solucions extracel·lulars s'aplicaven al bany a través d'un sistema de perfusió per gravetat.

Els corrents de membrana es registraven en condicions de fixació de voltatge, utilitzant la tècnica de *patch-clamp* descrita per Hamill (164) i en configuració de *whole cell*.

Les micropipetes es fabricaven a partir de capil·lars de vidre de borosilicat, amb un diàmetre extern de 1.2 mm i un diàmetre intern de 0.94 mm (Harvard Apparatus, UK), utilitzant un estirador de pipetes horitzontal P-97 (Sutter Instruments, Novato, CA), i obtenint una resistència entre 2-4 MOhm. Les micropipetes s'omplien amb la solució interna, i s'emprava un elèctrode de Ag/AgCl. S'obtenien segells de 4-5 Gigaohms sobre la superfície de la membrana abans d'establir la configuració *whole cell*. Els corrents macroscòpics s'adquirien i analitzaren mitjançant l'amplificador de *patch-clamp* EPC-9 (HEKA, Heildeberg, Germany) i el software associat a l'amplificador que el controla. Els corrents s'adquirien a 3 kHz i es filtraven posteriorment a 0.5 KHz. El potencial de membrana es mantenia a -40mV.

Les cèl·lules es banyaven amb la solució extracel·lular passats els primers 10 s de registre, i seguidament s'intercanviava la solució de perfusió per la mateixa solució amb 5 µM Forskolina durant 2 min, per estimular els corrents de clorur. L'inhibidor específic de CFTR (CFTR (inh)-172) (Sigma aldrich) s'aplicava a 1 µM amb la solució extracel·lular per perfusió.

M-3.3 Registres de patch-clamp de canal únic en configuració *excised inside-out*

L'estudi individual de l'activitat de cadascun dels canals de CFTR detectats a la membrana citoplasmàtica es realitzà mitjançant la tècnica de patch-clamp de canal únic en configuració *Excised inside-out*.

Les cèl·lules, que havien estat transfectades amb el plasmidi amb el cDNA de CFTR i el plasmidi pEGFP-N1 8 h abans, es plantaven en cobreobjectes tractats prèviament amb poli-L-Lisina (Sigma) 12 h prèvies a la seva utilització, per assegurar l'adhesió de les cèl·lules en el vidre en el moment de l'escissió del fragment de membrana unit a la micropipeta.

Les micropipetes es fabricaven a partir de vidre de borosilicat utilitzant un estirador de vidre horitzontal P-97 (Sutter Instruments), com en el cas anterior (veure

apartat 6.1.), obtenint-ne una resistència de 8-12 MOhm, i es recobria la punta amb Sylgard®, resina amb base de silicona (Dow Corning), per disminuir la capacitança de la pipeta. La punta de les micropipetes es forjava amb una microforja i s'omplia amb la solució extracel·lular.

Les cèl·lules es col·locaven en la cambreta de registre i es banyaven en la mateixa solució amb que s'havien omplert les pipetes, obtenint condicions simètriques entre l'interior (el bany) i l'exterior (la micropipeta) de la cèl·lula. Després d'aconseguir un segell d'alta resistència (Gigasegell), es neutralitzava el transient capacitatiu de la pipeta i s'escindia el pegat unit a la pipeta. El potencial de membrana es mantenia a -80 mV. Posteriorment, s'afegia al bany 1 ml de solució extracel·lular amb 75 nM de la subunitat catalítica pKA, 1 mM de Mg-ATP (ambdós de Sigma), per activar els canals de CFTR.

L'amplificador de *patch-clamp* EPC-9 i el software associat a l'amplificador que el controla (HEKA, Heildeberg, Germany) s'utilitzà per a la fixació del voltatge i per a l'adquisició dels corrents de canal únic. Els corrents s'adquirien a 10 kHz i es filtraven digitalment a freqüències amb un filtre passabaixos amb una freqüència de tall entre 200 i 500 Hz.

M-3.4. Anàlisi dels registres de canal únic

L'anàlisi dels registres adquirits es feu amb el programa EDR software v. 3.6.8 (Dr. John Dempster, Strathclyde University, UK) i Igor Pro 5 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR).

La mesura de les amplituds dels registres de canal únic s'efectuà a partir dels histogrames generats de tots els punts.

La conductància es calculà dividint la corrent unitària per la diferència entre el voltatge aplicat i el potencial de reversió. Es mesuraren dos paràmetres cinètics, la mitjana de temps d'obertura del canal i la probabilitat d'obertura (P_o) del canal. Per la mitjana de temps d'obertura es fixà un 50% com a llindar de selecció de detecció d'esdeveniments i es descartaren aquells que la seva duració era menor de 1 ms. La NPO es calculà utilitzant l'equació:

$$NPO = \sum (\tau_1 + \tau_2 + \dots + \tau_n) / \tau_{total}$$

On N és el nombre de canals, τ_{total} és el temps total analitzat, i τ_i és el temps en que i o més canals estan oberts, és a dir: τ_1 és el temps en que un o més canals estan oberts, τ_2 és el temps en que dos o més canals estan oberts, i així

successivament. Per calcular la *NPo* només s'utilitzaven els registres estables que presentaven una duració entre 1 i 6 min, obtinguts de segells on detectarem entre 1 i 5 canals; aquells amb un nombre major de canals es van excloure.

M-3.5. Anàlisi estadístic

Els resultats s'expressaren com a mitjanes \pm SEM de n observacions. Per a la comparació de les dades s'utilitzà "one-way analysis of variance" (ANOVA). Es consideraren diferències estadísticament significatives quan la $P < 0.05$. Tots els tests estadístics es feren amb el programa Graph Pad InStat software v. 3.

M-4. Composició de les solucions

| Solucions | Composició solucions |
|----------------------------|---|
| LB-Agar (per litre) | <p>10 g NaCl 10 g triptona 5 g extracte de llevat 20 g agar Afegir aigua desionitzada fins un volum 1 l Ajustar pH a 7.0 amb 5N NaOH Autoclavar</p> |
| NZY+ (per litre) | <p>10 g NZ amina (caseïna hidrolitzada) 5 g extracte de llevat 5 g NaCl Ajustar pH 7.5 amb NaOH Autoclavar Abans d'utilitzar complementar amb 12.5 ml 1M MgCl₂, 12.5 ml 1M MgSO₄ i 20 ml de 20% (w/v) de glucosa. Filtrar</p> |
| Tampó de Lisi RIPA | <p>25 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl 1% Triton X-100 1% deoxicolat sòdic 0.1% SDS 10 mM iodoacetat 10 µg/ml chimostatina 10 µg/ml pepstatina A 10 µg/ml antipaina 10 µg/ml leupeptina 100 µg/ml aprotinina 100 µM PMSF</p> |

| | |
|--|--|
| PBS | tampó fosfat 10 mM, pH 7.4 NaCl 140 mM, KCl 3 mM |
| Tampó de càrrega | Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8 Glicerol 20% SDS 2% β -Mercaptoetanol 5% |
| Solució de bloqueig I | PBS Tween-20 0.05% llet 2% |
| Solució de bloqueig II | PBS BSA 1% (w/v) azida sòdica 0.1% (w/v) |
| Solució d'incubació | PBS Tritó X-100 0.2% Sèrum fetal boví 1% |
| Solució de bloqueig III | PBS Sèrum fetal boví 20% Tritó X-100 0.2% |
| Solució extracel·lular per "whole-cell" | 140 mM clorur de N-metil-D-glucamina (NMDG-Cl) 1 mM $MgCl_2$ 10 mM Glucosa 10 mM Hepes Ajustar pH 7.4 amb Tris |

| | |
|---|---|
| Solució intracel·lular per "whole-cell" | 140 mM NMDG-Cl 5 mM EGTA 5 mM MgCl ₂ 10 mM Hepes Ajustar pH 7.2 amb Tris Afegir 5 mM Mg-ATP just abans d'utilitzar, i tornar a calibrar el pH, ja que concentracions tan altes d'ATP acidifiquen el medi. |
| Solució extra- intracel·lular per "excised inside-out" | 140 mM NMDG 3 mM MgCl ₂ 1 mM Cs EGTA 10 mM TES Ajustar pH 7.3 amb HCl |

Resultats

R-1. Descripció de les mutacions analitzades

R-1.1. Localització en el canal CFTR

En aquest estudi s'analitzà l'efecte que produeixen vuit canvis d'aminoàcids, localitzats a la regió N-terminal de la proteïna CFTR, en l'expressió, el processament i l'activitat del canal. Quatre d'aquests residus es troben a l'extrem N-terminal (p.P5L, p.S50P, p.E60K, p.R75Q) i els altres quatre en el primer fragment transmembrana (MSD1) (p.G85E, p.G85V, p.Y89C, p.E92K) (veure fig. R-1).

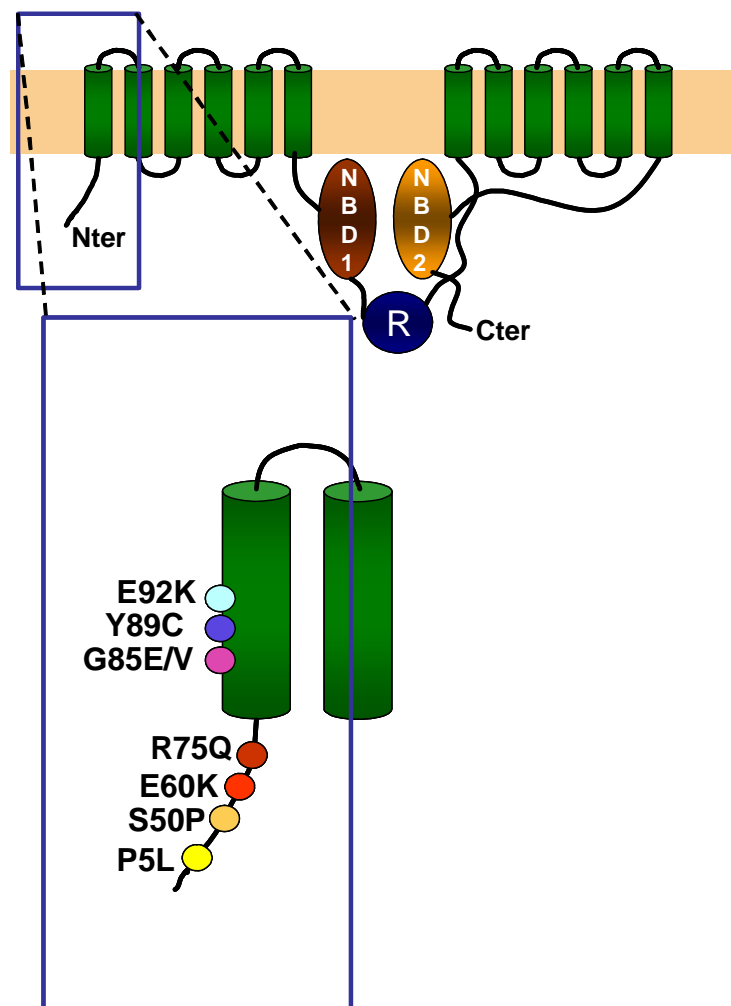


Figura R-1. Representació esquemàtica de les mutacions puntuals analitzades en aquest estudi.

R-1.2. Anàlisi de la conservació dels aminoàcids mutats

La primera fase de l'estudi, abans de generar les mutacions en els vectors d'expressió, va ser avaluar el grau de conservació dels aminoàcids en l'evolució. Per això, s'efectuà l'alineament de l'extrem N-terminal (els 100 primers aminoàcids) de la proteïna CFTR provinents de 8 espècies diferents de vertebrats: *Homo sapiens* (GenBank accession nº NM_000492), *Mus musculus* (GenBank accession nº NM_021050), *Rattus norvegicus* (GenBank accession nº. NM_031506), *Oryctolagus cuniculus* (GenBank accession nº. NM_001082716), *Bos taurus* (GenBank accession nº. NM_174018), *Ovis aries* (GenBank accession nº. NM_001009781), *Xenopus laevis* (GenBank accession nº. X65256) i *Squalus acanthias* (GenBank accession nº. M83785). Aquest alineament es realitzà mitjançant el programa d'alineament múltiple de seqüències *ClustalW*. Les 8 variants es trobaven completament conservades en les 8 espècies analitzades (veure fig. R-2).

| | | |
|-------------------------------|---|------------|
| | 1 | 50 |
| <i>H. sapiens</i> (Humano) | MQRS P LEKASVSKLFFSWTRPILRKGQRLELSDIYQIPSVDSADNLS | |
| <i>M. musculus</i> (Ratón) | MQKS P LEKASFISKLFFSWTTPILRKGRRHLELSDIYQAPSADSADHLS | |
| <i>R. norvegicus</i> (Rata) | MQKS P LEKASFISKLFFSWTTPILRKGRRHLDLSDIYHSPSPDSADHLS | |
| <i>O. cuniculus</i> (Conejo) | MQRS P LEKAGVLSKLFFSWTRPILRKGQRLELSDIYQIPSAADSADNLS | |
| <i>B. taurus</i> (Toro) | MQRS P LEKASVSKVFFSWTRPILKKGQRLELSDIYHISSSDSADNLS | |
| <i>O. aries</i> (Oveja) | MQRS P LEKASVSKLFFSWTRPILKKGQRLELSDIYHISSSDSADNLS | |
| <i>X. laevis</i> (Rana) | MQKT P LEKASIFSQIFFSWTKPILWKGQRLELSDIYQIHPGDSADNLS | |
| <i>S. acanthias</i> (Tiburón) | MQRS P IEKANAFSKLFFRWPRPILKKGQRQKLELSDIYQIPSSDADELS | |
| | 51 | 100 |
| <i>H. sapiens</i> (Humano) | EKLEREWDR E LAS-KKNPKLINALR R CFFWRFMFY G IFLY L GEVTKAVQPL | |
| <i>M. musculus</i> (Ratón) | EKLEREWDR E QAS-KKNPQLIHALR R CFFWRFLFY G ILLY L GEVTKAVQPV | |
| <i>R. norvegicus</i> (Rata) | EKLEREWDR E QAS-KRNPQLIHALR R CFVWRVFVY G VLLY L GEVTKAVQPV | |
| <i>O. cuniculus</i> (Conejo) | EKLEREWDR E LAS-KKNPKLINALR R CFFWRFMFY G IFLY L GEVTKAVQPL | |
| <i>B. taurus</i> (Toro) | EKLEREWDR E LAS-KKNPKLINALR R CFFWRFMFY G IILY L GEVTKAVQPL | |
| <i>O. aries</i> (Oveja) | EKLEREWDR E LAS-KKNPKLINALR R CFFWRFMFY G IILY L GEVTKAVQPL | |
| <i>X. laevis</i> (Rana) | ERLEREWDR E VATSKKNPKLINALK R CFFWKFLFY G ILLY L GEVTKAVQPL | |
| <i>S. acanthias</i> (Tiburón) | EMLEREWDR E LATSKKNPKLVNALR R CFFWRFLFY G ILLY F VEFTKAVQPL | |

Figura R-2. Alineament múltiple de la seqüència dels 100 primers aminoàcids de la proteïna CFTR provinents de 8 espècies diferents. Les seqüències provenen de humà (*Homo sapiens*, GenBankNM_000492), ratolí (*Mus musculus*, GenBankNM_021050), rata (*Rattus norvegicus*, GenBankNM_031506), conill (*Oryctolagus cuniculus*, GenBank NM_001082716), vaca (*Bos taurus*, GenBank NM_174018), ovella (*Ovis aries*, GenBank NM_001009781), granota

(*Xenopus laevis*, GenBank X65256), i tauró (*Squalus acanthias*, GenBank M83785). En vermell estan indicades les variants analitzades.

R-2. Clonatge i expressió de les diferents mutacions de canvi de sentit estudiades

R-2.1. Clonatge de les mutacions

Les 8 mutacions amb sentit erroni es generaren per mutagènesi dirigida en el vector d'expressió pCMVCFTRNot6.2wt i es van seqüenciar per verificar la incorporació del nucleòtid adient.

El resultat de la seqüenciació mostrà que dos dels plasmidis obtinguts per mutagènesi dirigida, p.Y89C i p.E60K, presentaven una mutació a l'atzar. Les mutacions a l'atzar en els plasmidis amb les mutacions p.Y89C i p.E60K es trobaven en les posicions nucleotídiques 3581 i 3926 del cDNA de CFTR, respectivament. Per tant, s'escindí el fragment de plasmidi on es trobava la mutació puntual correcta i es clonà en el vector d'expressió pCMVCFTRNot6.2wt.

La comprovació d'una correcte lligació, es feu en un primer pas mitjançant digestions amb tres enzims de restricció diferents, EcoRI, HindIII, XbaI, i posteriorment, els clons positius es van seqüenciar per comprovar que es mantenia la mutació desitjada, i s'havia eliminat la mutació a l'atzar.

R-2.2. Control de transfecció

Prèviament a la caracterització del processament post-traducciona l de les proteïnes mutants, es realitzava un control de transfecció. Per a dur a terme aquest control de transfecció es detectava el percentatge de cèl·lules transfectades amb EGFP-N1 mitjançant citometria de flux. Tal com es descriu a l'apartat corresponent de materials i mètodes, es transfectava alhora el plàsmid de pEGFP-N1 i el plàsmid corresponent de CFTR, en una proporció 1:10. Els percentatges de cèl·lules transfectades vives que es detectaven es trobaven compresos entre un 40 i un 50% (veure fig. R-3).

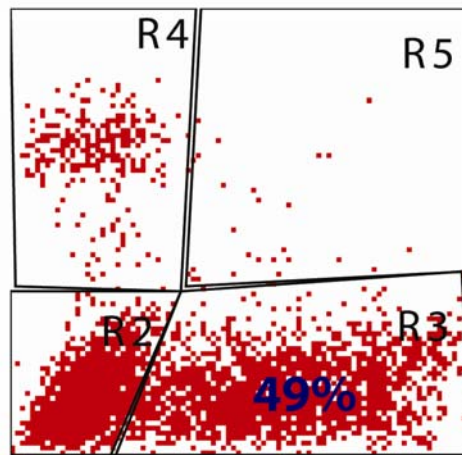


Figura R-3. Exemple representatiu d'anàlisi per citometria de flux. A la finestra R2 es detecten les cèl·lules vives, però negatives a la presència de proteïna fluorescent verda. A la finestra R3 es troben incloses les cèl·lules vives i transfectades amb pEGFP-N1. Les finestres R4 i R5 corresponen a cèl·lules mortes tenyides amb iodur de propidi.

R-3. Caracterització de l'efecte de les mutacions en la biogènesi del canal CFTR

R-3.1. Processament post-traducciona l de les mutacions a l'extrem N-terminal

La caracterització del processament post-traducciona l de les proteïnes mutants es dugué a terme determinant el patró de maduració de les proteïnes mitjançant la tècnica de Western blot.

Moltes mutacions puntuals en el gen *CFTR* produeixen defectes en el plegament o en la maduració de la proteïna. Durant aquest procés de maduració es va modificant el grup oligosacàrid unit a CFTR, com succeeix amb altres glicoproteïnes de membrana. En base a aquest increment de complexitat s'ha classificat a la proteïna en tres estats de maduració típics (165). La molècula, segons la presència

o no del grup glucídic i del seu nivell de complexitat, té un pes molecular diferent, i la tècnica de Western blot ens permet diferenciar cadascun dels estats. El procés de glicosilació de CFTR comença al ER produint-se la proteïna CFTR no glicosilada amb un pes molecular de 135 kDa, que correspon a la **banda A**, però és pràcticament indetectable, degut a la rapidesa en que els oligosacàrids s'uneixen als residus asparagina de la proteïna. La proteïna CFTR amb un pes molecular de 150 kDa, anomenada **banda B**, correspon a la proteïna CFTR que porta unit un oligosacàrid d'alt contingut en manosa, sent sensible a la digestió per l'enzim endoglicosidasa H. La **banda C**, de 170-180 kDa aproximadament, corresponen a la proteïna resultant del procés de maduració produït en el complex de Golgi, presentant una glicosilació complerta i complexa. En aquest estat la proteïna és resistent a la endoglicosidasa H.

La proteïna mutant p.F508del es caracteritza per tenir un processament incomplet i ser retinuda en el ER, per a una posterior degradació mitjançant els mecanismes cel·lulars de degradació proteosomal, per tant només es pot detectar la **banda A** i la **banda B** (32, 47, 165, 166).

Un cop generats els diferents plasmidis mutants amb la seva corresponent mutació puntual en el vector d'expressió pCMVCFTRNot6.2wt, es transfectaren transitòriament les cèl·lules HEK293 amb pCMVCFTRNot6.2wt, pCMVCFTRNot6.2delF508 i els 8 mutants generats, en paral·lel.

L'anàlisi per Western blot de les proteïnes CFTR sobreexpressades es féu utilitzant l'anticòs MAB1660, que reconeix el domini regulador (R) intracel·lular del canal. S'emprà la detecció de la proteïna endògena Golgina per normalitzar, i així poder comparar i quantificar relativament el processament de les proteïnes mutants de CFTR respecte els controls. Com a controls d'expressió del gen *CFTR*, s'utilitzà la detecció de la proteïna CFTR no mutant, i de la proteïna CFTR amb la mutació p.F508del. Es varen detectar quantitats majors de proteïna WT madura (Banda C) respecte la proteïna parcialment glicosilada (banda B). En canvi, quan s'expressava la proteïna mutant p.F508del només s'observava la proteïna parcialment glicosilada, i ens serví com a referència de proteïna mutant que queda retinuda en el ER (167).

Al expressar cinc de les mutacions analitzades vam detectar només la banda B, corresponent a la proteïna parcialment glicosilada, **p.S50P**, **p.E60K**, **p.G85E**, **p.G85V** i **p.E92K**; anàlogament a la proteïna mutada p.F508del, suggerint que aquestes cinc mutacions quedaven retingudes al ER. En canvi, Les mutacions **p.R75Q** i **p.Y89C** presentaven un patró de glicosilació molt similar a la proteïna CFTR WT, detectant majoritàriament la proteïna madura. En el cas de la mutació **p.P5L** vam observar la presència de la proteïna parcialment glicosilada i també la

banda C, corresponent a la proteïna amb una glicosilació complerta, però a diferència de p.R75Q i p.Y89C vam detectar una menor quantitat de proteïna madura (veure figura R-4A).

Es mesurà per densitometria la quantitat de proteïna CFTR madura expressada, normalitzant la Banda C de CFTR respecte la banda B, tant per CFTR WT com per cadascuna de les mutacions. Excepte p.R75Q i p.Y89C, la resta de mutacions expressen una quantitat significativament menor de proteïna madura que WT. En el cas de p.P5L vam observar al voltant d'un 13% de proteïna madura respecte proteïna madura de CFTR WT. Les altres mutacions produeixen una quantitat irrellevant de proteïna madura. (veure fig. R-4B).

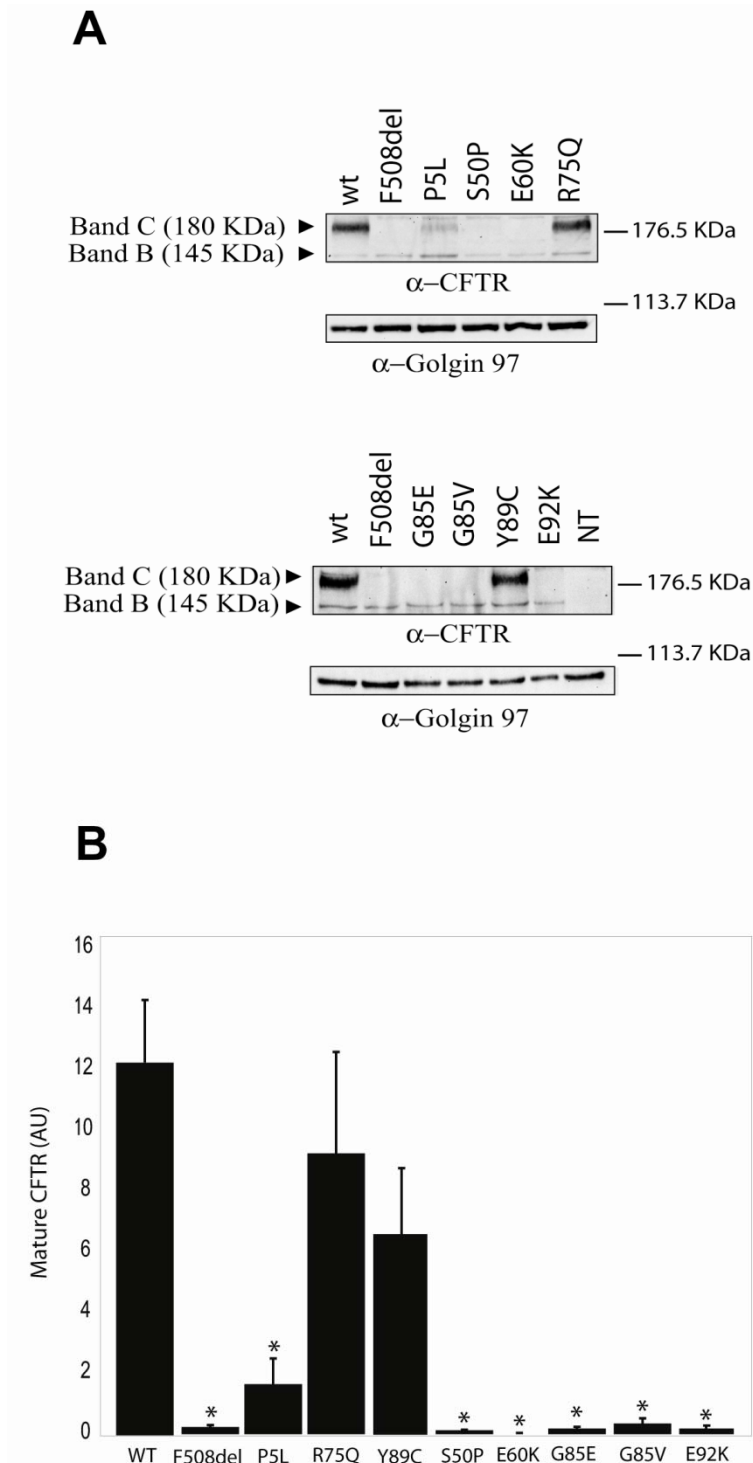


Figura R-4. Patró de maduració de la proteïna CFTR no mutada (WT), de la proteïna mutada p.F508del, i de les mutacions p.P5L, p.S50P, p.E60K, p.R75Q, p.G85E, p.G85V, p.Y89C i p.E92K. (A) Es transfectaren transitòriament cèl·lules HEK293 amb CFTR WT i la resta de mutacions, i es detectà la seva expressió per *Western blot* amb l'anticòs monoclonal MAB1660. La detecció de la proteïna endògena Golgina es va efectuar com a control de càrrega. (B) Quantificació de la proteïna CFTR madura per densitometria. La banda C es va normalitzar per la banda B. * $P < 0.01$ respecte CFTR WT, $n = 3$.

R-3.2. Distribució cel·lular

La distribució subcel·lular de la proteïna CFTR i de les variants generades s'efectuà amb un assaig d'immunolocalització, visualitzant posteriorment els resultats amb microscòpia confocal.

La proteïna CFTR es troba distribuïda en diferents compartiments cel·lulars segons el seu estat de maduració, sent el seu destí funcional la membrana citoplasmàtica, com en el cas de la majoria de glicoproteïnes. Inicialment, localitzem CFTR en el ER, on es produirà el seu assemblatge i s'iniciarà l'addició d'oligosacàrids. Si aquest procés inicial es realitza amb èxit i supera els punts de control, prosseguirà la seva maduració en el complex de Golgi, per acabar finalment a la membrana citoplasmàtica. El reciclatge de la proteïna a la membrana cel·lular es produeix via endosomes.

La proteïna mutada p.F508del, al no superar els punts de control del ER quedarà retinguda en ell per ser posteriorment degradada per la via del proteosoma.

En aquest estudi varem sobreexpressar el gen *CFTR* WT i les variants generades per mutagènesi dirigida en cèl·lules HEK293, i vam localitzar la seva distribució a la cèl·lula. Es van fer dos assajos paral·lels; per una banda marcàvem la membrana citoplasmàtica, i per un altre banda visualitzàvem el ER, emprant la lectina Concanavalina A unida a un fluorocrom. La lectina Concanavalina A té la propietat d'unir-se a glicoproteïnes de membrana. Aprofitant aquesta propietat de la molècula, es marcava la membrana citoplasmàtica de cèl·lules intactes, i en l'altre assaig paral·lel es marcaven les membranes de l'interior cel·lular d'aquelles cèl·lules prèviament fixades i permeabilitzades (ER i el complex de Golgi).

En la figura R-5, podem observar la proteïna CFTR no mutada (en vermell) co-localitzada majoritàriament amb la Concanavalina A (en verd) a la membrana citoplasmàtica de les cèl·lules HEK293. També, detectem una petita part de proteïna distribuïda a l'interior cel·lular, corresponent a aquella proteïna que s'estava sintetitzant i processant en el moment de fixar la cèl·lula. Quan marquem les membranes interiors amb la Concanavalina A, gairebé no s'observa colocalització.

A diferència de la proteïna CFTR no mutada, p.F508del no es troba localitzada a la membrana citoplasmàtica, sinó que s'observa bàsicament tota la proteïna sintetitzada co-localitzant amb la concanavalina A (en groc) a l'interior cel·lular.

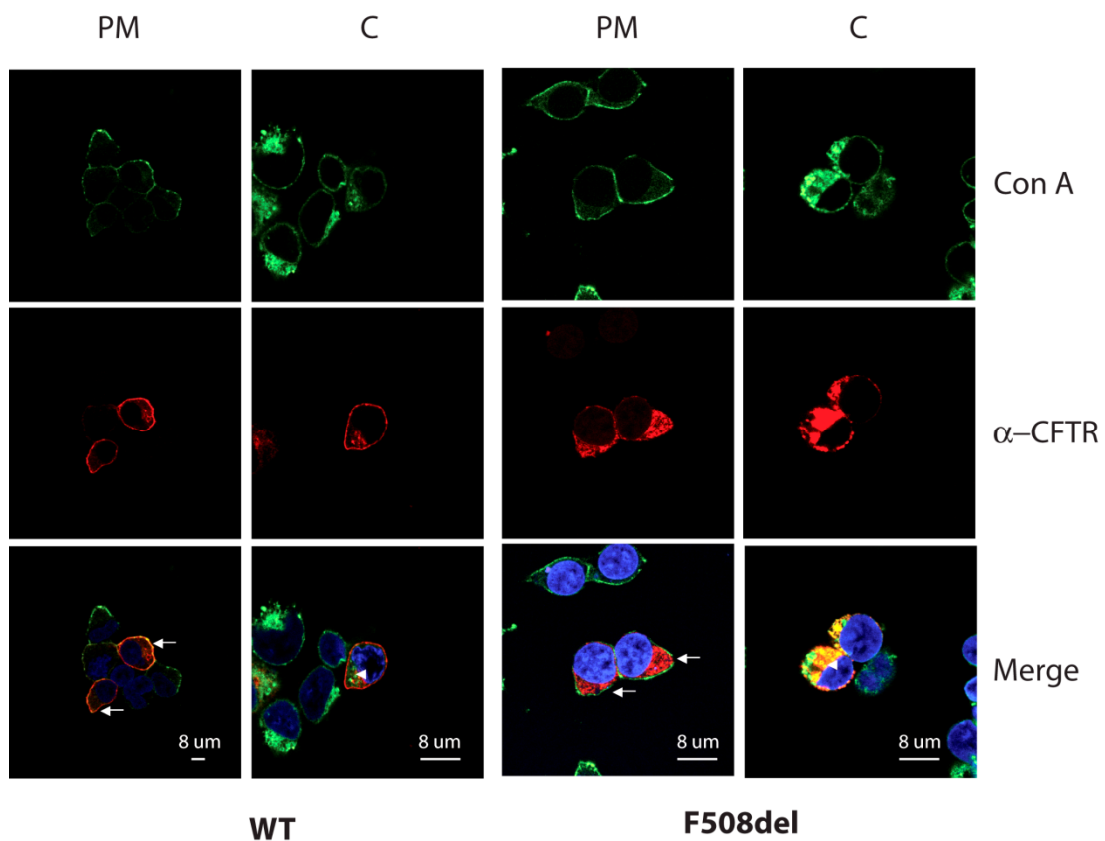


Figura R-5. Distribució subcel·lular de la proteïna CFTR no mutada (control positiu) (les dos primeres columnes) i la mutant p.F508del (les dos columnes de la dreta). El marcatge de la membrana citoplasmàtica i del reticle endoplasmàtic es feu amb la lectina Concanavalina A (en verd, primera fila), CFTR es detectà amb l'anticòs primari MAB1660 (en vermell, segona fila). Finalment es mostra la superposició de les dos imatges i es visualitzen els nuclis amb TO-PRO3 (en blau) (última fila).

L'assaig d'immunofluorescència ens mostrà que l'expressió de cinc de les mutacions de CFTR: p.S50P, p.E60K, p.G85E, p.G85V i p.E92K es localitzaven a l'interior cel·lular, i no s'observava la seva presència a la membrana de la cèl·lula, coincidint amb la distribució que havíem observat per la proteïna mutada p.F508del (veure fig. R-6). Aquests resultats es correlacionaven amb el patró de maduració observat per *Western blot*. En canvi, les mutacions p.R75Q i p.Y89C presentaven el mateix patró de distribució subcel·lular que la proteïna no mutada, observant-se majoritàriament la seva presència, juntament amb la concanavalina A, a la membrana plasmàtica, i una detecció mínima d'aquestes als compartiments intracel·lulars (veure fig. R-6). El fenotip intermedi el presentava el mutant p.P5L, trobant-se la major part del canal distribuït a l'interior cel·lular, colocalitzant

majoritàriament amb la concanavalina A. Però també existeix una petita proporció de canal sintetitzat que aconsegueix arribar a la membrana citoplasmàtica (veure fig. R-6).

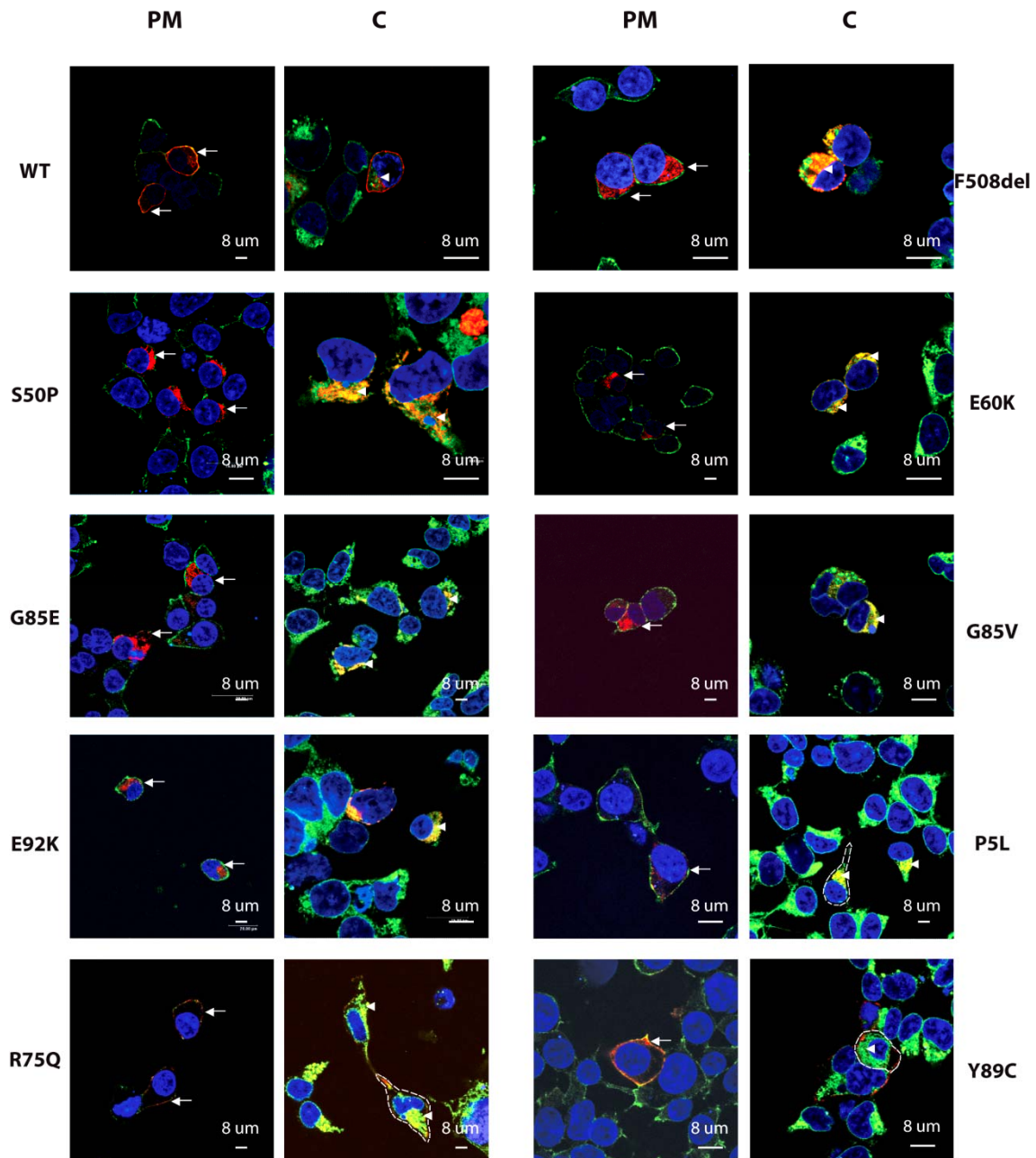


Figura R-6. Distribució subcel·lular de la proteïna CFTR WT i de les proteïnes mutants p.S50P, p.E60K, p.G85E, p.G85V, p.E92K, p.P5L, p.R75Q i p.Y89C en cèl·lules HEK293 transfectades transitòriament. A l'esquerra de cada panell sempre es mostra el marcatge de la membrana citoplasmàtica (PM) amb la concanavalina A unida al fluorocrom Alexa488 (en verd), i a la dreta l'utilització del mateix marcador per a la detecció del citoplasma (C). Es detectà el canal CFTR mitjançant l'anticòs monoclonal MAB1660 (en vermell) i els nuclis cel·lulars amb TO-PRO 3 (en blau).

Finalment, vam comprovar que els resultats obtinguts amb el doble marcatge fluorescent (concanavalina A- Alexa 488 i MAB1660- Alexa 568), coincidia amb el que s'extreia observant la superposició amb llum transmesa (veure fig. R-7). Per exemple, es detectà la proteïna no mutada bàsicament a la membrana citoplasmàtica, i en petites proporcions a l'interior cel·lular (fig. R-7A). En canvi, la distribució de la proteïna mutant p.P5L es centrava en la seva major part a l'interior cel·lular (fig. R-7B).

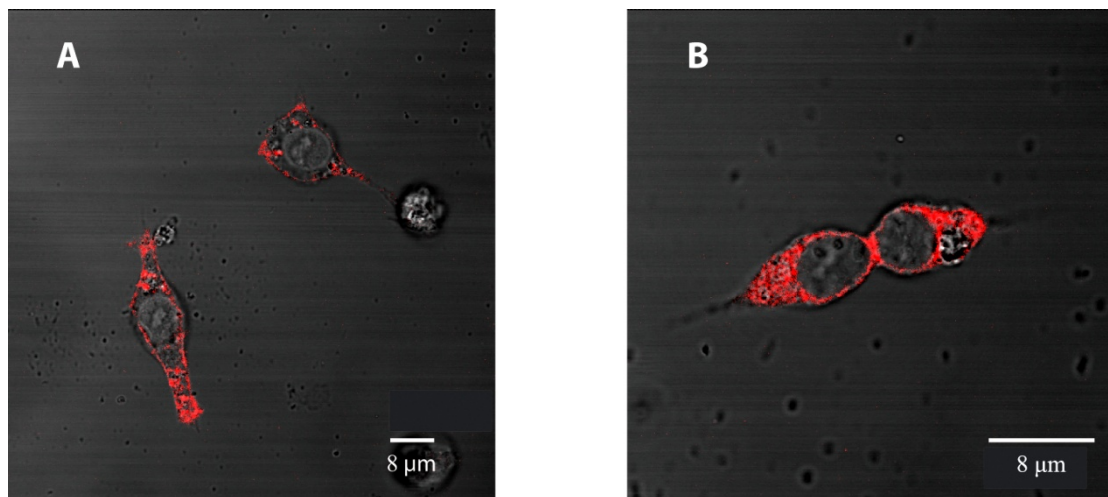


Figura R-7. Imatges superposades, adquirides amb llum transmesa i amb microscòpia confocal, de cèl·lules transfectades amb el vector d'expressió pCMVCFTRNot6.2wt (A) i amb pCMVCFTRNot6.2wt amb la mutació p.P5L (B). La proteïna CFTR està marcada amb l'anticòs monoclonal MAB1660 (en vermell).

R-4. Anàlisi de l'activitat dels canals CFTR mutats

R-4.1. Electrofisiologia de les mutacions CFTR a l'extrem N-terminal. Configuració *whole cell*

Per realitzar l'anàlisi de l'activitat dels canals CFTR mutats es mesuraren els corrents estimulats per AMPc mitjançant la tècnica electrofisiològica de *patch clamp* en configuració *whole cell*.

Les cèl·lules HEK293 eren transfectades amb el cDNA de CFTR i el cDNA de la proteïna EGFP. La fluorescència emesa per la proteïna verda la utilitzàvem com a marcador de les cèl·lules que havien estat transfectades. Varem intentar relacionar intensitat de corrent dels canals CFTR amb fluorescència emesa per la proteïna EGFP. La fluorescència emesa depenia del nombre de còpies de cDNA de EGFP que haguessin entrat a l'interior cel·lular. Varem voler comprovar si aquest nombre de còpies mantenia una proporció constant amb el nombre de còpies de CFTR expressades. Mitjançant una càmera acoblada al microscopi, adquiríem una imatge de la fluorescència de la cèl·lula, posteriorment punxàvem i registràvem la intensitat de corrent dels canals CFTR. La imatge adquirida la processàvem amb el programa *Image J* que ens permetia quantificar la intensitat de fluorescència. Ho vam realitzar amb cèl·lules transfectades amb CFTR no mutat i transfectades amb p.P5L. Vam observar que la relació entre fluorescència i intensitat de corrent no era lineal, i que la proporció no es mantenia, per tant era independent la intensitat de fluorescència de la intensitat de corrent (veure fig. R-8). La detecció de la proteïna verda es va utilitzar com a indicador qualitatiu.

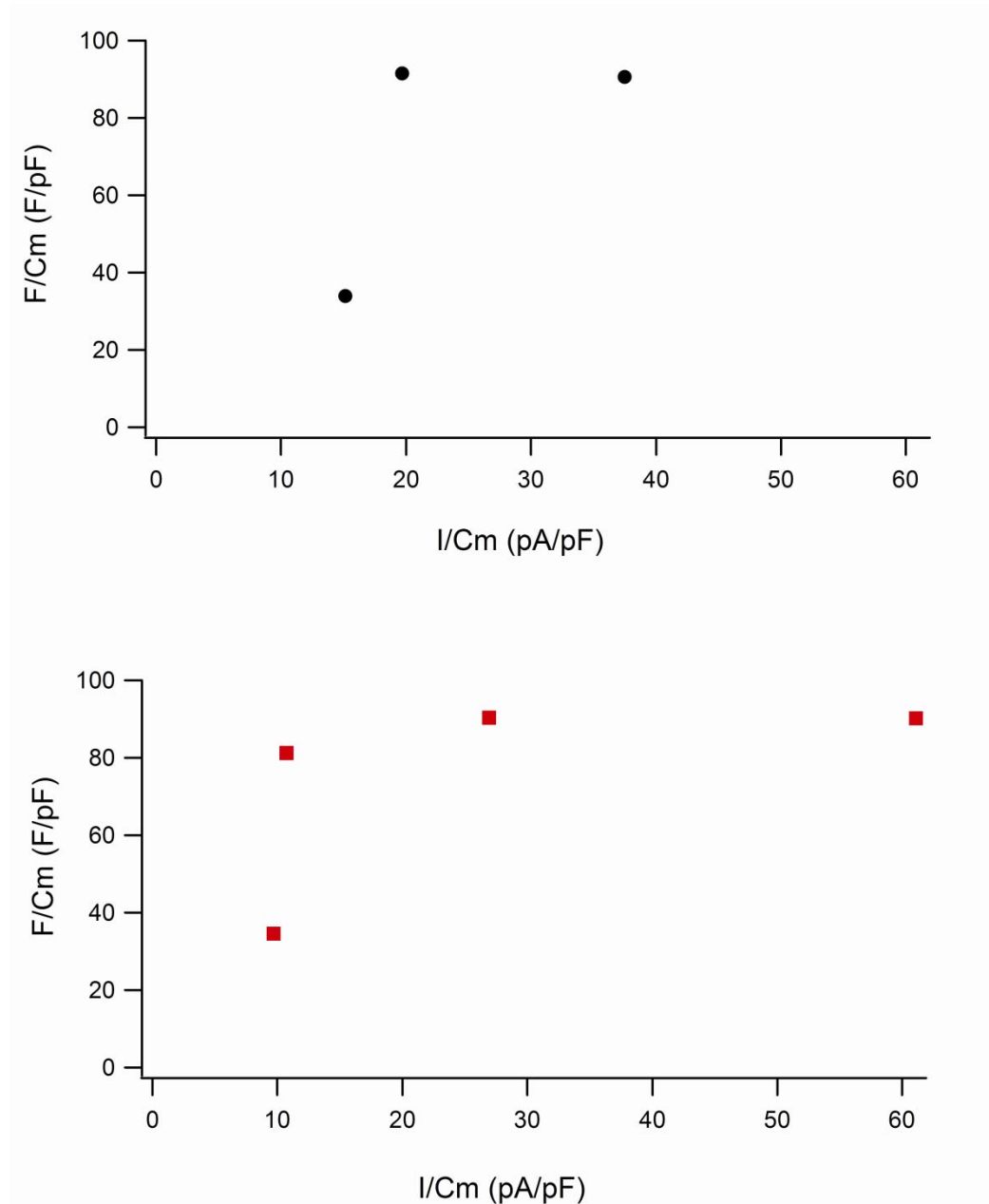


Figura R-8. Relació entre fluorescència emesa i intensitat de corrent en cèl·lules HEK293 transfectades amb CFTR no mutat (punts negres) i la mutació p.P5L (quadrats vermells). Els dos paràmetres es normalitzaren per la capacítància de la membrana.

Un cop aplicada la forskolina durant 2 min, les cèl·lules que expressaven el canal CFTR mostraven grans corrents de Cl^- . Aquests eren produïts per CFTR, ja que en les cèl·lules on no detectàvem l'expressió de EGFP tampoc detectàvem cap corrent induït per forskolina. A més, els corrents generats després d'aplicar $5 \mu\text{M}$ de forskolina en cèl·lules transfectades amb CFTR WT i p.R75Q, eren sensibles a la presència de $1 \mu\text{M}$ d'inhibidor CFTR_{inh}-172 (168) (veure fig. R-9).

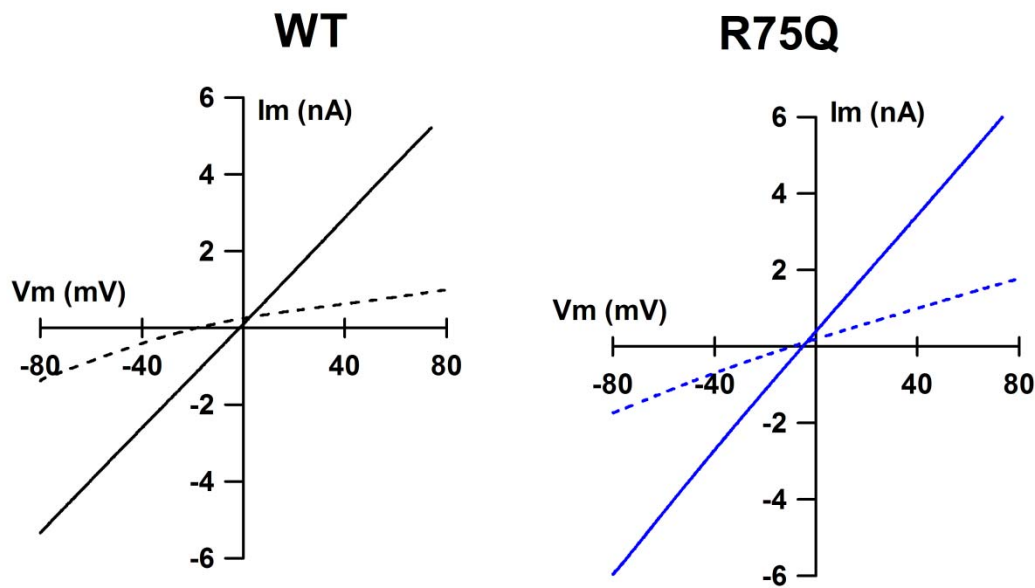


Figura R-9. Sensibilitat de CFTR WT i de la variant p.R75Q a la presència de l'inhibidor CFTR_{inh}-172. Els corrents de clorur generats després de l'aplicació de 5 μ M de Forskolina, en absència (línies contínues) i en presència (línies discontinues) de 1 μ M de l'inhibidor CFTR_{inh}-172. Les relacions corrent-voltatge es generaren amb protocols de rampes de 2 s amb canvis de voltatge que anaven des de -80 mV a +80 mV.

En les cèl·lules analitzades que expressaven el cDNA de la mutació p.F508del no es detectaven corrents estimulats per AMPc, al aplicar-se la forskolina (el nostre control negatiu de proteïna mutant retinguda en el ER degut a un plegament incorrecte) (veure fig. R-10, A). El mateix efecte l'observàvem en els registres obtinguts de les variants p.S50P, p.E60K, p.G85E, p.G85V i p.E92K, mutacions que com en el cas de p.F508del presentaven un patró electroforètic diferent a WT, i tampoc aconseguen arribar fins a la membrana citoplasmàtica (veure fig. R-10, B). Només les mutacions p.R75Q i p.Y89C produïen corrents estimulats per AMPc similars a la proteïna no mutada (veure fig. R-10, C).

Es van corregir els corrents obtinguts segons el tamany de la cèl·lula, normalitzant els pics de corrent per la superfície cel·lular, al dividir-se pels valors de capacítància cel·lular individual. Els valors obtinguts presentaven una gran variabilitat, possiblement degut a la metodologia de transfecció utilitzada (Tseng et al, 1997). En el cas de la proteïna no mutada teníem valors que anaven des de 10 pA/pF fins a 396 pA/pF, amb un valor mig de 114 ± 22 pA/pF (n=24). Valors similars varem detectar per la variant p.R75Q, 98 ± 55 pA/pF (n=18) i per la mutació p.Y89C, 114 ± 54 pA/pF (n=6). La mutació p.P5L presentava valors

menors de pics de corrent respecte a la capacítància de la cèl·lula, que la proteïna no mutada, amb un valor mig de 46 ± 16 ($n=20$). Encara que la diferència no era significativa, amb una $P = 0.09$, aquesta observació correlacionava amb les dades d'una menor quantitat de canals a la membrana obtingudes per Western blot i immunocitoquímica.

Tenint en compte la gran variabilitat en els corrents observats, es caracteritzà el processament de p.P5L a la membrana, analitzant la densitat de corrent en funció del temps posterior a la transfecció. Es van comparar les densitats de corrent per CFTR WT, p.R75Q i p.P5L a 8-12 hores pos-transfecció amb les obtingudes a 24-36 hores post-transfecció. Es va observar en tots els casos un augment progressiu en les densitats de corrent amb el temps transcorregut des de la transfecció. La variant p.P5L sempre presentava densitats de corrent menors a la resta en tots els temps estudiats. Vam detectar un reducció al voltant de 1.5 a 2 com a mitja respecte els corrents que es generaven en les cèl·lules que expressaven CFTR WT (veure fig. R-10, D).

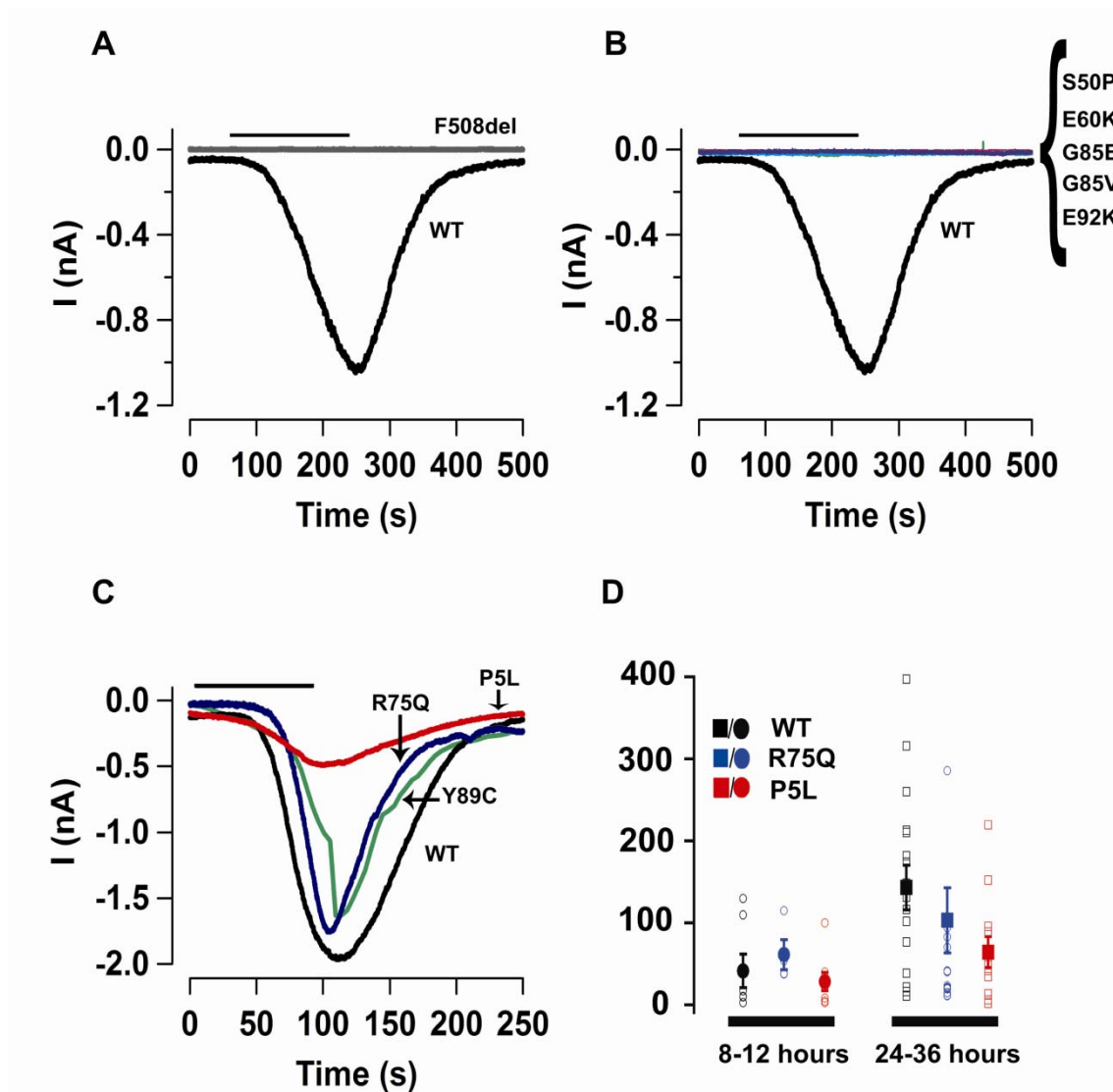


Figura R-10. Registres representatius de corrents de Cl⁻, adquirits mitjançant *patch clamp* en configuració *whole cell*, dels canals CFTR WT i mutants expressats transitòriament en cèl·lules HEK293. Els corrents de Cl⁻ van ser estimulats amb 5 μM forskolina durant 2 min. El potencial de membrana es mantingué a -40 mV. (A) Registre representatiu per CFTR WT (negre) i p.F508del (gris), la barra negra indica el temps d'estimulació amb forskolina. (B) Els mutants p.S50P (groc), p.E60K (vermell), p.G85E (blau), p.G85V (marró) i p.E92K (verd) no presenten corrents de Cl⁻ evidents. Es mostra registre de la proteïna CFTR WT per comparació (negre), la barra negra indica el temps d'estimulació amb forskolina. (C) Corrents estimulats per AMPc corresponents a CFTR WT (negre) p.P5L (vermell), p.R75Q (blau) i p.Y89C (verd). (D) Densitats de corrent del canal CFTR WT (negre) i dels canals p.R75Q (blau) i p.P5L (vermell) a diferents temps. La primera columna (cercles) correspon a 8-12 hores després de la transfecció i la segona columna (quadrats) a 24-36 hores posteriors a la transfecció. Mitjanes ± S.E.M

R-4.2. Anàlisi de l'activitat de canal únic per les mutacions CFTR localitzades a la membrana citoplasmàtica

Varem observar que tres de les vuit mutacions caracteritzades, p.P5L, p.R75Q i p.Y89C, arribaven a la membrana citoplasmàtica, i es detectaven corrents de Cl^- activats per AMPc en les cèl·lules HEK293 on les havíem expressat. Per tant, decidírem estudiar funcionalment el canal a nivell individual per aprofundir en les propietats electrocinètiques de cadascun d'aquests canals CFTR mutats. En especial en el cas de p.P5L, per tal d'aclarir si la disminució en la densitat de corrent observada prèviament es deu tan sols a un menor nombre de canals a la membrana, o també existeix una disfunció del canal. Utilitzàrem la tècnica de *patch clamp* en configuració *excised inside-out* per realitzar l'estudi de canal únic.

Els registres de *patch clamp* s'obtingueren mantenint els fragments de membrana en solucions amb concentracions simètriques de Cl^- , i s'aplicà la subunitat catalítica de PKA a la solució del bany. Inicialment caracteritzàrem CFTR WT en les condicions generals de registre. Vam observar que el potencial de reversió del canal CFTR és proper a zero en aquestes condicions. La relació I-V segueix essencialment una relació òhmica, experimentant una correcció al voltant de +40 mV, propietat intrínseca de CFTR (79). En la figura R-11 mostrem com la rectificació és deguda a una reducció en i (intensitat de corrent d'un canal únic) i a un canvi del comportament cinètic de l'obertura del canal (veure fig. R-11).

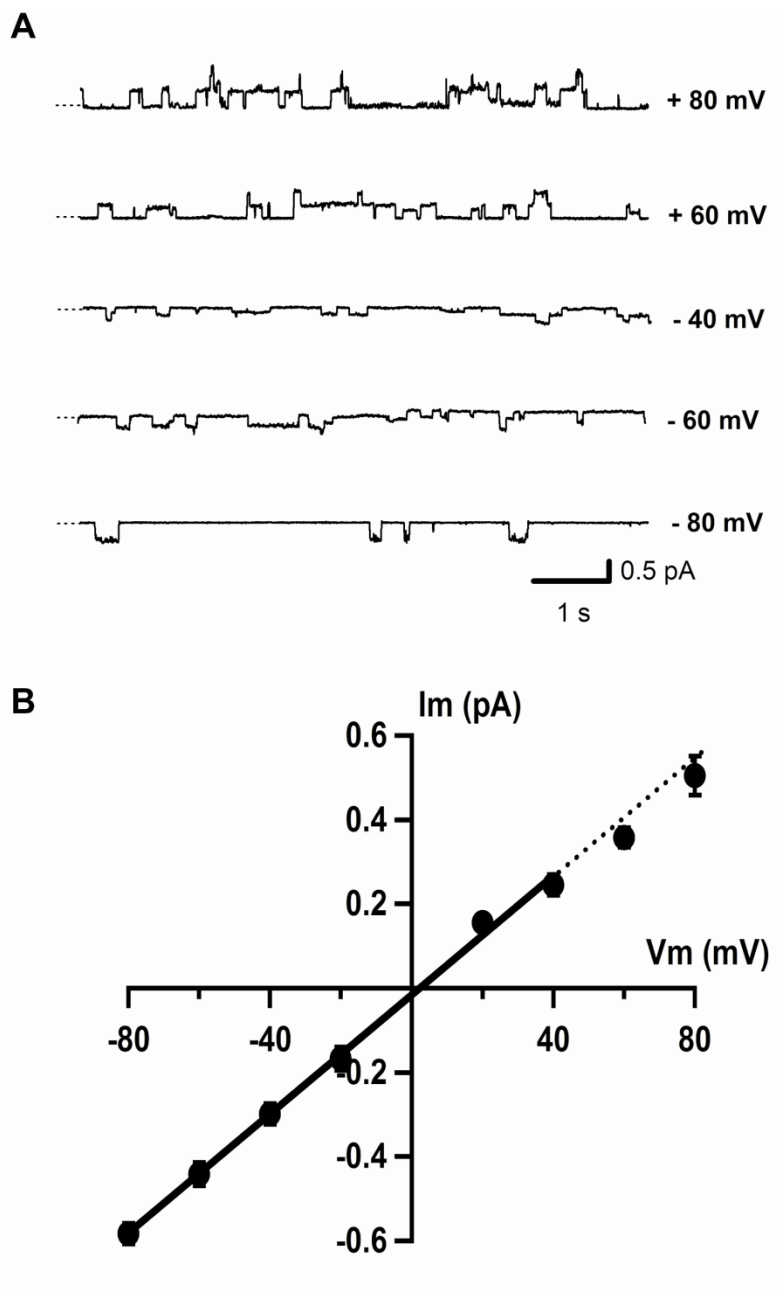


Figura R-11. Representació del comportament electrofisiològic del canal CFTR. (A) Traces representatives de canal únic de CFTR als voltatges indicats, ATP (1 mM) i PKA (75 nM) es trobaven en la solució intracel·lular. Les línies puntejades indiquen l'estat del canal tancat. (B) Relació Intensitat de corrent- Voltatge (I-V) de CFTR WT. La línia ens mostra la millor representació gràfica que uneix els diferents valors obtinguts en experiments independents. A voltatges superiors a +40 mV, la relació lineal I-V rectifica, indicat per la línia discontinua.

L'adquisició dels registres de canal únic es realitzà mantenint el potencial de membrana a -80 mV, ja que fou el voltatge en el que podíem determinar clarament les obertures i els tancaments del canal, per analitzar-los posteriorment utilitzant tots els punts del registre adquirits.

Inicialment varem mesurar la conductància del canal CFTR WT, i estimàrem una conductància a -80 mV de 8.6 ± 0.6 pS, amb 11 cèl·lules analitzades. Es detectaven transicions on el canal es trobava obert durant períodes que anaven de 0.1 a 0.7 s, sent la mitjana de temps obert (τ_o) de 259 ± 54 ms. Els valors de τ_o s'utilitzaren per calcular la *NPo* de CFTR, obtenint un valor mig de 0.3 ± 0.05 (veure taula 2). Quan s'examinà el comportament de les mutacions, varem observar que la mutació p.P5L era la que provocava un canvi més acusat en diferents paràmetres del procés d'obertura del canal. Es detectà una conductància de 4.8 ± 0.3 pS, significativament menor que la corresponent al canal WT ($P < 0.01$). Respecte als paràmetres cinètics, varem calcular una *NPo* de p.P5L de 0.09 ± 0.05 ($n=7$) (veure taula 2). En els registres obtinguts de CFTR WT havíem observat més d'un canal per segell, però no en els de p.P5L (veure fig. R-12, A). Si tenim en compte les dades bioquímiques obtingudes prèviament mitjançant Western blot i immunocitoquímica, esperaríem un menor nombre de canals a la membrana de cèl·lules expressant p.P5L. A més, els corrents de *whole cell* mesurats ens indicaven també un menor nombre, oscil·lant la seva disminució entre 1.5 a 2 cops menys que en el cas de la proteïna WT, segons el temps transcorregut des de la transfecció (veure fig. R-10). Per tant, havíem de tenir en compte que una part de la reducció de la *NPo* era deguda a una disminució de la *N*. Quan vam analitzar els temps d'obertura, detectàrem temps significativament més petits en p.P5L que en el canal no mutat. Varem determinar arbitràriament, observant els registres del canal CFTR, dos tipus d'obertures segons la seva durada: obertures de llarga durada (>0.1 s), i obertures de curta durada (<0.1 s). El canal CFTR WT presentava aproximadament un 43% d'obertures de llarga durada, en canvi en el canal p.P5L es van detectar tan sols un 18% d'obertures de llarga durada (veure fig. R-12, B). La variant p.R75Q sembla que no produeixi cap efecte en el comportament del canal, amb uns registres molt similars a la proteïna WT, presentant uns valors mitjos de *NPo* de 0.3 ± 0.07 , de τ_o de 296 ± 116 ms i una conductància de 8.3 ± 0.8 pS ($n=10$) (veure fig. R-12, A i Taula 2).

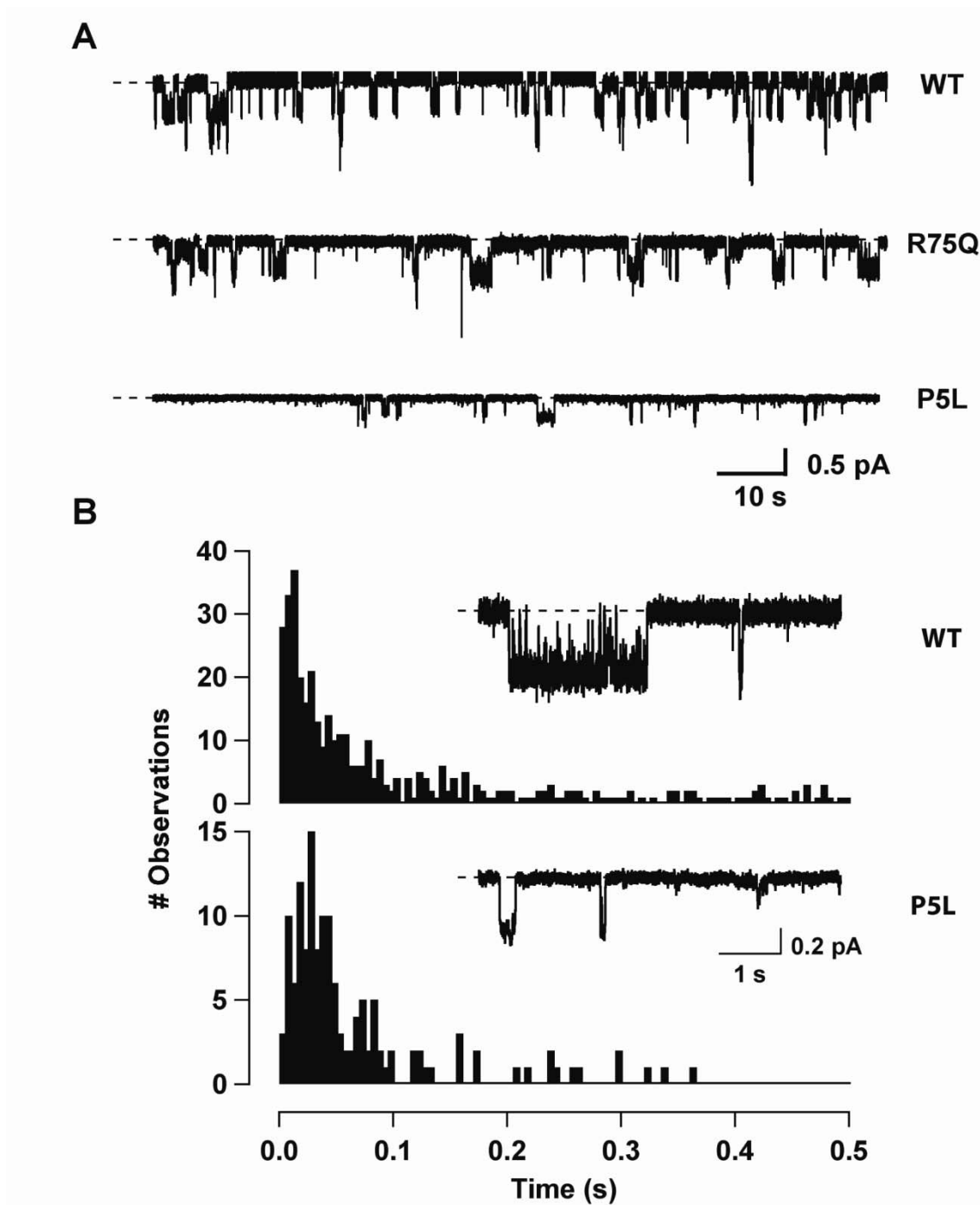


Figura R-12. Comportament de les obertures de CFTR WT, de la mutació p.R75Q i de la mutació p.P5L. (A) Traces representatives de les obertures del canal CFTR WT, de p.R75Q i de p.P5L. La línia puntejada indica l'estat tancat del canal. (B) Histogrames on es representa la distribució dels temps d'obertura (τ_o) per a la proteïna WT i la mutació p.P5L.

Al portar a terme l'anàlisi de la mutació p.Y89C, el primer que detectem és la gran complexitat del seu comportament d'obertura, mostrant-se la majoria del temps

obert, però amb un alt percentatge d'obertures de curta durada, i amb diferents nivells de subconductància. Identificàrem un nivell d'obertura que presentava una conductància mitja al voltant de 8.3 ± 0.4 pS ($n=8$). Degut al seu comportament complex, serien necessàries mesures electrofisiològiques addicionals per definir més acuradament el comportament dinàmic del canal p.Y89C (veure fig. R-13 i Taula 2).

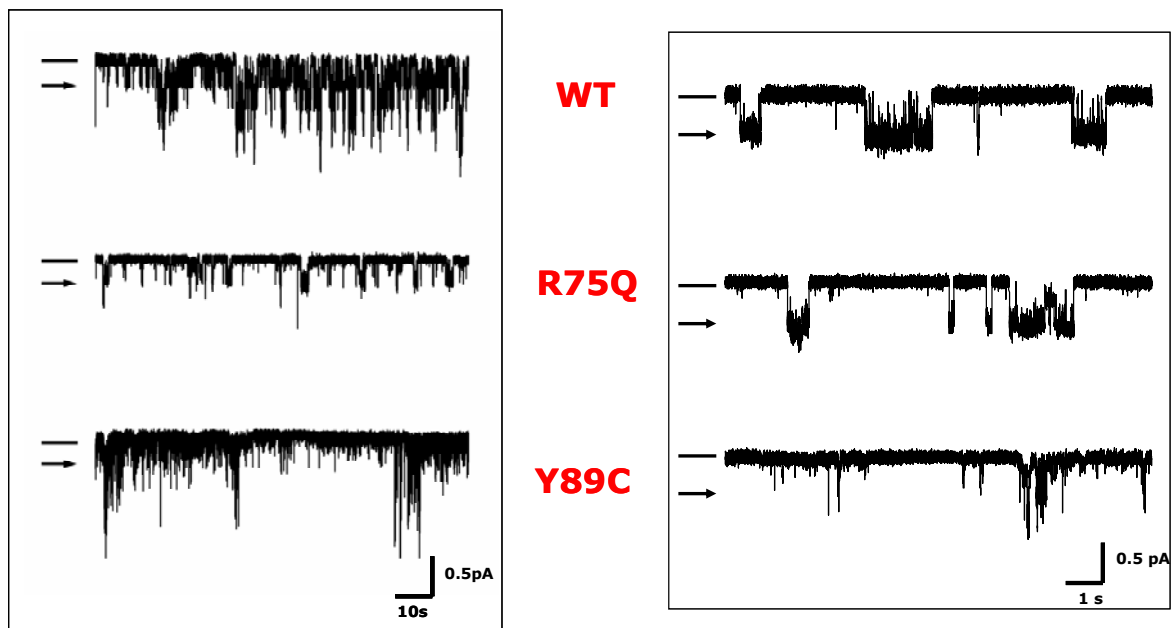


Figura R-13. Traces representatives on s'observa el comportament que provoquen en el canal CFTR les mutacions p.R75Q i p.Y89C. La barra indica l'estat tancat del canal, i la fletxa un nivell d'obertura del canal.

Taula 2. Resum dels valors obtinguts amb l'anàlisi de canal únic dels registres obtinguts per *patch clamp* en configuració *excised inside-out* de CFTR WT i de les mutacions p.P5L, p.R75Q i p.Y89C

| Mutacions (nombre de cèl·lules) | NPo | τ_o (ms) | G (pS) |
|--|--------------|---------------------------------|---------------|
| Wild type (n=11) | 0.3 ± 0.05 | 259 ± 54 | 8.6 ± 0.6 |
| P5L (n=7) | 0.09 ± 0.05* | 77 ± 15* | 4.8 ± 0.3* |
| R75Q (n=10) | 0.3 ± 0.07 | 296 ± 116 | 8.6 ± 0.8 |
| Y89C (n=8) | N.A. | 61.3 ± 9.2* | 8.3 ± 0.4 |

NPo, producte del nombre de canals (N) per la probabilitat d'obertura (Po); τ_o , temps mig d'obertura; G, conductància de canal únic a -80 mV. * valors estadísticament significatius (P<0.01) després d'aplicar test ANOVA.

R-5. Resum de la caracterització funcional de les mutacions estudiades

Taula 3. Taula resum de la caracterització funcional de les 8 mutacions analitzades

| Mutació | Conservació | Processament | Localització Predominant | Activitat del canal |
|---------|-------------|--------------|---------------------------------|---------------------|
| p.P5L | Conservada | Afectat | Citosòlic i Membrana plasmàtica | Afectada |
| p.S50P | Conservada | Afectat | Citosòlic | No hi ha activitat |
| p.E60K | Conservada | Afectat | Citosòlic | No hi ha activitat |
| p.R75Q | Conservada | No afectat | Membrana plasmàtica | No afectada |
| p.G85E | Conservada | Afectat | Citosòlic | No hi ha activitat |
| p.G85V | Conservada | Afectat | Citosòlic | No hi ha activitat |
| p.Y89C | Conservada | No afectat | Membrana plasmàtica | Afectada |
| p.E92K | Conservada | Afectat | Citosòlic | No hi ha activitat |

R-6. Correlació entre els trets funcionals de les mutacions estudiades i l'afectació clínica dels pacients

Tots els canvis analitzats en el present treball havien estat prèviament descrits en individus que mostraven fenotips relacionats amb CFTR, majoritàriament a la població espanyola (169), excepte p.Y89C que fou identificat en un pacient FQ a la població italiana (170).

Les mutacions p.P5L, p.E60K, p.G85E, p.G85V i p.E92K presenten una freqüència de 0.1-1% a la nostra cohort d'al·lèls FQ (n=1560). Algunes d'aquestes mutacions havien estat detectades tant en pacients amb FQ clàssica com en individus que presentaven manifestacions clíniques relacionades amb CFTR, p.G85E i p.E92K (individus amb agenèsia bilateral de conductes deferents (ABCD)). Altres mutacions

només s'han trobat en pacients amb malalties relacionades amb CFTR, com p.S50P, que només s'ha identificat en dos pacients amb ABCD (171). La mutació p.R75Q ha estat descrita com a canvi neutre, però posteriorment s'ha associat en diversos estudis amb pacients amb fenotips relacionats amb CFTR, com azoospèrmia obstructiva (172), bronquiectasies (173), pancreatitis crònica (174), hipertripsinèmia (175), asma (176); i també ha estat descrita a la població general (177) (veure Taula 4).

Taula 4. Correlació genotip-fenotip dels canvis d'aminoàcid analitzats en l'estudi

| Canvi d'aminoàcid | Fenotip | Segon al·lel (nº pacients) |
|-------------------|---|--|
| p.P5L | FQ | p.F508del (1), p.P205S (1) |
| p.S50P | ABCD | p.F508del (1), p.E115del (1) |
| p.E60K | FQ | p.G542X (1), p.I507del (1) |
| p.R75Q | HT B Br PT PC IM AUCD OZ Normal | p.F508del (3), p.E725K (1) p.R347H (1), p.R75Q (1), n.i. (4) c.1584G>A (2), c.121-7_1210-6delTT(1), n.i. (3) p.F508del (1) c.1584G>A (1), n.i. (3) n.i. (1) n.i. (2) n.i. (2) p.R75Q (1), c.2052_2053insA (1), n.i. (1) |
| p.G85E | FQ ABCD HT | p.F508del (8), p.G542X (2), p.I507del(1), c.580-1G>T (1), p.G85E(1), c.1477_1478delCA (1) p.G576A (1) p.L997F (1), WT (1) |
| p.G85V | FQ | p.F508del (2), p.G542X (2), p.Y1092X (1), c.2657+5G>A (1), p.A1006E, c.1210-7_1210-6delTT (1), n.i. (1) |
| Y89C | FQ | n.i. (1) Padoan R. et al. 2000 |
| p.E92K | FQ ABCD | p.F508del (2), p.Q890X (1), p.L206W (1) c.1210-7_1210-6 delTT (1) |

FQ: Fibrosi quística; ABCD: Agenèsia bilateral de conductes deferents; HT: Hipertripsinèmia; B: Bronquiectasies; Br: bronquitis; PT: Pneumotòrax, PC: pancreatitis crònica, IM: Ili meconial; AUCD: agenèsia unilateral de conductes deferents; OZ: oligozoospermia; n.i.: no identificat.

S'han utilitzat les recomanacions per la nomenclatura de les mutacions (www.hgvs.org/mutnomen/) per a nombrar les variacions de la seqüència del gen *CFTR*, tant a nivell de nucleòtid com a nivell de proteïna. A la taula s'ha seguit el format de la nomenclatura de HGVS (A del codó ATG d'inici de la traducció com a +1, "c." com a prefix), però les variacions a nivell de nucleòtid també s'han nombrat segons la *CF mutation database* (CFMDB) (més endavant entre parentesis), on la A del codó ATG d'inici de la

traducció correspon a +133 (GenBank NM_000492.2): [c.1584G>A (1716G>A); c.1210-7_1210-6delTT (IVS8-6(5T)); c.2052_2053insA (2184insA); c.580-1G>T (712-1G>T); c.1477_1478del CA (1609del CA); c.2657+5G>A (2789+5G>A)].

Discussió

Les mutacions que alteren el canal CFTR, responsable del transport de clorur en les cèl·lules epitelials i de la regulació d'altres proteïnes transportadores de membrana, dona lloc a la FQ. Existeixen aproximadament 1600 mutacions descrites, que confereixen un ampli ventall i severitat de les diferents manifestacions clíniques característiques d'aquesta malaltia. Diversos estudis estructurals-funcionals relacionen les mutacions detectades en el gen *CFTR* amb el seu efecte, i han contribuït a interpretar l'estructura i la funció dels diferents dominis de la proteïna i també han ajudat a entendre la relació entre la mutació i el quadre clínic.

Les diferents mutacions detectades en el gen *CFTR* causen defectes en el processament i la funció de la proteïna a través de diferents mecanismes moleculars. Aquest gran nombre de mutacions descrites poden classificar-se segons el mecanisme a través del qual afecten a la funció de CFTR. Conèixer millor quins són aquests mecanismes moleculars afectats per les mutacions i els elements que intervenen permetrà que es puguin crear unes bones bases pel desenvolupament de fàrmacs dirigits a una teràpia específica de mutació amb els malalts FQ.

Fins al moment, els dominis on s'han centrat més estudis, degut a la seva importància en la regulació del canal, són els dominis NBD i el domini R. Però, també existeixen altres evidències del paper rellevant dels dominis N-terminal, C-terminal i dels dominis TMD (dominis formadors del porus) en la funció del canal.

En aquest estudi hem analitzat i caracteritzat l'efecte que produeixen en la maduració i en les propietats electrofisiològiques de CFTR, vuit mutacions de sentit erroni (*missense*) localitzades en la regió N-terminal, identificades totes elles en pacients amb FQ i fenotips relacionats. Quatre d'elles es troben localitzades en l'extrem N-terminal (p.P5L, p.S50P, p.E60K i p.R75Q) i les altres quatre en el primer fragment transmembrana (p.G85E, p.G85V, p.Y89C i p.E92K). La conservació total dels residus analitzats que s'observa al fer l'alineament de les seqüències aminoacídiques de CFTR de diferents espècies, evidencia el paper important d'aquestes variants en l'estructura i funció de l'extrem N-terminal de CFTR.

A l'hora de discutir sobre l'efecte que tenen aquestes mutacions en el processament o funcionament de la proteïna CFTR a partir dels resultats obtinguts, s'haurà de tenir en compte quin canvi d'aminoàcid s'està produint i en quina regió de la proteïna està localitzada la mutació. Per aquesta raó es separa la discussió en dos grans blocs, corresponents: 1) a les mutacions situades en l'extrem citosòlic N-terminal i 2) a les mutacions situades en la regió transmembrana. No tindrà el mateix efecte un canvi de càrrega o de polaritat en l'extrem N-terminal que en el primer segment transmembrana. Com es comenta a l'introducció, els dominis transmembrana tindrien importància en la formació del porus i la seva

permeabilitat, i en canvi l'extrem N-terminal tindria principalment un paper regulador, tant de l'estabilitat de la proteïna com de l'activitat del canal.

A més a més, s'ha dut a terme a terme l'estudi mitjançant diferents aproximacions experimentals, per tal d'esbrinar si la mutació afecta a nivell de la biogènesi de la proteïna o bé a nivell funcional del canal.

També, s'ha intentat correlacionar els resultats moleculars amb el fenotip clínic, i així suggerir potencials actuacions terapèutiques específiques segons la mutació.

Utilitzant, concretament, tres aproximacions experimentals diferents (immunodetecció per Western blot, immunocitoquímica i *patch clamp* en configuració *whole cell*) varem observar que cinc de les mutacions analitzades, p.S50P, p.E60K, p.G85E, p.G85V i p.E92K, provoquen un processament i una maduració incorrecte de la proteïna. Totes cinc presenten un comportament molt similar a la mutació p.F508del, podent-se classificar aquestes mutacions dins la classe II.

En canvi, en el cas de les altres tres mutacions p.P5L, p.R75Q (situades a la cua N-terminal) i p.Y89C (al segment TM1), es detecta proteïna madura, encara que en diferents proporcions.

Mutacions localitzades al domini transmembrana MSD1

Si considerem les propietats físico-químiques de cadascun dels aminoàcids estudiats en el domini transmembrana podem predir que almenys tres d'aquestes mutacions (p.G85E/V i p.E92K), comportarien un efecte greu en el processament i la fisiologia de CFTR.

Un canvi de càrrega pot provocar un plegament incorrecte de la proteïna. En el cas de la mutació p.E92K situada al segment TM1 del domini MSD1, dóna lloc a un canvi de càrrega, de negativa a positiva. Estudis previs han descrit que residus carregats que es troben en dominis transmembrana afecten la topologia, el plegament i l'oligomerització de les proteïnes, com també propietats estructurals que afecten la conductància iònica, la selectivitat i el control de les obertures del canal (178-181). Un dels aspectes claus del plegament correcte de la proteïna és adquirir la topologia adequada associant-se amb la membrana lipídica. Moltes proteïnes de membrana adquireixen la topologia dels fragments transmembrana de la regió N-terminal abans de que s'hagi sintetitzat el domini transmembrana de l'extrem C-terminal en el ER. La inserció i el plegament correcte dels segments TM1 i TM2 esdevé essencial per la inserció i plegament dels segments de CFTR (182). El residu carregat negativament E92 situat al nucli hidrofòbic de TM1 disminueix l'activitat de translocació C-terminal de TM1, i així millora l'orientació estable del segment transmembrana. El canvi de càrrega pot estar desestabilitzant la correcta

orientació dins la membrana lipídica. Curiosament, segons els estudis de Lu i col.laboradors (31), la mutació p.E92A incrementa la senyal de l'activitat i l'habilitat de TM1 de dirigir independentment la topologia de la regió N-terminal, encara que redueix l'activitat del canal de clorur quan ho expressen en *Xenopus*. Per tant, sembla ser que un canvi de càrrega de negativa a positiva podria estar desestabilitzant la correcta orientació dels segments transmembrana, tal com s'observa per la mutació p.E92K, i en canvi quan es perd aquesta càrrega per una càrrega neutra, no desestabilitza sinó tot el contrari, encara manté més estable la topologia de la regió transmembrana.

Un estudi posterior, que corrobora els nostres resultats, de correlació genotip-fenotip on analitzen en individus la mutació p.E92K en homozigosi (183) detecten un transport de clorur dins el mateix rang que els individus control amb FQ clàssica.

La mutació p.G85E té una freqüència mundial de 0.2%, sent molt més prevalent en la regió mediterrània (Espanya 0.7%, Itàlia 1.7%). La mutació provoca una substitució d'una glicina per un àcid glutàmic, incorporant-se una càrrega negativa en el primer fragment transmembrana. Existeix un estudi de correlació genotip-fenotip (184) on conclueixen que la mutació p.G85E està associada a un fenotip sever. En aquest estudi també realitzen experiments de *pulse-chase* on observen una maduració incompleta de la proteïna quan la mutació està present, coincidint aquestes dades amb els nostres resultats.

A més de l'estudi esmentat, existeixen altres publicacions anteriors on els resultats obtinguts també concorden amb els nostres. Com en l'estudi de Xiong i col.laboradors (185), que van observar que la mutació p.G85E afecta al plegament de la proteïna, sent degradada per la via ERAD en el ER, però a diferència de p.E92K, aquests investigadors conclueixen que no afectaria provocant grans efectes en la topologia de la proteïna, ni impedit un correcte plegament i orientació dels fragments a la membrana, sinó que serien canvis més subtils en l'estructura terciària de la proteïna. Aquesta conclusió en l'efecte provocat vindria donat per la predicció que existeix de l'estructura de CFTR, que ens indica que l'aminoàcid en la posició 85 no es trobaria en contacte amb els lípids de la membrana, com és el cas de la mutació p.E92K, sinó formant part de l'alineació del porus. A més, completant l'informació sobre aquesta mutació, se sap que la proteïna Derlin-1, component de ERAD, degrada eficientment els mutants p.G85E i p.F508del (52).

Els mateixos resultats es van obtenir a l'expressar la mutació p.G85V a través de les tres aproximacions experimentals utilitzades (Western blot, immunocitoquímica i patch clamp en configuració whole cell). Encara que en aquest cas el canvi en aquesta posició és la substitució d'una glicina per una valina, i per tant no

s'introdueix una càrrega negativa, com succeïa amb la mutació p.G85E, sí que apareix un residu polar en substitució d'un no polar. Recentment, s'ha publicat que l'aparició de residus polars en les estructures hèlix dels fragments transmembrana poden distorsionar el plegament de la proteïna (186). Per tant es podria atribuir l'aparició de polaritat en aquesta posició com la causant d'un efecte molt similar al de p.G85E.

Finalment, dins del grup de les mutacions analitzades que es troben en la regió transmembrana, tenim la mutació p.Y89C. Si ens centrem en les propietats estructurals dels aminoàcids implicats en la mutació p.Y89C, on és substituït la tirosina, residu de gran tamany, per una cisteïna, petit grup aminoàcidic que conté un grup tiol, i en la seva posició en el fragment TM1, on la resta de mutacions analitzades (p.G85E/V i p.E92K) provoquen desestabilització de l'estructura de la proteïna, esperaríem un major desajustament en el plegament de la proteïna. Però sembla ser que el seu plegament és correcte, ja que obtenim un percentatge de proteïna madura semblant a WT per Western blot, i observem la proteïna localitzada a la membrana citoplasmàtica en les imatges d'immunocitoquímica (veure fig. R-4 i R-6).

Respecte a la funcionalitat de la proteïna que arriba a la membrana, p.Y89C presenta un fenotip complex. Sembla que tot i que no existeixen diferències en les intensitats de corrent detectades per whole cell en les cèl·lules HEK293 que sobreexpressen aquesta mutació (veure fig. R-10), quan analitzem el seu comportament cinètic i les seves propietats com a canal únic, sí que presenta diferències respecte CFTR WT (veure fig. R-13). Tot i que l'anàlisi no esdevé senzill, ja que presenta múltiples subnivells de conductància, i obertures de durada molt més curta que CFTR WT.

Es desconeix exactament l'estructura del porus de CFTR, i encara hi ha controvèrsies sobre si és un monòmer o dímer, però sembla coincidir tothom en el fet de que està format per l'alineació de múltiples hèlix alfa. Basant-nos en estudis previs de l'estructura del canal sembla ser que els fragments TM1 i TM6 tenen un paper primordial en la formació del porus (121). Encara que existeixen controvèrsies en estudis anteriors (125) on proposen que els fragments formadors del porus són TM5 i TM6, i TM1 té un paper menys important. Si afegim a la nostra discussió altres estudis estructurals previs del porus del canal CFTR (123) on ja van predir que només els residus de cisteïna substituïdes en G91, K95 i Q98 eren accessibles als reactius específics dels grups sulfidrils, suggerint que eren aquests aminoàcids els que s'alineaven en la cara externa del porus amb la periodicitat de l'estructura secundària de l'hèlix alfa. Tenim que la mutació p.Y89C es trobaria

localitzada en un fragment transmembrana important per la formació del porus del canal, però no estaria a la cara externa del porus, segons la predicció estructural. Per tant, no esperaríem efectes directes per la presència de la mutació en la conductància unitària del canal, però tenint en compte els nostres resultats aquesta mutació sí que estaria afectant a la cinètica del canal.

Amb el comportament cinètic tant complex que presenta el canal amb la mutació p.Y89C, esdevé molt complicat determinar quin és exactament el patró d'obertura. El que està clar és que no segueix el comportament característic en la cinètica d'obertura del canal CFTR WT, amb llargs períodes d'obertura que són interromputs per ràpids moviments de tancament i obertura, separats per llargs períodes de tancament.

Mutacions localitzades a l'extrem N-terminal

S'han analitzat quatre mutacions a l'extrem N-terminal, dues d'elles no donen lloc a proteïna madura (p.S50P i p.E60K) i les altres dues (p.P5L i p.R75Q) sí, encara que en diferents proporcions.

Per una banda tenim el cas de la mutació p.S50P on es produeix la substitució d'una serina per una prolina. El fet de que aparegui una prolina suggereix que aquesta mutació podria provocar canvis conformacionals que desestabilitzarien l'estructura de la proteïna. La prolina es distingeix de la resta de aminoàcids per no tenir un grup amino primari, sinó un grup amino secundari, anomenant-se per aquesta raó iminoàcid. Aquesta estructura cíclica característica li confereix una major rigidesa conformacional que la que posseeixen la resta d'aminoàcids. Així, si es troben al mig d'estructures secundàries com les hèlix alfa o les làmines beta poden desorganitzar-les. Per tant, si considerem que aquesta prolina es troba en una regió, compresa entre els residus 46 a 63, on s'ha predit que aquests aminoàcids formen una hèlix alfa (113), es reforça la hipòtesi de que aquesta prolina estaria desestabilitzant la proteïna, concordant d'aquesta manera amb els nostres resultats on només detectem la proteïna immadura. El més probable és que el mecanisme de control del ER reconegui un plegament incorrecte i sigui enviada a la via de degradació proteosomal.

En la mateixa regió (residus 46-63) que formen l'hèlix alfa, hi està comprés un grup d'aminoàcids carregats negativament que interacciona amb el domini regulador. Aquesta unió és essencial per a la regulació del domini R, donant estabilitat a les obertures de llarga duració (113, 114). Per tant, si aconseguíssim que aquest mutant evités els punts de control i arribés a la membrana, utilitzant un fàrmac o

algun altre mecanisme molecular, podria convertir-se en mutació de tipus III, afectant la regulació del canal.

La mutació p.E60K, dona lloc a un canvi de càrrega, com en el cas de p.E92K. Naren i col.laboradors (113) ja van observar un efecte pertorbador en el plegament de la proteïna CFTR quan es perd l'àcid glutàmic en la posició 60. En el seu estudi, feien mutagènesi dirigida de diferents residus carregats negativament, i els substituïen per alanines. Ells detectaven tan sols la banda B, corresponent a la proteïna immadura, quan expressaven la construcció de CFTR amb la mutació p.E60A. En el nostre estudi, detectem el mateix problema en la biogènesi de la proteïna amb la mutació E60K (veure fig. R-4).

Així que no tindria el mateix comportament la posició E60 que la E92 quan es muten per un altre aminoàcid, ja que com s'ha comentat abans, la mutació p.E92A no donava lloc a una proteïna truncada, sinó que per el contrari semblava que l'estabilitzava més. En canvi, en el cas de la posició E60, podria ser tan sols la pèrdua del glutamat el determinant per a que no es pugui arribar a formar la proteïna madura.

Respecte a les altres dues mutacions que s'expressen com a proteïna madura i arriben a la membrana de la cèl·lula, tenim la mutació p.R75Q, on es substitueix una arginina per una glutamina. Els nostres resultats mostren que tant el seu plegament com en la funció del canal presenta un comportament anàleg a WT. Aquesta mutació es troba localitzada en el límit entre l'extrem N-terminal i el primer fragment transmembrana. Probablement la posició que ocupa li confereix una certa flexibilitat, i per aquesta raó no s'observa un comportament alterat. Aquests resultats corroboren l'estudi previ de correlació genotip-fenotip clínic que considera la mutació p.R75Q com a una mutació sense expressió clínic (187).

La mutació p.P5L presenta un fenotip molt interessant, tant en la biogènesi de la proteïna com en les alteracions funcionals del canal.

Observem un fenotip entremig entre les mutacions estudiades on no s'expressa proteïna madura i el processament de CFTR WT. Ja que detectem una quantitat significativament menor de proteïna madura respecte a CFTR WT per Western blot (13% de proteïna madura respecte proteïna CFTR WT) (veure fig. R-4). I també observem en les nostres imatges obtingudes per microscòpia confocal un menor nombre de proteïna que conté la mutació p.P5L a la membrana citoplasmàtica. Per tant, no hi ha cap dubte de que està provocant una alteració en la biogènesi de la proteïna. El que desconeixem és quin punt del processament de la proteïna es

trobaria afectat (plegament, inserció en la membrana, reciclatge), obtenint com a resultat final una disminució del nombre de canals a la membrana citoplasmàtica (veure fig. R-6 i R-7).

La densitat de CFTR a la membrana dependrà dels processos d'endocitosi i reciclatge, convertint-se en el segon mecanisme que disposa la cèl·lula per regular els nivells de secreció de clorur a través de CFTR en les cèl·lules epitelials. En general, CFTR es endocitada de la membrana amb una freqüència molt similar a receptors de nutrients o molècules senyalitzadores, proteïnes associades a una endocitosi a través de clatrina molt eficient (30). Se sap que l'extrem N-terminal té un paper en tot aquest procés d'endocitosi i reciclatge de la membrana.

Per una banda les proteïnes t-SNAREs (*target soluble NSF attachment protein receptors*), la Sintaxina 1A i la SNAP23 s'uneixen a l'extrem N-terminal de CFTR, produint una disminució de la funció de CFTR i segons una de les hipòtesis que existeix, aquesta regulació es produiria a través de l'endocitosi de la proteïna (71).

Un altre membre de la subfamília de les t-SNARE, la sintaxina 8, està implicada en el transport vesicular entre els endosomes primerencs fins als endosomes tardans. S'uneix, també, a l'extrem N-terminal i possiblement al domini regulador de CFTR, reduint els nivells de CFTR a la membrana citoplasmàtica (73).

Estudis previs ja han detectat mutacions en l'extrem N-terminal que provoquen la reducció de l'expressió de la proteïna madura a la membrana citoplasmàtica, com és el cas de la mutació p.P67S. Utilitzant com a model d'expressió *Xenopus laevis*, els autors detecten una reducció en el nombre de canals mutants a la membrana citoplasmàtica i una lleu reducció en la conductància del canal mutant, sense alterar la selectivitat iònica del canal, però l'anàlisi per *Western blot* indica un nivell d'expressió de proteïna mutant similar a la proteïna WT. Aquests resultats suggereixen que la disminució del nombre de canals no és deguda a un processament incorrecte de la proteïna mutant, sino a un increment del reciclatge de la proteïna a la membrana citoplasmàtica (78).

Un estudi recent ha detectat un altre interacció directa proteïna-proteïna, entre l'extrem N-terminal de CFTR i la filamina, una proteïna que forma part del citoesquelet de la cèl·lula (75). L'estudi es centra en la mutació p.S13F, mutació detectada en malalts FQ. La presència d'aquesta mutació afecta a la interacció amb la filamina, provocant una desestabilització de la proteïna a la membrana citoplasmàtica, sent internalitzada i acumulada prematurament en els lisosomes per a la seva posterior degradació.

En un altre estudi analitzen altres mutacions naturals a l'extrem N-terminal de CFTR, p.R31C i p.R31L, on detecten alteracions en la biogènesi de CFTR molt similars a les que nosaltres observem en p.P5L (76). En aquestes mutacions, la

disminució observada de proteïna madura no és deguda a una degradació de la proteïna pels sistemes de control del ER, sinó degut a un increment de la internalització de la proteïna un cop localitzada a la membrana citoplasmàtica.

Per tant la mutació P5L, podria estar afectant l'endocitosi de la proteïna per alguna de les vies esmentades, desestabilitzant-la i incrementant la seva internalització. Seria interessant doncs realitzar assajos d'internalització per avaluar aquesta possibilitat.

Els nostres resultats discrepen amb els resultats publicats per Thelin i col.laboradors (75), ja que classifiquen la mutació p.P5L com a mutació de classe II, perquè no detecten mitjançant Western blot proteïna madura al expressar-la en cèl·lules eucariotes. Possiblement la raó d'aquesta discrepància es deguda a divergències metodològiques en el processament dels extractes proteics o bé al reconeixement de CFTR pels anticossos utilitzats.

Per altra banda la mutació P5L també altera les propietats electrofisiològiques del canal, detectant-se una disminució en la conductància i en la probabilitat d'obertura (veure fig. R-10 i R-12).

L'associació física entre el domini R i l'extrem N-terminal podria ser requerida per l'activació del canal depenent de PKA i promovent la fosforilació del domini R. Com s'ha comentat abans, Naren i col.laboradors (113) identificaren una regió de l'extrem N-terminal (residus del 46-60) que conté una sèrie de residus àcids (D47, E51, E54, D58) que regulen positivament l'activitat del canal. Aquests residus formen part de la superfície d'una hèlix alfa predita. La interacció entre el domini R i l'extrem N-terminal estableix l'activitat del canal. Posteriorment, proposaren que la regulació de l'obertura del canal per l'extrem N-terminal, a través d'aquesta interacció amb el domini R, facilita l'entrada a un estat d'obertura llarg de CFTR, o l'estabilitza. La mutació D58N presenta una reducció en la probabilitat d'obertura deguda en gran part a una reducció de la durada de les obertures del canal. La mutació p.P5L podria estar alterant les forces estèriques de l'hèlix alfa predita més propera, sent l'anell de prolina el que ajudés a mantenir la conformació de l'hèlix alfa gràcies a la seva estructura rígida, i al ser substituït aquest residu per una lisina es desestabilitzés. Així, p.P5L impediria una interacció estable entre els residus carregats de l'extrem N-terminal i el domini R de CFTR produint uns paràmetres electrofisiològics alterats del canal observats en els nostres experiments.

Relació entre mutació, funció i fenotip: cap a una futura correlació genotip-fenotip

Totes les variants *missense* que es van seleccionar per a la seva caracterització molecular i funcional, excepte p.Y89C (descrita en un pacient Italià (170)), han estat identificades en individus de la població espanyola diagnosticats amb FQ o amb altres alteracions relacionades amb el gen *CFTR* (veure Taula 4).

Establir quin efecte clínic poden tenir les mutacions de sentit erroni (*missense*) és molt complicat, necessitaríem un major nombre d'individus per poder dur a terme un bon estudi de correlació genotip-fenotip, i a ser possible que aquests individus presentessin la mutació en homozigosi. Però, observant els resultats del nostre estudi i tenint en compte la mutació identificada en l'altre al·lel, sembla que per la majoria de les variants hi ha una bona correlació entre la funcionalitat del canal de clorur i la severitat dels fenotips clínics. Tot i així, la major excepció és la variant p.S50P, que quan s'ha caracteritzat a nivell molecular i funcional s'ha classificat com a mutació de classe II. Per tant, si aquesta mutació dona lloc a una proteïna immadura o a un plegament deficient, esperaríem un fenotip sever, quan la mutació de l'altre al·lel no compensés el fenotip. En canvi, els dos pacients on ha estat identificada aquesta mutació no presentaven un fenotip clínic sever, sinó que tots dos pacients tenien agenèsia bilateral de conductes deferents (tenint ambdós mutacions greus a l'altre al·lel) (veure Taula 4). Però, hem de tenir en compte que tan sols són dos individus estudiats i que a la literatura no és el primer cas on no s'observa correlació entre el genotip i el fenotip. Existeixen altres casos publicats que tampoc correlacionen (188). Aquesta pèrdua de correlació podria ser deguda a l'efecte d'altres elements o factors reguladors que compensarien el fenotip sever.

En aquest estudi hem caracteritzat estructural i funcionalment les mutacions de sentit erroni (*missense*) de l'extrem N-terminal i del primer fragment transmembrana de *CFTR*. Els resultats obtinguts determinen que la majoria d'aquestes mutacions generen alteracions significatives en el processament i en el comportament del canal de clorur, i per tant hem verificat la importància que té aquesta regió en la fisiologia del canal. A més de l'informació molecular, l'anàlisi realitzat té un valor afegit per la clínica, tant per la contribució a la correlació genotip-fenotip com per poder aplicar en un futur una teràpia específica segons el tipus de mutacions que presenti el pacient.

Conclusions

1. Mitjançant una combinació de metodologies immunocitoquímiques i electrofisiològiques, s'ha caracteritzat funcionalment a nivell molecular vuit mutacions de sentit erroni, localitzades a l'extrem N-terminal del canal CFTR presents majoritàriament a la població FQ espanyola.
2. Cinc de les mutacions analitzades, p.S50P, p.E60K, p.G85E, p.G85V i p.E92K, tenen un efecte deleteri en el processament i en el tràfic de la proteïna, amb absència de transport de clorur. En totes elles observem un efecte en el processament molt similar a la mutació p.F508del. Per tant, podem classificar-les com a mutacions de tipus II.
3. La mutació p.P5L afecta a la funció de CFTR a dos nivells: a nivell de la biogènesi i a nivell de l'activitat del canal. Aquesta mutació provoca una disminució de la densitat de canals a la membrana citoplasmàtica. La conductància i la cinètica del canal també s'alteren.
4. La proteïna mutant p.Y89C afecta a l'activitat del canal. Aquesta mutació altera específicament la cinètica del canal.
5. El canal CFTR corresponent a la mutació p.R75Q presenta un patró de maduració i un comportament funcional del canal anàleg a la proteïna CFTR no mutada. Els nostres estudis corroboren la classificació de p.R75Q com a mutació sense expressió clínica.
6. El comportament sever de la majoria de les mutacions avaluades, afectant la biogènesi i/o l'activitat del canal, ressalta la importància funcional de la cua N-terminal i del segment TM1 en la fisiologia de CFTR.
7. Els resultats obtinguts en aquest estudi poden ajudar tant a contrastar correlacions entre els genotips i els fenotips clínics de pacients portadors de les mutacions analitzades, com al disseny racional d'estratègies terapèutiques personalitzades segons el defecte molecular present a CFTR.

Bibliografia

1. Estivill, X., Bancells, C. and Ramos, C. (1997) Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat*, **10**, 135-54.
2. Andersen, D.H. (1938) Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. *Am J Dis Child*, **56**, 344-399.
3. Andersen DH, H.R. (1946) Celiac syndrome v. genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration etiology. *Am J Dis Child*, **72**, 62.
4. Di Sant'Agnese, P.A., Darling, R.C., Perera, G.A. and Shea, E. (1953) Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics*, **12**, 549-63.
5. Gibson, L.E. and Cooke, R.E. (1959) A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*, **23**, 545-9.
6. Quinton, P.M. (1983) Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*, **301**, 421-2.
7. Knowles, M.R., Stutts, M.J., Spock, A., Fischer, N., Gatzky, J.T. and Boucher, R.C. (1983) Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science*, **221**, 1067-70.
8. Boucher, R.C., Stutts, M.J., Knowles, M.R., Cantley, L. and Gatzky, J.T. (1986) Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest*, **78**, 1245-52.
9. Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M. and Tsui, L.C. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, **245**, 1073-80.
10. Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L. *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, **245**, 1066-73.
11. Rommens, J.M., Iannuzzi, M.C., Kerem, B., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J.L., Kennedy, D., Hidaka, N. *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, **245**, 1059-65.
12. De Boeck, K., Wilschanski, M., Castellani, C., Taylor, C., Cuppens, H., Dodge, J. and Sinaasappel, M. (2006) Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*, **61**, 627-35.
13. Tarran, R., Button, B. and Boucher, R.C. (2006) Regulation of normal and cystic fibrosis airway surface liquid volume by phasic shear stress. *Annu Rev Physiol*, **68**, 543-61.
14. Boucher, R.C. (2004) New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*, **23**, 146-58.
15. Joris, L., Dab, I. and Quinton, P.M. (1993) Elemental composition of human airway surface fluid in healthy and diseased airways. *Am Rev Respir Dis*, **148**, 1633-7.
16. Smith, J.J., Travis, S.M., Greenberg, E.P. and Welsh, M.J. (1996) Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell*, **85**, 229-36.
17. Goldman, M.J., Anderson, G.M., Stolzenberg, E.D., Kari, U.P., Zasloff, M. and Wilson, J.M. (1997) Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, **88**, 553-60.
18. Matsui, H., Grubb, B.R., Tarran, R., Randell, S.H., Gatzky, J.T., Davis, C.W. and Boucher, R.C. (1998) Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell*, **95**, 1005-15.
19. Wilson, D.C. and Pencharz, P.B. (1998) Nutrition and cystic fibrosis. *Nutrition*, **14**, 792-5.

20. Wilschanski, M., Corey, M., Durie, P., Tullis, E., Bain, J., Asch, M., Ginzburg, B., Jarvi, K., Buckspan, M. and Hartwick, W. (1996) Diversity of reproductive tract abnormalities in men with cystic fibrosis. *Jama*, **276**, 607-8.
21. Patrizio, P., Ord, T., Silber, S.J. and Asch, R.H. (1993) Cystic fibrosis mutations impair the fertilization rate of epididymal sperm from men with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod*, **8**, 1259-63.
22. Lissens, W., Mercier, B., Tournaye, H., Bonduelle, M., Ferec, C., Seneca, S., Devroey, P., Silber, S., Van Steirteghem, A. and Liebaers, I. (1996) Cystic fibrosis and infertility caused by congenital bilateral absence of the vas deferens and related clinical entities. *Hum Reprod*, **11 Suppl 4**, 55-78; discussion 79-80.
23. Davis, P.B. (2006) Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*, **173**, 475-82.
24. Ellsworth, R.E., Jamison, D.C., Touchman, J.W., Chisoe, S.L., Braden Maduro, V.V., Bouffard, G.G., Dietrich, N.L., Beckstrom-Sternberg, S.M., Iyer, L.M., Weintraub, L.A. *et al.* (2000) Comparative genomic sequence analysis of the human and mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1172-7.
25. McCarthy, V.A. and Harris, A. (2005) The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatr Pulmonol*, **40**, 1-8.
26. Tizzano, E.F., Chitayat, D. and Buchwald, M. (1993) Cell-specific localization of CFTR mRNA shows developmentally regulated expression in human fetal tissues. *Hum Mol Genet*, **2**, 219-24.
27. Morales, M.M., Carroll, T.P., Morita, T., Schwiebert, E.M., Devuyst, O., Wilson, P.D., Lopes, A.G., Stanton, B.A., Dietz, H.C., Cutting, G.R. *et al.* (1996) Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney. *Am J Physiol*, **270**, F1038-48.
28. Devuyst, O., Burrow, C.R., Schwiebert, E.M., Guggino, W.B. and Wilson, P.D. (1996) Developmental regulation of CFTR expression during human nephrogenesis. *Am J Physiol*, **271**, F723-35.
29. Castellani, C., Cuppens, H., Macek, M., Jr., Cassiman, J.J., Kerem, E., Durie, P., Tullis, E., Assael, B.M., Bombieri, C., Brown, A. *et al.* (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*, **7**, 179-96.
30. Ameen, N., Silvis, M. and Bradbury, N.A. (2007) Endocytic trafficking of CFTR in health and disease. *J Cyst Fibros*, **6**, 1-14.
31. Lu, Y., Xiong, X., Helm, A., Kimani, K., Bragin, A. and Skach, W.R. (1998) Co- and posttranslational translocation mechanisms direct cystic fibrosis transmembrane conductance regulator N terminus transmembrane assembly. *J Biol Chem*, **273**, 568-76.
32. Ward, C.L., Omura, S. and Kopito, R.R. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*, **83**, 121-7.
33. Brodsky, J.L. and McCracken, A.A. (1999) ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 507-13.
34. DeCarvalho, A.C., Gansheroff, L.J. and Teem, J.L. (2002) Mutations in the nucleotide binding domain 1 signature motif region rescue processing and functional defects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator delta f508. *J Biol Chem*, **277**, 35896-905.
35. Roxo-Rosa, M., Xu, Z., Schmidt, A., Neto, M., Cai, Z., Soares, C.M., Sheppard, D.N. and Amaral, M.D. (2006) Revertant mutants G550E and 4RK rescue cystic fibrosis mutants in the first nucleotide-binding domain of CFTR by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 17891-6.
36. Farinha, C.M., Nogueira, P., Mendes, F., Penque, D. and Amaral, M.D. (2002) The human DnaJ homologue (Hdj)-1/heat-shock protein (Hsp) 40 co-chaperone is required for the in vivo stabilization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by Hsp70. *Biochem J*, **366**, 797-806.

37. Meacham, G.C., Lu, Z., King, S., Sorscher, E., Tousson, A. and Cyr, D.M. (1999) The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *Embo J*, **18**, 1492-505.
38. Yang, Y., Janich, S., Cohn, J.A. and Wilson, J.M. (1993) The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9480-4.
39. Farinha, C.M. and Amaral, M.D. (2005) Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin. *Mol Cell Biol*, **25**, 5242-52.
40. Pind, S., Riordan, J.R. and Williams, D.B. (1994) Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, **269**, 12784-8.
41. Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M. and Cyr, D.M. (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol*, **3**, 100-5.
42. Loo, M.A., Jensen, T.J., Cui, L., Hou, Y., Chang, X.B. and Riordan, J.R. (1998) Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *Embo J*, **17**, 6879-87.
43. Alberti, S., Bohse, K., Arndt, V., Schmitz, A. and Hohfeld, J. (2004) The cochaperone HspBP1 inhibits the CHIP ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell*, **15**, 4003-10.
44. Arndt, V., Daniel, C., Nastainczyk, W., Alberti, S. and Hohfeld, J. (2005) BAG-2 acts as an inhibitor of the chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP. *Mol Biol Cell*, **16**, 5891-900.
45. Wang, X., Venable, J., LaPointe, P., Hutt, D.M., Koulov, A.V., Coppinger, J., Gurkan, C., Kellner, W., Matteson, J., Plutner, H. *et al.* (2006) Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell*, **127**, 803-15.
46. Amaral, M.D. (2005) Processing of CFTR: traversing the cellular maze--how much CFTR needs to go through to avoid cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol*, **39**, 479-91.
47. Jensen, T.J., Loo, M.A., Pind, S., Williams, D.B., Goldberg, A.L. and Riordan, J.R. (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell*, **83**, 129-35.
48. Zhang, H., Peters, K.W., Sun, F., Marino, C.R., Lang, J., Burgoyne, R.D. and Frizzell, R.A. (2002) Cysteine string protein interacts with and modulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, **277**, 28948-58.
49. Zhang, H., Schmidt, B.Z., Sun, F., Condliffe, S.B., Butterworth, M.B., Youker, R.T., Brodsky, J.L., Aridor, M. and Frizzell, R.A. (2006) Cysteine string protein monitors late steps in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator biogenesis. *J Biol Chem*, **281**, 11312-21.
50. Oberdorf, J., Carlson, E.J. and Skach, W.R. (2006) Uncoupling proteasome peptidase and ATPase activities results in cytosolic release of an ER polytopic protein. *J Cell Sci*, **119**, 303-13.
51. Carlson, E.J., Pitonzo, D. and Skach, W.R. (2006) p97 functions as an auxiliary factor to facilitate TM domain extraction during CFTR ER-associated degradation. *Embo J*.
52. Sun, F., Zhang, R., Gong, X., Geng, X., Drain, P.F. and Frizzell, R.A. (2006) Derlin-1 promotes the efficient degradation of CFTR and CFTR folding mutants. *J Biol Chem*, 36856-63.

53. Sun, F., Zhang, R., Gong, X., Geng, X., Drain, P.F. and Frizzell, R.A. (2006) Derlin-1 promotes the efficient degradation of CFTR and CFTR folding mutants. *J Biol Chem*.
54. Wang, X., Matteson, J., An, Y., Moyer, B., Yoo, J.S., Bannykh, S., Wilson, I.A., Riordan, J.R. and Balch, W.E. (2004) COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. *J Cell Biol*, **167**, 65-74.
55. Yu, Y., Platoshyn, O., Safrina, O., Tsigelny, I., Yuan, J.X. and Keller, S.H. (2007) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) functionality is dependent on coatamer protein I (COPI). *Biol Cell*, 433-44.
56. Rennolds, J., Tower, C., Musgrove, L., Fan, L., Maloney, K., Clancy, J.P., Kirk, K.L., Sztul, E. and Cormet-Boyaka, E. (2007) CFTR trafficking is mediated by the copi coat in Epithelial cells. *J Biol Chem*, 833-39.
57. Lukacs, G.L., Segal, G., Kartner, N., Grinstein, S. and Zhang, F. (1997) Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation. *Biochem J*, **328 (Pt 2)**, 353-61.
58. Prince, L.S., Peter, K., Hatton, S.R., Zaliauskiene, L., Cotlin, L.F., Clancy, J.P., Marchase, R.B. and Collawn, J.F. (1999) Efficient endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a tyrosine-based signal. *J Biol Chem*, **274**, 3602-9.
59. Hu, W., Howard, M. and Lukacs, G.L. (2001) Multiple endocytic signals in the C-terminal tail of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochem J*, **354**, 561-72.
60. Prince, L.S., Workman, R.B., Jr. and Marchase, R.B. (1994) Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5192-6.
61. Bradbury, N.A., Jilling, T., Berta, G., Sorscher, E.J., Bridges, R.J. and Kirk, K.L. (1992) Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. *Science*, **256**, 530-2.
62. Loffing, J., Moyer, B.D., McCoy, D. and Stanton, B.A. (1998) Exocytosis is not involved in activation of Cl⁻ secretion via CFTR in Calu-3 airway epithelial cells. *Am J Physiol*, **275**, C913-20.
63. Swiatecka-Urban, A., Talebian, L., Kanno, E., Moreau-Marquis, S., Coutermarsh, B., Hansen, K., Karlson, K.H., Barnaby, R., Cheney, R.E., Langford, G.M. *et al.* (2007) Myosin Vb is required for trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in Rab11a-specific apical recycling endosomes in polarized human airway epithelial cells. *J Biol Chem*, **282**, 23725-36.
64. Picciano, J.A., Ameen, N., Grant, B.D. and Bradbury, N.A. (2003) Rme-1 regulates the recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol Cell Physiol*, **285**, C1009-18.
65. Swiatecka-Urban, A., Boyd, C., Coutermarsh, B., Karlson, K.H., Barnaby, R., Aschenbrenner, L., Langford, G.M., Hasson, T. and Stanton, B.A. (2004) Myosin VI regulates endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, **279**, 38025-31.
66. Ameen, N. and Apodaca, G. (2007) Defective CFTR apical endocytosis and enterocyte brush border in myosin VI-deficient mice. *Traffic*, **8**, 998-1006.
67. Guggino, W.B. (2004) The cystic fibrosis transmembrane regulator forms macromolecular complexes with PDZ domain scaffold proteins. *Proc Am Thorac Soc*, **1**, 28-32.
68. Guggino, W.B. and Stanton, B.A. (2006) New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 426-36.
69. Cheng, J., Moyer, B.D., Milewski, M., Loffing, J., Ikeda, M., Mickle, J.E., Cutting, G.R., Li, M., Stanton, B.A. and Guggino, W.B. (2002) A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. *J Biol Chem*, **277**, 3520-9.

70. Cormet-Boyaka, E., Di, A., Chang, S.Y., Naren, A.P., Tousson, A., Nelson, D.J. and Kirk, K.L. (2002) CFTR chloride channels are regulated by a SNAP-23/syntaxin 1A complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12477-82.
71. Peters, K.W., Qi, J., Watkins, S.C. and Frizzell, R.A. (1999) Syntaxin 1A inhibits regulated CFTR trafficking in xenopus oocytes. *Am J Physiol*, **277**, C174-80.
72. Chang, S.Y., Di, A., Naren, A.P., Palfrey, H.C., Kirk, K.L. and Nelson, D.J. (2002) Mechanisms of CFTR regulation by syntaxin 1A and PKA. *J Cell Sci*, **115**, 783-91.
73. Bilan, F., Thoreau, V., Nacfer, M., Derand, R., Norez, C., Cantereau, A., Garcia, M., Becq, F. and Kitzis, A. (2004) Syntaxin 8 impairs trafficking of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and inhibits its channel activity. *J Cell Sci*, **117**, 1923-35.
74. Bilan, F., Nacfer, M., Fresquet, F., Norez, C., Melin, P., Martin-Berge, A., Costa de Beauregard, M.A., Becq, F., Kitzis, A. and Thoreau, V. (2008) Endosomal SNARE proteins regulate CFTR activity and trafficking in epithelial cells. *Exp Cell Res*, **314**, 2199-211.
75. Thelin, W.R., Chen, Y., Gentsch, M., Kreda, S.M., Sallee, J.L., Scarlett, C.O., Borchers, C.H., Jacobson, K., Stutts, M.J. and Milgram, S.L. (2007) Direct interaction with filamins modulates the stability and plasma membrane expression of CFTR. *J Clin Invest*, **117**, 364-374.
76. Jurkuvenaite, A., Varga, K., Nowotarski, K., Kirk, K.L., Sorscher, E.J., Li, Y., Clancy, J.P., Bebok, Z. and Collawn, J.F. (2006) Mutations in the amino terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator enhance endocytosis. *J Biol Chem*, **281**, 3329-34.
77. Collawn, J.F., Stangel, M., Kuhn, L.A., Esekogwu, V., Jing, S.Q., Trowbridge, I.S. and Tainer, J.A. (1990) Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell*, **63**, 1061-72.
78. Kraus, C., Reis, A., Naehrlich, L., Dotsch, J., Korbmacher, C. and Rauh, R. (2007) Functional characterization of a novel CFTR mutation P67S identified in a patient with atypical cystic fibrosis. *Cell Physiol Biochem*, **19**, 239-48.
79. Cai, Z., Scott-Ward, T.S. and Sheppard, D.N. (2003) Voltage-dependent gating of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel. *J Gen Physiol*, **122**, 605-20.
80. Vankeerberghen, A., Cuppens, H. and Cassiman, J.J. (2002) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros*, **1**, 13-29.
81. Chen, T.Y. and Hwang, T.C. (2008) CLC-0 and CFTR: chloride channels evolved from transporters. *Physiol Rev*, **88**, 351-87.
82. Gadsby, D.C., Vergani, P. and Csanady, L. (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*, **440**, 477-83.
83. Dorwart, M., Thibodeau, P. and Thomas, P. (2004) Cystic fibrosis: recent structural insights. *J Cyst Fibros*, **3 Suppl 2**, 91-4.
84. Hanrahan, J.W. and Wioland, M.A. (2004) Revisiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function. *Proc Am Thorac Soc*, **1**, 17-21.
85. Howell, L.D., Borchardt, R. and Cohn, J.A. (2000) ATP hydrolysis by a CFTR domain: pharmacology and effects of G551D mutation. *Biochem Biophys Res Commun*, **271**, 518-25.
86. Qu, B.H., Strickland, E.H. and Thomas, P.J. (1997) Localization and suppression of a kinetic defect in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator folding. *J Biol Chem*, **272**, 15739-44.
87. Lewis, H.A., Buchanan, S.G., Burley, S.K., Connors, K., Dickey, M., Dorwart, M., Fowler, R., Gao, X., Guggino, W.B., Hendrickson, W.A. *et al.* (2004) Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Embo J*, **23**, 282-93.

88. Treharne, K.J., Crawford, R.M., Xu, Z., Chen, J.H., Best, O.G., Schulte, E.A., Gruenert, D.C., Wilson, S.M., Sheppard, D.N., Kunzelmann, K. *et al.* (2007) Protein Kinase CK2, Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, and the Δ F508 Mutation: F508 DELETION DISRUPTS A KINASE-BINDING SITE. *J Biol Chem*, **282**, 10804-13.
89. Vergani, P., Lockless, S.W., Nairn, A.C. and Gadsby, D.C. (2005) CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature*, **433**, 876-80.
90. Stratford, F.L., Ramjeesingh, M., Cheung, J.C., Huan, L.J. and Bear, C.E. (2006) The Walker B motif of the second nucleotide binding domain (NBD2) of CFTR plays a key role in ATPase activity of the NBD1, NBD2 heterodimer. *Biochem J*.
91. Vergani, P., Nairn, A.C. and Gadsby, D.C. (2003) On the mechanism of MgATP-dependent gating of CFTR Cl⁻ channels. *J Gen Physiol*, **121**, 17-36.
92. Aleksandrov, L., Mengos, A., Chang, X., Aleksandrov, A. and Riordan, J.R. (2001) Differential interactions of nucleotides at the two nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, **276**, 12918-23.
93. Berger, A.L., Ikuma, M. and Welsh, M.J. (2005) Normal gating of CFTR requires ATP binding to both nucleotide-binding domains and hydrolysis at the second nucleotide-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 455-60.
94. Zhou, Z., Wang, X., Liu, H.Y., Zou, X., Li, M. and Hwang, T.C. (2006) The Two ATP Binding Sites of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Play Distinct Roles in Gating Kinetics and Energetics. *J Gen Physiol*, **128**, 413-22.
95. Powe, A.C., Jr., Al-Nakkash, L., Li, M. and Hwang, T.C. (2002) Mutation of Walker-A lysine 464 in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator reveals functional interaction between its nucleotide-binding domains. *J Physiol*, **539**, 333-46.
96. Bompadre, S.G., Cho, J.H., Wang, X., Zou, X., Sohma, Y., Li, M. and Hwang, T.C. (2005) CFTR gating II: Effects of nucleotide binding on the stability of open states. *J Gen Physiol*, **125**, 377-94.
97. Szabo, K., Szakacs, G., Hegeds, T. and Sarkadi, B. (1999) Nucleotide occlusion in the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Different patterns in the two nucleotide binding domains. *J Biol Chem*, **274**, 12209-12.
98. Basso, C., Vergani, P., Nairn, A.C. and Gadsby, D.C. (2003) Prolonged nonhydrolytic interaction of nucleotide with CFTR's NH₂-terminal nucleotide binding domain and its role in channel gating. *J Gen Physiol*, **122**, 333-48.
99. Zegarra-Moran, O., Monteverde, M., Galiotta, L.J. and Moran, O. (2007) Functional analysis of mutations in the putative binding site for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiators. Interaction between activation and inhibition. *J Biol Chem*, **282**, 9098-104.
100. Ostedgaard, L.S., Baldursson, O. and Welsh, M.J. (2001) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by its R domain. *J Biol Chem*, **276**, 7689-92.
101. Jia, Y., Mathews, C.J. and Hanrahan, J.W. (1997) Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J Biol Chem*, **272**, 4978-84.
102. Cheng, S.H., Rich, D.P., Marshall, J., Gregory, R.J., Welsh, M.J. and Smith, A.E. (1991) Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*, **66**, 1027-36.
103. Picciotto, M.R., Cohn, J.A., Bertuzzi, G., Greengard, P. and Nairn, A.C. (1992) Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, **267**, 12742-52.

104. Neville, D.C., Rozanas, C.R., Price, E.M., Gruis, D.B., Verkman, A.S. and Townsend, R.R. (1997) Evidence for phosphorylation of serine 753 in CFTR using a novel metal-ion affinity resin and matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Protein Sci*, **6**, 2436-45.
105. Rich, D.P., Berger, H.A., Cheng, S.H., Travis, S.M., Saxena, M., Smith, A.E. and Welsh, M.J. (1993) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by negative charge in the R domain. *J Biol Chem*, **268**, 20259-67.
106. Aleksandrov, A.A., Chang, X., Aleksandrov, L. and Riordan, J.R. (2000) The non-hydrolytic pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel gating. *J Physiol*, **528 Pt 2**, 259-65.
107. Dulhanty, A.M., Chang, X.B. and Riordan, J.R. (1995) Mutation of potential phosphorylation sites in the recombinant R domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator has significant effects on domain conformation. *Biochem Biophys Res Commun*, **206**, 207-14.
108. Ostedgaard, L.S., Baldursson, O., Vermeer, D.W., Welsh, M.J. and Robertson, A.D. (2000) A functional R domain from cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is predominantly unstructured in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5657-62.
109. Csanady, L., Seto-Young, D., Chan, K.W., Cenciarelli, C., Angel, B.B., Qin, J., McLachlin, D.T., Krutchinsky, A.N., Chait, B.T., Nairn, A.C. *et al.* (2005) Preferential phosphorylation of R-domain Serine 768 dampens activation of CFTR channels by PKA. *J Gen Physiol*, **125**, 171-86.
110. Wilkinson, D.J., Strong, T.V., Mansoura, M.K., Wood, D.L., Smith, S.S., Collins, F.S. and Dawson, D.C. (1997) CFTR activation: additive effects of stimulatory and inhibitory phosphorylation sites in the R domain. *Am J Physiol*, **273**, L127-33.
111. Vais, H., Zhang, R. and Reenstra, W.W. (2004) Dibasic phosphorylation sites in the R domain of CFTR have stimulatory and inhibitory effects on channel activation. *Am J Physiol Cell Physiol*, **287**, C737-45.
112. Chappel, V., Irvine, T., Liao, J., Evagelidis, A. and Hanrahan, J.W. (2005) Phosphorylation of CFTR by PKA promotes binding of the regulatory domain. *Embo J*, **24**, 2730-40.
113. Naren, A.P., Cormet-Boyaka, E., Fu, J., Villain, M., Blalock, J.E., Quick, M.W. and Kirk, K.L. (1999) CFTR chloride channel regulation by an interdomain interaction. *Science*, **286**, 544-8.
114. Fu, J., Ji, H.L., Naren, A.P. and Kirk, K.L. (2001) A cluster of negative charges at the amino terminal tail of CFTR regulates ATP-dependent channel gating. *J Physiol*, **536**, 459-70.
115. Haggie, P.M. and Verkman, A.S. (2008) Monomeric CFTR in plasma membranes in live cells revealed by single-molecule fluorescence imaging. *J Biol Chem*, 23510-13.
116. Gupta, S., Xie, J., Ma, J. and Davis, P.B. (2004) Intermolecular interaction between R domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **30**, 242-8.
117. Li, C., Roy, K., Dandridge, K. and Naren, A.P. (2004) Molecular assembly of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in plasma membrane. *J Biol Chem*, **279**, 24673-84.
118. Locher, K.P., Lee, A.T. and Rees, D.C. (2002) The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, **296**, 1091-8.
119. Rosenberg, M.F., Kamis, A.B., Aleksandrov, L.A., Ford, R.C. and Riordan, J.R. (2004) Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Biol Chem*, **279**, 39051-7.
120. Reyes, C.L., Ward, A., Yu, J. and Chang, G. (2006) The structures of MsbA: Insight into ABC transporter-mediated multidrug efflux. *FEBS Lett*, **580**, 1042-8.

121. Ge, N., Muise, C.N., Gong, X. and Linsdell, P. (2004) Direct comparison of the functional roles played by different transmembrane regions in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *J Biol Chem*, **279**, 55283-9.
122. Gong, X. and Linsdell, P. (2004) Maximization of the rate of chloride conduction in the CFTR channel pore by ion-ion interactions. *Arch Biochem Biophys*, **426**, 78-82.
123. Akabas, M.H., Kaufmann, C., Cook, T.A. and Archdeacon, P. (1994) Amino acid residues lining the chloride channel of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, **269**, 14865-8.
124. Carroll, T.P., Morales, M.M., Fulmer, S.B., Allen, S.S., Flotte, T.R., Cutting, G.R. and Guggino, W.B. (1995) Alternate translation initiation codons can create functional forms of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, **270**, 11941-6.
125. Mansoura, M.K., Smith, S.S., Choi, A.D., Richards, N.W., Strong, T.V., Drumm, M.L., Collins, F.S. and Dawson, D.C. (1998) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) anion binding as a probe of the pore. *Biophys J*, **74**, 1320-32.
126. Wine, J.J. (2006) Acid in the airways. Focus on "Hyperacidity of secreted fluid from submucosal glands in early cystic fibrosis". *Am J Physiol Cell Physiol*, **290**, C669-71.
127. Aubin, C.N. and Linsdell, P. (2006) Positive charges at the intracellular mouth of the pore regulate anion conduction in the CFTR chloride channel. *J Gen Physiol*, **128**, 535-45.
128. Walker, J., Jijon, H.B., Churchill, T., Kulka, M. and Madsen, K.L. (2003) Activation of AMP-activated protein kinase reduces cAMP-mediated epithelial chloride secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **285**, G850-60.
129. Yoo, D., Flagg, T.P., Olsen, O., Raghuram, V., Foskett, J.K. and Welling, P.A. (2004) Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J Biol Chem*, **279**, 6863-73.
130. Ko, S.B., Zeng, W., Dorwart, M.R., Luo, X., Kim, K.H., Millen, L., Goto, H., Naruse, S., Soyombo, A., Thomas, P.J. *et al.* (2004) Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nat Cell Biol*, **6**, 343-50.
131. Reddy, M.M., Light, M.J. and Quinton, P.M. (1999) Activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) requires CFTR Cl⁻ channel function. *Nature*, **402**, 301-4.
132. Kunzelmann, K. (2001) CFTR: interacting with everything? *News Physiol Sci*, **16**, 167-70.
133. Schwiebert, E.M., Benos, D.J., Egan, M.E., Stutts, M.J. and Guggino, W.B. (1999) CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev*, **79**, S145-66.
134. Marcet, B. and Boeynaems, J.M. (2006) Relationships between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, extracellular nucleotides and cystic fibrosis. *Pharmacol Ther*, 719-32.
135. Bodas, E., Aleu, J., Pujol, G., Martin-Satue, M., Marsal, J. and Solsona, C. (2000) ATP crossing the cell plasma membrane generates an ionic current in xenopus oocytes. *J Biol Chem*, **275**, 20268-73.
136. Chanson, M., Kotsias, B.A., Peracchia, C. and O'Grady, S.M. (2007) Interactions of connexins with other membrane channels and transporters. *Prog Biophys Mol Biol*, **94**, 233-44.
137. Welsh, M.J. and Smith, A.E. (1993) Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*, **73**, 1251-4.
138. Proesmans, M., Vermeulen, F. and De Boeck, K. (2008) What's new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction of the basic defect. *Eur J Pediatr*, **167**, 839-49.
139. Zielenski, J. (2000) Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*, **67**, 117-33.

140. Cutting, G.R. (2005) Modifier genetics: cystic fibrosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **6**, 237-60.
141. Hull, J. and Thomson, A.H. (1998) Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. *Thorax*, **53**, 1018-21.
142. Matthews, L.W., Doershuk, C.F., Wise, M., Eddy, G., Nudelman, H. and Spector, S. (1964) A Therapeutic Regimen for Patients with Cystic Fibrosis. *J Pediatr*, **65**, 558-75.
143. Guilbault, C., Saeed, Z., Downey, G.P. and Radzioch, D. (2007) Cystic fibrosis mouse models. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **36**, 1-7.
144. Rogers, C.S., Stoltz, D.A., Meyerholz, D.K., Ostedgaard, L.S., Rokhlina, T., Taft, P.J., Rogan, M.P., Pezzulo, A.A., Karp, P.H., Itani, O.A. *et al.* (2008) Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*, **321**, 1837-41.
145. Wilschanski, M., Famini, C., Blau, H., Rivlin, J., Augarten, A., Avital, A., Kerem, B. and Kerem, E. (2000) A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying stop mutations. *Am J Respir Crit Care Med*, **161**, 860-5.
146. Clancy, J.P., Bebok, Z., Ruiz, F., King, C., Jones, J., Walker, L., Greer, H., Hong, J., Wing, L., Macaluso, M. *et al.* (2001) Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **163**, 1683-92.
147. Sato, S., Ward, C.L., Krouse, M.E., Wine, J.J. and Kopito, R.R. (1996) Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem*, **271**, 635-8.
148. Zhang, X.M., Wang, X.T., Yue, H., Leung, S.W., Thibodeau, P.H., Thomas, P.J. and Guggino, S.E. (2003) Organic solutes rescue the functional defect in delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, **278**, 51232-42.
149. Loo, T.W., Bartlett, M.C. and Clarke, D.M. (2005) Rescue of DeltaF508 and other misprocessed CFTR mutants by a novel quinazoline compound. *Mol Pharm*, **2**, 407-13.
150. Rubenstein, R.C. and Zeitlin, P.L. (1998) A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am J Respir Crit Care Med*, **157**, 484-90.
151. Andersson, C. and Roomans, G.M. (2000) Activation of deltaF508 CFTR in a cystic fibrosis respiratory epithelial cell line by 4-phenylbutyrate, genistein and CPX. *Eur Respir J*, **15**, 937-41.
152. Kelley, T.J., al-Nakkash, L. and Drumm, M.L. (1995) CFTR-mediated chloride permeability is regulated by type III phosphodiesterases in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **13**, 657-64.
153. Rich, D.P., Anderson, M.P., Gregory, R.J., Cheng, S.H., Paul, S., Jefferson, D.M., McCann, J.D., Klinger, K.W., Smith, A.E. and Welsh, M.J. (1990) Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature*, **347**, 358-63.
154. Drumm, M.L., Pope, H.A., Cliff, W.H., Rommens, J.M., Marvin, S.A., Tsui, L.C., Collins, F.S., Frizzell, R.A. and Wilson, J.M. (1990) Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell*, **62**, 1227-33.
155. Engelhardt, J.F., Yankaskas, J.R., Ernst, S.A., Yang, Y., Marino, C.R., Boucher, R.C., Cohn, J.A. and Wilson, J.M. (1992) Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat Genet*, **2**, 240-8.
156. Zabner, J., Couture, L.A., Gregory, R.J., Graham, S.M., Smith, A.E. and Welsh, M.J. (1993) Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects

- the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell*, **75**, 207-16.
157. Crystal, R.G., McElvaney, N.G., Rosenfeld, M.A., Chu, C.S., Mastrangeli, A., Hay, J.G., Brody, S.L., Jaffe, H.A., Eissa, N.T. and Danel, C. (1994) Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet*, **8**, 42-51.
 158. Bellon, G., Michel-Calemard, L., Thouvenot, D., Jagneaux, V., Poitevin, F., Malcus, C., Accart, N., Layani, M.P., Aymard, M., Bernon, H. *et al.* (1997) Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther*, **8**, 15-25.
 159. Porteous, D.J., Dorin, J.R., McLachlan, G., Davidson-Smith, H., Davidson, H., Stevenson, B.J., Carothers, A.D., Wallace, W.A., Moralee, S., Hoenes, C. *et al.* (1997) Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther*, **4**, 210-8.
 160. Alton, E.W., Stern, M., Farley, R., Jaffe, A., Chadwick, S.L., Phillips, J., Davies, J., Smith, S.N., Browning, J., Davies, M.G. *et al.* (1999) Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Lancet*, **353**, 947-54.
 161. Knowles, M.R., Hohneker, K.W., Zhou, Z., Olsen, J.C., Noah, T.L., Hu, P.C., Leigh, M.W., Engelhardt, J.F., Edwards, L.J., Jones, K.R. *et al.* (1995) A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*, **333**, 823-31.
 162. Zabner, J., Fasbender, A.J., Moninger, T., Poellinger, K.A. and Welsh, M.J. (1995) Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem*, **270**, 18997-9007.
 163. Neher, E. and Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, **260**, 799-802.
 164. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, **391**, 85-100.
 165. Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., White, G.A., O'Riordan, C.R. and Smith, A.E. (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, **63**, 827-34.
 166. Kartner, N., Augustinas, O., Jensen, T.J., Naismith, A.L. and Riordan, J.R. (1992) Mislocalization of delta F508 CFTR in cystic fibrosis sweat gland. *Nat Genet*, **1**, 321-7.
 167. Kopito, R.R. (1999) Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev*, **79**, S167-73.
 168. Ma, T., Thiagarajah, J.R., Yang, H., Sonawane, N.D., Folli, C., Galletta, L.J. and Verkman, A.S. (2002) Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J Clin Invest*, **110**, 1651-8.
 169. Alonso, M.J., Heine-Suner, D., Calvo, M., Rosell, J., Gimenez, J., Ramos, M.D., Telleria, J.J., Palacio, A., Estivill, X. and Casals, T. (2007) Spectrum of mutations in the CFTR gene in cystic fibrosis patients of Spanish ancestry. *Ann Hum Genet*, **71**, 194-201.
 170. Padoan, R., Costantini, D., Russo, M.C., Ambrosioni, A., Fiori, S., Prandoni, S., Cantu-Rajoldi, A., Seia, M. and Giunta, A. (2000) A novel missense mutation (Y89C) in exon 3 of the CFTR (ABCC7) gene in a young male. *Hum Mutat*, **15**, 486.
 171. Casals, T., Bassas, L., Egozcue, S., Ramos, M.D., Gimenez, J., Segura, A., Garcia, F., Carrera, M., Larriba, S., Sarquella, J. *et al.* (2000) Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod*, **15**, 1476-83.

172. Dork, T., Dworniczak, B., Aulehla-Scholz, C., Wieczorek, D., Bohm, I., Mayerova, A., Seydewitz, H.H., Nieschlag, E., Meschede, D., Horst, J. *et al.* (1997) Distinct spectrum of CFTR gene mutations in congenital absence of vas deferens. *Hum Genet*, **100**, 365-77.
173. Casals, T., De-Gracia, J., Gallego, M., Dorca, J., Rodriguez-Sanchon, B., Ramos, M.D., Gimenez, J., Cistero-Bahima, A., Olveira, C. and Estivill, X. (2004) Bronchiectasis in adult patients: an expression of heterozygosity for CFTR gene mutations? *Clin Genet*, **65**, 490-5.
174. Noone, P.G., Zhou, Z., Silverman, L.M., Jowell, P.S., Knowles, M.R. and Cohn, J.A. (2001) Cystic fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations. *Gastroenterology*, **121**, 1310-9.
175. Gartner S, C.N., Maya A, Casals T, Seculi JL, Asensio O, Bosque M,, Estivill X, P.M., Prats R and study group for neonatal screening of and Cataluña, c.f.i. (2003) Neonatal screening for cystic fibrosis in Cataluña, Spain. *Pediatr Pulmonol*, **S25:221**.
176. Lazaro, C., de Cid, R., Sunyer, J., Soriano, J., Gimenez, J., Alvarez, M., Casals, T., Anto, J.M. and Estivill, X. (1999) Missense mutations in the cystic fibrosis gene in adult patients with asthma. *Hum Mutat*, **14**, 510-9.
177. Bombieri, C., Giorgi, S., Carles, S., de Cid, R., Belpinati, F., Tandoi, C., Pallares-Ruiz, N., Lazaro, C., Ciminelli, B.M., Romey, M.C. *et al.* (2000) A new approach for identifying non-pathogenic mutations. An analysis of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in normal individuals. *Hum Genet*, **106**, 172-8.
178. Cosson, P., Lankford, S.P., Bonifacino, J.S. and Klausner, R.D. (1991) Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs. *Nature*, **351**, 414-6.
179. Hartmann, E., Rapoport, T.A. and Lodish, H.F. (1989) Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5786-90.
180. Parks, G.D. and Lamb, R.A. (1991) Topology of eukaryotic type II membrane proteins: importance of N-terminal positively charged residues flanking the hydrophobic domain. *Cell*, **64**, 777-87.
181. Szczesna-Skorupa, E., Browne, N., Mead, D. and Kemper, B. (1988) Positive charges at the NH2 terminus convert the membrane-anchor signal peptide of cytochrome P-450 to a secretory signal peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 738-42.
182. Chen, M. and Zhang, J.T. (1999) Topogenesis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR): regulation by the amino terminal transmembrane sequences. *Biochemistry*, **38**, 5471-7.
183. Stanke, F., Ballmann, M., Bronsveld, I., Dork, T., Gallati, S., Laabs, U., Derichs, N., Ritzka, M., Posselt, H.G., Harms, H.K. *et al.* (2008) Diversity of the basic defect of homozygous CFTR mutation genotypes in humans. *J Med Genet*, **45**, 47-54.
184. Decaestecker, K., Decaestecker, E., Castellani, C., Jaspers, M., Cuppens, H. and De Boeck, K. (2004) Genotype/phenotype correlation of the G85E mutation in a large cohort of cystic fibrosis patients. *Eur Respir J*, **23**, 679-84.
185. Xiong, X., Bragin, A., Widdicombe, J.H., Cohn, J. and Skach, W.R. (1997) Structural cues involved in endoplasmic reticulum degradation of G85E and G91R mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest*, **100**, 1079-88.
186. Wehbi, H., Gasmi-Seabrook, G., Choi, M.Y. and Deber, C.M. (2007) Positional dependence of non-native polar mutations on folding of CFTR helical hairpins. *Biochim Biophys Acta*, 79-82.

187. Nikolic, A., Divac, A., Stankovic, M., Dinic, J., Tomic, B. and Ljujic, M. (2006) Analysis of common CFTR polymorphisms 5T, M470V and R75Q in healthy Serbian population. *Genetika*, **42**, 996-8.
188. Slieker, M.G., Sanders, E.A., Rijkers, G.T., Ruven, H.J. and van der Ent, C.K. (2005) Disease modifying genes in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, **4 Suppl 2**, 7-13.

Annex

