

Tesis Doctoral

Relación entre el canal CFTR y proteínas Shroom en ovocitos de *Xenopus laevis*

Palma, Alejandra Graciela

2017

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Palma, Alejandra Graciela. (2017). Relación entre el canal CFTR y proteínas Shroom en ovocitos de *Xenopus laevis*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6242_Palma

Cita tipo Chicago:

Palma, Alejandra Graciela. "Relación entre el canal CFTR y proteínas Shroom en ovocitos de *Xenopus laevis*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6242_Palma

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Relación entre el canal CFTR y proteínas Shroom en ovocitos de *Xenopus laevis*

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad

de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Alejandra Graciela Palma

Director de tesis: **Dr. Basilio Arístidis Kotsias**

Director Asistente: **Dra. Gabriela Inés Marino**

Consejero de Estudios: **Dra. Lidia Szczupak**

Lugar de trabajo: **Laboratorio de Canales Iónicos-Instituto de Investigaciones Médicas
Alfredo Lanari-CONICET-Facultad de Medicina-Universidad de Buenos Aires**

Buenos Aires, 2017

Fecha de defensa: 9 de agosto de 2017

RELACIÓN ENTRE EL CANAL CFTR Y PROTEÍNAS SHROOM EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*

Estudiamos el canal iónico CFTR y el canal de sodio ENaC en ovocitos de *Xenopus laevis*. Las corrientes iónicas se estudiaron con la técnica de *voltage clamp* y la expresión de las proteínas analizada con técnicas corrientes de biología molecular. Los cuatro objetivos fueron: 1) evaluar la expresión y funcionalidad heteróloga del canal de cloruro CFTR, 2) analizar el efecto de la inhibición de xShroom1 sobre el canal CFTR, 3) investigar los mecanismos por los cuales xShroom1 se relaciona con CFTR, 4) estudiar la relación entre CFTR, ENaC y xShroom1. Los principales resultados fueron: El canal CFTR se expresa y es funcional en los ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con su ARNc. La supresión de la proteína xShroom1 resultó en un incremento marcado en las corrientes de CFTR al promover un aumento en la vida media del canal en la membrana plasmática. Esto sería debido a una reducción en la vía degradativa, aunque no descartamos un cambio en la probabilidad de apertura de CFTR. Tanto el CFTR como la supresión de xShroom1 produjeron una reducción en las corrientes de sodio sensibles al amiloride. La inhibición de ENaC por CFTR es mayor cuando xShroom1 es suprimido, debido al aumento en la corriente de CFTR. En conclusión, logramos conocer la relación y mecanismos involucrados del CFTR con la proteína Shroom en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Palabras claves: CFTR - Shroom - EnaC - actividad iónica- *voltage clamp* - ovocitos.

CFTR AND SHROOM PROTEIN RELATIONSHIP IN *XENOPUS LAEVIS* OOCYTES

Ionic channel CFTR and the sodium channel ENaC were studied in *Xenopus laevis* oocytes. Ion channel activity was recorded with voltage clamp technology and the expression of the proteins was studied with current techniques of molecular biology. Four main objectives were planned: 1) to evaluate the expression and heterologous functionality of the chloride channel CFTR; 2) to analyze the effect of xShroom1 downregulation on CFTR channel; 3) to investigate the mechanisms by which xShroom1 is related to CFTR; 4) to study the relationship between CFTR, ENaC and xShroom1. The main results were: CFTR channel is expressed and functional in *Xenopus laevis* oocytes injected with CFTR cRNA. xShroom1 suppression results in the increment of CFTR currents by promoting the increase of the half-life of CFTR in the plasma membrane. This would be due to a reduction in the degradative pathway, although we do not discard a change in the openings of the CFTR channels. CFTR and the xShroom1 downregulation decrease amiloride sensitive sodium currents. ENaC inhibition by CFTR is higher when xShroom1 is suppressed, due to an increase in CFTR current. In conclusion we were able to know the relationship and the mechanisms between CFTR and Shroom protein in *Xenopus laevis* oocytes.

Keywords: CFTR - Shroom – ENaC - ionic activity - voltage clamp – oocytes.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a todos los que colaboraron en el desarrollo de esta tesis:

- A mi hija Juliana, mi marido Javier y mi mamá Graciela.
- A mi director de tesis, Dr. Basilio Aristidis Kotsias.
- A mi directora asistente, Dra. Gabriela Inés Marino.
- A mi consejero de estudios, Dra. Lidia Szczupak.
- A mi compañero de laboratorio Luciano Galizia.
- A los integrantes del laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis del Instituto de Investigaciones Médicas que dirige la Dra. Mónica Costas.
- A todos mis compañeros del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari.
- A la Universidad de Buenos Aires, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. LOS CANALES IÓNICOS	2
1.1. Características generales de los canales iónicos	4
1.2. Clasificación de los canales iónicos	4
1.3. Gating	5
1.4. Modulación de la actividad de los canales	6
1.5. Funciones de los canales iónicos.....	7
1.6. Estudio de canales iónicos en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	7
2. CFTR	13
2.1. Características del CFTR.....	14
2.2. Síntesis, reciclado y degradación del CFTR	15
2.3. Funciones del CFTR.....	20
2.4. CFTR y fibrosis quística	22
2.5. CFTR regula a otros canales iónicos	22
2.6. Canal Epitelial de Sodio (ENaC)	23
3. PROTEÍNA APICAL DE XENOPUS (APX) O SHROOM	27
4. GENERALIDADES	30
4.1. Ley de Ohm	30
4.2. Relación corriente – voltaje.....	31
4.3. Potencial de equilibrio y Ecuación de Nernst	32
4.4. Permeabilidad, conductancia y selectividad.....	33
5. MEDICIÓN DE CORRIENTES CELULARES	35
5.1. Técnica de <i>voltage clamp</i>	35
HIPÓTESIS.....	37
OBJETIVOS.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS	43
RESULTADOS.....	54
1. Expresión del canal CFTR en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> y medición de las corrientes de Cl ⁻	55

2. Bloqueo de la síntesis de xShroom1 con oligonucleótidos antisentido y evaluación de su efecto sobre las corrientes y expresión de CFTR	66
3. Mecanismos involucrados en la relación entre xShroom1 y CFTR	75
4. Relación entre el canal epitelial de sodio (ENaC), el canal regulador de la fibrosis quística (CFTR), y la proteína xShroom1	88
DISCUSIÓN	96
CONCLUSIONES	112
REFERENCIAS	117

INTRODUCCIÓN

1. LOS CANALES IÓNICOS

Las membranas biológicas son impermeables a los iones, dada la naturaleza hidrofóbica de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos que las componen. Es por ello que los iones permean a través de glicoproteínas intrínsecas de membrana que configuran poros proteicos, denominados canales iónicos (Figura 1).

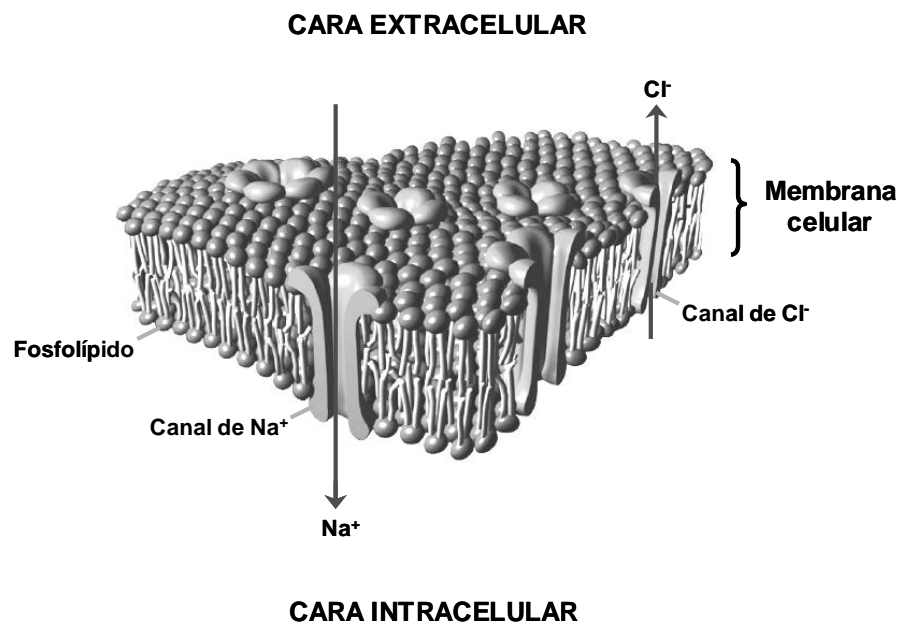


Figura 1. Esquema de una membrana celular (bicapa lipídica) en la que se encuentran insertos canales con distinta selectividad iónica. Se detallan un canal en el que ingresa Na^+ a la célula, y un canal en el que sale Cl^- (cortes transversales).

De este modo, los canales le confieren a las membranas biológicas alta permeabilidad a los iones que se desplazan a través de los canales en una dirección favorecida por el gradiente electroquímico (Hille 1992; Dubyak 2004).

Todas las células requieren de los canales iónicos para su funcionamiento y defectos en estas proteínas tienen un impacto fisiológico importante. En la última década se han identificado numerosas mutaciones en genes que codifican para canales o moduladores de canales iónicos que están asociadas a enfermedades hereditarias llamadas canalopatías (Surtees 2000; Hübner y Jentsch 2002; Imbrici y col. 2016).

En un sentido amplio las canalopatías representan una vasta variedad fenotípica del mal funcionamiento de los canales iónicos y transportadores, con aumento o disminución en la función. Aunque la mayoría de las canalopatías están asociadas a mutaciones hereditarias que modifican las propiedades de los canales iónicos, hay todo otro grupo de entidades que son debidas a pasos posteriores a la síntesis de la proteína. Por ejemplo, el plegamiento defectuoso de las proteínas pueden ocasionar formas de la fibrosis quística, entre ellas la $\Delta F508$, más común, o arritmias cardíacas graves debida a mal funcionamiento de canales de Na^+ o de K^+ como el síndrome del QT prolongado, por una defectuosa integración de canales como el canal de KATP con el citoesqueleto y otras proteínas, o ser blanco de autoanticuerpos como en la miastenia o enfermedades del sistema nervioso central debido al mal funcionamiento de canales de potasio voltaje dependientes (Imbrici y col. 2016).

1.1. Características generales de los canales iónicos

- Poseen una elevada tasa de transporte, un canal abierto permite el pasaje de 10^6 - 10^7 iones/seg provocando un cambio rápido en el potencial de membrana (V_m). Debido a la capacidad de transporte y a la alta capacitancia de membrana ($1\mu F/cm^2$), se requiere un número pequeño de canales para generar una señal eléctrica.
- Son proteínas de membrana capaces de interactuar con otras proteínas o moléculas, el citoesqueleto y el entorno lipídico.
- Una sola célula puede expresar diversos tipos de canales iónicos que, junto a la actividad de bombas y receptores, determinan la permeabilidad celular. La presencia de canales iónicos no está restringida a células excitables, sino que están expresados en todas las células eucariotas y procariotas (Kotsias 2002).

1.2. Clasificación de los canales iónicos

Los canales iónicos se pueden clasificar según:

- El tipo de ion que pasa a través del canal más fácilmente, y que permite agruparlos en canales de sodio, potasio, calcio, cloruro y canales no-selectivos.
- El estímulo que necesitan para la activación, dividiéndolos en: canales dependientes de voltaje, canales sensibles a la distorsión mecánica, canales dependientes de ligandos intracelulares o extracelulares.
- La región celular donde se localizan, por ejemplo, el canal de sodio epitelial (ENaC), el receptor nicotínico de la placa terminal (nAChR).

- La sensibilidad a inhibidores, como los canales de sodio sensibles a tetrodotoxina o a amiloride. Los canales iónicos poseen sitios de unión para drogas y toxinas.
- Similitud en la secuencia de aminoácidos. Numerosos tipos de canales pueden ser agrupados por homología estructural, por ejemplo, las proteínas de la familia ABC (*ATP binding cassette*), los canales dependientes de voltaje.

1.3. Gating

El *gating* es el proceso por el cual un canal se abre o cierra involucrando cambios conformacionales en la proteína y que se pueden medir en forma experimental. En muchos tipos de canales el *gating* se produce en respuesta a diferentes estímulos, los cuales son detectados por sensores que son parte de la proteína. Por ejemplo, los canales dependientes de ligando pueden sensar la presencia del agonista. Del mismo modo, los canales voltaje-dependientes poseen un sensor de voltaje y el *gating* ocurre en respuesta a un cambio en el campo eléctrico. En cada caso, un cambio en una parte de la molécula (sensor) produce un efecto en otra zona más alejada (apertura o cierre del poro). En los canales dependientes de voltaje, se postula al segmento S4, que posee entre 4 y 8 residuos cargados positivamente como el sensor de voltaje (Figura 2). El movimiento de las cargas del sensor en respuesta a un cambio de potencial se puede medir y se las denomina corrientes de *gating* o corrientes de compuerta.

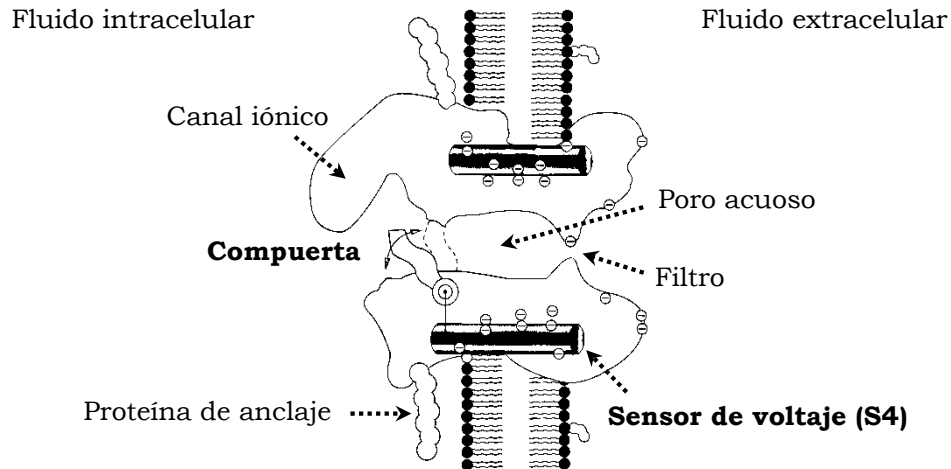


Figura 2. Modelo hipotético de la estructura de un canal voltaje dependiente. Las regiones funcionales (filtro de selectividad, compuerta y sensor) se dedujeron a partir de estudios electrofisiológicos.

1.4. Modulación de la actividad de los canales

La actividad de los canales, independientemente del estímulo inicial que requieran para su apertura, puede ser modificada por diferentes agentes o procesos, llamados moduladores. Esta modulación puede ser ejercida por cambios en: la concentración externa o interna de calcio, neurotransmisores, segundos mensajeros, citoesqueleto, fosforilación - desfosforilación del canal, entre otros.

1.5. Funciones de los canales iónicos

Los canales iónicos son los elementos excitables fundamentales de las membranas celulares, ya que producen y transducen las señales eléctricas. Los canales iónicos controlan numerosos procesos fisiológicos incluyendo la conducción del impulso nervioso, transmisión sináptica, iniciación de la contracción muscular, establecimiento y control del potencial de membrana, control del volumen celular, regulación del flujo de iones a través de células epiteliales de tejidos secretorios y reabsortivos, entre otros. Esta diversidad de funciones es un reflejo de la variedad de canales iónicos que se pueden expresar en una célula (Hille 1992; Kotsias 2002). En células no excitables se han identificado muchos de los canales iónicos caracterizados en el sistema nervioso y muscular, sugiriendo que los canales iónicos cumplen otros papeles diferentes a los establecidos en células excitables (ver más adelante).

1.6. Estudio de canales iónicos en ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos de la rana sudafricana de uñas *Xenopus laevis* (*X. laevis*) son ampliamente utilizados como un sistema de expresión heteróloga para el estudio de sistemas de transporte tales como transportadores de membrana, receptores y canales iónicos.

En 1971, Gurdon y colaboradores demostraron que los ovocitos de *X. laevis* son capaces de sintetizar hemoglobina a partir de la inyección del ARN complementario (ARNc) correspondiente (Gurdon y col. 1971). Los ovocitos son adecuados para la expresión de proteínas a partir de la inyección de ARNc, ya que contienen depósitos acumulados de enzimas, organelas y proteínas que son

normalmente utilizados luego de la fertilización y que pueden ser reclutados para proteínas heterólogas (Gurdon 1973; Gurdon y col. 1971).

En 1982, Miledi y colaboradores demostraron que los ovocitos de *X. laevis* pueden expresar varios canales iónicos (Miledi y col. 1982a). Estas células son excelentes para correlacionar la estructura de los canales iónicos con su función utilizando una combinación de técnicas de biología molecular y electrofisiológicas. La técnica de *voltage clamp* es a menudo aplicada para el estudio de canales iónicos expresados en los ovocitos de *X. laevis*.

El ovocito de *X. laevis* es un huevo inmaduro que bajo la estimulación hormonal apropiada puede ser apto para fertilizarse. Son almacenados dentro de la cavidad abdominal de hembras adultas en ovarios que incluyen ovocitos, tejido conectivo, vasos sanguíneos y células foliculares. Pueden ser removidos por procedimientos quirúrgicos hasta tres veces de la misma hembra. Los ovocitos pasan a través de seis estadios de maduración (I-VI) de acuerdo a la clasificación de Dumont (Dumont 1972); los ovocitos de estadios V y VI son los más grandes (~1.2 mm de diámetro) y son generalmente utilizados para estudios electrofisiológicos. Son células con una región pigmentada negra llamada el polo animal y un polo vegetal blanco no pigmentado. La membrana plasmática del ovocito está rodeada de una membrana vitelina, que ayuda a mantener la forma del ovocito y hace al ovocito más resistente a las manipulaciones. La membrana vitelina no afecta los registros electrofisiológicos ya que es desprovista de canales y transportadores y tiene una red lo suficientemente amplia para permitir la permeabilidad de iones y moléculas pequeñas. Alrededor de la membrana vitelina hay una capa de células foliculares que separa al ovocito del medio externo (Figura

3). A diferencia de la membrana vitelina, las células foliculares expresan canales iónicos y transportadores (Miledi y Woodward 1989a; Miledi y Woodward 1989b), están eléctricamente acopladas entre si y al ovocito a través de gap junctions (Browne y Werner 1984) y por lo tanto pueden crear serias interferencias durante los registros electrofisiológicos. Por estas razones esta capa de células es eliminada antes de la inyección del ARNc a través de un tratamiento con colagenasa.

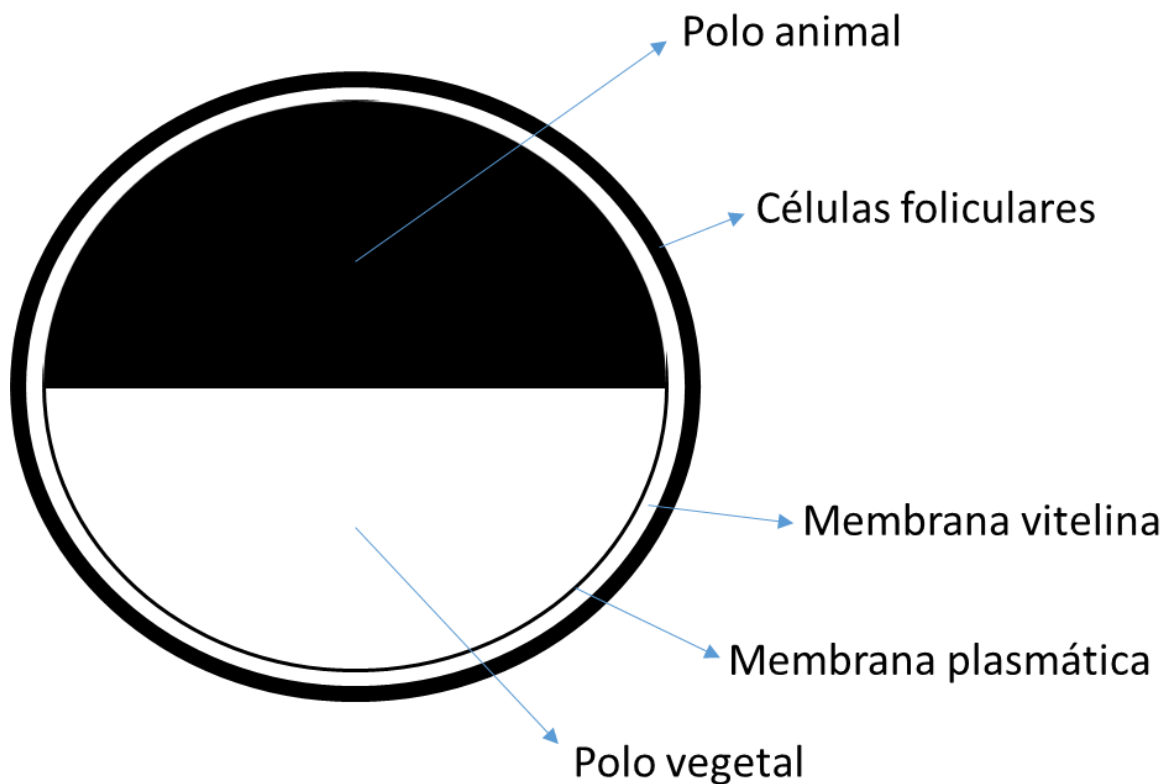


Figura 3. Estructura del ovocito de *Xenopus laevis*.

El ovocito de *X. laevis* es un sistema de expresión ideal al ofrecer varias ventajas experimentales. Es una célula relativamente grande (~0.8-1.3 mm de diámetro) conveniente para la microinyección de ARNc y para estudios de *voltage clamp* con dos electrodos (Figura 4). Además, la célula se encuentra en un estado silente relativo y por esto presenta una baja actividad de transportadores endógenos. Como está preparado para un alto volumen de síntesis proteica, el ovocito puede sintetizar proteínas de membrana a partir de ARNc exógeno microinyectado dentro del citoplasma (Gurdon y col. 1971), y múltiples especies de ARNc pueden ser inyectadas simultáneamente para estudiar complejos de proteínas formados por múltiples subunidades. Por otro lado, la rana *X. laevis* es fácilmente mantenida en cautiverio, haciéndola un animal de laboratorio de bajo costo, los ovocitos pueden ser fácilmente obtenidos y pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo fuera del cuerpo de la rana. Por lo tanto, los ovocitos son un excelente sistema para el estudio de los canales iónicos de nuestro interés, como el regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y el canal epitelial de sodio (ENaC).

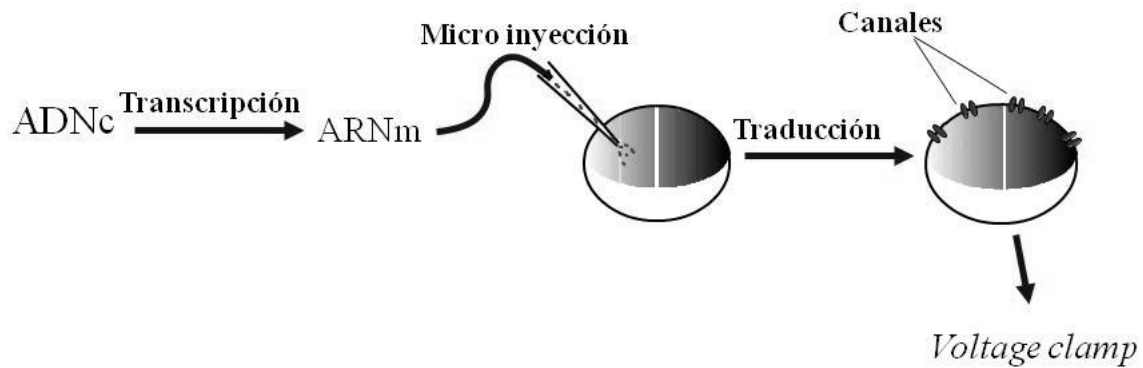


Figura 4. Expresión heteróloga de canales iónicos en ovocitos de *Xenopus laevis*.

1.6.1. Parámetros eléctricos e iónicos básicos de la membrana del ovocito

Los ovocitos de *X. laevis* pertenecen a las células más grandes del reino animal, y tienen una membrana plasmática altamente plegada con un área entre 18-20 mm² (Sigel 1990). Los parámetros eléctricos como resistencia, potencial de membrana y corriente son factores importantes que dan información sobre la calidad de los ovocitos. Estos parámetros difieren de ovocito en ovocito dentro de un mismo grupo provenientes del mismo animal y diferencias en estos parámetros pueden ser aún mayores en ovocitos provenientes de diferentes hembras. Los ovocitos que poseen una resistencia significativamente menor no deberían ser utilizados para microinyección y experimentos electrofisiológicos. Existen grandes diferencias entre los valores de potencial de membrana de los ovocitos que oscilan desde -27 a -90 mV (Kusano y col. 1982; Costa y col. 1989), dependiendo de la concentración extracelular de K⁺, el diámetro y la manipulación correcta de los microelectrodos

utilizados. Las concentraciones intracelulares iónicas (Tabla 1) son muy importantes para la investigación de sistemas de transportadores pasivos y activos debido a que la tasa y/o dirección de los respectivos transportadores son determinadas por los gradientes electroquímicos.

Ion	Concentración [mM]
K ⁺	76 - 148
Ca ²⁺	3 x 10 ⁻⁶ - 400 x 10 ⁻⁶
Na ⁺	4 - 23
Cl ⁻	24 - 62
Mg ²⁺	>0.5

Tabla 1. Concentraciones iónicas intracelulares del ovocito (Sobzack y col. 2010).

El gran tamaño y el alto grado de expresión de ARNm exógeno o ADNc hacen que los ovocitos sean una herramienta óptima para la expresión y caracterización funcional de proteínas de membrana. Sin embargo, los ovocitos poseen una gran variedad de transportadores de membrana endógenos y es de gran importancia distinguir los transportadores endógenos de los sistemas de transportadores expresados heterológamente.

2. CFTR

El regulador transmembrana de la fibrosis quística, CFTR, es un canal que permite el paso principalmente de iones Cl^- en la membrana apical de células epiteliales, así como en otros tipos de celulares, por ejemplo se lo ha encontrado en el trofoblasto (Marino y Kotsias 2014). Luego de la identificación de la secuencia de aminoácidos del CFTR (Riordan y col. 1989), se propuso una estructura para esta proteína de 150-170 kDa basada en datos electrofisiológicos y en su homología con la familia de proteínas ABC. Tiene dos dominios transmembrana (TM1 y TM2), un dominio regulatorio (R), y dos dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2), así como dos N-glicanos. En el CFTR los motivos TM1-NBD1 están unidos al TM2-NBD2 por el dominio R que posee múltiples sitios de fosforilación (Figura 5). Los dominios TM contribuyen a la formación del poro, los dominios NBD hidrolizan el ATP intracelular para regular el *gating* del canal y la fosforilación del dominio R por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) controla la actividad de mismo. Una vez que el canal es activado por fosforilación, las aperturas y cierres son regulados por la hidrólisis de ATP. Finalmente, la desfosforilación mediada por fosfatasa lleva a la inactivación del canal (Berger y col. 1993; Winter y Welsh 1997; Sheppard y Welsh 1999). En condiciones experimentales el canal es activado aumentando la concentración intracelular de AMPc por agentes farmacológicos.

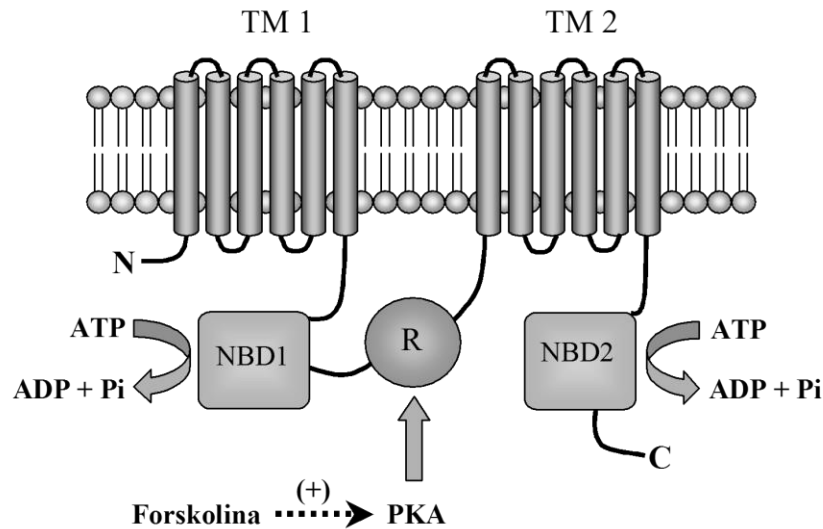


Figura 5. Modelo topológico propuesto para el CFTR que muestra los dominios citosólicos terminales NH₂ y COOH, dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) donde ocurre la hidrólisis del ATP, las 12 estructuras α-hélice que atraviesan la membrana, agrupadas en dos segmentos (TM1 y TM2) y el dominio regulatorio (R), sujeto a regulación por PKA. La forskolina es un activador de la adenilato ciclasa que promueve en última instancia la activación de PKA.

2.1. Características del CFTR

Estudios electrofisiológicos permitieron establecer que el CFTR es un canal aniónico, con una relación corriente-voltaje lineal y con la siguiente secuencia de permeabilidad a aniones: Br⁻ ≥ Cl⁻ > I⁻ > F⁻ (Anderson y col. 1991a). El comportamiento del canal es independiente del tiempo y del voltaje. La forskolina, un activador de la adenilato ciclasa, lo activa en forma reversible (ver Assef y col. 2003 y 2005 para referencias), y puede ser bloqueado por diferentes agentes incluyendo: diphenylamina-2-ácido carboxílico (DPC), ácido 4,4'-

diisotiocianoestilbeno-2-2'-disulfónico (DIDS), 5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino) ácido benzoico (NPPB), y el hipoglucemiante oral glibenclamida. Recientemente se han desarrollado otros inhibidores que son específicos de este canal, como CFTRinh-172 (Ma y col. 2002; Li y col. 2004; Hwang y Sheppard 1999; Zhang y col. 2000).

2.2. Síntesis, reciclado y degradación del CFTR

Existe una forma glicosilada inmadura de CFTR que es producida cuando es sintetizada en el retículo endoplásmico (RE) y es transportada al complejo de Golgi donde se produce la forma madura N-glicosilada de CFTR que migra a la membrana plasmática. En el RE, el CFTR es sentido por el control de calidad del RE (ERQC) y se convierte en sustrato de la degradación asociada al RE. Aproximadamente el 60 % del CFTR *wild type* recién sintetizado es retenido por ERQC y degradado por la vía ubiquitin-proteosoma. Sólo un tercio del precursor de CFTR es glicosilado de forma madura y expresado en la membrana plasmática. El CFTR una vez insertado en la membrana plasmática puede ser endocitado a endosomas tempranos y la mayoría es reciclado y enviado de vuelta a la membrana plasmática; una fracción es transferida a los endosomas tardíos y a los lisosomas para degradación (Cholon y col. 2010; Farinha y col. 2013) (Figura 6).

Los potenciadores como el ivacaftor, son compuestos de quinolinacarboxamida que mejoran la funcionalidad del canal insertado, mientras que los correctores brindan sus beneficios mediante el aumento del número de canales en la membrana por una disminución en su degradación, o facilitan su maduración o corrigen el defecto de los codones de finalización, como el ataluren que se utiliza en las mutaciones que tienen su fundamento en este mecanismo. El

ivacaftor es un compuesto que aumenta la probabilidad de apertura del CFTR (estado abierto del canal) en los casos en que la fibrosis quística es causada por una mutación que provoca un bajo funcionamiento del canal (G551D). El ataluren es un aminoglicósido diseñado para promover la lectura en las mutaciones por codones de terminación como en la mutación G542X, restaurando la función del gen con resultados positivos en enfermos con fibrosis quística. El lumacaftor (VX-809) ha demostrado utilidad en cultivos promoviendo el tráfico hacia la membrana del CFTR con la mutación $\Delta F508$ (Boyle y col. 2013; Peltz y col. 2013) (Figura 6). Existen así tratamientos novedosos para los dos tipos de mutaciones más frecuentes en Argentina.

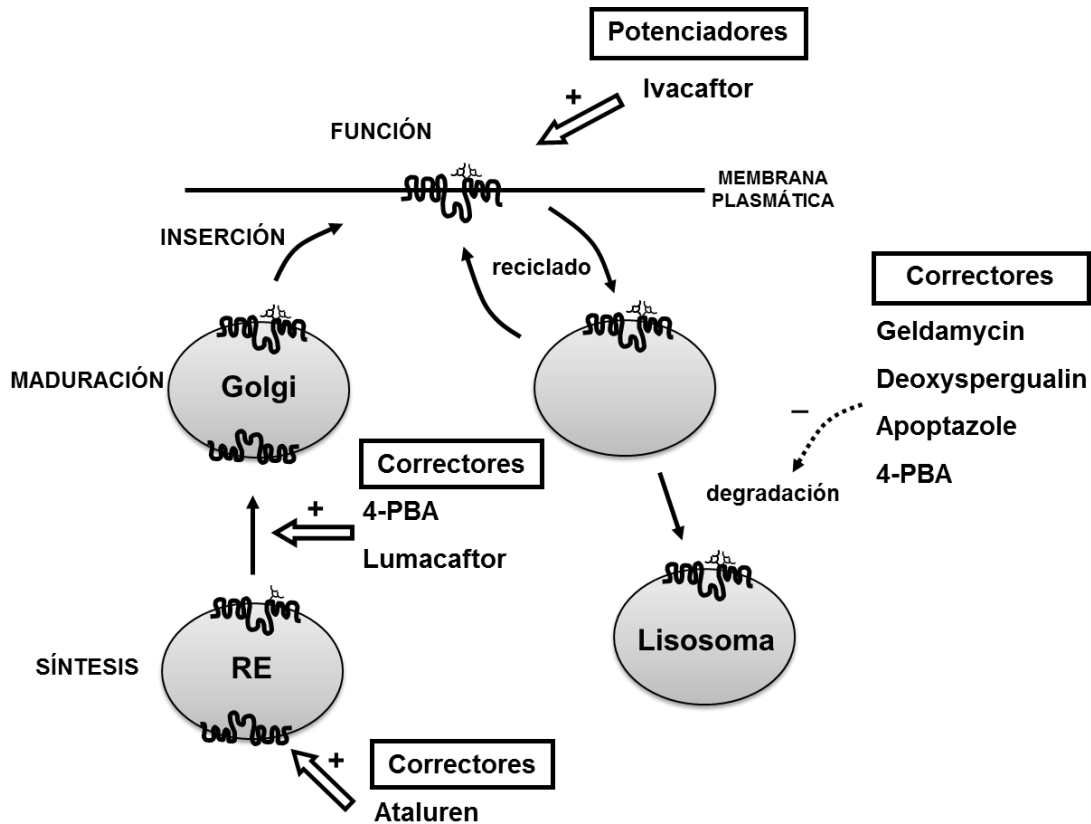


Figura 6. Esquema de la síntesis, maduración, inserción y degradación del CFTR. El CFTR se sintetiza en el retículo endoplásmico (RE) y completa su maduración y glicosilación en el complejo de Golgi para luego insertarse en la membrana plasmática donde cumple su función de canal iónico. Gran parte del CFTR es reciclado en vesículas y luego vuelto a la membrana plasmática mientras que otra fracción es degradada en los lisosomas.

El citoesqueleto tiene un papel importante en la regulación de la actividad del CFTR. Los filamentos de actina (F-actina) son esenciales en la regulación de la actividad y expresión de CFTR en la membrana plasmática (Broadbent y col. 2015).

Tanto en la síntesis, como en el plegamiento y degradación del canal intervienen numerosas moléculas chaperonas y todo este conjunto de proteínas, más de 200, se conoce como “CFTR interactoma” (Chanoux y Rubenstein 2012; Monterisi y col. 2013). El canal interactúa con diversas proteínas formando un complejo macromolecular que se encuentra anclado a F-actina que permiten regular tanto la inserción del CFTR en la membrana, su nivel de expresión como su funcionamiento y degradación (Figura 7) (Guggino y Stanton 2006). El extremo COOH terminal del CFTR posee un dominio de unión de 4 aminoácidos (DTRL) para proteínas con dominios PDZ como NHERF (*Na/H exchanger regulatory factor*). La unión del CFTR a la membrana plasmática involucra su interacción con su isoforma NHERF1. Esto requiere de la interacción de NHERF1 por medio de su extremo COOH terminal con la proteína ezrin, una proteína estructural relacionada tanto a la superficie celular como a los filamentos de actina. De esta manera se estabiliza todo el complejo, anclando el CFTR a la actina en un complejo inamovible. Además, ezrin puede actuar como una proteína de anclaje de PKA, permitiendo su compartimentalización próxima a CFTR, y que el AMPc generado por PKA se mantenga en la zona del complejo, promoviendo la fosforilación del canal (Monterisi y col. 2013; Palma y col. 2014). Por el contrario, en las mutaciones $\Delta F508$ esta estructura está desintegrada, el AMPc está diseminado por todo el citoplasma y el canal mutado es degradado (Monterisi y col. 2013).

Así, proteínas del citoesqueleto forman una interacción dinámica con CFTR, participando en la regulación del transporte iónico, tráfico y degradación de CFTR (Monterisi y col. 2013; Edelman 2014; Marino y col. 2014; Palma y col. 2014). Hasta la fecha no se conoce como estas interacciones modulan la expresión de CFTR en

la superficie celular, aunque los datos disponibles indican que el CFTR está presente en la superficie celular y en compartimentos intracelulares, y sufre una endocitosis rápida acoplada a un reciclado altamente eficiente.

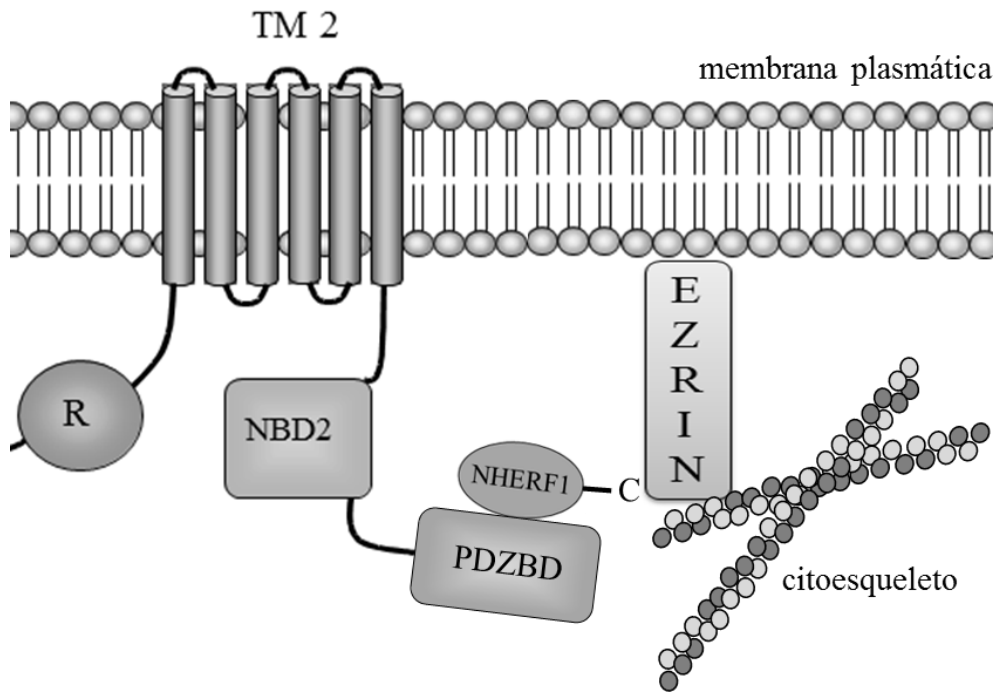


Figura 7. Esquema de la interacción entre el CFTR y proteínas asociadas al citoesqueleto. El extremo C terminal del CFTR tiene un dominio de unión a los dominios PDZ (PDZBD) y de esta forma se une a la proteína NHERF1. A su vez NHERF1 por su extremo C terminal se une a EZRIN, una proteína estructural que se conecta tanto a la superficie celular como a los filamentos de actina que forman el citoesqueleto. Sólo se han dibujado los dominios TM2, R, NBD2 y PDZBD del CFTR.

2.3. Funciones del CFTR

1) En condiciones experimentales ha sido comprobado que tanto la proteína M2 del virus de la influenza, un canal protónico, así como la inflamación, hipoxia y factores oxidantes disminuyen la expresión y función del CFTR, sugiriendo un papel del CFTR en la fisiopatología de la influenza y en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Londino y col. 2013; Rab y col. 2013).

2) Tanto el CFTR como el ENaC y otros canales iónicos participan en la migración celular, proceso crucial en la defensa inmunológica, la implantación y morfogénesis embrionaria, la reparación de heridas y la regeneración de los tejidos. Es un fenómeno complejo que requiere de la integración de señales mecánicas y químicas que reprimen la expresión de moléculas de adhesión y producen cambios en el volumen y en el citoesqueleto celular. La regulación aberrante de los canales iónicos es un mecanismo que subyace en la invasión de los tumores malignos (Marino y Kotsias 2012, 2014).

3) Además de su función como canal iónico de cloruro, el CFTR puede transportar HCO_3^- y su defecto es muy importante en la fisiopatología de la fibrosis quística (Shcheynikov y col. 2004; Tang y col. 2009).

4) El CFTR puede ser activado por estímulos mecánicos y se ha caracterizado así como un canal mecanosensible, particularidad importante en los cambios de volumen celular en los que participa el CFTR (Zhang y col. 2010).

5) Existen numerosas pruebas acerca de que el CFTR regula la actividad de otros canales iónicos como canales de cloruro de rectificación saliente (ORCC), el ENaC y las conexinas (Kotsias y Peracchia 2005; Reddy y Quinton 2005; Kotsias y col. 2006). Ejemplo de ello se observa con la disminución en la conductancia a

través de las uniones gap por el CFTR activado por forskolina en ovocitos que expresan también la conexina 45, proteína formadora de las uniones gap. La actividad del CFTR altera la respuesta control. Aunque los detalles de esta regulación no se conocen, los mecanismos podrían involucrar cambios en la concentración de iones por la actividad de un canal que a su vez afectaría a otro canal o en el número de canales expresados. Una interacción física directa entre CFTR y ENaC se apoya en los resultados obtenidos en experimentos de electrofisiología de canales aislados, la coimmunoprecipitación de las dos proteínas y por la presencia del fenómeno FRET (transmisión de energía de resonancia de Förster) que requiere de una proximidad de las proteínas de 1-10 nm (Berdiev y col. 2009; Qadri y col. 2011).

En 1986 se publicó un artículo (Boucher y col. 1986) en el que se demostraba en la fibrosis quística una hiperabsorción de Na^+ en el epitelio de las vías aéreas, sugiriéndose la participación del canal ENaC en el desarrollo de la enfermedad. A partir de ese momento se publicaron nuevas evidencias y contradicciones sobre la relación del ENaC con el CFTR y del papel regulador del CFTR sobre otros canales, que incluyeron modelos transgénicos de ratones con falta de CFTR y sobreexpresión de una de las subunidades del ENaC (Zeihner y col. 1995; Mall y col. 2004). Como se comentó más arriba, faltan muchos detalles sobre esta interacción, en particular sobre sus efectos positivos y negativos dependiendo del tejido estudiado (Collawn y col. 2012; Hobbs y col. 2013).

En líneas generales, la absorción de los iones y agua depende de los efectos del transporte activo de Na^+ en las membranas basolaterales. El Cl^- y el Na^+ se transportan al interior celular por varios mecanismos, incluyendo el CFTR y el canal

ENaC en respuesta a cambios en la fuerza impulsora creada por la NaK-ATPasa. El movimiento de iones tiene por resultado el pasaje de agua por vía paracelular y transcelular (Frizzell y Hanrahan 2012; Reddy y Stutts 2013).

2.4. CFTR y fibrosis quística

Mutaciones en el gen que codifica para el CFTR causan fibrosis quística, la enfermedad genética de mayor prevalencia en la población caucásica, alcanzando frecuencias de 1:2500 nacimientos vivos. Más de 1900 mutaciones diferentes se identificaron en pacientes con fibrosis quística. Muchas de ellas alteran diferentes propiedades del canal, pero la mutación más común ($\Delta F508$) resulta en un mal ensamblaje y en una falla en la maduración de la proteína, que imposibilita su inserción en la membrana plasmática (Ward y col. 1995). Esta mutación se observa en aproximadamente el 59 – 66 % de los pacientes con fibrosis quística en la Argentina (Palma y col. 2014). Este desorden se caracteriza por un defectuoso transporte de Cl^- y de otros iones que afectan las funciones exocrinas de diferentes órganos como el páncreas, intestino, pulmón, árbol biliar y glándulas sudoríparas (Quinton y col. 1999). Las características clínicas de la fibrosis quística incluyen obstrucción de las vías respiratorias por acumulación de moco e infecciones bacterianas crónicas, ocasionando pérdida progresiva de la función pulmonar.

2.5. CFTR regula a otros canales iónicos

El CFTR es una proteína multifuncional, es un canal de Cl^- pero también un regulador de la actividad de otros canales iónicos como el ENaC, el canal de K^+

renal (ROMK2) y el canal de cloruro con rectificación saliente (ORCC), entre otros (Kunzelmann y Schreiber 1999; Schwiebert y col. 1995 y 1999; Rubenstein y col. 2011).

2.6. Canal Epitelial de Sodio (ENaC)

El ENaC es un canal iónico selectivo al sodio, no activado por voltaje, perteneciente a la superfamilia de las ENaC/Degenerinas (Pochynyuk y col. 2007). El canal es inhibido por el bloqueante amiloride y sus análogos (benzamil y triamterene), hecho que caracteriza a las corrientes que conduce (Garty y Palmer 1997; Kellenberger y Schild 2003; Kashlan y col. 2005). El mismo media la entrada de sodio a las células desde el fluido luminal, ubicándose en la membrana apical de muchos epitelios absortivos de alta resistencia, representando el primer paso para el transporte transepitelial del ion. Participa en el mantenimiento del volumen extracelular y de la presión arterial, e indirectamente en la homeostasis del K^+ y de H^+ . En la superficie del epitelio de las vías aéreas mantiene el volumen de líquido ayudando a la eliminación de las partículas y patógenos inhalados (Donaldson y col. 2007).

El ENaC se expresa en otros tipos celulares, tales como el túbulo colector renal, el colon distal, los ductos de las glándulas secretorias (salivales y sudoríparas), el epitelio respiratorio/pulmonar y la piel de anfibios (Garty y Palmer 1997; Alvarez de la Rosa y col. 2000). También se lo ha detectado en las papilas gustativas, células de músculo liso vascular, en células epiteliales mamarias (Boyd y col. 2007), en el epitelio endometrial y tracto reproductor femenino (Yang y col. 2004; Chan y col. 2007), en células endoteliales (Kusche-Vihrog y col. 2007), en

espermatozoides (Hernandez-Gonzales y col. 2006; Kong y col. 2008), en linfocitos humanos (Bubien y col. 2001), en glándula tiroides (Verrier y col. 1989), keratinocitos y folículos pilosos (Rossier y col. 2002), y en células BeWo y placenta humana (del Mónaco y col. 2006 y 2008^a; del Mónaco y col. 2009).

2.6.1. Estructura del ENaC

El ENaC es un canal heteromérico, compuesto por tres subunidades homólogas (α , β y γ) que comparten una estructura terciaria común y las mismas poseen los dominios carboxilo y amino intracelulares cortos (~50-100 aminoácidos) separados por dos dominios transmembrana y un largo dominio extracelular (~450 aminoácidos) (Figura 8).

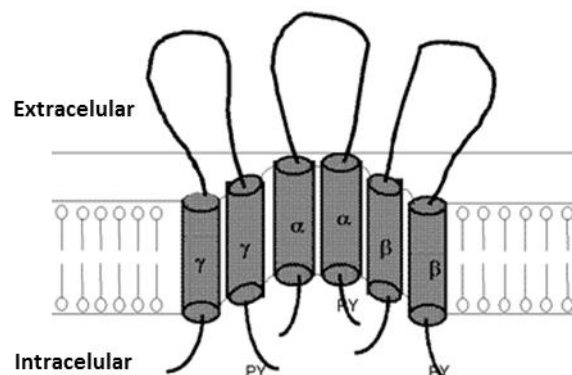


Figura 8. Estructura terciaria de las subunidades del ENaC. Esquema de una membrana celular en la que se observan las tres subunidades del canal de sodio y su distribución a través de la misma.

2.6.2. Regulación del ENaC

El ENaC es regulado por una variedad de estímulos, como aldosterona, vasopresina, insulina (Butterworth y col. 2009), glucocorticoides (Quesnell y col. 2007), prostaglandinas, agonistas beta adrenérgicos y por las hormonas sexuales estrógeno y progesterona (Laube y col. 2011). Por otra parte, el mismo puede ser afectado por la concentración de sodio intracelular (Anantharam y col. 2006; Bize y col. 2007) y extracelular (Sheng y col. 2007), por estímulos mecánicos (Carattino y col. 2004; Wei y col. 2007) y por la tensión de oxígeno sanguínea (Otulakowski y col. 2006). El canal es sensible a fosfatidilinosítidos (Ma y col. 2002; Pochynyuk y col. 2007), estrés hipotónico (Taruno y col. 2008) y a la coexpresión con canales de cloro CIC-5 (Bachhuber y col. 2005).

El CFTR regula al ENaC aunque el mecanismo por el cual ocurre esta interacción no es conocido. Se sugirió que el CFTR se asocia físicamente con el ENaC y que el CFTR suprime la proteólisis de los dominios extracelulares de ENaC impidiendo su estimulación (Gentsch y col. 2010). En ovocitos de *Xenopus laevis* se observó que la coexpresión del ENaC y el CFTR disminuyó la probabilidad de apertura de ENaC, sin afectar su expresión en la superficie celular (Konstas y col. 2003). También se propuso que el Cl⁻ intracelular inhibe el ENaC como un mecanismo de regulación indirecto del CFTR (Konig y col. 2001; Bachhuber y col. 2005).

La hormona mineralocorticoide aldosterona es uno de los principales efectores (y el más potente) para el aumento de la actividad del ENaC, elevando las tasas de reabsorción de sodio a través de los epitelios. La hormona entra a las células y se une al receptor de mineralocorticoides (MR) en el citoplasma. El

receptor activado ingresa al núcleo, donde estimula la transcripción de genes (proteínas estimuladas por aldosterona, AIPs) y reprime la transcripción de otros (proteínas reprimidas por aldosterona, ARPs). Los tiempos de acción de la hormona presentan dos fases. La respuesta temprana, entre los 30 minutos y las 3 horas, caracterizada por un crecimiento en la absorción de sodio de 2 a 3 veces. En esta etapa el aumento de los niveles del ARNm del ENaC es escaso, por lo que el aumento de la corriente de sodio está relacionado con el tráfico del canal a membrana y la inhibición de las vías de ubiquitinación, aumentando la presencia del mismo en la superficie celular. La respuesta tardía, a partir de las 3 horas de estímulo y durando incluso hasta las 24 horas, se caracteriza por un aumento de la absorción de sodio de hasta 20 veces. La aldosterona estimula la transcripción de las subunidades del canal, con patrones de respuesta heterogéneos y tejido específicos (Alvarez de la Rosa y col. 2000).

En etapas tardías la aldosterona estimula directamente la transcripción del ENaC, aumentando las copias del canal por célula y estimulando su presencia en la membrana plasmática. Una vez que el canal se encuentra en membrana, el mismo es modulado por estímulos postranscripcionales: 1) proteólisis de las subunidades del canal, mediante la cual las proteínas son clivadas por proteasas (mCAP-1, mCAP-2, tripsina, elastasa, prostasina, furina), aumentando la probabilidad de apertura (Narikiyo y col. 2002; Hughey y col. 2003; Caldwell y col. 2004; Rossier 2004; Adebamiro y col. 2007; Harris y col. 2007). 2) metilación de la subunidad β del canal, aumentando la probabilidad de apertura (Rokaw y col. 1998;

Zhou y Buben 2001; Edinger y col. 2006). 3) unión a fosfatidilinosítidos, que regulan la probabilidad de apertura del canal (Pochynyuk y col. 2007).

Dado que la modulación principal del ENaC se produce regulando su tráfico en vesículas hacia la membrana plasmática, también existen proteínas del citoesqueleto (syntaxina 1A) y pequeñas GTPasas (RhoA, K-RasA, Rac1 y proteínas Rab) mediando la endo y exocitosis de dichas vesículas, participando así de los efectos hormonales descritos (Condliffe y col. 2004; Malik y col. 2006; Pochynyuk y col. 2006; Saxena y Zaur 2006; Saxena y col. 2007).

3. PROTEÍNA APICAL DE XENOPUS (APX) O SHROOM

El grupo de Staub y colaboradores describió en el año 1992, una proteína que denominaron *Apx* (*Apical protein Xenopus*) en células A6 derivadas de riñón de *X. laevis*. La misma fue clonada y su gen caracterizado. El gen de *Apx* se aisló de una genoteca de células A6 de riñón de *X. laevis* y se determinó que la proteína se expresaba en membranas apicales, modulando la expresión funcional del ENaC en la superficie celular, como una proteína regulatoria (Benos y col. 1986; Staub y col. 1992). En ese mismo trabajo, la inhibición de la expresión de *Apx* por oligonucleótidos antisentido produjo una reducción de las corrientes sensibles al amiloride generadas en ovocitos de *Xenopus* inyectados con ARN poli (A)⁺ de células A6, y medidos con técnicas electrofisiológicas. No se generaban corrientes de sodio cuando se expresaba solamente *Apx* en los ovocitos.

Hace unos años, Apx se incorporó a la familia de proteínas Shroom (Shrm), asociadas al citoesqueleto de actina apical. En vertebrados, la familia Shroom consiste en cuatro miembros, Shroom1 - Shroom4, con similitudes en sus dominios, los cuales incluyen un dominio PDZ y dos dominios Apx/Shrm C-terminales (ASD1 y ASD2) (Hagens y col. 2006) con el dominio ASD2 presente únicamente en estas proteínas y conservado evolutivamente para mantener la arquitectura celular (Dietz y col. 2006; Hagens y col. 2006). Estas proteínas comparten actividades celulares, como así también poseen actividades distintivas. Todas las proteínas Shroom examinadas se unen a F-actina a través del dominio ASD1 y controlan la morfología celular y la arquitectura tisular al regular la distribución subcelular del citoesqueleto de actina-miosina y utilizan esto para provocar constricción apical o contractibilidad cortical (Hildebrand 2005). Se predice que las proteínas Shroom funcionen como adaptadores regulando la actividad contráctil del citoesqueleto actina-miosina. Cada miembro está implicado en la regulación de varios eventos durante el desarrollo embrionario, incluyendo el cierre del tubo neural (Hildebrand y Soriano 1999), remodelado de la vasculatura (Farber y col. 2011), desarrollo del ojo (Fairbank y col. 2006; Plageman y col. 2010), morfogénesis del intestino (Grosse y col. 2011; Plageman y col. 2011a), arquitectura y función neuronal (Hagens y col. 2006b; Taylor y col. 2008), función renal (Köttgen y col. 2009), hipertensión arterial (Sevilla-Pérez y col. 2008), y heterotaxia en humanos (Tariq y col. 2011). Dentro de la familia se encuentran: Shroom3, una proteína de unión a actina requerida en el cierre del tubo neural de ratones y *Xenopus*, que controla la distribución del esqueleto de actina-miosina y la morfología celular durante la embriogénesis (Hildebrand 2005); y Kiaa1202 (Shroom4), también asociada a la organización del citoesqueleto de

actina, con un importante papel en el desarrollo embrionario de los vertebrados (Yoder y Hildebrand 2007). Apx, a partir de estos estudios se denominó Shroom1, y se encontró que a diferencia del resto de los miembros no posee un dominio PDZ (Figura 9). Posteriormente, se observó que Apx y ENaC estaban físicamente asociados en la membrana de las células A6, junto con proteínas del citoesqueleto (espectrina), en un complejo macromolecular y se confirmó su influencia en las corrientes sensibles al amiloride (Zuckerman y col. 1999). En nuestro laboratorio observamos que la regulación del canal ENaC por la proteína Shroom1 ocurre a través de un cambio en el número de canales insertos en la membrana, y no por un efecto sobre las propiedades cinéticas del canal (Assef y col. 2011). En resumen, esta proteína posee una actividad regulatoria sobre la forma y la arquitectura intracelular, tejida específica, dependiente del citoesqueleto de actina-miosina/tubulina.

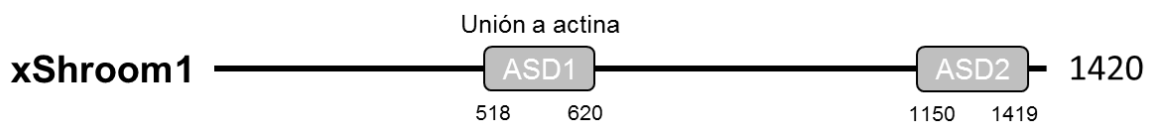


Figura 9. Estructura de xShroom1.

Organización de los dominios de la proteína xShroom1.

4. GENERALIDADES

4.1. Ley de Ohm

Para el estudio de los canales iónicos es importante recordar algunos conceptos de electricidad. La materia está constituida por moléculas cargadas, donde un mol de Hidrógeno contiene el número de Avogadro de protones ($N = 6.02 \times 10^{23}$) y el mismo número de electrones. La carga de un protón (e), medida en Coulombs es, $e = 1.6 \times 10^{-19}$ C. Por lo tanto, la carga de un mol de protones queda determinada por la Ecuación 1 y se la conoce como constante de Faraday (F).

$$F = N \times e = \sim 10^5 \text{ C/mol}$$

Un flujo de cargas es denominado corriente. La corriente se mide en Amperios (A), donde 1 A corresponde al flujo de un Coulomb por segundo. Si se colocan en solución salina un electrodo positivo y otro negativo, los cationes migrarán al polo negativo (cátodo) y los aniones al positivo (ánodo). Por convención, la corriente fluye a través de la solución desde el ánodo al cátodo. Según la ley de Ohm, la corriente eléctrica (I) está determinada por dos factores: la diferencia de potencial (V) entre los electrodos (trabajo necesario para mover una carga de un punto a otro, medida en Volts) y la conductancia (G) de la solución entre ellos (facilidad con que las cargas se mueven entre dos puntos, medida en Siemens).

$$I = V \times G$$

La ley de Ohm también puede escribirse en términos de resistencia, donde la resistencia (R) es la inversa de la conductancia y se mide en Ohm (Ω). La ley de Ohm es central en la biofísica de membranas porque cada canal iónico constituye un conductor elemental que atraviesa la membrana lipídica. La conductancia total de la membrana es la suma de esas conductancias elementales en paralelo. De este modo, podemos estimar el número de canales abiertos y la facilidad con la que los iones pueden atravesar la membrana.

4.2. Relación corriente – voltaje

Usualmente se caracteriza a los canales iónicos con curvas corriente-voltaje (curvas I-V), obtenidas de relacionar la amplitud de la corriente con el potencial aplicado a la célula. A partir de estos gráficos se puede estimar la conductancia que se define como el cociente entre la amplitud de corriente y el voltaje.

En muchos casos, la conductancia no cambia en forma lineal con el voltaje y a esta propiedad se la conoce como rectificación. La rectificación puede ser consecuencia de un cambio en la probabilidad de apertura del canal, de mecanismos de bloqueo por iones o moléculas presentes en el medio intracelular y de diferente composición iónica de las soluciones a ambos lados de la membrana. El término de rectificación entrante se utiliza cuando el canal conduce corriente en forma más efectiva hacia el interior celular, con respecto al exterior. Lo opuesto corresponde a la rectificación saliente, y se denominan canales no rectificantes a aquellos que presentan una curva I-V lineal (Figura 10).

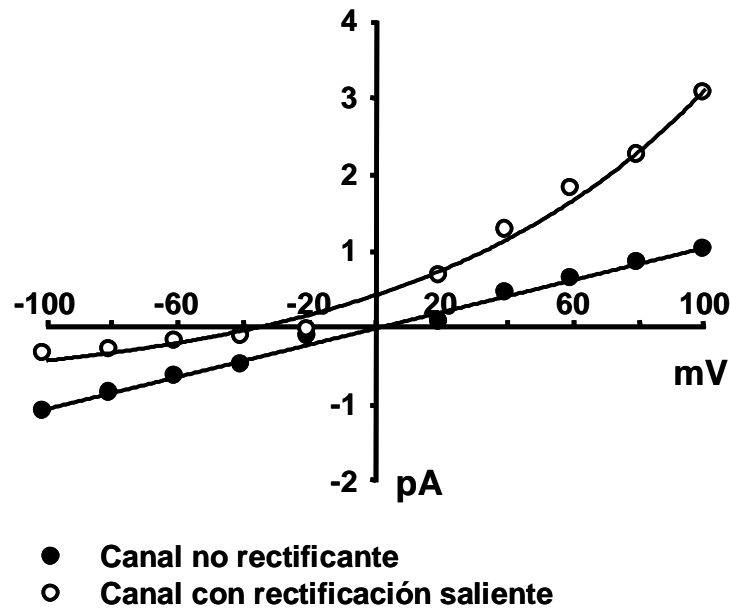


Figura 10. Relación corriente – voltaje de dos canales iónicos distintos. Los símbolos llenos (●) representan a un canal de conductancia unitaria 10 pS y no rectificante. Los círculos vacíos (O) representan a un canal con rectificación saliente.

4.3. Potencial de equilibrio y Ecuación de Nernst

Un canal puede conducir corriente hacia adentro o afuera de la célula, y la dirección en que el movimiento de iones ocurre es gobernada por el gradiente electroquímico. El punto donde el gradiente químico es exactamente igual al gradiente eléctrico es llamado potencial de equilibrio.

En las células, los iones se distribuyen en forma asimétrica a ambos lados de la membrana y la diferencia de potencial a través de la misma en el reposo es

distinta de cero. El potencial de equilibrio para un determinado ion (E_{ion}) queda determinado por la Ecuación de Nernst:

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[S]_o}{[S]_i}$$

donde, z es la carga del ion, F es la constante de Faraday, R es la constante de los gases, T es la temperatura en grados Kelvin y $[S]_o$ y $[S]_i$, corresponden a las concentraciones del ion fuera y dentro de la célula, respectivamente. Conociendo las concentraciones iónicas a ambos lados de la membrana se puede determinar a partir de la ecuación de Nernst, el potencial de equilibrio para cada ion. De este modo, si se fija la diferencia de potencial de la célula al potencial de equilibrio del K^+ (E_K) por ejemplo, la ecuación predice que en estas condiciones no habrá flujo neto de K^+ a través de la membrana.

4.4. Permeabilidad, conductancia y selectividad

La permeabilidad es una propiedad de las membranas biológicas que se relaciona con la facilidad que posee un ion para atravesar la bicapa lipídica. En la mayoría de los casos es independiente de la concentración del ion a ambos lados de la membrana. La conductancia es una medida del número de canales insertos en la membrana que se encuentran abiertos a un determinado potencial. En líneas generales, la conductancia cambia en paralelo con la permeabilidad, pero la conductancia depende de las propiedades de la membrana y de las concentraciones de iones en las soluciones interna y externa. Si un canal permite el pasaje de más de una especie iónica, un valor análogo al potencial de equilibrio, llamado potencial

de reversión (E_r) puede ser calculado a partir de una ecuación de campo constante modificada:

$$E_r = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_{Cl} [Cl]_i + P_X [X]_i}{P_{Cl} [Cl]_o + P_X [X]_o}$$

En este ejemplo se escribió la ecuación para el Cl^- , donde $[Cl]$ y $[X]$, corresponden a las concentraciones de Cl^- y de otro ion permeable, respectivamente y las permeabilidades se simbolizan como P_{Cl} y P_X . E_r corresponde al valor de potencial donde la corriente es cero y se puede obtener experimentalmente. De este modo, si las concentraciones iónicas en la solución intracelular y extracelular son conocidas, esta ecuación permite estimar el valor de permeabilidad relativa del ion X con respecto al Cl^- , P_X/P_{Cl} .

Otra alternativa para obtener datos de permeabilidades relativas es mediante la determinación del cambio en el E_r cuando un ion es reemplazado por otro en la solución extracelular. Por ejemplo se mide primero el E_r con Cl^- en la solución extracelular ($[Cl]_o$) y luego con el anión X ($[X]_o$) y se calcula P_X/P_{Cl} utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta E_r = E_{r_X} - E_{r_{Cl}} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_X [X]_o}{P_{Cl} [Cl]_o}$$

Si se obtiene un valor de $P_X/P_{Cl} = 0.25$, indica que el Cl^- es 4 veces más permeable que X.

La selectividad compara las permeabilidades de un canal abierto a diferentes especies iónicas. El fenómeno de selectividad tiene lugar en la región más angosta del poro conocida como filtro de selectividad, donde los aminoácidos localizados en esa zona determinan el tipo de ion que puede permear. La interacción de los iones con los grupos polares del filtro permite la deshidratación y entrada del ion por el poro del canal.

5. MEDICIÓN DE CORRIENTES CELULARES

5.1. Técnica de *voltage clamp*

5.1.1. Fundamentos del *voltage clamp*

La técnica de *voltage clamp*, fue desarrollada por Cole y Marmont (1949) y Hodgking y colaboradores (1952), y revolucionó el estudio de los canales iónicos. Con esta técnica electrofisiológica el flujo de iones a través de la membrana celular se detecta como corriente eléctrica, mientras que el potencial de membrana es mantenido bajo control experimental con un amplificador, haciendo posible medir las corrientes macroscópicas de una célula entera. La técnica de *voltage clamp* consiste en impalar la célula con dos microelectrodos de vidrio conectados a un amplificador, uno constituye el electrodo de voltaje para registrar el voltaje, y otro el electrodo de corriente para inyectar corriente desde el amplificador. El electrodo de voltaje puede capturar todos los iones que fluyen bajo su área después de la aplicación de un estímulo y así la corriente transportada por los canales iónicos,

puede ser determinada. Esto se denomina *voltage clamp* con dos electrodos (TEVC) y se utiliza para registrar la actividad de los canales de toda una célula manteniendo intacta la composición del medio intracelular (Figura 11).

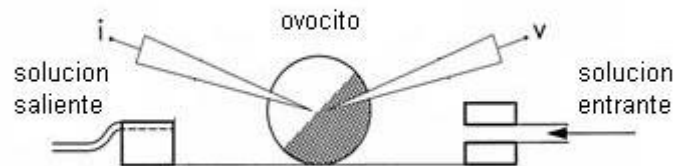


Figura 11. Esquema de la técnica de *voltage clamp* con dos electrodos.

5.1.2. Equipo de *voltage clamp*

En una forma simple, el equipo de *voltage clamp* usado en nuestro laboratorio consiste en una cámara donde se colocan las células, ubicado sobre una mesa antivibratoria. Un amplificador de *voltage clamp* está conectado al electrodo de medida (pipeta) y dos micromanipuladores permiten posicionar los microelectrodos sobre la célula. Se requiere de otros aparatos para la adquisición de datos (ej. software pClamp 8.0, conversor analógico digital, osciloscopio, computadora, etc.), y se utilizan instrumentos para la fabricación de las pipetas, como el estirador de pipetas.

HIPÓTESIS

El CFTR se activa por el aumento de los niveles de AMPc intracelulares y por la fosforilación mediada por las proteínas quinasa C (PKC) y quinasa A (PKA). Otros factores adicionales influyen en la cantidad, estabilidad, vida media y la actividad de CFTR en la superficie celular (Broadbent y col. 2015). Las proteínas del citoesqueleto forman una interacción dinámica con el CFTR, participando en la regulación del transporte de iones del canal, en su tráfico y degradación, siendo F-actina esencial para la regulación de la actividad y la expresión (Marino y Kotsias 2014; Monterisi y col. 2013; Palma y col. 2014). Hasta el momento, no está claro cómo todas estas interacciones modulan la expresión de CFTR en la superficie celular, aunque los datos indican que el canal está presente en la superficie celular y en compartimentos intracelulares y sufre una rápida endocitosis acoplada con un eficiente reciclado (Ahner y col. 2013).

En los epitelios, el canal de sodio ENaC se colocaliza con frecuencia con otros canales aniónicos, y se ha demostrado una compleja regulación por el canal de cloruro CFTR (Bachhuber y col. 2005). El CFTR además de ser un canal aniónico es un regulador de otros canales iónicos como el ENaC y el ORCC por varios mecanismos (Kunzelman y col. 1999; Hobbs y col. 2013). La relación entre CFTR y ENaC parece depender del tejido estudiado; así, en las vías aéreas, la presencia o activación del CFTR se asocia a una menor actividad del ENaC, mientras que en las glándulas sudoríparas el ENaC es activado. Mutaciones en los mismos están implicadas en la fisiopatología de cuadros nosológicos como hipertensión, preeclampsia y fibrosis quística entre otros.

Shroom es una familia de proteínas involucradas en la regulación y mantenimiento de la arquitectura del citoesqueleto mediante la unión a actina

(Fairbank y col. 2006). En células A6 de riñón de anfibio, el ENaC se encontró físicamente asociado a Shroom1 (Zuckerman y col. 1999). Además, nuestro grupo ha demostrado que Shroom1 regula al ENaC a través del número de canales en la membrana y no por un efecto sobre las propiedades cinéticas del canal (Assef y col. 2011).

Dada la frecuente colocalización del ENaC y CFTR donde existe una interacción entre ambos y los efectos demostrados sobre ENaC por parte de Shroom1, nos indujeron a pensar que esta regulación podría extenderse hacia el CFTR.

En base a estas evidencias y nuestros resultados, nuestra hipótesis de trabajo es que podría existir una relación entre el canal de cloruro CFTR y la proteína asociada al citoesqueleto Shroom. Esta relación podría estar dada por mecanismos regulatorios de Shroom sobre CFTR a través de alguna de las vías de tráfico intracelular del canal.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO

Shroom es una familia de proteínas relacionadas con la regulación y el mantenimiento del citoesqueleto al unirse a actina. Uno de los miembros de la familia Shroom es la proteína xShroom1, la cual se expresa constitutivamente en ovocitos de *Xenopus laevis* y es necesaria para la expresión y funcionalidad del canal epitelial de sodio ENaC (Assef y col. 2011)

Dada la información presentada hasta el momento expuesta en los capítulos de introducción e hipótesis, el **objetivo general** de este trabajo consiste en **estudiar la relación y mecanismos involucrados del CFTR con proteínas Shroom en ovocitos de *Xenopus laevis***. Se emplean técnicas electrofisiológicas (*voltage clamp*) y de biología molecular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL TRABAJO

1. Evaluar la expresión y funcionalidad heteróloga del canal de cloruro CFTR por la técnica de *voltage clamp* en ovocitos de *Xenopus laevis*, estudiando las corrientes totales, analizando curvas corriente-voltaje, y su comportamiento luego de la utilización del bloqueante DPC. La expresión del canal se confirmará con técnicas de biología molecular, para conocer si los patrones de expresión se corresponden con el análisis funcional del mismo.

2. Analizar la relación entre xShroom1 y CFTR inhibiendo xShroom1 con oligonucleótidos antisentido y midiendo la actividad y la expresión del canal por *voltage clamp* y biotilización de las proteínas de membrana, respectivamente, en ovocitos de *Xenopus laevis*.

3. Investigar los mecanismos por los cuales xShroom1 se relaciona con CFTR.

Se registrarán las corrientes de CFTR cuando el tráfico del canal a la membrana plasmática es bloqueado con brefeldina A para analizar su vida media, y cuando su degradación proteosomal es inhibida con MG-132. También cuando el lisosoma es inhibido con cloroquina o cuando la endocitosis del canal es inhibida con dynasore. Por otro lado se medirá la ubiquitinación de CFTR y su interacción con la chaperona Hsc70 por inmunoprecipitación. En todos los casos xShroom1 será inhibida con oligonucleótidos antisentido.

4. Estudiar la relación entre CFTR, ENaC y xShroom1 analizando las corrientes de sodio sensibles a amiloride por *voltage clamp*, cuando la proteína endógena de los ovocitos xShroom1 es inhibida y el canal CFTR es activado con un aumento intracelular de AMPc.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los ovocitos de *Xenopus laevis*

Ranas hembras adultas de *Xenopus laevis* se anestesiaron con 0.3 % de triclaína (MS-222) y un segmento del ovario fue extraído de la incisión abdominal. Este segmento fue colocado en medio ND96, que contiene (en mM): NaCl 96, KCl 2, CaCl₂ 1.8, HEPES 5 (pH 7.4) suplementado con 1 µg/ml de gentamicina. Las células foliculares que rodean a los ovocitos se removieron mediante incubación con 1 mg/ml de colagenasa tipo IA por 40 minutos. Los ovocitos en estadio V-VI se separaron en forma manual y se mantuvieron a 18 °C.

Expresión heteróloga

En los ovocitos de *Xenopus laevis* obtenidos se expresaron heterológamente los canales CFTR o ENaC. Para ello se realizó la síntesis *in vitro* de los ARN complementarios (ARNc) utilizando el kit T7 mMessageMachine kit (Ambion, Austin, EEUU), a partir de los ADNc de CFTR y ENaC. Luego a cada ovocito se le inyectaron 7 ng del ARNc de CFTR o ENaC solo o junto con 25 ng de los oligonucleótidos sentido o antisentido dirigidos contra xShroom1 diluidos en 50 nl finales de agua libre de RNAsas (ver mas abajo), o en algunos casos con 50 nl de agua libre de RNAsas como control. Para esto se utilizó un nanoinyector Drummond (Drummond, Broomall, EEUU).

Electrofisiología

Los ovocitos se colocaron en una cámara de registro y visualizados por medio de una cámara digital montada sobre una mesa antivibratoria. Las distintas soluciones empleadas se perfundieron (0.6 ml/min) con una bomba peristáltica (Dynamax RP-1; Rainin Instruments, Woburn, MA) y la solución fue eyectada con una aguja ubicada arriba de la cámara que contiene el ovocito. Se midieron las corrientes iónicas utilizando la técnica de *voltage clamp* con dos microelectrodos de vidrio, utilizando un amplificador Warner Oocyte Clamp OC 725C con un sistema de referencia *bath probe* (Warner Instruments, Hamden, CT). Los datos se adquirieron a través de Clampex 8.0 (Axon Instruments, Union City, CA) utilizando una interface DigiData 1220A a 1 kHz. Los microelectrodos de vidrio se construyeron con un estirador de pipetas horizontal con resistencias de 1-3 M Ω y se llenaron con 3 M KCl. Para la referencia se utilizaron dos cables de plata clorurados a través de puentes de agar 3 % en 3 M KCl. y posicionados cerca del ovocito. Para el análisis de los datos se utilizaron los programas de pClamp10. En la cámara con el ovocito, estimamos que la resistencia baño-fluido como la resistencia entre ambos electrodos (alrededor de 100-200 Ω). Sin el *bath probe* este valor se incrementa por un factor de 10 o 20 y de allí la utilidad del circuito *bath probe* para mantener esta resistencia en serie con la membrana y entre electrodos lo más baja posible.

Luego de la inserción de ambos microelectrodos, se esperó 5 minutos antes de comenzar el experimento. Se corrieron dos sets de registros con una demora de 5 minutos para asegurarse de que las corrientes fueran estables. La adición de 10 μ M de foskolina más 1 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) a la solución

extracelular produce un aumento intracelular de AMPc y fue usada para inducir la actividad de CFTR (Weber y col. 2005). De la resta entre la actividad basal y luego de la aplicación de este compuesto se extrajo la corriente de CFTR (Jiang y col. 1998; Qadri y col. 2011). Luego de 15 minutos de exposición a las drogas las corrientes se registraron, tiempo suficiente para tener un efecto de activación estable del canal. Las corrientes de sodio de ENaC son aquellas sensibles a su inhibidor específico amiloride. Todos los experimentos se realizaorn a temperatura ambiente (20 - 24 °C). Las corrientes y los potenciales se expresaron usando las convenciones usuales, donde un potencial negativo indica una polaridad negativa en el interior celular y una corriente entrante (mostradas en los gráficos como deflexiones hacia abajo) corresponden a un flujo de aniones saliendo de la célula o a un flujo de cationes entrando a la misma.

El protocolo utilizado para la medición de las corrientes en los ovocitos consistió en la aplicación de pulsos de voltaje desde -160 a +40 mV, en incrementos de 20 mV, con una duración de 500 msec y un intervalo de 10 msec entre la aplicación de cada pulso. Las corrientes se midieron a los 400 msec de iniciado el pulso a un potencial de 0 mV, y a partir de esos datos se obtuvieron las curvas de corriente en función del voltaje (curvas I-V).

Soluciones y reactivos

Forskolina (Alomone Labs, Israel), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma, EE.UU.), difenilamino-2-carboxilato (DPC, Sigma) y dynasore (Sigma) se disolvieron en DMSO; brefeldina A (Sigma) en etanol y cloroquina en agua.

Extracción de proteínas totales

Grupos de 20-40 ovocitos inyectados se incubaron con 10 μ M de forskolina junto con 1 mM de IBMX por 15 minutos. El medio fue removido y los ovocitos se lavaron dos veces con forskolina más IBMX. Luego las células se incubaron en buffer de homogenización (Tris 20 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM y sucrosa 80 mM, pH 7.4) (4 °C) con inhibidores de proteasas (0.01 X *Protease Inhibitor Cocktail*) a un volumen de 10 μ l/ovocito. Se lisaron en hielo con inhibidores de proteasas pasándolos secuencialmente a través de una aguja de calibre 23 y luego a través de una aguja de calibre 27 y luego vortexeados. El homogenato se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm (4 °C) y el sobrenadante se centrifugó 20 minutos a 12500 rpm (4 °C). Los pellets se resuspendieron en 25 μ l de *buffer* de corrida (SDS 4 %, Tris-ClH 0.125 M - pH 6.8, ditiotreitól 0.2 M, bromofenol 0.02 % y glicerol 20 %) y se calentaron a 70 °C durante 10 minutos antes de ser usados para *western blot*. La concentración final de proteínas en los sobrenadantes se determinó utilizando el método de Bradford y realizando una curva de calibración con seroalbúmina bovina. Las proteínas se detectaron por electroforesis en gel de

poliacrilamida y *western blot* como se describe a continuación. Cada experimento se repitió tres veces.

Biotinilación de las proteínas de la superficie celular

La expresión de la proteína CFTR en la superficie de los ovocitos de *Xenopus laevis* fue estudiada con el reactivo de biotinilación impermeable a la membrana (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA). Grupos de 20-40 ovocitos inyectados se incubaron con 10 μ M de forskolina junto con 1 mM de IBMX por 15 minutos. El medio fue removido y los ovocitos se lavaron dos veces con forskolina más IBMX. Luego cada grupo de ovocitos fue incubado con sulfo-NHS-SS-biotina (0.5 mg/ml en ND96; Pierce) y agitados por 60 minutos a 4 °C. El reactivo fue preparado en el momento de la incubación. Luego de la biotinilación, cada grupo se lavó e incubó con 1 ml de solución de *quenching* (192 mM glycine, 25 mM Tris-Cl [pH 7.4]) por 5 minutos en hielo para asegurar el completo apagado de la sulfo-NHS-SS-biotina que no reaccionó. Posteriormente se incubaron los ovocitos con 1 ml de buffer de homogenización con 1 % de un cocktail de inhibidores de proteasas y se lisaron en hielo pasándolos secuencialmente a través de una aguja de calibre 23 y luego a través de una aguja de calibre 27 y luego agitados con un vortex. Se centrifugó el homogenato a 4.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Las proteínas biotiniladas se precipitaron con 100 μ l de bolitas de NeutrAvidin-agarosa (Pierce Chemical). Estas se agregaron al sobrenadante para aislar las proteínas de la superficie celular y se incubaron toda la noche en un rotador. Las proteínas de la membrana plasmática

se disolvieron en *buffer* de corrida con 50 mM DTT. Las proteínas se detectaron por electroforesis en gel de poliacrilamida y *western blot* como se describe a continuación. Cada experimento se repitió cinco veces.

Western blot

Para la electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) se utilizaron entre 10 μ g y 50 μ g de proteínas por calle. Las proteínas se disolvieron en el *buffer* de corrida (duodecil sulfato de sodio (SDS) 4 %, Tris-ClH 1 M, ditioneitol 0.2 M, bromofenol 0.02 % y glicerol 10 %) con 50 mM de DTT. La preparación se calentó a 90 °C durante 10 min y la electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 6 %. Luego las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL; Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, UK). La eficiencia de la transferencia se controló realizando una tinción con Rojo Ponceau (Sigma). Las membranas se bloquearon por 1 hora con una solución de 2 % (p/v) de leche en polvo descremada en *buffer* TBS con Tween 0.1 % (T-TBS) a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la incubación con los anticuerpos primarios diluidos en *buffer* T-TBS suplementado con 0.5 % (p/v) de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma). Para la identificación de la proteína CFTR se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-CFTR dirigido contra su dominio R (MAB 1660, R&D Systems) a una dilución de 1:1000 durante toda la noche. La especificidad del anticuerpo fue demostrada previamente por Davidson y col. (2006). Las membranas

tratadas con el anticuerpo anti-CFTR se lavaron con T-TBS y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con la enzima peroxidasa HRP (1:5000) (Vector Lab, Burlingame, CA). Las membranas se lavaron y la inmunoreactividad se detectó utilizando el sistema de análisis para *western blot* ECL (Amersham, GE Healthcare). La reacción de quimioluminiscencia se visualizó con placas AGFA Medical X-Ray (Agfa-Gevaert). Los *immunoblots* se cuantificaron por análisis densitométrico utilizando el software densitométrico ImageJ 1.37v.. Las intensidades de cada banda se normalizaron usando tinción con rojo ponceau para estimar la cantidad relativa de proteínas. Los valores se graficaron como la intensidad de CFTR con respecto a la proteína (cambio de porcentaje medio \pm SE).

Inhibición de xShroom1 endógena

Los ovocitos de *Xenopus laevis* se inyectaron con oligonucleótidos sintéticos complementarios (antisentido) o idénticos (sentidos) a los nucleótidos +455 a +479 del ARNm de xShroom1. Las secuencias fueron las siguientes: sentido, 5'-GCA TTA AGC AGA ATC GCC CTA ACC AC-3'; antisentido, 5'-GTG GTT AGG GCG ATT CTG CTT ATG C-3', Integrated DNA Technologies (Assef y col. 2011). Los ovocitos se inyectaron con un volumen de 50 nl conteniendo: 7 ng de ARNc de CFTR o ENaC y 25 ng de oligonucleótidos antisentido de xShroom1, o 7 ng de ARNc de CFTR o ENaC y 25 ng de oligonucleótidos sentido de xShroom1 como control. Luego los

ovocitos inyectados se incubaron a 18 °C en solución control ND96 por 24 horas, previo a las mediciones electrofisiológicas.

RT-PCR

Se purificó el ARN total de los ovocitos por medio del reactivo Trizol (Molecular Research Center, Inc.), a partir de 10 células. La transcripción reversa se realizó como fue descrito anteriormente (Marino y Kotsias 2013) en 60 minutos a 37 °C a partir de 5 µg de RNA total como templado, utilizando la enzima transcriptasa reversa proveniente del virus de la leucemia murina, primers Oligo (dT)₁₈ y 2 mM de cada desoxiribonucleótido trifosfato (dNTP). La PCR comenzó en 94 °C por 3 min y luego se realizaron 28 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos, y 72 °C por 45 segundos, seguido de una extensión final de 20 min a 72 °C. Para la amplificación se utilizaron dos primers específicos que codifican para los nucleótidos 4131-4152 y 4527-4546 de la secuencia de xShroom1 (forward 5'-TCTGGAGAAAGTGGTGAGCCTG-3', reverse 5'-TCATTTGTAGCGGGTGGACG-3', para amplificar un fragmento de 416 pb de xShroom1). Para la amplificación de Ornithine Decarboxylase (ODC), usada como control interno utilizamos primers que amplifican un fragmento de 418 pb (forward 5'-GCAAGGAATCACCCGAATG-3', reverse 5'-GCAACATAGTATCTCCCAGGCTC-3') (Zuckerman y col. 1999).

Los productos de amplificación se sembraron en geles de agarosa al 2 % en buffer TBE teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes de los geles luego de la electroforesis se adquirieron con el equipo Foto Analyst Investigator (Fotodyne Inc.).

Se realizó un control negativo donde no se agregó la enzima transcriptasa reversa, para evaluar la ausencia de ADN genómico en las muestras y ninguna banda se obtuvo en estas condiciones. También se realizó otro control negativo donde no se agregó el ADNc templado, para detectar contaminación o amplificación no específica en la reacción (ver resultados).

Inmunoprecipitación

Luego de lavar los ovocitos con PBS, los mismos se homogenizaron pasándolos a través de un tip en buffer de homogenización con inhibidores de proteasas. Los lisados se incubaron en hielo y se centrifugaron a 12000 rpm. Una cantidad equitativa de proteína se agregó al buffer de homogenización a un volumen final de 1 ml. El sobrenadante se pre-lavó con 0.1 volumen de bolitas de sefarosa unidas a proteína G (Pharmacia Biotech, Gaithersburg, MD). Los extractos limpios de 2-3 ovocitos se incubaron con el anticuerpo contra CFTR MAB1660 en un agitador a 4 °C, y en otro control separado, el anticuerpo contra CFTR se agregó al buffer de homogenización sin lisado. Las bolitas de sefarosa unidas a proteína G se agregaron, y las muestras se incubaron a 4 °C por 90 minutos adicionales. Las proteínas unidas a las bolitas se recolectaron por centrifugación y se lavaron tres veces con buffer de homogenización, se eluyeron calentando las muestras a 75 °C por 15 minutos en *loading buffer*, se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con T-TBS con 0.5 % seroalbúmina bovina y con el

anticuerpo dirigido contra CFTR (H-182 de Santa Cruz Biotechnology), el anticuerpo monoclonal dirigido contra Hsc70 (clon BRM-22 de Sigma), o el anticuerpo policlonal dirigido contra ubiquitina (L-14 de Santa Cruz Biotechnology).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm error estándar (SE) (n = número de determinaciones realizadas).

Para evaluar si la diferencia entre dos grupos de datos fue significativa se utilizó el programa GraphPad InStat™, aplicando el test estadístico *t* de Student (apareado o no apareado, según el caso). La hipótesis nula plantea que no existe diferencia significativa entre el control y el tratamiento, siendo rechazada cuando se obtiene un $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DEL CANAL CFTR EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS* Y MEDICIÓN DE LAS CORRIENTES DE Cl^-

1.1. Estudio de las corrientes de CFTR en ovocitos

Se inyectaron ovocitos de *Xenopus laevis* con 50 nl de una solución que contiene 4 ng de ARNc del canal CFTR sintetizado a partir de su ADNc. Luego se incubaron por 24-36 horas en la solución control ND96, tiempo suficiente para permitir que la proteína CFTR sea sintetizada y transportada a la membrana plasmática, donde cumple su función como canal iónico. La actividad del CFTR se indujo por la aplicación extracelular de forskolina y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) en la solución de baño. La forskolina, es un diterpenoide derivado del *Coleus forskohlii*, permeable a la membrana plasmática y un potente activador de la adenilato ciclasa, que explican la mayor parte de sus efectos biológicos (de Souza y col. 1983). El IBMX es un derivado de xantina metilado y un inhibidor de la actividad fosfodiesterasa (Beavo y col. 1970).

A partir del análisis del curso temporal de los experimentos estimamos el tiempo de incubación con las drogas. Determinamos que entre 10 - 15 minutos de exposición a forskolina más IBMX, las corrientes permanecen constantes y en su nivel máximo de activación (Figura 12).

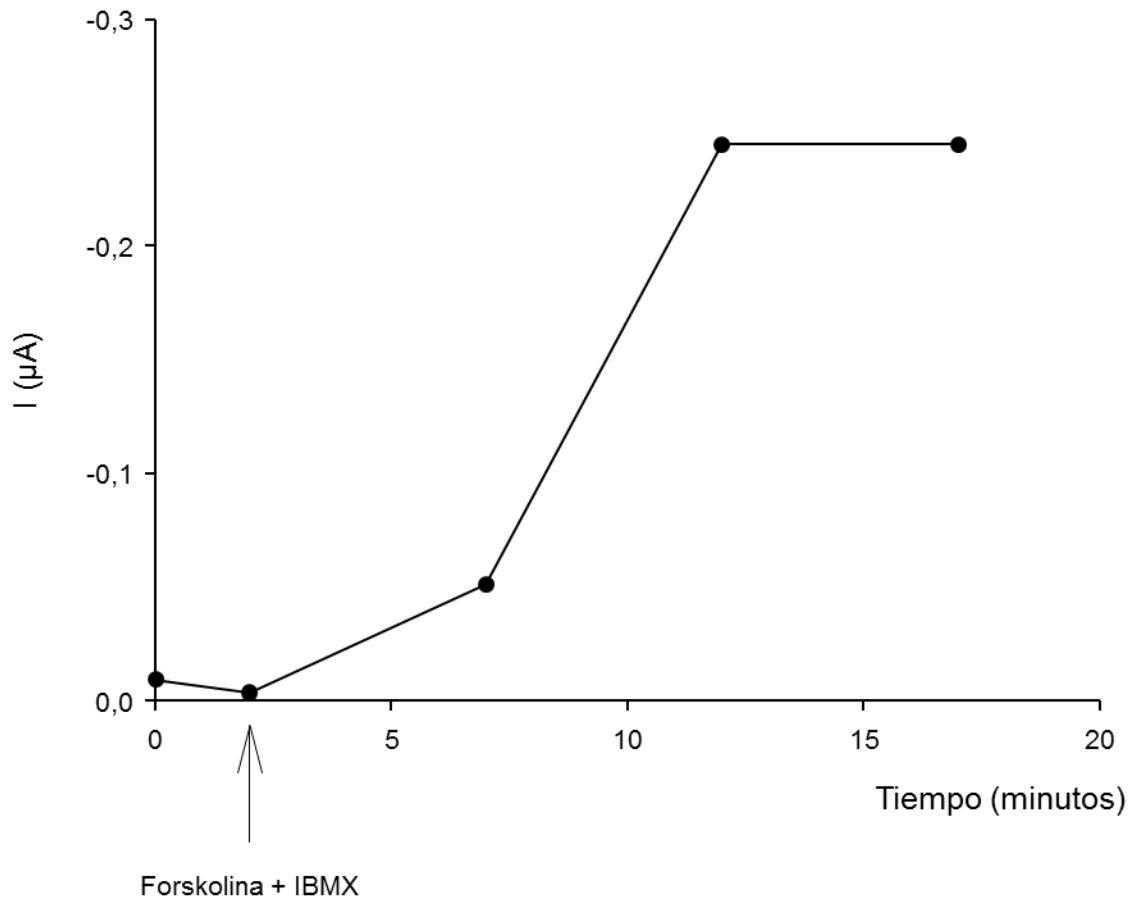


Figura 12. Activación dependiente de AMPc de canales CFTR en ovocitos de *Xenopus laevis*. Curso temporal de un experimento (representativo de 11) durante la exposición a forskolina 10 µM más IBMX 1mM. La corriente total a -100 mV se graficó en función del tiempo.

Luego de 15 minutos de equilibrio en la solución activadora con forskolina más IBMX, las corrientes activadas por AMPc pudieron ser registradas, mediante la técnica de *voltage clamp*, en respuesta a pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes

de -160 a +40 mV durante 500 msec en pasos de 20 mV, desde un potencial de mantenimiento de 0 mV.

El potencial de membrana (V_m) de ovocitos que expresan CFTR se despolarizó ~ 13 mV respecto al V_m de ovocitos inyectados con H_2O (-49.0 ± 1.3 mV, $n = 10$), indicando que la expresión de CFTR aumentó la permeabilidad de Cl^- despolarizando el V_m . La corriente activada por AMPc no se observó en ovocitos inyectados con H_2O (Figura 13, $n = 10$).

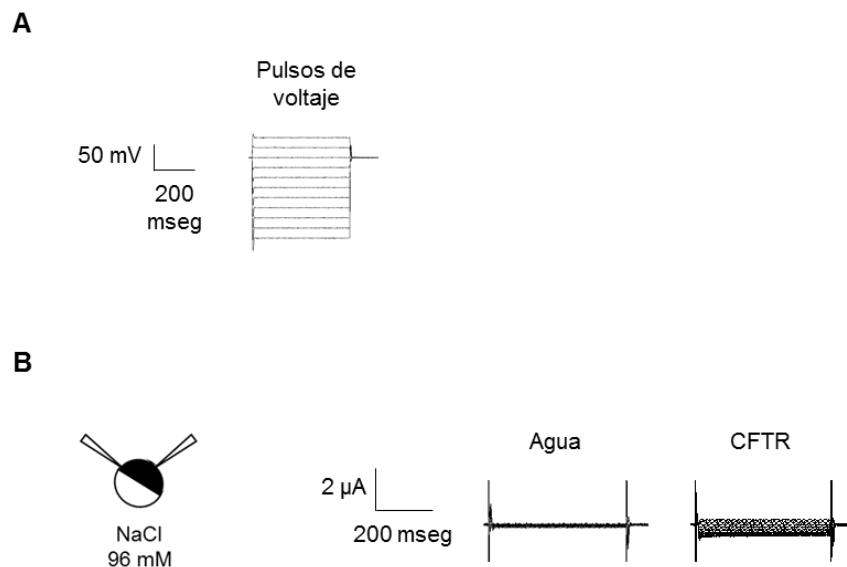


Figura 13. Registros representativos de corrientes de CFTR en los ovocitos. A. El protocolo de estimulación consistió en una serie de pulsos desde -160 a +40 mV en pasos de 20 mV desde un potencial de mantenimiento a 0 mV. **B.** Corrientes registradas en función del tiempo para cada pulso de voltaje aplicado. Los registros se midieron en ovocitos inyectados con H_2O o con el ARNc de CFTR. Las corrientes entrantes (trazos hacia abajo) y las corrientes salientes fueron mayores en ovocitos inyectados con CFTR que en ovocitos inyectados con H_2O ($p < 0.05$). A la izquierda se muestra un esquema de un ovocito con el principal componente de la solución extracelular utilizada.

En la figura 14 se muestra la curva de la corriente (μA) en función del voltaje (mV) (curva I-V) a partir de los registros mostrados en la figura 13. Las corrientes entrantes y salientes se observaron en ovocitos inyectados con el ARNc de CFTR.

El potencial de reversión (V_{rev}) es el potencial aplicado en el cual no hay movimiento neto del ión a través del canal debido a que el potencial electroquímico es igual a ambos lados de la membrana. Es un valor específico para cada canal iónico y depende de las concentraciones del ión extra e intracelular. En nuestro caso el V_{rev} obtenido fue -30 mV. Este valor es consistente con el potencial de equilibrio de Nernst teórico para una corriente selectiva de Cl^- en las concentraciones de Cl^- usadas extracelularmente.

Además, se muestran las corrientes de ovocitos inyectados con H_2O y los valores medios obtenidos a -100 mV.

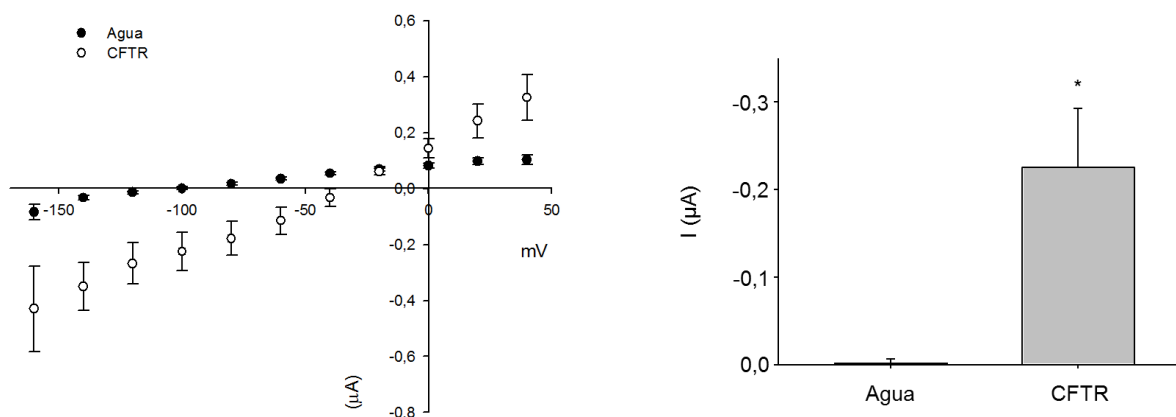


Figura 14. Relación corriente - voltaje del canal CFTR. El panel izquierdo muestra la curva I-V de estos experimentos en ovocitos inyectados con CFTR ($n = 11$) o con H_2O ($n = 10$). Las corrientes tienen una curva I-V lineal. Los valores medios obtenidos a -100 mV en ambas condiciones se muestran en el panel derecho. El asterisco indica una diferencia significativa en las corrientes de ovocitos inyectados con CFTR con respecto a los ovocitos inyectados con H_2O .

La figura 15 muestra las corrientes totales obtenidas en los ovocitos, antes y después de la activación por forskolina más IBMX. En los ovocitos con la solución control ND96 se observan corrientes endógenas, las cuales son pequeñas en comparación con las corrientes de canales sobreexpresados (Goldin 2006). Con forskolina más IBMX se obtuvieron corrientes mayores a las corrientes en solución control ND96.

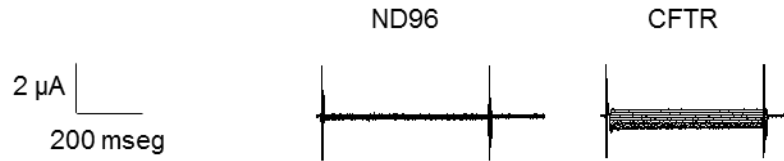


Figura 15. Registros representativos de corrientes en ovocitos en condiciones control y luego de la activación con 10 μM de forskolina más 1 mM de IBMX. En solución control se observan las corrientes endógenas del ovocito. En presencia de forskolina más IBMX se produce un aumento de las corrientes totales.

Con los datos obtenidos se construyó una curva I-V con la corriente promedio antes y después de la activación con forskolina más IBMX (Figura 16 A). Claramente, la curva I-V muestra que en presencia de forskolina más IBMX las corrientes aumentan significativamente. Los valores de corriente a -100 mV en condiciones control y luego de la exposición a forskolina + IBMX fueron: $-0.01 \pm 0.01 \mu\text{A}$ y $-0.22 \pm 0.07 \mu\text{A}$, respectivamente, $p < 0.05$, $n = 11$.

La corriente neta activada por forskolina más IBMX, corriente de CFTR (I_{CFTR}), se obtuvo por la substracción de las corrientes basales a aquellas tratadas con forskolina más IBMX y se graficó la corriente promedio en relación al voltaje aplicado (Figura 16 B).

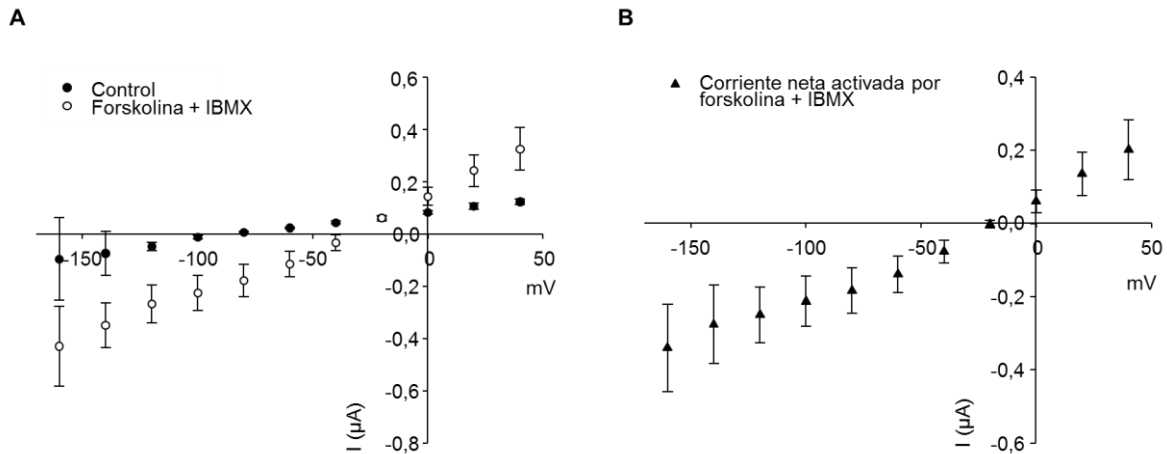


Figura 16. Relación entre la corriente y el voltaje en ovocitos inyectados con ARNc de CFTR. A. Curva I-V en condiciones control y luego de la activación con forskolina 10 μM más IBMX 1 mM en ovocitos de *X. laevis* ($n = 11$, media \pm SD). Las diferencias entre las corrientes control y las obtenidas después del tratamiento fueron significativas a todos los potenciales ($p < 0.05$). **B.** Curva I-V donde se muestran las corrientes netas activadas con forskolina más IBMX ($n = 11$).

1.2. Efecto del bloqueante DPC sobre la actividad del CFTR

Para confirmar que las corrientes observadas se deben al movimiento de Cl^- , utilizamos el inhibidor DPC en nuestro sistema.

La difenilamina-2-carboxilato (DPC) es un inhibidor de los canales de Cl^- , como el CFTR y ORCC. Inhibe a CFTR de forma reversible desde el lado citoplasmático del canal y ha sido utilizado en numerosos estudios de las corrientes de CFTR (Briel y col. 1998; Chan y col. 1999; Chen y col. 2008). El mecanismo de bloqueo es por oclusión del poro, aumentando el tiempo en que el canal se mantiene cerrado (Zhang y col. 2000).

La figura 17 muestra el efecto de 1 mM de DPC sobre la I_{CFTR} en el tiempo por la aplicación de un pulso de -100 mV. A los 15 minutos de exposición con DPC se alcanzó la inhibición máxima de las corrientes observadas. Estos datos nos permitieron estimar el tiempo de incubación de la droga para obtener el máximo efecto inhibitorio.

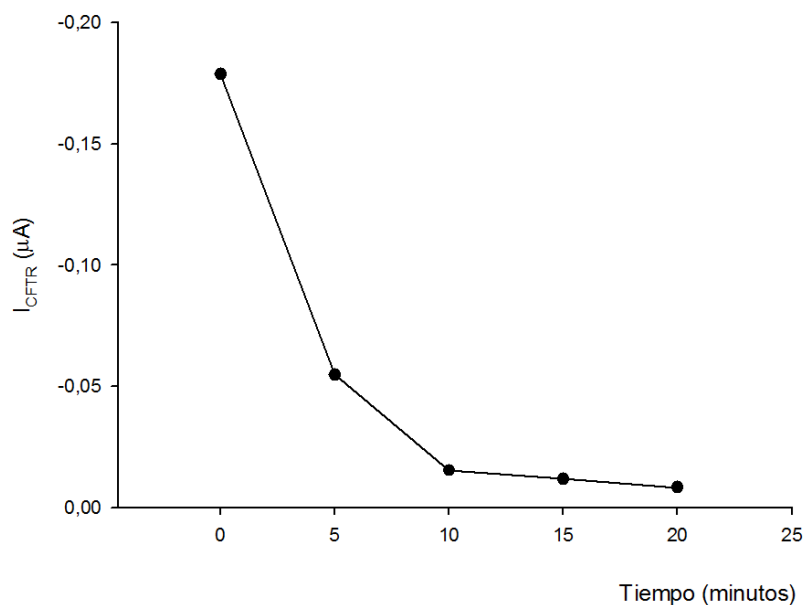


Figura 17. Curso temporal del tratamiento con DPC con un pulso de -100 mV. El máximo de inhibición se alcanzó entre los 10-15 minutos de exposición al bloqueante.

Como se observa en la figura 18, 1 mM de DPC (15 minutos) disminuyó la corriente. La curva I-V promedio correspondiente se muestra en la figura 19. Comprobamos una disminución en las corrientes con respecto al control para cada pulso aplicado. En estos experimentos como en todos los demás, la droga se aplicó una vez estabilizadas las corrientes en su amplitud ($p < 0.01$, $n = 4$).

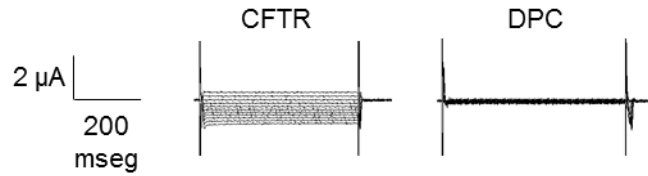


Figura 18. Trazos de corrientes en condiciones control y en presencia de DPC 1 mM. Registros representativos adquiridos con pulsos desde -160 a +40 mV que muestran el efecto del DPC 1 mM sobre la actividad del canal, en ovocitos inyectados con CFTR antes y después de 15 minutos de la incubación con el bloqueante. El experimento se repitió cuatro veces.

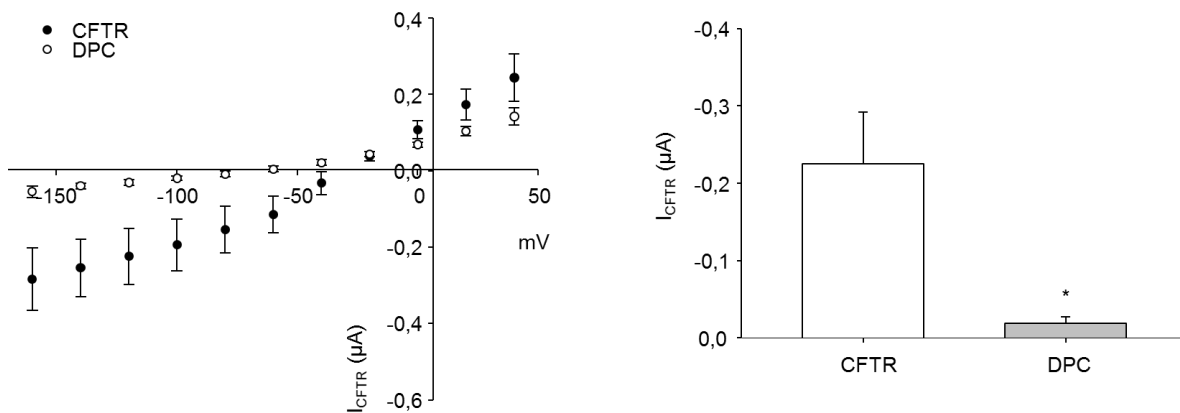


Figura 19. Tratamiento con DPC en los ovocitos de *Xenopus laevis*. Relación entre la corriente (μA , media \pm DS) y el voltaje (mV) en condiciones control y 15 minutos después del agregado de DPC 1 mM en la solución de baño ($n = 4$, media \pm SD) (panel izquierdo). Los valores medios obtenidos a -100 mV en ambas condiciones se muestran en el panel derecho ($p < 0.01$, $n = 4$). El asterisco indica una diferencia significativa en las I_{CFTR} en el tratamiento con DPC con respecto a las corrientes controles.

1.3. Presencia de la proteína CFTR en ovocitos de *Xenopus laevis*

El CFTR fue clonado en 1989 por Riordan y colaboradores (Riordan y col. 1989) y desde entonces es una proteína extensivamente estudiada y de la que disponemos de anticuerpos para su estudio. Para evaluar la expresión de la proteína del canal en la superficie celular de los ovocitos inyectados con el ARNc de CFTR, se realizaron experimentos de *western blot*, donde previamente se biotinilaron las proteínas de la membrana plasmática del ovocito. Los ovocitos se incubaron con biotina, la cual se une a las proteínas de la superficie celular, y luego lisados. A partir de estos extractos, se precipitaron las proteínas de la superficie celular unidas a biotina, y luego se separaron electroforéticamente. Como se esperaba, detectamos la proteína CFTR biotinilada sólo en los ovocitos inyectados con ARNc de CFTR, mientras que estaba ausente en los ovocitos inyectados con H₂O (Figura 20). Se detectó una banda de 160-180 kDa correspondiente a la forma glicosilada del CFTR utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio R de CFTR humano. El experimento se repitió tres veces en ambos casos.

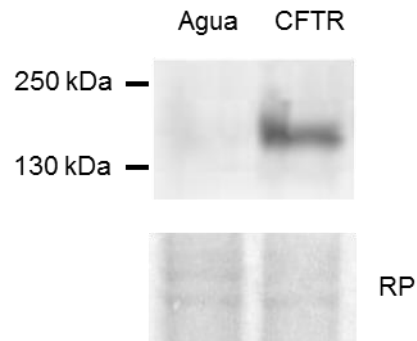


Figura 20. Presencia de CFTR en ovocitos de *X. laevis*. La expresión de la proteína de CFTR fue medida en la membrana plasmática con una técnica de biotilación de las proteínas de la superficie celular. Utilizamos un anticuerpo específico de CFTR dirigido contra el dominio regulatorio R. La expresión de CFTR fue detectada en ovocitos inyectados con CFTR (banda a un nivel de 160 - 180 kDa, n = 3) pero no fue observada en ovocitos inyectados con H₂O.

En conclusión, nuestros resultados muestran que el canal CFTR se expresa y es funcional en los ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con su ARNc. Se registraron corrientes activadas por AMPc al aumentar el AMPc intracelular con forskolina más IBMX, utilizando la técnica de *voltage clamp*, las cuales son inhibidas con el inhibidor de canales de cloruro DPC. Además observamos la expresión del canal en la superficie celular de los ovocitos por *western blot*.

2. BLOQUEO DE LA SÍNTESIS DE XSHROOM1 CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO SOBRE LAS CORRIENTES Y EXPRESIÓN DE CFTR

Una vez caracterizada la corriente transportada a través del canal CFTR comenzamos una serie de experimentos para estudiar su regulación. Como se comentó en la Introducción, una primera línea de investigación fue la de utilizar oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1. Esta proteína es endógena de ovocitos de *Xenopus laevis*, y posee una actividad regulatoria sobre la forma y la arquitectura intracelular, tejida específica, dependiente del citoesqueleto de actina-miosina/tubulina. En nuestro laboratorio observamos que la regulación del canal ENaC por la proteína Shroom1 ocurre a través de un cambio en el número de canales insertos en la membrana, y no por un efecto sobre las propiedades cinéticas del canal (Assef y col. 2011).

2.1. Detección del ARNm de xShroom1 en los ovocitos

Para corroborar si los oligonucleótidos antisentido disminuyen la expresión de xShroom1 en ovocitos de *X. laevis* coinyectados con CFTR y oligonucleótidos antisentido dirigidos hacia xShroom1, se extrajo el ARN total y se analizó por RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento del dominio ASD2 de la proteína. Con los productos de amplificación obtenidos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % donde se obtuvo la banda esperada de 416 pb correspondiente al producto de xShroom1, tanto con el tratamiento con oligonucleótidos antisentido como en el control (Figura 21, panel de arriba). Se observó una marcada reducción de la expresión de xShroom1 en los ovocitos

inyectados con CFTR y oligonucleótidos antisentido dirigidos hacia xShroom1 en comparación con los ovocitos control coinyectados con CFTR y oligonucleótidos sentido. Además se detectó la banda de 418 pb correspondiente a la proteína endógena de ovocitos ornitina decarboxilasa (ODC), utilizada en todos los casos como control positivo de integridad del ADNc (panel de abajo), la cual no cambió con el tratamiento con oligonucleótidos antisentido. No se detectó señal en el control negativo que se realizó sin el agregado de muestra templado de ADNc o en ausencia de transcriptasa reversa.

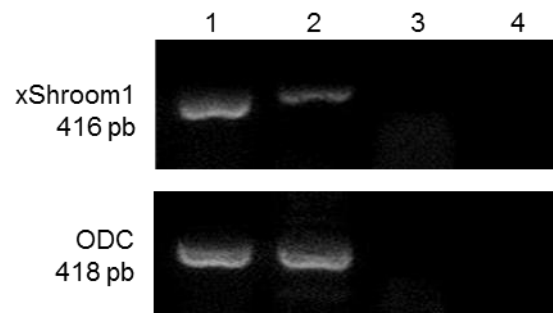


Figura 21. Detección del ARNm de xShroom1 en ovocitos inyectados con oligonucleótidos sentido o antisentido dirigidos contra la proteína por RT-PCR.

Las calles (de 1 a 4) corresponden a ovocitos inyectados con oligonucleótidos sentido; ovocitos inyectados con oligonucleótidos antisentido; muestras de ovocitos inyectados con oligonucleótidos sentido sin transcriptasa reversa como control negativo (ausencia de ADN genómico); control negativo de PCR (reacción en ausencia de muestra templado), respectivamente. Hubo una reducción marcada en el ARNm de xShroom1 (416 bp; panel superior) en el tratamiento con oligonucleótidos antisentido (calle 2) con respecto al control (calle 1). La detección de ornitina decarboxilasa (ODC) (418 bp; panel de abajo) fue utilizada como control positivo de integridad del ADNc. El experimento fue repetido tres veces.

2.2. Efecto de xShroom1 sobre las corrientes de CFTR

Para conocer la relación entre CFTR y xShroom1 se midieron registros de ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos antisentido (*antisense*) o sentido (*sense*) dirigidos hacia xShroom1 (Figura 22). La inhibición de xShroom1 con los oligonucleótidos antisentido produjo un aumento en las corrientes del canal CFTR, en comparación con los ovocitos control inyectados con oligonucleótidos sentido.

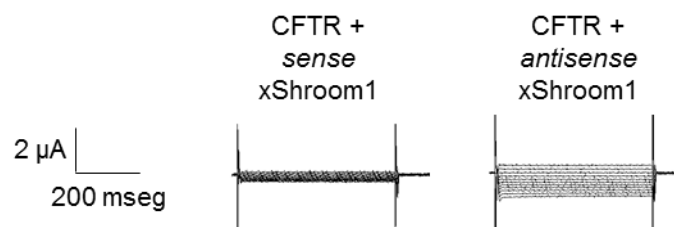


Figura 22. Corrientes totales en ovocitos coinyectados con ARNc de CFTR más oligonucleótidos antisentido y sentido de xShroom1. Registros de ovocitos coinyectados con ARNc de CFTR y oligonucleótidos antisentido (CFTR + *antisense* xShroom1) o sentido (CFTR + *sense* xShroom1) dirigidos contra xShroom1 donde se evidencia que con los oligonucleótidos antisentido, las corrientes fueron mayores que en los ovocitos inyectados con oligonucleótidos *sense*.

En la figura 23 se muestran las curvas I-V para los ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos sentido o antisentido dirigidos contra xShroom1, y también se muestran las corrientes entrantes promedio a -100 mV. La inhibición de xShroom1 produce un aumento en las corrientes de CFTR a todos los pulsos de voltaje aplicados. La despolarización observada en los ovocitos que expresan CFTR

estimulados con forskolina más IBMX es mayor en los ovocitos co-inyectados con CFTR y oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1 (los ovocitos con CFTR + oligonucleótidos sentido se despolarizaron 3.2 ± 0.8 mV, mientras que los ovocitos con CFTR + oligonucleótidos antisentido se despolarizaron 8.1 ± 1.5 mV).

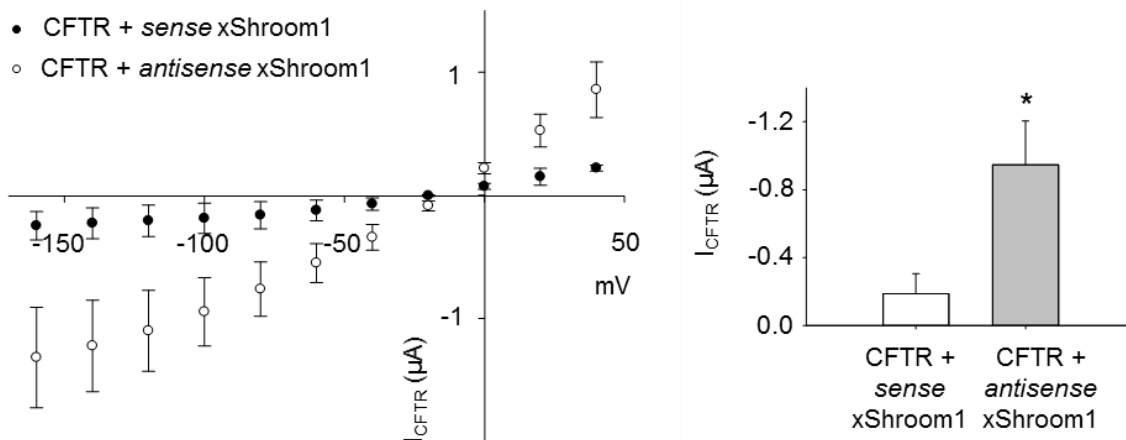


Figura 23. Curvas I-V y corrientes entrantes a -100 mV cuando xShroom1 es inhibido. Los ovocitos fueron inyectados con oligonucleótidos sentido (círculos llenos, $n = 10$) o antisentido (círculos abiertos, $n = 8$) dirigidos contra xShroom1. El asterisco indica una diferencia significativa en las I_{CFTR} en el tratamiento con antisentido de xShroom1 con respecto al tratamiento con *sense* de xShroom1.

La amplitud de las corrientes y el potencial de reversión en los ovocitos coinyectados con CFTR más oligonucleótidos sentido fueron similares a los obtenidos en los ovocitos inyectados sólo con el ARNc de CFTR ($n = 15$, figura 24). Estos resultados nos permitieron confirmar que xShroom1 ejerce un efecto

regulador negativo sobre la actividad del CFTR, por lo que la inhibición de la expresión de xShroom1 aumenta las corrientes por CFTR.

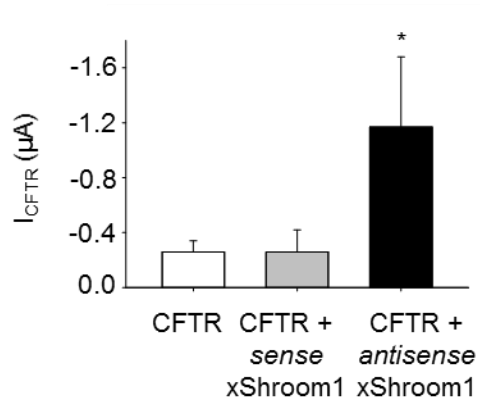


Figura 24. Amplitud de las corrientes de ovocitos coinyectados con ARNc de CFTR, CFTR + xShroom1 sentido o CFTR + xShroom1 antisentido. No se observan diferencias significativas en ovocitos inyectados con CFTR + *sense* xShroom1 o sólo con el ARNc de CFTR. El asterisco indica una diferencia significativa en las I_{CFTR} en el tratamiento con los antisentidos dirigidos contra xShroom1 con respecto al tratamiento con los sentido y al CFTR solo ($n = 15$, $p < 0.05$).

2.3. Estudio de la expresión de CFTR cuando xShroom1 es inhibida

Para evaluar si el incremento observado en la I_{CFTR} estaba asociado con un cambio en la expresión del canal, se realizaron estudios de *western blot* en los ovocitos, cuando la expresión de xShroom1 es inhibida. Se generó un extracto de proteínas totales a partir de grupos de 20-40 ovocitos y se sembraron entre 10-50 μ g de dicho extracto en geles de poliacrilamida 6 %. Las proteínas resueltas y transferidas a membranas de nitrocelulosa se expusieron toda la noche a un suero monoclonal de ratón dirigido contra el dominio R de la proteína CFTR humana. En la figura 25 puede observarse la banda resultante, correspondiente al tamaño esperado para CFTR. Observamos una mayor expresión del canal en los ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1 con respecto a los ovocitos control coinyectados con CFTR y oligonucleótidos sentido ($n = 3$, $p < 0.05$).

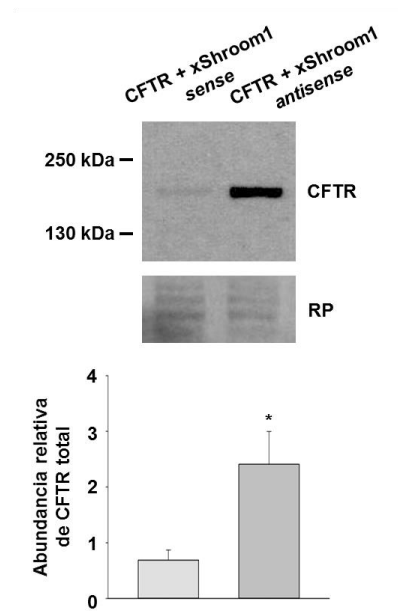


Figura 25. Detección de la proteína CFTR en ovocitos de *Xenopus laevis* en presencia de oligonucleótidos sentido (CFTR + xShroom1 *sense*) o antisentido (CFTR + xShroom1 *antisense*) dirigidos contra xShroom1. Se utilizó la técnica de *western blot*. Se obtuvieron extractos de proteínas totales de los ovocitos los cuales fueron separados electroforéticamente en geles de poliacrilamida 6 %. Para detectar el canal, empleamos un anticuerpo específico monoclonal dirigido contra el dominio regulatorio R de CFTR. Las intensidades de las señales se normalizaron con tinción con Rojo Ponceau (RP). Se observa la banda compatible con CFTR de ~160 kDa, más predominante en los ovocitos tratados con los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1 ($n = 3$, $p < 0.05$).

Para evaluar la presencia de la proteína CFTR en la superficie celular, se biotinilaron las proteínas de la membrana plasmática en ovocitos co-inyectados con CFTR y oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1. Para detectar el canal CFTR se utilizó el anticuerpo mencionado anteriormente. En la figura 26 se observa una única banda esperada de 160-180 kDa, que corresponde al CFTR glicosilado maduro. El análisis de las señales por densitometría indican que la intensidad del CFTR biotinilado es mayor en los ovocitos coinyectados con CFTR y los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1 (aproximadamente el doble) que los ovocitos con los oligonucleótidos sentido. El valor relativo promedio obtenido de cinco experimentos se muestra en el panel de abajo.

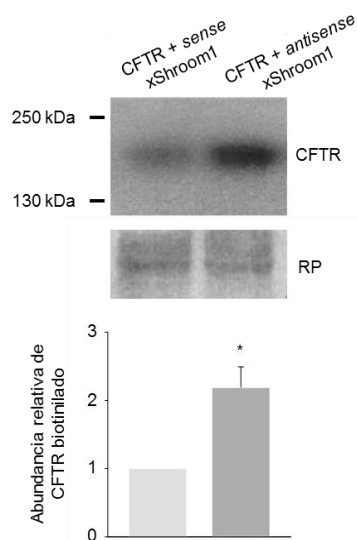


Figura 26. Detección de la proteína CFTR en ovocitos de *Xenopus laevis* en presencia de oligonucleótidos sentido o antisentido dirigidos hacia xShroom1.

Expresión de la proteína CFTR en la membrana plasmática de los ovocitos. Las proteínas de la superficie celular de los ovocitos se biotinilaron previo a la lisis de los mismos. *Immunoblots* representativos demuestran un incremento en la expresión de CFTR en la superficie celular en ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos antisentido dirigidos hacia xShroom1 en comparación con ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos sentido (CFTR) (panel de arriba). La expresión de CFTR fue cuantificada por análisis densitométrico (panel de abajo). Las intensidades de las señales biotiniladas se normalizaron con tinción con Rojo Ponceau (RP). Los valores calculados para CFTR en el control se ajustaron a 1. Las barras representan el cambio medio en la expresión de CFTR biotinilado en el tratamiento con antisentidos comparado con el control. La expresión de la proteína CFTR aumentó por un factor de 2 en ovocitos coinyectados con CFTR y los oligonucleótidos antisentido ($p < 0.05$, $n = 5$). El asterisco indica una diferencia significativa en la expresión de CFTR en el tratamiento con antisentidos con respecto al control.

Estos resultados sugieren que un incremento en la expresión del canal en la membrana plasmática es responsable de las corrientes más grandes cuando xShroom1 se suprime.

3. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA RELACION ENTRE XSHROOM1 Y CFTR

3.1. Estudio del efecto de xShroom1 sobre la degradación proteosomal de CFTR

El canal CFTR al mismo tiempo que es sintetizado en el retículo endoplásmico (RE) es sentido por la maquinaria de control de calidad del RE (ERQC), donde puede ser retenido, y desde allí degradado a través de la vía ubiquitin-proteosoma (Farinha y col. 2017). El CFTR que no es degradado es enviado a la membrana plasmática.

Por lo tanto, para evaluar la hipótesis que xShroom1 aumenta la degradación de CFTR a través de la vía proteosomal, incubamos ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos sentido o antisentido dirigidos contra xShroom1 con MG-132 (10 μ M), un potente bloqueante de la actividad proteolítica del sistema proteosomal, el cual aumenta la acumulación de CFTR. MG-132 aumentó las corrientes de CFTR en las dos condiciones, aunque las corrientes fueron mayores cuando los ovocitos se coinyectaron con oligonucleótidos antisentido dirigidos hacia xShroom1 que con los oligonucleótidos sentido (Figura 27). Estos experimentos sugieren que xShroom1 no aumenta la degradación de CFTR a través de la vía del

proteosoma. En la figura 28 se muestra el curso temporal del efecto de MG-132 sobre las corrientes de CFTR en ovocitos coinyectados con oligonucleótidos sentido o antisentido dirigidos contra xShroom1. Se observa que en todas las horas registradas la corriente es mayor cuando xShroom1 es inhibida.

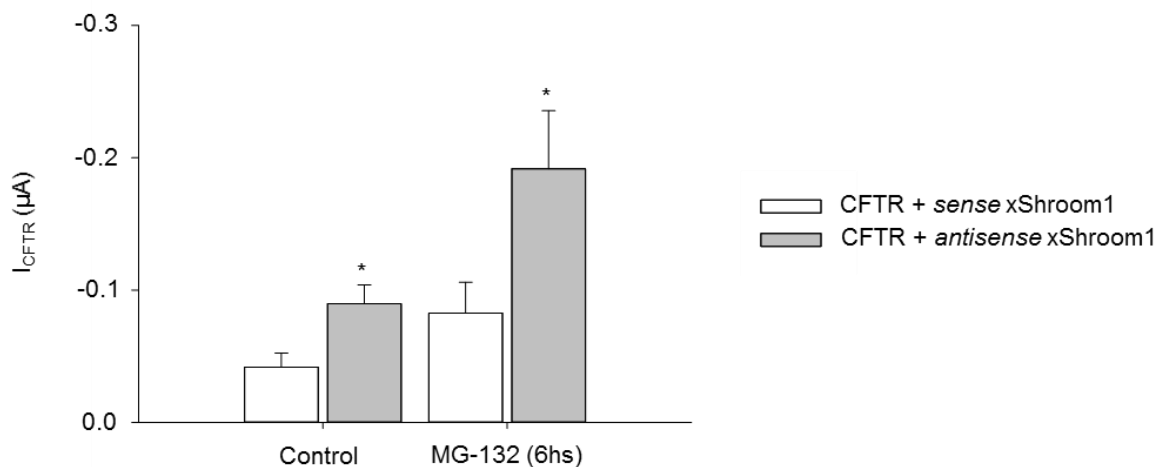


Figura 27. Efecto de MG-132, un inhibidor del sistema proteosomal, sobre las corrientes de CFTR. Los ovocitos se coinyectaron con CFTR y oligonucleótidos sentido (CFTR + *sense* xShroom1) o antisentido (CFTR + *antisense* xShroom1) dirigidos contra xShroom1 e incubados con 10 μM de MG-132. MG-132 (6 hs) incrementó las corrientes de CFTR con ambos oligonucleótidos aunque las corrientes fueron mayores con oligonucleótidos antisentido que con los oligonucleótidos sentido ($p < 0.05$, $n = 5$). El asterisco indica una diferencia significativa en las I_{CFTR} en el tratamiento con los oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra xShroom1 con respecto al tratamiento con los oligonucleótidos sentido.

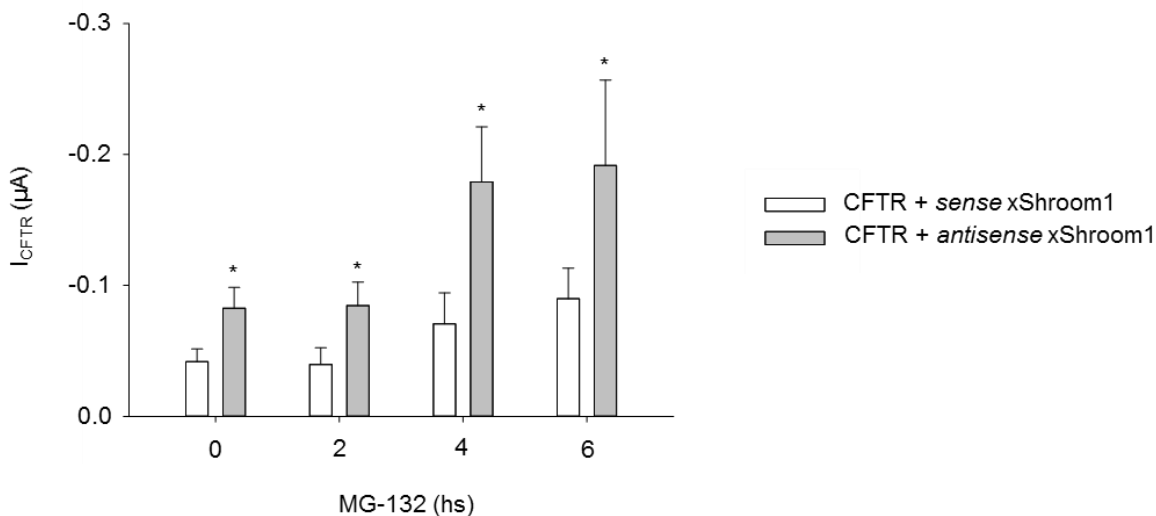


Figura 28. Curso temporal (2 - 6 hs) de los efectos de MG-132 sobre las corrientes de CFTR. Las corrientes de CFTR se registraron a las 2, 4 y 6 horas de incubación con 10 μM del inhibidor del proteosoma MG-132, en ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos *sense* o *antisense* dirigidos contra xShroom1. El asterisco indica una diferencia significativa en I_{CFTR} en el tratamiento con los oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra xShroom1 con respecto al tratamiento con los oligonucleótidos sentido.

3.2. Análisis del efecto de xShroom1 sobre la vida media del CFTR en la membrana plasmática

Para evaluar el efecto de xShroom1 sobre la vida media del CFTR en la membrana plasmática, utilizamos ovocitos coinyectados con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1 e incubamos con brefeldina A (BFA), una toxina fúngica que bloquea el transporte de proteínas por desensamblado del Complejo de Golgi en el retículo endoplasmático, y de este modo inhibimos el transporte de proteínas nuevas sintetizadas a la membrana plasmática. Dos días

después de la coinyección de los ovocitos con ARNc de CFTR y oligonucleótidos sentido o antisentido dirigidos hacia xShroom1, se midió el decaimiento de las corrientes cada 2 horas en presencia de 5 μ M de BFA, una concentración similar a la utilizada por Carattino y colaboradores en ovocitos de *Xenopus laevis* (Carattino y col. 2003). Las corrientes se normalizaron al tiempo 0 horas. La curva en la figura 29 nos dio un estimado de la vida media de los canales CFTR en la membrana plasmática. Así, la inhibición de xShroom1 incrementó la vida media de los canales en la membrana plasmática de 1.66 ± 0.24 a 6.97 ± 1.84 horas ($n = 3$). Estos datos sugieren que la ausencia de xShroom1 incrementa la expresión de CFTR en la superficie celular probablemente a través de un incremento en la retención o el reciclado del canal en la membrana plasmática.

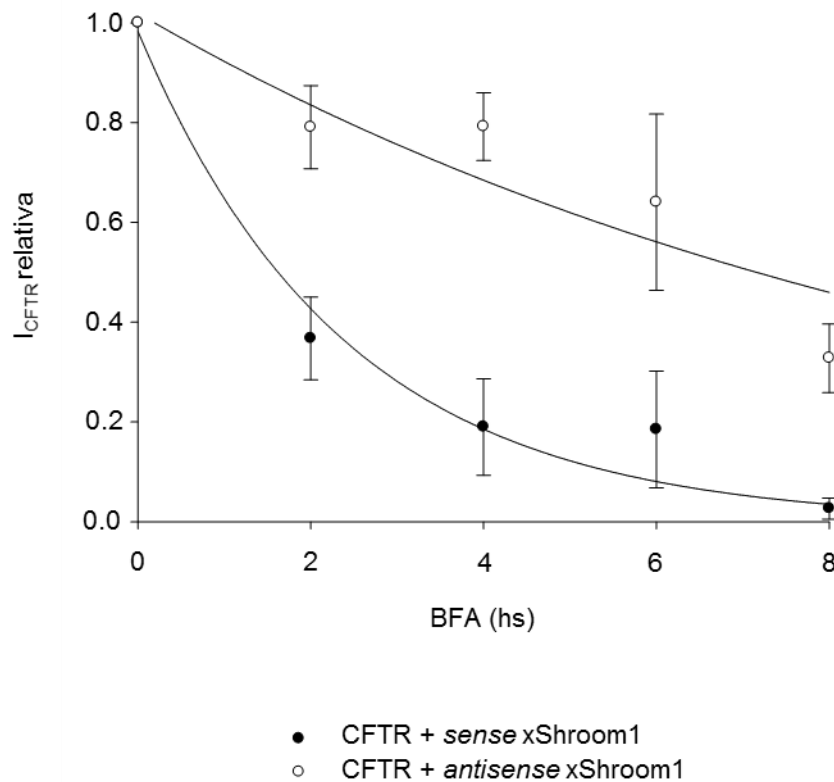


Figura 29. Efecto de BFA sobre las corrientes de CFTR. El experimento comenzó luego de 48 horas de la coinyección de los ovocitos con CFTR y oligonucleótidos sentido (círculos llenos) o antisentido (círculos abiertos) dirigidos hacia xShroom1. Para las mediciones de las corrientes, los ovocitos se perfundieron continuamente con 5 μ M de BFA y las corrientes relativas se normalizaron al tiempo 0 hs a un potencial de 0 mV y medidas cada 2 horas. La vida media de I_{CFTR} fue calculada utilizando el software SigmaPlot (Systat Software). Los datos se ajustaron a una exponencial simple.

3.3. Estudio de la vía endocítica/lisosomal y su relación con el efecto de xShroom1 sobre el canal CFTR

Los canales CFTR entran en la vía de degradación a través de la endocitosis mediada por clatrina (Bradbury y col. 1994) y luego son degradados a través de la vía lisosomal (Cheng y col. 2013).

Examinamos el efecto de inhibir la vía endocítica/lisosomal con dynasore y cloroquina. Dynasore es una molécula pequeña permeable a la membrana plasmática que inhibe no competitivamente la actividad GTPasa de dinamina. La dinamina es esencial para la formación de vesículas dependiente de clatrina, y su inhibición impide la endocitosis dependiente de dinamina en las células (Macia y col. 2006). Ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos sentido o antisentido dirigidos contra xShroom1 se incubaron con 80 μ M de dynasore, y las I_{CFTR} se registraron a las 24 horas. La inhibición de la endocitosis por dinamina abolió el efecto de los oligonucleótidos antisentido (Figura 30).

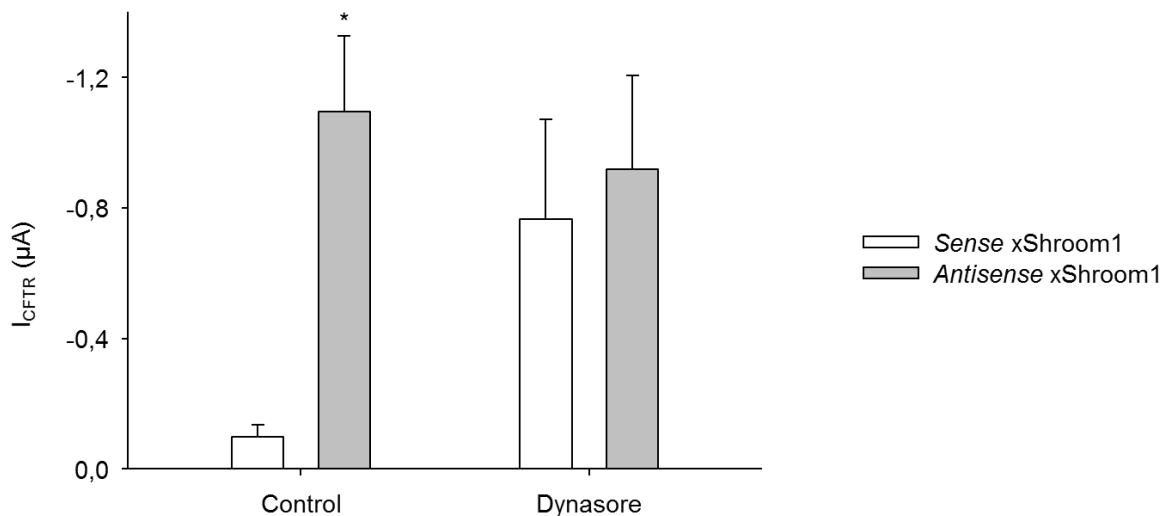


Figura 30. Efecto de dynasore sobre las I_{CFTR} en ovocitos coinyectados con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1. La incubación con dynasore (80 μ M) bloqueó completamente el efecto de los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1. El asterisco indica una diferencia significativa en I_{CFTR} en el tratamiento con los oligonucleótidos antisentido con respecto al tratamiento con los oligonucleótidos sentido ($n = 5$, $p < 0.05$).

Cloroquina es una base débil que bloquea los endosomas tardíos/lisosomas inhibiendo la proteólisis en estos compartimentos (Staub y col. 1997), previniendo el tráfico de vesículas derivadas desde la membrana plasmática hacia el lisosoma y otras vías de degradación (Jones y col. 2004), aunque su mecanismo de acción es más complejo (Butterworth y col. 2005). La adición de 50 μ M de cloroquina produjo un incremento significativo en las corrientes de CFTR en ovocitos co-inyectados con CFTR y oligonucleótidos sentido, pero no en ovocitos co-inyectados con CFTR y oligonucleótidos antisentido dirigidos hacia xShroom1, comparados

con aquellos sin tratar (Figura 31). En la figura 32 se muestra el curso temporal del efecto de cloroquina sobre las corrientes de CFTR en ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos sentido o antisentido dirigidos contra xShroom1. Se observa que a partir de las dos horas de incubación con cloroquina el efecto de xShroom1 sobre CFTR es inhibido.

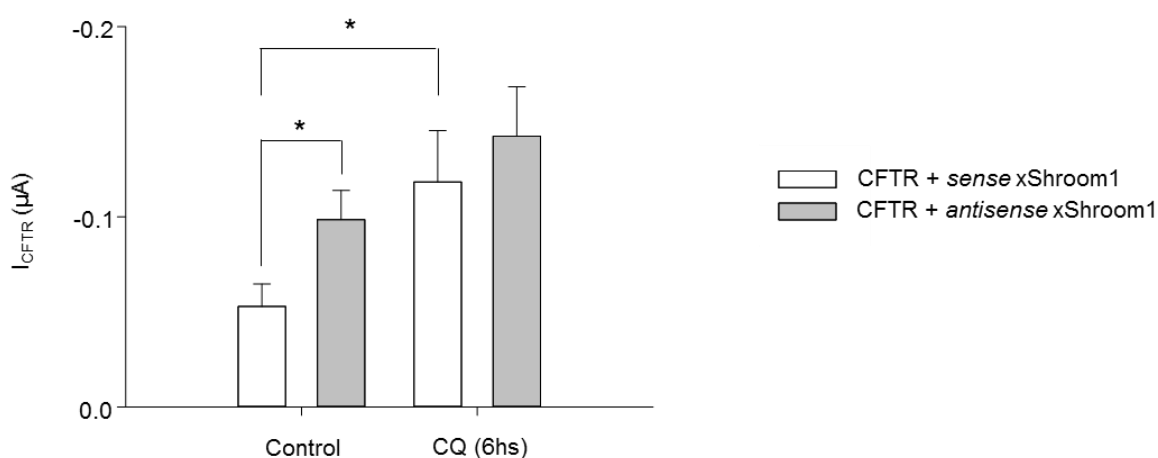


Figura 31. Efecto de cloroquina (50 μM), un inhibidor de los endosomas tardíos/lisosomas, sobre las corrientes totales. Los ovocitos se coinjectaron con CFTR y oligonucleótidos sentido (CFTR + *sense* xShroom1) o antisentido (CFTR + *antisense* xShroom1) dirigidos contra xShroom1 e incubados durante 6 horas con cloroquina. Se muestran los efectos de cloroquina sobre los valores medios de las corrientes obtenidas a un pulso de -100 mV, donde se observa un incremento significativo en las corrientes de los ovocitos coinjectados con CFTR y oligonucleótidos *sense* pero no en ovocitos coinjectados con CFTR y oligonucleótidos antisentido ($p = 0.1$, $n = 14$). El asterisco indica una diferencia significativa entre los grupos de datos indicados.

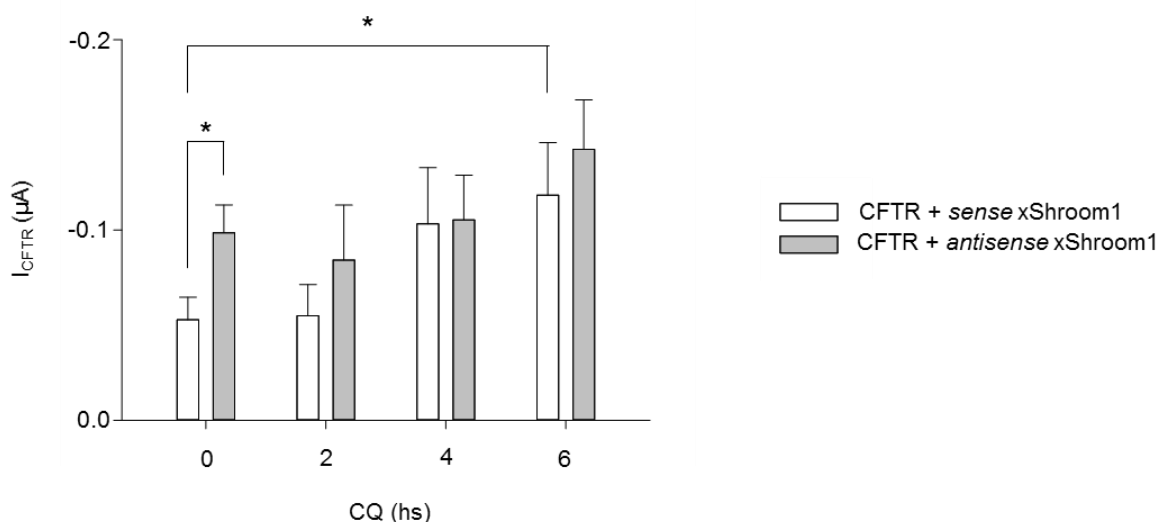


Figura 32. Curso temporal del efecto de cloroquina sobre las corrientes de CFTR. Los ovocitos se incubaron con 50 μ M del inhibidor de los endosomas tardíos/lisosomas cloroquina y se registraron las corrientes de CFTR a las 2, 4 y 6 horas de incubación. El asterisco indica una diferencia significativa entre los grupos de datos indicados.

3.4. Ubiquitinación de CFTR

El CFTR presente en la membrana plasmática puede ser endocitado a endosomas tempranos, reciclado y enviado de vuelta a la membrana plasmática; una pequeña cantidad es transferida a los endosomas tardíos y a los lisosomas para degradación (Cholon y col. 2010; Farinha y col. 2013), remoción asociada a la ubiquitinación del canal (Farinha y col. 2017). Para evaluar si la disminución observada en la vía endocítica/lisosomal en los experimentos con dynasore y cloroquina está asociada con una disminución en la ubiquitinación de CFTR, se realizaron estudios de coimmunoprecipitación en los ovocitos de *Xenopus laevis*.

El CFTR ubiquitinado fue detectado en el complejo proteico inmunoprecipitado tanto en los ovocitos control (*sense*) como en los inyectados con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1 (*antisense*), con el anticuerpo anti-ubiquitina (Figura 33). Cada protocolo se repitió tres veces en distintos grupos de ovocitos. Se observó mayor abundancia de CFTR ubiquitinado en células tratadas con los oligonucleótidos antisentido en comparación con las células control. Observamos, sin embargo que la cantidad de CFTR ubiquitinado relativa a la cantidad de CFTR inmunoprecipitado fue similar en ambos grupos. El hecho que una reducción de xShroom1 no disminuye la cantidad relativa del CFTR ubiquitinado es consistente con la observación que xShroom1 no está involucrado en la ubiquitinación de CFTR. De haberlo estado relacionado, tendría que haber menor cantidad de canal ubiquitinado en presencia de los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1.

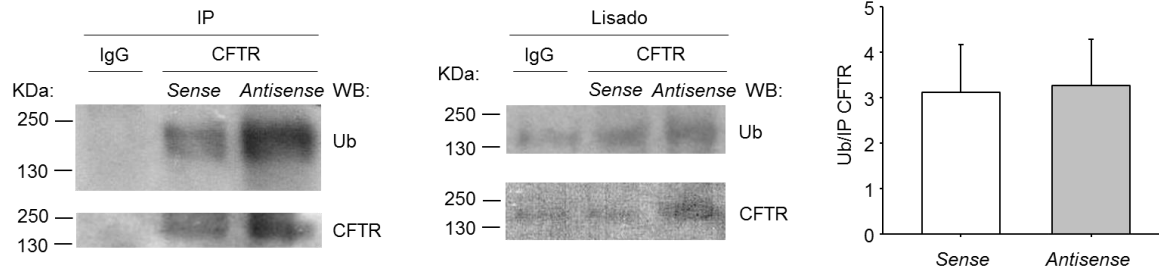


Figura 33. Ubiquitinación de CFTR cuando xShroom1 es inhibido. Los ovocitos se inyectaron con ARNc de CFTR y se incubaron con 50 μ g/ml de cicloheximida por seis horas para degradar los canales recién sintetizados desde el retículo endoplásmico y así determinar la ubiquitinación de CFTR en compartimentos post-Golgi. El canal fue aislado por inmunoprecipitación usando el anticuerpo anti-CFTR MAB1660 (IP: CFTR). Un anticuerpo de ratón IgG fue utilizado como control (IP: IgG) mientras que se utilizaron el anticuerpo H-182 para detectar CFTR y el anticuerpo anti-ubiquitina para detectar el CFTR ubiquitinado. Se muestran *western blots* representativos (panel izquierdo) y un resumen de los experimentos (panel derecho) demostrando que la inhibición de xShroom1 incrementó la expresión de CFTR en el lisado celular total pero no disminuyó la abundancia del CFTR ubiquitinado (Ub). El CFTR ubiquitinado fue calculado dividiendo la señal por arriba de 130 kDa del marcador de peso molecular obtenida con el anticuerpo anti-ubiquitina por la señal obtenida en *western blots* con el anticuerpo anti-CFTR H-182 en muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-CFTR MAB1660. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE usando geles 6 %. Se realizaron tres experimentos por grupo. Estos datos sugieren que CFTR es ubiquitinado en presencia o ausencia de xShroom1. Barras de error, S.E. $p = 0.9334$.

3.5. Estudio de la interacción entre CFTR y Hsc70

Para investigar mecanismos relacionados en la regulación de CFTR mediada por xShroom1, examinamos la interacción entre CFTR y Hsc70 (*heat shock cognate of 70 kDa*), una chaperona que reconoce a CFTR en la membrana plasmática, llevándolo a ubiquitinación y degradación lisosomal (Okiyoneda y col. 2010). En ovocitos de *Xenopus laevis*, que expresan endógenamente la proteína Hsc70 (Mandell y Feldherr 1990), inyectamos el ARNc de CFTR y usamos la técnica de coinmunoprecipitación para demostrar interacción específica proteína-proteína. La inmunoprecipitación de complejos con el anticuerpo anti-CFTR MAB1660 que contienen Hsc70 (Figura 34) sugieren que CFTR y Hsc70 se asocian en un complejo proteico. No se observó inmunoprecipitación con IgG totales, utilizadas como control negativo.

La cantidad de Hsc70 que coinmunoprecipita con CFTR es similar en células tratadas con los oligonucleótidos antisentido en comparación con las células control, sugiriendo que xShroom1 no está involucrado en la unión de CFTR con la chaperona Hsc70.

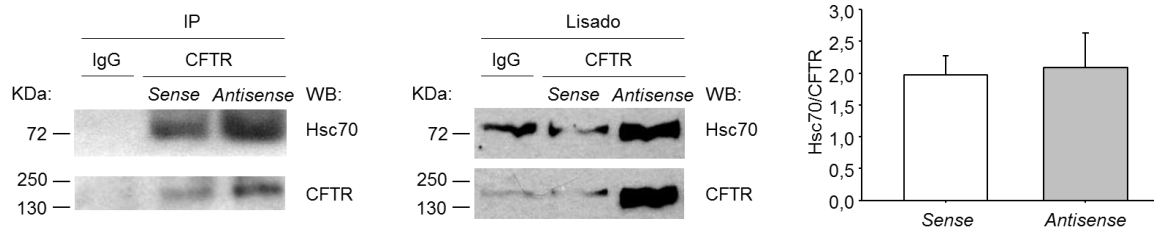


Figura 34. Coimmunoprecipitación de CFTR y Hsc70. Ovocitos de *Xenopus laevis* se coinyectaron con ARNc de CFTR y oligonucleótidos sentido (*sense*) o antisentido (*antisense*) dirigidos contra xShroom1 y preincubados con 50 μ M de cicloheximida por seis horas. Luego los extractos de ovocitos se sometieron a coimmunoprecipitación (IP) de CFTR o IgG y el complejo proteico analizado por *western blot* usando un anticuerpo anti-Hsc70 o anti-CFTR. El experimento se repitió dos veces obteniéndose datos similares.

Así, podemos concluir la expresión de CFTR funcional no es incrementada con el tratamiento con dynasore o cloroquina cuando la expresión de xShroom1 es inhibida con oligonucleótidos antisentido, sugiriendo la participación de la vía endocítica/lisosomal en el efecto de xShroom1.

4. RELACIÓN ENTRE EL CANAL EPITELIAL DE SODIO (ENaC), EL CANAL REGULADOR DE LA FIBROSIS QUÍSTICA (CFTR), Y LA PROTEÍNA XSHROOM1

En los epitelios, el canal de sodio ENaC se colocaliza con frecuencia con otros canales aniónicos, y se ha demostrado una compleja regulación por el canal de cloruro CFTR (Bachhuber y col. 2005). Como se mencionó más arriba, el CFTR además de ser un canal aniónico es un regulador de otros canales iónicos como el ENaC y el ORCC por varios mecanismos (Kunzelman y col. 1999; Hobbs y col. 2013). Además, nuestro grupo ha demostrado que Shroom1 regula al ENaC a través del número de canales en la membrana y no por un efecto sobre las propiedades cinéticas del canal (Assef y col. 2011), sugiriendo que esta proteína estaría relacionada en la regulación entre CFTR y ENaC. De esta manera decidimos estudiar la regulación de CFTR sobre las corrientes de sodio cuando Shroom1 esta inhibido.

4.1. Coexpresión de CFTR y ENaC

Se registraron corrientes de sodio del canal ENaC en ovocitos coinyectados con CFTR y ENaC, en respuesta a pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes.

En la figura 35 A se muestra el protocolo aplicado. Se consideró que las corrientes por el ENaC, corrientes de sodio sensibles a amiloride ($I_{Na(amil)}$), son aquellas que resultan de sustraer las corrientes en presencia de amiloride de las corrientes en su ausencia (Qadri y col. 2011).

El ENaC es inhibido por el diurético amiloride y sus análogos (Garty y col. 1997; Alvarez de la Rosa y col. 2000) y en nuestros estudios utilizamos

10 μM , la misma concentración utilizada en otros estudios (Assef y col. 2011). La coexpresión de ENaC y CFTR en los ovocitos generaron corrientes totales que se inhibieron con amiloride (10 μM , figura 35 B). La curva I-V correspondiente se muestra en la figura 36. En ovocitos que coexpresan CFTR y ENaC en ausencia de forskolina más IBMX ($n = 6$), el amiloride redujo las corrientes desde -1.97 ± 0.60 a $-0.64 \pm 0.31 \mu\text{A}$. Por lo tanto, las corrientes de sodio sensibles a amiloride están presentes en los ovocitos.

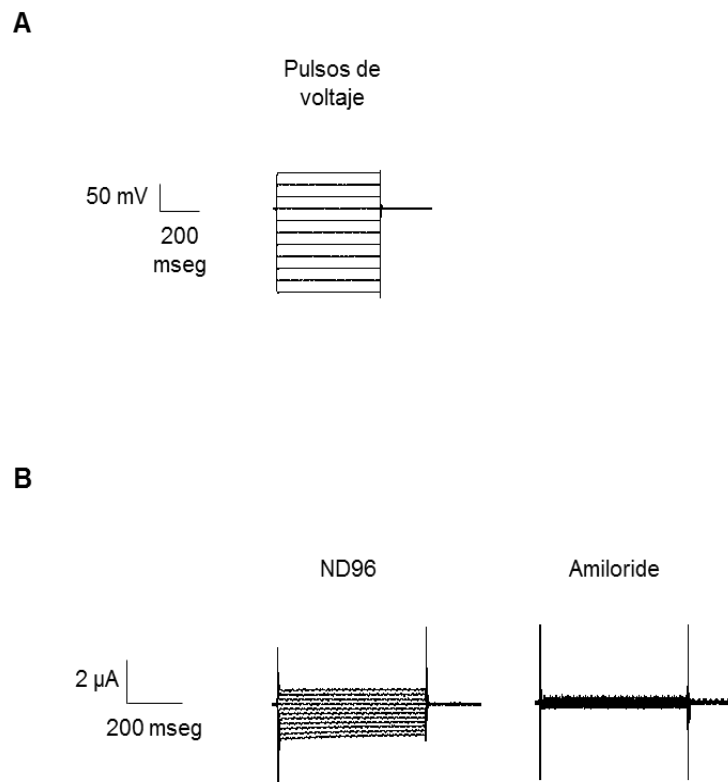


Figura 35. Expresión de CFTR y ENaC en ovocitos de *Xenopus laevis*. **A.** Se aplicaron pulsos desde -140 a +60 mV en pasos de 20 mV desde un potencial de mantenimiento a 0 mV y las corrientes medidas durante 500 msec en cada pulso de voltaje. **B.** Ejemplos representativos del bloqueo de las corrientes con 10 μM de amiloride sobre las corrientes totales observadas en un ovocito coexpresando CFTR y ENaC.

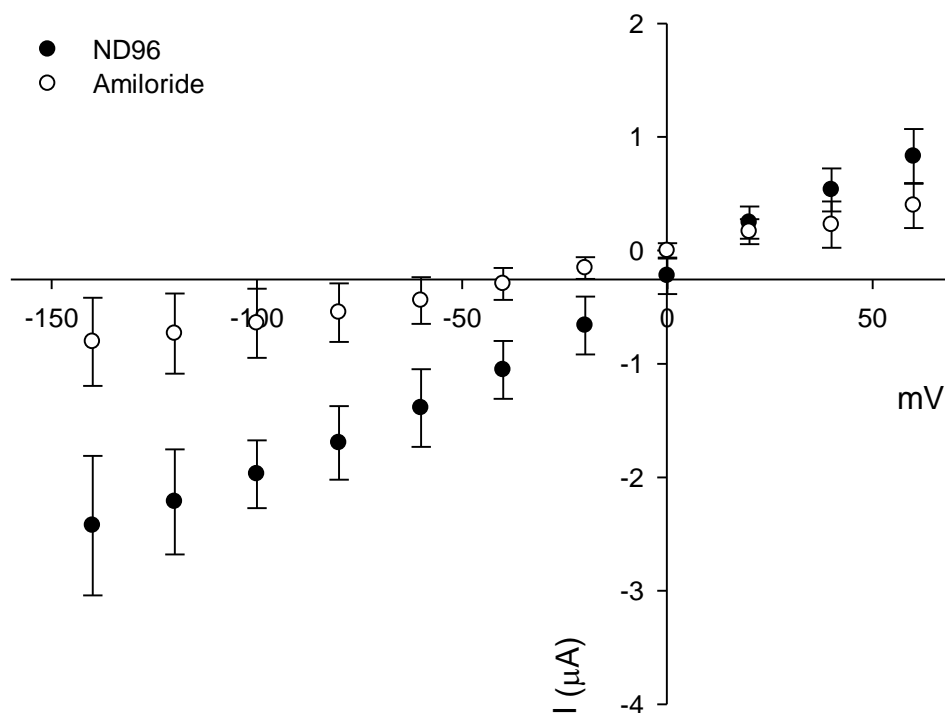


Figura 36. Curvas corriente-voltaje (I-V) obtenidas en ovocitos coinyectados con CFTR y ENaC. Las corrientes se registraron antes y después de la incubación de los ovocitos con 10 μM de amiloride. Curva I-V correspondiente a los experimentos mostrados en la figura 35 B. N = 6.

4.2. Corrientes sensibles a amiloride en ovocitos que coexpresan CFTR y ENaC

Para evaluar las corrientes de sodio sensibles a amiloride $I_{\text{Na(amil)}}$ en presencia del CFTR activado, se examinaron ovocitos que coexpresan ENaC y CFTR en presencia de forskolina más IBMX para activar al CFTR. En la figura 37 A se muestra un experimento representativo de un solo ovocito, donde es evidente que las $I_{\text{Na(amil)}}$ son atenuadas en presencia de forskolina más IBMX en ovocitos

que coexpresan CFTR y ENaC (figura 37 B). El promedio de estos resultados se grafica en la figura 38. Las $I_{Na(amil)}$ disminuyeron en presencia de forskolina más IBMX (pulso -100 mV: $-1.33 \pm 0.54 \mu A$ versus $-0.69 \pm 0.52 \mu A$, $n = 6$, $p < 0.01$).

Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la activación de CFTR por forskolina más IBMX produce una inhibición de las $I_{Na(amil)}$ en ovocitos que coexpresan CFTR más ENaC.

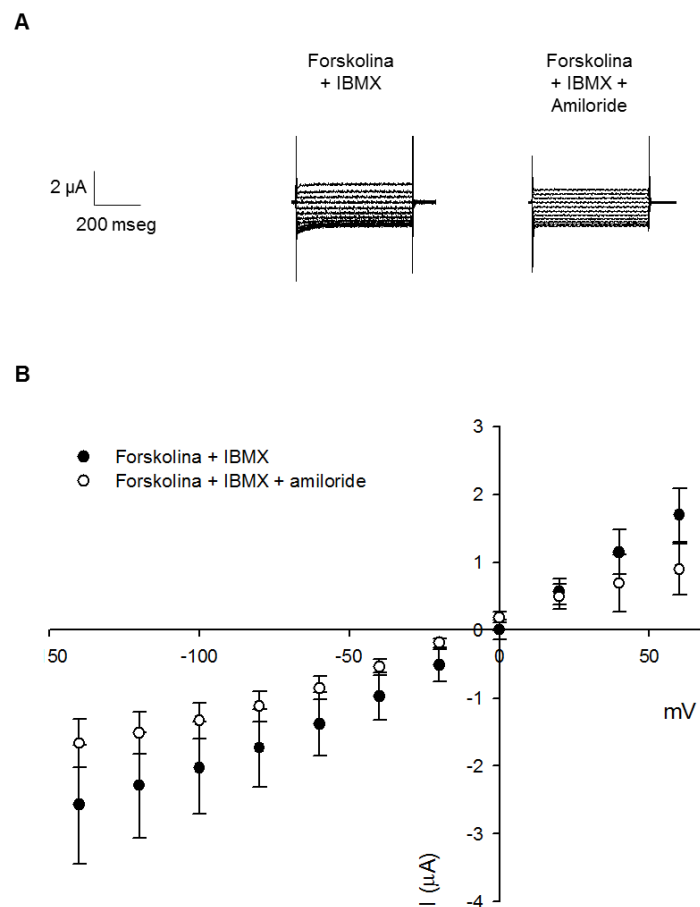


Figura 37. Ejemplos representativos y curvas I-V de corrientes totales observadas en ovocitos coexpresando CFTR y ENaC. A. Estimulación de CFTR con 10 μM de forskolina más 1 mM de IBMX, e inhibición de ENaC por 10 μM de amiloride en presencia de forskolina más IBMX. **B.** Curvas I-V correspondientes a los experimentos mostrados en A ($n = 6$).

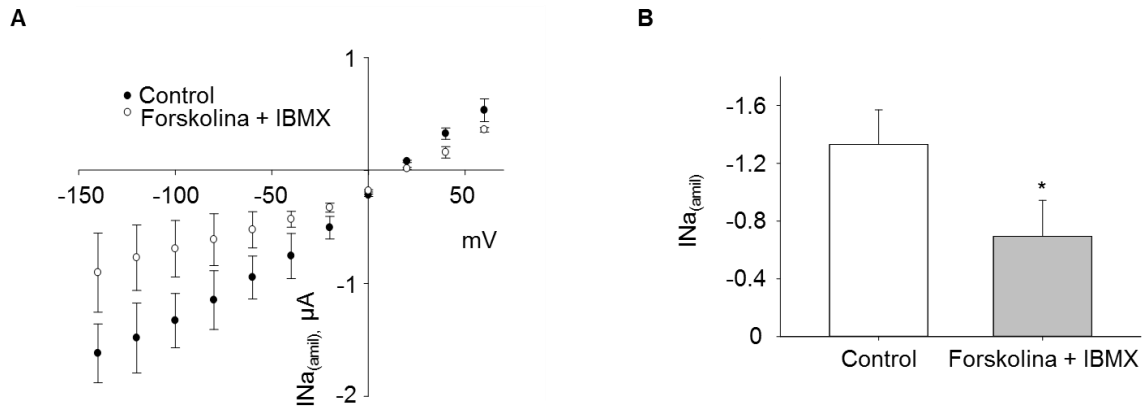


Figura 38. Corrientes de sodio sensibles al amiloride en ovocitos coinyectados con CFTR y ENaC. A. Curva I-V de los resultados promedios de las corrientes sensibles a amiloride obtenidas en solución control o cuando el CFTR es activado. **B.** Promedio de las corrientes registradas a -100 mV, cuando los ovocitos se coinyectaron con CFTR y ENaC ($n = 6$, $p < 0.01$).

4.3. Efecto de la inhibición de xShroom1 sobre las corrientes sensibles al amiloride

Para estudiar si la proteína xShroom1 se encuentra involucrada en la regulación observada entre CFTR y ENaC, coinyectamos ovocitos con ambos canales y oligonucleótidos antisentido dirigidos hacia xShroom1.

En la figura 39 se muestran las curvas I-V y las corrientes promedio a -100 mV, para los ovocitos coinyectados con CFTR, ENaC y oligonucleótidos sentido o antisentido dirigidos hacia xShroom1.

La inhibición de xShroom1 produce una disminución en las $I_{Na(amil)}$ a todos los pulsos de voltaje aplicados.

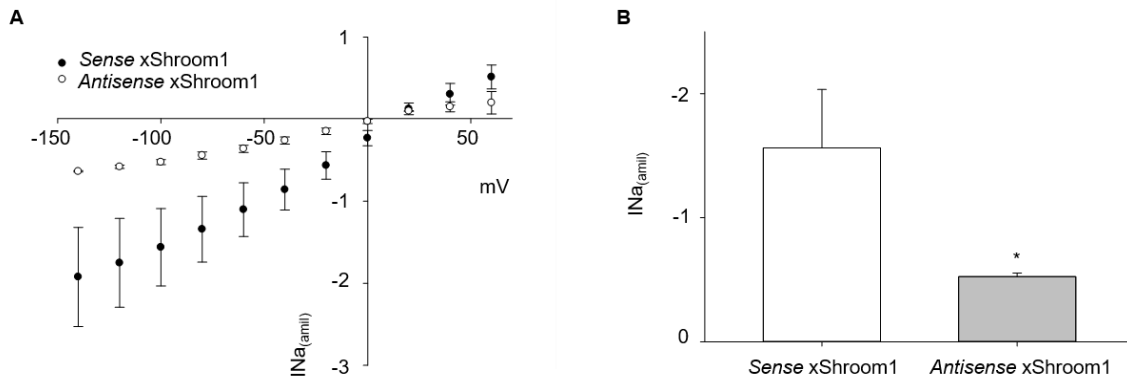


Figura 39. Curvas I-V y corrientes a -100 mV cuando xShroom1 es inhibida. A.

Curva I-V de los resultados promedios de las corrientes sensibles a amiloride obtenidas en condición control o cuando xShroom1 es inhibido. **B.** Promedio de las corrientes registradas a -100 mV, cuando los ovocitos se coinyectaron con CFTR, ENaC y oligonucleótidos sentido o antisentido dirigidos contra xShroom1 ($n = 6$, $p < 0.01$). Se observa una disminución de las $INa_{(amil)}$ en los ovocitos coinjectados con CFTR, ENaC y oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1.

Luego el amiloride fue lavado con solución control y los ovocitos coinjectados con CFTR, ENaC y los oligonucleótidos antisentido se incubaron con forskolina más IBMX para inducir la actividad del canal CFTR (ver *Estudio de las corrientes de CFTR en ovocitos*). La activación de CFTR produce una disminución en las $INa_{(amil)}$ mayor que la obtenida con la inhibición de xShroom1 (-0.52 ± 0.03 versus $-0.16 \pm 0.07 \mu A$, $n = 3$, $p < 0.05$) (Figura 40).

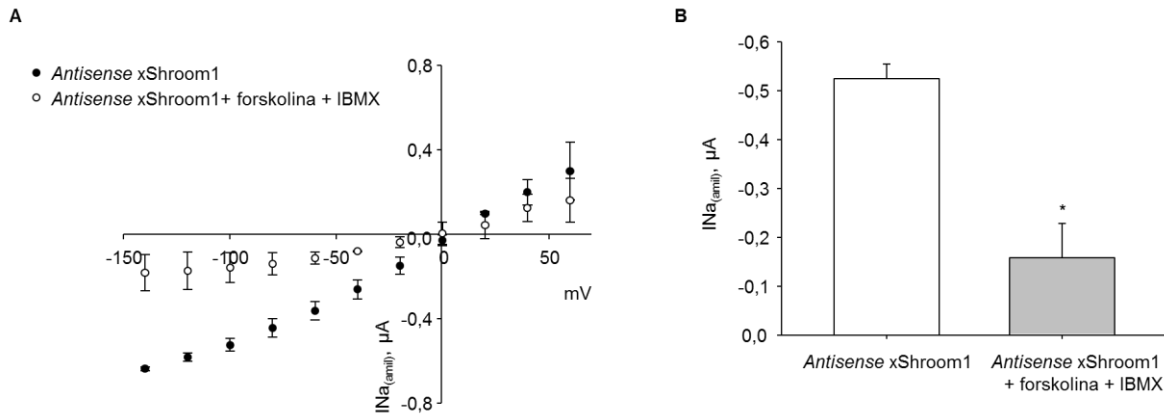


Figura 40. La activación del CFTR produjo que las corrientes sensibles al amiloride disminuyan aún más en ovocitos coinjectados con CFTR y ENaC más oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1. A. Curva I-V de los resultados promedios de las corrientes sensibles al amiloride obtenidas de los registros de 3 ovocitos. **B.** Promedio de las corrientes registradas a -100 mV, cuando los ovocitos se coinjectaron con CFTR y ENaC más oligonucleótidos dirigidos contra xShroom1 (n = 3, p < 0.05).

La figura 41 muestra la inhibición inducida por CFTR sobre las $INa_{(amil)}$ cuando xShroom1 es inhibida. Se observa que la inhibición fue mayor en ovocitos coinjectados con oligonucleótidos antisentido dirigidos hacia xShroom1 respecto a los ovocitos control coinjectados con los oligonucleótidos sentido, sugiriendo que el aumento en las I_{CFTR} debido al bloqueo de xShroom1 produce una inhibición mayor en las $INa_{(amil)}$.

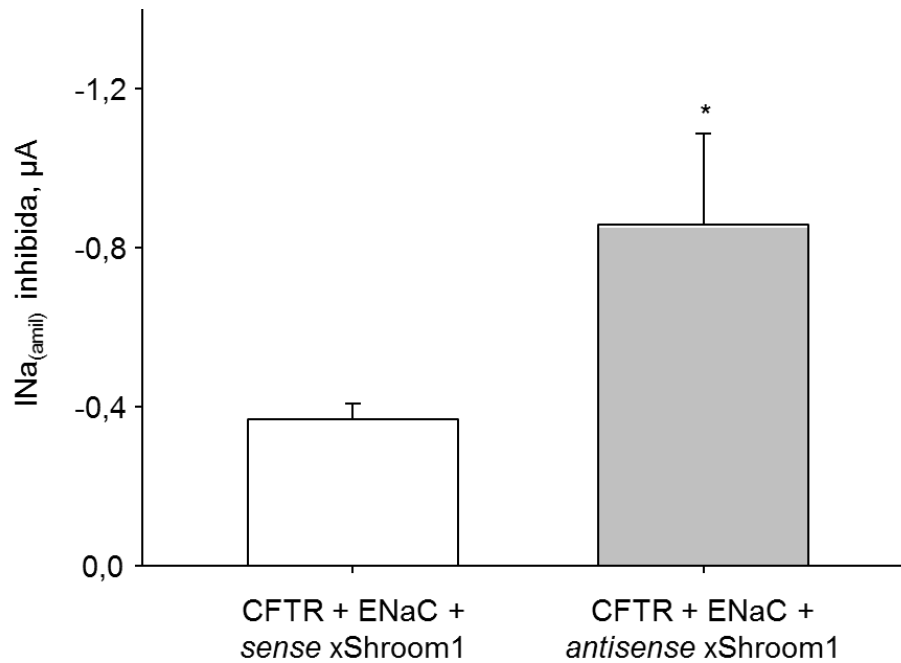


Figura 41. Inhibición de CFTR sobre las corrientes de sodio sensibles al amiloride.

La inhibición de CFTR sobre las $INa_{(amil)}$ fue mayor en ovocitos coinyectados con CFTR y ENaC más oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1 (CFTR + ENaC + *antisense* xShroom1) que en ovocitos control coinyectados con CFTR y ENaC más oligonucleótidos sentido (CFTR + ENaC + *sense* xShroom1).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis utilizamos técnicas de biología molecular y electrofisiológicas para estudiar el canal CFTR, responsable de una porción significativa del transporte de cloruro, y la proteína xShroom1 involucrada en la reorganización del citoesqueleto celular. A medida que se fueron ejecutando los experimentos decidimos además estudiar la regulación existente entre el CFTR y el canal epitelial de sodio (ENaC) junto con xShroom1.

1. EXPRESIÓN DEL CANAL CFTR EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS* Y MEDICIÓN DE LAS CORRIENTES DE CL⁻

Identificación del CFTR

Debido a la colocalización e interacción entre CFTR y ENaC (ver Introducción), nos interesó analizar la regulación de CFTR por la proteína xShroom1, en la que habíamos demostrado que era un factor regulador de la actividad del canal ENaC (Assef y col. 2011).

En primer lugar inyectamos ovocitos con el ARNm de CFTR y los incubamos con forskolina más IBMX. Aunque el CFTR presenta actividad espontánea, la misma aumenta con el agregado de forskolina más IBMX. La forskolina es una droga derivada de la planta *Coleus forskohlii*, y es un activador de la adenilato ciclasa (Souza y col. 1983). El IBMX es un derivado de xantina metilado y un inhibidor de la actividad fosfodiesterasa (Beavo y col. 1970). La activación del CFTR implica la fosforilación dependiente de AMPc en múltiples sitios de la región reguladora R del canal por PKA. La fosforilación provoca un cambio en la conformación de CFTR que

permite la asociación de los dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y 2) que se dimerizan, y esta asociación permite la unión y la hidrólisis de ATP para impulsar la activación del canal (Liang y col. 2012; Stahl y col. 2012).

Dos criterios se emplean para identificar al CFTR. Uno es su activación incrementando los valores de AMPc y el otro es la inhibición de las corrientes con algunos de bloqueantes de canales de cloruro (Kunzelmann 2011). En nuestros experimentos la forskolina junto con el IBMX aumentaron las corrientes totales y para corroborar que se trataba del CFTR, empleamos el inhibidor DPC (Chen y col. 2008). Aunque el bloqueante puede ser agregado del lado extracelular, el DPC permea la membrana siendo su efecto reversible. El mecanismo de bloqueo de DPC se produce cuando el bloqueante alcanza su sitio de unión dentro del poro del canal y produce su oclusión, bloqueando el estado abierto de CFTR (Zhang y col. 2000). Nuestros experimentos muestran que las corrientes netas activadas por forskolina más IBMX se inhiben a todos los potenciales aplicados con el DPC.

Proteínas Shroom y el efecto sobre el canal de sodio ENaC

Shroom es una familia de proteínas involucrada en la regulación y mantenimiento de la arquitectura del citoesqueleto uniéndose a la actina del citoesqueleto con varias funciones en el desarrollo celular. Hasta el momento se ha estudiado la participación de Shroom en células endoteliales, en procesos de vasculogénesis y angiogénesis que requieren de un remodelado de la estructura celular. En la vasculatura, Shroom puede funcionar regulando la actividad de la miosina II y por lo tanto la permeabilidad endotelial (Dietz y col. 2006). Por otra parte, Shroom también se expresa en el epitelio pigmentado de la retina humana, generando

la acumulación del pigmento en melanosomas maduros, el desarrollo de estas células y la localización del pigmento. Para ello controla el ensamblaje del citoesqueleto de actina y tubulina. Las proteínas shroom más caracterizadas son xShroom3 y mShroom3, las cuales son esenciales para la morfogénesis del tubo neural en *Xenopus* y en ratón (Dye y col. 2009). Otro miembro de la familia Shroom es xShroom1, el cual ha sido asociado con proteínas de membrana plasmática. Se encontró una relación física entre la proteína xShroom1, el canal epitelial de sodio ENaC y proteínas del citoesqueleto, en la membrana de las células A6 de riñón de *Xenopus laevis*. Las mismas conformaban un complejo macromolecular a partir del cual pudo probarse una relación funcional, siendo xShroom1 regulador de corrientes sensibles al amiloride cuando se coexpresaban estas proteínas en ovocitos de anfibio (Staub y col. 1992; Zuckerman y col. 1999). Ya habíamos comprobado que xShroom1 es requerido para la expresión funcional de ENaC en ovocitos de *X. laevis* debido a una regulación en el número de canales insertos en la membrana plasmática (Assef y col. 2011). En esos experimentos se obtuvieron dos evidencias. Una, con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1 se reducen las corrientes de ENaC en ovocitos coinyectados con ENaC. Dos, se observaron canales ENaC marcados por inmunofluorescencia en la membrana plasmática de ovocitos expresando α , β y γ ENaC y oligonucleótidos sentido xShroom1, pero no en ovocitos coinyectados con el ARNc de ENaC y oligonucleótidos antisentido.

xShroom1 y CFTR

La actividad del canal es regulada por filamentos de actina (Guggino y col. 2006; Monterisi y col. 2013) y posee un sitio de unión de 4 aminoácidos (DTRL) para

proteínas con dominios PDZ como NHERF (Na/H exchanger regulatory factor). Así, por ejemplo, la isoforma NHERF1, por medio de su extremo C terminal se une a EZRIN, una proteína estructural relacionada tanto a la membrana celular como a los filamentos de actina, estabilizando todo el complejo. Esto permite una compartimentalización celular y que el AMPc generado por PKA se mantenga en la zona del complejo. Por el contrario, en las mutaciones $\Delta F508$ esta estructura está desintegrada, el AMPc está diseminado por todo el citoplasma y el canal mutado es degradado (Monterisi y col. 2013). De esta forma el citoesqueleto funciona como ancla para los canales iónicos en la membrana plasmática, y participa en el tráfico vesicular de los mismos hacia la superficie celular.

Debido a todos estos antecedentes surge con bastante claridad la posibilidad que la presencia de xShroom1 asociada a la actina, como proteína reguladora del citoesqueleto de actina-miosina/tubulina y del transporte de sustancias a la membrana plasmática, tenga también una relación funcional/estructural con el CFTR.

Para estudiar la relación entre xShroom1 y CFTR, utilizamos los mismos oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1 publicados por Zuckerman y col. (1999) y Staub y col. (1992). Los últimos autores encontraron que más del 90 % del ARNm de xShroom1 fue degradado por la ARNasa H endógena en presencia de oligonucleótidos antisentido pero no con oligonucleótidos sentido. Pudimos observar que los ovocitos expresan el ARNm de xShroom1. Como esperábamos, cuando los ovocitos se coinyectaron con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1, la abundancia de su ARNm fue menor.

Observamos un incremento marcado en las corrientes de CFTR y en su expresión total y en la superficie celular en ovocitos coinyectados con

oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1 (Figuras 22, 23, 25 y 26) un resultado que indica una acción dual de xShroom1 en la expresión y el nivel de actividad de ENaC y CFTR. Los factores principales en controlar la expresión o actividad de CFTR incluyen la regulación de la síntesis del canal, el tráfico intracelular, la inserción en la membrana plasmática, degradación y probabilidad de apertura (Ahner y col. 2013). Cualquiera de estos factores podría ser responsable del incremento en la corriente y expresión observada en nuestros experimentos. Los siguientes experimentos se diseñaron para explicar esta regulación.

Mecanismos posibles en el efecto de xShroom1 sobre la actividad del CFTR

Como se verá a continuación nuestros resultados sugieren que la inhibición de la expresión de la proteína xShroom1 resultó en mayores corrientes de CFTR por un incremento en los canales CFTR en la superficie celular posiblemente al reducir su transporte a la vía endolisosomal (Palma y col. 2016).

(1) MG-132, un inhibidor proteosomal (Wilke y col. 2012), no inhibió el incremento en las corrientes de CFTR cuando xShroom1 fue suprimido con oligonucleótidos antisentido;

(2) cuando BFA fue utilizado, un compuesto que inhibe el transporte de proteínas recién sintetizadas a la membrana plasmática (Chardin y col. 1999), obtuvimos una vida media de CFTR mayor en la membrana plasmática de ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos antisentido dirigidos hacia xShroom1;

(3) con cloroquina, un inhibidor de los endosomas tardíos/lisosomas (Butterworth y col. 2005), y dynasore, un inhibidor de la endocitosis dependiente de

dinamina (Macia y col. 2006), el incremento en las corrientes de CFTR no fue observado en ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1 en comparación con ovocitos controles coinyectados con CFTR y oligonucleótidos sentido. Debe mencionarse sin embargo que el Dynasore puede tener otros efectos además del canónico sobre la endocitosis (Hofmann y col. 2017).

Efectos del BFA

El número de canales en la superficie celular es determinado por un balance entre la inserción de canales nuevos en la membrana plasmática y la endocitosis y degradación de los canales desde la membrana plasmática. La BFA disminuye las corrientes de CFTR, lo cual concuerda con Weber y col. (2001) quienes demostraron que la BFA redujo la activación de las corrientes de CFTR de una manera dependiente del tiempo y también redujo la capacitancia en ovocitos, indicando un bloqueo del transporte de los canales a la membrana plasmática. Los valores de la vida media de CFTR en la membrana plasmática varían ampliamente desde pocas horas hasta 2 días (Heda y col. 2001), lo cual podría ser debido al uso de diferentes líneas celulares, sistemas de expresión y protocolos experimentales realizados a diferentes temperaturas. Con BFA, se notó un incremento en la vida media de CFTR en la membrana plasmática en ovocitos co-inyectados con CFTR y oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1 (Figura 29). Esta vida media refleja la tasa de endocitosis y el reciclado de CFTR. Los resultados obtenidos son consistentes con la idea que la inhibición en la expresión de xShroom1 aumentó el

número de CFTR en la superficie celular por un incremento en la retención o en el reciclado del canal en la membrana plasmática.

Efecto de la cloroquina y dynasore

La ubiquitinación es conocida por regular negativamente receptores y transportadores desde la membrana plasmática de levaduras y células de mamíferos (Nabhan y col. 2010; Hyun y col. 2013; Babst 2014). La ubiquitinación inducida por ligando (por ejemplo, EGF) o constitutiva (por ejemplo, ENaC) de proteínas de membrana requiere reconocimiento del sustrato por enzimas de conjugación de la ubiquitina y por proteínas ligasas de ubiquitina (E2/E3s; Pickart 2001). El reciclado de las proteínas de membrana protege los polipéptidos de su degradación y les permite que tengan repetidos ciclos de endocitosis y exocitosis (Ghosh y Maxfield 1995). Por otro lado, los canales ubiquitinados son selectivamente tomados desde el reciclado y redirigidos para su degradación en los lisosomas (Farinha y col. 2017). El proceso de selección en los endosomas tempranos confiere un mecanismo eficiente para prevenir la acumulación de proteínas de membrana mal plegadas en la superficie celular.

Los canales CFTR entran en la vía de degradación a través de la endocitosis mediada por clatrina (Bradbury y col. 1994) y luego son degradados a través de la vía lisosomal (Cheng y col. 2013). Cuando analizamos la vía endolisosomal, tanto dynasore como cloroquina promovieron un incremento significativo en las corrientes de CFTR en ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos sentido de xShroom1, en comparación con ovocitos control (sin cloroquina). Dynasore, al ser un inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina, tuvo el efecto previsto sobre

CFTR, disminuyendo la internalización de la proteína desde la membrana plasmática significativamente. Los experimentos con cloroquina coinciden con otros resultados obtenidos en canales Kir2.1 donde hay un incremento en las corrientes I_{K1} en presencia de cloroquina (Jansen y col. 2008). Los tratamientos con dynasore y cloroquina no produjeron un incremento significativo en las corrientes de CFTR cuando la expresión de xShroom1 fue inhibida, sugiriendo la participación de xShroom1 en la vía endolisosomal, y no en el reciclado de CFTR.

Expresión del CFTR

El silenciamiento de xShroom1 aumentó la expresión celular total de CFTR al reducir la cantidad de CFTR que es degradado en el lisosoma. Para investigar si este cambio en la degradación del canal se correlaciona con un cambio en su ubiquitinación, evaluamos los niveles de ubiquitinación de CFTR cuando xShroom1 es suprimido. Detectamos CFTR ubiquitinado tanto en los inmunoprecipitados de los ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1 como en los ovocitos control coinyectados con CFTR y oligonucleótidos sentido. La conjugación de ubiquitina es promovida por el mal plegamiento del canal e involucra superficies hidrofóbicas expuestas de la proteína (Sharma y col. 2004). Sin embargo, el CFTR *wild type* también es ubiquitinado y degradado luego de su desplegado fisiológico al finalizar su tiempo de vida medio en la superficie celular. También observamos que los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1 no disminuyeron la cantidad relativa de CFTR ubiquitinado, sugiriendo que xShroom1 facilita la endocitosis de CFTR mediante un mecanismo independiente de ubiquitina, y luego es degradado en el lisosoma.

Unión de CFTR y Hsc70

El reconocimiento del CFTR en la membrana plasmática es mediado por la chaperona Hsc70, llevando el canal a ubiquitinación y degradación lisosomal (Okiyoneda y col. 2010). Los ovocitos expresan constitutivamente por lo menos dos isoformas de Hsc70 (Mandell y Feldherr 1990), y obtuvimos que la chaperona Hsc70 de ovocitos coinmunoprecipita con CFTR. Cuando xShroom1 fue suprimido, no se observó un cambio en la unión entre CFTR y Hsc70, sugiriendo que el efecto de xShroom1 no ocurre a través de la chaperona.

Nuestros ensayos de *western blot* indican que las células expresan la proteína CFTR. Utilizando un anticuerpo específico pudimos detectar una banda de aproximadamente 160 - 180 KDa que corresponde a la forma glicosilada del canal (Avella y col. 2011). La adquisición de los oligosacáridos por el extremo N-terminal del CFTR se produce en el retículo endoplasmático y el polipéptido glicosilado se exporta al aparato de Golgi, y una vez completada allí la glicosilación por enzimas glicosiltransferasas, el transporte del CFTR progresa a la membrana plasmática. Además, las mediciones de la expresión de la proteína total de CFTR y en la superficie celular mostraron una expresión y consecuente aumento de la densidad de la proteína de CFTR por tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1. Esto concuerda con los estudios funcionales presentados más arriba, sugiriendo la posibilidad que un incremento en el número de canales insertos en la membrana plasmática es responsable por el aumento en las corrientes cuando la expresión de xShroom1 es inhibida.

En conclusión, pensamos que la inhibición de la expresión de xShroom1 resultó en mayores corrientes de CFTR por un incremento de los canales CFTR en la superficie celular. Esto puede ser debido a una disminución hacia el tráfico endocítico que dirige CFTR su degradación.

2. RELACIÓN ENTRE EL CANAL EPITELIAL DE SODIO (ENAC), EL CANAL REGULADOR DE LA FIBROSIS QUÍSTICA (CFTR), Y LA PROTEÍNA XSHROOM1

Como se comentó más arriba, la inhibición en la expresión de xShroom1 resultó en una disminución en la función de ENaC (Assef y col. 2011) mientras que lo opuesto fue encontrado en estos experimentos respecto al CFTR. Los detalles de esta acción dual son pobremente comprendidos pero es interesante notar que en algunos tejidos el CFTR inhibe la conductancia de ENaC y no la activa (ver sección 2). Así en el epitelio respiratorio la activación del CFTR suprime la proteólisis de los dominios extracelulares de ENaC impidiendo su estimulación (Gentzsch y col. 2010) en tanto que en ovocitos de *X.laevis* la coexpresión del ENaC y el CFTR disminuye la probabilidad de apertura de ENaC, sin afectar su expresión en la superficie celular (Konstas y col. 2003). Como se puede apreciar un efecto opuesto al de la estimulación del ENaC que se observa en las glándulas sudoríparas y de allí que el efecto de la actividad del CFTR sobre el ENaC es tejido dependiente (Berdiev y col. 2009; Collawn y col. 2012; Hobbs y col. 2013).

Para estudiar la regulación de ENaC por CFTR y la proteína xShroom1, registramos corrientes de sodio sensibles al amiloride ($I_{Na(amil)}$) en ovocitos coinyectados con ambos canales y oligonucleótidos sentido o antisentido dirigidos contra xShroom1.

Cuando ambos canales se coexpresaron en los ovocitos, encontramos que CFTR produjo una reducción en las $I_{Na(amil)}$. Aunque los detalles de esta regulación no son conocidos y mencionamos algunos de los posibles mecanismos.

1. En células de la vía aérea se ha demostrado que el CFTR altera el tráfico de ENaC desde su sitio de síntesis hacia la membrana celular y produce cambios en la probabilidad de apertura del canal (Rubenstein y col. 2011).

2. También se propuso que el incremento del Cl^- intracelular inhibe el ENaC como un mecanismo de regulación indirecto del CFTR (Konig y col. 2001; Bachhuber y col. 2005; Briel y col. 1998).

Nosotros comprobamos que en los ovocitos coinyectados con ENaC y oligonucleótidos antisentido dirigidos hacia xShroom1 la $I_{Na(amil)}$ es menor que en los ovocitos control coinyectados con ENaC y oligonucleótidos sentido. En nuestro laboratorio comprobamos que esta inhibición se debe a un cambio en el número de canales insertos en la membrana plasmática (Assef y col. 2011).

Por otro lado, observamos que la inhibición de ENaC por CFTR es mayor en ovocitos coinyectados con ambos canales y oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1. Este resultado indicaría que el aumento en la corriente de CFTR debido a la supresión de xShroom1 con los oligonucleótidos antisentido produce que la inhibición de ENaC por CFTR sea mayor en comparación con la inhibición producida en ovocitos control coinyectados con ambos canales y oligonucleótidos

sentido. Aunque las inhibiciones de ENaC por CFTR y xShroom1 sean por vías diferentes, la supresión de xShroom1 también produce una inhibición de ENaC a través de un aumento en la corriente de CFTR.

No conocemos el mecanismo por el cual ocurre esta inhibición. xShroom1 genera un cambio en la cantidad de canales CFTR en la membrana plasmática, produciendo también un cambio en la corriente de cloruro total, por lo que no se puede descartar que la expresión o la corriente del canal sean la causa de la inhibición sobre ENaC, uno de los mecanismos propuestos para esta regulación (ver arriba). Por otro lado, también se detectó, utilizando las técnicas de coimmunoprecipitación y FRET, que los canales se encuentran muy cercanos sugiriendo que la inhibición producida por CFTR ocurriría a través de una interacción directa entre ambos (Berdiev y col. 2007) aunque no se puede descartar que en esta regulación intervenga otra molécula o el movimiento iónico.

Canales CFTR, ENaC y fibrosis quística

Conocer la relación entre ambos canales es de particular importancia por ser dos proteínas que se coexpresan en distintos epitelios regulando la homeostasis de los iones cloruro y sodio, y su desregulación produce un desbalance iónico como en la fibrosis quística. Aunque el CFTR es principalmente un canal aniónico (Welsh y Smith 1993; Gadsby y col. 2006; Aleksandrov y col. 2007), los síntomas de la fibrosis quística no son debidos solamente a deficiencias en la secreción del anión. La absorción de sodio a través de la membrana apical de los epitelios también contribuye con la enfermedad aunque sólo el CFTR es afectado por las mutaciones genéticas. La regulación del ENaC por el CFTR depende del tipo de epitelio

estudiado. En los epitelios secretores (vías aéreas, páncreas), la activación del CFTR disminuye la actividad del ENaC mientras que el efecto opuesto se observa en los epitelios absortivos (riñón, glándulas sudoríparas y colon) con aumento en la actividad del ENaC. El mecanismo de esta regulación es poco conocido, pero brinda una explicación sencilla para el hecho que la concentración de Na^+ en el sudor de los enfermos con fibrosis quística es elevada respecto a las personas sanas (Figura 42). En las células de personas con fibrosis quística se observa un potencial transpitelial más negativo que en condiciones normales. Una posibilidad sería que la célula está despolarizada por la entrada de Na^+ sin el acompañamiento del Cl^- produciendo una disminución de la fuerza impulsora para el Na^+ , su menor entrada y el consiguiente aumento en el líquido extracelular. Esto llevaría en el organismo enfermo a un aumento en la concentración de Na^+ en el sudor.

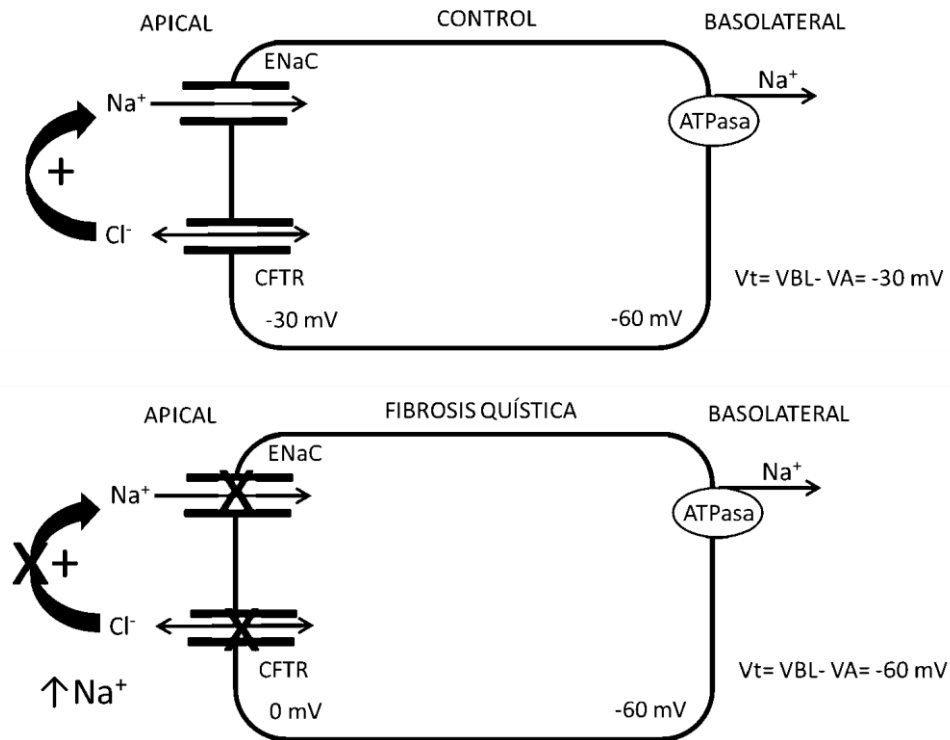


Figura 42. Esquema que relaciona la actividad del CFTR y ENaC en epitelio de glándula sudorípara. El potencial transepitelial (V_t) es potencial en cara basolateral, (V_BL) - potencial en cara apical (V_A). En las células de pacientes con fibrosis quística la actividad del CFTR está disminuida o ausente y esto se traduce en una menor activación del ENaC y un V_t más negativo que en las células sanas. Esto se traduce en un aumento de Na⁺ en el sudor de los enfermos.

Nuestros resultados sugieren que el CFTR regula negativamente la función de ENaC, restringiendo la absorción y cambiando el balance del fluido a través de los epitelios a favor de una secreción neta. En la fibrosis quística ocurre el proceso inverso: ENaC no es inhibido por CFTR, el cual no es funcional o no está presente en la fibrosis quística, causando un incremento en la absorción de sodio a través del epitelio de las vías aéreas. Esto resulta en deshidratación de los fluidos en la superficie de las vías aéreas en los pacientes con fibrosis quística (Palma y col. 2014).

CONCLUSIONES

Shroom es una familia de proteínas relacionadas con la regulación y el mantenimiento del citoesqueleto al unirse a actina. Uno de los miembros de la familia Shroom es la proteína xShroom1, la cual se expresa constitutivamente en ovocitos de *Xenopus laevis* y es necesaria para la expresión y funcionalidad del canal epitelial de sodio ENaC (Assef y col. 2011).

En este trabajo estudiamos la relación entre la proteína xShroom1 y el canal transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), expresándolo heterológamente en los ovocitos de *Xenopus laevis*.

En primer lugar se confirmó la funcionalidad heteróloga del canal de cloruro CFTR por la técnica de *voltage clamp* en los ovocitos inyectados con el ARNc del canal. Se registraron corrientes totales activadas por AMPc, las cuales se inhibieron con el bloqueante de corrientes de cloruro DPC. La expresión del canal se confirmó con la técnica de *western blot*.

Se detectó el ARNm de la proteína xShroom1, proteína ligada a morfogénesis, mantenimiento y/o funcionalidad del citoesqueleto de actina-miosina/tubulina (Fairbank y col. 2006; Hagens y col. 2006). Debido a las funciones asociadas a esta proteína, se considera que también puede influenciar en la actividad de proteínas de transporte apicales, como intermediaria de la modulación que ejerce el citoesqueleto de actina sobre las mismas (Cantiello 1995). Analizamos el efecto de la inhibición de xShroom1 sobre el CFTR midiendo su actividad en los ovocitos. Se observó que la supresión de xShroom1 incrementó la corriente de CFTR. Inferimos que el efecto de xShroom1 sobre CFTR también podría cumplir su papel relacionando funcionalmente a la actina y los demás componentes del citoesqueleto. Esto es particularmente importante en este canal, cuya actividad se

encuentra regulada por el citoesqueleto. Los filamentos de actina (F-actina) son esenciales en la regulación de la actividad y expresión de CFTR en la membrana plasmática (Broadbent y col. 2015).

Se estudió la expresión del canal total y en la superficie celular utilizando la biotilización de las proteínas de la membrana plasmática. Las mediciones de la expresión de CFTR mostraron un aumento de la densidad de la proteína de CFTR por tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra xShroom1. Los patrones de expresión se corresponden con el análisis funcional de CFTR cuando xShroom1 es inhibida.

Posteriormente se investigaron los mecanismos por los cuales xShroom1 se relaciona con CFTR. Se registraron las corrientes del canal cuando la degradación proteosomal de CFTR se inhibió con MG-132. Se obtuvo que el efecto de xShroom1 sobre CFTR no es a través de la degradación proteosomal. El tráfico de CFTR a la membrana plasmática se bloqueó con brefeldina A para analizar su vida media. Con BFA obtuvimos un incremento en la vida media de CFTR en la membrana plasmática de los ovocitos cuando xShroom1 fue inhibido. Esta vida media refleja la tasa de endocitosis y el reciclado de CFTR, y los resultados obtenidos son consistentes con la idea que la inhibición en la expresión de xShroom1 aumentó el número de CFTR en la superficie celular por un incremento en la retención o en el reciclado del canal en la membrana plasmática. Cuando el lisosoma se inhibió con cloroquina o cuando la endocitosis del canal se inhibió con dynasore, se observó la participación de la vía endolisosomal en el efecto de xShroom1 sobre CFTR.

Por otro lado se midió la ubiquitinación de CFTR y su interacción con la chaperona Hsc70 por inmunoprecipitación. Cuando xShroom1 fue suprimido, no se

observó un cambio en la ubiquitinación de CFTR ni en la unión entre CFTR y Hsc70, sugiriendo que xShroom1 facilita la endocitosis de CFTR mediante un mecanismo independiente de ubiquitina y de la chaperona, y luego es degradado en el lisosoma.

Se estudió la relación entre CFTR, ENaC y xShroom1 analizando las corrientes de sodio sensibles a amiloride por *voltage clamp*, cuando la proteína endógena de los ovocitos xShroom1 fue inhibida y el canal CFTR fue activado con un aumento intracelular de AMPc. La regulación del ENaC en los tejidos donde se detectó su expresión (riñón, colon, pulmón) es compleja, siendo estimulado por una serie de hormonas (aldosterona, vasopresina, insulina, estrógeno, progesterona, etc.) e inhibido por el diurético amiloride (Garty y Palmer 1997; Álvarez de la Rosa y col. 2000). El CFTR regula el ENaC por varios mecanismos (Kunzelman y col. 1999; Schwiebert y col. 1995, Bachhuber y col 2005; Berdiev y col. 2009; Hryciw y Guggino 2000). Se encontró que tanto CFTR como xShroom1 producen una reducción en las corrientes de sodio sensibles a amiloride. Además, la inhibición de ENaC por CFTR es mayor cuando xShroom1 es suprimido, debido al aumento en la corriente de CFTR.

Podemos concluir que la supresión de xShroom1 se traduce en un incremento en las corrientes de CFTR por un aumento del canal en la superficie celular. Posiblemente esto se deba a una reducción hacia los etapas tardías de la vía endocítica que lleva al CFTR a la vía de degradación, pero no podemos descartar que la inhibición de la expresión de xShroom1 afecte la probabilidad de apertura de CFTR. Nuestros datos sugieren que xShroom1 juega un papel importante en regular la expresión de CFTR y así su función, así como también en la relación entre CFTR y ENaC. Esto podría ser relevante en el entendimiento del mal funcionamiento del canal en varias enfermedades, en especial en la fibrosis quística.

REFERENCIAS

1. **Adebamiro A, Cheng Y, Rao US, Danahay H, Bridges RJ. 2007.** A segment of γ ENaC mediates elastase activation of Na⁺ transport. *J Gen Physiol.* 130:611-629.
2. **Aleksandrov AA, Aleksandrov LA, Riordan JR. 2007.** CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 453:693–702.
3. **Alvarez de la Rosa D, Canessa CM, Fyfe GK, Zhang P. 2000.** Structure and regulation of amiloride sensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol.* 62:573–594.
4. **Anantharam A, Tian Y, Palmer LG. 2006.** Open probability of the epithelial sodium channel is regulated by intracellular sodium. *J Physiol.* 574:333-347.
5. **Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ. 1991.** Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science.* 253(5016):202-5.
6. **Assef YA, Damiano AE, Zotta E, Ibarra C, Kotsias BA. 2003.** CFTR in K562 human leukemic cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285:C480–C488.
7. **Assef YA, Cavarra SM, Damiano AE, Ibarra C, Kotsias BA. 2005.** Ionic currents in multidrug resistant K562 human leukemic cells. *Leukemia Research.*

29:1039–1047.

8. **Assef Y, Ozu M, Marino G, Galizia L, Kotsias BA. 2011.** ENaC channels in oocytes from *xenopus laevis* and their regulation by xshroom1 protein. *Cell Physiol Biochem.* 28:259-266.
9. **Babst M. 2014.** Quality control at the plasma membrane: One mechanism does not fit all *J. Cell Biol.* 205:1 11–20.
10. **Bachhuber T, König J, Voelcker T, Mürle B, Schreiber R, Kunzelmann K. 2005.** Cl⁻ interference with the epithelial Na⁺ channel ENaC. *J Biol Chem.* 280:31587-1594.
11. **Beavo JA, Rogers NL, Crofford OB, Hardman JC, Sutherland EW, Newman EV.** Effects of xanthine Derivatives on Lipolysis and on Adenosine 3',5'-Monophosphate Phosphodiesterase Activity. *Mol Pharmacol.* 6:597-603.
12. **Benos DJ, Saccomani G, Brenner BM, Sariban-Sohraby S. 1986.** Purification and characterization of the amiloride-sensitive sodium channel from A6 cultured cells and bovine renal papilla. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(22):8525-9.
13. **Berdiev BK, Qadri YJ, Benos DJ. 2009.** Assessment of the CFTR and ENaC association. *Mol Biosyst.* 5:123-7.

14. **Berger HA, Travis SM, Welsh MJ. 1993.** Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem.* 268(3):2037-47.
15. **Bianchi L, Driscoll M. 2006.** Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *WormBook.* 1:1-16.
16. **Bize V, Horisberger JD. 2007.** Sodium self-inhibition of human epithelial sodium channel selectivity and affinity of the extracellular sodium sensing site. *Am J Physiol Renal Physiol.* 293:F1137-F1146.
17. **Boucher RC, Stutts MJ, Knowles MR, Cantley L, Gatzky JT. 1986.** Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest.* 78:1245-52.
18. **Boyd C, Naray-Fejes-Toth A. 2007.** Steroid-mediated regulation of the epithelial sodium channel subunits in mammary epithelial cells. *Endocrinology.* 148:3958-3967.
19. **Boyle MP, De Boeck K. 2013.** A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir Med.* 1:158-63.
20. **Bradbury NA, Cohn JA, Venglarik CJ, Bridges RJ. 1994.** Biochemical and biophysical identification of cystic fibrosis transmembrane conductance

regulator chloride channels as components of endocytic clathrin-coated vesicles. *J Biol Chem.* 269(11):8296-302.

21. **Bradbury NA. 2001.** cAMP signaling cascades and CFTR: is there more to learn?. *Pflügers Archl.* 443[Suppl1]:S85–S91.
22. **Briel M, Greger R, Kunzelmann K. 1998.** Cl⁻ transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na⁺ channels (ENaCs) in *Xenopus* oocytes co-expressing CFTR and ENaC. *J Physiol.* 508:825-836.
23. **Broadbent SD, Ramjeesingh M, Bear CE, Argent BE, Linsdell P, Gray M. 2015.** The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an extracellular chloride sensor. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 467:1783–1794.
24. **Browne CL, Werner W. 1984.** Intercellular junctions between the follicle cells and oocytes of *Xenopus laevis*. *J Exp Zool.* 230(1):105-13.
25. **Bubien J K, Watson B, Khan MA, Langloh A L, Fuller C M, Berdiev B, Tousson A, Benos DJ. 2001.** Expression and regulation of normal and polymorphic epithelial sodium channel by human lymphocytes. *J Biol Chem.* 276:8557-66.

26. **Butterworth MB, Edinger R, Frizzell RA, Johnson JP. 2009.** Regulation of the epithelial sodium channel by membrane trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol.* 296:F10-F24.
27. **Caldwell RA, Boucher RC, Stutts MJ. 2004.** Serine protease activation of near-silent epithelial Na⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C190-C194.
28. **Cantiello HF. 1995.** Role of the actin cytoskeleton on epithelial Na⁺ channel regulation. *Kidney Int.* 48(4):970-84.
29. **Carattino MD, Hill WG, Kleyman TR. 2003.** Arachidonic Acid Regulates Surface Expression of Epithelial Sodium Channels. *J Biol Chem.* 278:36202–36213.
30. **Carattino MD, Sheng S, Kleyman TR. 2004.** Epithelial Na⁺ channels are activated by laminar shear stress. *J Biol Chem.* 279:4120-6.
31. **Chan LN, Chung YW, Leung PS, Liu CQ, Chan HC. 1999.** Activation of an adenosine 3', 5' -cyclic Monophosphate-Dependent Cl⁻ Conductance in Response to Neurohormonal Stimuli in Mouse Endometrial Epithelial Cells: The Role of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Biol Reprod.* 60:374–380.

32. **Chan HC, He Q, Ajonuma LC, Wang XF. 2007.** Epithelial ion channels in the regulation of the reproductive tract fluid microenvironment: implications in fertility and infertility. *Acta Physiologica Sinica*. 59:495-504.
33. **Chanoux RA, Rubenstein RC. 2012.** Molecular chaperones as targets to circumvent the CFTR defect in cystic fibrosis. *Front Pharmacol*. 3:137.
34. **Chen M, Du J, Jiang W, Zuo W, Wang F, Li M, Wu Z, Chan H, Zhou W. 2008.** Functional expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in rat oviduct epithelium. *Acta Biochim Biophys Sin*. 40:864-872.
35. **Cheng J, Guggino W. 2013.** Ubiquitination and degradation of CFTR by the E3 ubiquitin ligase MARCH2 through its association with adaptor proteins CAL and STX6. *PLoS One*. 8(6):e68001.
36. **Cholon DM, O'Neal WK, Randell SH, Riordan JR, Gentsch M. 2010.** Modulation of endocytic trafficking and apical stability of CFTR in primary human airway epithelial cultures. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 298:L304-14.
37. **Collawn JF, Lazrak A, Bebok Z, Matalon S. 2012.** The CFTR and ENaC debate: how important is ENaC in CF lung disease? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 302:L1141-6.

38. **Condliffe SB, Zhang H, Frizzell RA. 2004.** Syntaxin 1A regulates ENaC channel activity. *J Biol Chem.* 279:10085-10092.
39. **Costa PF, Emilio MG, Fernandes PL, Ferreira HG, Ferreira KG. 1989.** Determination of ionic permeability coefficients of the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes under voltage clamp. *J Physiol.* 413:199-211.
40. **del Monaco S1, Assef Y, Damiano A, Zotta E, Ibarra C, Kotsias BA. 2006.** Characterization of the epithelial sodium channel in human pre-eclampsia syncytiotrophoblast. *Medicina (B Aires).* 66(1):31-5.
41. **del Mónico S, Assef Y, Kotsias BA. 2008.** Epithelial Sodium Channel in a Human Trophoblast Cell Line (BeWo). *J Memb Biol.* 223:127–139.
42. **del Mónico SM, Marino GI, Assef YA, Damiano AE, Kotsias BA. 2009.** Cell migration in BeWo cells and the role of epithelial sodium channels. *J Membr Biol.* 232(1-3):1-13.
43. **de Souza NJ, Dohadwalla AN, Reden J. 1983.** Forskolin: a labdane diterpenoid with antihypertensive, positive inotropic, platelet aggregation inhibitory, and adenylate cyclase activating properties. *Med Res Rev.* 3(2):201-19.
44. **Dietz ML, Bernaciak TM, Vendetti F, Kielec JM, Hildebrand JD. 2006.**

- Differential actin-dependent localization modulates the evolutionarily conserved activity of shroom family proteins. *J Biol Chem.* 281(29):20542–20554.
45. **Donaldson SH, Boucher RC. 2007.** Sodium channels and cystic fibrosis. *Chest.* 132(5):1631-6.
46. **Dubyak G. 2004.** Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms. *Adv Physiol Educ.* 28:143-54.
47. **Dumont JN. 1972.** Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol.* 136(2):153-79.
48. **Edelman A. 2014.** Cytoskeleton and CFTR. *Int J Biochem Cell.* 68-72.
49. **Edinger RS, Yospin J, Perry C, Kleyman TR, Johnson JP. 2006.** Regulation of epithelial Na⁺ channels (ENaC) by methylation: a novel methyltransferase stimulates ENaC activity. *J Biol Chem.* 281:9110-7.
50. **Fairbank PD, Lee C, Ellis A, Hildebrand JD, Gross JM, Wallingford JB. 2006.** Shroom2 (APXL) regulates melanosome biogenesis and localization in the retinal pigment epithelium. *Development.* 133(20):4109-18.

51. **Farber MJ, Rizaldy R, Hildebrand JD. 2011.** Shroom2 regulates contractility to control endothelial morphogenesis. *Mol Biol Cell.* 22(6):795-805.
52. **Farinha CM, Matos P, Amaral MD. 2013.** Control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane trafficking: not just from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *FEBS J.* 280:4396–4406.
53. **Farinha CM, Canato S. 2017.** From the endoplasmic reticulum to the plasma membrane: mechanisms of CFTR folding and trafficking. *Cell Mol Life Sci.* 74:39–55.
54. **Frizzell RA, Hanrahan JW. 2012.** Physiology of epithelial chloride and fluid secretion. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2:a009563.
55. **Gadsby DC, Vergani P, Csanády L. 2006.** The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature.* 440(7083):477-83.
56. **Garty H, Palmer LG. 1997.** Epithelial sodium channels: function, structure and regulation. *Physiological reviews.* 77:359-396.
57. **Gentsch M, Dang H, Dang Y, Garcia-Caballero A, Suchindran H, Boucher RC, Stutts MJ. 2010.** The cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Impedes Proteolytic Stimulation of the Epithelial Na⁺ Channel. *J Biol*

Chem. 285:32227–32232.

58. **Goldin AL. 2006.** Expression and analysis of recombinant ion channels. Weinheim. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
59. **Ghosh RN, Maxfield FR. 1995.** Evidence for nonvectorial, Retrograde Transferrin Trafficking in the Early Endosomes of HEp2 Cells. *The J Cell Biol.* 128:549-561.
60. **Grosse AS, Pressprich MF, Curley LB, Hamilton KL, Margolis B, Hildebrand JD, Gumucio DL. 2011.** Cell dynamics in fetal intestinal epithelium: implications for intestinal growth and morphogenesis. *Development.* 138(20):4423-32.
61. **Guggino WB, Stanton BA. 2006.** New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:426-36.
62. **Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G. 1971.** Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature.* 233(5316):177-82.
63. **Gurdon JB. 1973.** The translation of messenger RNA injected in living oocytes of *Xenopus laevis*. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh).* 180:225-43.

64. **Hagens O, Ballabio A, Kalscheuer V, Kraehenbuhl J-P, Schiaffino MV, Smith P, Staub O, Hildebrand J, Wallingford JB. 2006.** A new standard nomenclature for proteins related to Apx and Shroom. *BMC Cell Biology*. 7:18.
65. **Hagens O, Dubos A, Abidi F, Barbi G, Van Zutven L, Hoeltzenbein M, Tommerup N, Moraine C, Fryns JP, Chelly J, van Bokhoven H, Gécz J, Dollfus H, Ropers HH, Schwartz CE, de Cassia Stocco Dos Santos R, Kalscheuer V, Hanauer A. 2006.** Disruptions of the novel KIAA1202 gene are associated with X-linked mental retardation. *Hum Genet*. 118(5):578-90.
66. **Harris M, Firsov D, Vuagniaux G, Stutts MJ, Rossier BC. 2007.** A novel neutrophil elastase inhibitor prevents elastase activation and surface cleavage of the epithelial Sodium channel expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem*. 282:58-64.
67. **Hernandez-Gonzalez EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, Lopez-Gonzalez I, Demarco I, Wertheimer E, Darszon A, Visconti PE. 2006.** Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem*. 281:5623-5633.
68. **Hildebrand JD, Soriano P. 1999.** Shroom, a PDZ domain-containing actin-binding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice. *Cell*.

99(5):485-97.

69. **Hildebrand JD. 2005.** Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network. *J Cell Science.* 118:5191-5203.
70. **Hille B. 1992.** Ionic hannels of excitable membranes. Second edition, Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts.
71. **Hobbs CA, Da Tan C, Tarran R. 2013.** Does epithelial sodium channel hyperactivity contribute to cystic fibrosis lung disease? *J Physiol.* 591:4377-87.
72. **Hübner C, Jentsch T. 2002.** Ion channel diseases. *Human Molecular Genetics.* 11:2435–45.
73. **Hughey RP, Mueller GM, Bruns JB, Kinlough CL, Pol PA, Harkleroad KL, Carattino MD, Kleyman TR. 2003.** Maturation of the epithelial Na⁺ channel involves proteolytic processing of the α - and γ -subunits. *J Biol Chem.* 278:37073-37082.
74. **Hwang T-C, Sheppard DN. 1999.** Molecular pharmacology of the CFTR Cl⁻ channel. *Trends Pharmacol Sci.* 20:448-53.

75. **Hyun JH, Eom K, Lee K-H, Ho W-K, Lee S-H. 2013.** Activity-dependent downregulation of D-type K⁺ channel subunit Kv1.2 in rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J Physiol.* 591:5525–5540.
76. **Imbrici P, Liantonio A, Camerino GM, De Bellis M, Camerino C, Mele A, Giustino A, Pierno S, De Luca A, Tricarico D, Desaphy JF, Conte D. 2016.** Therapeutic approaches to genetic ion channelopathies and perspectives in drug discovery. *Front Pharmacol.* 7:121.
77. **Jiang Q, Mak D, Devidas S, Schwiebert EM, Bragin A, Zhang Y, Skach WR, Guggino WB, Foskett JK, Engelhardt JF. 1998.** Cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-associated ATP Release Is Controlled by a Chloride Sensor. *The Journal of Cell Biology.* 143:645-657.
78. **Jones HM, Hamilton KL, Papworth GD, Syme CA, Watkins SC, Bradbury NA, Devor DC. 2004.** Role of the NH₂ terminus in the assembly and trafficking of the intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel hK1. *J Biol Chem.* 279(15):15531-40.
79. **Kashlan OB, Sheng S, Kleyman TR. 2005.** On the interaction between amiloride and its putative α -subunit epithelial Na channel binding site. *J Biol Chem.* 280:26206-26215.
80. **Kellenberger S, Gautschi I, Schild L. 2003.** Mutations in the epithelial Na

channel ENaC outer pore disrupt amiloride block by increasing its dissociation rate. *Mol Pharmacol.* 64:848-56.

81. **Kong XB, Ma HG, Li HG, Xiong CL. 2008.** Blockade of epithelial sodium channels improves sperm motility in asthenospermia patients. *Int J Androl.* 31:1-7.
82. **König J, Schreiber R, Voelcker T, Mall M, Kunzelmann K. 2001.** The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) inhibits ENaC through an increase in the intracellular Cl⁻ concentration. *EMBO Rep.* 2(11):1047-51.
83. **Konstas A-A, Koch J-P, Korbmacher C. 2003.** cAMP-dependent activation of CFTR inhibits the epithelial sodium channel (ENaC) without affecting its surface expression. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 445:513–521.
84. **Kotsias BA. 2002.** Basic mechanisms of ion channel function. *Advances in Clinical Neurophysiology.* 54:33-42.
85. **Kotsias BA, Peracchia C. 2005.** Functional interaction between CFTR and Cx45 gap junction channels expressed in oocytes. *J Membr Biol.* 203:143-50.
86. **Kotsias BA, Salim M, Peracchia LL, Peracchia C. 2006.** Interplay between cystic fibrosis transmembrane regulator and gap junction channels made of

connexins 45, 40, 32 and 50 expressed in oocytes. *J Membr Biol.* 214:1-8.

87. **Köttgen A, Glazer NL, Dehghan A, Hwang SJ, Katz R, Li M, Yang Q, Gudnason V, Launer LJ, Harris TB, Smith AV, Arking DE, Astor BC, Boerwinkle E, Ehret GB, Ruczinski I, Scharpf RB, Chen YD, de Boer IH, Haritunians T, Lumley T, Sarnak M, Siscovick D, Benjamin EJ, Levy D, Upadhyay A, Aulchenko YS, Hofman A, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Chasman DI, Paré G, Ridker PM, Kao WH, Witteman JC, Coresh J, Shlipak MG, Fox CS. 2009.** Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat Genet.* 41(6):712-7.
88. **Kunzelmann K, Schreiber R. 1999.** CFTR, a regulator of channels. *J Membr Biol.* 168(1):1-8.
89. **Kusano K, Miledi R, Stinnakre J. 1982.** Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J Physiol.* 328:143-70.
90. **Kusche-Vihrog K, Sobczak K, Bangel N, Wilhelmi M, Nechyporuk-Zloy V, Schwab A, Schillers H, Oberleithner H (2007).** Aldosterone and amiloride alter ENaC abundance in vascular endothelium. *Pflugers Arch.* 455:849-857.
91. **Laube M, Küppers E, Thome UH. 2011.** Modulation of sodium transport in alveolar epithelial cells by estradiol and progesterone. *Pediatr Res.* 69(3):200-5.

92. **Li H, Findlay IA, Sheppard DN. 2004.** The relationship between cell proliferation, Cl⁻ secretion, and renal cyst growth: a study using CFTR inhibitors. *Kidney Int.* 66(5):1926-38.
93. **Liang X, Da Paulaa AC, Bozókyb Z, Zhanga H, Bertranda CA, Petersa KW, Forman-Kayb JD, Frizzella RA. 2012.** Phosphorylation-dependent 14-3-3 protein interactions regulate CFTR biogenesis. *Mol Biol Cell.* 23(6):996-1009.
94. **Londino JD, Lazrak A, Jurkuvenaite A, Collawn JF, Noah JW, Matalon S. 2013.** Influenza matrix protein 2 alters CFTR expression and function through its ion channel activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 304:L582-92.
95. **Ma T, Thiagarajah JR, Yang H, Sonawane ND, Folli C, Galietta LJ, Verkman AS. 2002.** Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin–induced intestinal fluid secretion. *J Clin Invest.* 110:1651-8.
96. **Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. 2006.** Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell.* 10:839–850.
97. **Malik B, Price SR, Mitch WE, Yue Q, Eaton DC. 2006.** Regulation of epithelial sodium channels by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290:F1285-F1294.

98. **Mall M, Hipper A, Greger R, Kunzelmann K. 1996.** Wild type but not deltaF508 CFTR inhibits Na⁺ conductance when coexpressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* 381(1-2):47-52.
99. **Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. 2004.** Increased airway epithelial Na absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med.* 10:487-93.
100. **Mandell RB, Feldherr CM. 1990.** Identification of two HSPT0-related *Xenopus* Oocyte proteins that Are Capable of Recycling Across the Nuclear Envelope. *J Cell Biol,* 111:1775-1783.
101. **Marino GI, Kotsias BA. 2012.** The epithelial sodium channel and the cell migration. *Physiological Mini Reviews.* 6:13-22.
102. **Marino GI, Kotsias BA. 2014.** Cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) in human trophoblast BeWo cells and its relation to cell migration. *Placenta.* 35:92-8.
103. **Miledi R, Parker I, Sumikawa K. 1982.** Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocytes. *EMBO.* 1:1307-1312.
104. **Miledi R, Woodward RM. 1989.** Effects of defolliculation on membrane current

responses of *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 416:601-21.

- 105. Miledi R, Woodward RM. 1989.** Membrane currents elicited by prostaglandins, atrial natriuretic factor and oxytocin in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 416:623-43.
- 106. Monterisi S, Favia M, Guerra L, Cardone RA, Marzulli D, Reshkin SJ, Casavola V, Zaccolo M. 2011.** CFTR regulation in human airway epithelial cells requires integrity of the actin cytoskeleton and compartmentalized cAMP and PKA activity. *J Cell Sci.* 125:1106–1117.
- 107. Monterisi S, Casavola V, Zaccolo M. 2013.** Local modulation of cystic fibrosis conductance regulator: cytoskeleton and compartmentalized cAMP signalling. *Br J Pharmacol.* 169:1-9.
- 108. Nabhan JF, Pan H, Lu Q. 2010.** Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the b2-adrenergic receptor. *EMBO reports.* 11:605–611.
- 109. Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M, Miyosi T, Iwashita K, Shiraishi N, Nogoguchi H, Chen L, Chai KX, Chao J, Tomita K. 2002.** Regulation of prostasin by aldosterone in the kidney. *J Clin Invest.* 109:401-408.

- 110. Okiyoneda T, Barrière H, Bagdány M, Rabeh WM, Du K, Höhfeld J, Young JC, Lukacs GL. 2010.** Peripheral protein Quality Control Removes Unfolded CFTR from the Plasma Membrane. *Science*. 329:805-810.
- 111. Otulakowski G, Rafii B, Harris M, O’Brodvich H. 2006.** Oxygen and glucocorticoids modulate α ENaC mRNA translation in fetal distal lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 34:204-212.
- 112. Palma A, Kotsias BA, Marino GI. 2014.** Funciones de los canales iónicos CFTR Y ENaC en la fibrosis quística. *Medicina (Buenos Aires)*. 74:133-139.
- 113. Palma AG, Galizia L, Kotsias BA, Marino GI. 2016.** CFTR channel in oocytes from *Xenopus laevis* and its regulation by xShroom1 protein. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 468:871–880.
- 114. Peltz SW, Morsy M, Welch EM, Jacobson A. 2013.** Ataluren as an agent for therapeutic nonsense suppression. *Annu Rev Med*. 64:407-25.
- 115. Pickart CM. 2001.** Ubiquitin enters the New Millennium. *Mol Cell*. 8:499–504.
- 116. Plageman TFJ, Chung M-I, Lou M, Smith AN, Hildebrand JD, Wallingford JB, Lang RA. 2010.** Pax6-dependent Shroom3 expression regulates apical

constriction during lens placode invagination. *Development*. 137:405-415.

- 117. Plageman TF Jr, Chauhan BK, Yang C, Jaudon F, Shang X, Zheng Y, Lou M, Debant A, Hildebrand JD, Lang RA. 2011.** A Trio-RhoA-Shroom3 pathway is required for apical constriction and epithelial invagination. *Development*. 138:5177-88.
- 118. Pochynyuk O1, Medina J, Gamper N, Genth H, Stockand JD, Staruschenko A. 2006.** Rapid translocation and insertion of the epithelial Na⁺ channel in response to RhoA signaling. *J Biol Chem*. 281:26520-7.
- 119. Pochynyuk O, Tong O, Staruschenko A, Stockand JD. 2007.** Binding and direct activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by phosphatidylinositides. *J Physiol*. 580:365-372.
- 120. Qadri YJ, Cormet-Boyaka E, Benos DJ, Berdiev BK. 2011.** CFTR regulation of epithelial sodium channel. *Methods Mol Biol*. 742:35-50.
- 121. Quesnell RR, Han X, Schultz BD. 2007.** Glucocorticoids stimulate ENaC upregulation in bovine mammary epithelium. *Am J Physiol*. 292:C1739-C1745.
- 122. Rab A, Rowe SM, Raju SV, Bebok Z, Matalon S, Collawn JF. 2013.** Cigarette smoke and CFTR: implications in the pathogenesis of COPD. *Am J Physiol Lung*

Cell Mol Physiol. 305:L530-41.

- 123. Reddy MM, Quinton PM. 2005.** ENaC activity requires CFTR channel function independently of phosphorylation in sweat duct. *J Membr Biol.* 207:23-33.
- 124. Reddy MM, Stutts MJ. 2013.** Status of fluid and electrolyte absorption in cystic fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3:a009555.
- 125. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. 1989.** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 245:1066-73.
- 126. Rokaw MD, Wang JM, Edinger RS, Weiz OA, Hiu D, Middleton P, Shlyonsky V, Berdiev BK, Ismailov I, Eaton DC, Benos DJ, Johnson JP. 1998.** Carboxymethylation of the β subunit of xENaC regulates channel activity. *J Biol Chem.* 44:28746-28751.
- 127. Rosenberg MF, Kamis AB, Aleksandrov LA, Ford RC, Riordan JR. 2004.** Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Biol Chem.* 279(37):39051-7.

- 128. Rossier BC, Pradervand S, Schild L, Hummler E. 2002.** Epithelial Sodium Channel and the control of sodium balance: Interaction Between Genetic and Environmental Factors. *Annu Rev Physiol.* 64:877–897.
- 129. Rossier BC. 2004.** The epithelial sodium channel. Activation by membrane-bound serine proteases. *Proc Am Thorac Soc.* 1:4-9.
- 130. Rubenstein RC, Lockwood SR, Lide E, Bauer R, Suaud L, Grumbach Y. 2011.** Regulation of endogenous ENaC functional expression by CFTR and F508-CFTR in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 300:L88–L101.
- 131. Saxena SK, Kaur S. 2006.** Regulation of epithelial ion channels by Rab GTPases. *Biochem Biophys Res Commun.* 351:582-587.
- 132. Saxena SK, Singh M, Kaur S, George C. 2007.** Distinct domain-dependent effect of syntaxin 1A on amiloride-sensitive sodium channel (ENaC) currents in DT-29 colonic epithelial cells. *Int J Biol Sci.* 3:47-56.
- 133. Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR, Guggino WB. 1995.** CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell.* 81(7):1063-73.
- 134. Sevilla-Pérez J, Königshoff M, Kwapiszewska G, Amarie OV, Seeger W,**

- Weissmann N, Schermuly RT, Morty RE, Eickelberg O. 2008.** Shroom expression is attenuated in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 32(4):871-80.
- 135. Sharma M, Pampinella F, Nemes C, Benharouga M, So J, Du K, Bache KG, Papsin B, Zerangue N, Stenmark H, Lukacs GL. 2004.** Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol.* 164:923–933.
- 136. Shcheynikov N, Kim KH, Kim KM, Dorwart MR, Ko SBH, Goto H, Naruse S, Thomas PJ, Muallem S. 2004.** Dynamic control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁽⁻⁾/HCO₃⁽⁻⁾ selectivity by external Cl⁽⁻⁾. *J Biol Chem.* 279:21857-65.
- 137. Sheng S, Maarout AB, Bruns JB, Hughey RP, Kleyman TR. 2007.** Functional role of extracellular loop cysteine residues of epithelial Na channel in Na self-inhibition. *J Biol Chem.* 282:20180-20190.
- 138. Sheppard DN, Welsh MJ. 1999.** Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev.* 79(1 Suppl):S23-45.
- 139. Sigel E. 1990.** Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J Membr Biol.* 117(3):201-21.

- 140. Stahl M, Stahl K, Brubacher MB, Forrest JNJr. 2012.** Divergent CFTR orthologs respond differently to the channel inhibitors CFTRinh-172, glibenclamide, and GlyH-101. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302:C67–C76.
- 141. Staub O, Verrey F, Kleyman TR, Benos DJ, Rossier BC, Kraehenbuhl J-P. 1992.** Primary structure of an apical protein from *Xenopus laevis* that participates in amiloride-sensitive sodium channel activity. *J Cell Biol.* 119(6):1497-1506.
- 142. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC. 1995.** CFTR as a cAMP-Dependent Regulator of Sodium Channels. *Science.* 269:847-850.
- 143. Surtees R. 2000.** Inherited ion channel disorders. *Eur J Pediatr.* 159:S199-S203.
- 144. Tang L, Fatehi M, Linsdell P. 2009.** Mechanism of direct bicarbonate transport by the CFTR anion channel. *J Cyst Fibros.* 8:115-21.
- 145. Tariq M, Belmont JW, Lalani S, Smolarek T, Ware SM. 2011.** SHROOM3 is a novel candidate for heterotaxy identified by whole exome sequencing. *Genome Biol.* 12(9):R91.

- 146. Taruno A, Niisato N, Marunaka Y. 2008.** Intracellular calcium plays a role as the second messenger of hypotonic stress in gene regulation of SGK1 and ENaC in renal epithelial A6 cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 294:F177-F186.
- 147. Taylor J, Chung KH, Figueroa C, Zurawski J, Dickson HM, Brace EJ, Avery AW, Turner DL, Vojtek AB. 2008.** The scaffold protein POSH regulates axon outgrowth. *Mol Biol Cell.* 19(12):5181-92.
- 148. Verrier B, Champigny G, Barhry P, Gerard C, Mauchamp J, Lazdunski M. 1989.** Identification and properties of a novel type of Na-permeable amiloride-sensitive channel in thyroid cells. *Eur J Biochem.* 183:499-505.
- 149. Ward CL, Omura S, Kopito RR. 1995.** Degradation of CFTR by the ubiquitin-Proteasome Pathway. *Cell.* 83:121–127.
- 150. Weber GJ, Mehr AP, Sirota JC, Aller SG, Decker SE, Dawson DC, Forrest JN Jr.** Mercury and zinc differentially inhibit shark and human CFTR orthologues: involvement of shark cysteine 102. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290:C793–C801.
- 151. Wei SP, Li XQ, Chou CF, Liang YY, Peng JB, Warnock DG, Ma HP. 2007.** Membrane tension modulates the effects of apical cholesterol on the renal epithelial sodium channel. *J Membr Biol.* 220:21-31.

- 152. Welsh MJ, Smith AE. 1993.** Molecular mechanisms of CFTR Chloride Channel Dysfunction in Cystic Fibrosis. *Cell*. 73:1251-1254.
- 153. Winter MC, Welsh MJ. 1997.** Stimulation of CFTR activity by its phosphorylated R domain. *Nature*. 389(6648):294-6.
- 154. Yang JZ, Ajonuma LC, Tsang LL, Lam SY, Rowlands DK, Ho LS, Zhou CX, Chung YW, Chan HC. 2004.** Differential expression and localization of CFTR and ENaC in mouse endometrium during pre-implantation. *Cell Biol Int*. 28:433-439.
- 155. Yoder M, Hildebrand JD. 2007.** Shroom4 (Kiaa1202) is an actin-associated protein implicated in cytoskeletal organization. *Cell Motil Cytoskeleton*. 64(1):49-63.
- 156. Zeiher BG, Eichwald E, Zabner J, Smith JJ, Puga AP, McCray PBJ, Capecchi MR, Welsh MJ, Thomas KR. 1995.** A mouse model for the delta F508 allele of cystic fibrosis. *J Clin Invest*. 96:2051-64.
- 157. Zhang Z-R, Zeltwanger S, McCarty NA. 2000.** Direct comparison of NPPB and DPC as Probes of CFTR Expressed in *Xenopus* Oocytes. *J. Membrane Biol*. 175:35–52.

- 158. Zhang WK, Wang D, Duan Y, Loy MM, Chan HC, Huang P. 2010.**
Mechanosensitive gating of CFTR. *Nature Cell Biol.* 12:507-12.
- 159. Zhou Z-H, Buben JK. 2001.** Nongenomic regulation of ENaC by aldosterone.
Am J Physiol. 281:C1118-C1130.
- 160. Zuckerman JB, Chen X, Jacobs JD, Hui B, Kleyman TR, Smith PR. 1999.**
Association of the epithelial Sodium Channel with Apx and α -Spectrin in A6
Renal Epithelial Cells. *J Biol Chem.* 274:23286–95.