

Tesis Doctoral

# Estudio de la expresión del gen CISD1 mediada por la actividad del CFTR

Taminelli, Guillermo Luis

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Taminelli, Guillermo Luis. (2010). Estudio de la expresión del gen CISD1 mediada por la actividad del CFTR. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Taminelli, Guillermo Luis. "Estudio de la expresión del gen CISD1 mediada por la actividad del CFTR". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Departamento de Química Biológica**

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *CISD1***  
**MEDIADA POR LA ACTIVIDAD DEL CFTR**

**Tesis presentada para optar al título de**  
**Doctor de la Universidad de Buenos Aires**  
**en el área de Química Biológica**

**Lic. Guillermo Luis Taminelli**

**Director de Tesis: Dr. Tomás A. Santa Coloma**

**Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Cánepa**

**Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir (antes Fundación Campomar),**  
**Instituto de Investigaciones Bioquímicas (FCEyN) y de Buenos Aires**  
**(CONICET)**

**y**

**Facultad de Ciencias Médicas, Programa de Investigaciones Biomédicas**  
**UCA-CONICET, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA)**

**Buenos Aires, 2010**

***“Alea iacta Est”***

**Caius Iulius Caesar (a punto de cruzar el Rubicón)**

## **ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *CISD1* MEDIADA POR LA ACTIVIDAD DEL CFTR**

### **Resumen**

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva producida por mutaciones en el gen que codifica el canal de cloruro CFTR. Muy poco se sabe sobre los mecanismos moleculares involucrados en el daño celular producido por la falla del canal CFTR. Mediante la metodología de “Display Diferencial” o “Differential Display” (DD) observamos que la expresión del gen de origen nuclear *CISD1* (CDGSH Iron Sulfur Domain 1) estaba disminuída en un modelo celular de FQ. Dado que el DD es una técnica que aporta evidencias pero es susceptible a falsos positivos y negativos, se decidió que el primer enfoque de esta Tesis fuera corroborar los resultados del DD. Para ello se utilizaron técnicas como RT-PCR semi cuantitativas y RT seguida de PCR en tiempo real para medir los niveles de expresión de *CISD1* en distintos modelos celulares de FQ o con células que expresasen CFTR wt en presencia de inhibidores o activadores del CFTR. Ya que *CISD1* es un gen que se encuentra en el genoma nuclear, el siguiente enfoque de esta Tesis fue determinar la localización subcelular de su producto. En este caso, se utilizó la expresión de una quimera unida a EGFP y mediante microscopía confocal pudimos demostrar que *CISD1* codifica una proteína de localización mitocondrial. La localización mitocondrial fue confirmada por Wiley y col. Ellos además reportaron que *CISD1* posee un grupo prostético del tipo 2Fe-2S en lugar de Zinc, como postulamos en un principio debido a su estructura primaria. La función de esta proteína es desconocida, pero estudios hechos en mitocondrias aisladas de células cardíacas de un ratón nulo (-/-) para *mitoNEET* (*CISD1* en humanos) presentaban disminuída en un 30 % la capacidad máxima de la fosforilación oxidativa medida en estado 3. Además, en un trabajo anterior de Colca y colaboradores, se reportó que la proteína Minner-1 de ratón (producto de splicing alternativo de *CISD1*) co-inmuno

precipitó con proteínas pertenecientes al complejo I de la cadena de transporte de electrones.

Luego de que comprobamos su localización mitocondrial mediante la quimera GFP-CISD1, nuestro siguiente objetivo fue determinar si la actividad del complejo I mitocondrial se encontraba afectada por la expresión diferencial de CISD1 (un efecto observado en FQ por Gabriel Valdivieso en su Tesis, aún no publicado). Para tal fin medimos la actividad *in gel* del CI<sub>m</sub> mediante la técnica “Blue Native-PAGE” (BN-PAGE), en mitocondrias extraídas desde diferentes modelos experimentales de células FQ transfectadas con *CISD1* salvaje y células Caco-2 (no FQ) transfectadas con un variante mutada de *CISD1* obtenida por mutagénesis dirigida en las cisteínas 72 y 74 que fueron reemplazadas por serinas en un plásmido de expresión para eucariotas pcDNA 3.1(-). Así, observamos que la disminución significativa de la actividad del CI<sub>m</sub> reportada por Valdivieso y col. en distintos modelos FQ era restaurada por la expresión ectópica de *CISD1*, mientras que la variante mutada de *CISD1* moduló negativamente la actividad normal del CI<sub>m</sub> en células Caco-2 (no FQ).

**Palabras claves:** Fibrosis Quística; CFTR; *CISD1*; mitocondria Complejo I mitocondrial.

**STUDY OF GENE EXPRESSION MEDIATED CISD1 CFTR ACTIVITY.****Summary**

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by mutations in the gene encoding the CFTR chloride channel. Very little is known about the molecular mechanisms involved in the disease. Using the methodology of "Differential Display" (DD), we observed that the expression of the nuclear gene *CISD1* (CDGSH Iron Sulfur Domain 1) was decreased in a cell model of CF. Since DD is a technique that might provide false positive or negative results, the results has to be validated by using other methods. Thus, the first objective of this Thesis was to corroborate the DD results. For this purpose, we used semi-quantitative RT-PCR and RT followed by real-time PCR to measure the expression levels of *CISD1* in different CF cell models. We also used non-CF cells in presence of CFTR inhibitors or activators. Since *CISD1* is a gene found in the nuclear genome, the following focus of this thesis was to determine the subcellular location of the *CISD1* product. We used the expression of a chimera containing *CISD1* linked to EGFP and by using confocal microscopy we could show that *CISD1* indeed encodes for a protein of mitochondrial localization, as the program PSORT previously predicted. The mitochondrial location was also confirmed by Wiley et al. They reported that *CISD1* has a 2Fe-2S type prosthetic group instead of zinc as we originally thought. The function of this protein is unknown yet, but studies done in isolated mitochondria of cardiac cells from a null (-/-) mouse for mitoNEET (*CISD1* in humans) had decreased by 30% the maximal capacity of oxidative phosphorylation measured in state 3. Furthermore, in a previous work, Colca et al. reported that the mouse protein Minner-1 co-immune precipitated with proteins belonging to the mCI of the electron transport chain (ETC). We also showed previously (Valdivieso et al), that the mitochondrial protein ND4, which belong to the mitochondrial complex I, was reducen in FQ. Therefore, our next goal was to determine whether mitochondrial complex I activity was affected by the differential expression of *CISD1*. To this end, we measured the *in gel* mCI activity using the "Blue Native-PAGE (BN-PAGE) technique, in mitochondria

extracted from different experimental models of CF cells, transfected with CISD1 wt, and non- CF cells transfected with a mutated variant of CISD1. We observed that the significant decrease in the mCl activity reported by Valdivieso et al. in different CF models, can be partially restored by the CISD1 ectopic expression, while the mutated variant of CISD1 down modulated the normal mCl activity in non-CF Caco-2 cells.

**Keywords:** Cystic fibrosis, CFTR, CISD1; mitochondria; mitochondrial Complex I.

## **Agradecimientos**

A mi director, Dr. Tomás Santa Coloma, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por su apoyo.

Al Dr. Marcelo Dankert por compartir su enorme sabiduría.

Al Dr. Dieter Gruenert (Human Molecular Genetics Unit, Department of Medicine, University of Vermont, Burlington, VT, USA) por haber cedido las células de tráquea FQ (CFDE) y las mismas corregidas para la expresión del CFTR (CFDE/6RepCFTR).

A los organismos que hicieron posible este trabajo de investigación: Universidad de Buenos Aires, Subsidios UBA (X-156), CONICET y ANPCyT (PICT 13907).

A la Fundación Universidad Católica Argentina, por su apoyo económico.

A la Pontificia Universidad Católica Argentina por brindarme un sitio donde culminar con mi tesis. A su Rector anterior, Monseñor Alfredo Zecca y al actual, Pbro. Dr. Víctor Fernández., al Decano de la facultad de medicina Dr. Carlos B. Alvarez y a todos aquellos que me apoyaron, ayudaron y comprendieron.

A mis compañeros de laboratorio que ya dejaron el laboratorio con otro rumbo: Mariana Brocardo, Martín Radrizzani, Eduardo Cafferata, Michelle Bianchini, Beatriz Reyes, Verónica Sotomayor, Florencia Marcucci; Celeste Marín.

Y a los que están en la actualidad: Gabriel Valdivieso, Eleonora Pagano, Maríangeles Clauzure, Macarena Massip Copiz, Edgardo Kolkowski, Francisco Sánchez, María Luz Teiber, Soledad Llarrull, María Agüero y Gustavo Shulman;



## **AGRADECIMIENTOS**

por su amistad, por su compañerismo y por toda su la colaboración, tanto dentro como fuera del laboratorio.

A mi psicóloga, Mónica Radrizzani, por su ayuda y acompañamiento en los momentos difíciles

A mi Familia: Silvina, Federico y Lucía, por toda su paciencia y por todo su amor; también por todas las postergaciones y sacrificios.

A mis amigos.

A mis padres.

A todos ¡Gracias!, este trabajo hubiera sido imposible sin cada uno de sus aportes.

**ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ácido desoxirribonucleico copia
<b>Amp.</b>	Ampicilina
<b>AMPc</b>	adenosina monofosfato cíclico
<b>ARNm</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>ADNmt</b>	ADN mitocondrial
<b>CFTR</b>	“cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”
<b>CISD1</b>	proteína “CDGSH Iron-Sulfur Domain 1”
<b><i>CISD1</i></b>	gen humano que codifica para la proteína “CDGSH Iron-Sulfur Domain 1”
<b>CI<sub>m</sub></b>	complejo I mitocondrial
<b>Cl<sup>-</sup></b>	ión cloruro
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>DD</b>	“differential display”
<b>DMEM</b>	medio de cultivo “Dulbeco’s Modified Essential Medium”
<b>DMSO</b>	(dimetil sulfóxido)
<b>DNasa rh</b>	desoxirribonucleasasa recombinante humana
<b>EDTA</b>	ácido etilen diamino tetraacético
<b>FQ</b>	fibrosis quística
<b>IBMX</b>	isobutilmetilxantina
<b>LB</b>	Luria Bertani (medio de cultivo para bacterias)
<b>MOPS</b>	ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico
<b>MSD</b>	“membrane spanning domain”
<b>MTND4</b>	Subunidad ND4 del Complejo I mitocondrial
<b><i>MTND4</i></b>	Gen de la subunidad ND4 del Complejo I mitocondrial
<b>NBD</b>	“nucleotide-binding domain”
<b>NBT</b>	“nitro blue tetrazolium”
<b>NHERF</b>	factor regulador del intercambio sodio-protones
<b>NPPB</b>	5-nitro-2(3-phenylpropyl amino) benzoato
<b>ORCC</b>	“outwardly rectifying Cl <sup>-</sup> channels”
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa

## **ABREVIATURAS**

---

<b>PKA</b>	proteína quinasa A
<b>PKC</b>	proteína quinasa C
<b>ROS</b>	“reactive oxygen species”
<b>RT-PCR</b>	transcripción reversa seguida de PCR
<b>SD</b>	“Standard Deviation”
<b>SFB</b>	suero fetal bovino
<b>SRC/c-Src</b>	tirosina quinasa SRC (pp60c-Src)

**ÍNDICE**

<b>RESUMEN</b> .....	<b>ii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>x</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>1- HISTORIA DE LA ENFERMEDAD</b> .....	<b>3</b>
<b>2- ASPECTOS CLÍNICOS DE LA FIBROSIS QUÍSTICA</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1- Patología respiratoria</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2- Infecciones e inflamación pulmonar</b> .....	<b>8</b>
<b>2.3- Trastornos digestivos</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4- Malnutrición y trastornos alimentarios en FQ</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5- Anomalías del sistema reproductor</b> .....	<b>11</b>
<b>3- DIAGNÓSTICO DE LA FQ</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1- Ley 24.438:</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2- Diagnóstico molecular</b> .....	<b>14</b>
<b>3.3- Detección de portadores</b> .....	<b>15</b>
<b>4- TERAPIAS EXISTENTES PARA FQ</b> .....	<b>15</b>
<b>4.1- Despeje de las vías respiratorias (“Airway clearance”)</b> .....	<b>16</b>
<b>4.2- Terapia con antibióticos</b> .....	<b>16</b>
<b>4.3- Tratamiento con DNasa</b> .....	<b>18</b>
<b>4.4- Terapia antiinflamatoria</b> .....	<b>18</b>
<b>5- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL CFTR</b> .....	<b>19</b>

<b>6- REGULACIÓN GENERAL E INTERACCIONES DEL CFTR .....</b>	<b>22</b>
<b>7- LAS MUTACIONES DEL GEN <i>CFTR</i>.....</b>	<b>29</b>
7.1- Clasificación de las mutaciones Del <i>CFTR</i> .....	30
<b>8- <i>CFTR</i> Y FIBROSIS QUÍSTICA.....</b>	<b>32</b>
9.1- Antecedentes .....	34
9.2- <i>CISD1</i> , otro gen modulado por la actividad del <i>CFTR</i> .....	35
9.3- El modelo utilizado para el “Display” diferencial (DD) .....	36
<b>10- ANORMALIDADES MITOCONDRIALES ASOCIADAS A FQ .....</b>	<b>36</b>
<b>11- EL COMPLEJO I MITOCONDRIAL (CI<sub>m</sub>).....</b>	<b>37</b>
<b>HIPOTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>39</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
1- OBJETIVO GENERAL:.....	40
2- OBJETIVOS PARTICULARES:.....	40
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
1- CULTIVOS CELULARES.....	42
1.1- Células <i>CFDE</i> y células <i>CFDE/6RepCFTR</i> .....	42
1.2- Células <i>IB3-1</i> y <i>S9</i> .....	43
1.3- Células <i>T84</i> .....	44
1.4- Células <i>Caco-2</i> .....	44
2- CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO DE LAS CÉLULAS .....	45
2.1- Descongelamiento .....	45
2.2- Congelamiento .....	46
3- TRATAMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES CON INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DE TRANSPORTE DE CLORURO DEL <i>CFTR</i> . .....	47
4- TRATAMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES DE <i>IB3-1</i> Y <i>S9</i> CON ACTIVADORES DEL TRANSPORTE DE CLORURO VÍA <i>CFTR</i> . .....	47
5- EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL .....	47

<b>6- RT-PCR (“REVERSE TRANSCRIPTION - POLYMERASE CHAIN REACTION”) SEMICUANTITATIVA Y PCR EN TIEMPO REAL.....</b>	<b>48</b>
6.1- Transcripción Reversa (RT) .....	48
6.2- PCR “multiplex” semicuantitativa .....	49
6.3- PCR semicuantitativa con curva estándar.....	50
6.4- Estudio de la expresión de CISD1 por “Real Time”-PCR .....	51
6.5- Condiciones de amplificación por PCR .....	51
6.6- Generación de los plásmidos para las curvas estándar. ....	52
<b>7- PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES .....</b>	<b>53</b>
<b>8- TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES POR CHOQUE TÉRMICO. ....</b>	<b>54</b>
<b>9- SELECCIÓN DE BACTERIAS RECOMBINANTES POR “COLONY PCR” .....</b>	<b>55</b>
<b>10- PREPARACIONES DE PLÁSMIDOS (“MINI, MIDI Y MAXIPREPS”)... ..</b>	<b>55</b>
<b>11- CORTE CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN .....</b>	<b>57</b>
<b>12- SECUENCIACIÓN.....</b>	<b>57</b>
<b>13- ANÁLISIS DE LA SECUENCIA <i>IN SILICO</i>.....</b>	<b>58</b>
14.1- El plásmido pcEGFP .....	59
14.2- Producción de la proteína de fusión CISD1-EGFP.....	59
14.3- Preparación de las muestras. ....	60
14.4- Obtención de las imágenes por microscopía confocal. ....	61
<b>15.- ANTICUERPOS POLICLONALES EN CONEJO.....</b>	<b>61</b>
<b>16.- INMUNOHISTOQUÍMICA.....</b>	<b>62</b>
<b>16- OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pcCISD1 y pcCISD1<sub>(C72-74S)</sub> POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA. ....</b>	<b>63</b>
<b>17- SELECCIÓN DE LAS LINEAS CELULARES TRANSFECTADAS. ....</b>	<b>65</b>

<b>18- MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL MEDIANTE BN-PAGE (“BLUE NATIVE - POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS”)</b> .....	<b>65</b>
18.1- Extracción de mitocondrias .....	65
18.2- Preparación de las muestras para el BN-PAGE .....	66
18.3- Preparación del gel de poliacrilamida para BN-PAGE.....	67
18.4- Condiciones de electroforesis .....	67
18.5- Determinación de la actividad catalítica del Complejo I mitocondrial (C <sub>1m</sub> ), <i>in gel</i> . .....	68
18.6- Tinción de los geles BN-PAGE con “coomassie blue”.....	68
<b>19- ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>68</b>
<b>I- RESULTADOS PREVIOS</b> .....	<b>71</b>
I.I- “Differential Display” o “Display” Diferencial (DD).....	71
I.II- Hibridación <i>in situ</i> en tejido pulmonar humano .....	73
I.III- Estudio de la expresión diferencial de <i>CISD1</i> mediante FISH confocal. ....	74
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>77</b>
<b>Objetivo 1: Validar los resultados obtenidos por DD sobre la expresión     diferencial del gen <i>CISD1</i> en FQ</b> .....	<b>77</b>
1.1- RT-PCR semicuantitativa .....	77
1.2 - Efectos de los inhibidores del CFTR, Glibenclamida y CFTR(inh)-172, sobre la expresión de <i>CISD1</i> medidos por PCR en tiempo real.....	81
1.3 - Efectos de la activación del CFTR sobre la expresión de <i>CISD1</i> a distintos tiempos, medidos por PCR en tiempo real. ....	83
<b>Objetivo 2: Estudiar la localización subcelular de <i>CISD1</i> utilizando     predicciones <i>in silico</i> y comprobar en un cultivo celular dicha     localización mediante microscopía confocal.</b> .....	<b>86</b>
2.1- Análisis de la secuencia de <i>CISD1</i> .....	86
2.2- Localización subcelular de la proteína de fusión <i>CISD1</i> -EGFP...	88

2.2.1- Obtención de la Quimera CISD1-EGFP .....	88
Objetivo 3: Desarrollar anticuerpos policlonales que reconozcan la proteína CISD1 .....	95
3.1 Anticuerpos policlonales de CISD1 .....	95
OBJETIVO 4; Determinar si la reducción de <i>CISD1</i> tiene consecuencias en la actividad del Clm. ....	97
4.1- Efecto de la expresión ectópica de CISD1 en la actividad NADH deshidrogenasa.....	97
4.2 - Efecto de la expresión de un mutante de CISD1 en la actividad NADH deshidrogenasa in gel. ....	100
DISCUSION .....	105
Expresión diferencial de genes. Regulación negativa del gen CISD1 en FQ.....	106
Confirmación de los resultados diferenciales. ....	108
Localización mitocondrial.....	112
Alteraciones mitocondriales producto de la expresión de CISD1:EGFP. .....	114
Actividad del Clm en FQ.....	116
Sobre las posibles funciones de CISD1.....	119
CONCLUSIONES .....	122
BIBLIOGRAFÍA .....	125



---

# **INTRODUCCIÓN**

### INTRODUCCIÓN

La Fibrosis Quística (también llamada FQ, Mucusviscidosis o Mucoviscidosis) es una enfermedad hereditaria que afecta principalmente a las glándulas exocrinas en los pulmones, páncreas, hígado e intestino, causando la degeneración y pérdida de función de éstos órganos en forma progresiva.

Los síntomas de la enfermedad aparecen a muy temprana edad y si no son detectados y tratados preventivamente, pueden llevar a una muerte temprana. En la actualidad, esta enfermedad es incurable y la expectativa de vida en el mejor de los casos es de unos 40 a 45 años con los tratamientos adecuados. Estos tratamientos van desde las nebulizaciones para disolver el mucus y uso de antibióticos para controlar las infecciones, hasta el transplante de pulmón en los casos mas avanzados de la enfermedad.

La población de origen europeo presenta la mayor incidencia con alrededor de 1 enfermo cada 2500 recién nacidos vivos. Sin embargo en Estados Unidos, la ORD (Office of Rare Diseases) del NIH (National Institute of Health) y el consorcio europeo Orphanet (<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin7index.php>) la definen como una enfermedad rara, ya que la incidencia no supera el límite por ellos propuesto de más de 200.000 personas afectadas en EEUU y 1 en 2.000 para los europeos. En EEUU la incidencia en la población general es de 1 en 108.800 ó 2.500 recién nacidos sobre un total de la población de 272 millones de habitantes. La mayor tasa en los EEUU la posee la población caucásica y es de 1 en 3.000 recién nacidos vivos [1]. Según la ELF (European Lung Foundation) [2] en la actualidad, la incidencia de la fibrosis quística en Europa depende de la región y del grupo étnico y va de 1 de cada 2.000 nacidos vivos en Irlanda hasta 7 de cada 1.000.000 en Eslovaquia. También menciona que el 34% de los enfermos son adultos y que esta proporción aumenta debido a las mejoras en los tratamientos que llevan a una mayor supervivencia. En la Argentina, en trabajos de pesquisa neonatal realizados a miles de recién nacidos, se obtuvo un valor de incidencia de la FQ de 1/6.573 neonatos[3, 4].

Según la UAIFQ (Unión Argentina de Instituciones de Fibrosis Quística) la fibrosis quística, al ser una enfermedad con baja incidencia y prevalencia, no

es tenida en cuenta en campañas masivas de difusión. Este hecho conlleva a que solo se diagnostique entre el 25 y el 30% de los afectados. A medida que se difunde la obligatoriedad de la pesquisa neonatal (Ley 24.438) el número de pacientes detectado aumenta progresivamente.

### 1- HISTORIA DE LA ENFERMEDAD

La aparición de la fibrosis quística ha sido estimada en hace aproximadamente 52.000 años [5]. En el norte de Europa, en la edad media, se decía de los niños que tenían la piel salada que estaban embrujados y que pronto morirían. “Pobre niño aquél que al besarle su frente sabe a sal; un embrujo pesa sobre él y no tardará en morir” sentencia un manuscrito alemán del siglo XV [6]. En 1606, en su obra “Diez privilegios para mugeres preñadas”, Juan Alonso y de los Ruyzes de Fontecha (1565 - 1613), profesor de Medicina de la Universidad de Alcalá, escribe: “...que conoce a la gente embrujada, si al rascarles en la frente, uno después nota un sabor salado en los dedos” [7].

En realidad, existen en la historia de la medicina varias referencias a casos que han presentado síntomas que hoy conocemos como asociados a la enfermedad. En 1595, en Leiden (Holanda), Pieter Paaw (1564 - 1617), profesor de medicina y uno de los padres de la anatomía, describe la causa de la muerte de una chica de 11 años que se suponía estaba embrujada; luego de la autopsia concluye que dicha causa fue una anomalía en el páncreas. En 1673, en Polonia, Georg Seger describe lo que podría ser la primera historia clínica de FQ. Se trataba de una niña de 3 años que presentó síntomas de fiebre, vómitos, diarrea dificultad para ganar peso e inanición prolongada; la autopsia reveló que el páncreas se hallaba cirroso y endurecido. En 1677, otra vez en Holanda, Gerardus Blasius informa de un niño muerto a los 9 años con el páncreas cirroso. Hacia el año 1838, Carl von Rokitansky, de Austria, observó una obstrucción intestinal (íleo meconial) en una autopsia de un feto. Ya en 1850 había varios reportes, desde distintos países europeos, de autopsias que mostraban características similares (Los datos históricos fueron recopilados a partir del trabajo publicado por el Dr. James Littlewood [8]).

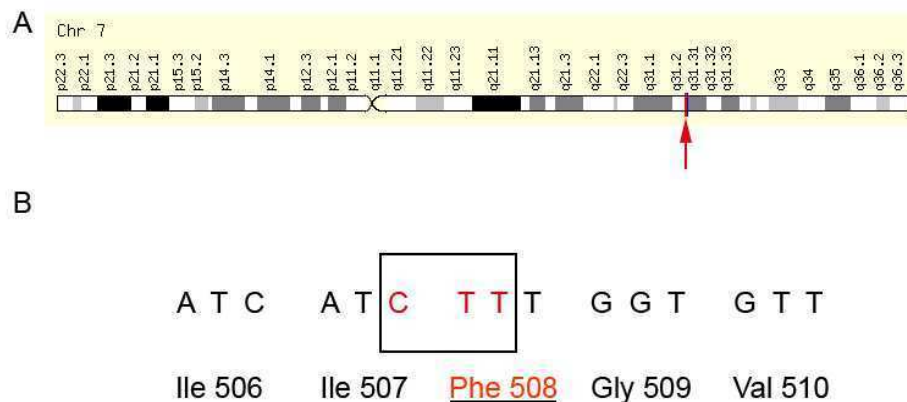
En los años 30' del siglo XX se publicaron varios casos de recién nacidos con síntomas de malnutrición, que por aquél entonces se asociaban a defectos en la absorción de nutrientes por daños en el páncreas y mal funcionamiento de los intestinos. Una muy interesante recopilación de éstos casos puede encontrarse en Internet, en la página sobre medicina y fibrosis quística <http://www.cfmedicine.com/history/thirties.htm>. Como una pequeña reseña histórica de ellos podemos citar a Fanconi y colaboradores, que en 1936 describieron dos casos de recién nacidos, cuyas autopsias revelaron daños en el páncreas y pulmones hasta tal punto que “era comprensible que fallaran”. Fanconi fue, junto con sus colaboradores, uno de los primeros que asociaron la fibrosis pancreática con la inflamación pulmonar crónica conocida como bronquiectasia [9].

En 1938, Dorothy Andersen, una eminente patóloga del Hospital de Bebés del Centro Médico Presbiterano de Columbia en Nueva York y nieta de Hans Christian Andersen, desarrolló la primera descripción completa de los síntomas de la fibrosis quística. Su trabajo se basó en la descripción de los síntomas de 49 pacientes de los cuales 20 eran de su hospital y el resto de otros colegas e instituciones (más de 600 chicos con FQ fueron derivados a ella en el hospital) [10].

En 1943, Faber llama a la enfermedad “mucoviscidosis” y describe que la mayoría de los órganos que contienen ductos, como los pulmones, páncreas, intestino, etc., se encuentran afectados por secreciones anormalmente espesas. Es el primero en afirmar que la fibrosis quística es una enfermedad que afecta al cuerpo en forma generalizada [11]. En 1949, Lowe y May establecieron que la Fibrosis Quística es un desorden genético recesivo [12, 13]. En 1953, di Sant` Agnese y colegas de la Universidad de Columbia en Nueva York, observaron que luego de una ola de calor los pacientes con fibrosis quística se deshidrataban más de lo normal. Estas observaciones los llevaron a comunicar a la Sociedad Americana de Pediatría que los pacientes FQ secretaban excesivas cantidades de sal en su transpiración [14]. Dicha observación permitió el desarrollo del test de sudor con el que, aún en la actualidad, se diagnostica en forma estándar la fibrosis quística [15].

Por los 80 se descubrió que la falla de los tejidos epiteliales ocurría en todos los órganos afectados por la FQ y que consistía en que la permeabilidad

al ion cloruro se veía seriamente disminuida [16-18]. También en 1983, Paul Quinton postula una hipótesis que explicaría el porqué del sudor salado, en un estudio basado en la medición de electrolitos en glándulas sudoríparas de pacientes y de voluntarios no FQ [19]. En 1985 el supuesto gen que provocaba la enfermedad fue mapeado en el cromosoma 7 por medio de las técnicas de ligamiento genético y clonado posicional, basada en el análisis de marcadores polimórficos distribuidos en el genoma [20-22] y en 1989 Tsui y Riordan del Hospital para Niños Enfermos en Toronto, junto con otros colaboradores, descubrieron el gen responsable de la FQ. Se encontraba en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31) y lo llamaron *CFTR* por las iniciales de su nombre en inglés “Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator” o en castellano, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística [23, 24]. Identificaron así la mutación  $\Delta F508$ , que es la más frecuente en la FQ [25] (Fig. 1).



**Figura 1. Ubicación del gen CFTR y la mutación más frecuente  $\Delta F508$ .** (A) esquema donde se indica con una flecha la ubicación del gen CFTR en el brazo largo cromosoma 7 humano. (B),  $\Delta F508$ , la mutación más frecuente del CFTR (subrayado), se debe a la deleción de la citosina ubicada en la tercera posición del codón 507 y las dos primeras timidinas del codón 508 (recuadro). El mapa del cromosoma 10 corresponde a una figura ligeramente modificada de su original [26]

Anderson demostró, en 1991, que el CFTR es un canal de cloruro y que precisa de la presencia de ATP citosólico para activarse [27, 28]. A partir de aquí y hasta la actualidad se han abierto innumerables líneas de investigación,

que van desde la obtención de ratones transgénicos y “Knock Out” hasta el estudio funcional del CFTR en cultivos celulares provenientes de epitelios de pacientes con FQ.

## 2- ASPECTOS CLÍNICOS DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

Se podría decir que la FQ es la enfermedad de los conductos, ya que la característica principal es que todas las secreciones del cuerpo se encuentran anormalmente espesas y provocan el taponamiento de los conductos de secreción, llevando a la muerte de los tejidos y a la pérdida de función en los distintos órganos. La fibrosis quística no sigue el mismo patrón en todos los pacientes, sino que afecta a diferentes personas de diferentes formas y en diversos grados. El problema básico, sin embargo, es el mismo: una anomalía en las glándulas que producen y secretan el sudor y el mucus, que ocurre como consecuencia de la falla en la función del CFTR. El daño pulmonar crónico y progresivo, causado por la acumulación de mucus espeso, junto con la insuficiencia pancreática, son los principales determinantes de la evolución, gravedad y mortalidad en la FQ. Otros órganos y todas las glándulas de secreción exocrina también se encuentran afectados en mayor o menor grado. Aproximadamente el 90 % de los pacientes con FQ presentan insuficiencia pancreática exocrina [29] y entre el 10 y el 20 % de los recién nacidos presentan íleo meconial, causado por un tapón espeso de mucus que obstruye el colon [30].

En la mayoría de los casos no existe una correlación significativa entre el tipo de mutación que afecta al *CFTR* (genotipo) y el grado de severidad de la enfermedad (fenotipo) [31, 32]. De modo que no es posible realizar una predicción de la evolución clínica del paciente según el genotipo y existe una enorme variabilidad en la magnitud de la enfermedad pulmonar dentro de genotipos similares [32]. Son innumerables los factores que pueden modificar las manifestaciones clínicas de la enfermedad; los más importantes son aquellos vinculados al daño pulmonar. Estos incluyen la diversidad de tratamientos clínicos, factores medioambientales, factores congénitos distintos a las mutaciones del *CFTR*, diferencias en el tratamiento clínico y la posibilidad

de contraer diversas infecciones (particularmente bacterianas y virales) [32]. Por otro lado, cabe destacar que los heterocigotas para FQ no presentan síntomas clínicos fácilmente reconocibles [33]. Esto indica que una sola copia del *CFTR* salvaje es suficiente para sostener el transporte normal de cloruro.

Como hemos visto, la primera falla que se detectaba en la antigüedad era la malnutrición o la avanzada desnutrición y las autopsias revelaban que el páncreas se hallaba “endurecido” por la fibrosis. En la actualidad, debido a los avances en la ciencia y en la medicina, la malnutrición dejó de ser la primera manifestación; el principal problema ahora es la afección pulmonar. La característica principal de dicha alteración es la obstrucción de las vías respiratorias por acumulación anormal de mucus. El defecto o ausencia de la proteína CFTR lleva a la producción de secreciones alteradas de iones y de mucus, que generan la obstrucción del tracto respiratorio además de los conductos pancreáticos, los conductos hepatobiliares, el lumen intestinal y los vasos deferentes [34]. El mucus se acumula por estar alterado el tráfico de iones y de agua en la membrana apical de los epitelios; esto lo hace más espeso, provocando además falla ciliar en el tracto respiratorio. Al poco tiempo, el mucus acumulado en los pulmones es rápidamente colonizado por bacterias oportunistas, las que desencadenan, junto con la propia respuesta inmune del paciente, el principal daño pulmonar [35].

### **2.1- Patología respiratoria**

Durante el curso de la enfermedad se desarrolla una obstrucción pulmonar crónica, que se caracteriza por una progresión lenta desde la bronquiectasia (dilatación patológica de los bronquios o bronquiolos por acumulación de secreciones) hasta la muerte por paro cardiorrespiratorio. La evolución del daño pulmonar es el factor que determina principalmente la expectativa de vida de los pacientes con FQ, ya que representa la causa de más del 90 % de los casos letales [36].

La actividad ciliar de las mucosas se halla alterada por la viscosidad anormal del mucus; esto hace que las vías respiratorias sean incapaces de eliminar eficientemente las bacterias [37]. Está aún en discusión si el aumento

de viscosidad del mucus se debe a una mayor acumulación de éste por la sobreproducción de mucinas [38], a una mayor deshidratación del mismo [39, 40], o a ambas causas.

Los pulmones de los recién nacidos con FQ presentan una apariencia histológica normal, pero antes del primer año de vida ya se observa la presencia de bacterias. Comienza con una infección oportunista con *Staphylococcus aureus* y/o *Haemophilus influenzae*, seguida de otra con *Pseudomonas aeruginosa* [41] la cual, al poco tiempo, reviste carácter crónico y es muy difícil de combatir, aún con el uso intensivo de antibióticos.

### 2.2- Infecciones e inflamación pulmonar

Los pacientes FQ sufren largas y repetidas infecciones. Una vez que los pulmones son infectados por *P. aeruginosa* rara vez la bacteria puede ser eliminada. El organismo intenta defenderse haciendo uso del sistema inmune pero provoca más daño que la propia infección. Se produce una importante respuesta inflamatoria con una masiva infiltración de neutrófilos. Los neutrófilos originan una especie de trampa de cromatina y proteína denominada NET por "Neutrophil Extracellular Trap", donde quedan confinadas las bacterias y se evita de esta manera su diseminación [42]. En el lugar de la infección se produce la liberación de varias enzimas proteolíticas junto con radicales libres. Estos afectan la acción protectora de los factores que inhiben las proteasas como la elastasa, dando lugar a la degradación de la elastina y otras proteínas estructurales, provocando con el tiempo un importante daño al tejido pulmonar [43]. Como consecuencia del daño en el tejido pulmonar se libera ADN y actina, lo que provoca un aumento de la viscosidad del mucus, dificultando aún más su expulsión y evitando de esta manera el lavado de los patógenos oportunistas [44].

Si bien existen varios microorganismos que pueden colonizar los pulmones, como los hongos *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* o micobacterias no tuberculosas, el principal patógeno es *Pseudomonas aeruginosa* [45]. Esta bacteria coloniza las vías respiratorias inferiores, primero intermitentemente y después de forma crónica, observándose con el transcurso



del tiempo un cambio en su morfotipo. Al principio las cepas que constituyen la infección tienen un morfotipo denominado “clásico” y luego, en etapas más tardías, este cambia a “mucoide”. La principal diferencia con el clásico es que las cepas mucoides generan y secretan grandes cantidades de un exopolisacarido denominado alginato. La capacidad de producir alginato es compartida por todas las cepas no mutantes de *P. aeruginosa*. El cambio en el morfotipo podría ocurrir por la presencia de factores en el microambiente del pulmón [46]. Está postulado que el alginato y otras secreciones permitirían a *P. aeruginosa* generar microcolonias, en una configuración que las hace más resistentes al ataque de los neutrófilos y los antibióticos [47].

Existen muchos factores que afectan la respuesta inmune y es difícil establecer un mecanismo general de la falla inmune para la fibrosis quística. Sin embargo, podemos enumerar algunas posibles causas, como una falla generalizada de los mecanismos de defensa innata [48] o de defensa adquirida [49-51], como resultado del transporte ineficiente de Cl<sup>-</sup>.

La infección con *Pseudomonas* estimula la respuesta inflamatoria desencadenando un círculo vicioso: las bacterias comienzan a producir poderosos quimioattractantes de neutrófilos como pilina (proteína constitutiva del Pili) o flagelina, provocando su reclutamiento en el pulmón. A su vez, los neutrófilos se activan a sí mismos y liberan más quimioattractantes, entre ellos leucotrieno B4 (LB4), lo que provoca una retroalimentación de la señal de reclutamiento. Las células epiteliales son activadas por la liberación de elastasa y secretan grandes cantidades de IL-8 [52-54]. Este reclutamiento masivo de neutrófilos no es efectivo para destruir las bacterias y causa un daño considerable al pulmón. Por otro lado, se encuentra disminuida la expresión de IL-10, una citoquina de características antiinflamatorias. También se ha encontrado aumentada la concentración de otras citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) en el fluido de lavados bronqueoalveolares de las vías aéreas de pacientes FQ [55].

### **2.3- Trastornos digestivos**

Como ya hemos visto, antes de que se descubrieran las anomalías en los contenidos de electrolitos en el sudor, el diagnóstico de la FQ se basaba en los síntomas de malabsorción nutricional, en la insuficiencia pancreática, en las lesiones pancreáticas observadas en las autopsias y, finalmente, en el 10 al 15 % de los recién nacidos con íleo meconial [56]. En pacientes adolescentes, el íleo meconial se denomina síndrome de obstrucción intestinal distal [57]. Es frecuente encontrar en pacientes FQ hiperplasia del tejido epitelial y obstrucción de las cavidades intestinales por alimentos mal digeridos y mucus. El 85 % de los pacientes FQ sufren de insuficiencia pancreática; la mayoría la desarrolla en el primer año de vida y entre un 5 – 10 % la desarrolla en los primeros 10 años de vida [58]. En pacientes FQ con insuficiencia pancreática, el páncreas presenta obstrucción en sus conductos secretores, así como también formación de quistes y necrosis de tejidos. Las autopsias de dichos pacientes revelan que este órgano se ve afectado por varias alteraciones que son características en FQ: los conductos secretores se encuentran totalmente obstruidos, el asinus atrofiado y hay reemplazo de las lesiones por tejido graso y fibrosis. A medida que aumenta la edad de los pacientes estas alteraciones son progresivas y conducen a una total disfunción pancreática. Aproximadamente solo el 15 % de los pacientes no se ve afectado por insuficiencia pancreática o la desarrolla a mayor edad [59]. Esta afección pancreática produce la liberación de tripsina en la sangre (hipertrisinemia) y este hecho se utiliza para medir el grado de avance de la enfermedad en el páncreas; se lo denomina determinación de tripsina inmunoreactiva.

Aunque es un poco menos frecuente, el hígado también se ve afectado por lesiones provocadas por un aumento de la viscosidad de las secreciones biliares y taponamiento de los conductos, llevando a una cirrosis denominada “cirrosis biliar”. Si bien se desconocen las causas de porqué algunos pacientes desarrollan esta afección y otros no, se cree que la cirrosis biliar está ligada a la insuficiencia pancreática. Sin embargo, han sido reportados algunos casos en los que pacientes sin insuficiencia pancreática presentaron cirrosis biliar [60].

## **2.4- Malnutrición y trastornos alimentarios en FQ**

La falla general del sistema digestivo y más puntualmente la deficiencia pancreática, conlleva a una situación de malnutrición desde los primeros años de vida. La deficiencia en enzimas pancreáticas ocasiona la incompleta digestión de proteínas y grasas provocando un déficit de vitaminas K, E, D y A [59] y [61], conjuntamente con un retraso del crecimiento y el desarrollo.

Los pacientes FQ tienen un déficit de ácidos grasos esenciales que modifica el patrón de ácidos grasos en sangre y tejidos. El déficit pancreático no se limita a la disminución o ausencia de enzimas digestivas. La degeneración progresiva de los islotes de células productoras de insulina provoca la denominada diabetes *mellitus* por falta de insulina, el consecuente aumento en la glucemia y un deficiente aprovechamiento de los nutrientes.

Otro aspecto a tener en cuenta es la pérdida de agua y electrolitos por sudoración. En FQ la sudoración se encuentra aumentada, produciéndose una mayor pérdida de oligoelementos y deshidratación, que obliga al paciente FQ a un seguimiento permanente de su estado nutricional.

## **2.5- Anomalías del sistema reproductor**

Hacia 1980, la edad promedio de muerte por fibrosis quística en se estimaba en alrededor de los 22 años [62]. Por el contrario, en los últimos años, la supervivencia de pacientes con fibrosis quística se ha mejorado notablemente, con una supervivencia que llega y puede superar la cuarta década [63]. Actualmente, con los adelantos que se han producido en el tratamiento de los síntomas de esta enfermedad, casi el 50% de los pacientes FQ se cuentan entre la población adulta. En consecuencia, ha resultado necesaria una evaluación cuidadosa de los efectos de la enfermedad en la fertilidad y la posibilidad de embarazo de pacientes FQ.

Las pacientes FQ no padecen anomalías en su tracto reproductivo. Sin embargo, algunas de ellas son infértiles como resultado de la ausencia de ovulación (anovulación) derivada del stress producido por la malnutrición y los problemas respiratorios. Se sabe que la edad de menarquía (o menarca) está

directamente relacionada con el estado de salud. Esto incluye la altura, el peso y un porcentaje de grasa corporal superior a 18%, así como a la salud en general [64, 65]. Una vez establecida la menarca, la mayoría de las niñas con FQ presentan ciclos menstruales normales o casi normales [66]. Sin embargo, en el momento de la fecundación los espermatozoides se encuentran impedidos de llegar al óvulo porque las secreciones mucosas del tracto cervical son más espesas debido a una disminución en el contenido de agua [67-69]. Luego, en un modelo de FQ murino, se determinó que los espermatozoides no podían seguir el proceso de capacitación por la disminución del contenido de bicarbonato de las secreciones del endometrio uterino, producto de la ausencia del canal CFTR [70]. Ello explica la imposibilidad de algunas mujeres de quedar embarazadas aún mediante el proceso de fertilización *in vitro* intrauterino.

En el caso específico de los varones con FQ, el 98 % presenta malformaciones en los conductos de Wolff [71]. La infertilidad se debe a la ausencia de espermatozoides (azoospermia) provocada por la atrofia de los conductos deferentes o del epidídimo y vesículas seminales dilatadas o ausentes. Algunas mutaciones en el gen *CFTR* están ligadas a la infertilidad en FQ [72], aunque no todas las mutaciones del gen *CFTR* que están ligadas a la infertilidad lo están también a la FQ [73, 74]. Las mutaciones o variantes alélicas en el intrón 8 serían las causantes de la infertilidad [75].

### 3- DIAGNÓSTICO DE LA FQ

La edad en la que se desarrollan los estadios avanzados de la enfermedad y la sobrevida varía mucho de una región a otra del mundo. Esta variabilidad se debe a que en los países desarrollados existen políticas de salud en las que se incluyen el diagnóstico precoz y la disponibilidad de tratamientos adecuados, llevando la sobrevida por encima de la cuarta década de vida. En los países subdesarrollados, en cambio, la sobrevida de los pacientes difícilmente supera los 12 años [76].

Según la UAIFQ (Unión Argentina de Instituciones de Fibrosis Quística), en nuestro país solo se diagnostica entre el 25 y el 30% de los afectados. Con el fin de mejorar esta situación, en diciembre de 1994 se sancionó la Ley 24.438, que modifica a los artículos 1º y 2º de la ley 23.413 y hace obligatorios los test neonatales para fenilcetonuria, hipotiroidismo congénito y fibrosis quística

### **3.1- Ley 24.438:**

(Sanción: 21/12/1994; Promulgación: 12/01/1995; Boletín Oficial 16/01/1995 )

. ARTICULO 1º - Modifícanse los arts. 1º y 2º de la ley 23.413 los que quedarán redactados de la siguiente forma:

Art. 1º -- La realización de una prueba de rastreo para la detección precoz de la fenilcetonuria, el hipotiroidismo congénito y la fibrosis quística o mucoviscidosis será obligatoria en todas las maternidades y establecimientos asistenciales que tengan a su cuidado a niños recién nacidos.

Art. 2º -- La prueba se realizará en todos los recién nacidos nunca antes de las 24 horas de haberse iniciado la alimentación láctea. Para la fibrosis quística o mucoviscidosis la prueba se realizará en todos los recién nacidos dentro de los cuatro primeros días de vida.

El método más utilizado para el diagnóstico de la FQ es la prueba del sudor y consiste en cuantificar por iontoforesis la cantidad de electrolitos que se encuentran presentes en el sudor. Para ello se frota en una pequeña superficie de la piel de la pierna o el brazo del paciente, un compuesto denominado policarpina. Seguidamente se colocan unos electrodos y se hace pasar una pequeña corriente eléctrica para permitir la penetración de la droga (iontoforesis). La policarpina induce la sudoración y el sudor es recolectado durante 30 min. en una gasa o papel de filtro, para luego analizar los niveles de NaCl. Los niveles elevados de NaCl en sudor es señal de FQ.

Como los niños recién nacidos no producen cantidades significativas de sudor, se recurre al "test" inmunoreactivo para tripsinógeno, que analiza la presencia de tripsinógeno en sangre. La desventaja del ensayo de tripsinógeno es la frecuente presencia de falsos positivos, lo que hace

necesaria su confirmación mediante el “test” de sudor y posterior análisis molecular.

### **3.2- Diagnóstico molecular.**

En los casos en los que se tiene sospecha clínica de la enfermedad o en los casos en que los análisis mencionados han dado positivos, se recurre al diagnóstico mediante ensayos basados en técnicas de biología molecular, con el fin de caracterizar el genotipo. El diagnóstico molecular es extensible a los miembros de la familia que puedan requerir diagnóstico prenatal y detección de portadores. Se encuentra incluido en algunos programas de detección precoz cuando se determina hipertripsinemia, como es el caso del “South Australian Neonatal Screening Programme” de Adelaida [77].

La estrategia para realizar un diagnóstico molecular se planifica en función del patrón de distribución alélica de cada población. Por lo general, se comienza el “screening” de las mutaciones por aquellas más frecuentes. En el caso de que no puedan detectarse es necesario realizar un análisis del gen CFTR mediante técnicas que permitan detectar cualquier cambio existente en la secuencia del DNA de la muestra. Las técnicas más comúnmente utilizadas en el análisis del gen CFTR son la electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE) [78] y el análisis de la conformación de cadena sencilla (SCCA) [79]. Ambas técnicas tienen una sensibilidad para la detección de fragmentos anómalos que es mayor al 98 %. Seguidamente se realiza la secuenciación del fragmento de ADN para poder caracterizar la anomalía hallada con alguna de las técnicas anteriores.

Cuando el análisis directo de mutaciones no es factible o resulta no concluyente, los marcadores polimórficos dentro o próximos al gen pueden aportar la información necesaria para el análisis de ligamiento. Los más útiles en la construcción del haplotipo son los microsatélites IVS8CA, IVS17bTA y IVS17bCA [80-82]. En las poblaciones con una alta heterogeneidad, el haplotipo con marcadores puede facilitar la identificación de la mutación.

El diagnóstico molecular es aplicable también en los casos de enfermedades asociadas a mutaciones en el gen CFTR. Este grupo incluye la

infertilidad por agenesia de conductos deferentes [83], las enfermedades respiratorias relacionadas con la FQ (aspergilosis broncopulmonar alérgica, bronquiectasias) [84, 85] y la pancreatitis crónica de etiología desconocida [86, 87].

### **3.3- Detección de portadores**

Los familiares de pacientes FQ o que han tenido algún enfermo de FQ en su historia familiar son la población de mayor riesgo y a las que les es aconsejada la “detección de portadores”. La capacidad diagnóstica en la detección de portadores depende de la información genética disponible. Por consiguiente, siempre que sea factible, el paso previo es la caracterización molecular del paciente. Si no fuese posible hacerla, se recomienda al igual que en el análisis molecular, el análisis de las mutaciones más frecuentes correspondientes a la población del posible portador. El resultado negativo conduce a una estimación de las probabilidades de riesgo de tener hijos FQ y no descarta el estatus de portador [88].

## **4- TERAPIAS EXISTENTES PARA FQ**

Como hemos visto, en la actualidad la FQ es incurable. Los tratamientos empleados tienen como objetivo aliviar los síntomas con el fin de mejorar la calidad de vida del paciente y frenar todo lo posible el progreso de la enfermedad. Los tratamientos están enfocados en reducir el daño en las vías respiratorias, debido a que en FQ la principal causa de mortalidad se debe a la enfermedad pulmonar. Las terapias son planificadas en función de las necesidades de cada paciente y combinan el uso de antibióticos y antiinflamatorios, en conjunto con diferentes tratamientos que eliminen el mucus espeso de los pulmones [89, 90].

### **4.1- Despeje de las vías respiratorias (“Airway clearance”)**

Una vez establecida la infección e inflamación en las vías aéreas, las células inflamatorias muertas liberan altas cantidades de material nuclear. El ADN provoca que las secreciones del epitelio de las vías aéreas se vuelvan mucho más viscosas y sean más difíciles de eliminar. A esto se le agrega un menor contenido de agua en la capa de líquido luminal y el posible aumento en la secreción de mucinas. En consecuencia, se reduce el movimiento ciliar y la expectoración y la renovación de mucus de las vías aéreas, lo que genera un microambiente ideal para que el ciclo de infección e inflamación continúe y se produzca el daño pulmonar [91].

La finalidad de las técnicas de despeje de las vías respiratorias es remover las secreciones aéreas viscosas, que contienen altas concentraciones de bacterias, elastasas, citoquinas y otros productos de origen bacteriano. Entre las terapias para llevar a cabo este despeje de las vías respiratorias, se encuentran la fisioterapia de pecho tradicional, el ejercicio físico, el uso de aparatos mecánicos y técnicas de respiración y tos específicas [92]. Cuanto antes sea aplicada esta terapia más efectiva será en lo que respecta a evitar las infecciones crónicas y el daño pulmonar, debido a que las infecciones y la aparición de factores proinflamatorios comienza en una etapa muy temprana [93, 94].

### **4.2- Terapia con antibióticos**

La finalidad del uso racional de antibióticos en FQ es reducir la infección bacteriana crónica, que induce la inflamación, la obstrucción de las vías aéreas y la bronquiectasia [95].

Los antibióticos se prescriben siempre que exista sospecha de neumonía o se constate deterioro en la función pulmonar. Habitualmente, se los escoge en función del historial de infecciones que afectaron al paciente. Muchas de las bacterias comunes en la fibrosis quística son resistentes a diferentes antibióticos y requieren semanas de tratamiento intravenoso con



vancromicina, tobramicina, meropenem, ciprofloxacina y piperacilina, entre otros antibióticos [96].

La terapia prolongada a menudo requiere hospitalización y canalización de una vía intravenosa permanente, como por ejemplo un catéter central insertado percutáneamente (PICC). Asimismo, es frecuente la indicación simultánea de antibióticos administrados por inhalación, como la tobramicina, la colistina y la gentamicina, por varios meses, con el objeto de mejorar la función pulmonar, impidiendo la proliferación bacteriana. Varios estudios han demostrado que la utilización de dichos antibióticos, administrada en forma de nebulización, reduce la concentración de *P. aeruginosa* en el líquido recuperado de los lavajes bronqueo-alveolares (BAL), sin los efectos secundarios que se observan a las altas dosis que se utilizan cuando los antibióticos se administran por la vía sistémica [97, 98]. Algunos antibióticos orales, como la ciprofloxacina o la azitromicina, se utilizan a veces para ayudar a prevenir la infección o para controlarla una vez que está en curso [99]. En algunos casos pasan años entre sucesivas hospitalizaciones, mientras que en otros se requiere la internación cada año para poder realizar un tratamiento efectivo.

La infección con *P. aeruginosa* no puede ser completamente erradicada a pesar de una terapia agresiva con antibióticos, pero sí puede ser reducida. En conjunto con otras terapias, como el despeje de las vías respiratorias, se logra una mejora en los síntomas y en la función pulmonar [100].

Los antibióticos pueden ser administrados en forma intravenosa, oral o aerosolizados, lo que depende de la situación clínica de cada paciente en particular. Para realizar una terapia exitosa con antibióticos administrados por vía intravenosa, es fundamental usar la combinación y la dosis apropiada de drogas durante un tiempo adecuado. También es muy importante identificar las bacterias presentes en el esputo del paciente o realizar un antibiograma para guiar la elección de los antibióticos. En los casos de infecciones severas se puede utilizar la terapia intravenosa y en los casos menos severos se puede utilizar una administración por vía oral. Los antibióticos de amplio espectro pueden proveer beneficios clínicos aún cuando no sean activos contra las especies de *Pseudomonas*, ya que son efectivos contra otras bacterias presentes en el tracto respiratorio inferior [101]. El uso de antibióticos

administrados por inhalación presenta la ventaja de aportar una mayor concentración de la droga en las vías aéreas [102, 103], sin las complicaciones que conlleva una alta concentración intravenosa. En tratamientos prolongados, varios de los antibióticos más comunes (como la tobramicina y la vancomicina) pueden causar pérdida de audición por ototoxicidad o problemas en los riñones. Con el objeto de prevenir tales efectos secundarios, es habitual hacer un seguimiento cuantitativo de las concentraciones de estos medicamentos en sangre y, de ser necesario, ajustar la dosificación.

### **4.3- Tratamiento con DNasa**

La presencia de altas cantidades de ADN liberado por las células dañadas provoca el aumento de la viscosidad de las secreciones. Por este motivo se utiliza el tratamiento enzimático con desoxirribonucleasa recombinante humana (DNasa rh), que provoca la ruptura de las cadenas de ADN y una consecuente disminución de la viscosidad del mucus. Este tratamiento conjuntamente con un tratamiento de despeje de las vías respiratorias favorece la expulsión del mucus. La DNasa rh ha sido probada en análisis clínicos y aprobada por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) [104]. Varios trabajos realizados *in vitro*, juntamente con ensayos clínicos, han demostrado una reducción de la viscosidad de las secreciones de las vías aéreas de pacientes FQ al tratarlos con DNasa rh [105-107] y es en la actualidad un tratamiento frecuente. Sin embargo, se produce también liberación de la elastasa secuestrada por el ADN, que provoca daño celular [108]. Es un delicado equilibrio y se está estudiando la posibilidad de usar inhibidores de elastasa [109].

### **4.4- Terapia antiinflamatoria**

Una de las causas por las que se genera el daño pulmonar es por la permanente actividad proinflamatoria generada por las citoquinas expresadas frente a la invasión bacteriana. Por este motivo el tratamiento de la inflamación

es fundamental para el manejo de la enfermedad pulmonar en FQ. Anteriormente se hacía uso sistémico de corticosteroides para este propósito, aunque en la actualidad este tipo de antiinflamatorios está limitado por la alta incidencia de efectos colaterales [110]. Los corticosteroides han sido reemplazados por otros antiinflamatorios no-esteroides, como el ibuprofeno, que actualmente es el más utilizado en FQ por su capacidad de inhibir la migración de los neutrófilos [111], aunque también posee algunos efectos secundarios.

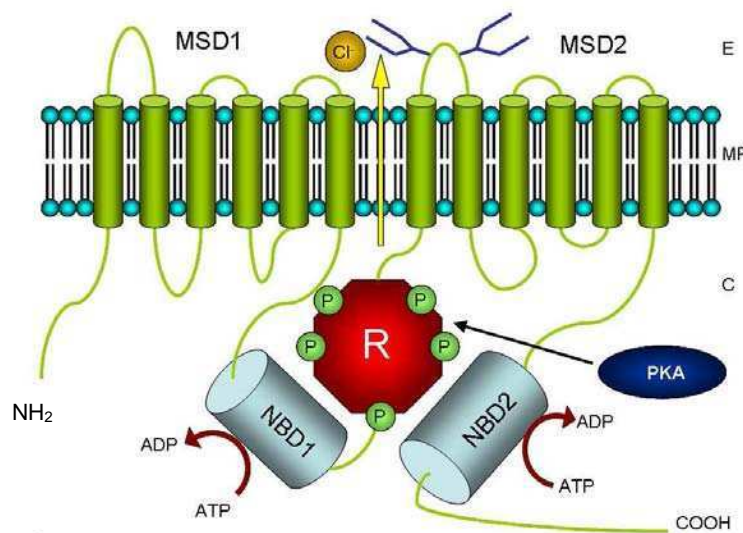
### 5- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL CFTR

El gen *CFTR*, localizado en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31), abarca una región de 250 kilobases y está organizado en 27 exones. El ARN mensajero, luego de procesado, tiene una longitud de 6.5 kb [24]; es traducido en la proteína CFTR de 1480 aminoácidos, que posee un peso molecular de 168 KDa [23]. Si bien la región promotora del CFTR fue propuesta en 1991 por Chou y colaboradores entre las bases -228 y +48 [112], todavía hoy se está estudiando qué factores estimulan o inhiben la transcripción del gen.

El CFTR es una glicoproteína integral de membrana que funciona como canal de transporte de iones cloruro, bicarbonato y glutatión, a través de la membrana apical de las células epiteliales [113-116]. El CFTR es responsable de la homeostasis de las sales disueltas en el agua de la superficie celular en los epitelios de las vías respiratorias, ductos del páncreas, glándulas salivares, glándulas sudoríparas, pulmón y tractos gastrointestinal y genitourinario [117]. La apertura y cierre del CFTR requiere de la unión de ATP a los dominios de unión a nucleótidos NBD1 y NBD2 [113, 118-120], pero la actividad de transporte de Cl<sup>-</sup> del CFTR está regulada fundamentalmente por AMP cíclico (AMPc) [27, 28]. Esta última característica es la que lo diferencia del resto de los canales de Cl<sup>-</sup>.

El AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA), la cual fosforila el dominio regulador (R), induciendo la apertura del canal [121]. Debido a su estructura, esta proteína se clasifica dentro de la superfamilia de los transportadores ABC (por ATP Binding Cassette) [122]. Los transportadores ABC pertenecen a una

de las más grandes y antiguas familias de proteínas ampliamente distribuidas en todos los seres vivos [123]. Varios miembros de esta superfamilia transportan en forma activa distintos tipos de sustancias a través de la membrana plasmática, utilizando la energía de la hidrólisis de ATP. Todas estas proteínas tienen al menos un dominio de unión de nucleótido o NBD (por “Nucleotide Binding Domain” en inglés) [124]. Entre los transportadores ABC se encuentran las proteínas mediadoras de la multiresistencia a fármacos antineoplásicos, la glicoproteína-P y diferentes transportadores de membrana de bacterias y levaduras [121].



**Figura 2: Esquema del CFTR.** MSD (“Membrane-spanning Domain”), dominios transmembrana; R, dominio regulatorio; NBD (“Nucleotide Binding Domain”), dominios de unión a nucleótidos; MP, membrana plasmática; C, citoplasma.[125].

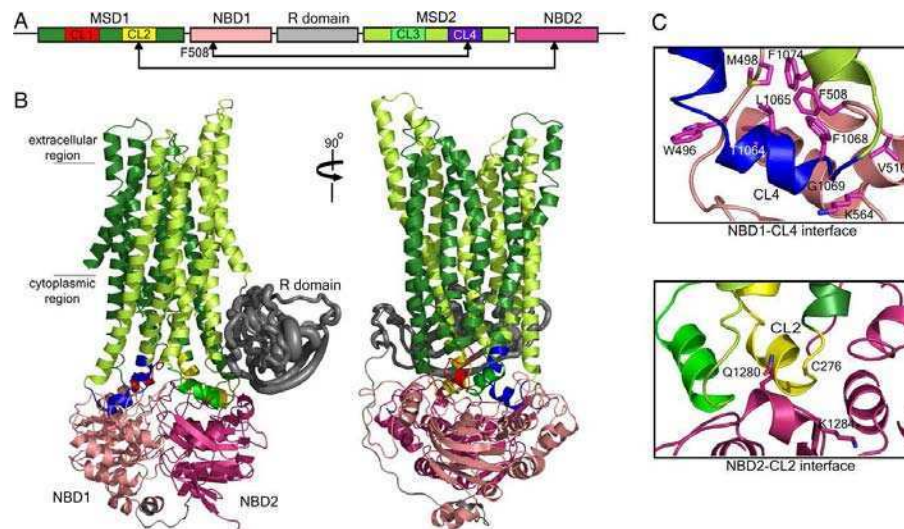
En la Figura 2 se muestra un modelo del canal CFTR, derivado principalmente de la estructura primaria y por comparación con otros transportadores de la familia. Se destacan 12 hélices que atraviesan la membrana celular en dos grupos de 6. A cada grupo se lo denomina MSD 1 y MSD 2 (Membrane Spanning Domain), e intervendrían en la formación del poro del canal. Como ya se mencionó, también presenta dos dominios de unión a nucleótidos (NBD, “Nucleotide Binding Domain”), NBD1 y NBD2, que hidrolizan ATP para activar el flujo de Cl<sup>-</sup> hacia la matriz extracelular y un dominio regulatorio citoplasmático (R), el cuál es fosforilado por las quinasas PKA [124]

y PKC [126]. La fosforilación del dominio R sería una condición necesaria para que se produzca la apertura del canal CFTR [124, 127].

El CFTR es el único miembro de la familia de los transportadores ABC que presenta un dominio regulatorio. La mayoría de los transportadores ABC se componen de cuatro dominios (dos dominios transmembrana y dos dominios de unión a nucleótidos). Además, el CFTR posee dos sitios de N-glicosilación (en Asn), en el cuarto rulo extra-citoplasmático [128]. Aunque algunos estudios realizados con mutantes sugieren que las glicosilaciones no son necesarias para la actividad normal del canal ni para su correcto plegamiento, hay otros estudios que indican alteraciones en la actividad del canal cuando la proteína no está glicosilada [128].

Debido a las características estructurales del CFTR, ha sido imposible hasta ahora determinar la estructura de la molécula completa, utilizando cristalografía de rayos X. Sin embargo, algunos autores han propuesto algunos modelos valiéndose de comparaciones por homología a otros transportadores ABC con estructuras primarias similares. En la figura 3 podemos observar un modelo teórico construido a partir de la homología del CFTR con el exportador Sav1866 [129]. En él pueden apreciarse los dominios transmembrana organizados en dos grupos de 6  $\alpha$ -hélices, conformando el poro, y el dominio R, interactuando con los NBDs. Se ha propuesto que la fenilalanina 508 en el NBD 1 interactúa con el 4° "loop" citoplasmático y que esta interacción sería la responsable de la comunicación del NBD 1 con el MSD 2 [129].

Si bien no se ha podido establecer la estructura de la molécula completa del CFTR por cristalografía de rayos-X, recientemente si se ha podido obtener cristales de los dominios de algunas partes de ésta, como es el caso de los dominios NBD [130]. En dicho trabajo se comprobó que los dominios NBD formaban un dímero estable en forma antiparalela y que lo mismo ocurría con dominios que fueron expresados con la mutación  $\Delta F508$ .



**Figura 3. Modelo teórico de la estructura del CFTR.** (A) Esquema de la estructura primaria del CFTR que contiene dos dominios de unión de nucleótidos NBD1 y NBD2 (“Nucleotide Binding Domains” en inglés o dominios de unión de nucleótido), dos dominios transmembrana MSD1 y MSD2 (“Membrane Spanning Domains”), y una región reguladora llamada dominio R. Cada MSD contiene dos bucles citoplasmáticos (CL) que interactúa con los NBDs. (B) Modelo por Homología de CFTR construido a partir del exportador Sav1866 (16), los dominios son del mismo color que en el esquema. (C) Vista cercana de las interfaces formado entre NBD1/CL4 y NBD2/CL2 [129, 131].

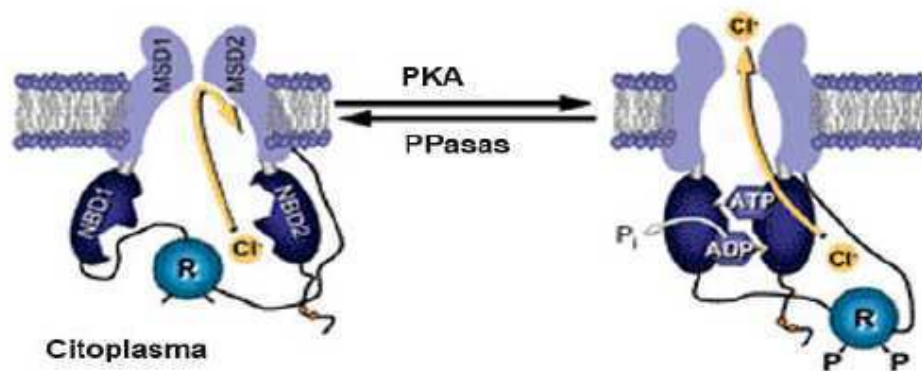
## 6- REGULACIÓN GENERAL E INTERACCIONES DEL CFTR

La actividad de transporte de  $\text{Cl}^-$  a través del CFTR depende de dos sucesos. Uno de los sucesos es la fosforilación de 4 residuos serina situados en el dominio regulatorio (R) de la proteína, mediante la acción de la PKA [124] y de la PKC [126]. El otro consiste en un cambio conformacional provocado por la hidrólisis de ATP [121].

Existen numerosos trabajos que nos revelan los sucesos que se deben dar para la apertura o cierre del canal, léase modulación de la actividad del transporte de  $\text{Cl}^-$ . Sin embargo, ninguno hasta la fecha ha logrado dilucidar el mecanismo por el cual se abre o libera el poro que permite el pasaje de los iones  $\text{Cl}^-$  desde el citoplasma hacia la matriz extracelular. La Figura 4 muestra un posible modelo de la regulación del CFTR. La fosforilación por PKA de los residuos serina del dominio R induciría un cambio conformacional, dejando el poro despejado. Seguidamente, la unión e hidrólisis de ATP en el dominio

NBD1 induciría la apertura del canal y éste permanecería abierto hasta que NBD2 una e hidrolize otra molécula de ATP. Una vez ocurrido esto, el dominio R quedaría expuesto a la acción de fosfatasa que inactivarían el canal por defosforilación. Así, el canal volvería al estado de quiescencia (cerrado) [132]. Estas características supondrían que la apertura del canal CFTR estaría finamente controlada por el balance de las actividades quinasa y fosfatasa dentro de la célula, además de los niveles de ATP.

La activación del CFTR por PKC es mucho menor que la activación provocada por la PKA, aunque la PKC incrementa significativamente la sensibilidad de respuesta a la PKA [126].



**Figura 4: Modelo de regulación de la apertura del canal CFTR.** La fosforilación de R por PKA abre el paso a los iones cloruro y la hidrólisis de ATP en el dominio NBD1 permite la apertura del canal. La acción de las fosfatasa permite que el canal vuelva a cerrarse. PKA, proteína quinasa dependiente de AMPc; PPasas, fosfatasa; ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; P<sub>i</sub>, fosfato inorgánico; P, fosforilaciones del dominio regulatorio. Imagen obtenida de [133].

La actividad del CFTR puede ser modulada por interacciones entre el motivo C-terminal de unión a dominios PDZ (motivos de unión proteína-proteína)[134] y proteínas de la familia NHERF [135, 136]

La quinasa PKC fosforila el residuo 162 del dominio PDZ2 de la proteína NHERF (factor regulador del intercambio sodio-protones) y esta fosforilación modula la interacción de NHERF-1/EBP50 con el dominio de unión a PDZ del CFTR ubicado en el extremo C-terminal [137].

Por otra parte, en trabajos efectuados mediante “patch clamp”, midiendo los patrones de corriente de  $Cl^-$  conducida a través de la membrana plasmática, se observó que la actividad tirosina quinasa de SRC/p60c-Src es capaz de producir la apertura del CFTR [138]. Por otro lado, la ausencia de CFTR en FQ, o su inhibición en células normales, produce un aumento en la actividad de c-Src que podría modular la expresión de MUC1 y constituir así c-Src un puente entre la falla del CFTR y la sobreexpresión de mucinas en FQ [38].

En la Figura 5 se muestra un esquema de algunas de las interacciones y complejos más representativos. La cantidad de interacciones y complejos que formarían parte del normal funcionamiento y regulación del CFTR es enorme y cada vez son más los trabajos que vinculan al CFTR con distintos procesos celulares a través de interacciones con diversas proteínas. Uno de estos trabajos reportó que el extremo N-terminal del CFTR interacciona con sintaxina 1A, un componente de membrana que forma parte de la maquinaria de tráfico celular. La sintaxina 1A inhibe al canal por interacciones físicas directas en la cola citoplasmática del extremo N-terminal del CFTR. La presencia de Munc-18, la delección de la porción amino terminal del CFTR o la sobreexpresión de esta porción anulan el efecto de la sintaxina 1A [139]. Así, en células epiteliales, la actividad del CFTR se encuentra acoplada a la regulación del tráfico proteico intracelular y dicha interacción modularía también los eventos de fusión de membrana, afectando el número de moléculas de CFTR que llegan a la zona apical de la membrana plasmática [140, 141].

La adenosina es un mediador que activa el canal CFTR vía AMPc/PKA. La activación del receptor de adenosina (A2B) estimula a la adenilato ciclasa por intermedio de la proteína  $G\alpha$ , llevando a un aumento en la concentración altamente compartimentalizada de AMPc y la subsecuente activación de PKA [142, 143]. La fosforilación del CFTR por la subunidad catalítica de la proteína quinasa A (PKA-cat) está mediada por PRKAR2A, enzima ligada física y funcionalmente al CFTR por VIL2/ezrin. Esta última, VIL2/ezrin, sirve como proteína de anclaje de la PKA-cat y promueve su interacción con el CFTR [144]. La interacción de VIL2/ezrin esta mediada por el factor regulador 2 de intercambio  $Na^+/H^+$  (NHERF-2), también denominado proteína activadora de quinasa de tirosina 1. Como ya se mencionó, el extremo C-terminal del CFTR posee una secuencia consenso T-K/R-L, conservada desde *Xenopus* hasta



humanos [135], que constituye un motivo de unión a proteínas con dominios PDZ. Estas proteínas con dominios PDZ presentan generalmente varios dominios PDZ y promueven interacciones homotípicas o heterotípicas entre proteínas. Estas interacciones podrían facilitar la formación de agregados de canales iónicos en microdominios sobre la superficie celular (“clustering”) y de esta forma promover el ensamblado de complejos de señalización en la membrana plasmática [134]. La familia de las proteínas NHERF, entre ellas el factor 1 regulador de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHERF-1/EBP50/SLC9A3R1), NHERF-2/ESKARP/SLC9A3R2 y la proteína en riñón portadora de dominios PDZ 1 (PDZK-1, también llamada CAP70 o NHERF3), contienen al menos dos dominios de unión PDZ. La formación del complejo VIL2(ezrin):E3KARP/(NHERF2):CFTR mejora la eficiencia de la activación del CFTR vía AMPc [144]. E3KARP/NHERF2 funciona como un andamio y PDZK1 es capaz de unir las moléculas de CFTR para formar dímeros. En esta forma dimerica, la actividad del CFTR se ve aumentada [145].

La inhibición de la formación del complejo PDZK1/CFTR interrumpe el acoplamiento funcional entre el CFTR y la actividad del transportador de AMPc [133, 135]. NHERF1/EBP50, la cual forma complejo con el CFTR, puede estimular la expresión de CFTR en la membrana apical en forma receptor - dependiente, principalmente con el receptor  $\beta$ -2 adrenérgico (beta(2)AR). El CFTR estaría formando un complejo de señalización con este receptor a través de NHERF1/EBP50 [146].

Por otra parte, la fosforilación de CFTR mediada por la PKA-cat inhibe eficientemente la formación del complejo macromolecular constituido por el receptor  $\beta$ -2 adrenérgico/EBP50/CFTR [146]. Las consecuencias funcionales de la interrupción de este complejo no han sido dilucidadas.

Se especula que las interacciones mediadas por PDZ facilitan la intercomunicación (“cross-talk”) entre CFTR y otros transportadores de iones con mecanismos de regulación paralelos. En efecto, además de funcionar como canal de cloruro, el CFTR modula canales de  $\text{Na}^+$  epiteliales [147, 148], canales ORCC (“Outwardly Rectifying Cl Channels”) [149, 150], canales de  $\text{K}^+$  apicales [151], canales de agua aquaporina 3 en epitelio de vías respiratorias [152], intercambiadores de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  [153] y mecanismos de liberación de ATP [154-156].

Asimismo, el complejo formado por la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 3 (calcineurina A), la anexina A2 (anexina II) y la proteína S100 de unión a calcio A10 (S100A10) participa en la activación del CFTR dependiente de PKA [157] y se ha demostrado que la anexina A5 (anexina V) también es necesaria para la actividad normal del canal de cloruro CFTR, pero el mecanismo exacto por el que actúa es desconocido [158].

Curiosamente, la activación de la PKA por adenosina también puede aumentar la actividad de la fosfodiesterasa 4D (PDE4D), que conduce a la atenuación de la señal generada por AMPc. El subproducto de la degradación de AMPc, adenosina monofosfato (AMP), puede activar la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) [159]. La AMPK también puede fosforilar al CFTR, pero a diferencia de la PKA, esta tiene un efecto negativo en la actividad del canal CFTR [160-162]. El mecanismo por el cual esto ocurre aún no está enteramente dilucidado; lo más probable es que se inicie con la activación de PDE4D por PKA-CAT seguida de la conversión de AMPc a AMP [159]. El AMP se une y activa a la subunidad  $\gamma 1$  regulatoria de AMPK, que se encuentra predominante y funcionalmente asociada con CFTR [160]. Esto inicia a su vez, la formación de un complejo constituido por las subunidades regulatorias  $\beta$  y  $\gamma$  y por la subunidad catalítica  $\alpha 1$  de AMPK. A su vez, la subunidad  $\alpha 1$  se une al CFTR. Esta interacción sería esencial para la fosforilación de CFTR mediada por AMPK, provocando la reducción de la secreción de  $\text{Cl}^-$  por la inhibición de la actividad, sin afectar el número de canales de CFTR en la membrana plasmática [160-162].

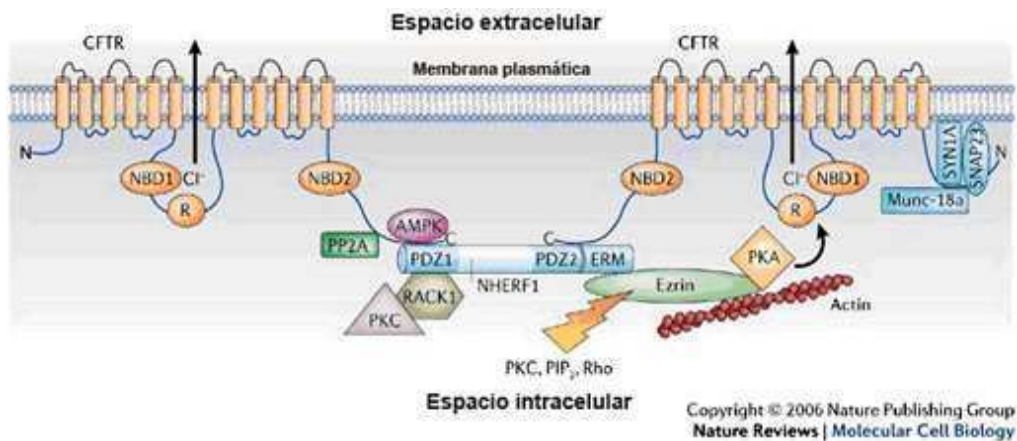
Además, las enterotoxinas liberadas por el *Vibrio cholerae* (la toxina del cólera) y *Escherichia coli* (enterotoxina termoestable) activan a la cAMP/PKA y cGMP/proteína quinasa G 2 y activan al CFTR en la membrana plasmática apical [163].

La expresión del CFTR en la membrana apical también está regulada por el complejo formado por tubulina:NHERF-1/(EBP50):RACK1 (proteína de andamiaje similar al polipéptido  $\beta 2$  de la proteína G):PKC- $\epsilon$ . La PKC- $\epsilon$  fosforila al CFTR y así estabiliza la expresión del canal en la membrana plasmática apical de las células epiteliales [164, 165]. Al parecer, la fosforilación constitutiva por PKC - $\epsilon$  es esencial para la activación aguda de CFTR por PKA-

cat, ya que la fosforilación por la PKA-cat por sí sola no es un estímulo suficiente para abrir el canal [126].

El gen 2 con dominio SH3/ankyrin (SHANK2) inhibe la actividad del CFTR al interferir en la interacción CFTR-EBP50 y al reclutar a PDE4D, la cual tiene una acción contraria a la activación por AMPc/PKA [166].

La actividad del canal CFTR también es afectada por la desfosforilación. Por ejemplo, la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y las proteínas fosfatasa que contienen el dominio 2C (PP2C) inhiben la actividad del CFTR [167-169]



**Figura 5: Interacciones del CFTR:** Se muestran algunas proteínas que interactúan directa o indirectamente con el CFTR, **proteínas cuya interacción inhibe la actividad del canal y reducen la secreción de Cl<sup>-</sup>:** proteína fosfatasa-2A (PP2A), AMP quinasa (AMPK), sintaxina 1A (SYN1A), la proteína asociada a sinaptosoma de 23 KDa (SNAP23) y Munc-18<sup>a</sup>. **Proteínas que interaccionan con el CFTR potencian su actividad:** la isoforma 1 (o 2) del factor regulador del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHERF1/2), el receptor de quinasa-1-C (RACK1), proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa A (PKA) y la proteína Ezrin. **NBD**, “Nucleotide Binding Domain” (Dominio de Unión a Nucleótido); **PIP<sub>2</sub>**, fosfatidilinositol bifosfato; **R**, dominio regulador. La figura fue levemente modificada de su original [118].

Además de la regulación positiva del CFTR mediada por la formación de complejos con las proteínas de andamiaje con dominios PDZ, otras proteínas forman complejos con el CFTR. Es el caso, por ejemplo, del complejo conformado por SNAP-23 (proteína asociada a sinaptosoma de 23 Kd) y Syntaxina 1a, que se asocia con el CFTR y reduce su actividad. A su vez, esta acción puede ser alterada por la unión de la proteína de unión a Sintaxina 1A (MUNC18) [170, 171].

La activación del receptor 4 de diferenciación endotelial acoplado a proteína G (EDG4) por ácido lisofosfatídico, rápidamente inhibe la activación del CFTR mediada por PKA-cat, a través de la familia de proteínas G $\alpha$ i [172].

La acción del EDG4/LPA2 (lysophosphatidic acid 2 (LPA2) receptor) es más típica del intestino, pero los complejos macromoleculares EDG4/LPA2::NHERF2/E3KARP::CFTR pueden formarse en células tan diferentes como HT29-CL19A (derivadas de cáncer de colon) y Calu-3 (derivadas de células epiteliales de glándula serosa de las vías aéreas respiratorias), por lo que es posible que EDG4/LPA2 también participe en la regulación del CFTR en las células de las vías respiratorias.

Existe un caso de interacción a través de los dominios PDZ, que conduce a la modulación de la expresión, dependiente del CFTR, de la citoquina RANTES. Esta citoquina promueve de manera selectiva la trans migración de los linfocitos T CD45 RO<sup>+</sup> y eosinófilos. Las células epiteliales aéreas de pacientes FQ expresan poco y nada de la proteína o ARNm de RANTES comparado con los controles no FQ, ya sea en forma basal o estimulada con TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  [173]. A su vez, se demostró que la corrección de las células FQ, mediante la inserción de CFTR salvaje, es capaz de restaurar la expresión de RANTES a nivel transcripcional por un mecanismo dependiente de NF- $\kappa$ B. Por otra parte, los datos aportados por el grupo de Schwiebert demuestran que el CFTR dispara la expresión de RANTES por un mecanismo independiente de la actividad del canal de cloruro CFTR, ya que ni la inhibición selectiva del transporte de Cl<sup>-</sup> por el CFTR ni la expresión de canales de Cl<sup>-</sup> alternativos (por ejemplo CIC-2), afectó la expresión de RANTES [174]. De esta manera, mediante estudios de expresión de CFTR con fragmentos truncados, se determinó que el extremo C-terminal del CFTR, incluyendo su dominio PDZ, es necesario para la expresión del gen RANTES dependiente del CFTR [174]. Estudios complementarios, sugieren que la proteína EBP50/NHERF1, que contiene 2 dominios PDZ, podría estar involucrada en el mecanismo de regulación de la expresión de RANTES y de la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de CFTR [174]. Por lo tanto, para la correcta expresión del gen RANTES, sería necesaria la presencia del CFTR en la

membrana plasmática apical, para formar un complejo macromolecular de señalización en el que intervendría la proteína EBP50/NHERF1 y NF- $\kappa$ B.

### 7- LAS MUTACIONES DEL GEN *CFTR*

Hasta el momento se han descrito más de 1700 mutaciones diferentes en el gen *CFTR* (“Cystic Fibrosis Mutation Data Base” [175]), aunque la mutación más común es la delección del triplete CTT, que determina la pérdida del aminoácido fenilalanina de la posición 508 ( $\Delta$ F508) [25, 176]. Esta mutación tiene una distribución altamente heterogénea en las distintas poblaciones del mundo [177] y es responsable de una falla en el plegamiento del *CFTR* que conduce a una severa disminución de la expresión del *CFTR* en la membrana plasmática apical [178]. Se ha observado un amplio rango de disfunción pulmonar en los pacientes homocigotas con la mutación  $\Delta$ F508, hecho que reflejaría la interacción de diversas variables, incluyendo influencias genéticas distintas al gen *CFTR*, medio ambiente, eventos infecciosos y diferencias en el tratamiento de la enfermedad [16, 33].

Las mutaciones en el gen *CFTR* son mayoritariamente cambios puntuales que afectan a uno o pocos nucleótidos, aunque también se han detectado delecciones que causan la pérdida de la mayor parte del gen *CFTR*. Las distintas mutaciones se denominan siguiendo un criterio consensuado [179]:

- Cambio de aminoácido (“missense”): el cambio de nucleótido determina la sustitución de un aminoácido.
- Cambio de marco de lectura (“frameshift”): la inserción o delección de un nucleótido produce una alteración el marco de lectura.
- Modificaciones en el corte y empalme del ARNm (“splicing”): se ha detectado “splicing” alternativo implicando la pérdida de los exones 9 y 12 [180, 181].
- Mutaciones sin sentido (“nonsense”): la mutación origina un codón de terminación de la traducción, generando proteínas truncadas.

- Inserción o delección de varios aminoácidos o parte del gen CFTR.
- Mutaciones en el promotor del gen.

Debido a la frecuencia y distribución de las mutaciones  $\Delta F508$ , G542X y N1303K, se cree que estas tres mutaciones fueron las primeras en originarse y expandirse. Los haplotipos con tres microsatélites intragénicos, IVS8CA, IVS17bTA y IVS17bCA, datan el origen de las mutaciones en unos 35000 años [182]. En otro trabajo, Morral y colaboradores, han datado la mutación  $\Delta F508$  en 52000 años [5].

Tipo de mutación	Conteo	Frecuencia %
Missense	693	40.27
Frameshift	285	16.56
Splicing	214	12.43
Nonsense	157	9.12
in/del en marco	33	1.92
in/del grandes	48	2.79
Promotor	8	0.46
Variación de secuencias	238	13.83
Desconocidas	45	2.61

**Tabla 1. Distribución de frecuencias de las mutaciones del CFTR.** Datos extraídos de la página web de la “Cystic Fibrosis Mutation Data Base”, [175]

### 7.1- Clasificación de las mutaciones Del CFTR

Se han descrito 5 clases de mutaciones que explican los distintos mecanismos moleculares que producen la disfunción del canal CFTR [183, 184] y se clasifican como se detalla a continuación:

**Mutaciones Clase I:** incluye aquellas mutaciones que dan lugar a la ausencia de proteína debido a mutaciones “nonsense”, “frameshift” o de “splicing”. También se las puede asociar con ARNm inestables (rápidamente

degradados). La mayoría de las mutaciones en el gen CFTR (52%) pertenecen a esta clase; un ejemplo de ellas son las mutaciones W1282X y R553X.

**Mutaciones Clase II:** son cambios que impiden que la proteína llegue a la membrana celular. Se caracterizan por el procesamiento defectuoso de la proteína, que implica la retención del CFTR en el retículo endoplásmico. Este es el caso de la mutación  $\Delta F508$ , que genera una proteína con glicosilación alterada, mal plegada y que se degrada en gran proporción antes de llegar a la membrana plasmática [178, 185]. Sin embargo, estudios realizados *in vitro*, han demostrado que la mutante  $\Delta F508$  se pliega normalmente a bajas temperaturas (23-30 °C), o cuando las células son tratadas con 4-PBA (4-fenilbutirato). En estos casos el CFTR  $\Delta F508$  elude la maquinaria de degradación y se dirige a la membrana plasmática apical, donde exhibe parcialmente su función como canal de cloruro regulado por AMPc [186, 187]. De modo que ni la actividad del canal ni la capacidad de ser activada por AMPc estaría alterada en FQ sino solo el transporte de la proteína hacia la membrana plasmática y posiblemente, su permanencia en la membrana plasmática [188, 189].

**Mutaciones Clase III:** Corresponden a defectos en la regulación del canal CFTR, que están presentes aunque el transporte de la proteína a la membrana plasmática es correcto. Es el caso, por ejemplo, de las mutaciones “missense” que afectan a la unión a ATP, o de las mutaciones que pueden impedir su función en forma drástica (mutación G551D), o dejar alguna actividad residual (mutación G551S) [184, 190].

**Mutaciones Clase IV:** Estas afectan la conductividad de los iones cloruro [184, 191]. Hay una gran cantidad de mutaciones de este tipo que involucran residuos de arginina en los dominios transmembrana del canal. Estas mutaciones dan como resultado un canal que presenta una conductividad residual y con frecuencia los pacientes tienen una función pancreática exocrina normal. Estas mutaciones son del tipo “missense”. Las más comunes de este tipo son: R117H, G314E, R334W y R347P.

**Mutaciones Clase V:** Esta clase de mutaciones alteran o crean sitios de procesamiento del ARNm del CFTR, sin alterar la secuencia codificante [192-194]. Estas mutaciones pueden provocar una reducción parcial o total de la

síntesis de la proteína CFTR. La mutación más común de este tipo es la que crea un sitio de procesamiento activo en el intrón 19 y lleva a una inserción de 84 pares de bases con un codón de terminación: 3849+10Kb C a T.

### 8- CFTR Y FIBROSIS QUÍSTICA

El CFTR posee un alto grado de conservación entre las distintas especies, lo que sugiere una función de fundamental importancia [195]. Sería muy aventurado adjudicar una sola función a una proteína tan compleja como el CFTR (canal de iones  $\text{Cl}^-$  solamente), o a una proteína con una única función de transporte de  $\text{Cl}^-$  adjudicarle toda la gama de defectos en las funciones celulares del epitelio de enfermos FQ [196]. Entre los efectos secundarios que aparecen por el mal funcionamiento del CFTR, puede mencionarse la desregulación de los canales de  $\text{Cl}^-$  ORCC [150, 197], la hiperabsorción de  $\text{Na}^+$  a través del epitelio respiratorio y la hiperactividad de los canales de  $\text{Na}^+$  en células epiteliales aisladas del sistema respiratorio de pacientes FQ [19, 148, 198]. De modo que, indirectamente, y como sugieren la gran cantidad de interacciones con otras proteínas reportadas hasta la fecha, sobre todo a través de sus dominios PDZ, el CFTR interactúa y modula la actividad de otras proteínas, como es el caso del transporte de diversos canales.

En células FQ ha sido reportada también una falla en la regulación de la endocitosis y la exocitosis mediada por AMPc y una insuficiente acidificación en sus organelas, hecho que provoca a su vez un patrón de glicosilación anormal [199, 200].

Es interesante el hecho de que el CFTR también es capaz de regular la expresión de varios genes involucrados en la respuesta inflamatoria, incluyendo RANTES [173], interleuquina-8 (IL-8) [53, 201], IL-10 [55, 202] y la óxido nítrico sintetasa inducible [203]. Como hemos visto, en el caso de la regulación de RANTES, es necesaria la interacción del CFTR con la proteína EBP50 a través de sus dominios PDZ, con la que formaría un complejo macromolecular de activación de factores de transcripción entre los que se encontraría  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  [173]. Estos datos, sugieren un posible rol del CFTR en la función epitelial durante la respuesta inmune innata y adquirida.



Por otra parte, se han reportado diversas alteraciones en la actividad mitocondrial en FQ, lo que sugiere un rol muy importante del CFTR en los procesos de fosforilación oxidativa y homeostasis del calcio intracelular [204-207].

## **9- EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN FQ**

### **9.1- Antecedentes**

Desde 1994 nuestro laboratorio ha estado identificando y estudiando genes cuya expresión pudiera estar modificada específicamente por la falla del CFTR, en modelos celulares de FQ, con el fin de demostrar su existencia, caracterizarlos y conocer con mayor detalle los mecanismos involucrados en la enfermedad. Estos estudios comenzaron antes de que se conociera algún gen dependiente de la actividad del CFTR o las interacciones de éste con otras proteínas a través de sus dominios de unión a PDZ. Tampoco se sabía si el transporte de Cl<sup>-</sup> podría tener algún efecto genómico (aún hoy se ignora con certeza). Para explorar la hipótesis de la existencia de genes CFTR-dependientes se utilizó el método denominado “differential display” o “display” diferencial (DD) [208, 209]. De ésta manera se lograron observar diferentes genes cuya expresión dependía de la presencia o de la actividad del CFTR. Uno de los fragmentos de ADN copia (ADNc) observados en el “display” diferencial de células CFDE (fenotipo FQ) fue clonado, secuenciado e identificado como correspondiente a la tirosina quinasa SRC/c-Src/p-60-src [38, 210]. Asimismo, se comprobó el incremento de la actividad de tirosina quinasa de SRC y se observó que la expresión de MUC1 se encontraba aumentada en células FQ, regulada por SRC. De modo que SRC podría ser el puente entre la sobreproducción de mucinas y la falla del CFTR en FQ [38]. Otro gen en estudio, cuya expresión depende de la actividad del CFTR, es el gen mitocondrial *MTND4* [211, 212]. Este gen también fue identificado por DD, pero al contrario de SRC, su expresión se hallaba disminuida en las células CFDE (FQ) respecto de las CFDE/6RepCFTR (corregidas mediante la expresión ectópica de CFTR wt), e incluso en otros modelos de FQ [213]. Dicho gen codifica la subunidad MTND4 del complejo I mitocondrial (CI<sub>m</sub>) de la cadena respiratoria, una de las 7 subunidades de este complejo codificadas por el genoma mitocondrial [214, 215].

En la actualidad se desconoce la función exacta de dicha subunidad y si la misma se encuentra o no involucrada en la transferencia de electrones o en

la translocación de protones. Sin embargo, se ha reportado en varios trabajos que la subunidad ND4 es un componente fundamental para la correcta actividad del CIm. Ciertas mutaciones en el gen MT-ND4 provocan la neuropatía óptica hereditaria de Leber [216].

### 9.2- CISD1, otro gen modulado por la actividad del CFTR

En otro DD realizado simultáneamente se identificó una banda con un patrón de expresión similar al de ND4 [217]. Dicha banda fue recortada del gel del DD y se aisló el ADNc, que fue amplificado por PCR. El producto de la PCR fue clonado en el plásmido pGEMT y enviado a secuenciar. El análisis de la secuencia reveló que se trataba del marco de lectura abierto 70 ubicado en el cromosoma 10, c10orf70. Era la primera proteína clonada e identificada de la familia de proteínas con dominios CDGSH. Dicho gen de expresión y función desconocidas fue denominado en ese momento por nuestro laboratorio, ZCD1 (Zn finger CDGSH Domain 1), por poseer un dominio del tipo CDGSH que era similar al de los “Zn fingers” (número de acceso AY960578) . Más tarde se descubrió que en realidad este tipo de dominios une un grupo 2Fe-2S coordinado por 3 cisteínas y una histidina [218] y entonces, de común acuerdo entre los distintos autores y la HUGO (Human Genome Organization), adoptamos para este gen el símbolo CISD1 (IS por Iron-Sulfur) [219].

Simultáneamente, otros autores encontraron la misma proteína en un modelo de diabetes. En ratón y bovino, la denominaron mitoNEET [220]. La encontraron por ser el blanco específico, en la fracción mitocondrial, de un derivado radioactivo de Pioglitazona, una droga utilizada en el tratamiento de la diabetes del tipo II. Además, esta proteína co-inmunoprecipitó junto con proteínas del complejo 1 perteneciente a la cadena respiratoria, entre ellas la NADH deshidrogenasa [220], por lo que se sugería una localización mitocondrial.

Otra evidencia de la posible función en la cadena respiratoria de CISD1 es que ratones nulos (-/-) para CISD1/mitoNEET presentan alterada significativamente la respiración en estado 3, medida como consumo de oxígeno en presencia de alta concentración de los sustratos O<sub>2</sub> y ADP [218].

### **9.3- El modelo utilizado para el “Display” diferencial (DD)**

Brevemente, el DD fue realizado con ARNm aislado de células CFDE (provenientes de epitelio de tráquea de un paciente con FQ), células CFDE/6RepCFTR (células CFDE normalizadas mediante la expresión ectópica de CFTR salvaje) y éstas últimas tratadas con glibenclamida, un inhibidor del CFTR. El inhibidor se utilizó para revertir el fenotipo normalizado de las células CFDE/6RepCFTR hacia un fenotipo FQ. De esa forma, comparando los tres patrones en los geles del DD, pudieron ser descartados los genes que podían tener afectada su expresión por causas diferentes a la actividad de transporte de Cl<sup>-</sup> del CFTR; por ejemplo, debido a efectos producidos por la transfección del plásmido con el CFTR salvaje, por alguna variación en la historia de las células post transfección (p.e., selección clonal de las mutantes por una mayor velocidad de crecimiento), por la sola presencia del CFTR en la membrana, o por efectos exclusivos del inhibidor. De esta manera se puede distinguir aquellos genes cuya expresión depende exclusivamente de la actividad del transporte del CFTR. Dichos genes deberían tener niveles diferentes de expresión en las células transfectadas respecto de las CFDE y este cambio debería poder revertirse tras el tratamiento de las CFDE/6RepCFTR con el inhibidor. En otras palabras, buscábamos identificar en el DD aquellos fragmentos de expresión diferencial entre las células corregidas y las FQ, que podían revertirse con el tratamiento con glibenclamida. Además, esta reversión observada tras el tratamiento con un inhibidor del canal, indicaría que no solo existe una correlación entre la expresión diferencial del gen en estudio y la actividad del CFTR, sino una relación causa-efecto.

### **10- ANORMALIDADES MITOCONDRIALES ASOCIADAS A FQ**

Antes de conocerse la existencia de la falla del *CFTR* en FQ, se habían descrito diversas anormalidades mitocondriales asociadas a esta enfermedad. Entre otros efectos, se había reportado que las mitocondrias de células FQ incorporaban más calcio [204, 205] y que el consumo de oxígeno era mayor que en células normales usadas como controles [221]. La incorporación de calcio por la mitocondria es una compleja reacción dirigida por el gradiente de

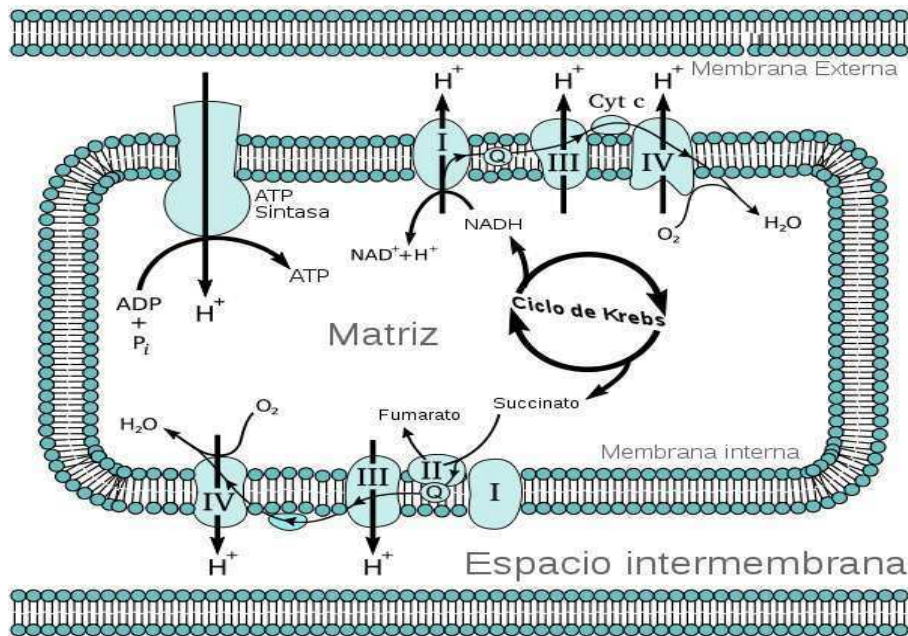
protones que se establece entre ambos lados de la membrana interna mitocondrial debido al sistema de fosforilación oxidativa. Por otro lado, el consumo de oxígeno celular está en parte modulado por la actividad de dicho sistema [204, 222].

Estos datos sugirieron que en FQ la cadena de transporte de electrones presentaba alguna alteración con respecto a un fenotipo normal, e incluso dichos autores llegaron a pensar que el gen (proteína) mutante responsable de la FQ se encontraba en el Complejo I mitocondrial (CI<sub>m</sub>) [221]. Más aún, en 1988 Dechecchi y col. [223] encontraron alteraciones significativas en las propiedades del CI<sub>m</sub> en células FQ. Pero luego del descubrimiento por Riordan y colaboradores de la falla en el CFTR en FQ [23], no se volvió a mencionar la teoría de la falla en las mitocondrias, hasta que en 1995 de Meer y col. [224] proponen que las anormalidades observadas explicarían los defectos en la eficiencia oxidativa en el músculo esquelético de pacientes FQ. Posteriormente, nosotros encontramos disminuida la expresión de ND4 y CISD1, lo que nos llevó a repostular la hipótesis mitocondrial, postulándola ahora como consecuencia indirecta de la falla del CFTR [212, 225].

### **11- EL COMPLEJO I MITOCONDRIAL (CI<sub>m</sub>)**

El CI<sub>m</sub>, también conocido como complejo NADH:ubiquinona oxido-reductasa o complejo NADH deshidrogenasa, es la puerta de entrada de los electrones con alto poder reductor del NADH proveniente del ciclo de los ácidos tricarbónicos (ciclo de Krebs) a la cadena respiratoria, en la cual se lleva a cabo la producción de energía mediante fosforilación oxidativa. La producción de energía ocurre gracias a la acción concertada de cinco complejos enzimáticos embebidos en la membrana interna mitocondrial. Así, el CI<sub>m</sub> acopla la oxidación de NADH y la reducción de ubiquinona con la generación de una parte del gradiente de protones utilizado para la síntesis de ATP. Los electrones son transferidos a través de nueve “clusters” de hierro-azufre hasta el aceptor de electrones ubiquinona y luego a lo largo del sistema de fosforilación oxidativa, hasta el complejo IV, para reducir oxígeno molecular. La

energía liberada durante este proceso es utilizada para translocar los protones a través de la membrana interna mitocondrial (Fig. 6). Por cada NADH que se oxida, el CIm transporta 4 protones hacia el espacio intermembrana [226, 227].



**Figura 6: Esquema de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.** Se muestran los 5 complejos del sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial I, II, III y IV: Complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE) ubicados sobre la membrana interna mitocondrial. ATP sintetasa, es el quinto complejo de la fosforilación oxidativa. Q, es ubiquinona (Coenzima Q10 o CoQ10), que transporta los electrones que ingresan a la cadena por la oxidación de NADH en el CIm (I) y los que ingresan por la oxidación del succinato a fumarato en el CIIm (II) [228].

En este trabajo de Tesis se ha observado claramente una disminución en la expresión de CISD1 en los modelos celulares de FQ y en células no FQ tratadas con inhibidores del CFTR. También hemos comprobado su localización mitocondrial mediante la expresión de una proteína quimera CISD1-EGFP. Seguidamente se estudió la relación de la expresión de esta proteína con la actividad de la NADH deshidrogenasa, resultados que serán descritos y discutidos en esta Tesis.

## HIPOTESIS DE TRABAJO

Como se indicó anteriormente, hemos demostrado mediante DD la existencia de diversos genes dependientes de la actividad del CFTR, como *SRC* y *MUC1* [38]. Ahora, hemos clonado y caracterizado un nuevo gen humano, *CISD1*, que tiene la capacidad de ser regulado por CFTR. El gen *CISD1*, codifica una proteína de 108 aminoácidos, cuya función permanece desconocida. Dado que por análisis in silico habíamos demostrado que *CISD1* tenía una posible señal de localización mitocondrial y que Colca y col. [220] habían demostrado que *Cisd1* de ratón constituía un ligando mitocondrial de pioglitazona y coprecipitaba con proteínas mitocondriales, nuestra hipótesis de trabajo fue que la proteína humana *CISD1* debía tener una localización mayoritariamente mitocondrial. Asimismo, dados los resultados preliminares obtenidos por medio del DD, que sugerían que la actividad del canal de cloruro CFTR podría regular de manera directa o indirecta la expresión de *CISD1*, planteamos como hipótesis que la disminución de la expresión de *CISD1* podría tener un efecto causal en la disminución de la actividad del CIm y que esta disminución de la expresión de *CISD1* podría ser responsable de los efectos mitocondriales descritos ya hace muchos años en esta enfermedad.

## **OBJETIVOS**

### **1- OBJETIVO GENERAL:**

Demostrar la expresión diferencial del gen nuclear *CISD1* en fibrosis quística mediada por la falla del canal de cloruro CFTR. Estudiar su localización subcelular y determinar si existe una relación con la disminución de la actividad del Clm en FQ.

### **2- OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Validar los resultados obtenidos por DD sobre la regulación negativa del gen *CISD1* en FQ.
2. Analizar la localización subcelular de *CISD1* utilizando predicciones *in silico* y comprobar en un cultivo celular dicha localización mediante la construcción de una quimera *CISD1*-EGFP y su detección por microscopía confocal.
3. Desarrollar anticuerpos policlonales que reconozcan la proteína *CISD1*.
4. Determinar si la reducción de *CISD1* tiene consecuencias en la actividad del Clm.
5. Estudiar los efectos de mutaciones dirigidas que modifiquen el sitio de unión al grupo 2Fe-2S de *CISD1*.



---

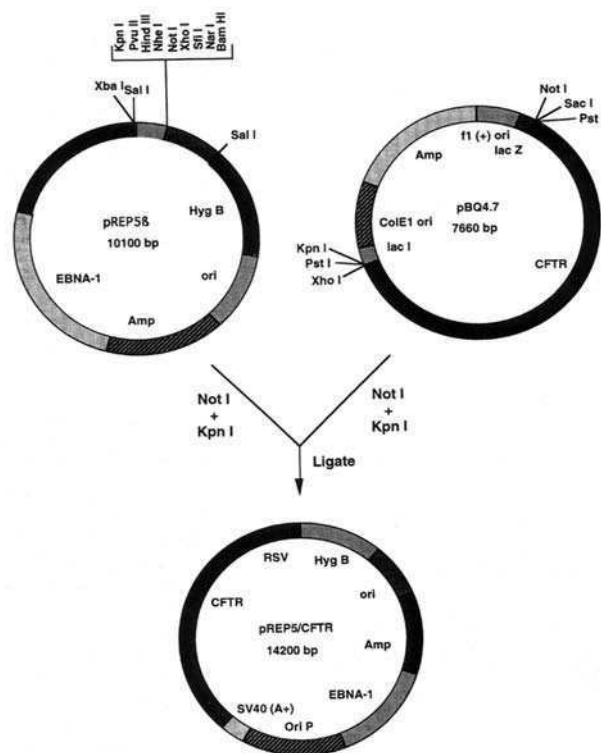
## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

## 1- CULTIVOS CELULARES

## 1.1- Células CFDE y células CFDE/6RepCFTR

El modelo celular de fibrosis quística utilizado inicialmente está compuesto por dos líneas celulares: la línea CFDE, que proviene de células epiteliales de glándula traqueobronquial de un paciente con Fibrosis Quística [229] y la línea CFDE/6RepCFTR, compuesta por estas mismas células CFDE transfectadas con el plásmido pRep5/CFTR, que expresa en forma ectópica el CFTR salvaje y corrige el transporte de cloruro dependiente de AMP cíclico (AMPC), afectado en FQ.



**Figura 7: Esquema de la construcción del plásmido p5rep/CFTR.** Un fragmento de *CFTR* de 4,7 kb fue obtenido por digestión del plásmido pBQ4,7. (B) El plásmido pBQ4,7 es un plásmido pBluescript KS+ con un inserto del ADNc del gen *CFTR*, obtenido por digestión con PstI. Para escindir el inserto *CFTR* del sitio de clonado de pBluescript KS+, el plásmido fue digerido con NotI y KpnI. El fragmento de *CFTR* fue insertado en el sitio de clonado del vector pREP5β (A) previamente clivado con NotI y KpnI, para que el *CFTR* quede en la orientación correcta; el extremo 5' del fragmento quedó adyacente al promotor RSV LTR y el extremo 3' a la región de poliadenilación de SV40. Las secuencias EVB oriP y EBNA1 facilitan la replicación episomal y el mantenimiento de (C) pRep5/CFTR.

Estas células fueron donadas por el Dr. Dieter Gruenert (Human Molecular Genetics Unit, Department of Medicine, University of Vermont, Burlington, VT, USA) [229].

### 1.2- Células IB3-1 y S9

Las células IB3-1 (CRL-2777) y S9 (CRL-2778) fueron adquiridas de ATCC (Rockville, MD). Las células IB3-1 poseen el CFTR con la mutación más común en FQ ( $\Delta F508$ ) y una mutación sin sentido en el otro alelo (W1282X), con una señal de terminación prematura (hoja de datos de ATCC) [230]. Las células S9 son células IB3-1 que han sido transducidas con un vector viral portando el CFTR salvaje. Estas células expresan el CFTR en forma estable, con lo cual, a diferencia de las CFDE/6RepCFTR, no requieren antibióticos para mantener la expresión del CFTR normal. Además, ambas líneas celulares fueron transducidas simultáneamente, algo que no fue hecho con las CFDE (las CFDE no tienen plásmido mock). La desventaja de las IB3-1 y S9 es que el gen está insertado al azar en el genoma, sin que se conozcan posibles efectos colaterales y, además, por el mismo motivo, podría haber existido una selección de un clon respecto de los múltiples clones con distintos puntos de inserción generados en su obtención. En realidad, este problema de la selección clonal diferencial afecta a cualquier línea celular. Luego de algunos pasajes, es imposible saber con certeza si los clones correspondientes a las células transfectadas con el vector “mock” son realmente comparables con los transfectados con el vector con el inserto de interés. Algunos clones, como consecuencia de la integración al azar, pueden crecer mucho más rápido que otros y prevalecer en una línea y no en la otra, a tal punto que las diferencias que se observen puedan deberse a efectos inespecíficos de la integración y no a la expresión del gen de interés. Por este motivo decidimos también usar otro modelo experimental alternativo: una línea celular que ya expresase en forma normal el CFTR, pero que pudiese ser rápidamente inhibida su actividad utilizando inhibidores farmacológicos del CFTR, disminuyéndose así la posibilidad de una selección clonal diferencial. Esto es así, porque en el corto plazo de la incubación es poco probable que se produzca una selección clonal

diferencial (aunque no puede descartarse) y, además, no hay presentes efectos de una integración al azar con consecuencias impredecibles. Las células tratadas y las no tratadas son prácticamente las mismas células. Con este fin utilizamos entonces células T84.

### **1.3- Células T84**

La línea celular T84 (CCL 248) también fue obtenida de ATCC y proviene de células de carcinoma de colon humano. Estas células expresan el CFTR salvaje [231-233]. Como se mencionó antes, estas células se utilizaron como modelo alternativo, para evitar los efectos de una posible selección clonal o los efectos de los antibióticos, como ocurre con las dos líneas descritas (CFDE e IB3-1). El modelo experimental consiste en tratar a estas células con un inhibidor del CFTR para provocar una fibrosis quística “inducida” por la inhibición de la actividad del canal. Así, tanto las células controles (T84) como las tratadas con inhibidores, difieren únicamente en la presencia del inhibidor. De todas maneras, persiste el problema de posibles efectos colaterales del inhibidor, ya que los efectos observados en las células tratadas con inhibidor se comparan con los observados en las células controles que no fueron tratadas con éste. Por tal motivo, se utilizaron varios inhibidores y modelos experimentales y se verificó que se obtuvieran los mismos resultados.

### **1.4- Células Caco-2**

La línea celular Caco-2 también fue obtenida de ATCC (HTB-37) y también proviene de células de carcinoma de colon humano. Estas células también expresan el CFTR salvaje en niveles similares a las células T84 y fueron usadas para confirmar los resultados obtenidos con las células T84.

### 1.5- Condiciones de cultivo

Las células CFDE y CFDE/6RepCFTR, salvo que se indique lo contrario, fueron crecidas sobre una matriz de colágeno y fibronectina en placas (o botellas) de plástico, aptas para el cultivo de células, como fue previamente descrito por Lei [229]. Para generar la matriz de colágeno y fibronectina se colocaron en las placas (o botellas) de cultivo 1-2 ml de la solución preparada en medio DMEM-F12 (1:1) con 0,1 mg/ml de BSA, 0,029 mg/ml de colágeno tipo I y 0,01 mg/ml de fibronectina humana preparada a tal efecto. Las placas se dejaron con la solución a 37 °C durante 1 h. y luego se retiró el excedente.

Todas las líneas celulares utilizadas se cultivaron en medio de cultivo DMEM-F12 1:1 (Gibco-BRL, Life Technologies, Rockville, MD) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (BIOSER, Buenos Aires, Argentina), 10 U/ml penicilina, 10 µg/ml estreptomina y 50 µM anfotericina B (Gibco-BRL, Life Technologies, Rockville, MD); la incubación se realizó en una atmósfera de aire saturado con agua y equilibrado con 5 % de CO<sub>2</sub>.

Las células CFDE/6RepCFTR debieron ser cultivadas en presencia de 75 µg/ml de higromicina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), para mantener seleccionadas las células que contienen el plásmido que expresa el CFTR. Luego de la selección y 24 horas antes de los ensayos, el medio fue reemplazado por medio sin higromicina B, para minimizar posibles efectos colaterales del antibiótico.

## 2- CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO DE LAS CÉLULAS

### 2.1- Descongelamiento

Para descongelar un criotubo con células mantenidas en nitrógeno líquido se lo retiró del termo y se introdujo la parte inferior del criotubo en un recipiente con agua a 37 °C. Tomándolo de la tapa se lo hizo girar con movimientos circulares teniendo cuidado de que el agua no moje la parte superior. Cuando la mayor parte del contenido estuvo descongelado se le

agregó 1 ml de medio de cultivo a temperatura ambiente y las células se pasaron a una botella de 75 cm<sup>2</sup> con 15 ml del medio de cultivo descrito anteriormente. A las 4 o 5 horas fueron observadas con el microscopio para verificar que las células se hubieran adherido. Una vez adheridas al fondo, el medio fue reemplazado por medio fresco para eliminar los restos de DMSO presentes en el medio de congelamiento.

### 2.2- Congelamiento

El rango de concentración celular utilizado osciló entre 4 y 8 x 10<sup>6</sup> células/ml/criotubo. Las líneas celulares fueron cultivadas hasta un 80 – 90 % de confluencia (6,5 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> para las CFDE, IB3-1 y S9; 1 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> para las CFDE/6repCFTR y Caco-2 y 1,15 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> para las T84), luego se trataron con una solución de tripsina-EDTA (0,25 % tripsina / 0,02 % EDTA en PBS 1X) aproximadamente durante 5 minutos en estufa de cultivo. Una vez disgregadas las células se inactivó la tripsina utilizando aproximadamente 5 ml de medio de cultivo suplementado con 10 % de suero fetal bovino. La mezcla fue agitada suavemente hasta obtener una suspensión homogénea de células y se retiró una alícuota de 10 µl, a la que se le agregó 10 ml de la tinción vital “azul de trypan” para su posterior conteo en hemocitómetro. Paralelamente al conteo, las células disgregadas fueron centrifugadas a 600 x g durante 5 minutos; se retiró el medio sobrenadante, se resuspendieron en solución A de congelamiento (DMEM-F12 (1:1), 20 % y suero fetal bovino SFB 80 %) y se pusieron en hielo para agregarle lentamente y en agitación suave, la solución B de congelamiento (DMEM-F12 (1:1) con 20 % de DMSO). Posteriormente, se las dejó reposar en hielo durante 10 min. y se almacenaron a –80 °C durante 12 horas, dentro de un recipiente de material aislante del calor (telgopor) para disminuir la tasa de enfriamiento. Finalmente se las retiró del freezer de -80 °C y se las pasó a –196 °C, en un termo con nitrógeno líquido.

### 3- TRATAMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES CON INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DE TRANSPORTE DE CLORURO DEL CFTR.

Las células fueron cultivadas hasta un 70-80 % de confluencia en placas de cultivo de 100 mm de diámetro. En ese momento se cambió el medio por otro sin suero (medio de ayuno) y se dejaron 24 horas en estufa de cultivo. Transcurridas las 24 horas se agregaron los inhibidores para cada tratamiento, en las distintas concentraciones ensayadas (glibenclamida 50 y 100  $\mu\text{M}$ ; CFTR(inh)-172, 2,5 y 5  $\mu\text{M}$ ) y se incubó durante 24 horas en estufa de cultivo. Las incubaciones de 24 horas se realizaron para la medición de la expresión del ARNm de *CISD1* en dichas condiciones.

### 4- TRATAMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES DE IB3-1 Y S9 CON ACTIVADORES DEL TRANSPORTE DE CLORURO VÍA CFTR.

Al igual que en el caso del tratamiento con inhibidores, las células IB3-1 y S9 fueron cultivadas hasta un 70-80 % de confluencia en placas de cultivo de 100 mm de diámetro. Se cambió el medio por otro sin suero (medio de ayuno) y se dejaron 24 horas en estufa de cultivo. Luego de las 24 horas, ambas líneas celulares fueron estimuladas incubándolas en presencia de dibutilil-AMP cíclico (db-AMPC) 200  $\mu\text{M}$ , isobutil-metil-xantina (IBMX) 500  $\mu\text{M}$  e isoproterenol (20  $\mu\text{M}$ ), durante los distintos tiempos ensayados (0, 4 y 24 horas). Las incubaciones se realizaron para la medición de la expresión del ARNm de *CISD1* en las distintas situaciones ensayadas.

### 5- EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo *TRI Reagent* (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Las células cultivadas en placas de 100 mm de diámetro hasta la densidad (en células/cm<sup>2</sup>) indicada anteriormente para el congelamiento, fueron lavadas con 2 ml de PBS 1X frío y lisadas con 3 ml de *TRI Reagent*.

Para separar el ARN del ADN y las proteínas, por cada 1 ml de reactivo se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo y se mezcló vigorosamente. Se incubó a temperatura ambiente 5 minutos y se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C, para facilitar la separación de fases. Luego se extrajo la fase acuosa que contiene el ARN total con el cuidado de no tocar la interfase que contiene el ADN genómico y algunas proteínas (entre ellas ARNasas) y se lo colocó en microtubos de centrifuga de 1,5 ml. El ARN fue precipitado de la fase acuosa agregando un volumen de isopropanol y se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min. a 4 °C. El precipitado fue lavado tres veces con etanol frío 75 % (v/v) para eliminar los restos de isotiocianato de guanidina y se dejó secar al aire, dejando los tubos destapados y acostados. Finalmente, el precipitado obtenido se disolvió en agua libre de ribonucleasas (tratada con 0,1 % de dietilpirocarbonato o DEPC) a razón de 30  $\mu$ l por cada  $5 \times 10^6$  células y se guardó a -80 °C. La cuantificación se realizó haciendo una dilución 1/100 en solución tampón TE (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7,8), en un espectrofotómetro UV modelo GenQuant de Pharmacia Biotech SP (Cambridge, Inglaterra). Para verificar la pureza del ARN se usaron las relaciones de absorbancia  $A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$  (presencia de sales), siendo aceptable una relación mayor a 2,0 y  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  (presencia de proteínas), cuyo cociente fue considerado aceptable a partir de 1,7. Las muestras de ARN total fueron extraídas de células CFDE, CFDE/6RepCFTR y CFDE/6RepCFTR tratadas con distintas concentraciones de inhibidores o células IB3-1 y S9 tratadas con estimuladores de la actividad del CFTR para las reacciones de RT-PCR semicuantitativa o PCR en tiempo real.

## **6- RT-PCR (“REVERSE TRANSRIPTION - POLYMERASE CHAIN REACTION”) SEMICUANTITATIVA Y PCR EN TIEMPO REAL**

### **6.1- Transcripción Reversa (RT)**

La reacción de RT fue realizada usando transcriptasa reversa MMLV (Promega, WI) según las instrucciones del proveedor, con unas pocas



modificaciones. Brevemente, en un primer paso de apareamiento se usó, en un volumen de 10  $\mu$ l, 2  $\mu$ g de ARN y 6,4  $\mu$ M de oligo(dT)<sub>14</sub> a 70 °C durante 10 minutos y luego se enfrió a 1 °C/seg hasta 4 °C y se pasó a hielo. Luego, a dicha mezcla se le agregó 15  $\mu$ l conteniendo 200 U de transcriptasa reversa de MMLV/ $\mu$ g de ARN y 1,5  $\mu$ l del inhibidor de RNAsas RNAsin (Promega, WI). La mezcla de reacción de RT se incubó a 42 °C durante 1,5 horas y se agregó un paso final de 80 °C por 20 minutos. El ADN copia (ADNc) obtenido fue luego utilizado en varias diluciones en las reacciones de PCR, PCR semicuantitativa o PCR en tiempo real o guardado a -80 °C hasta su uso.

### 6.2- PCR “multiplex” semicuantitativa

Inicialmente se intentó utilizar la técnica de PCR “multiplex” para analizar los patrones de expresión de *CISD1* en los distintos modelos de FQ. Para ello se utilizaron diferentes diluciones de las muestras de ADNc que fueron agregadas a 40  $\mu$ l de la mezcla de reacción de PCR compuesta por 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM desoxinucleótidos trifosfato, 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Promega, WI) y 1  $\mu$ M de cada uno de los cebadores para *CISD1*, “forward” 5'-CCGTTTGAGCTCGGTATCCTAGTG-3' y “reverse” 5'-CCAGCGAAGGTGAATCAGACAGAG-3' y para *GAPDH*, “forward” 5'-CCCATCACCATCTTCCAGGA-3' y “reverse” 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'. Dicha mezcla de reacción se la sometió de 25 a 28 ciclos de amplificación y a varias temperaturas de apareamiento (50 a 60 °C) de los cebadores, en un termociclador de gradiente “MASTERCYCLER® gradient” (Eppendorf GA, Hamburgo, Alemania). En cada experimento se realizaron ensayos preliminares con diferentes diluciones de ADNc para determinar la fase exponencial de la amplificación por PCR. Luego se separaron los productos de la reacción de PCR por electroforesis en geles de agarosa 3 % (p/v), preparados en solución amortiguadora (“buffer”) TAE 1X (Tris base 40 mM, ácido acético 18 mM, EDTA 1 mM, pH 8) con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5  $\mu$ g/ml. Las bandas fueron visualizadas y la imagen digitalizada utilizando un documentador de geles Bio-Rad

(Hércules, CA). La intensidad de las bandas fueron cuantificadas mediante el programa Scion Image (Scion Corp., Frederick, MD).

### 6.3- PCR semicuantitativa con curva estándar

Dado que no se pudo encontrar las condiciones de amplificación adecuadas utilizando la técnica de PCR “multiplex”, se intentó el estudio de la expresión relativa utilizando una PCR convencional, utilizando los pares de cebadores de cada ADNc en reacciones separadas. Luego, para lograr una mayor reproducibilidad adaptamos una técnica de PCR cuantitativa con curva estándar, previamente creada por Miller y col. para la cuantificación del número de copias de ADN mitocondrial [234]. Brevemente, se usaron dos plásmidos pGEM-T recombinantes como referencia, que contenían un fragmento de cada secuencia de ADN diana, el fragmento de ADN copia con el ORF completo de *CISD1* en uno y un fragmento del ADN copia de *GAPDH* en el otro. A partir del ADNc obtenido por RT se hicieron dos reacciones de PCR por separado, una amplificando *CISD1* y la otra *GAPDH*. En cada ensayo se utilizaron los plásmidos descritos como control, tanto para construir la curva estándar como para normalizar las diferencias que pudieran existir por las distintas eficiencias en los pasos de amplificación (correspondiente a cada gen y su respectivo par de cebadores). La mezcla de reacción fue idéntica a la usada en la PCR “multiplex”, pero con un solo par de cebadores correspondientes a *CISD1* o *GAPDH*. Al igual que en la PCR “multiplex”, se usaron varias diluciones de ADNc para determinar las condiciones en las que la reacción se encontraba en la fase de amplificación exponencial y evitar así la saturación de la señal en las bandas del gel. Paralelamente, para construir la curva estándar, se amplificó el plásmido correspondiente a cada gen en diluciones seriadas al tercio, a partir de 0,1 ng (0,1 ng, 0,033 ng, 0,011 ng, etc.) y se corrieron en la misma electroforesis. La cuantificación absoluta de los productos correspondientes a cada tratamiento fue inicialmente expresada como nanogramos equivalentes de plásmido. Finalmente, la expresión relativa de *CISD1* se calculó como el cociente entre los ng obtenidos de *CISD1* y *GAPDH*. Debido a la variabilidad

intrínseca de estos ensayos, debieron realizarse múltiples replicados, en al menos cuatro ensayos independientes.

### 6.4- Estudio de la expresión de *CISD1* por “Real Time”-PCR

Para validar los resultados obtenidos en la PCR semicuantitativa se decidió utilizar la técnica de PCR en tiempo real (“Real Time PCR”), método que inicialmente no estaba a nuestro alcance. El protocolo utilizado se asemeja al que usamos para cuantificar el nivel de expresión de *CISD1* por el método de la curva estándar. La reacción de PCR se realizó en las mismas condiciones, con el agregado del colorante fluorescente “EvaGreen” (Biotium Inc., Hayward, CA), cuya fluorescencia es mucho mayor al estar asociado a ADN de doble cadena que el “CiberGreen”. Para detectar los productos de amplificación en tiempo real, se utilizó un termociclador “iQ cycler” (Bio-Rad, Hercules, CA), con lector de fluorescencia ciclo a ciclo. Los cebadores utilizados fueron los mismos que se utilizaron en la PCR semicuantitativa descriptos previamente. Se calculó la concentración equivalente de cada gen a partir de los resultados de la curva estándar, mediante el programa provisto por el fabricante del termociclador. Con las cantidades equivalentes a los ng de plásmido de la curva estándar se determinó el nivel de expresión relativa de *CISD1* respecto de la expresión de *GAPDH*. En este caso, no se pudo utilizar el método de los  $\Delta\Delta C_t$  pues las eficiencias de amplificación correspondiente a cada gen eran diferentes (70 – 75 % para *CISD1* y 85 – 90 % para *GAPDH*).

### 6.5- Condiciones de amplificación por PCR

Tanto la PCR “multiplex” como las PCR con curva estándar se realizaron en las siguientes condiciones: 94 °C (2 min.) y 28 ciclos, compuestos por un paso de desnaturalización a 94 °C (30 seg), un paso de apareamiento de los cebadores a 55 °C (30 seg), y un paso de elongación a 72 °C (15 seg). Al concluir el último ciclo se agregó un paso de extensión a 72 °C de 2 min. Al finalizar la PCR, 10  $\mu$ l de cada mezcla de PCR fueron separados en geles de

agarosa 3 % con bromuro de etidio, visualizados por transiluminación UV con un documentador de geles (UVP, Inc. Upland, CA,) y los resultados guardados como imágenes en archivos con formato .TIFF, para su posterior cuantificación con el programa Scion Image mencionado anteriormente.

Las condiciones de amplificación de las PCR en tiempo real con curva estándar fueron: 94 °C (2 min.) y 35 ciclos compuestos por un paso de desnaturalización a 94 °C (35 seg), un paso de apareamiento de los cebadores a 55 °C (30 seg), y un paso de elongación a 72 °C (10 seg). Para evitar interferencias por la presencia de amplificación no deseada, la fluorescencia fue adquirida ciclo a ciclo en un paso a 78 °C, luego de cada paso de elongación y antes del paso de desnaturalización. La temperatura de adquisición de la fluorescencia fue determinada mediante el estudio de las curvas de “melting” (desnaturalización por temperatura) de los productos de amplificación, realizados en ensayos previos.

### **6.6- Generación de los plásmidos para las curvas estándar.**

Los plásmidos utilizados en la curva de calibración para la cuantificación fueron generados mediante la inserción en el sistema “pGEM-T Easy Vector” de Promega, de un fragmento de las secuencias de ADN copia de los genes *GAPDH* y *CISD1*. El sistema de amplificación por PCR genera un fragmento de 300 pb para *GAPDH* y un fragmento de 470 pb para *CISD1*. El plásmido de *CISD1* fue generado a partir de la banda obtenida en el DD clonada y enviada a secuenciar. Para ello se cortó la banda del gel y el fragmento fue purificado mediante el sistema de purificación de ADN en agarosa “GENCLEAN II KIT” (BIO101, Vista CA, USA) y se cuantificó por espectrofotometría a 280 nm. Posteriormente, el fragmento fue ligado al plásmido pGEM-T siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez hecha la ligación, el plásmido fue introducido en bacterias DH5 $\alpha$  competentes, mediante transformación por el método de choque térmico. Las bacterias transformadas con el plásmido, se colocaron en placas de Petri con medio LB-agar (NaCl 1 %, triptona 1 %, extracto de levadura 0,5 %, agar 1,5 %), que contenían 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C toda la noche. La presencia del inserto en las distintas

colonias fue detectada por el método de PCR de una colonia (“colony PCR”). Se eligió una de las colonias que dieron amplificación positiva y se realizó una mini-preparación de plásmido. La presencia del inserto fue confirmada por digestión con la enzima de restricción *Eco RI*, siguiendo el protocolo del fabricante (Promega). Para el gen *GAPDH*, se utilizó el producto de amplificación de una RT seguida de PCR, utilizando cebadores diseñados para que aparezcan en distintos exones; de esta manera se evitó la amplificación de *GAPDH* desde el ADN genómico.

### 7- PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Las bacterias competentes para la transformación se prepararon según el protocolo de  $\text{CaCl}_2$  descrito en el manual de Sambrook y col. [235] con algunas modificaciones. Para ello se utilizaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5 $\alpha$  (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Las bacterias fueron cultivadas sobre medio LB agar a 37 °C., durante 24 horas. Al día siguiente se picó una colonia y se inoculó un tubo con 3 ml de medio LB líquido que se incubó con agitación durante 16 horas a 37 °C. Luego se tomó un inóculo de 100  $\mu\text{l}$  de dicho cultivo que se sembró en 100 ml de medio LB y se continuó el crecimiento bacteriano a 37 °C, con agitación, hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0,4 - 0,6. El cultivo se mantuvo luego en hielo durante 20 min. y se centrifugó a 4.000 rpm (rotor J-14, en centrífuga Beckman) durante 10 min., a 4 °C. Se descartó el medio de cultivo y se resuspendió el precipitado bacteriano en 50 ml de una solución de  $\text{CaCl}_2$  50 mM, pre-enfriada a 4 °C. Se mantuvieron las bacterias en hielo durante 10 min y luego se centrifugaron a 4.000 rpm, durante 10 min, a 4 °C. Posteriormente se resuspendió el precipitado en 4 ml de  $\text{CaCl}_2$  50 mM, se agregaron 140  $\mu\text{l}$  de DMSO, se mezcló suavemente y se dejó 15 min en hielo. Se agregaron 140  $\mu\text{l}$  de DMSO adicionales por cada suspensión, se mezcló y se dejó en hielo 10 min. Las suspensiones se fraccionaron en volúmenes de 100-200  $\mu\text{l}$ , en tubos de 1,5 ml previamente enfriados, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C hasta su uso.

## **8- TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES POR CHOQUE TÉRMICO.**

La transformación de las bacterias competentes se realizó según el protocolo de Sambrook y col. [235], con algunas modificaciones. Las bacterias competentes (guardadas previamente a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) se mantuvieron en hielo durante 10 a 15 min., hasta que se descongelaron. Se agregaron 1-5  $\mu\text{l}$  del producto de ligación o del plásmido deseado cada 100  $\mu\text{l}$  de bacterias competentes y la mezcla se dejó en hielo durante 30 min. Luego se incubó a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 90 seg. e inmediatamente se pasaron a hielo por 5 min. Posteriormente se agregó 900  $\mu\text{l}$  de medio LB sin antibióticos y se dejó incubando a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación durante 1 h. Luego se sembraron entre 50 y 200  $\mu\text{l}$  de bacterias en placas de Petri con medio LB agar al 1,5 % y ampicilina (50  $\mu\text{g/ml}$ ). En el caso de seleccionar bacterias transformadas con plásmido pGEM-T, las placas se prepararon con isopropil- $\beta$ -D-tiogaláctidopiranosido (IPTG; 80  $\mu\text{g/ml}$ ) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galacto-piranosido (X-Gal, 80  $\mu\text{g/ml}$ ). Posteriormente se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas. El sistema de selección de colonias que contienen el pGEM-T con el inserto de interés se basa en la búsqueda de colonias de color blanco, diferenciadas de las colonias de color azul. El plásmido pGEM-T se provee en forma lineal, cortado en el gen de la  $\beta$ -galactosidasa con una T protruyente en cada extremo 5', que evita la religación sin el inserto. La ADN polimerasa TaqPol posee actividad de adenilación en los extremos 3', incorporando al menos una adenina a los productos de PCR, sobre todo cuando hay un exceso de desoxinucleótidos trifosfato (entre ellos dATP). En presencia del inserto, la ligación se ve favorecida por acoplamiento de los extremos protruyentes compatibles de las A del inserto y las T del plásmido. El inserto provoca la disrupción del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, lo que en el cultivo con X-gal producirá colonias blancas. Algunos plásmidos pierden las T protruyentes y pueden religarse, regenerando el gen de la  $\beta$ -galactosidasa y generando colonias azules por la hidrólisis del X-gal. Algunas colonias azules también pueden llegar a tener el inserto, dependiendo de diversos factores (tamaño del inserto, lugar de la inserción,

etc.). Las colonias blancas fueron seleccionadas y fueron cultivadas en 5 ml de medio LB líquido para hacer mini preparaciones de plásmido o “mini-preps”.

### **9- SELECCIÓN DE BACTERIAS RECOMBINANTES POR “COLONY PCR”**

Se siguió fundamentalmente el método descrito por Sandhu y col [236] con algunas modificaciones. Se picó una colonia de la placa con una punta de micropipeta estéril, se la colocó en un microtubo con 10  $\mu$ l de agua estéril y se dejó luego la punta en 2 ml de medio LB-ampicilina, toda la noche a 37 °C. El tubo con la colonia resuspendida en agua fue hervido durante 5 min. para lisar las bacterias y se centrifugó a 12.000 x g durante 5 min. Finalmente, se usaron 5  $\mu$ l del sobrenadante como muestra para realizar la reacción de PCR con los cebadores correspondientes al inserto. El producto fue corrido en un gel de agarosa para observar la presencia del fragmento deseado. Una vez identificada la colonia positiva para la presencia del inserto, se procedió a realizar una preparación de plásmido a partir del cultivo de 2 ml.

### **10- PREPARACIONES DE PLÁSMIDOS (“MINI, MIDI Y MAXIPREPS”)**

Para obtener soluciones de distintas cantidades de plásmido a partir de cultivos de bacterias, se utilizaron sistemas de purificación comerciales o preparados en el laboratorio, basados en el método de Birnboim y Doly e Ish-Horowicz y Burke, modificados [237, 238]. Para obtener plásmidos con una menor presencia de contaminantes se utilizó el sistema comercial de purificación de plásmidos a baja escala “Wizard Plus SV Miniprep” (Promega, Madison, WI, USA), según las instrucciones del fabricante. Se precipitaron las bacterias provenientes de un cultivo bacteriano de 5-10 ml mediante centrifugación a 10.000 x g, durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se dejó el tubo boca abajo, sobre un papel, para remover el exceso de líquido. Las bacterias se resuspendieron en 250  $\mu$ l de una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 10 mM y 100  $\mu$ g/ml ARNasa A. Se agregaron 250  $\mu$ l de

solución de lisis (NaOH 0,2 M con 1 % de SDS) y se mezcló por inversión (no se utilizó “vortex” para evitar la ruptura del ADN cromosómico y la posterior contaminación del plásmido). Una vez obtenida una solución más clara, se agregaron 10  $\mu$ l de proteasa alcalina y se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente. Luego se agregaron 350  $\mu$ l de solución de neutralización (hidrocloruro de guanidinio 4,09 M, ácido acético glacial 2,12 M y acetato de potasio 0,76 M, pH 4,2) y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces (esta rápida neutralización produce la precipitación del ADN cromosómico). Se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min. y el sobrenadante se purificó por cromatografía en columna, para la que se usó una minicolumna “Wizard Plus Miniprep Column” según las instrucciones del fabricante. Brevemente, luego de sembrar la solución con el plásmido sobre el lecho, la columna fue lavada dos veces con una solución que contenía acetato de potasio 60 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y etanol 60 %. Luego, el plásmido fue eluido con 100  $\mu$ l de agua bidestilada libre de ADNsas.

Para obtener una mayor cantidad de plásmidos se realizaron purificaciones a mayor escala, aumentando los volúmenes de cultivo de bacterias. Las “midi” preparaciones se hicieron con el sistema de purificación comercial “Wizard *Plus* Midipreps” (Promega, Madison, WI, USA), a partir de 100 ml de cultivo, según las instrucciones del fabricante. En los casos en que la producción de plásmidos obtenida por “midi” preparaciones no fue suficiente, se hicieron “maxi” preparaciones de plásmido, a partir de 500 ml de cultivo de bacterias, según el protocolo de Sambrook y col. [235].

En todos los casos, la concentración de plásmido fue medida a partir de la absorbancia a 260 nm. La pureza del mismo fue determinada utilizando las relaciones entre las absorbancias a 260/230 nm (sales, mayor a 2,0) y 260/280 nm (proteínas, mayor a 1,7). Para determinar su integridad, los plásmidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 0,8 %, en solución amortiguadora TAE 1X, corridos a 100 Voltios durante 50 min. Las bandas fueron visualizadas con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/ml) por transiluminación UV, en un documentador de geles marca UVP (UVP Inc. Upland, CA).



## **11- CORTE CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN**

Los cortes con enzimas de restricción fueron realizados de acuerdo con el protocolo provisto por el fabricante (Promega). Brevemente, para los cortes con una sola enzima de restricción, por ejemplo, la digestión con EcoR I en pGEM-T, se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l usando de 0,5 a 1  $\mu$ g de sustrato de ADN (plásmido) y 0,5  $\mu$ l (6 unidades) de enzima en Tris-HCl 90 mM, NaCl 50 mM, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y pH 7,5. La reacción se efectuó a 37 °C durante 2 horas y luego se inactivó la enzima a 80 °C durante 20 minutos. La definición de unidad enzimática provista por el fabricante es, “la cantidad de enzima requerida para completar la digestión de 1  $\mu$ g de ADN de fago  $\lambda$  en una hora a 37 °C en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l”. En los casos en que fue necesario el corte con dos enzimas de restricción se utilizaron las mismas condiciones descritas para EcoR I, excepto por la solución tampón utilizada. En estos casos la solución tampón fue elegida utilizando los datos provistos por el fabricante para que ambas enzimas tengan la mayor actividad. Los productos de corte de la reacción fueron luego corridos en una electroforesis en gel de agarosa-TAE 1X. La concentración de agarosa se eligió teniendo en cuenta el tamaño de los fragmentos de interés: 1 % para los fragmentos más grandes (plásmidos) y 2 % para los fragmentos más pequeños (insertos).

## **12- SECUENCIACIÓN.**

La presencia, integridad y sitio de inserción de todos los fragmentos de ADN o ADNc clonados en los plásmidos correspondientes fueron comprobados por secuenciación. Para ello, los plásmidos fueron obtenidos y purificados mediante “minipreps” y llevados a 0,2  $\mu$ M en H<sub>2</sub>O bidestilada. Las alícuotas de plásmidos se secuenciaron utilizando un secuenciador automático ALF, de Pharmacia LKB y un “kit” de marcación fluorescente del mismo fabricante (servicio institucional de la Fundación Instituto Leloir). Los plásmidos pGEM-T con insertos se secuenciaron utilizando los cebadores estándar T7 y SP6 y los

plásmidos con base pcDNA 3.1 (+/-), de Invitrogen, se secuenciaron usando el primer basado en la secuencia T7.

### **13- ANÁLISIS DE LA SECUENCIA *IN SILICO***

La secuencia clonada a partir del DD fue utilizada para realizar una búsqueda con el programa BLAST [239]. Para la predicción de la localización subcelular de CISD1 se utilizó el programa PSORT II [240, 241] y para identificar posibles dominios funcionales la secuencia fue analizada mediante los programas ProDom [242], ESPript [243, 244], , PROSITE [245], BLOCKS [246], PRINTS [247] y Pfam [248, 249] disponibles en línea en el servidor de Internet "Motif" [250]. El programa COMPUTE pI/Mw, del servidor ExPASy [251] se utilizó para el cálculo del peso molecular. La información sobre la localización del gen en el genoma y la distribución en los distintos tejidos fue provista por la página GeneCards [252] del instituto Weizmann de Israel.

### **14- LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE CISD1 POR MICROSCOPIA CONFOCAL.**

Con el fin de estudiar la localización subcelular de CISD1 se construyó una proteína de fusión con CISD1 y EGFP. La proteína CISD1 constituyó la región N- terminal y la proteína EGFP la región C-terminal. Dicha proteína fue expresada en un vector (pcEGFP) modificado para tal fin y transfectado en las distintas líneas celulares mediante la técnica de electroporación como se describe mas adelante. Posteriormente se las incubó sobre cubre objetos en placas de 24 pozos, como se indicó anteriormente para el resto de las células. Luego de la incubación fueron fijadas con paraformaldeído recién preparado (4% de paraformaldeído, glucosa 4%, PBS 1 x) y observadas por microscopía confocal. Para los ensayos *in vivo* las células transfectadas se cultivaron en placas de cultivo especiales para microscopía confocal de 8 pocillos marca "Lab-Tek II" (Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY).

### **14.1- El plásmido pcEGFP**

El plásmido utilizado para la construcción y posterior expresión de la proteína quimérica CISD1-EGFP fue el pcEGFP. Es un plásmido pcDNA3.1(+) de Invitrogen modificado por la inserción, entre los sitios de corte para EcoR I y Not I, de un fragmento escindido con las mismas enzimas desde el plásmido pEGFP-1 (Becton Dickinson & co., Franklin Lakes, NJ). Dicho fragmento de 773 pb contiene el ADNc de la EGFP junto con una porción del sitio de multi-clonado del pEGFP-1.

### **14.2- Producción de la proteína de fusión CISD1-EGFP.**

Para generar la proteína quimérica CISD1-EGFP, se amplificó el ADNc de CISD1 desde el plásmido pGEM-T/CISD1. Se utilizó en la PCR un par de cebadores con los sitios de corte para EcoR I y HinD III. Como la proteína CISD1 debía ser expresada en la zona amino-terminal, los cebadores fueron diseñados teniendo cuidado de borrar el codón de terminación de la traducción de esta proteína y se verificó que además quedara en fase con la EGFP. Las secuencias diseñadas de dichos cebadores fueron para el cebador “forward” con la secuencia para HinD III: 5-GGAGACCCAAGCTTAGTGATTAGC CAGCGAACCCG-3 y para el cebador “reverse” con la secuencia para EcoR I: 5-CGACTGCAGAATTCTAGTTTCTTTTTCTTGATGATCAGAGGG-3. Tanto el plásmido pcEGFP como el producto de la PCR con los sitios de corte generados fueron cortados con EcoR I y HinD III; los productos de corte fueron corridos en un gel de agarosa y luego purificados con el sistema GENECLAN II. Los fragmentos purificados fueron agregados a la reacción de ligación con la ligasa de ADN del fago T4 en las relaciones molares 1:3 y 1:6 (vector : inserto), para disminuir la probabilidad de religación del vector. El producto de ligación fue utilizado para transformar bacterias DH5 $\alpha$ , amplificarlo y purificarlo. La secuencia de la quimera fue corroborada por secuenciación, como fue descrito anteriormente. Los clones con la construcción fueron cultivados en una escala mayor para obtener la cantidad de plásmido necesaria para las electroporaciones.

Las electroporaciones se llevaron a cabo en un electroporador de onda cuadrada ECM 830 BTX (Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA), ajustado a un pulso de 70 ms de 150 V para las CFDE y CFDE/6repCFTR o 120 V para las T84. Cada electroporación se realizó utilizando 40 µg/ml de plásmido en un volumen de 400 µl de medio DMEM-F12 sin suero ni antibióticos, conteniendo  $4 \times 10^6$  células CFDE, CFDE/6repCFTR o T84, en una cuveta para electroporación de células eucariotas de 4 mm de distancia entre electrodos, marca Bio-Rad (Hércules, CA).

### 14.3- Preparación de las muestras.

Las células producto de la electroporación fueron cultivadas sobre cubreobjetos de microscopía como se describió previamente y luego fijadas con una solución de paraformaldehído 4%, glucosa 4% en PBS 1X durante 20 minutos. Los residuos de paraformaldehído fueron neutralizados incubando las células con buffer TBS 1X (Tris-HCl 20 mM, 0,5 M NaCl, pH 7,4). Los cubreobjetos fueron lavados dos veces con PBS 1X y colocados invertidos sobre un portaobjetos con una gota de FluorSave® (Calbiochem, Merk KGaA, Darmstadt, Germany) y sellados con esmalte para uñas.

Para estudiar la expresión de la quimera *in vivo*, las células fueron sembradas en cámaras de cultivo para microscopía de 8 pocillos marca Lab-Tek (cat. 155411) de Nalge Nunc International (Naperville, CA) y colocadas en la platina termostaticada del microscopio a 37°C, con la cámara de CO<sub>2</sub> ajustada al 5% o utilizando simplemente PBS, para tiempos cortos de incubación.

Para corroborar la localización mitocondrial de CISD1:EGFP se utilizó la sonda tetra-metil-rodamina-etil-éster o TMRE (Ex./Em. 549/573 nm), en una concentración 20 nM. Las células se incubaron con la sonda durante 20 min. en DMEM-F12 sin suero fetal bovino, en las cámaras de cultivo. Luego las células se lavaron con DMEM-F12 sin suero y se llevaron al microscopio confocal para ser visualizadas.

### 14.4- Obtención de las imágenes por microscopía confocal.

Para la visualización de las células se utilizó un microscopio confocal invertido marca Zeiss LSM510 de Carl Zeiss (Jena, Alemania), con platina termostatzada, controlador de temperatura y cámara de cultivo con inyector, recirculador y controlador de CO<sub>2</sub>.

La proteína verde fluorescente (EGFP, Ex./Em. 490/509 nm) fue excitada con un haz de luz láser de 488 nm y su emisión fue adquirida a través de un filtro LP ("long pass") de 505 nm (verde). Para la excitación de la sonda fluorescente mitocondrial TMRE se utilizó un haz láser de 543 nm y un filtro BP ("band pass") de 560-615 nm (rojo).

### 15.- ANTICUERPOS POLICLONALES EN CONEJO

Para la generación de anticuerpos para CISD1 se utilizaron dos conejos Nueva Zelanda blancos y se siguió un protocolo estándar de inmunización (servicio Institucional de la Fundación Instituto Leloir) con un péptido sintético unido a BSA. Brevemente, luego de la cuarentena tras la llegada de los conejos, se les extrajo una muestra de sangre para obtener el suero pre-inmune, el cual fue utilizado como control negativo. Luego se les administró una primera inyección vía intraperitoneal de 500 µg de péptido YKRFYVKDHRNKAMINLC-BSA (sintetizado a pedido en Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX), con adyuvante completo de Freund (SIGMA). Luego se realizaron dos inyecciones subcutáneas adicionales, cada 15 días, con 250 µg del mismo péptido, pero ahora con adyuvante incompleto de Freund. Posteriormente se determinó el título del anticuerpo por DOT-BLOTs en membranas de nitrocelulosa, utilizando 1 µg de péptido sintético en cada punto, que fueron incubados con diluciones seriadas del suero extraído de la sangre que se tomó de la oreja de los conejos. Una vez establecido el título, se procedió a obtener el suero a partir de la sangre total del conejo, la cual fue extraída por punción cardíaca bajo anestesia. Para extraer el suero se colocó la sangre en tubos de centrífuga tipo FALCON (de 50 ml) y se la incubó a 37

°C para favorecer la coagulación; posteriormente se la llevó a 4 °C para producir el encogimiento del coágulo y se extrajo el suero del sobrenadante. El suero fue llevado a una concentración de glicerol del 50 % (1 parte de suero más 2 partes de una solución de 75 % de glicerol, 25 % de PBS (v/v) conteniendo el PBS BSA al 2,5 %, pH 7.4); luego fue alicuotado y conservado a -20 °C.

### 16.- INMUNOHISTOQUÍMICA.

El suero policlonal de conejo contra CISD1 obtenido fue utilizado para realizar una inmuno-histoquímica en el modelo celular de FQ compuesto por las células CFDE y CFDE/6repCFTR. Para ello se cultivaron las células mencionadas sobre cubreobjetos recubiertos con la matriz de fibronectina y colágeno ya descrita, hasta alcanzar un 80 a 90 % de confluencia (se sembraron  $3 \times 10^4$  células CFDE /cm<sup>2</sup> y  $5 \times 10^4$  células CFDE/6RepCFTR /cm<sup>2</sup>). Las células de los cubreobjetos fueron luego lavadas con PBS 1X y fijadas con una solución de paraformaldehído 4%, glucosa 4% en PBS 1X, durante 20 minutos. El paraformaldehído residual fue neutralizado por incubación con buffer TBS 1X (Tris 20 mM, 0,5 M NaCl, pH 7,4) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los cubreobjetos fueron lavados dos veces con PBS 1X y las células fueron permeabilizadas con una solución de Tritón X-100 al 0.5 % durante 5 min. en PBS 1X.

Las células permeabilizadas fueron bloqueadas con leche descremada en polvo al 2,5% en PBS 1X durante 1 h a temperatura ambiente y fueron incubadas con distintas diluciones de suero anti-CISD1 en PBS 1X y las mismas diluciones de suero pre-inmune fueron utilizadas como control negativo, en células CFDE/6repCFTR. Luego, las células fueron lavadas nuevamente con PBS 1X 2 veces por 15 min. y fueron reveladas con una dilución 1:250 de un anticuerpo monoclonal contra IgG de conejo unido a FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en PBS 1X con leche descremada al 2% por 2 horas y lavadas 3 veces con PBS 1X durante 15 min. Los cubreobjetos fueron colocados invertidos sobre un portaobjetos con una gota de FluorSave®

(Calbiochem, Merk KGaA, Darmstadt, Germany) y sellados con esmalte para uñas.

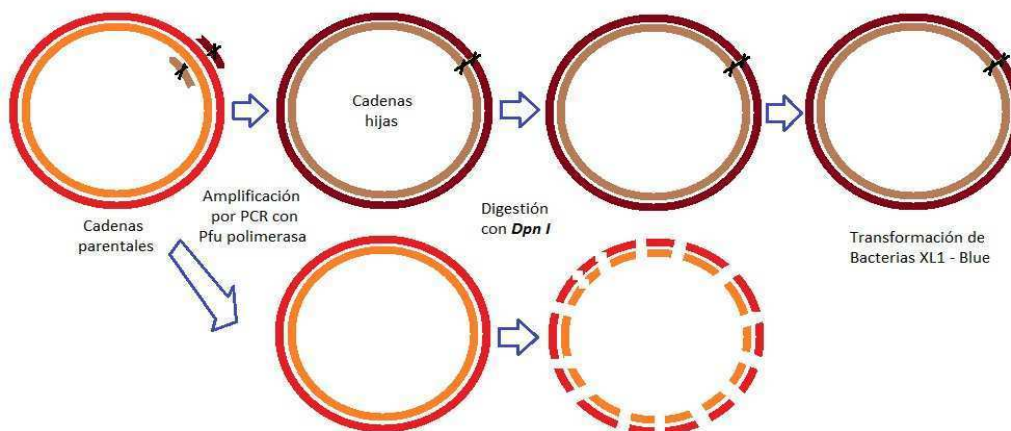
Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal utilizando una configuración de filtros para FITC. Brevemente, la muestra fue excitada con un haz de luz láser de 488 nm con un espejo del tipo “Beam Splitter” HFT 488/543 y su emisión fue adquirida a través de un filtro del tipo BP (“Band pass”) de 505/530 nm..

### **16- OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pcCISD1 y pcCISD1<sub>(C72-74S)</sub> POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.**

Para realizar los ensayos de rescate (recuperación de la función mitocondrial por expresión ectópica de CISD1) y de competencia (con mutantes) de la función de CISD1, se realizaron construcciones en plásmidos para la expresión en eucariotas de la proteína CISD1 salvaje y CISD1 mutada. Las mutaciones se realizaron en las cisteínas 72 y 74, correspondientes al sitio de unión del grupo 2Fe-2S, que fueron reemplazadas por serinas. En ambos casos se utilizó el plásmido de expresión en eucariotas pcDNA3.1(-) de Invitrogen. Para expresar la proteína CISD1 salvaje en células CFDE se amplificó por PCR el ADNc de CISD1 clonado en pGEM-T, utilizando el cebador “forward” 5'-TATCTGCAGAATTCAGTAGTGATTAGCCAGCGAACC-3', con un sitio de corte para EcoR I, y el cebador “reverse” 5'-TTAAACTTAAGCTT CGATTAGCCAGC GAAGGTGAATCA-3, con un sitio de corte para Hind III. El producto de la PCR y el plásmido pcDNA3.1(-) fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoR I y Hind III y seguidamente, fueron purificados en un gel de agarosa, para luego ser ligados al plásmido con la ligasa de ADN T4 y luego clonados en bacterias, como se describió para el plásmido pcCISD1-EGFP.

El plásmido pcCISD1<sub>(C72-74S)</sub> fue generado a partir del plásmido pcCISD1 por mutagénesis dirigida utilizando el sistema QuickChange® II de STRATAGENE (Agilent Technologies, La Jolla, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Resumidamente, el sistema se basa en la amplificación durante unos pocos ciclos (en este caso fueron 18 ciclos),

mediante la enzima ADN polimerasa de alta fidelidad PfuUltra® (provista en el sistema) de todo el plásmido que expresará la mutante (ver esquema I). Para la PCR se utilizaron los cebadores “forward” 5-GATAAAGCTGTG TACAGCCGTAGTTGGAGGTCCAAAAAG-3 y “reverse” (complementario al “forward”) 5-CTTTTTGGACCTCCAACTACGGCTGTACACAGCTTTATC-3. Estos cebadores fueron diseñados con las mutaciones en las primeras timidinas de los codones 72 y 74 (subrayado), cambiadas por adeninas (en negrita). Dicho cambio genera en la proteína la sustitución de las cisteínas 72 y 74 por serinas.



**Esquema I. Pasos para la obtención de pcCISD1<sub>(C72-74S)</sub> por mutagénesis dirigida.** Las cadenas parentales (metiladas) son amplificadas por PCR con cebadores diseñados con la mutación, luego de varios ciclos se digieren con la enzima *Dpn I* y las bacterias XL1-Blue son transformadas con las cadenas hijas portadoras de la mutación que no fueron digeridas por no estar metiladas. [253]

A partir del cebador “forward”, la PfuUltra® generó la cadena “sentido” (entera) del plásmido y a partir del “reverse”, generó la cadena “antisentido” completa. Las cadenas “hijas” fueron generadas portando las mutaciones mencionadas y como provienen de una síntesis *in vitro*, no se encontraban metiladas. Este último hecho es aprovechado por este sistema para digerir las cadenas “madre” metiladas, utilizando en un paso posterior la enzima *Dpn I*. La enzima *Dpn I* es una exonucleasa que reconoce y corta la secuencia metilada o hemimetilada 5’-GmATC-3’, degradando selectivamente los



plásmidos que poseen al menos una de las hebras “madre” salvajes [254, 255]. El producto de la reacción fue utilizado para transformar células supercompetentes XL1-Blue, las que fueron sembradas en placas de Petri con LB-Agar-Ampicilina [235]. Posteriormente se purificó el plásmido mediante una “miniprep” y se confirmó por secuenciación la presencia de ambas mutaciones.

### **17- SELECCIÓN DE LAS LINEAS CELULARES TRANSFECTADAS.**

Los plásmidos con las construcciones basadas en el vector pcDNA3.1 fueron transfectados en células eucariotas, que fueron luego seleccionadas con el antibiótico Geneticina (G418) de Gibco (Invitrogen). Para cada nueva línea celular se determinó la concentración de antibiótico adecuada para la selección, realizando ensayos a distintas concentraciones en células transfectadas y no transfectadas, sembradas en multi placas de cultivo de 6 pocillos (marca Nalge Nunc International; Rochester, NY). El criterio para determinar la concentración fue la menor concentración de geneticina que resultase en un 100% de células no transfectadas muertas al cabo de dos semanas, teñidas con tinción vital de azul de Trypan.

### **18- MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL MEDIANTE BN-PAGE (“BLUE NATIVE - POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS”)**

#### **18.1- Extracción de mitocondrias**

La extracción de mitocondrias se llevó a cabo utilizando el método descrito por Majander y col. [256], con algunas modificaciones. Brevemente, las células se lavaron dos veces con PBS 1X frío en presencia de inhibidores de proteasas (100  $\mu$ M PMSF, 10  $\mu$ M leupeptina, 10  $\mu$ M pepstatina, 2 mM EDTA, pH 7.4); se levantaron con rastrillo de goma y se centrifugaron a 600 x g durante 5 min. a 4 °C. El precipitado de células fue pesado y resuspendido llevándolo a una concentración de 250 mg/ml, en una solución amortiguadora

de aislamiento (IB) [0,25 M sacarosa, 25 mM MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico), pH 7,4], que contenía las mismas concentraciones de inhibidores de proteasas que se utilizaron en el PBS 1X para el rastrillaje de las células. A la suspensión de células se le agregó digitonina 0,12 % p/v y se la dejó en hielo por 40 seg.; luego se la diluyó en tres volúmenes de IB y se aplicó un pulso de 10 seg. A máxima velocidad con un homogenizador ULTRA-TURRAX T8 (IKA Labortechnik, Alemania), manteniendo la muestra en hielo. Luego se centrifugó a 10.000 x g por 20 min. a 4 °C, se resuspendió el precipitado en 500-800 µl de solución amortiguadora de aislamiento y se centrifugó 5 min. a 800 x g a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min. y el precipitado final se resuspendió en 20-40 µl de “buffer” de muestra A de BN-PAGE (1 M ácido aminocaproico, 50 mM bis-Tris-HCl, pH 7,0) con cóctel de inhibidores de proteasas y se guardó a -80 °C hasta el momento del ensayo. La cuantificación de proteínas se realizó con el método de Lowry, adaptado para proteínas de membrana (muestras pretratadas con una solución final de NaOH 0,2 N, durante 1 hora a 37°C) [257].

### **18.2- Preparación de las muestras para el BN-PAGE**

Los complejos mitocondriales fueron solubilizados a partir de las mitocondrias extraídas de acuerdo al protocolo de Schägger y col. [258], con pequeñas modificaciones. Se tomaron fracciones de 50-100 µg de proteínas mitocondriales y se resuspendieron en “buffer” de muestra A de BN-PAGE a una concentración de 3 µg/µl. Los complejos proteicos fueron extraídos de la membrana interna mitocondrial con el detergente dodecil-maltósido (0,8 %, concentración final en “buffer” de muestra A), por resuspensión suave, seguida de una centrifugación a 20.000 x g durante 45 min., a 4 °C. Al sobrenadante se le agregó “buffer” de muestra B de BN-PAGE (5 % “coomassie brilliant blue” G-250 en ácido aminocaproico 1 M, bis-Tris-HCl 50 mM, pH 7,0) en una proporción de 1:14 (volumen de “buffer” B : muestra en “buffer” A) [259]

### 18.3- Preparación del gel de poliacrilamida para BN-PAGE

Los BN-PAGE se realizaron en una cuba de electroforesis vertical modelo Miniprotein III (Bio-Rad). Los geles se elaboraron con un gradiente del 5 al 13 % de poliacrilamida y con un gel concentrador del 4 % de poliacrilamida. Todas las soluciones amortiguadoras usadas para la corrida electroforética y la preparación del gel se prepararon según el protocolo provisto por Schägger y von Jagow [258], con algunas modificaciones. Los geles se prepararon utilizando una solución de acrilamida 30 % y una solución amortiguadora para BN-PAGE 3X (bis-Tris-HCL 500 mM, ácido aminocaproico 1,5 M, pH 7.0). Para evitar al máximo la degradación/disgregación de los complejos mitocondriales, el equipo de electroforesis con el gel y las soluciones amortiguadoras para la corrida fueron enfriados a 4 °C antes de cargar las muestras (el volumen máximo de carga por muestra fue de 20 µl); en las corridas se cargaron entre 40 y 100 µg de proteína por calle. También se corrieron marcadores de alto peso molecular para geles nativos (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England).

### 18.4- Condiciones de electroforesis

Los BN-PAGES fueron corridos con la cuba de electroforesis totalmente sumergida en hielo granizado durante todo el ensayo, para evitar que la temperatura generada durante la corrida desnaturalizase los complejos. La electroforesis se efectuó en dos fases: la primera fue realizada a 80 voltios (V), para permitir la llegada de las proteínas al gel de separación. En la segunda fase, el voltaje fue aumentado a 300 V, con un límite en la corriente de 15 mA. Para la corrida se utilizaron dos soluciones amortiguadoras: una denominada solución amortiguadora de cátodo (Tricina 50 mM, bis-Tris-HCl 15 mM, "coomassie blue" G-250 0,02 %, pH 7,0) y la otra una solución amortiguadora de ánodo (bis-Tris-HCL 50 mM, pH 7,0). Para comenzar a lavar el gel y disminuir el posterior fondo azul, en cuanto el frente de corrida alcanzó la mitad del gel, se reemplazó la solución amortiguadora de cátodo que contenía "coomassie blue" por otra solución amortiguadora de cátodo sin el colorante.

### **18.5- Determinación de la actividad catalítica del Complejo I mitocondrial (CI<sub>m</sub>), *in gel*.**

Una vez terminada la electroforesis se retiró el gel de la cuba y se reveló la actividad NADH deshidrogenasa del CI<sub>m</sub> *in gel*. Para ello se incubó el gel en una solución compuesta por Tris-HCl 0,1 M, NADH 0.14 mM y NBT (“nitro blue tetrazolium”) 1 mg/ml, pH 7.4 [260], durante 30-40 min a temperatura ambiente. Una vez que la actividad del CI<sub>m</sub> fue revelada, la reacción se detuvo utilizando una solución de fijación (45 % metanol, 10 % ácido acético). El gel se dejó en esa solución toda la noche, para eliminar el fondo generado por la tinción con el “coomassie blue” que lleva la solución amortiguadora de cátodo. Los geles se digitalizaron con un “scanner” HP4C y se guardaron como archivos en formato TIFF (con una resolución de 600 dpi) para su posterior cuantificación densitométrica. Luego, los geles fueron teñidos con “coomassie brilliant blue” y fueron digitalizados para cuantificar por densitometría la carga de proteínas en cada calle del gel. La cuantificación de la actividad del CI<sub>m</sub> fue normalizada con respecto a la cuantificación de la carga de proteínas mitocondriales, obteniéndose de este modo la actividad relativa del CI<sub>m</sub>. La actividad relativa de cada muestra control fue considerada como el 100 % de actividad.

### **18.6- Tinción de los geles BN-PAGE con “coomassie blue”**

Los geles se incubaron durante 1 horas en solución de tinción (0,25 % “coomassie brilliant blue” R250, 40 % metanol y 7 % ácido acético) con agitación constante y el destañido se realizó por incubación en una solución de 10 % de ácido acético y 10 % de metanol, en agitación constante toda la noche.

## **19- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los diferentes gráficos fueron obtenidos utilizando el programa ORIGIN Pro (Originlab Co., Northhampton, MA, USA) o EXCEL de Microsoft corp. Los

valores finales se obtuvieron del promedio de al menos dos duplicados de un experimento representativo de tres o más experimentos independientes. En general se usaron triplicados intra e inter-ensayo. La significancia de las diferencias observadas fue determinada mediante análisis de ANOVA y el test de Tukey HSD, utilizando el programa STATS (StatSoft, Tulsa, OK). Las imágenes de los BN-PAGE se cuantificaron por densitometría con el programa NIH Scion Image (<http://www.scioncorp.com>). Todas las figuras de BN-PAGE corresponden a resultados representativos de al menos dos experimentos, cada uno por duplicado. Cuando se indican barras de error, éstas provienen de resultados promediados, obtenidos de al menos dos experimentos independientes.

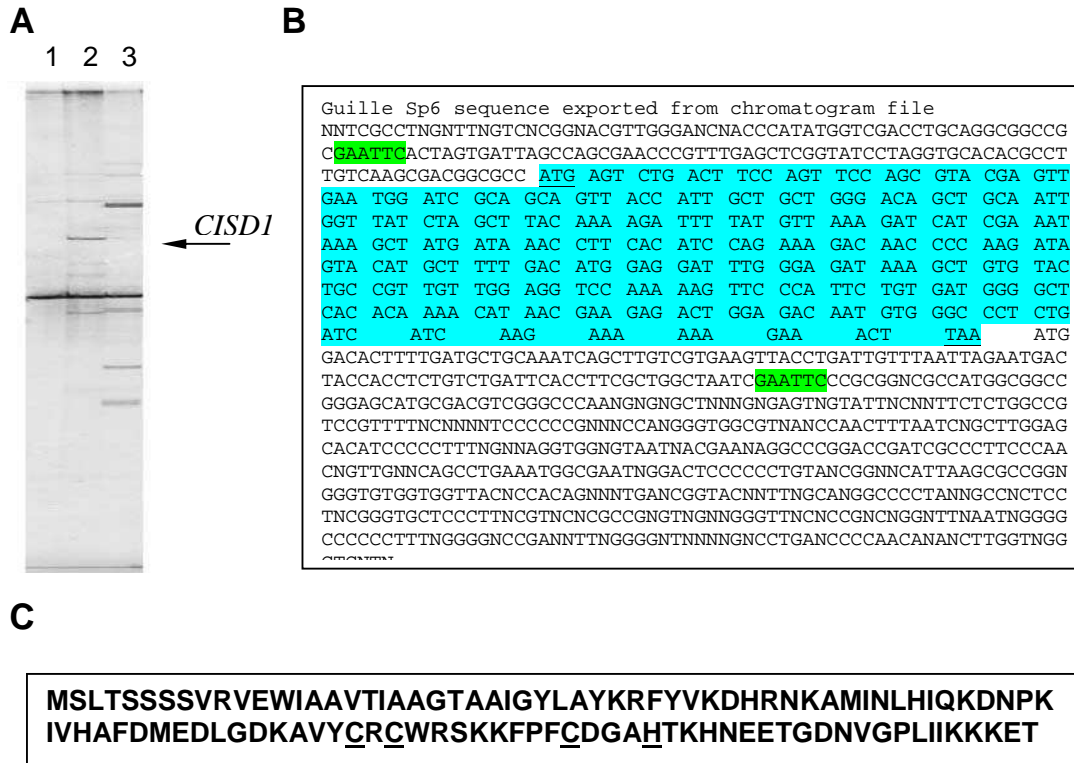
## **RESULTADOS**

**I- RESULTADOS PREVIOS****I.I- “Differential Display” o “Display” Diferencial (DD)**

Como se mencionara en la introducción, comenzamos este trabajo a partir de los resultados obtenidos en uno de los DD realizados en nuestro laboratorio [217]. Se describen aquí brevemente estos resultados previos, porque son importantes para entender con más claridad los resultados obtenidos posteriormente y las estrategias seguidas para obtenerlos, y que forman parte de este trabajo de Tesis.

Se utilizó como modelo experimental células CFDE, provenientes de glándulas de epitelio de tráquea de un paciente con fibrosis quística, células CFDE/6RepCFTR provenientes de células CFDE transfectadas con un plásmido que expresa CFTR salvaje (“células corregidas”) y éstas últimas tratadas con un inhibidor de la actividad de transporte de cloruro a través del CFTR, denominado glibenclamida. El tratamiento con este inhibidor fue durante 24 horas a una concentración de 50  $\mu$ M.

En el DD se identificó una banda con mayor intensidad en la calle correspondiente a la muestra obtenida de las células corregidas CFDE/6RepCFTR respecto de las muestras obtenidas de células CFDE (FQ) y de células CFDE/6RepCFTR tratadas con el inhibidor del canal de cloruro. Esta banda cuya intensidad se vio aumentada, corresponde a un gen cuya expresión es afectada por la actividad del canal de cloruro CFTR o, mejor dicho, la expresión del gen identificado se encontraba disminuida en células FQ (Figura 8 A). Es comprensible, por lo tanto, que este aumento de intensidad revierta cuando a las células CFDE/6RepCFTR se las trata con glibenclamida, (Figura 8 A, 6Rep+Gli), siempre que el efecto observado sea específico de la función de transporte de cloruro del CFTR. Este mismo comportamiento fue observado con el gen mitocondrial que identificamos previamente como MTND4, que codifica una subunidad del complejo I de la cadena respiratoria [211, 212], mientras que estudios anteriores revelaron que SRC y MUC1 presentaban un comportamiento opuesto, es decir, están sobreexpresados en FQ [38].



**Figura 8: Identificación de un nuevo gen dependiente de la actividad del CFTR.** (A) Display Diferencial (DD) de células CFDE y CFDE/6RepCFTR. 1: Células CFDE; 2: Células CFDE corregidas mediante la expresión ectópica de CFTR salvaje (CFDE/6RepCFTR) 3: Células CFDE/6Rep CFTR tratadas con el inhibidor de la actividad de transporte de Cl<sup>-</sup> del CFTR glibenclamida (50 μM, 24 hs). (B) Secuencia clonada en pGEM-T correspondiente al fragmento de ADNc indicado con una flecha en (A). Los sitios generados de Eco RI están resaltados en verde y los codones de inicio y fin de la traducción están subrayados. Esta secuencia fue 100 % idéntica a la secuencia del marco de lectura 70 del cromosoma 10 humano (c10orf70) (C) Secuencia traducida de CISD1, la cisteína 72, 74, 83 y la histidina 88 están subrayadas.

La banda del DD que presentaba este comportamiento fue recortada y el fragmento de ADN copia fue aislado, amplificado por PCR, purificado por gel de agarosa y finalmente, clonado en un plásmido y secuenciado. La secuencia obtenida fue analizada *in silico* mediante el programa BLAST [261], en todos los marcos de lectura. Se encontró que esta secuencia pertenece a un gen del cromosoma 10, q10orf70, de expresión y función desconocidas. Como se indicó anteriormente (sección 9.2), y dado que q10orf70 es un nombre demasiado inespecífico, inicialmente denominamos a la proteína correspondiente a este fragmento KLPx por su aparente similitud con kinesinas [262], luego ZCD1, por poseer un dominio del tipo CDGSH similar a los “Zn



fingers” y finalmente *CISD1*, con el acuerdo de HUGO y de otros autores, por poseer un cluster 2Fe-2S.

En la figura 8 B se muestra la secuencia obtenida por secuenciación del fragmento clonado en el plásmido pGEM-T (Promega, WI). Resaltado en verde se muestran los sitios de restricción generados para EcoR I y en celeste el marco de lectura abierto que corresponde a *CISD1*.

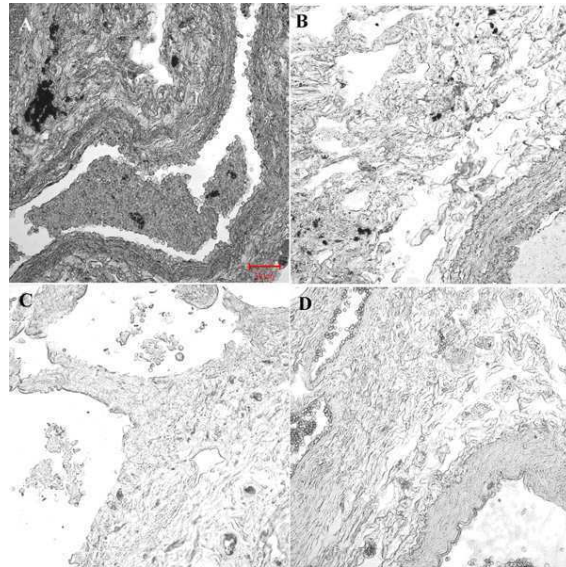
### **I.II- Hibridación *in situ* en tejido pulmonar humano**

La expresión diferencial de *CISD1* parecía evidente en el DD, pero había que determinar si esta diferencia de expresión ocurría también en las células de tejidos provenientes de pacientes FQ y controles normales. Para ello, se hicieron ensayos de hibridación *in situ* en cortes de pulmón humano con una sonda específica para *CISD1* biotinilada, la que luego fue incubada con estreptavidina-fosfatasa alcalina. La reacción de fosfatasa alcalina fue revelada con NBT y BCIP [217]. La tinción del tejido pulmonar marcado con la sonda de reconocimiento específica para *CISD1* biotinilada, muestra una menor intensidad de actividad de fosfatasa alcalina en el tejido proveniente del paciente FQ (Figura 9 C), comparada con la tinción observada en el tejido proveniente del paciente control (que no tenía FQ) (Figura 9 A). Estos resultados sugieren una menor expresión del gen *CISD1* en la muestra del paciente FQ (Figura 9 C).

En los cuadros 9 B y D, se muestran los controles de especificidad de la sonda de *CISD1*, correspondientes a incubaciones con la sonda marcada competida con sonda sin marcar en relación 1:100.

Si bien estos resultados mostraron que en FQ el gen *CISD1* tenía una tendencia a expresarse en menor proporción que en tejidos normales, no eran suficientes para confirmar las observaciones del DD, porque la disminución de *CISD1* podía atribuirse a otros factores. Por ejemplo, a efectos de infecciones pulmonares a las que son propensos los pacientes FQ, o a los tratamientos que podrían haber sufrido los pacientes de los que provenían los cortes de pulmón “normal”. Debido a estos hechos, decidimos validar los resultados del DD

utilizando otros métodos y tratar de encontrar qué consecuencia tenía la disminución de la expresión del gen *CISD1* en nuestro modelo experimental.



**Figura 9: Hibridación *in situ* en cortes de tejido pulmonar.** La sonda de *CISD1* fue marcada con biotina y revelada con fosfatasa alcalina-estreptavidina. **(A)** Cortes de tejido de pulmón humano que expresan CFTR salvaje incubado con la sonda de *CISD1* marcada con biotina. **(B)** cortes de tejido del mismo origen incubado con la sonda de *CISD1* marcada con biotina y competida con sonda sin marcar **(C)** Cortes de tejido de pulmón humano proveniente de un paciente FQ incubado con la sonda de *CISD1* marcada con biotina. **(D)** Corte de tejido del mismo origen incubado con la sonda de *CISD1* marcada con biotina y competida con sonda sin marcar. (X 100)

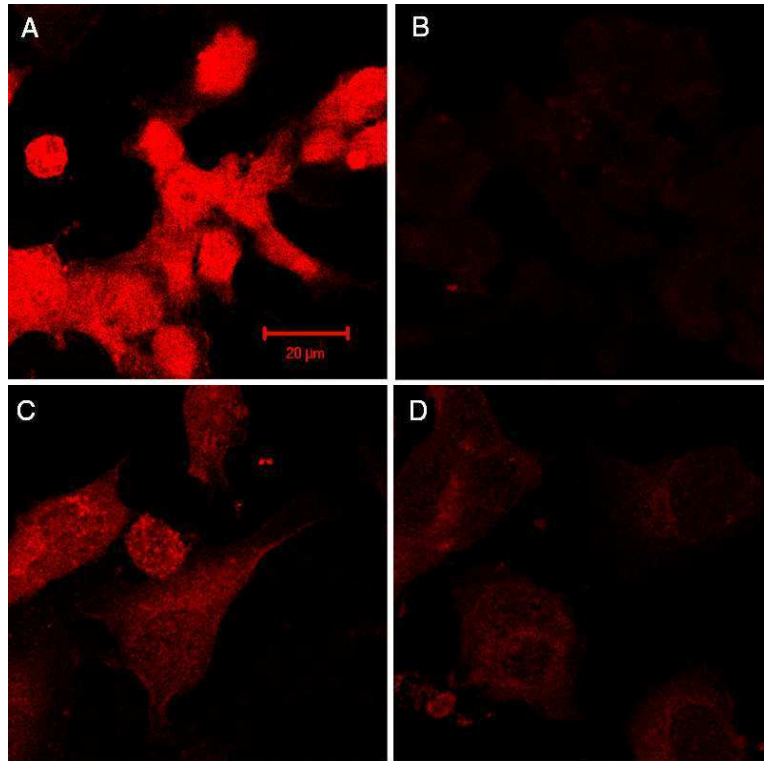
### **I.III- Estudio de la expresión diferencial de *CISD1* mediante FISH confocal.**

La expresión diferencial de *CISD1* observada en el DD, fue corroborada mediante la técnica de hibridación fluorescente *in situ* o FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) en células CFDE, CFDE tratadas con glibenclamida, CFDE/6repCFTR y CFDE/6repCFTR con glibenclamida, mediante microscopía confocal.

El tratamiento de las células CFDE/6repCFTR con glibenclamida produjo una disminución en la expresión de *CISD1*, traducida en una

## RESULTADOS

disminución de la fluorescencia respecto del control sin tratamiento (Fig. 10 A y B). Si bien la intensidad de fluorescencia de las células CFDE/6repCFTR es mucho mayor, en las células CFDE puede observarse algo de fluorescencia (Fig. 10 C), la que disminuye drásticamente al tratar dichas células con glibenclamida (Fig. 10 D). De esta manera, se puede observar que la expresión de CISD1 en las células CFDE (FQ) no está totalmente anulada y que esta pequeña expresión es sensible de ser disminuida por la inhibición de la actividad residual del CFTR, utilizando glibenclamida como inhibidor.



**Figura 10. FISH confocal en células CFDE y CFDE /6RepCFTR.** Las células crecidas sobre un cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído y se, permeabilizaron con tritón X-100. La hibridación se realizó a 53 °C por 18 horas, utilizando como sonda el fragmento obtenido a partir del DD, marcado con dGTP-Rodamina por PCR. Luego se realizaron lavados con SSC 2X. Las células fueron observadas en un microscopio confocal LSM510, con un aumento de x 1000. **(A)** CFDE/6RepCFTR **(B)** CFDE/6RepCFTR glibenclamida **(C)** CFDE **(D)** CFDE glibenclamida.

Sin embargo, utilizando ISH o FISH, es difícil poder asegurar que la unión de la sonda ha sido únicamente, o al menos mayoritariamente, a su target. Es necesario validar estos resultados por otros métodos adicionales. Por otro lado, la glibenclamida puede tener efectos inespecíficos sobre las células, aparte de su capacidad para inhibir al CFTR y las células CFDE no constituyen el modelo ideal de FQ, como ya se discutió. Por estos motivos, en este trabajo de tesis se corroboran los estudios previos arriba descritos modulando los niveles de CFTR con otro inhibidor diferente, el CFTR(inh)-172, que es mucho más específico y potente que la glibenclamida. Además, para validar los resultados se utilizó en primer lugar PCR semicuantitativa y finalmente real-time PCR, cuando este método estuvo a nuestro alcance. Finalmente, se utilizaron otros modelos de FQ, como las células IB3-1 y S9, las células T84 y las células Caco-2. Como se explicó en materiales y métodos, las células IB3-1 portan una señal temprana de terminación de la traducción en un alelo y el gen del CFTR con la mutación  $\Delta F508$  en el otro, y las células S9 son células IB3-1 corregidas mediante la expresión ectópica de CFTR salvaje.

**RESULTADOS.**

**Objetivo 1: Validar los resultados obtenidos por DD sobre la expresión diferencial del gen *CISD1* en FQ.**

**1.1- RT-PCR semicuantitativa**

Con el fin de validar los resultados del DD y la hibridación *in situ*, empezamos por ensayar la modulación de la expresión de *CISD1* en el modelo celular de FQ constituido por las células CFDE y CFDE/6repCFTR, y estas últimas tratadas con inhibidores del CFTR. Para medir la expresión diferencial de *CISD1* utilizamos inicialmente la técnica de RT-PCR (“Reverse Transcriptase & Polymerase Chain Reaction”) semicuantitativa. Previamente a la extracción de ARN, las células fueron crecidas hasta un 70 - 80 % de confluencia y luego fueron incubadas 24 hs en medio sin suero (medio de ayuno). El ayuno de 24 hs. es muy importante ya que de lo contrario, las células estarían constantemente estimuladas por los factores de crecimiento, hormonas y otros factores que el suero fetal bovino contiene una alta concentración. Así, estas células reducen su velocidad de crecimiento estabilizando su metabolismo basal y las vías de señalización no se encuentran saturadas.

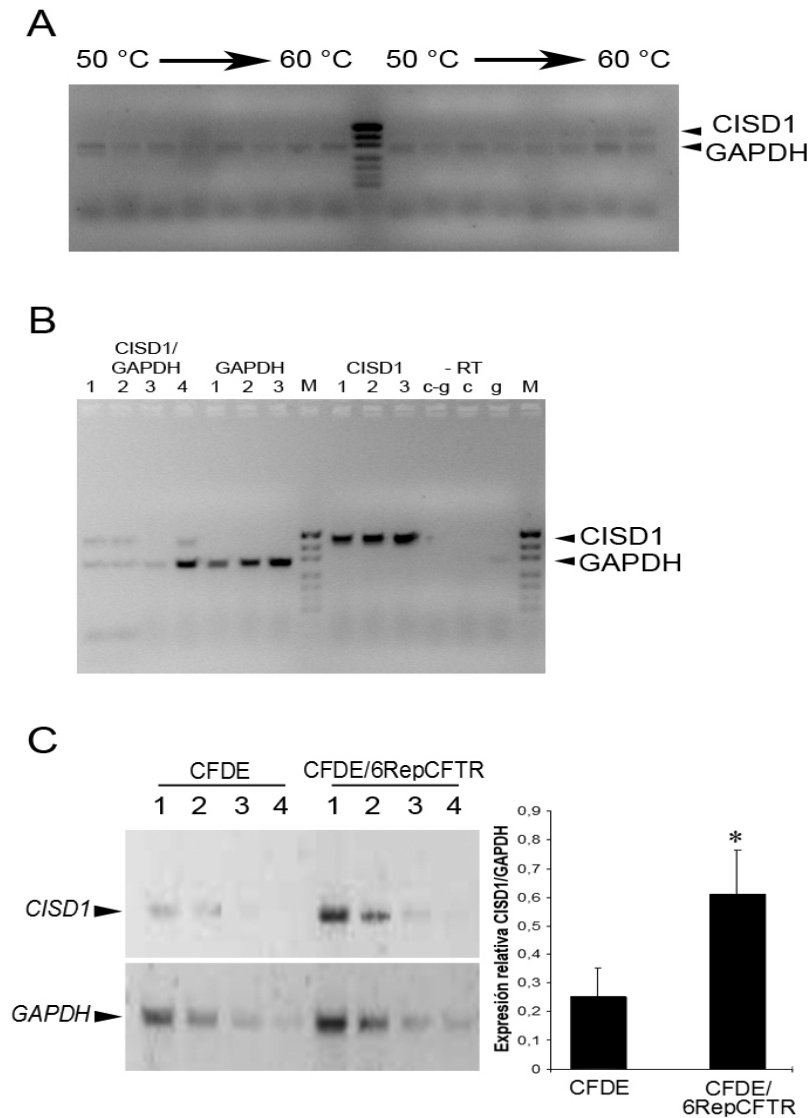
Para llevar a cabo la PCR semicuantitativa usamos el método de amplificación en forma paralela de una curva estándar [234] en lugar de un ensayo multiplex. Brevemente, se amplificaron por PCR, en tubos separados, las secuencias correspondientes a los genes *CISD1* y *GAPDH*, a partir de ADNc obtenido por retrotranscripción. En cada ensayo de amplificación se utilizaron plásmidos que contenían las secuencias correspondientes a amplificar de *CISD1* o *GAPDH*, según fuera el caso (*pGEM-CISD1* y *pGEM-GAPDH*). Estos plásmidos se utilizaron para construir curvas con concentraciones conocidas (curvas estándar), a partir de las cuales se calculó

la masa equivalente de cada gen. Dicha masa equivalente se refiere a la cantidad necesaria de plásmido, en ng, para que luego de la reacción de amplificación se obtenga en un gel de agarosa la misma intensidad de banda medida por densitometría. El nivel de expresión de *CISD1* fue calculado mediante la relación siguiente: (ng equivalentes de ADNc de *CISD1*)/(ng equivalentes de ADNc de *GAPDH*). Ambas magnitudes son ng relativos a los ng de plásmido, pero como para el cálculo se utilizan las mismas unidades en la relación, el cociente no posee unidades.

### **1.1.1-Puesta a punto del método de PCR “semicuantitativa”**

La RT-PCR semicuantitativa se basa en una cuidadosa puesta a punto de las condiciones de amplificación, para evitar la saturación de las bandas que luego serán medidas por densitometría. Para ello, se realizaron pruebas de los cebadores utilizando gradientes de temperatura de apareamiento. Luego se ensayaron varios programas con distinto número de ciclos de amplificación (Fig. 11 A) y varias diluciones al décimo de ADNc producto de la RT (Figura 11 C y 12 A, calles 1, 2, 3 y 4). Para poder utilizar esta técnica semicuantitativa de PCR, se realizaron diluciones seriadas del ADNc de cada muestra, de modo de poder cuantificar productos que estuviesen dentro del rango exponencial de amplificación. También se determinaron los números de ciclos necesarios para obtener, en la electroforesis, una banda que no se hallara saturada y que fuera cuantificable por densitometría.

La mejor forma de realizar una PCR semicuantitativa es hacerla en la modalidad “multiplex”, es decir, realizar la amplificación de varias secuencias “blanco” con sus respectivos pares de cebadores, todo en una misma reacción. De esta manera se reduce el error de manejar pequeños volúmenes en tubos separados. Para ello, se debe contar con la posibilidad de disponer de varios pares de cebadores y realizar pruebas combinándolos hasta obtener una amplificación “limpia” de cada blanco.



**Figura 11. Puesta a punto de la PCR semi-cuantitativa:** electroforesis en geles de agarosa de distintas pruebas concernientes a aspectos de la PCR semi-cuantitativa que tuvieron que ser tenidos en cuenta en la puesta a punto. **(A):** prueba de PCR “multiplex” en un gradiente de temperaturas de desnaturalización de los cebadores entre 50°C a 60°C (izq. 25 ciclos de amplificación; der. 28 ciclos de amplificación). **(B):** comparación de PCR “multiplex” y PCR estándar en reacciones independientes. Cisd1/Gapdh: Multiplex, calles 1-4: concentración creciente de ADNc; Gapdh: sólo con los cebadores para Gapdh; 1-3 concentraciones crecientes de ADNc; Cisd1, ídem Gapdh; -RT, controles negativos sin MMLV-RT, c-g: PCR “multiplex”, g, Gapdh y c: Cisd1. **(C):** der. Ejemplo de electroforesis de una PCR semicuantitativa de los productos de la RT a partir de RNA de células CFDE y CFDE/6repCFTR. (1-4 diluciones seriadas al décimo de ADNc), izq. Cuantificación por densitometría de bandas. ( $\bar{X} \pm ES$ , \* =  $p < 0,05$ ,  $n = 9$ )

Esto no fue así con los pares de cebadores que habíamos elegido para Cisd1 y Gapdh. Al colocar los dos pares de cebadores en la misma reacción, estos interfirieron entre ellos. Las interferencias se manifestaron como una

disminución de la intensidad de las bandas observadas en el gel de agarosa, correspondientes a *CISD1* y a *GAPDH* en la reacción “multiplex”, respecto de las intensidades observadas en las reacciones estándar con un solo par de cebadores. Debido a las interferencias mencionadas, la intensidad de la banda observada en la PCR semicuantitativa “multiplex” no se correlacionó con la concentración de ADNc en la mezcla de reacción (Fig. 11 A y B).

Las pruebas realizadas modificando las temperaturas de apareamiento en el programa de PCR tampoco dieron el resultado esperado, aún aumentando el número de ciclos (Fig. 11 A). Por esta razón, nos vimos obligados a realizar las reacciones de amplificación de *CISD1* y *GAPDH* en forma separada y concomitantemente, a aumentar el número de replicados para hacer estos resultados más fiables.

Encontramos que la cuantificación por éste método resultó ser más reproducible que en el caso de la RT-PCR “multiplex”, debido a que en este último sistema no se generaban interferencias apreciables entre los cebadores.

### **1.1.2- Expresión relativa diferencial de *CISD1* en FQ**

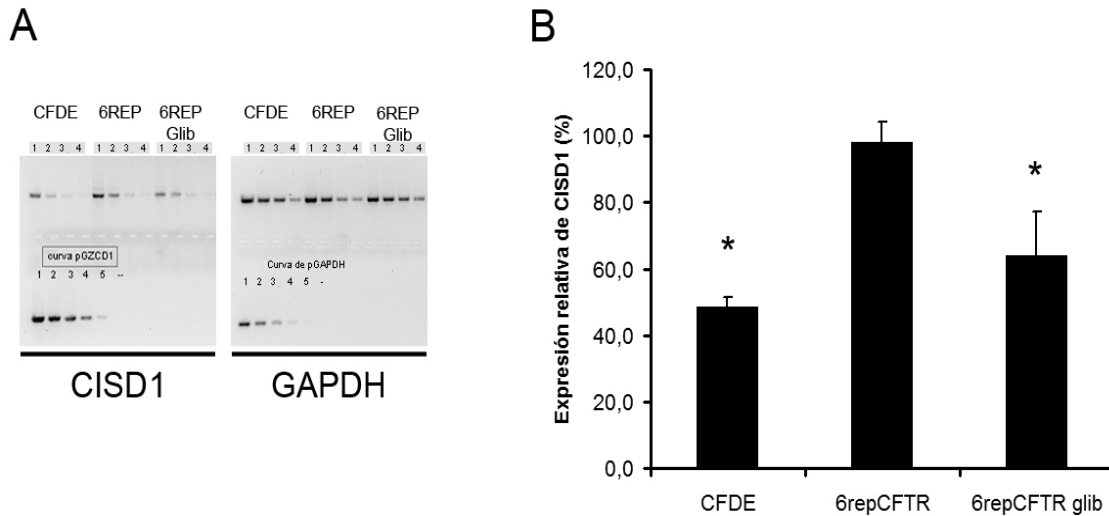
Una vez obtenidas las condiciones adecuadas se procedió a realizar los ensayos y cuantificarlos por densitometría de banda en geles de agarosa.

En la Figura 12 se muestran los niveles de expresión de *CISD1* observados en este modelo celular.

Cada ensayo fue llevado a cabo realizando diluciones seriadas al décimo del ADNc producto de la reacción de retro-transcripción. En la figura 12 A, se puede observar que la banda correspondiente a *CISD1* es más intensa en las células CFDE/6RepCFTR que en las células CFDE. La intensidad de banda de *CISD1* fue relativizada a *GAPDH*, utilizado como estándar interno. En la Figura 12 B, se muestra el gráfico correspondiente al promedio de tres experimentos independientes, con el nivel de expresión del gen *CISD1* representado por la relación entre su expresión y la expresión de *GAPDH*. El



nivel de expresión de ARNm de *CISD1* en las células CFDE/6RepCFTR fue significativamente mayor que en las células CFDE (FQ) ( $p < 0,05$ ).



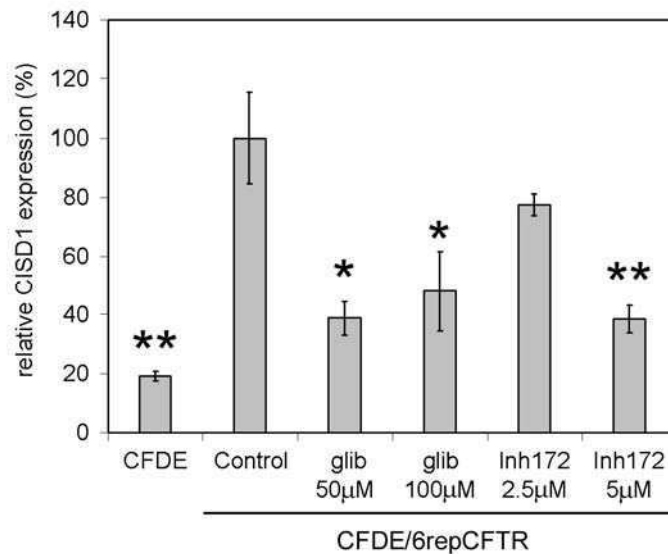
**Figura 12. Validación del DD por RT-PCR Semicuantitativa. (A)** Gel de agarosa corrido con los productos de las RT-PCR. (1-4) Diluciones de ADNc para elegir las concentraciones en las que no estén saturadas las bandas del gel **(B)** Se tomaron las densidades de banda en esas condiciones y se calculó la expresión relativa de *CISD1* respecto de *GAPDH*, en células CFDE, CFDE/6RepCFTR y CFDE/6RepCFTR tratadas con glibenclamida 50  $\mu$ M. El patron de niveles de expresión observados fue coincidente con los resultados obtenidos en el DD ( $\bar{x} \pm DS$ , \* =  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

### 1.2- Efectos de los inhibidores del CFTR, Glibenclamida y CFTR(inh)-172, sobre la expresión de CISD1 medidos por PCR en tiempo real.

Con el objeto de estudiar si la expresión de CISD1 era afectada por la actividad del CFTR o si la expresión diferencial en este tipo de células se debía a otro motivo (selección clonal inespecífica, etc.), decidimos incluir inhibidores de la actividad del canal de cloruro CFTR (glibenclamida y CFTR(inh)-172). La glibenclamida inhibe la actividad del CFTR, pero se ha demostrado que posee

## RESULTADOS

una elevada toxicidad y que tiene efectos inespecíficos [263] que podrían afectar la expresión de *CISD1* por vías distintas a la del CFTR. En años recientes se ha comenzado a utilizar un nuevo inhibidor de la actividad de transporte de  $\text{Cl}^-$  por CFTR, el CFTR(inh)-172. Este inhibidor, desarrollado en el laboratorio de Verkman, es un derivado de las tiazolidinonas y ha sido demostrado que es más potente que la glibenclamida y que no presenta la toxicidad ni tiene los efectos secundarios característicos de ese inhibidor [263]. Por lo tanto, la utilización de éste inhibidor del CFTR también fue necesaria para confirmar la modulación de la expresión de *CISD1* por el transporte de  $\text{Cl}^-$  a través del CFTR y permitió tener mayor certeza sobre la especificidad de los efectos observados.



**Figura 13: Modulación de la expresión de *CISD1* por inhibidores del CFTR.** Los niveles de expresión fueron medidos mediante PCR en tiempo real. En la abscisa se indican los tratamientos de las células CFDE/6Rep y la concentración en  $\mu\text{M}$  de los inhibidores. En las ordenadas se representa el nivel de expresión de *CISD1* normalizado con respecto a la expresión de *GAPDH*, en % respecto del control. Los niveles de expresión de *CISD1* fueron modulados negativamente en forma significativa por el uso de inhibidores del CFTR confirmando los resultados obtenidos en el DD y en la PCR semicuantitativa. (\*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ ) (n=4).

El nivel de expresión de *CISD1* fue medido ésta vez mediante la técnica de PCR en tiempo real, a partir de ADNc obtenido mediante la reacción de

retro-transcripción del ARN mensajero extraído de células CFDE, CFDE/6RepCFTR y estas últimas tratadas con diferentes concentraciones de inhibidores (glibenclamida 50 y 100  $\mu$ M; CFTR(inh)-172 2.5 y 5  $\mu$ M). En éste ensayo se utilizaron curvas estándar de calibración, para evitar errores de estimación por diferencias en las eficiencias de amplificación correspondientes a los productos de *CISD1* y *GAPDH*.

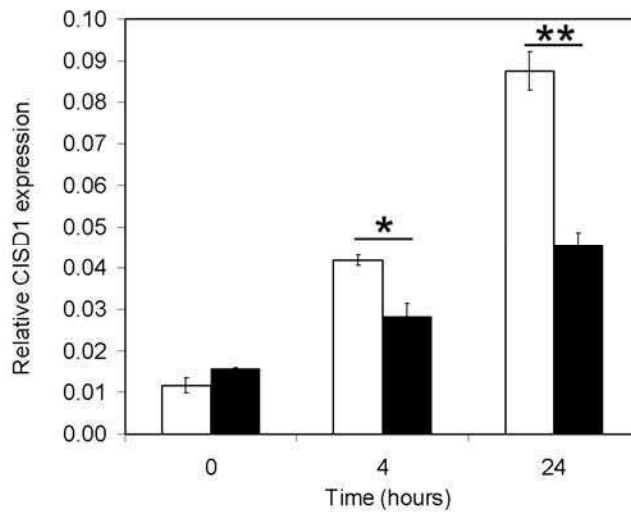
Los resultados se analizaron por ANOVA-Tukey. Se observó una disminución significativa en los niveles de mensajero de *CISD1*, prácticamente en todos los tratamientos con inhibidores del CFTR (\*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ ). Los niveles de expresión de *CISD1* se normalizaron con respecto a *GAPDH*. La expresión de *CISD1* en las células CFDE/6repCFTR fue tomada como el 100% y el resto de los niveles de expresión fueron relativizados a éste. Al igual que los resultados obtenidos en la RT-PCR semicuantitativa, con la RT-PCR en tiempo real también pudo observarse una diferencia significativa en la expresión de *CISD1* entre las células CFDE y CFDE/6repCFTR. La expresión de *CISD1* en las células CFDE fue alrededor de un 80% menor que en las CFDE/6rep CFTR. Con el uso de inhibidores del CFTR se obtuvo una disminución en la expresión de *CISD1* que fue entre un 60% y 50% con glibenclamida 50 mM y 100 mM respectivamente. En cambio, se obtuvieron valores del 20% y 60% con CFTR(inh)-172 2,5 mM y 5 mM respectivamente. Es interesante la diferencia que se puede observar entre los tratamientos con los distintos inhibidores, ya que fue necesario una concentración mucho menor de CFTR(inh)-172 (5  $\mu$ M) que de glibenclamida (50 – 100  $\mu$ M) para obtener los mismos niveles de reducción de la expresión de *CISD1* (Fig. 13).

### **1.3- Efectos de la activación del CFTR sobre la expresión de *CISD1* a distintos tiempos, medidos por PCR en tiempo real.**

Como se indicó en materiales y métodos, el modelo celular de FQ compuesto por las líneas CFDE y CFDE/6repCFTR fue generado a partir de células extraídas de un paciente con fibrosis quística. Sin embargo, estudios realizados sobre las regiones del gen donde se localizan las mutaciones más

## RESULTADOS

comunes, no reveló la presencia de ninguna de ellas (datos no mostrados). Se decidió entonces incorporar un nuevo modelo, compuesto por células IB3-1 (de glándulas epiteliales de tráquea) portando un alelo del CFTR con una mutación sin sentido (W1282X), que es una señal de terminación temprana de la traducción y la mutación  $\Delta F508$  en el otro alelo (células IB3-1), inmortalizadas con un vector viral (adenovirus 12-SV40). La contraparte fueron estas mismas células corregidas mediante la expresión ectópica del CFTR salvaje, insertado en el genoma mediante el mismo vector viral (células S9).



**Figura 14: Modulación de la expresión de *CISD1* por activadores del CFTR a distintos tiempos.** Se calcularon los niveles de expresión de *CISD1* respecto de *GAPDH*. las barras negras corresponden a los niveles relativos en Células IB3-1 y las barras blancas a los niveles relativos en S9, ambas estimuladas con db-AMPC 200  $\mu$ M, isoprotenerol 20  $\mu$ M e IBMX 500  $\mu$ M. La diferencia de expresión relativa de *CISD1* entre las células S9 e IB3-1 aumentó con el tiempo de estimulación (\* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ )

Luego de varios esfuerzos por medir diferencias significativas en la expresión de *CISD1* entre las líneas celulares IB3-1 y S9, descubrimos que la actividad basal del CFTR se hallaba muy baja en ambos tipos celulares. Teniendo en cuenta que las células S9 expresaban el CFTR salvaje y funcional [230], decidimos estimular la actividad del CFTR con un cóctel de activadores (al que denominamos “mix de activación”), con el fin de tratar de observar

diferencias. El mix de activación agregado al medio de cultivo estaba compuesto por iso-butil-metil-xantina (IBMX) 500  $\mu$ M, adenosina monofosfato cíclica (AMPc) 200  $\mu$ M e isoprotenerol 20  $\mu$ M. Para medir la respuesta de la expresión de *CISD1* a la estimulación de la actividad del canal de cloruro CFTR por el mix de activación en células IB3-1 y S9, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real. La figura 12 muestra la diferencia de expresión de *CISD1* (normalizado con respecto a la expresión de *GAPDH*) entre las células IB3-1 (barras negras) y S9 (barras blancas).

La expresión relativa de *CISD1* se midió en ambas células a distintos tiempos de estimulación desde el agregado del mix. A las células se les extrajo el ARNm a tiempo cero, a las 4 horas y a las 24 horas y los niveles de expresión se determinaron mediante RT-PCR en tiempo real. A tiempo cero no se observaron diferencias en los niveles de expresión relativa de *CISD1* entre las líneas IB3-1 y S9. En cambio, si se pudo observar un incremento significativo de la diferencia de expresión entre los dos tipos celulares en función del tiempo de estimulación (Fig. 14, 4 hs y 24 hs). Estos resultados sugieren que la expresión del gen de *CISD1* se encuentra modulada por la actividad del CFTR.

**Objetivo 2: Estudiar la localización subcelular de *CISD1* utilizando predicciones *in silico* y comprobar en un cultivo celular dicha localización mediante microscopía confocal.**

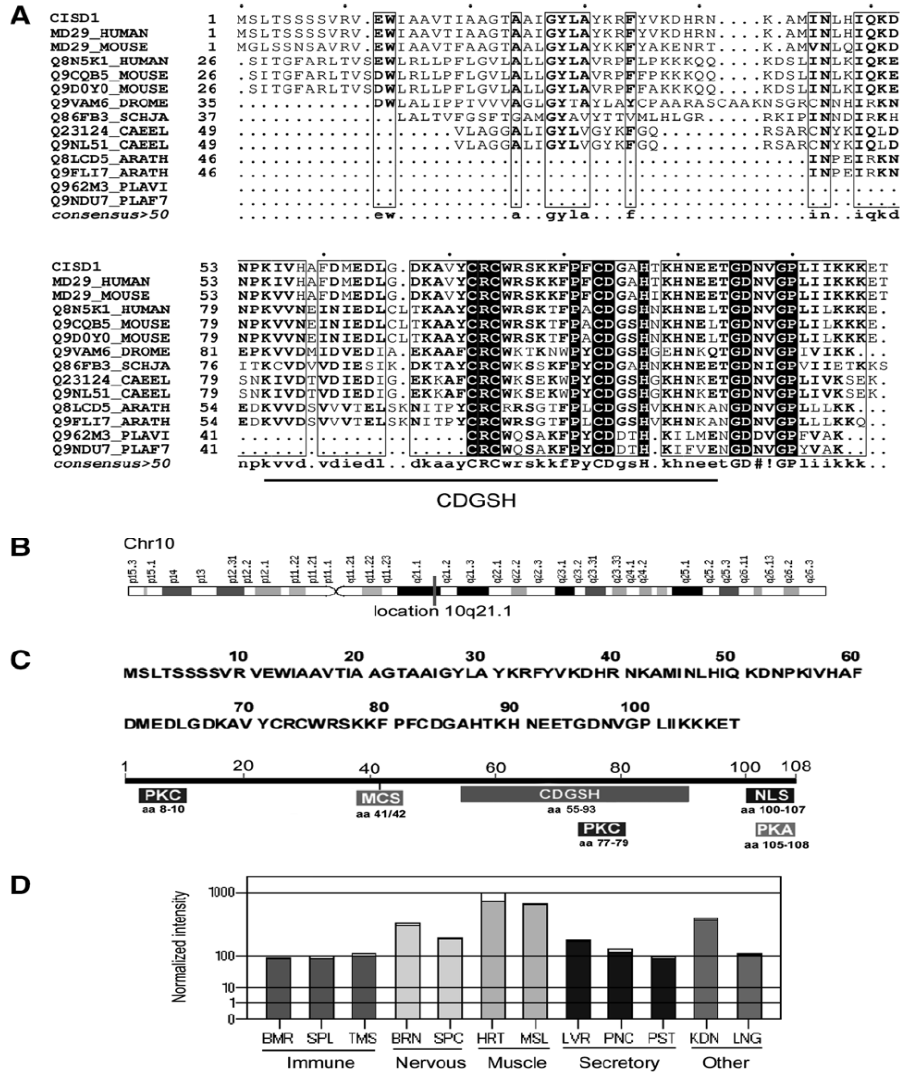
### **2.1- Análisis de la secuencia de *CISD1***

El clonado de la banda diferencial de *CISD1* nos permitió conocer su secuencia. Luego, mediante el análisis *in silico* de esta secuencia, se pudo determinar que *CISD1* es la primera proteína reportada de una familia que contiene el dominio CDGSH (las letras corresponden a la secuencia). Esta proteína está compuesta por 108 aminoácidos y en la figura 15 se muestran algunos miembros representativos de la familia.

Los análisis de alineamiento utilizando los programas ProDom [242] y ESPript [244] nos permitieron comparar el grado de conservación entre dichos miembros (Fig. 15 A). El programa COMPUTE pI/Mw, del servidor ExPASy [251], calculó un punto isoeléctrico teórico de 9.2 y un peso molecular de 12.199,05 Da. La localización genómica según GeneCards [252] es 10q21.1 (Fig. 15 B). El programa SMART 4.0 [264] identificó un segmento transmembrana entre los aminoácidos 13 – 35 y un dominio CDGSH entre los aminoácidos 55 – 93 (Fig. 15 C). Sumado a esto, el programa PSORT II [240] predijo la existencia de una señal de localización nuclear entre los aminoácidos 100 – 107 (PLIIKKK) (Fig. 8 C). Sin embargo, los resultados de la predicción *k*-NN (*k*-Nearest Neighbors) [265] arrojó las siguientes probabilidades respecto de la distribución subcelular: mitocondrial 34,8%, citoplasmática 26,1%, nuclear 17,4%, vacuolar 8,7%, retículo endoplasmático 8,7% y peroxisomal 4,3%. El programa MitoProt II [266, 267] arrojó una probabilidad de 0.6221 de hallar a *CISD1* en mitocondrias y predijo también un sitio de clivaje de una proteasa mitocondrial en el aminoácido (aa) de la posición 42 (secuencia del fragmento supuestamente clivado: MSLTSSSSVRVEWIAAVTIAAGTAAIGYL AYKRFYVKDHRN).

De acuerdo con el programa PROSITE, *CISD1* tiene un posible sitio de fosforilación dependiente de AMPc/GMPc entre los aa de las posiciones 105 a 108 (KKET) dentro de la hipotética señal de localización nuclear y dos sitios de

fosforilación por PKC, uno en los aa 8 a 10 (SVR) y otro dentro del dominio CDGSH, entre los aa 77 a 79 (SKK) (Fig. 15 C) [225].



**Figura 15 Análisis in silico de CISD1.** (A) Alineamiento de secuencias de los miembros representativos de la familia de proteínas CDGSH. Las secuencias de mayor consenso se representan en letras blancas con fondo negro. (B) Ubicación de *CISD1* en el cromosoma 10 (C) Secuencia proteica de *CISD1* obtenida de la secuenciación y análisis sobre marcos de lectura abiertos del ADNc. Esquema que muestra los posibles sitios de fosforilación de proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC), señal de localización nuclear (NLS), sitio de clivaje mitocondrial (MCS) y el dominio CDGSH. (D) Perfil de expresión de acuerdo con GeneCards: BMR, médula ósea; SPL, bazo; TMS, timo; BRN, cerebro; SPC, médula espinal; HRT, corazón; MSL, músculo; LVR, hígado; PNC, páncreas; PST, próstata; KDN, riñón y LNG, pulmón.

La estructura 3D de CISD1 fue reportada recientemente y descrita en detalle [268, 269]. CISD1 parecería encontrarse como homodímero y cada subunidad se uniría a un grupo prostético del tipo 2Fe-2S.

### 2.2- Localización subcelular de la proteína de fusión CISD1-EGFP.

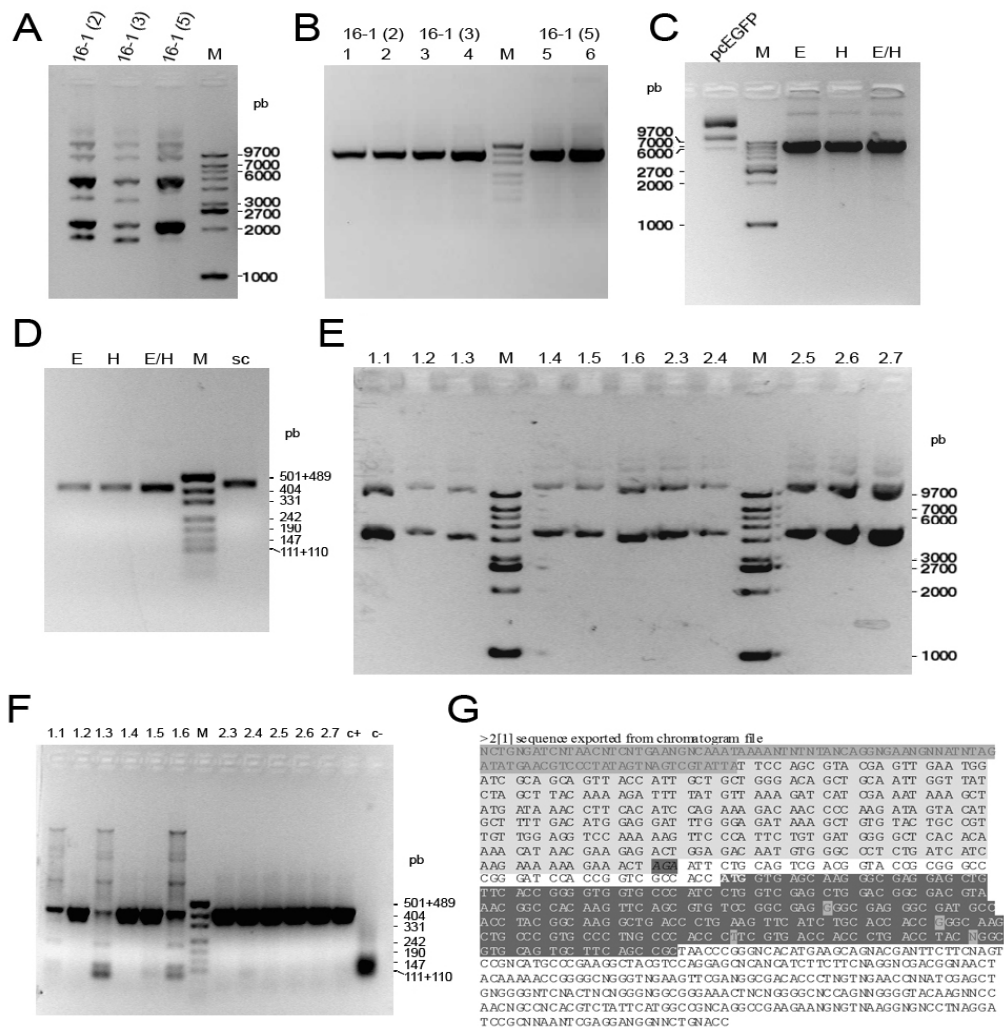
#### 2.2.1- Obtención de la Quimera CISD1-EGFP

Al contar con la secuencia de CISD1 en el plásmido de clonado pGEM-T “Easy Vector” (PROMEGA, WI) (Fig. 16 A y B) fue relativamente sencillo diseñar una proteína de fusión mediante la inserción de dicha secuencia “aguas arriba” y en el mismo marco de lectura de la secuencia correspondiente a la proteína verde fluorescente EGFP. Como se mencionó en materiales y métodos, dicha inserción se realizó en un plásmido de expresión eucariota, modificado para ser amplificado en bacterias (pcEGFP). La secuencia de CISD1, clonada en pGEM-T, fue amplificada con cebadores diseñados para crear los sitios de restricción de EcoR I (E) y HinD III (H), y para eliminar el codón de finalización de la traducción de CISD1. El producto de la reacción de PCR fue tratado con las enzimas de restricción y corrido en un gel de agarosa (Fig. 16 D), con el fin de confirmar la existencia de dichos sitios de corte. Analizando el gel se puede observar la diferencia en el largo de los fragmentos sin cortar (Fig.16 D, calle sc), cortados con una sola enzima de restricción (Fig. 16 D, calles E y H) y los cortados con ambas enzimas (Fig. 16 D, calle E/H). Paralelamente, el plásmido pcEGFP fue cortado con las mismas enzimas de restricción (Fig. 16 C). Ambos productos de corte (plásmido e inserto) fueron purificados del gel de agarosa, para luego ser cuantificados por espectrofotometría. En la reacción de ligación con ADN ligasa del fago T4, se utilizaron dos relaciones de plásmido – inserto, 1:3 y 1:6. El producto fue introducido en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante el método de choque térmico y luego las bacterias transfectadas fueron sembradas en placas de LB-agar/amp. Varios clones obtenidos fueron amplificados en medio LB/amp y se les extrajo el ADN plasmídico, el cuál fue corrido en un gel de agarosa al 1%, lográndose



## RESULTADOS

observar en dicho gel diferencias entre la movilidad de las bandas correspondientes a los plásmidos que poseían el inserto (Fig. 16 E, clones 1.2, 1.4, 1.5, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 y 2.7) de los que no (Fig. 16 E, clones 1.1, 1.3 y 1.6). La presencia de la secuencia de CISD1 fue confirmada por PCR (Fig. 16 F) y por secuenciación se corroboró que dicho inserto hubiera perdido el codón “stop” de CISD1 y que se encontrara en el mismo marco de lectura que la EGFP (Fig. 16 G)

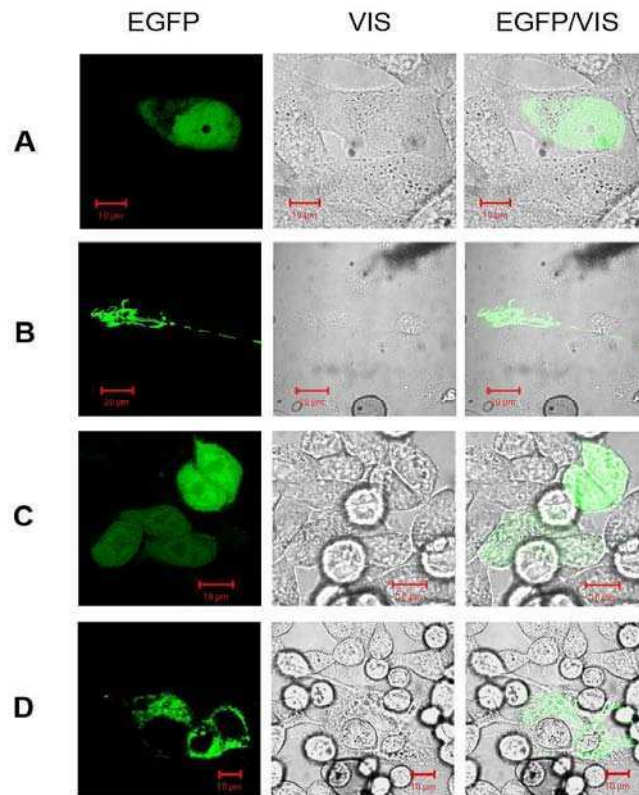


**Fig. 16: Obtención del vector de expresión de la quimera CISD1:EGFP. (A)**, Electroforesis en gel de agarosa 1% de los plásmidos purificados de los clones 16-1(2, 3 y 5) con CISD1. **(B)** amplificación por PCR de CISD1 de los clones 16-1 utilizando cebadores degenerados. **(C)** electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de corte del plásmido pcEGFP con las enzimas EcoR I y Hind III. **(D)** ídem (C) para el inserto CISD1 producto de la PCR mostrada en (B). **(E)** corrida electroforética de los plásmidos purificados de los clones obtenidos del producto de ligación. **(F)** PCR para identificar los plásmidos con el inserto de CISD1. **(G)** análisis de la secuenciación del clon 2.3 de (F), los codones en letras negras y resaltado en gris claro corresponden a CISD1 al final de dicha secuencia resaltado en gris oscuro y letras negras el codón “stop” eliminado de CISD1 (TAA -> AGA); los codones sin resaltar

corresponden al "linker" resultante de la inserción, en letras blancas y fondo gris oscuro la secuencia de la proteína EGFP.

### 2.2.2 Localización subcelular de CISD1.

Para determinar si CISD1 realmente se localizaba en mitocondrias, como había sido predicho por el programa PSORT II, se utilizó una proteína de fusión con la secuencia completa de CISD1 en la región NH<sub>2</sub>- terminal y la secuencia de la EGFP en la zona COOH- terminal, tal y como fue descrito en materiales y métodos. El plásmido pcEGFP se utilizó como control y tanto éste como el pcCISD1-EGFP fueron transfectados en células CFDE y T84.

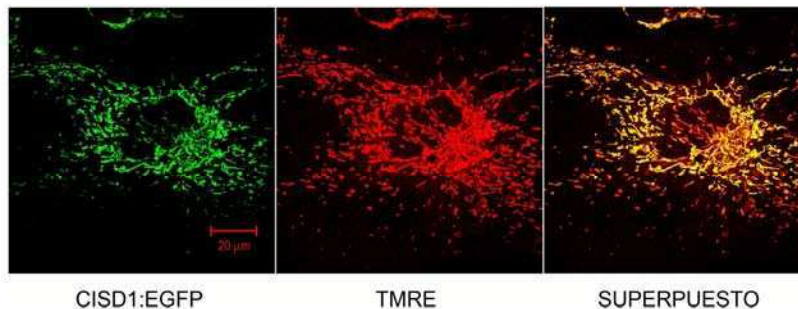


**Figura 17. Localización mitocondrial de pcCISD1:EGFP.** (A) Células CFDE transfectadas con el plásmido pcEGFP (control) (B) Células CFDE transfectadas con el plásmido pcCISD1-EGFP (C) células T84 transfectadas con pcEGFP y (D) células T84 transfectadas con el plásmido pcCISD1:EGFP. Las imágenes fueron tomadas con microscopio confocal, 18 hs post transfección. X 1000. Tanto en las células CFDE como en las células T84 se observa el mismo patrón de distribución reticular de la quimera CISD1-EGFP.

## RESULTADOS

Las células transfectadas con dichas construcciones fueron crecidas en portaobjetos con pocillos especiales para microscopía de células vivas y las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal. (Fig. 17 A a D).

En la figura 17 A se pudo observar una localización nuclear levemente predominante de la proteína EGFP expresada en células CFDE transfectadas con el plásmido pcEGFP (MOCK), acompañada de una distribución citoplasmática más tenue. En las células CFDE transfectadas en forma transiente con la quimera C1SD1-EGFP se observó una distribución reticular que se asemeja a la distribución de las estructuras mitocondriales (Fig. 17 B). Este patrón de distribución de la EGFP y de C1SD1-EGFP también pudo observarse en las células T84 de cáncer de colon transfectadas con los mismos plásmidos (Fig. 17 C y 17 D respectivamente).



**Figura 18. Co-localización de C1SD1-EGFP y la sonda TMRE.** Células CFDE transfectadas con el plásmido pcC1SD1-EGFP incubadas con TMRE. (A) fluorescencia de EGFP, (B) fluorescencia emitida por la sonda TMRE y (C) superposición de ambas emisiones. Imágenes tomadas con microscopio confocal. (x 1000). Se observa que ambas emisiones de fluorescencia se superponen perfectamente confirmando la localización mitocondrial de C1SD1

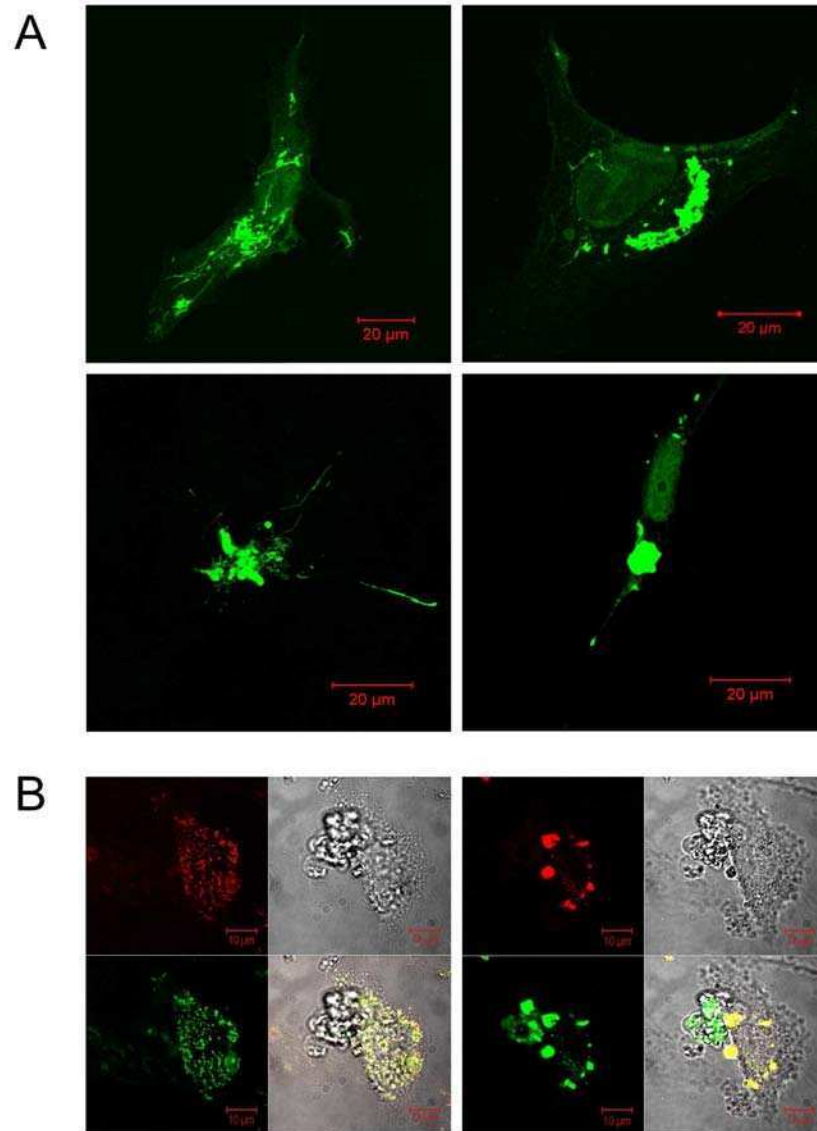
Para validar las observaciones realizadas en la experiencia anterior, se decidió utilizar la sonda específica de mitocondria, TMRE (tetra-metil-rodamina-etil-ester). Para ello se transfectaron células CFDE con la quimera C1SD1-EGFP y 18 hs post-transfección fueron tratadas con la sonda como se indicó en materiales y métodos. Las imágenes obtenidas mostraron la señal fluorescente de la proteína C1SD1-EGFP como un reticulado (Fig. 18 A) similar al visto

anteriormente. Esta distribución de la fluorescencia de CISD1-EGFP fue casi idéntica a la distribución de fluorescencia emitida por el TMRE (Fig. 18 B), observándose una superposición casi total de las dos señales (Fig. 18 C). Estos resultados confirman que CISD1 se localiza en mitocondrias y no en peroxisomas (que tienen una distribución similar).

### **2.2.3- Alteraciones en la estructura mitocondrial y citotoxicidad en el proceso de selección de las células CFDE transfectadas con CISD1-EGFP**

Posteriormente se intentó seleccionar una línea celular a partir de las células CFDE transfectadas con el plásmido vacío (CFDE/Mock) y otra que expresara en forma ectópica, la quimera CISD1-EGFP (CFDE/CISD1-EGFP). El plásmido utilizado en estas transfecciones, pcEGFP para las CFDE/Mock o su derivado pcCISD1-EGFP para las CFDE/CISD1-EGFP, porta el gen *neo<sup>r</sup>* de resistencia al antibiótico de selección neomicina (también geneticina o G418). De modo que para llevar a cabo la selección, las células transfectadas fueron seleccionadas en medio DMEM : F12 con SFB al 10% y geneticina a una concentración de 400 µg/ml. Esta concentración de antibiótico fue determinada mediante una curva de sensibilidad de las células CFDE a distintas concentraciones de geneticina y corresponde a la mínima concentración que produce un 100 % de células muertas en los cultivos de CFDE sin transfectar, en dos semanas de cultivo.

La presencia de fluorescencia de la proteína verde se utilizó como marcador del seguimiento del proceso de selección, tanto para las CFDE/Mock como para las que expresaban la quimera. A partir de las 18 hs post transfección y durante al menos 48 hs no se observaron mayores cambios en los cultivos y luego de dos semanas se pudo obtener una línea celular de las



**Figura 19. Alteraciones mitocondriales observadas en el proceso de selección de células CFDE/CISD1-EGFP.** Las células transfectadas con la quimera fueron crecidas en placas de pocillos múltiples para microscopía y observadas luego de las 48 hs post transfección sin geneticina (**A, imágenes superiores**) y 48 hs post transfección con geneticina (**A, imágenes inferiores**). Se puede observar que a las 48 hs post transfección las mitocondrias se fusionan en estructuras alargadas y vecículas independientemente del uso del antibiótico de selección. La señal fluorescente de la sonda TMRE coincide con la señal de la quimera CISD1-EGFP en mitocondrias con morfología aparentemente normal (**B, izquierda**) y algunas células con vesículas fluorescentes (verdes), refractarias a la tinción con TMRE (**B, derecha**) lo que indicaría que dichas mitocondrias estarían despolarizadas. (x 1000)

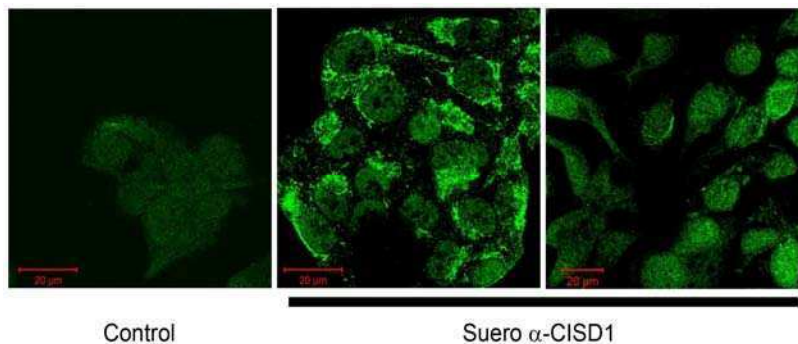
## **RESULTADOS**

CFDE/Mock. No ocurrió así con las CFDE/CISD1-EGFP. Transcurridas las 24 – 48 hs post transfección, en estas últimas comenzaron a observarse cambios muy notorios en la estructura de las mitocondrias. Estas se fusionaron en grandes vesículas, atiborradas de fluorescencia verde (Fig. 19 A). Algunas células comenzaron a ser insensibles a la tinción de sus mitocondrias por la sonda fluorescente TMRE (Fig. 19 B). Las células que mostraban éstas alteraciones fueron muriendo hasta no quedar ninguna, por lo que fue imposible obtener una línea celular a partir de ellas. La selección volvió a intentarse utilizando menores concentraciones de geneticina, pero se obtuvieron los mismos resultados, incluso quitando totalmente la geneticina del medio de cultivo. Estas mismas alteraciones se observaron en células T84 transfectadas con CISD1-EGFP y tampoco se pudo seleccionar una línea celular de ellas.

**Objetivo 3: Desarrollar anticuerpos policlonales que reconozcan la proteína CISD1**

**3.1 Anticuerpos policlonales de CISD1**

Con el fin de verificar si la proteína CISD1 seguía el mismo comportamiento que su ARNm se desarrolló un suero policlonal en conejo. Como se explicó en materiales y métodos se utilizó un protocolo estándar de inmunización con el péptido CISD1 unido a BSA. Previo a la inmunización se extrajo una pequeña cantidad de suero al que se lo denominó suero preinmune que fue utilizado como control. Posteriormente a la tercera dosis de péptido se realizó una titulación del antisuero utilizando diluciones seriadas, Los ensayos del antisuero en “SDS-PAGE” y en “DOT-BLOTS” ambos con sus respectivos controles y compitiendo con el péptido de inmunización, dieron resultados negativos. Sin embargo, en una prueba de inmunofluorescencia efectuada mediante microscopía confocal realizada sobre células CFDE/6repCFTR fijadas, incubadas con el antisuero contra CISD1 en una dilución 1/160 y reveladas con un anticuerpo secundario contra IgG de conejo marcado con FITC, se pudo observar una marcación reticulada similar a la observada en las células CFDE y T84 transfectadas con la quimera de CISD1:EGFP (Fig. 20 centro).



**Figura 20. Prueba de un suero policlonal de conejo contra CISD1. Imagen izquierda:** control negativo realizado con suero pre-inmune en células CFDE/6repCFTR fijadas y permeabilizadas. . **Imagen central:** Células CFDE/6repCFTR incubadas con suero policlonal de conejo inmunizado con un péptido sintético de CISD1. **Imagen derecha:** Células CFDE incubadas con el mismo suero. Se puede observar que las células incubadas con el suero policlonal contra CISD1 presentan un patron de tinción mitocondrial similar al observado con la quimera CISD1-EGFP, con algo de fluorescencia inespecífica y la intensidad de fluorescencia es mayor en las células CFDE/6RepCFTR que en la CFDE.

## **RESULTADOS**

En células CFDE incubadas en las mismas condiciones, la fluorescencia observada fue considerablemente menor que la de las células CFDE/6repCFTR (Fig. 20 derecha). Estos resultados podrían sugerir que los resultados obtenidos en el DD y las RT-PCR se reflejan a nivel de proteína. La imposibilidad de este antisuero de reconocer a la proteína en "Western blots" podría deberse a que el anticuerpo sea capaz de reconocer solamente a la proteína nativa o en una conformación muy cercana a la nativa. Actualmente estamos intentando desarrollar anticuerpos monoclonales en ratón y aptámeros de ADN que reconozcan a CISD1, tanto en su estado desnaturalizado como nativo.

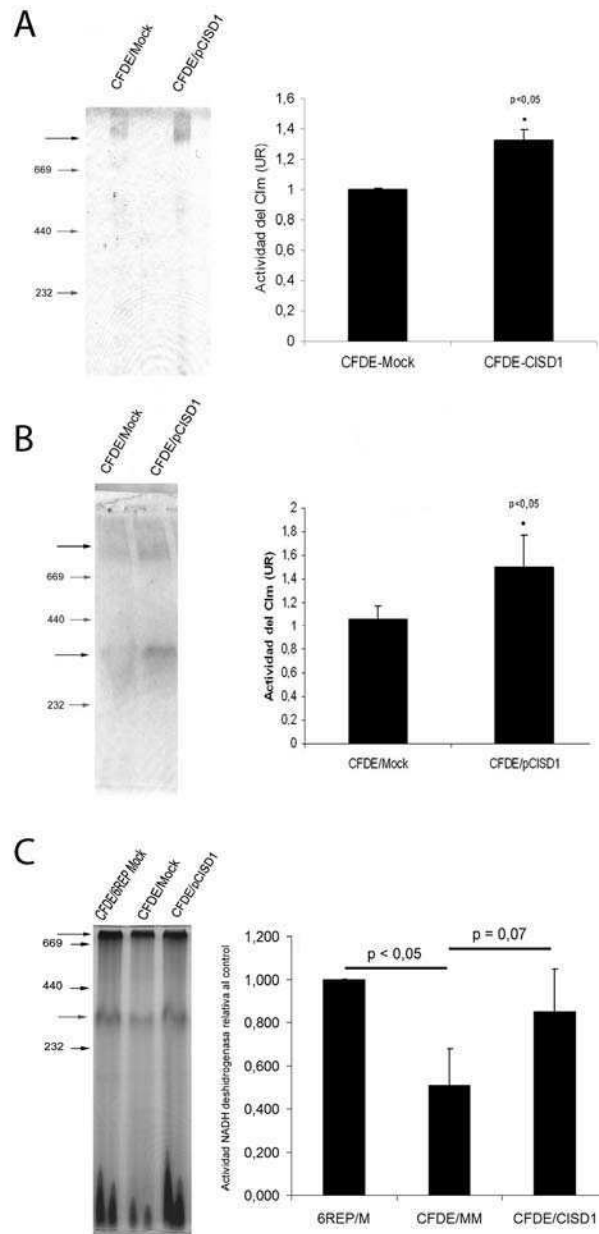


**OBJETIVO 4; Determinar si la reducción de *CISD1* tiene consecuencias en la actividad del Clm.**

**4.1- Efecto de la expresión ectópica de *CISD1* en la actividad NADH deshidrogenasa**

En forma paralela a nuestros resultados, otros autores también demostraron que MitoNEET estaba localizada en mitocondrias, más precisamente en la membrana externa mitocondrial. Sin embargo, ratones nulos para MDS029 (*CISD1* en humanos) presentaron una significativa reducción de la tasa de consumo de oxígeno, medida en estado 3 y 3u, indicando una alteración en la fosforilación oxidativa [218]. No está claro aún como una proteína localizada en la membrana externa puede afectar la fosforilación oxidativa, localizada en la membrana interna. Este es aún un tema de estudio.

Por otro lado, nosotros hemos observado que la actividad de NADH deshidrogenasa del Complejo I mitocondrial (Clm) en células CFDE se encuentra disminuida con respecto a la actividad de las células CFDE/6repCFTR [213], quizás debido a una disminución de la expresión del gen mitocondrial *MTND4* [212]. Pero también cabe la posibilidad de que estos efectos se deban a la disminución de la expresión de *CISD1* observada aquí en células FQ. Para determinar si ésta disminución en la actividad NADH deshidrogenasa del Clm estaba relacionada con la disminución en la expresión de *CISD1*, se transfectaron células CFDE con los plásmidos pcDNA 3.1 (-) (CFDE/Mock) y pc*CISD1* (CFDE/*CISD1*). Estas células fueron cultivadas en las condiciones descritas y fueron cosechadas para aislar las mitocondrias. Los complejos de la cadena respiratoria fueron solubilizados y corridos en condiciones nativas mediante la técnica de BN-PAGE, descrita en materiales y métodos. Este método permite ensayar *in gel* la actividad de los distintos complejos de la cadena respiratoria, luego de una electroforesis en condiciones no desnaturizantes, utilizando proteínas de mitocondrias extraídas desde los distintos tipos celulares o tratamientos en estudio [258-260].



**Figura 21. Medición in gel de la actividad del C1m.** Restauración parcial de la actividad NADH deshidrogenasa del C1m mediante la expresión ectópica de CISD1 **(A)** células CFDE/Mock y CFDE/CISD1 cultivadas en medio con 1% de glucosa (n = 3) ( $\bar{x} \pm SD$ ) **(B)** estas mismas células pero cultivadas en medio con 1% de galactosa en lugar de glucosa (n = 4) ( $\bar{x} \pm SD$ ), **(C)** comparación de la restauración de la actividad NADH deshidrogenada con la actividad basal de las células normalizadas CFDE/6repCFTR (n = 2) ( $\bar{x} \pm SD$ ). Se observa que las células CFDE transfectadas con el plásmido pcCISD1 recuperan parcialmente la actividad del Complejo I mitocondrial. Esta recuperación indicaría que la actividad NADH oxidasa del C1m esta regulada positivamente por CISD1.

El revelado del BN-PAGE muestra el resultado de la reacción catalítica del CIm, que lleva a la oxidación del NADH y a la reducción del NBT (“nitro blue tetrazolium”). El NBT reducido precipita dejando un depósito insoluble de color violáceo sobre la posición en que se encuentra el complejo catalítico. El color desarrollado permite medir la actividad NADH deshidrogenasa del complejo y subcomplejos directamente sobre el gel. La imagen del gel con la actividad del CIm revelada, fue digitalizada y transformada a escala de grises para cuantificar la intensidad de cada banda.

La actividad NADH deshidrogenasa del CIm medida *in gel* fue aproximadamente un 40% mayor en las células CFDE/CISD1 que en las células control CFDE/MOCK (Fig. 21 A).

Con el objeto de poder hacer más evidentes las diferencias funcionales del CIm en los ensayos de medición de la actividad NADH deshidrogenasa, se reemplazó la glucosa del medio por galactosa. Al hacer esta sustitución, las células utilizan el “Leloir pathway” para obtener piruvato esta vía es mucho menos eficiente y la célula debe compensar su requerimiento energético produciendo ATP forzando la cadena respiratoria [270]. Así, la cadena respiratoria se transforma en el principal productor de ATP. Sin embargo, la diferencia en la actividad NADH deshidrogenada entre éstas líneas celulares cultivadas en presencia de galactosa 1% fue prácticamente igual a la observada entre las mismas células cultivadas en presencia de glucosa 1% (Fig. 21 B).

A pesar de no haber visto mayores diferencias en las células cultivadas en presencia de galactosa, se decidió continuar con las experiencias utilizando esta fuente de carbono, reemplazando a la glucosa al menos 2 días antes de la cosecha de mitocondrias, para asegurarnos que la función mitocondrial fuese la más importante forma de generar ATP.

A fin de determinar el grado de recuperación de la actividad NADH deshidrogenasa al transfectar las células CFDE con el plásmido pcCISD1, se utilizó una línea celular normalizada CFDE/6repCFTR, transfectada con el plásmido vacío, que fue denominada línea 6rep/Mock. En una nueva experiencia, se aislaron mitocondrias de células 6rep/Mock, CFDE/Mock y CFDE/CISD1, todas cultivadas en medio con galactosa y se midió la actividad

del Clm. La actividad del Clm de las mitocondrias obtenidas de las células 6rep/Mock se tomó como el 100% de actividad y la actividad medida en las otras células fueron relativizadas a ésta.

Aunque según el ANOVA-Tukey las diferencias no son significativas, se observó una clara tendencia de recuperación. En estas condiciones, las células CFDE/CISD1 presentan un aumento de aproximadamente un 50 % de la actividad NADH deshidrogenada, medida in gel, respecto de las CFDE/Mock. Esta misma diferencia pudo observarse entre las mitocondrias aisladas de células CFDE/Mock y 6rep/Mock, donde se obtuvo un nivel de recuperación de la actividad mitocondrial casi total (Fig. 21 C). Estos resultados sugieren que CISD1 es un factor sumamente importante en la regulación de la actividad mitocondrial y sugieren que la reducción de la actividad del Clm observada en células FQ podría deberse a la disminución de la expresión de CISD1. Además, que las células CFDE pueden recuperar mayoritariamente la actividad del Clm mediante la expresión ectópica de CISD1. Estos resultados son preliminares y se necesitan nuevos ensayos para su confirmación.

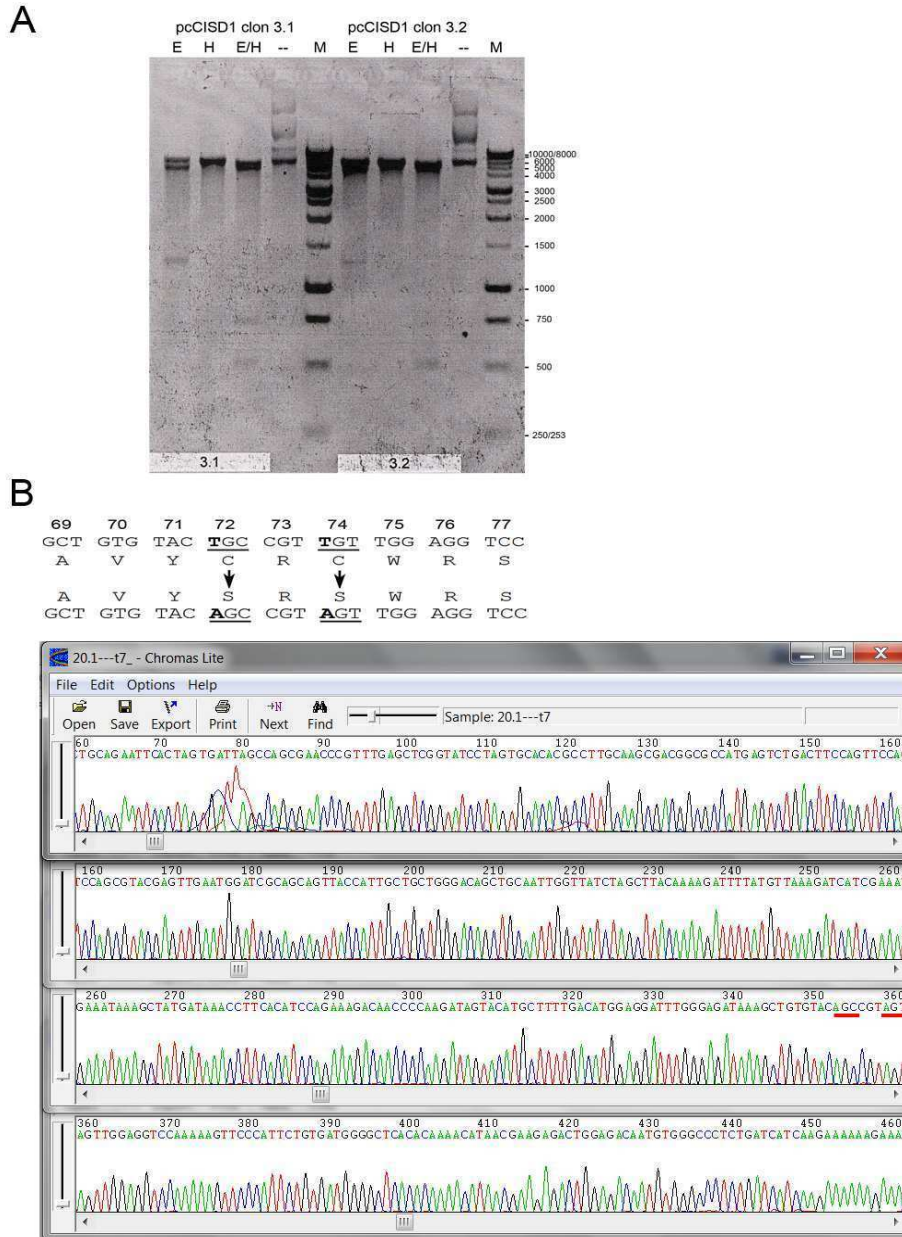
### **4.2- Efecto de la expresión de un mutante de CISD1 en la actividad NADH deshidrogenasa in gel.**

La utilización de la quimera CISD1-EGFP permitió determinar la localización mitocondrial de CISD1. Sin embargo, no fue responsable de las alteraciones mitocondriales previamente descritas en las células CFDE/CISD1:EGFP. Estas drásticas alteraciones en la morfología mitocondrial podrían atribuirse a una falla en la función específica de CISD1 por estar fusionada a la EGFP y actuar de una manera similar a la que lo hace un dominante negativo. Otra explicación podría ser que la proteína de fusión ejerce un efecto citotóxico, ya sea porque la presencia de la EGFP impide su asociación con otros complejos o inhibe la formación de dichos complejos debido a un impedimento estérico.

Con el fin de intentar aclarar lo observado, se decidió estudiar los efectos de la expresión de un mutante de CISD1 en células Caco-2 (no FQ). Como se dijo

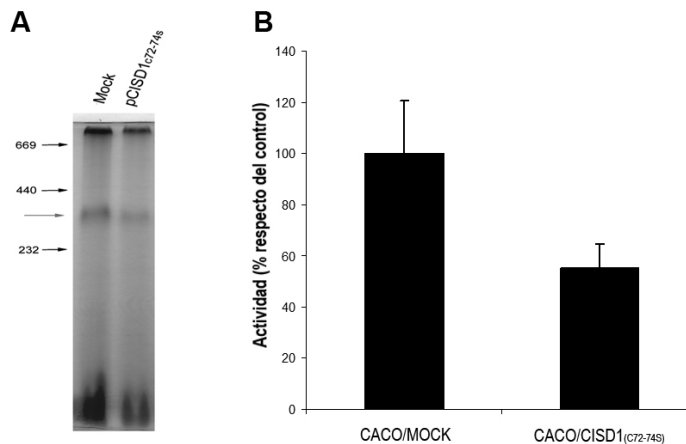
## RESULTADOS

previamente en la introducción, CISD1 contiene un sitio de unión para el cluster 2Fe-2S. Este sitio de unión se encuentra en el dominio



**Figura 22. Obtención de pcCISD1 mutante. (A)** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de corte de pcCISD1 clones 3.1 y 3.2 para ser utilizados en la reacción de mutagénesis dirigida (E: EcoR I, H: Hind III). **(B) Arriba:** Secuencia de los codones mutados. **Abajo:** cromatograma de la secuenciación del plásmido pcCISD1 mutado por mutagénesis dirigida.

altamente conservado CDGSH, donde las cisteínas 72, 74 y 83, junto con la histidina 87, son indispensables para la coordinación de la unión con el grupo prostético [271]. Teniendo en cuenta esto y mediante la técnica de mutagénesis dirigida, se generó una mutante de CISD1 en el plásmido pcCISD1, el que fue cortado con las enzimas de restricción Eco R I y Hind III para confirmar la presencia de CISD1 (Fig. 22 A, clon 3.2). Los codones que codificaban las cisteínas 72 y 74 fueron sustituidos por codones que codifican serinas (Fig. 22 B). El plásmido pcDNA 3.1(-) de INVITROGEN (Mock) y éste plásmido con la versión mutada de CISD1 (pcCISD1<sub>C72-74S</sub>) fueron transfectados en células Caco-2, generando por selección con geneticina las líneas celulares Caco/Mock y Caco/CISD1<sub>(C72-74S)</sub>



**Figura 23. Medición *in gel* de la actividad del Ctm.** Efecto de la expresión de un dominante negativo de CISD1 en la actividad del Ctm. **(A)** BN-PAGE de complejos solubilizados de mitocondrias aisladas de células CACO/Mock y CACO/CISD1<sub>(C72-74S)</sub>. **(B)** Comparación de la cuantificación de la actividad respecto del control Mock, (n = 2) ( $\bar{x} \pm SD$ ). Se observa que la expresión de la proteína CISD1 mutada en el sitio de unión al grupo 2Fe-2S modula negativamente la actividad del Ctm. Esto indicaría que la expresión de una proteína funcional con el grupo 2Fe-2S intacto es necesaria para la correcta actividad del Ctm.

Contrariamente a lo ocurrido con las CFDE/CISD1-EGFP, estas células sí pudieron ser seleccionadas y no presentaron estructuras mitocondriales

aberrantes, incluso luego de las cuatro semanas que llevó la selección, ni después de varios pasajes, congelaciones y descongelaciones.

Una vez obtenidas las líneas celulares portadoras de los plásmidos Mock como línea control y pcCISD1<sub>(C72-74S)</sub> con la mutante, se procedió a ensayar los niveles de actividad del CIm por BN-PAGE (Fig. 23 A).

Aunque según el ANOVA-tukey las diferencias no llegan a ser significativas, se observa una clara tendencia a la reducción de la actividad.

Las células Caco2 transfectadas con la mutante presentaron una tendencia de reducción del 40% con respecto a la actividad del CIm respecto de las células transfectadas con el plásmido vacío (Mock) (Fig. 23 B). Esta reducción fue similar a la diferencia de actividad observada anteriormente entre las células CFDE/CISD1 o 6rep/Mock y CFDE/Mock. Estos resultados concuerdan con los obtenidos al expresar ectópicamente CISD1 en células CFDE, sugiriendo nuevamente que CISD1 es sumamente importante en la regulación de la actividad del Complejo I mitocondrial. Aunque estos resultados aún son preliminares y necesitan de nuevos ensayos para su confirmación.

---

## **DISCUSIÓN**



**DISCUSION**

Desde hace casi dos décadas estamos estudiando en nuestro laboratorio la expresión diferencial de genes en Fibrosis Quística. Esta enfermedad se debe a mutaciones en el gen *CFTR*, que provocan fallas en la actividad de la proteína que codifica, el CFTR, que es un canal de cloruro regulado por AMPc. El mismo se encuentra localizado en la membrana plasmática apical de las células epiteliales de la gran mayoría de los conductos del cuerpo. Como hemos visto en la introducción, no está claro de qué forma el transporte de cloruro puede generar los múltiples desórdenes que se manifiestan en esta enfermedad y no existe una clara correlación genotipo-fenotipo. En la actualidad, a pesar de los grandes adelantos científicos y tecnológicos, aún no se ha podido encontrar la cura efectiva y definitiva para esta enfermedad. Si bien se han producido enormes adelantos en lo que se refiere a la investigación sobre terapia de genes *in vitro* e *in vivo*, aún hace falta mucho camino por recorrer. Hasta el momento en que se cuente con los medios tecnológicos y el conocimiento científico para utilizar la terapia génica o cualquier otro método que resulte en la expresión y función normal del CFTR sin riesgos para el paciente, se seguirán estudiando nuevas y mejores formas de tratar los síntomas de la enfermedad. El tratamiento de los síntomas y los desórdenes han logrado hasta ahora elevar la sobrevida de los pacientes de FQ desde una muerte temprana en la niñez hasta aproximadamente 40 años, en los países desarrollados. El mejoramiento de las condiciones de vida de los pacientes FQ ha llegado a tal extremo que ya es una realidad la posibilidad por parte de algunos de ellos, fuera de los tratamientos a los que deben ser sometidos, de llevar una vida casi normal.

Mientras tanto, el estudio de la expresión diferencial de genes es sin duda una herramienta muy importante. Ayuda a establecer nuevos puntos de partida en la investigación de los mecanismos moleculares que podrían permitir explicar algunos de los numerosos síntomas y desórdenes de la FQ. El conocimiento de dichos mecanismos nos permitirá comprender mejor el fenotipo FQ y definir nuevos posibles blancos de terapia.

En esta sección se discutirán los resultados obtenidos en el estudio de la expresión diferencial del gen *CISD1* en FQ, incluyendo su caracterización y localización, y sus implicancias en la función mitocondrial, en particular con respecto a la actividad del Complejo I mitocondrial (CI<sub>m</sub>). Además, se discutirán las ventajas y desventajas de cada modelo celular utilizado y las posibles explicaciones de los resultados obtenidos. Finalmente, se plantearán las perspectivas y la relevancia del estudio de la modulación de la actividad mitocondrial mediada por el canal CFTR.

### **Expresión diferencial de genes. Regulación negativa del gen *CISD1* en FQ.**

Los resultados observados en el DD fueron el punto de partida de esta Tesis. En dicho DD se encontró un gen cuya expresión se encontraba reducida, en células provenientes de un paciente con FQ (células CFDE). Dicha expresión estaba disminuida con respecto a estas mismas células “normalizadas” mediante la expresión ectópica de CFTR salvaje (funcional), denominadas células CFDE/6RepCFTR. El fragmento del DD en cuestión presentó un patrón de expresión que se correlacionaba con el patrón esperable para un gen regulado por la actividad de transporte de Cl<sup>-</sup> del CFTR [213]: al incubar las células normalizadas CFDE/6RepCFTR con el inhibidor del CFTR glibenclamida se observó una importante reducción de la expresión del fragmento en estudio. Esta reducción de la expresión fue tal que alcanzó niveles similares a la observada en las células CFDE (FQ). La confirmación de este comportamiento mediante el uso del inhibidor permite atribuir estas diferencias a la actividad del canal CFTR y no a un falso positivo/negativo generado en la RT-PCR o debido a una posible selección clonal inespecífica durante la obtención de la línea celular CFDE/6RepCFTR. Más aún, el hecho de que la expresión disminuyera al utilizar el inhibidor del CFTR, nos permite afirmar que la regulación de la expresión del fragmento se encuentra bajo la influencia de la actividad del canal y no solamente de la presencia del CFTR en la membrana plasmática.

Decidimos estudiar este gen debido a que su expresión diferencial en células FQ era similar a la expresión del gen mitocondrial *MT-ND4* [211, 212] y podíamos investigar si existía una relación entre estos comportamientos. Además, el gen también posee una expresión diferencial en el modelo celular FQ contraria a la del gen *SRC*, el cual se encuentra regulado positivamente en células FQ [38, 210].

Para comenzar el estudio de este nuevo gen, el fragmento aislado del DD fue clonado, secuenciado y posteriormente identificado [217]. La secuencia obtenida fue analizada *in silico* mediante el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), teniendo en cuenta todos los marcos de lectura posibles. Se encontró que esta secuencia era idéntica a un marco de lectura abierto identificado previamente como *c10orf70*; es decir, el marco de lectura 70, ubicado en el cromosoma 10 del genoma humano [272]. Esta secuencia también fue denominada por otros autores como “uncharacterized hematopoietic stem/ progenitor cells protein MDS029”, que codificaba una proteína de localización, estructura y función desconocida hasta ese momento.

El análisis *in silico* de la secuencia proteica predicha reveló que esta proteína posee un dominio del tipo CDSGH, similar a los dedos de Zinc “Zn fingers”, entre los aminoácidos 55 y 93 inclusive. Por tal motivo, propusimos nombrarla ZCD1 o “Zn finger CDGSH domain 1” (número de acceso AY960578) (inicialmente la habíamos denominado KLPx por su similitud con algunas quinesinas, pero luego nos dimos cuenta que faltaba la parte motora de las mismas y se eligió entonces el símbolo ZCD1). Mas tarde otros autores descubrieron que la proteína unía hierro en lugar de zinc, contenido en un grupo prostético del tipo 2Fe2S [218], por lo que se optó por cambiar su nombre por CISD1 o “CDGSH iron sulfur domain 1” en inglés, de acuerdo con la Human Genome Organization (HUGO)[219]. De modo que el símbolo oficial en la actualidad es CISD1. La proteína CISD1 es el primer miembro de una nueva familia de proteínas que portan el dominio CDGSH.

### Confirmación de los resultados diferenciales.

Los experimentos de hibridación *in situ* hechos previamente en cortes de tejido pulmonar provenientes de pacientes FQ y también no FQ, apoyaron los resultados del DD. Indicaron que la diferencia observada entre las células CFDE y CFDE/6RepCFTR también podían ser observadas en la situación tisular inherente a la enfermedad. El mismo resultado se observó en las experiencias de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) confocal realizadas en cultivos celulares de CFDE y su contraparte normalizada CFDE/6RepCFTR. Si bien estos resultados apoyaron la idea de que el ARNm de C1SD1 tenía disminuida su expresión en FQ, no eran suficientes para validar los resultados del DD. Esto es así en los cortes de pulmón, porque la reducción de la expresión de C1SD1 podría deberse a una diferencia provocada por la historia clínica del paciente, el uso de antibióticos o cualquier otra terapia para el tratamiento de la enfermedad pulmonar. Por otro lado, el método FISH podría presentar falsos positivos (unión inespecífica).

En este trabajo de tesis, comenzamos confirmando los resultados del DD por RT-PCR semicuantitativa y RT seguida de PCR en tiempo real. La técnica de RT-PCR semicuantitativa tuvo que ponerse a punto utilizando curvas de calibración con plásmidos conteniendo el fragmento a amplificar, regulando la cantidad de ciclos de la PCR y utilizando curvas de concentración del DNAC generado en la reacción de RT, para obtener bandas no saturadas en el gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio. Esta técnica, si bien conlleva un mayor trabajo, es una buena alternativa si no se tiene acceso a un ciclador térmico para PCR en tiempo real (como fue inicialmente en nuestro caso). Los resultados obtenidos nos muestran que la expresión de C1SD1 se encuentra disminuida en las células CFDE respecto de las CFDE/6repCFTR, en concordancia con los resultados del DD.

En el DD se utilizó el inhibidor del CFTR glibenclamida para poder determinar si la diferencia de expresión observada entre las células CFDE y CFDE/6repCFTR se debía a la falla en la actividad de transporte de Cl<sup>-</sup> del CFTR

y no simplemente a un falso positivo, frecuentes en este método. Esta disminución en la expresión de CISD1 en células FQ o normales inhibidas también sugiere, que la regulación del gen depende de la actividad del transporte del CFTR, es decir del transporte de cloruro, y no simplemente de la presencia o ausencia de la proteína CFTR en la membrana. En este sentido, la expresión de la citoquina RANTES es un ejemplo de un gen que depende exclusivamente de la presencia del CFTR en la membrana apical y no de su actividad de transporte de cloruro [174]. Por otro lado, como la glibenclamida posee efectos secundarios inespecíficos, como el de afectar la actividad de los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ) [273, 274], los resultados obtenidos en el DD fueron validados utilizando la técnica de PCR en tiempo real, junto con el nuevo inhibidor CFTR(inh)-172, que es más potente y específico que la glibenclamida [263]. De todos modos, no podemos descartar que los inhibidores sean capaces de acelerar la degradación del CFTR en la membrana, algo que aún no se ha estudiado. Si fuese este el caso, la regulación del gen CISD1 también podría estar mediada por la presencia o ausencia de la proteína en la membrana plasmática (es decir, por interacciones con otras proteínas que interactúen con el CFTR).

Las diferencias en los niveles relativos de expresión de CISD1 observados entre las células CFDE y CFDE/6repCFTR (control), utilizando la técnica de PCR en tiempo real, son ligeramente superiores a las observadas con la técnica de PCR semicuantitativa. Probablemente, esta diferencia se deba a la mayor exactitud y precisión que posee la técnica de PCR en tiempo real. De todas formas, en ambos casos y al igual que en el DD, se muestra un evidente aumento de la expresión de CISD1 en aquellas células que fueron normalizadas mediante la expresión ectópica del CFTR salvaje. Por el contrario, el tratamiento con glibenclamida produjo una reducción máxima de alrededor del 60% (fue similar para las dos concentraciones ensayadas), lo que podría indicar que existe un límite para la inhibición del canal de cloruro alcanzable por glibenclamida, más allá del cuál la expresión de CISD1 no se ve afectada. Otra posible explicación es que el CFTR presente en la membrana pueda activar directa o indirectamente la expulsión del inhibidor hacia el exterior de la célula, quizás por alguna proteína de la familia de los transportadores ABCB involucrados en el fenotipo de

resistencia a múltiples drogas MDR (multi-drug resistance), como la glicoproteína-P (P-gp o MDR1) [275, 276] y que ese transporte no sea fácilmente saturable. Estudios hechos con la toxina Cif de *P. aeruginosa* indican que esta toxina provoca la disminución del CFTR en la membrana plasmática apical junto con la del MDR1, pero no la abundancia en membrana de otros transportadores ABC [277], por lo que no sería extraño que las actividades de MDR1 y el CFTR se encuentren ligadas de alguna manera.

En comparación con glibenclamida, el inhibidor CFTR(inh)-172 demostró ser más potente y fue necesaria una concentración 10 veces menor (5  $\mu$ M) que la de glibenclamida (50  $\mu$ M) para obtener un mismo nivel de inhibición de la expresión de CISD1, en las células CFDE/6repCFTR (Fig.13). El inconveniente que tiene este inhibidor es su baja solubilidad en medios acuosos, por lo que resultó imposible ensayar concentraciones superiores a 10  $\mu$ M, pues al intentar trabajar con concentraciones superiores se produce la formación de agregados que impiden aumentar su concentración efectiva en la solución. Estas mismas observaciones han sido reportadas por otros investigadores [212, 278, 279].

Hasta ese momento, los resultados obtenidos en el modelo celular de FQ, constituido por las células CFDE y CFDE/6repCFTR, coincidieron con los resultados obtenidos con las otras técnicas y con el DD, incluso habiendo utilizado otro inhibidor del CFTR diferente a glibenclamida. Sin embargo, el inconveniente con el modelo de células CFDE, es que no se encuentra caracterizada la mutación que produce el fenotipo FQ (este modelo celular era anterior al descubrimiento del gen CFTR) y estudios realizados en nuestro laboratorio dieron negativos para la mutación mas común ( $\Delta$ F508) y otras 20 mutaciones frecuentes. Además, los resultados podrían estar sujetos a artefactos generados por una presión de selección diferente de cada línea celular, debido al antibiótico higromicina B usado para mantener el plásmido en las células CFDE/6RepCFTR y que no es usado en las células CFDE, ya que éstas últimas no poseen ningún plásmido (Mock) que le confiera resistencia a dicho antibiótico.

Por estos motivos, se decidió estudiar si el patrón de expresión diferencial de *CISD1* podía también ser observado en otro modelo celular de genotipo conocido, conformado por células IB3-1. Estas portan el gen *CFTR* con la delección de la fenilalanina 508 en un alelo y una señal de terminación temprana en el otro. Su contraparte normalizada son las células S9, que expresan ectópicamente el *CFTR* salvaje. En este caso el gen se encuentra integrado, por lo que no es necesario el uso de antibióticos y ambas células fueron inmortalizadas y seleccionadas con el mismo vector viral. Las células S9 poseen un nivel basal de actividad de transporte de cloruro vía *CFTR*, por lo que necesitan ser estimuladas para que se haga evidente la diferencia en la actividad de transporte del canal. Para activar dichas células se utilizó una mezcla compuesta por IBMX, isoproterenol y db-AMPC. El Isoproterenol y el db-AMPC activan al *CFTR* a través de la PKA, en diferentes puntos de la cascada de señales. El isoproterenol es un agonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos que, vía proteína G, activa a la adenilato ciclasa generando AMPc. Este AMPc junto con el db-AMPC agregado activan a la PKA, que libera las subunidades PKA catalíticas, las que luego fosforilan el dominio regulatorio del *CFTR*, produciendo la apertura del canal [124]. La isobutil-metil xantina o IBMX es un inhibidor de las fosfodiesterasas que impide la degradación del AMPc, extendiendo el tiempo que dura la señal de activación. En su conjunto, esta mezcla de agonista  $\beta$ -adrenérgico, activador de PKA e inhibidor de las fosfodiesterasas, permite una activación más efectiva y prolongada del *CFTR*. Esto nos permitió observar las diferencias en la expresión de *CISD1* entre las células IB3-1 y S9 a distintos tiempos de estimulación de la actividad del *CFTR*. En la Figura 14 se pudo observar que las células S9 presentan un aumento significativo de la expresión de *CISD1*, mucho más pronunciado que el observado en las células IB3-1, a distintos tiempos de estimulación del canal de cloruro. Este último resultado confirma la expresión diferencial de *CISD1* y sugeriría nuevamente que el aumento de la expresión de *CISD1* podría estar directamente ligado a la actividad del *CFTR* y no simplemente deberse a su presencia o ausencia de la membrana plasmática. En las células IB3-1, sin embargo, también se observa un aumento de la expresión de *CISD1* en función del tiempo (aunque menor). Esto podría ocurrir por diferentes motivos. Uno podría deberse a que la mutación

$\Delta F508$  ocasiona un mal plegamiento del CFTR, que hace que este sea ubiquitinilado durante el proceso de maduración de la proteína y degradado prematuramente [280]; sólo una pequeña fracción escapa a la degradación y la proteína que llega a la membrana apical de las células epiteliales es totalmente funcional y puede ser activable por PKA-cat [281, 282]. Otra causa posible es que el cóctel activador del CFTR, estimule también directa o indirectamente la expresión de CISD1 por una vía paralela a la del CFTR.

Los resultados observados en esta primer parte del trabajo de tesis confirman y validan los resultados obtenidos en el DD. La expresión de CISD1 se encuentra estimulada por la actividad del CFTR o, dicho de otra forma, la expresión de CISD1 se ve disminuida en FQ por la falla en la actividad del CFTR. Queda por responder si la vía de regulación CFTR  $\rightarrow$  CISD1 es a través de la concentración intracelular de iones cloruro, como podría ser el caso de la modulación de proteínas vía el factor de transcripción RunX1, cuya unión al DNA es sensible a  $Cl^-$  [283] o se trata de otra vía de señalización a través de proteínas asociadas al CFTR, que puedan sensor su actividad, sus cambios conformacionales por activadores e inhibidores, o su presencia o ausencia en la membrana plasmática.

### Localización mitocondrial

Como se mencionó anteriormente, esta proteína fue denominada en un principio KLPx y luego ZCD1, pues el análisis *in silico* de la secuencia reveló que poseía un novedoso dominio similar a los “Zn fingers”. Sin embargo, dicho análisis aportó información adicional. El alineamiento de las secuencias nos permitió observar que éste dominio en la secuencia consenso poseía varios grupos de aminoácidos altamente conservados, entre los que se destacan el fragmento CRC, abarcando las posiciones 72 a 74 y el PyCDgsH, entre las posiciones 81 y 87. El alto grado de conservación de dichos aminoácidos sugería que debían tener un rol importante en la función de la proteína. Mientras este trabajo se estaba realizando, otros investigadores reportaron que tres cisteínas y una histidina rigurosamente conservadas en las posiciones 72, 74, 83 y 87



respectivamente, serían indispensables para la coordinación de un grupo prostético del tipo 2Fe-2S [218, 271]. Este dominio, entre los aminoácidos 55 a 93, llamado CDGSH, y un dominio transmembrana entre los aminoácidos 13 y 35, fueron identificados en nuestro análisis por el programa SMART 4.0 [264]. Además, los resultados de la predicción *k*-NN (*k*-Nearest Neighbors) [265], indicaron que la mayor probabilidad de localización de esta proteína correspondía en primer lugar a las mitocondrias (34,8%), luego al citoplasma (26.1%) y en tercer lugar a una posible localización nuclear (17.4%). También el programa MitoProt II (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>) [267] predijo una localización mitocondrial de CISD1, además de un sitio de clivaje de una proteasa mitocondrial en el aminoácido de la posición 42. De modo que la localización más probable era mitocondrial, según estos análisis *in silico*.

Por otro lado, un estudio realizado en ratones había demostrado que la droga antidiabética pioglitazona se unía específicamente a una proteína de extractos mitocondriales a la que llamaron M17. Este ortólogo de CISD1 en ratón fue luego denominado mitoNEET [220]. Además, en ese mismo trabajo se reportó que M17 co-inmunoprecipitaba con proteínas de la cadena respiratoria como la NADH deshidrogenasa del complejo I mitocondrial (CI<sub>m</sub>). Decidimos entonces comprobar si efectivamente CISD1 era de localización mitocondrial, como predecían los programas de análisis y determinar, además, si esa localización era mayoritaria.

Para determinar la localización de la proteína se utilizó una quimera construida a partir de la proteína CISD1 fusionada a EGFP (CISD1:EGFP). Esta quimera fue expresada en células CFDE y en T84, utilizando un plásmido de expresión eucariota modificado. Como control se utilizó el mismo plásmido pero solo con la EGFP. Los resultados mostraron claramente que la proteína de fusión CISD1:EGFP mostraba un patrón de distribución de fluorescencia que correspondía con una localización mitocondrial. Por el contrario, en las células utilizadas como control, se observó una distribución homogénea, con una leve predominancia nuclear de la EGFP para ambos tipos celulares. Aunque el patrón de fluorescencia obtenido era típico de mitocondrias, podía también confundirse con el patrón que se obtiene con peroxisomas. De modo que estos resultados fueron confirmados mediante la co-localización de la quimera CISD1:EGFP con la

sonda mitocondrial TMRE, mediante microscopía confocal, resultados que mostraron una clara co-localización. Por otro lado, una distribución típica mitocondrial para CISD1 también fue observada utilizando anticuerpos policlonales desarrollados en conejo. Además, en este último ensayo se pudo observar claramente una mayor intensidad de fluorescencia en las células CFDE/6repCFTR respecto de las CFDE y del control negativo. Si bien las imágenes no fueron muy precisas, porque tienen cierto background, puede observarse una distribución mitocondrial similar a la observada con la quimera fluorescente. Todos estos resultados experimentales se condicen con las predicciones hechas por los programas PSORT y MitoProt II y también con los resultados obtenidos por Colca y col [220]. De modo que no queda duda alguna de que la localización de CISD1 es mitocondrial. Además, salvo en células en división, claramente la localización mitocondrial de CISD1 es mayoritaria.

Actualmente estamos desarrollando anticuerpos monoclonales contra CISD1, a partir de ratones hiperinmunizados con péptidos sintéticos conjugados a KLH, dado que los anticuerpos obtenidos en conejo no pudieron reconocer a la proteína corrida y transferida a una membrana de nitrocelulosa en un Western Blot (reconocen únicamente la proteína nativa).

### **Alteraciones mitocondriales producto de la expresión de CISD1:EGFP.**

Curiosamente, al intentar seleccionar las células que portaban la quimera, empezaron a observarse alteraciones en la estructura de las mitocondrias; éstas comenzaban fusionarse y a formar estructuras más alargadas, similares a hilos. Con el tiempo, las mitocondrias terminaron fusionándose en grandes vesículas y las células murieron sin lograr obtenerse, a partir de ellas, una línea celular portadora del plásmido con la quimera. Esta observación nos llevó a pensar que la quimera estaba interfiriendo de alguna manera con la función de la proteína endógena y, además, que esta función era lo suficientemente importante como para que su falla llevara a la célula a la muerte. Otra alternativa era que quizás la sobreexpresión de CISD1:EGFP en la membrana mitocondrial fuera tóxica para

la célula, independientemente de la supuesta interferencia en la función de CISD1.

Las mitocondrias se encuentran naturalmente en un equilibrio entre procesos de fusión y fisión que le permiten mantener la estructura y distribución de la red de organelas [284-286]. Estos procesos continuos y opuestos sirven para mantener en comunicación toda la red de mitocondrias, lo que permite una mejor distribución energética en diferentes regiones celulares [287]. Este equilibrio fusión-fisión también determina el tamaño y distribución del pool mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  [286] y genera un tráfico permanente de componentes, incluyendo el ADN mitocondrial, que permitiría “rescatar” por complementación a aquellas organelas cuya actividad se ha visto alterada [288-290]. Los procesos de fusión y fisión dependen principalmente de la integridad del potencial de la membrana interna mitocondrial [291], de la función de “mitofusinas” (Mfn 1 y 2) para la fusión [291, 292] y de la proteína 1 relacionada con la Dinamina (Drp1) para la fisión [293]. Los procesos de fisión de las mitocondrias están finamente regulados y ligados a otros procesos celulares como la apoptosis. En este caso las mitocondrias se ven fisionadas. Es probable entonces que la sobreexpresión de la quimera estuviera afectando la interacción y normal funcionamiento de componentes involucrados en estos procesos, llevando a las mitocondrias a formar una gran vesícula, ya sea por inhibición de la fisión o por exacerbación de la fusión. Actualmente nos encontramos diseñando experimentos para dilucidar cuales son realmente las proteínas con que interactúa CISD1 y determinar de esta manera si existe alguna relación o interacción con las proteínas que componen los mecanismos de estos procesos de fusión y fisión.

Las células Caco-2 transfectadas con la mutante de CISD1 (CISD1<sub>C72-74S</sub>), al contrario de lo ocurrido con las CFDE/CISD1:EGFP, si pudieron ser seleccionadas y no presentaron estructuras mitocondriales aberrantes, incluso luego de las cuatro semanas que llevó la selección, o después de varios pasajes, congelaciones y descongelaciones. Este resultado sugiere que la ausencia de un grupo prostético 2Fe-2S no es capaz de provocar las alteraciones observadas con la quimera CISD1:EGFP. Es probable entonces, que la acción citotóxica de la quimera se deba a un efecto estérico por la presencia de la EGFP, sobre todo considerando que el sitio de unión al grupo 2Fe-2S no se encontraba mutado.

### **Actividad del Clm en FQ**

Pensando en la función, resulta interesante que el ortólogo en ratón de CISD1 sea el blanco de una sonda radioactiva sintetizada a partir de la droga antidiabética pioglitazona [220] y que la pioglitazona, al igual que otras tiazolidinedionas, inhiba al complejo I mitocondrial [294]. En forma independiente, en otro trabajo realizado en nuestro laboratorio, se demostró que la expresión del gen mitocondrial MT-ND4 está disminuida en células CFDE e IB3-1 respecto de la expresión observada en las células normalizadas CFDE/6repCFTR y S9. Esta diferencia de expresión se traduce en una disminución en la actividad NADH deshidrogenasa medida en geles de electroforesis nativo de proteínas mitocondriales provenientes de dichas células FQ (CFDE e IB3-1) respecto de las normalizadas (CFDE/6repCFTR y S9) [212, 213]. Teniendo en cuenta estos hechos, decidimos probar si mediante la sobre-expresión de CISD1 era posible rescatar, al menos en parte, la actividad del Complejo I disminuida en los modelos de FQ.

En su tesis de doctorado, Angel G. Valdivieso explicó las ventajas de utilizar la técnica denominada “Blue Native-PAGE” (BN-PAGE) [258], la cual permite estudiar *in situ* la actividad de los distintos complejos de la cadena respiratoria luego de una electroforesis en condiciones nativas, utilizando proteínas solubilizadas desde mitocondrias aisladas [258-260]. La ventaja principal radica en que se puede discernir mediante la posición de la banda en el gel, el origen de la señal de actividad NADH deshidrogenasa [295] y circunscribir la medición de la actividad exclusivamente al Clm completo. Esta es la principal diferencia con el método espectrofotométrico, en el cual la señal de actividad NADH deshidrogenasa proveniente de la actividad del Clm no puede diferenciarse claramente de otras señales provenientes de otras reacciones de oxidación del NADH o de la actividad de sub-complejos, que a pesar de seguir teniendo actividad NADH deshidrogenasa, no pueden cumplir su función en la cadena de transporte de electrones. La posibilidad de medir la presencia de sub-complejos del Clm representa otra ventaja más de ésta técnica, ya que nos

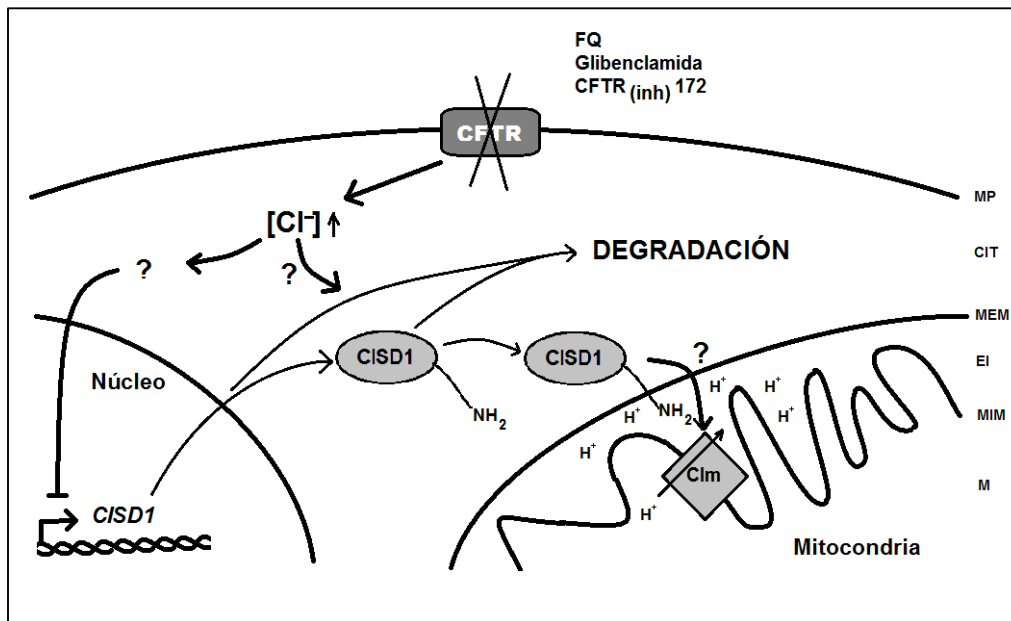
permite determinar si existe alguna alteración en el ensamblado del complejo proteico, algo que es imposible de determinar por el método espectrofotométrico.

Se decidió entonces medir la actividad del Clm en las líneas celulares del modelo de FQ sobre-expresando la proteína CISD1 en las células en las que se hallaba disminuida. Si bien los resultados observados indican una significativa recuperación de la actividad NADH deshidrogenasa medida *in gel*, la diferencia de actividad observada no fue muy grande. Se decidió entonces probar el mismo ensayo pero en células cultivadas en presencia galactosa al 1%. Al sustituir la glucosa del medio de cultivo por galactosa, las células utilizan el “Leloir pathway” para obtener piruvato, pero esta vía es menos eficiente que la glucólisis y la célula debe compensar sus necesidades energéticas forzando la fosforilación oxidativa [270]. El piruvato ingresa directamente a la cadena respiratoria disminuyendo la producción de ATP que se genera por fermentación, lo que ocurriría debido a la gran disponibilidad de glucosa en el medio de cultivo. De esta forma, con galactosa en el medio, la fosforilación oxidativa es forzada a ser el principal productor de ATP de la célula y cualquier disfunción en la cadena respiratoria (como en el complejo I) se hace más evidente. Pero a pesar de este cambio, la diferencia en la actividad NADH deshidrogenasa entre estas líneas celulares cultivadas en presencia de galactosa 1% fue prácticamente igual a la observada entre las mismas células cultivadas en presencia de glucosa 1%. La recuperación de la actividad NADH deshidrogenasa medida en el gel nativo fue prácticamente la misma que se observó en las células CFDE/6repCFTR/Mock. Estos resultados podrían sugerir que la disminución de la actividad del Clm en FQ se debe a la disminución de la expresión de CISD1, pero por ahora indican solamente una tendencia y deben ser profundizados.

Como se dijo anteriormente, no podemos descartar totalmente posibles efectos colaterales de la selección, ya que ambos tipos celulares (FQ y corregidas) se seleccionan en forma independiente y podríamos estar comparando células totalmente distintas, pero por otros motivos totalmente ajenos a la expresión y actividad del CFTR. Durante la generación de la línea celular corregida se utilizó un vector viral que se insertó en forma relativamente al azar en el genoma nuclear. En ese momento probablemente se generó una población heterogénea de células con el vector insertado en distintos sitios del

genoma, con resultados totalmente impredecibles. Al realizar la selección con el antibiótico durante muchas divisiones celulares podrían seleccionarse aquellos clones que sean más o menos resistentes al antibiótico y se dupliquen a mayor velocidad, dependiendo del lugar de inserción del gen corrector. Por estas razones, se buscó un nuevo modelo que no tuviese el problema de la posible selección clonal por sucesivas selecciones con antibiótico. De esta manera, elegimos una línea celular que expresara el CFTR salvaje en forma normal, con el fin de modular la actividad del complejo I mitocondrial sobreexpresando una mutante de CISD1 (dominante negativo) que interfiriera con el funcionamiento normal de la proteína CISD1 salvaje. La línea celular elegida en primera instancia fue Caco-2, de carcinoma de colon humano, la cual expresa CFTR en forma abundante. Por lo tanto, si la sobreexpresión de CISD1 en las células FQ provoca la recuperación de la actividad del complejo I, entonces la sobreexpresión de una proteína CISD1 mutada podría tener el efecto inverso al interferir con la función biológica de la proteína salvaje. Para probar esta hipótesis se transfectaron las células Caco-2 (no FQ) con un plásmido de expresión portando el ADNc de CISD1 mutado en las cisteínas 72 y 74 por serinas. Las cisteínas 72 y 74, junto con la cisteína 83 y la histidina 87 son indispensables para la unión del grupo 2Fe2S [218, 271]. En estas condiciones, la actividad NADH deshidrogenasa medida *in gel* a partir de mitocondrias aisladas de las células Caco-2 transfectadas con la mutante de CISD1 (CISD1<sub>C72-74S</sub>) presentó una tendencia de disminución de aproximadamente un 40 % comparada con la observada en las células control, Caco-2 transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1(-) vacío (Mock). Según estos resultados, la presencia del grupo prostético 2Fe-2S en CISD1 sería necesaria para la correcta actividad del CIm. Sin embargo, estos resultados también mostraron solamente una tendencia y tienen que ser estudiados con mayor detalle para corroborarlos.

En su conjunto, estos resultados sugieren que el correcto funcionamiento del Complejo I mitocondrial dependería de la normal expresión del gen *CISD1*, y éste a su vez dependería de la actividad de transporte de Cl<sup>-</sup> del CFTR. Dicho de otro modo, CISD1, formaría parte integrante de la cascada de sucesos que afectan la actividad del Complejo I mitocondrial por la falla en la actividad de transporte del CFTR en FQ (Fig. 23 modelo).



**Fig 23. Modelo de las posibles vías de la modulación del Clm con la participación de Cisd1.** La falla en la actividad del CFTR, ya sea por su ausencia (FQ) o por la acción de inhibidores como la glibenclamida o el CFTR(inh)-172, provocarían la disminución en la expresión de Cisd1 (posiblemente como una consecuencia de la acumulación del ión Cl<sup>-</sup>). Esta disminución de la expresión de Cisd1 provoca una disminución en la actividad NADH deshidrogenasa del Complejo I mitocondrial (Clm).

### Sobre las posibles funciones de Cisd1

Las proteínas con grupos prostéticos del tipo Fe/S desempeñan importantes funciones en muchos caminos metabólicos, catalizando reacciones de óxido-reducción. Pueden también estar involucradas en el transporte de electrones o jugar un rol en la regulación de la expresión de genes, como sensores de O<sub>2</sub> o del estado redox del ambiente intra o extra celular [296]. Es llamativo que la coordinación de este grupo prostético en particular se haga a través de tres cisteínas y una histidina en lugar de la conformación más común de cuatro cisteínas. Esta conformación le confiere la característica de hacer mas sensible su unión a cambios en el ambiente redox. De hecho, se ha publicado un estudio sobre la estabilidad de la unión del grupo 2Fe2S a la proteína respecto de cambios en el pH [271]. Estos datos sugieren que Cisd1 podría ser también un

intermediario en el mecanismo de distribución del grupo 2Fe2S al resto de las proteínas celulares que lo necesitan para su correcta actividad.

Ya sea que CISD1 es un sensor del estado redox citoplasmático o un intermediario en la distribución de los grupos del tipo 2Fe-2S, en ambos casos la actividad del complejo I mitocondrial dependería del correcto funcionamiento de CISD1. En el primer caso se trataría de una señal que podría estar siendo transducida por CISD1 hacia el interior de la mitocondria, posiblemente modulando la expresión de *MTND4* [213]. En el segundo caso, la actividad del CI<sub>m</sub> está íntimamente relacionada con la disponibilidad de los grupos prostéticos 2Fe-2S que constituyen parte integral de su estructura. Si CISD1 disminuye, la disponibilidad de estos grupos disminuirá y esto afectará la actividad del CI<sub>m</sub>.



---

## **CONCLUSIONES**

**CONCLUSIONES**

1. Se clonó y caracterizó un nuevo gen humano, que hemos denominado CISD1, cuya expresión se encuentra regulada positivamente por la actividad del CFTR, o dicho en otras palabras, regulado negativamente (o no activado) en modelos celulares de fibrosis quística.
2. Se ha confirmado una vez más la existencia de genes CFTR-dependientes.
3. Existe una correlación entre la falla del CFTR en FQ y la expresión del gen nuclear CISD1.
4. Esta correlación es una relación causal, ya que la modulación de la actividad del CFTR por los inhibidores glibenclamida y el más específico CFTR(inh)-172 también modulan la expresión de *CISD1*.
5. El análisis de la secuencia protéica de CISD1 reveló la presencia de un dominio del tipo CDGSH. Por su similitud con los “Zinc fingers” la proteína fue inicialmente denominada ZCD1 (Zinc finger like CDGSH Domain 1). Luego Wiley determinó que en realidad dicho dominio une un grupo del tipo 2Fe-2S y de común acuerdo con ese grupo y con la Human Genome Organization, se cambió el símbolo oficial de este gen a *CISD1*, para incluir IS (por “Iron-sulfur”) en lugar de Z.
6. El análisis de la secuencia protéica reportó una mayor probabilidad de que la localización subcelular de CISD1 fuese mitocondrial, posibilidad que fue confirmada mediante el uso de una quimera CISD1-EGFP, por microscopía confocal.
7. La actividad del Complejo I mitocondrial se encuentra disminuida en FQ y existe una correlación entre la expresión de *CISD1* y la actividad del Clm.
8. La expresión de la proteína mutada CISD1 en las cisteínas 72 y 74 provocó una disminución en la actividad NADH deshidrogenasa del Clm medida *in gel*. Por otro lado, la sobreexpresión de CISD1 produjo el rescate de la actividad del Clm en células FQ. Estos resultados sugieren que la actividad del Clm depende de la expresión CISD1. Pero estos resultados necesitan mayor confirmación.

9. En concordancia con los resultados aquí obtenidos, CISD1 podría tener efectos importantes en la actividad mitocondrial y según otros autores, en la regulación del equilibrio entre la fosforilación oxidativa y la glucólisis. Estos defectos mitocondriales podrían ser responsables de la sobreexpresión de especies reactivas de oxígeno (ROS) en FQ y posiblemente de la falla inmune innata que determina las infecciones crónicas con *P. aeruginosa*.
10. En estudios futuros se intentará encontrar la vía de señalización por la cual el CFTR es capaz de regular la expresión de CISD1 y la actividad del Complejo I mitocondrial.

## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

1. [http://www.wrongdiagnosis.com/c/cf/prevalence.htm#incidence\\_intro](http://www.wrongdiagnosis.com/c/cf/prevalence.htm#incidence_intro). 2010.
2. <http://www.european-lung-foundation.org>.
3. Borrajo, G., et al. *Screening neonatal de fibrosis quística. Experiencia en mas de 100.000 neonatos estudiados.* in *Memorias del IX Congreso Latinoamericano de Fibrosis Quística*. 1999. Buenos Aires, Argentina.
4. Visich, A., et al., *Complete screening of the CFTR gene in Argentine cystic fibrosis patients.* Clin Genet, 2002. **61**(3): p. 207-13.
5. Morral, N., et al., *The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations.* Nat Genet, 1994. **7**(2): p. 169-75.
6. Salcedo Posadas, A. and M.D. García Novo, *Fibrosis Quística*, ed. S.A. Diaz de Santos. 1998, Madrid.
7. Ruyzes de Fontecha, J.A.y.d.l., *Diez privilegios para mugeres preñadas. Apéndice con diccionario.* 1606, Alcalá de Henares: Impr, Luis Martynez Grande. 460.
8. Littlewood, J.M. (2009) *A History of Cystic Fibrosis.* Artículo electrónico publicado en <http://www.cfmedicine.com/history/index.pdf>. **Volume**,
9. Fanconi G, U.E., Knauer C, *Das Coeliakie-syndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasien.* Wien Med Wochnschr, 1936(86): p. 753-756.
10. Andersen, D., *Cystic Fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: clinical and pathological study.* Am J Dis Child, 1938. **56**.
11. Farber, S., H. Shwachman, and C.L. Maddock, *Pancreatic Function and Disease in Early Life. I. Pancreatic Enzyme Activity and the Celiac Syndrome.* J Clin Invest, 1943. **22**(6): p. 827-38.
12. Lowe, C.U., C.D. May, and S.C. Reed, *Fibrosis of the pancreas in infants and children; a statistical study of clinical and hereditary features.* Am J Dis Child, 1949. **78**(3): p. 349-74.
13. May, C.D. and C.U. Lowe, *Fibrosis of the pancreas in infants and children; an illustrated review of certain clinical features with special emphasis on the pulmonary and cardiac aspects.* J Pediatr, 1949. **34**(6): p. 663-87.
14. Di Sant'Agnese, P.A., *Bronchial obstruction with lobar atelectasis and emphysema in cystic fibrosis of the pancreas.* Pediatrics, 1953. **12**(2): p. 178-90.

15. Gibson, L.E. and R.E. Cooke, *A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis*. Pediatrics, 1959. **23**(3): p. 545-9.
16. Knowles, M.R., et al., *Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium*. Science, 1983. **221**(4615): p. 1067-70.
17. Quinton, P.M., *Suggestion of an abnormal anion exchange mechanism in sweat glands of cystic fibrosis patients*. Pediatr Res, 1982. **16**(7): p. 533-7.
18. Quinton, P.M., *Chloride impermeability in cystic fibrosis*. Nature, 1983. **301**(5899): p. 421-2.
19. Quinton, P.M. and J. Bijman, *Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis*. N Engl J Med, 1983. **308**(20): p. 1185-9.
20. Tsui, L.C., et al., *Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker*. Science, 1985. **230**(4729): p. 1054-7.
21. Tsui, L.C., et al., *Cystic fibrosis: analysis of linkage of the disease locus to red cell and plasma protein markers*. Cytogenet Cell Genet, 1985. **39**(3): p. 238-9.
22. Tsui, L.C., et al., *Cystic fibrosis: progress in mapping the disease locus using polymorphic DNA markers. I*. Cytogenet Cell Genet, 1985. **39**(4): p. 299-301.
23. Riordan, J.R., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1066-73.
24. Rommens, J.M., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1059-65.
25. Kerem, B., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1073-80.
26. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CFTR&search=CFTR>.
27. Anderson, M.P., et al., *Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR*. Science, 1991. **251**(4994): p. 679-82.
28. Anderson, M.P., et al., *Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity*. Science, 1991. **253**(5016): p. 202-5.
29. Zielenski, J., *Genotype and phenotype in cystic fibrosis*. Respiration, 2000. **67**(2): p. 117-33.
30. Eggermont, E., *Gastrointestinal manifestations in cystic fibrosis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1996. **8**(8): p. 731-8.

31. Collins, F.S., *Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications*. Science, 1992. **256**(5058): p. 774-9.
32. Welsh, M.J. and A.E. Smith, *Cystic fibrosis*. Sci Am, 1995. **273**(6): p. 52-9.
33. Noone, P.G. and M.R. Knowles, '*CFTR-opathies*': *disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations*. Respir Res, 2001. **2**(6): p. 328-332.
34. Leigh, M., *Airways Secretions, in Cystic Fibrosis in Adults*, J.Y.a.M. In Knowlws, Editor. 1999, Lippincott-Raven: Philadelphia.
35. Sagel, S.D., E.B. Dowell, and F.J. Accurso, *Bacterial colonization and infection in the CF lung*. Methods Mol Med, 2002. **70**: p. 433-46.
36. Ramsey, B.W., *Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis*. N Engl J Med, 1996. **335**(3): p. 179-88.
37. Koch, C. and N. Hoiby, *Pathogenesis of cystic fibrosis*. Lancet, 1993. **341**(8852): p. 1065-9.
38. Gonzalez-Guerrico, A.M., et al., *Tyrosine kinase c-Src constitutes a bridge between cystic fibrosis transmembrane regulator channel failure and MUC1 overexpression in cystic fibrosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(19): p. 17239-47.
39. Kilbourn, J.P., *Bacterial content and ionic composition of sputum in cystic fibrosis*. Lancet, 1978. **1**(8059): p. 334.
40. Potter, J.L., et al., *Studies on pulmonary secretions. II. Osmolality and the ionic environment of pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis, and laryngectomy*. Am Rev Respir Dis, 1967. **96**(1): p. 83-7.
41. Lyczak, J.B., C.L. Cannon, and G.B. Pier, *Lung infections associated with cystic fibrosis*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 194-222.
42. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
43. Brown, R.K. and F.J. Kelly, *Role of free radicals in the pathogenesis of cystic fibrosis*. Thorax, 1994. **49**(8): p. 738-42.
44. Sheils, C.A., et al., *Actin filaments mediate DNA fiber formation in chronic inflammatory airway disease*. Am J Pathol, 1996. **148**(3): p. 919-27.
45. Guggino, S.E., *Evolution of the delta F508 CFTR mutation*. Trends Microbiol, 1999. **7**(2): p. 55-6; discussion 56-8.
46. Gilligan, P.H., *Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis*. Clin Microbiol Rev, 1991. **4**(1): p. 35-51.

47. Pedersen, S.S., et al., *Role of alginate in infection with mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis*. Thorax, 1992. **47**(1): p. 6-13.
48. Pier, G.B., *Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to Pseudomonas aeruginosa infections*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8822-8.
49. Bubien, J.K., *CFTR may play a role in regulated secretion by lymphocytes: a new hypothesis for the pathophysiology of cystic fibrosis*. Pflugers Arch, 2001. **443 Suppl 1**: p. S36-9.
50. Moss, R.B., Y.P. Hsu, and L. Olds, *Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes*. Clin Exp Immunol, 2000. **120**(3): p. 518-25.
51. Krauss, R.D., et al., *Antisense oligonucleotides to CFTR confer a cystic fibrosis phenotype on B lymphocytes*. Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 1): p. C1147-51.
52. DiMango, E., et al., *Activation of NF-kappaB by adherent Pseudomonas aeruginosa in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells*. J Clin Invest, 1998. **101**(11): p. 2598-605.
53. DiMango, E., et al., *Diverse Pseudomonas aeruginosa gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8*. J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2204-10.
54. Kim, K.C., J. Nassiri, and J.S. Brody, *Mechanisms of airway goblet cell mucin release: studies with cultured tracheal surface epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1989. **1**(2): p. 137-43.
55. Bonfield, T.L., et al., *Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(6 Pt 1): p. 2111-8.
56. Littlewood, J.M., *Gastrointestinal complications in cystic fibrosis*. J R Soc Med, 1992. **85 Suppl 19**: p. 13-9.
57. Littlewood, J.M., *Cystic fibrosis: gastrointestinal complications*. Br Med Bull, 1992. **48**(4): p. 847-59.
58. Waters, D.L., et al., *Pancreatic function in infants identified as having cystic fibrosis in a neonatal screening program*. N Engl J Med, 1990. **322**(5): p. 303-8.
59. Welsh, M.J., et al., *Cystic Fibrosis*. 8th ed. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. , ed. B.A. Scriver CR and V.D. Sly WS. 2001, New York: McGraw-Hill, Inc.
60. Waters, D.L., et al., *Hepatobiliary disease in cystic fibrosis patients with pancreatic sufficiency*. Hepatology, 1995. **21**(4): p. 963-9.



61. Wilson, D.C. and P.B. Pencharz, *Nutrition and cystic fibrosis*. Nutrition, 1998. **14**(10): p. 792-5.
62. McCormick, J., et al., *Demographics of the UK cystic fibrosis population: implications for neonatal screening*. Eur J Hum Genet, 2002. **10**(10): p. 583-90.
63. Ratjen, F. and G. Doring, *Cystic fibrosis*. Lancet, 2003. **361**(9358): p. 681-9.
64. Frisch, R.E., *The right weight: body fat, menarche, and fertility*. Nutrition, 1996. **12**(6): p. 452-3.
65. Novotny, R., et al., *Formula feeding in infancy is associated with adolescent body fat and earlier menarche*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2003. **49**(8): p. 1289-93.
66. Edenborough, F.P., *Women with cystic fibrosis and their potential for reproduction*. Thorax, 2001. **56**(8): p. 649-55.
67. Kopito, L.E., H.J. Kosasky, and H. Shwachman, *Water and electrolytes in cervical mucus from patients with cystic fibrosis*. Fertil Steril, 1973. **24**(7): p. 512-6.
68. Kotloff, R.M., S.C. FitzSimmons, and S.B. Fiel, *Fertility and pregnancy in patients with cystic fibrosis*. Clin Chest Med, 1992. **13**(4): p. 623-35.
69. Thickett, K.M., et al., *Awareness of infertility in men with cystic fibrosis*. Fertil Steril, 2001. **76**(2): p. 407-8.
70. Wang, X.F., et al., *Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(10): p. 902-6.
71. Wilschanski, M., et al., *Diversity of reproductive tract abnormalities in men with cystic fibrosis*. JAMA, 1996. **276**(8): p. 607-8.
72. Mercier, B., et al., *Is congenital bilateral absence of vas deferens a primary form of cystic fibrosis? Analyses of the CFTR gene in 67 patients*. Am J Hum Genet, 1995. **56**(1): p. 272-7.
73. Patrizio, P., et al., *Aetiology of congenital absence of vas deferens: genetic study of three generations*. Hum Reprod, 1993. **8**(2): p. 215-20.
74. Lissens, W., et al., *Cystic fibrosis and infertility caused by congenital bilateral absence of the vas deferens and related clinical entities*. Hum Reprod, 1996. **11 Suppl 4**: p. 55-78; discussion 79-80.
75. Cuppens, H., et al., *Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation*. J Clin Invest, 1998. **101**(2): p. 487-96.

76. Macri C, P.O., Gentile A, **Cafferata EGA**, Luna MC., "**Cystic Fibrosis in Latinamerica**" Chapter 9. "**Cystic Fibrosis Pulmonary Infections : Lessons from around the Word**", ed. M.I.M. A. Bavernfeind, B. Strandvik. 1996, Basel, Boston, Berlin.: Birkhauser Verlag.
77. Ranieri, E., et al., *Neonatal screening for cystic fibrosis using immunoreactive trypsinogen and direct gene analysis: four years' experience*. Bmj, 1994. **308**(6942): p. 1469-72.
78. Costes, B., et al., *A rapid, efficient, and sensitive assay for simultaneous detection of multiple cystic fibrosis mutations*. Hum Mutat, 1993. **2**(3): p. 185-91.
79. Orita, M., et al., *Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction*. Genomics, 1989. **5**(4): p. 874-9.
80. Zielenski, J., et al., *A cluster of highly polymorphic dinucleotide repeats in intron 17b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene*. Am J Hum Genet, 1991. **49**(6): p. 1256-62.
81. Estivill, X., et al., *Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by multiplex PCR of mutation and microsatellite alleles*. Lancet, 1991. **338**(8764): p. 458.
82. Morral, N., et al., *CA/GT microsatellite alleles within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene are not generated by unequal crossingover*. Genomics, 1991. **10**(3): p. 692-8.
83. Casals, T., et al., *Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens*. Hum Reprod, 2000. **15**(7): p. 1476-83.
84. Bombieri, C., et al., *Complete mutational screening of the CFTR gene in 120 patients with pulmonary disease*. Hum Genet, 1998. **103**(6): p. 718-22.
85. Miller, P.W., et al., *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in allergic bronchopulmonary aspergillosis*. Am J Hum Genet, 1996. **59**(1): p. 45-51.
86. Cohn, J.A., et al., *Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis*. N Engl J Med, 1998. **339**(10): p. 653-8.
87. Cohen, C.J., et al., *Direct detection and quantitation of a distinct T-cell epitope derived from tumor-specific epithelial cell-associated mucin using human recombinant antibodies endowed with the antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells*. Cancer Res, 2002. **62**(20): p. 5835-44.
88. Dequeker, E., et al., *Recommendations for quality improvement in genetic testing for cystic fibrosis*. European Concerted Action on Cystic Fibrosis. Eur J Hum Genet, 2000. **8 Suppl 2**: p. S2-24.

89. Koch, C. and N. Hoiby, *Diagnosis and treatment of cystic fibrosis*. Respiration, 2000. **67**(3): p. 239-47.
90. Segal, E., [*A consensus on diagnosis and treatment of cystic fibrosis: is it of interest for the pediatrician?* ]. Arch Argent Pediatr, 2008. **106**(4): p. 293-4.
91. Davis, P., *Clinical Pathophysiology and Manifestations of Lung Disease*, in *Cystic Fibrosis in Adults*, J.Y.a.M. Knowles, Editor. 1999, Lippincott-Raven: Philadelphia. p. 45-67.
92. Davidson AGF, M.M., *Airway clearance techniques in cystic fibrosis*. New Insights Cystic Fibrosis, 1995. **3**: p. 6-11.
93. Khan, T.Z., et al., *Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **151**(4): p. 1075-82.
94. Konstan, M.W., et al., *Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **150**(2): p. 448-54.
95. Winter, R.J., et al., *Self-administered home intravenous antibiotic therapy in bronchiectasis and adult cystic fibrosis*. Lancet, 1984. **1**(8390): p. 1338-9.
96. Lang, B.J., et al., *Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with multiresistant strains of Pseudomonas aeruginosa*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(6): p. 2241-5.
97. Pai, V.B. and M.C. Nahata, *Efficacy and safety of aerosolized tobramycin in cystic fibrosis*. Pediatr Pulmonol, 2001. **32**(4): p. 314-27.
98. Westerman, E.M., et al., *Effect of nebulized colistin sulphate and colistin sulphomethate on lung function in patients with cystic fibrosis: a pilot study*. J Cyst Fibros, 2004. **3**(1): p. 23-8.
99. Hansen, C.R., et al., *Long-term azitromycin treatment of cystic fibrosis patients with chronic Pseudomonas aeruginosa infection; an observational cohort study*. J Cyst Fibros, 2005. **4**(1): p. 35-40.
100. Smith, A.L., et al., *Sputum changes associated with therapy for endobronchial exacerbation in cystic fibrosis*. J Pediatr, 1988. **112**(4): p. 547-54.
101. Jewes, L.A. and R.C. Spencer, *The incidence of anaerobes in the sputum of patients with cystic fibrosis*. J Med Microbiol, 1990. **31**(4): p. 271-4.
102. Littlewood, J.M., S.W. Smye, and H. Cunliffe, *Aerosol antibiotic treatment in cystic fibrosis*. Arch Dis Child, 1993. **68**(6): p. 788-92.
103. Toso, C., D.M. Williams, and P.G. Noone, *Inhaled antibiotics in cystic fibrosis: a review*. Ann Pharmacother, 1996. **30**(7-8): p. 840-50.

104. Shak, S., *Aerosolized recombinant human DNase I for the treatment of cystic fibrosis*. Chest, 1995. **107**(2 Suppl): p. 65S-70S.
105. Aitken, M.L., et al., *Recombinant human DNase inhalation in normal subjects and patients with cystic fibrosis. A phase 1 study*. Jama, 1992. **267**(14): p. 1947-51.
106. Hubbard, R.C., et al., *A preliminary study of aerosolized recombinant human deoxyribonuclease I in the treatment of cystic fibrosis*. N Engl J Med, 1992. **326**(12): p. 812-5.
107. Ramsey, B.W., et al., *Efficacy and safety of short-term administration of aerosolized recombinant human deoxyribonuclease in patients with cystic fibrosis*. Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(1): p. 145-51.
108. Cantin, A.M., *DNase I acutely increases cystic fibrosis sputum elastase activity and its potential to induce lung hemorrhage in mice*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(2): p. 464-9.
109. Grimbert, D., et al., *Characteristics of EPI-hNE4 aerosol: a new elastase inhibitor for treatment of cystic fibrosis*. J Aerosol Med, 2003. **16**(2): p. 121-9.
110. Rosenstein, B.J. and H. Eigen, *Risks of alternate-day prednisone in patients with cystic fibrosis*. Pediatrics, 1991. **87**(2): p. 245-6.
111. Konstan, M.W., *Therapies aimed at airway inflammation in cystic fibrosis*. Clin Chest Med, 1998. **19**(3): p. 505-13, vi.
112. Chou, J.L., R. Rozmahel, and L.C. Tsui, *Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene*. J Biol Chem, 1991. **266**(36): p. 24471-6.
113. Gadsby, D.C., P. Vergani, and L. Csanady, *The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 477-83.
114. Chan, H.C., et al., *Critical role of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **250**(1-2): p. 106-13.
115. Linsdell, P. and J.W. Hanrahan, *Glutathione permeability of CFTR*. Am J Physiol, 1998. **275**(1 Pt 1): p. C323-6.
116. Gao, L., et al., *Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia*. Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 1): p. L113-8.
117. Bradbury, N.A., *Intracellular CFTR: localization and function*. Physiol Rev, 1999. **79**(1 Suppl): p. S175-91.

118. Guggino, W.B. and B.A. Stanton, *New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(6): p. 426-36.
119. Zhou, Z., et al., *The two ATP binding sites of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) play distinct roles in gating kinetics and energetics*. J Gen Physiol, 2006. **128**(4): p. 413-22.
120. Aleksandrov, A.A., L.A. Aleksandrov, and J.R. Riordan, *CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel*. Pflugers Arch, 2007. **453**(5): p. 693-702.
121. Cheng, S.H., et al., *Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel*. Cell, 1991. **66**(5): p. 1027-36.
122. Hyde, S.C., et al., *Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport*. Nature, 1990. **346**(6282): p. 362-5.
123. Jones, P.M. and A.M. George, *The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(6): p. 682-99.
124. Sheppard, D.N. and M.J. Welsh, *Structure and function of the CFTR chloride channel*. Physiol Rev, 1999. **79**(1 Suppl): p. S23-45.
125. Taminelli, G.L., *(Esquema del CFTR, figura original)*. 2010.
126. Jia, Y., C.J. Mathews, and J.W. Hanrahan, *Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A*. J Biol Chem, 1997. **272**(8): p. 4978-84.
127. Hwang, T.C. and D.N. Sheppard, *Molecular pharmacology of the CFTR Cl-channel*. Trends Pharmacol Sci, 1999. **20**(11): p. 448-53.
128. Chang, X.B., et al., *Mapping of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane topology by glycosylation site insertion*. J Biol Chem, 1994. **269**(28): p. 18572-5.
129. Serohijos, A.W., et al., *Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(9): p. 3256-61.
130. Atwell, S., et al., *Structures of a minimal human CFTR first nucleotide-binding domain as a monomer, head-to-tail homodimer, and pathogenic mutant*. Protein Eng Des Sel, 2010. **23**(5): p. 375-84.
131. <http://www.pnas.org/content/105/9/3256/F1.large.jpg>.

132. Berger, H.A., S.M. Travis, and M.J. Welsh, *Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by specific protein kinases and protein phosphatases*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 2037-47.
133. Li, C., et al., *Spatiotemporal coupling of cAMP transporter to CFTR chloride channel function in the gut epithelia*. Cell, 2007. **131**(5): p. 940-51.
134. Ranganathan, R. and E.M. Ross, *PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes*. Curr Biol, 1997. **7**(12): p. R770-3.
135. Wang, S., et al., *Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity*. Cell, 2000. **103**(1): p. 169-79.
136. Raghuram, V., D.D. Mak, and J.K. Foskett, *Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(3): p. 1300-5.
137. Raghuram, V., H. Hormuth, and J.K. Foskett, *A kinase-regulated mechanism controls CFTR channel gating by disrupting bivalent PDZ domain interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9620-5.
138. Fischer, H. and T.E. Machen, *The tyrosine kinase p60c-src regulates the fast gate of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel*. Biophys J, 1996. **71**(6): p. 3073-82.
139. Naren, A.P., et al., *Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein-protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10972-7.
140. Peters, K.W., et al., *Syntaxin 1A inhibits regulated CFTR trafficking in xenopus oocytes*. Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 1): p. C174-80.
141. Kirk, K.L., *New paradigms of CFTR chloride channel regulation*. Cell Mol Life Sci, 2000 **57**(4): p. 623-34.
142. Clancy, J.P., F.E. Ruiz, and E.J. Sorscher, *Adenosine and its nucleotides activate wild-type and R117H CFTR through an A2B receptor-coupled pathway*. Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 1): p. C361-9.
143. Huang, P., et al., *From the Cover: Compartmentalized autocrine signaling to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at the apical membrane of airway epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 14120-5.
144. Sun, F., et al., *Protein kinase A associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via an interaction with ezrin*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14360-6.

145. Sun, F., et al., *E3KARP mediates the association of ezrin and protein kinase A with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29539-46.
146. Naren, A.P., et al., *A macromolecular complex of beta 2 adrenergic receptor, CFTR, and ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein 50 is regulated by PKA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 342-6.
147. Stutts, M.J., et al., *CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels*. Science, 1995. **269**(5225): p. 847-50.
148. Chinet, T.C., et al., *Mechanism of sodium hyperabsorption in cultured cystic fibrosis nasal epithelium: a patch-clamp study*. Am J Physiol, 1994. **266**(4 Pt 1): p. C1061-8.
149. Gabriel, S.E., et al., *CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship*. Nature, 1993. **363**(6426): p. 263-8.
150. Schwiebert, E.M., et al., *CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP*. Cell, 1995. **81**(7): p. 1063-73.
151. McNicholas, C.M., et al., *A functional CFTR-NBF1 is required for ROMK2-CFTR interaction*. Am J Physiol, 1997. **273**(5 Pt 2): p. F843-8.
152. Schreiber, R., et al., *The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11811-6.
153. Lee, M.G., et al., *Regulation of Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3414-21.
154. Reisin, I.L., et al., *The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel*. J Biol Chem, 1994. **269**(32): p. 20584-91.
155. Prat, A.G., et al., *Cellular ATP release by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Am J Physiol, 1996. **270**(2 Pt 1): p. C538-45.
156. Jiang, Q., et al., *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP release is controlled by a chloride sensor*. J Cell Biol, 1998. **143**(3): p. 645-57.
157. Borthwick, L.A., et al., *The formation of the cAMP/protein kinase A-dependent annexin 2-S100A10 complex with cystic fibrosis conductance regulator protein (CFTR) regulates CFTR channel function*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(9): p. 3388-97.

158. Trouve, P., et al., *Annexin V is directly involved in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator's chloride channel function*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(10): p. 1121-33.
159. Barnes, A.P., et al., *Phosphodiesterase 4D forms a cAMP diffusion barrier at the apical membrane of the airway epithelium*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 7997-8003.
160. Hallows, K.R., et al., *Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase*. J Clin Invest, 2000. **105**(12): p. 1711-1721.
161. Hallows, K.R., et al., *Physiological modulation of CFTR activity by AMP-activated protein kinase in polarized T84 cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(5): p. C1297-308.
162. Hallows, K.R., et al., *Regulation of channel gating by AMP-activated protein kinase modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity in lung submucosal cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(2): p. 998-1004.
163. Golin-Bisello, F., N. Bradbury, and N. Ameen, *STa and cGMP stimulate CFTR translocation to the surface of villus enterocytes in rat jejunum and is regulated by protein kinase G*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(3): p. C708-16.
164. Liedtke, C.M., et al., *Protein kinase C epsilon-dependent regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator involves binding to a receptor for activated C kinase (RACK1) and RACK1 binding to Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulatory factor*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22925-33.
165. Auerbach, M. and C.M. Liedtke, *Role of the scaffold protein RACK1 in apical expression of CFTR*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(1): p. C294-304.
166. Lee, J.H., et al., *Dynamic regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by competitive interactions of molecular adaptors*. J Biol Chem, 2007. **282**(14): p. 10414-22.
167. Luo, J., et al., *Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases*. Am J Physiol, 1998. **274**(5 Pt 1): p. C1397-410.
168. Vastiau, A., et al., *Interaction of the protein phosphatase 2A with the regulatory domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel*. FEBS Lett, 2005. **579**(16): p. 3392-6.
169. Thelin, W.R., et al., *The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is regulated by a direct interaction with the protein phosphatase 2A*. J Biol Chem, 2005. **280**(50): p. 41512-20.
170. Chang, S.Y., et al., *Mechanisms of CFTR regulation by syntaxin 1A and PKA*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 4): p. 783-91.



171. Cormet-Boyaka, E., et al., *CFTR chloride channels are regulated by a SNAP-23/syntaxin 1A complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12477-82.
172. Li, C., et al., *Lysophosphatidic acid inhibits cholera toxin-induced secretory diarrhea through CFTR-dependent protein interactions*. J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 975-86.
173. Schwiebert, L.M., K. Estell, and S.M. Propst, *Chemokine expression in CF epithelia: implications for the role of CFTR in RANTES expression*. Am J Physiol, 1999. **276**(3 Pt 1): p. C700-10.
174. Estell, K., et al., *Plasma membrane CFTR regulates RANTES expression via its C-terminal PDZ-interacting motif*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(2): p. 594-606.
175. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>.
176. Kerem, E., et al., *The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508)*. N Engl J Med, 1990. **323**(22): p. 1517-22.
177. Mateu, E., et al., *Can a place of origin of the main cystic fibrosis mutations be identified?* Am J Hum Genet, 2002. **70**(1): p. 257-64.
178. Cheng, S.H., et al., *Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis*. Cell, 1990. **63**(4): p. 827-34.
179. Antonarakis, S.E., *Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations*. Nomenclature Working Group. Hum Mutat, 1998. **11**(1): p. 1-3.
180. Chu, C.S., et al., *Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA*. Nat Genet, 1993. **3**(2): p. 151-6.
181. Slomski, R., et al., *Omission of exon 12 in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene transcripts*. Hum Genet, 1992. **89**(6): p. 615-9.
182. Morral, N., et al., *Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers*. Hum Mol Genet, 1993. **2**(7): p. 1015-22.
183. Tsui, L.C., *The spectrum of cystic fibrosis mutations*. Trends Genet, 1992. **8**(11): p. 392-8.
184. Welsh, M.J. and A.E. Smith, *Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis*. Cell, 1993. **73**(7): p. 1251-4.

185. Riordan, J.R., *Cystic fibrosis as a disease of misprocessing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator glycoprotein*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(6): p. 1499-504.
186. Andersson, C. and G.M. Roomans, *Activation of deltaF508 CFTR in a cystic fibrosis respiratory epithelial cell line by 4-phenylbutyrate, genistein and CPX*. Eur Respir J, 2000. **15**(5): p. 937-41.
187. Li, C., et al., *The cystic fibrosis mutation (delta F508) does not influence the chloride channel activity of CFTR*. Nat Genet, 1993. **3**(4): p. 311-6.
188. Swiatecka-Urban, A., et al., *PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 40099-105.
189. Swiatecka-Urban, A., et al., *The short apical membrane half-life of rescued {Delta}F508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) results from accelerated endocytosis of {Delta}F508-CFTR in polarized human airway epithelial cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(44): p. 36762-72.
190. Cutting, G.R., et al., *A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein*. Nature, 1990. **346**(6282): p. 366-9.
191. Sheppard, D.N., et al., *Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl<sup>-</sup> channels with altered pore properties*. Nature, 1993. **362**(6416): p. 160-4.
192. Highsmith, W.E., et al., *A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations*. N Engl J Med, 1994. **331**(15): p. 974-80.
193. Highsmith, W.E., Jr., et al., *Identification of a splice site mutation (2789 +5 G > A) associated with small amounts of normal CFTR mRNA and mild cystic fibrosis*. Hum Mutat, 1997. **9**(4): p. 332-8.
194. Zielenski, J., et al., *Skipping of exon 12 as a consequence of a point mutation (1898 + 5G-->T) in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene found in a consanguineous Chinese family*. Clin Genet, 1995. **47**(3): p. 125-32.
195. Diamond, G., et al., *A cross-species analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Potential functional domains and regulatory sites*. J Biol Chem, 1991. **266**(33): p. 22761-9.
196. Schwiebert, E.M., et al., *CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel*. Physiol Rev, 1999. **79**(1 Suppl): p. S145-66.
197. Hryciw, D.H. and W.B. Guggino, *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the outwardly rectifying chloride channel: a relationship between two chloride channels expressed in epithelial cells*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000 Nov. **27**(11): p. 892-5.

198. Boucher, R.C., et al., *Na<sup>+</sup> transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation.* J Clin Invest, 1986. **78**(5): p. 1245-52.
199. Barasch, J. and Q. al-Awqati, *Defective acidification of the biosynthetic pathway in cystic fibrosis.* J Cell Sci Suppl, 1993. **17**: p. 229-33.
200. Imundo, L., et al., *Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 3019-23.
201. DiMauro, S., *Exercise intolerance and the mitochondrial respiratory chain.* Ital J Neurol Sci, 1999. **20**(6): p. 387-93.
202. Bonfield, T.L., et al., *Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **13**(3): p. 257-61.
203. Steagall, W.K., et al., *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent regulation of epithelial inducible nitric oxide synthase expression.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **22**(1): p. 45-50.
204. Feigal, R.J. and B.L. Shapiro, *Mitochondrial calcium uptake and oxygen consumption in cystic fibrosis.* Nature, 1979. **278**(5701): p. 276-7.
205. Feigal, R.J., M.S. Tomczyk, and B.L. Shapiro, *The calcium abnormality in cystic fibrosis mitochondria: relative role of respiration and ATP hydrolysis.* Life Sci, 1982. **30**(1): p. 93-8.
206. Shapiro, B.L., *Mitochondrial dysfunction, energy expenditure, and cystic fibrosis.* Lancet, 1988. **2**(8605): p. 289.
207. Shapiro, B.L., *Evidence for a mitochondrial lesion in cystic fibrosis.* Life Sci, 1989. **44**(19): p. 1327-34.
208. Cafferata, E.G., et al., *Identification by differential display of a mRNA specifically induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in T84 human colon carcinoma cells.* Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1996. **42**(5): p. 797-804.
209. Liang, P. and A.B. Pardee, *Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction.* Science, 1992. **257**(5072): p. 967-71.
210. González-Guerrico, A., *Expresión de genes asociados a Fibrosis Quística,* in *Fundación Insituto Federico Leloir.* 2001, Universidad de Buenos Aires: Buenos Aires.
211. Marcucci, F., *Identificación de genes regulados por CFTR, canal de cloruro afectado en fibrosis quística,* in *Departamento de Química Biológica-FCEyN.* 2003, Universidad Nacional de Buenos Aires: Capital Federal. p. 1-81.

212. Valdivieso, A.G., et al., *The expression of the mitochondrial gene MT-ND4 is downregulated in cystic fibrosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **356**(3): p. 805-9.
213. Valdivieso, A.G., *Estudio de la expresión del gen mitocondrial MT-ND4 mediada por la actividad del CFTR*. Tesis doctoral., in *Química Biológica*. 2008, Universidad de Buenos Aires: Buenos Aires.
214. Chomyn, A., et al., *Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase*. Nature, 1985. **314**(6012): p. 592-7.
215. Chomyn, A., et al., *URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit*. Science, 1986. **234**(4776): p. 614-8.
216. Degli Esposti, M., et al., *Functional alterations of the mitochondrially encoded ND4 subunit associated with Leber's hereditary optic neuropathy*. FEBS Lett, 1994. **352**(3): p. 375-9.
217. Sotomayor, V., *Identificación de genes regulados por la actividad del CFTR, canal de cloruro afectado en la fibrosis quística*. (Tesis de licenciatura). 2003, Universidad de Buenos Aires: Buenos Aires. p. 1-67.
218. Wiley, S.E., et al., *MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(13): p. 5318-23.
219. [http://www.genenames.org/data/hgnc\\_data.php?hgnc\\_id=30880](http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=30880).
220. Colca, J.R., et al., *Identification of a novel mitochondrial protein ("mitoNEET") cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **286**(2): p. E252-60.
221. Shapiro, B.L., R.J. Feigal, and L.F. Lam, *Mitochondrial NADH dehydrogenase in cystic fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(6): p. 2979-83.
222. Beatrice, M.C., J.W. Palmer, and D.R. Pfeiffer, *The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential, and the retention of Ca<sup>2+</sup> by mitochondria*. J Biol Chem, 1980. **255**(18): p. 8663-71.
223. Dehecchi, M.C., et al., *The Km of NADH dehydrogenase is decreased in mitochondria of cystic fibrosis cells*. Enzyme, 1988. **40**(1): p. 45-50.
224. de Meer, K., et al., *Efficiency of oxidative work performance of skeletal muscle in patients with cystic fibrosis*. Thorax, 1995. **50**(9): p. 980-3.
225. Taminelli, G.L., et al., *CISD1 codifies a mitochondrial protein upregulated by the CFTR channel*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **365**(4): p. 856-62.

226. Galkin, A., S. Drose, and U. Brandt, *The proton pumping stoichiometry of purified mitochondrial complex I reconstituted into proteoliposomes*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(12): p. 1575-81.
227. Galkin, A.S., V.G. Grivennikova, and A.D. Vinogradov, *-->H<sup>+</sup>/2e<sup>-</sup> stoichiometry in NADH-quinone reductase reactions catalyzed by bovine heart submitochondrial particles*. FEBS Lett, 1999. **451**(2): p. 157-61.
228. [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fb/Mitochondrial\\_electron\\_transport\\_chain%E2%80%94.svg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fb/Mitochondrial_electron_transport_chain%E2%80%94.svg).
229. Lei, D.C., et al., *Episomal expression of wild-type CFTR corrects cAMP-dependent chloride transport in respiratory epithelial cells*. Gene Ther, 1996. **3**(5): p. 427-36.
230. Zeitlin, P.L., et al., *A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1991. **4**(4): p. 313-9.
231. Gregory, R.J., et al., *Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Nature, 1990. **347**(6291): p. 382-6.
232. Cafferata, E.G., et al., *Interleukin-1beta regulates CFTR expression in human intestinal T84 cells*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1500**(2): p. 241-8.
233. Cafferata, E.G., et al., *NF-kappaB activation is involved in regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by interleukin-1beta*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 15441-4.
234. Miller, F.J., et al., *Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(11): p. e61.
235. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>o</sup> ed. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
236. Sandhu, G.S., J.W. Precup, and B.C. Kline, *Rapid one-step characterization of recombinant vectors by direct analysis of transformed Escherichia coli colonies*. Biotechniques, 1989. **7**(7): p. 689-90.
237. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
238. Ish-Horowicz, D. and J.F. Burke, *Rapid and efficient cosmid cloning*. Nucleic Acids Res, 1981. **9**(13): p. 2989-98.
239. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.

- 
240. <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>.
241. Nakai, K. and P. Horton, *PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(1): p. 34-6.
242. Servant, F., et al., *ProDom: automated clustering of homologous domains*. Brief Bioinform, 2002. **3**(3): p. 246-51.
243. Gouet, P., et al., *ESPrpt: analysis of multiple sequence alignments in PostScript*. Bioinformatics, 1999. **15**(4): p. 305-8.
244. Gouet, P., X. Robert, and E. Courcelle, *ESPrpt/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3320-3.
245. Falquet, L., et al., *The PROSITE database, its status in 2002*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(1): p. 235-8.
246. Henikoff, J.G., et al., *Blocks-based methods for detecting protein homology*. Electrophoresis, 2000. **21**(9): p. 1700-6.
247. Attwood, T.K., et al., *PRINTS and PRINTS-S shed light on protein ancestry*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(1): p. 239-41.
248. Bateman, A., et al., *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(1): p. 276-80.
249. Bateman, A., et al., *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Res, 2004. **32 Database issue**: p. D138-41.
250. <http://motif.genome.jp>.
251. Gasteiger, E., et al., *ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3784-8.
252. Rebhan, M., et al., *GeneCards: a novel functional genomics compendium with automated data mining and query reformulation support*. Bioinformatics, 1998. **14**(8): p. 656-64.
253. Taminelli, G.L., *Esquema simplificado del protocolo de mutagénesis dirigida por el método de PCR y digestión con Dpn I. (Figura original)*. 2010.
254. Lacks, S. and B. Greenberg, *A deoxyribonuclease of Diplococcus pneumoniae specific for methylated DNA*. J Biol Chem, 1975. **250**(11): p. 4060-66.
255. Li, F. and J.I. Mullins, *Site-directed mutagenesis facilitated by DpnI selection on hemimethylated DNA*. Methods Mol Biol, 2002. **182**: p. 19-27.

256. Majander, A., et al., *Electron transfer properties of NADH:ubiquinone reductase in the ND1/3460 and the ND4/11778 mutations of the Leber hereditary optic neuroretinopathy (LHON)*. FEBS Lett, 1991. **292**(1-2): p. 289-92.
257. Lowry, O.H., Rosebroug, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J.Biol.Chem, 1951. **193**: p. 265- 275.
258. Schagger, H. and G. von Jagow, *Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form*. Anal Biochem, 1991. **199**(2): p. 223-31.
259. Zerbetto, E., L. Vergani, and F. Dabbeni-Sala, *Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels*. Electrophoresis, 1997. **18**(11): p. 2059-64.
260. Lojda, Z., Gossrau, R., and Schiebler, T. H., *in Enzyme Histochemistry, a Laboratory Manual*. 1979: p. 256-266.
261. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
262. Taminelli, G.L., et al., *KLPX es una proteína de localización Mitocondrial, con un dominio «Zn finger» similar al de algunas kinesinas, y cuya expresión está disminuida en fibrosis quística*. Medicina, 2003. **64**(Sup. II): p. 163.
263. Ma, T., et al., *Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion*. J Clin Invest, 2002. **110**(11): p. 1651-8.
264. Letunic, I., et al., *SMART 4.0: towards genomic data integration*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D142-4.
265. Horton, P. and K. Nakai, *Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier*. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol, 1997. **5**: p. 147-52.
266. <http://ihq2.helmholtz-muenchen.de/ihq/mitoprot.html>.
267. Claros, M.G. and P. Vincens, *Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences*. Eur J Biochem, 1996. **241**(3): p. 779-86.
268. Hou, X., et al., *Crystallographic studies of human MitoNEET*. J Biol Chem, 2007.
269. Lin, J., et al., *Crystal structure of human mitoNEET reveals distinct groups of iron sulfur proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(37): p. 14640-5.

270. Seo, B.B., et al., *Molecular remedy of complex I defects: rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of Saccharomyces cerevisiae mitochondria restores the NADH oxidase activity of complex I-deficient mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9167-71.
271. Wiley, S.E., et al., *The outer mitochondrial membrane protein mitoNEET contains a novel redox-active 2Fe-2S cluster*. J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 23745-9.
272. Strausberg, R.L., et al., *Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16899-903.
273. Rabe, A., J. Disser, and E. Fromter, *Cl<sup>-</sup> channel inhibition by glibenclamide is not specific for the CFTR-type Cl<sup>-</sup> channel*. Pflugers Arch, 1995. **429**(5): p. 659-62.
274. Engbersen, R., et al., *Glibenclamide depletes ATP in renal proximal tubular cells by interfering with mitochondrial metabolism*. Br J Pharmacol, 2005. **145**(8): p. 1069-75.
275. Bradley, G., P.F. Juranka, and V. Ling, *Mechanism of multidrug resistance*. Biochim Biophys Acta, 1988. **948**(1): p. 87-128.
276. Aller, S.G., et al., *Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding*. Science, 2009. **323**(5922): p. 1718-22.
277. Ye, S., et al., *Chemotoxicity of doxorubicin and surface expression of P-glycoprotein (MDR1) is regulated by the Pseudomonas aeruginosa toxin Cif*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(3): p. C807-18.
278. Wang, X.F., M.M. Reddy, and P.M. Quinton, *Effects of a new cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibitor on Cl<sup>-</sup> conductance in human sweat ducts*. Exp Physiol, 2004. **89**(4): p. 417-25.
279. Akiba, Y., et al., *A novel small molecule CFTR inhibitor attenuates HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion and duodenal ulcer formation in rats*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **289**(4): p. G753-9.
280. Ward, C.L., S. Omura, and R.R. Kopito, *Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway*. Cell, 1995. **83**(1): p. 121-7.
281. Hwang, T.C., et al., *Genistein potentiates wild-type and delta F508-CFTR channel activity*. Am J Physiol, 1997. **273**(3 Pt 1): p. C988-98.
282. Bebok, Z., et al., *Activation of DeltaF508 CFTR in an epithelial monolayer*. Am J Physiol, 1998. **275**(2 Pt 1): p. C599-607.
283. Backstrom, S., et al., *The RUNX1 Runt domain at 1.25A resolution: a structural switch and specifically bound chloride ions modulate DNA binding*. J Mol Biol, 2002. **322**(2): p. 259-72.



284. Bereiter-Hahn, J. and M. Voth, *Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria*. Microsc Res Tech, 1994. **27**(3): p. 198-219.
285. Nunnari, J., et al., *Mitochondrial transmission during mating in Saccharomyces cerevisiae is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(7): p. 1233-42.
286. Rizzuto, R., et al., *Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses*. Science, 1998. **280**(5370): p. 1763-6.
287. Amchenkova, A.A., et al., *Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes*. J Cell Biol, 1988. **107**(2): p. 481-95.
288. Hayashi, J., et al., *Human mitochondria and mitochondrial genome function as a single dynamic cellular unit*. J Cell Biol, 1994. **125**(1): p. 43-50.
289. Nakada, K., et al., *Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 934-40.
290. Ono, T., et al., *Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria*. Nat Genet, 2001. **28**(3): p. 272-5.
291. Legros, F., et al., *Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4343-54.
292. Chen, H., et al., *Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development*. J Cell Biol, 2003. **160**(2): p. 189-200.
293. Frank, S., et al., *The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis*. Dev Cell, 2001. **1**(4): p. 515-25.
294. Brunmair, B., et al., *Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions?* Diabetes, 2004. **53**(4): p. 1052-9.
295. Rustin, P., et al., *Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies*. Clin Chim Acta, 1994. **228**(1): p. 35-51.
296. Johnson, D.C., et al., *Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 247-81.