

Tesis de Posgrado

Fibrosis quística: estudio poblacional : detección de mutaciones y transcritos alternativos del gen CFTR

Melo, Carlos Alberto

1993

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

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:

Melo, Carlos Alberto. (1993). Fibrosis quística: estudio poblacional : detección de mutaciones y transcritos alternativos del gen CFTR. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2566_Melo.pdf

Cita tipo Chicago:

Melo, Carlos Alberto. "Fibrosis quística: estudio poblacional : detección de mutaciones y transcritos alternativos del gen CFTR". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2566_Melo.pdf

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

"Fibrosis quística : estudio poblacional. Detección de mutaciones y transcritos alternativos del gen CFTR"

Carlos Alberto Melo

**Tesis
para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas**

Director : Dr. Francisco Ernesto Baralle

**International Center for Genetic Engineering and Biotechnology
Trieste, Italia**

Año 1993

Tesis
2166
h²

*A mi madre
A mis hijos y esposa
A Tito*

Agradecimientos

A Tito por su apoyo, enseñanzas y consejos.

A Silvia

A todos los que me enseñaron y ayudaron a cumplir este trabajo

Título	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. La enfermedad	3
I.2. Función de la proteína CFTR	6
I.3. El gen, los transcritos y la proteína	9
I.3.1. El gen	9
I.3.2. Los transcritos	14
I.3.3. La proteína	15
I.3.3.A. Los NBFs	17
I.3.3.B. La región R	18
I.4. Las mutaciones	24
I.5. Perspectivas terapéuticas	29
II. MATERIALES Y MÉTODOS	33
II.1.1. Marca de los materiales	33
II.1.2. Extracción de ADN genómico de leucocitos	33
II.1.3. Amplificación por PCR	35
II.1.4. Análisis de los fragmentos de ADN por gel de agarosa	38
II.1.5. Análisis de la mutación $\Delta F508$ por gel de acrilamida	39
II.1.6. Pretratamiento de sangre para uso directo en PCR	40
II.1.7. Tratamiento de vellosidades coriónicas para su estudio por PCR	41
II.1.8. Extracción de ARN total de leucocitos	42
II.1.9. Preparación de ADN copia de cadena simple	45
II.1.10. PCR anidadas	46
II.1.11. Secuenciación directa del producto de la reacción de amplificación por PCR	47

II.1.12. Secuenciación del ADN	47
II.1.13. Geles para secuenciación	48
II.1.14. Cultivo de células	49
II.1.15. Preparación de ARN total de células	52
II.1.16. Análisis del ADN por enzimas de restricción ..	53
II.1.17. Marcado de sondas	54
II.1.18. "Southern blot"	56
II.1.19. Purificación de fragmentos de ADN	58
II.1.20. Tratamiento del producto de la PCR para su clonado con extremos romos	59
II.1.21. Clonado de fragmentos de ADN en plásmidos..	61
II.1.22. Células competentes	62
II.1.23. Transformación	64
II.1.24. Extracción de ADN plasmídico	64
II.1.25. Preparación de ADN de fago λ	66
II.1.26. Secuenciación de cantidades mínimas de fago λ mediante el modelo PCR	68
II.1.27. PCR circular	69
II.1.28. Marcado de proteína e inmunoprecipitación	71
II.1.29. Gel de proteínas	73
II.2. Oligonucleótidos usados	76
II.3. Anticuerpos usados	80
 III. OBJETIVOS DEL TRABAJO	 81
 IV-V. DESARROLLO	 83
IV. Mejoramiento de las técnicas y estudios de población	83
IV.1. Introducción	83
IV.2. Resultados	86
IV.2.1.1. Nuevas técnicas de estudio de la $\Delta F508$	86

IV.2.1.2. Estudio poblacional de la $\Delta F508$	91
IV.2.2. Estudio del ADN copia de pacientes	95
IV.2.3. Conclusiones sobre el mejoramiento de las técnicas y el estudio de la $\Delta F508$	97
V. Estudio de isoformas	99
V.1. Introducción	99
V.2. Resultados	103
V.2.1. Nuevos transcritos	103
V.2.1.1. Estudio de células T84	103
V.2.1.2. Nuevos transcritos en leucocitos humanos ...	113
V.2.1.3. Nuevos transcritos en otros tipos de células .	116
V.2.2. Presencia del exón 10b en ADN genómico humano	117
V.2.3. Ubicación del exón 10b en el ADN genómico entre los exones 10 y 11.....	118
V.2.4. Búsqueda de transcritos 10b+ en ratón	130
V.2.5. Detección de la proteína CFTR36	132
V.2.6. Conclusiones del estudio de isoformas	141
 VI. PUBLICACIONES	 144
 VII . REFERENCIAS	 145

ABREVIATURAS

Aa.	aminoácido
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosina-5'difosfato
AMP	adenosina-5'monofosfato
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina-5'trifosfato
cADN	ADN copia
cAMP	adenosina-3',5' monofosfato cíclico
CFTR	proteína llamada en inglés <i>cistic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
FQ	fibrosis quística
kb	kilobases
kD	kilodaltons
mARN	ARN mensajero
NBF	sitios de unión de nucleótido
nt.	nucleótido
ORCC	canal de cloruro distinto del asignado a la CFTR, se llama en inglés <i>outwardly rectifying chloride channel</i>
P	fósforo
PK	Quinasa de proteína
PKA	Quinasa de proteína A
PKC	Quinasa de proteína C

I. INTRODUCCIÓN

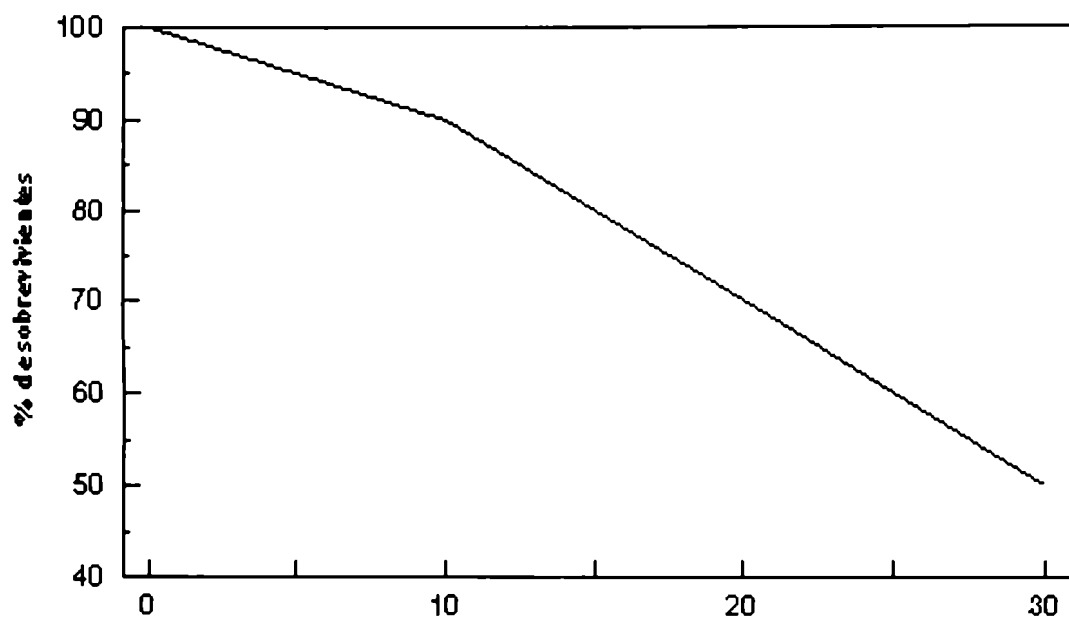
La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria más común en la población europea de origen caucásico. Se encuentra en proporción significativa también en otros grupos étnicos, como por ejemplo judíos asquenazi y negros norteamericanos (Tsui *et al.*, 1991), y en cantidad reducida, probablemente menos de 1 en 100.000, en orientales y negros africanos (Tsui, 1992).

Es una enfermedad autosómica recesiva muy severa, con una frecuencia que llega a 1 portador cada 25 individuos (clínicamente normales), y 1 enfermo cada 2.500 nacidos vivos (Boat *et al.*, 1989).

Durante los últimos 40 años la expectativa de vida de los pacientes ha ido en progresivo aumento gracias a la disponibilidad de mejores tratamientos, pero aun así es en la actualidad de solo 29 años (Collins, 1992a) (ver gráfico 1).

La gravedad de la enfermedad debida a este defecto genético y la frecuencia con la cual el gen mutado está presente en la población justifican plenamente el enorme interés existente sobre el tema.

Gráfico I



Edad (años)

En el gráfico puede verse la curva de supervivencia de los pacientes de CF en función de la edad.

I.1. La enfermedad

La fibrosis quística se produce cuando la proteína CFTR ("Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator") no puede desempeñar correctamente su función. En una alta proporción de los casos esto sucede debido a mutaciones en ambos alelos del gen CFTR, que resultan en la síntesis de una proteína distinta de la normal en los enfermos. En algunos pacientes no se han encontrado mutaciones en el gen CFTR.

Las manifestaciones clínicas son:

a) Insuficiencia de las glándulas exócrinas. Provoca una concentración de electrolitos anormalmente alta en el sudor.

b) Afecciones respiratorias crónicas. Son las más graves y que generalmente llevan a la muerte del paciente, (bronqueolitis, asma, colonización del tracto respiratorio por *Pseudomonas aeruginosa*, neumonía stafilococal, poliposis nasal, etc.).

El principal fenómeno en los pulmones es la acumulación de secreciones mucosas que obstruyen las vías respiratorias. Las secreciones se acumulan a pesar de que su velocidad de transporte en las vías principales, así como la morfología de las cilias y su ritmo de movimiento son normales (Wood *et al.*, 1975, Katz *et al.*, 1980, Rutland *et al.*, 1981), por lo que muchos investigadores sostienen que las propiedades físicas anormales de las secreciones o el excesivo volumen de secreción son las causas de la retención de mucosidades (Boat *et al.*, 1989). Ello crea un ambiente adecuado al establecimiento de infecciones crónicas

endobronquiales, fundamentalmente por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. No hay pruebas de que exista una disminución de las defensas en los pacientes, los que de hecho reaccionan normalmente contra infecciones fuera del sistema respiratorio.

c) Afecciones del sistema gastrointestinal. Pueden ser importantes pero tratadas correctamente difícilmente lleven a la muerte del paciente, tales como síndrome de "plug" de meconio, prolapso rectal, dolores crónicos abdominales, edema hipoproteinémico, prolongada ictericia neonatal, cirrosis biliar, pancreatitis crónica, etc..

d) Infertilidad tanto masculina como femenina, etc.(Boat *et al.*, 1989).

Usualmente se observa una gran heterogeneidad clínica, no solo entre distintas familias sino también dentro de la misma familia, lo que implica que otros factores genéticos y/o ambientales pueden ser también importantes (Dorin *et al.*, 1991, Burke *et al.*, 1992).

El único síntoma para el que existe una buena correlación genotipo-fenotipo es el grado de severidad de la disfunción pancreática y su velocidad de desarrollo, que es similar entre pacientes con la misma falla genética (Kerem *et al.*, 1989b, Tsui *et al.*, 1992).

Esto nos permite clasificar los síntomas en tres clases, que están probablemente relacionadas con el papel de la proteína CFTR en el tejido involucrado:

La primera es la que agrupa los síntomas comunes a todos los pacientes, como por ejemplo el incremento en la concentración de iones cloruro en el

sudor, lo que demuestra la función de la proteína CFTR en el transporte de iones cloruro y que el requerimiento de esta función es mayor en glándulas sudoríparas que en otros tejidos.

La segunda es el grado de la disfunción pancreática que puede ser suave para el 10-15% de las mutaciones, o severo para el restante 85-90% (Kerem *et al.*, 1989b).

La tercera comprende las manifestaciones clínicas que pueden estar fuertemente influenciadas por otros factores y son entonces altamente variables dentro del mismo genotipo, como por ejemplo la severidad de la disfunción pulmonar.

I.2. Función de la proteína CFTR

La proteína CFTR normal glicosilada tiene un peso molecular de 168.000 Daltons aproximadamente, y cumple un papel importante en el transporte de iones cloruro a través de la membrana celular en distintas células epiteliales, (Rich *et al.*, 1990, Dalemans *et al.*, 1991, Drumm *et al.*, 1991, Kartner *et al.*, 1991, Anderson *et al.*, 1991a, Higgins, 1992a, Egan *et al.*, 1992, Krauss *et al.*, 1992a).

Después de muchas controversias, en las que estuvo en discusión si la proteína CFTR actuaba como activador directo o indirecto del transporte de iones cloruro o era en sí misma un canal de cloruro, está suficientemente probado que se trata de un canal de cloruro de baja conductancia, con una relación lineal corriente-voltaje, que se activa en respuesta a estímulos que elevan el nivel intracelular de AMP cíclico (cAMP) y activan quinasas de proteína (Anderson *et al.*, 1991a, Kartner *et al.*, 1991, Tabcharani *et al.*, 1991, Bear *et al.*, 1992, Quinton *et al.*, 1992). La proteína CFTR no actúa como una bomba sino sólo como canal, permitiendo el paso de cloruros en una u otra dirección en función de las concentraciones relativas (Higgins *et al.*, 1991, Collins, 1992a, Riordan *et al.*, 1992).

Dado que es casi imposible explicar las considerables consecuencias fisiológicas derivadas de un gen CFTR mutado sólo como derivantes del mal funcionamiento del canal de cloruro, se supone que la proteína CFTR puede tener otras funciones (Higgins, 1992b). Existen pruebas de que puede actuar en:

a) El reciclamiento de la membrana plasmática de la célula (endocitosis y exocitosis).

Cuando vesículas del interior de la célula se funden con la membrana de ésta, las proteínas contenidas en la vesícula se secretan y las presentes en la membrana vesicular pasan a ser parte de la membrana celular. Éste proceso y su opuesto son vías importantes para la secreción y el emplazamiento de proteínas en la membrana celular y son conocidos respectivamente como exocitosis y endocitosis.

Se vio que en células epiteliales de páncreas provenientes de sujetos sanos el reciclamiento de la membrana celular regulado por AMP cíclico era normal, mientras que no funcionaba en las mismas células obtenidas de pacientes con FQ. Por otro lado éstas recuperaban la correcta funcionalidad al ser transfectadas con el gen CFTR normal (Barinaga, 1992, Bradbury *et al.*, 1992).

b) Se postula además que la proteína CFTR puede actuar como canal de cloruro no sólo en la superficie celular, sino también en la de compartimientos intracelulares donde podría influenciar el tráfico de membrana y proteínas asociadas a la membrana (Bradbury *et al.*, 1992, Barinaga, 1992). Esta posibilidad se ve reforzada por el hecho de que ciertas poblaciones vesiculares, por ejemplo prelisozomas, tienen un pH menos ácido en células epiteliales de vías respiratorias de pacientes de FQ que en el mismo tipo de células provenientes de individuos normales (Barasch *et al.*, 1991). El pH de gránulos secretorios está regulado por la conductancia de cloruros, de allí su relación con la proteína CFTR (Barasch *et al.*, 1988).

c) Una tercera hipótesis que cuenta con algunas evidencias en su favor es que la proteína CFTR juega algún papel en el así llamado ORCC ("outwardly rectifying chloride channel"), que es un canal de cloruro con características enteramente diferente del de baja conductancia asignado a la proteína. Se ha demostrado recientemente que los ORCC no funcionan en células FQ y que la actividad se restablece al transfectar estas células con el gen CFTR correcto (Higgins, 1992a, Egan *et al.*, 1992).

No parece probable que la proteína CFTR forme parte del ORCC, pero tendría alguna acción de regulación directa o indirecta sobre éste (Higgins, 1992a, Egan *et al.*, 1992).

d) Otros trabajos, basados en diferencias entre células provenientes de individuos normales y FQ sugieren actividades distintas de la proteína CFTR en: I) Fagocitos mononucleados, donde varía la velocidad de formación de superóxidos (Regelmann *et al.*, 1991). II) Neutrófilos, donde se ve una probable relación con funciones de la quinasa de proteína C (Graff *et al.*, 1991). III) Granulocitos, en los que se ven diferencias en la generación y metabolismo de lipooxigenasas (Saak *et al.*, 1990).

e) Ha sido también asociada la proteína a la canalización a través de la membrana celular de agua y otros aniones o solutos pequeños (Hasegawa *et al.*, 1992).

I.3. El gen, los transcriptos y la proteína

El gen CFTR fue aislado en 1989 (Riordan *et al.*, 1989), está ubicado en el brazo largo del cromosoma 7. Fue originalmente descrito con 24 exones, pero luego se individualizaron los 27 exones conocidos hasta hoy (Zielinski *et al.*, 1991a). Dentro de esta situación dinámica no sorprendería la aparición de otros, como por ejemplo el estudiado en esta tesis. Los 27 exones abarcan aproximadamente 250.000 pares de bases (Riordan *et al.*, 1989, Zielinski *et al.*, 1991a). El ARN mensajero (mARN) tiene 6.129 nucleótidos, excluyendo el poliA, y codifica para una proteína de 1480 aminoácidos (Riordan *et al.*, 1989).

I.3.1. El gen: El largo y complejo proceso de búsqueda para llegar al aislamiento del gen llevó más de cuatro años de trabajo de un gran número de laboratorios, el esquema seguido fue:

1°. Hallar con marcadores genéticos la zona del ADN genómico dónde está el gen CFTR.

2°. Clonar fragmentos de ADN de esta zona.

3°. Hallar cuál de esos clones era homólogo con ADN de otras especies animales, ya que se suponía que el gen CFTR debía ser conservado entre especies.

4°. Hallar cuál de los clones individualizados en el punto anterior reconocía en un ensayo de hibridación algún fragmento de ADN de una biblioteca de ADN copia (cADN), dónde se suponía debería estar representado el CFTR.

5°. Con el clon de cADN hallado hacer "caminatas" en la misma biblioteca hasta tener un cADN completo.

6°. Probar que el cADN completo aislado corresponde a la CFTR. a) Buscando mutaciones, en individuos enfermos de FQ, mutaciones en este cADN y b) Transfectando con el cADN células provenientes de pacientes FQ y observando la normalización del fenotipo.

La resolución del problema comenzó en 1985 cuando fue identificado por primera vez un marcador de polimorfismo que se relaciona con la FQ, ubicado en el gen que codifica para la proteína sérica paraoxonasa (Eiberg *et al.*, 1985). Poco después se hallaron otros marcadores relacionados con la FQ, todos ellos localizados en el brazo largo del cromosoma 7 (Knowlton *et al.*, 1985, Tsui *et al.*, 1985, Wainwright *et al.*, 1985, White *et al.*, 1985). El siguiente paso fue la detección de dos marcadores, ubicados cada uno a un lado del gen CFTR y separados por aproximadamente 1500 kilobases, llamados MET y D7S8 (Beaudet *et al.*, 1986).

Los ulteriores progresos requirieron de una combinación de técnicas, a saber (descripción en Marx, 1989, Watson *et al.*, 1992):

A) Clonado a saturación de un gran número de marcadores de ADN de la región 7q31 (Kaiser *et al.*, 1987, Rommens *et al.*, 1988). Con ello se llegó a la identificación de otros dos marcadores adicionales correlacionados estrechamente a la FQ, llamados D7S122 y D7S340 respectivamente (Rommens *et al.*, 1988).

B) Clonado de fragmentos de ADN de un tamaño definido con el uso de electroforesis de campo pulsátil (Michiels *et al.*, 1987).

C) "Saltos" y "caminatas cromosomales" a partir de los marcadores laterales (Collins *et al.*, 1987).

D) Técnicas de clonado diseñadas para aislar fragmentos de ADN de islas de CpG hipometiladas. Las islas de CpG son regiones en las que la incidencia del dinucleótido 5' CG 3' es mucho más alta que en otras partes del genoma. Pueden ser hipometiladas, las que están frecuentemente asociadas con la región 5' no codificante de muchos genes eucarióticos conocidos e involucradas en la regulación de su expresión, o pueden ser hipermetiladas, perteneciendo en este caso a porciones silentes de ADN (Estivill *et al.*, 1987, Watson *et al.*, 1992).

El estudio genético y el mapeo indicaron que los marcadores seguían el orden MET-D7S340-D7S122-D7S8, con una separación entre ellos de 500.000, 10.000 y 980.000 pares de bases respectivamente (Rommens *et al.*, 1989b).

De allí se prosiguió con "saltos" y "caminatas cromosómicas", partiendo de distintos marcadores, llegando a cubrirse casi por completo con distintos fragmentos clonados una región de 280 kilobases, de la que se hizo un mapa de restricción (Rommens *et al.*, 1989a). El único sitio encontrado en esta región para Not I, que es una enzima de restricción cuya secuencia de reconocimiento es poco frecuente en el genoma humano, resultó ser el sitio ya descrito en el "locus" de la "int-1-related-protein" (IRP), según se probó con el mapeo hecho con electroforesis de campo pulsante (Wainwright *et al.*, 1988).

Los estudios genéticos subsiguientes demostraron que el gen CFTR estaba localizado entre el IRP y D7S8, por lo que la atención se centró sobre esta zona de ADN (Farrall *et al.*, 1988, Riordan *et al.*, 1989, Kerem *et al.*, 1989a, Rommens *et al.*, 1989a).

Era de esperar una cierta conservación de la secuencia entre especies. Se supuso entonces que el gen CFTR humano, o fragmentos de él, deberían reconocer en un experimento de hibridación a sus correspondientes homólogos de otras especies (Rommens *et al.*, 1989a). En base a ello, para encontrar cuál de los fragmentos clonados podría codificar para la proteína, se hizo un primer paso en el que se usaron como sonda los distintos clones en ensayos "southern blot", hibridando ADNs proveniente de bovino, ratón, hamster y pollo. Así se identificaron cinco fragmentos que podían pertenecer al gen CFTR, a otro ADN de la zona que también fuese conservado entre las especies ensayadas, o a un artefacto del experimento. Para descartar de estos fragmentos los que no perteneciesen al gen CFTR se trabajó como sigue:

Los tejidos de individuos normales que pueden ser afectados por la FQ deben tener expresión de la proteína y por ende sus transcritos. En una biblioteca de cADN de glándulas sudoríparas debían entonces hallarse clones con todo o partes del cADN de la CFTR.

Si alguno de los cinco fragmentos anteriores reconocía además en un ensayo de hibridación algún clon de esta biblioteca, era muy probable que ambos fuesen al menos parte del gen y el cADN de la CFTR respectivamente.

El estudio dio resultado negativo con cuatro de las sondas, con la quinta, que además poseía islas CpG, se hibridó un inserto de 920 pares de bases. Ello sugirió que esta sonda sería la región inicial del gen.

Se usó luego el cADN de 920 pares de bases como sonda para ensayos de "northern blot" sobre material proveniente de células T84, (células de carcinoma de colon, donde también se esperaba que hubiese expresión de la proteína, ya que provienen de un tejido que puede ser afectado por la FQ), tratando de hallar el transcripto completo. Allí se encontró un ARN mensajero de 6.500 bases (Riordan *et al.*, 1989).

El próximo paso consistió en usar el fragmento de 920 pares de bases para analizar una biblioteca de ADN copia de células T84 buscando aislar el ADN copia completo. Se hallaron distintos clones con regiones de superposición entre ellos, así se llegó a la dilucidación de una secuencia de ADN copia que codifica para una proteína que los indicios señalaban como la CFTR (Riordan *et al.*, 1989).

Las pruebas finales concluyentes de que el cADN hallado codifica para la proteína responsable de la enfermedad fueron:

a) Búsqueda y hallazgo de mutaciones que estuviesen presentes en enfermos pero no en ambos cromosomas de sujetos normales (Kerem *et al.*, 1989a, Riordan *et al.*, 1989). De estas mutaciones se tratará más adelante.

b) Restablecimiento, en células defectivas, del funcionamiento de los canales de cloruro cuando fueron transfectadas con este ADN copia (Drumm *et al.*, 1990, Rich *et al.*, 1990).

Con el ADN copia fue posible conocer la estructura del gen a través de hibridaciones seguidas de secuenciación de clones de ADN genómico (Rommens *et al.*, 1989a) (ver figura 1).

I.3.2. Los transcritos: El promotor del gen asemeja a promotores de genes que se expresan constitutivamente (Chou *et al.*, 1991). Sin embargo los transcritos son producidos en mayor cantidad en algunos tejidos. El ARN mensajero específico para la proteína CFTR fue detectado mediante "northern blot" en células T84, donde constituye aproximadamente el 0,01% del ARN mensajero total, en páncreas y en cultivos primarios de células de pólipos nasales. Una señal más débil pero visible fue detectada también en pulmón, colon, glándulas sudoríparas (específicamente en células epiteliales en cultivo), placenta, hígado y glándulas parótidas (Riordan *et al.*, 1989). No fue detectada transcripción, en ensayos de "northern blot" en: Cerebro, glándulas adrenales, fibroblastos de piel ni en líneas celulares de linfoblastos (Riordan *et al.*, 1989).

Se trató de detectar el ARN mensajero usando un método mucho más sensible que el "northern blot", como es la transcripción inversa seguida de la amplificación del cADN específico por PCR (Polimerase Chain Reaction) y posterior análisis por "southern blot". Se encontraron transcritos CFTR en casi todas las células de origen no epitelial estudiadas (fibroblastos de pulmón, leucocitos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, células K562 (eritroleucemia), etc.), aunque en una abundancia mucho menor que en los tejidos mencionados en los párrafos anteriores (Yoshimura *et al.*, 1991, Chu *et al.*, 1991b).

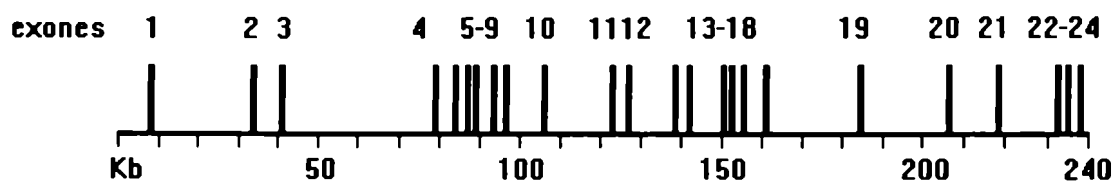
De aquí se ve que la CFTR se transcribe en una variedad de tejidos, pero especialmente en aquellos que son más afectados por la enfermedad, siguiendo un patrón de expresión tejido-epitelial específica. Por otra parte no se hallaron diferencias cuantitativas entre enfermos de FQ e individuos normales, demostrándose así que la enfermedad no depende de la cantidad de proteína expresada, sino de cambios en la secuencia aminoacídica de ésta.

I.3.3. La proteína: Para tratar de detectar la proteína se sintetizaron dos péptidos que abarcan: El primero los aminoácidos 724 al 746 (dentro de la región R) y el segundo los aminoácidos 415 al 427 (dentro del primer NBF). Los péptidos fueron utilizados separadamente para producir anticuerpos policlonales en conejos.

Usando estos anticuerpos para la búsqueda por inmunocitoquímica de la proteína CFTR se halló una proteína de aproximadamente 165 kilodaltons de peso molecular, peso que corresponde a la proteína CFTR glicosilada. Se vio con estos ensayos que la proteína CFTR es abundante en células epiteliales de conductos de glándulas sudoríparas, de pequeños conductos pancreáticos e intestinales y de túbulos renales; contrariamente a lo esperado la cantidad hallada fue baja en células epiteliales de pulmones.

La proteína se encuentra en la región apical de las células asociada con la membrana plasmática (Crawford *et al.*, 1991).

FIGURA 1



La figura muestra esquemáticamente la organización del gen CFTR. El gen ocupa una vasta zona de 250 Kilobases. Los exones están representados por líneas verticales, inicialmente fueron individualizados 24, luego se vio que sumaban 27, ya que tres de ellos eran en realidad dos exones cada uno próximos entre sí, a estos se los denominó 6a, 6b; 14a, 14b y 17a, 17b (Zielinski *et al.*, 1991a).

La escala inferior está en kilobases. Como puede verse algunos exones están cercanos entre sí, mientras que otros están separados por decenas de kilobases.

La proteína CFTR está constituida por dos motivos semejantes (ver **figura 2**) separados por una región citoplasmática reguladora (R) que comprende el exón 13 del gen. Cada uno de estos motivos está compuesto de seis dominios hidrofóbicos transmembrana, que abarcan los exones 3 a 7 y 14 a 18 del gen respectivamente, y un sitio hidrofílico de unión de nucleótido llamado A o NBF ("nucleotide binding fold"), que abarcan los exones 9 a 12 del gen para el NBF1 y 19 a 23 para el NBF2 respectivamente (Dorin *et al.*, 1991, Riordan *et al.*, 1989). Los dos motivos tienen una estructura simétrica pero la homología a nivel aminoacídico es pobre, puesto que la región más conservada que son los 66 aminoácidos del extremo carboxi-terminal de los NBF tiene sólo el 27% de homología más un 11% de aminoácidos funcionalmente similares (Riordan *et al.*, 1989).

No hay señal de secreción de modo que la región hidrofílica ubicada antes del primer dominio transmembrana probablemente está orientada hacia el citoplasma (Riordan *et al.*, 1989).

Muy poco de la proteína se ubica extracelularmente. La parte más expuesta es la región comprendida entre el séptimo y el octavo dominio transmembrana, región que además posee los dos únicos sitios potenciales de N glicosilación de la proteína (Dorin *et al.*, 1991, Riordan *et al.*, 1989).

I.3.3.A. Los NBFs: Poco se sabe sobre el modo en el cual los NBF actúan. Mutaciones en cada uno de los NBF alteran la relación entre la concentración de ATP y la actividad del canal, lo que prueba que el ATP regula el canal mediante la interacción directa con los NBF (Anderson *et al.*, 1991b y 1992).

Esto constituye una característica inusual de la proteína CFTR ya que al ser transportes pasivos ningún otro canal iónico conocido posee estructuras semejantes a los NBF ni necesita de ATP para abrirse (Anderson *et al.*, 1992, Quinton *et al.*, 1992).

Los resultados de un reciente experimento sugieren que el ATP regula la apertura del canal por un mecanismo no hidrolítico (contrariamente a lo visto por Anderson *et al.*, 1991b). Un descenso en los niveles de energía de las células no permite que el canal se abra, haciendo así que no sea necesario consumir ATP en el transporte de otros electrolitos. La evidencia sugiere que el ATP puede controlar su propio consumo a través de la modulación del canal de cloruro dependiente de la proteína CFTR (Quinton *et al.*, 1992).

Se sabe además que ambos NBF son algo distintos funcionalmente, ya que el ADP, usado como competidor no activo del ATP, logra interferir con la apertura del canal por parte del NBF2, pero no por parte del NBF1 (Anderson *et al.*, 1992).

I.3.3.B. La región R: La región citoplasmática R, altamente hidrofílica (69 de sus 241 aminoácidos son polares), posee la mayor parte de los potenciales sitios aceptores de fosfato para quinasas de proteína A y C (PKA y PKC), nueve para la PKA y siete para la PKC (Caton *et al.*, 1990 y 1991). En particular se sabe que "in vitro" se fosforilan por lo menos las serinas número 660, 686, 700, 737, 768, 795 y 813 por acción de la PKA y las serinas número 686 y 790 por la PKC (Picciotto *et al.*, 1992). Hay además pruebas de que cuatro serinas, los

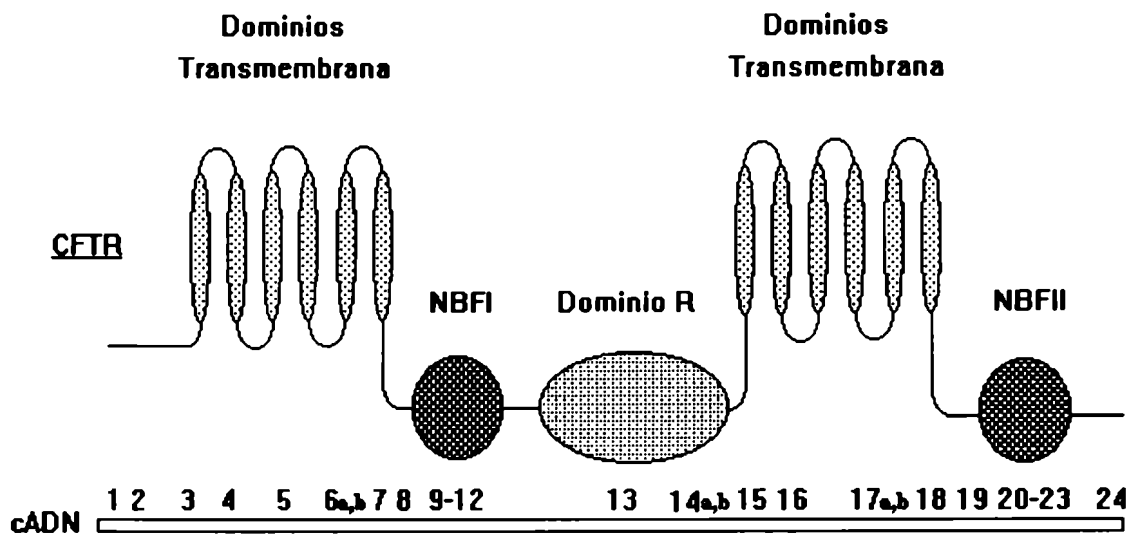


FIGURA 2

En la figura se ve esquemáticamente representada la proteína CFTR, puede apreciarse la distribución de las distintas regiones. Los dos grupos de seis dominios hidrofóbicos transmembranales se ubican a la altura de la membrana celular; los dos NBF y la zona regulatoria R se hallan en el citoplasma, así como las regiones N y C terminal.

La línea inferior representa el ADN copia, los números corresponden a los exones, que están ubicados en correspondencia con las regiones de la proteína para las que codifican.

residuos número 660, 737, 795 y 813, son fosforiladas "in vivo" por la PKA (Cheng *et al.*, 1991). Los sitios de fosforilación parecen ser redundantes ya que mutando individualmente cada uno de estos sitios la activación del canal de cloruro responde al AMP cíclico, pero mutando todos ellos desaparece la regulación y el canal permanece cerrado. Cuando se dejó sólo la serina número 660 en condiciones de ser fosforilada el canal fue regulado normalmente (Cheng *et al.*, 1991).

La delección parcial del dominio R resulta en un canal que es activo constitutivamente, sin necesidad de activación por la PKA (Rich *et al.*, 1991), lo que sugiere que la región R es normalmente inhibitoria del canal en su estado defosforilado. Además si se toma una proteína CFTR con mutación en el NBF2, que la hace incapaz de abrir el canal, y se la asocia a la ausencia parcial de la región R, el canal de cloruro resulta abierto constitutivamente. Ello sugiere que el NBF2 actúa a través de la región R. No así el NBF1, porque cuando se hace el mismo tipo de experimento usando un mutante en el NBF1 el canal permanece cerrado (Rich *et al.*, 1991).

Se hicieron pruebas de estímulo de la formación del canal en presencia de ATP con el agregado de PKA, PKC o ambas. La actividad del canal que se logra con la PKC sola es mucho menor a la que produce la PKA sola. Respondiendo a un mecanismo no muy claro se ve un efecto potenciador de la PKA cuando se agrega además PKC (Tabcharani *et al.*, 1991).

Las fosfatasas ejercen el efecto contrario, inhibiendo la apertura del canal dependiente de la proteína CFTR; aunque no se sabe cuál fosfatasa actúa en la regulación negativa "in vivo" (Tabcharani *et al.*, 1991).

La proteína CFTR comparte una considerable homología en su organización con un amplio grupo de más de 40 proteínas hasta hoy identificadas, dependientes de ATP, encargadas del transporte transmembrana de distintas moléculas en organismos tan diferentes como *E. Coli*, *Drosophila* y mamíferos. Este grupo constituye la superfamilia denominada ABC (por "ATP binding cassette") (Hyde *et al.*, 1990). El grupo está formado por: La hemolisina B de *E. Coli*, que está relacionada con el transporte de un péptido lítico (Hess *et al.*, 1986), el producto del gen White de la *drosophila*, que participa en el transporte de las moléculas de pigmento del ojo del insecto (O'Hare *et al.*, 1984), y otras proteínas (Riordan *et al.*, 1989, Krupinski *et al.*, 1989, Gros *et al.*, 1986, Ames *et al.*, 1990, Riordan *et al.*, 1991, Hyde *et al.*, 1990, Higgins *et al.*, 1986, Gerlach *et al.*, 1986). Todas ellas tienen en común la presencia de uno o dos dominios hidrofóbicos transmembrana, cada uno usualmente de seis subregiones que atraviesan la membrana y la existencia de uno o dos NBF que se pegan a ATP y lo hidrolizan para obtener la energía necesaria para el transporte (Hess *et al.*, 1986). Por otra parte la proteína CFTR posee una región reguladora R que no se halla en los otros miembros de la superfamilia.

A pesar de estas homologías recordemos nuevamente que la proteína CFTR no actúa transportando sino como canal, y que la interacción entre los NBFs y ATP podría no ser hidrolítica (Quinton *et al.*, 1992).

En resumen la proteína CFTR produce un canal de cloruro que es regulado por I) La interacción entre los NBF y ATP. II) La acción de la PKA, la PKC y fosfatasas sobre la región R.

Fosfatasas y falta de ATP bloquean el canal; ATP, PKA y PKC lo estimulan

Un posible modelo del modo de actuar de la proteína CFTR en función de los datos disponibles es:

Las regiones transmembranales forman físicamente el canal en la membrana celular. La región R actúa como "tapón" en su estado defosforilado. Cuando está fosforilada por las quinasas de proteína y los NBFs tienen suficiente ATP para actuar, la región R se desplaza permitiendo el paso de los iones cloruro (Rich *et al.*, 1991, Higgins *et al.*, 1991) (**ver figura 3**).

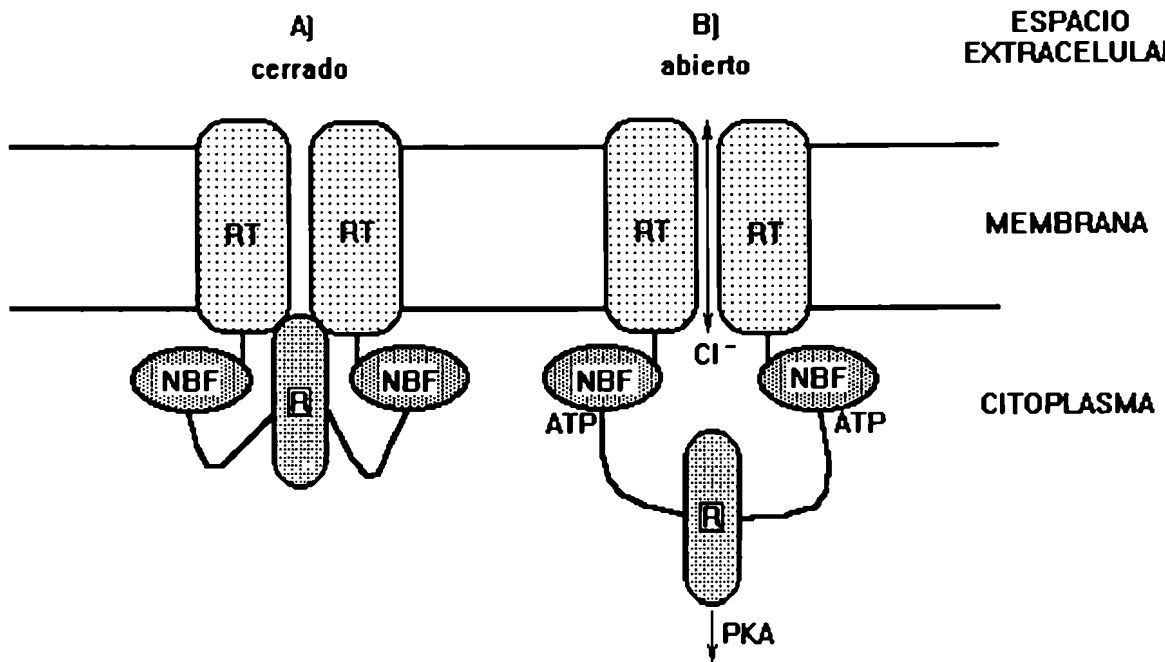


FIGURA 3

La figura muestra una posible interpretación del modo de funcionar de la proteína CFTR como canal de cloruro.

El canal está formado por las regiones transmembrana (RT). En la parte A) se ve el canal cerrado. La región R obstruye el paso de los iones. En la parte B) la activación de la proteína CFTR por ATP y quinasas de proteína, que actúan sobre los NBF y la región R respectivamente, produce el movimiento de la región R que deja entonces el canal abierto. En función de las concentraciones de cloruros a cada lado de la membrana éste pasará libremente en uno u otro sentido.

I.4. Las mutaciones

Antes de hablar sobre las mutaciones se debe mencionar al "Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium", que es una organización que abarca más de 90 laboratorios en el mundo, los cuales envían al Consorcio toda la información sobre el tema aún antes de su publicación, e incluso si no va a ser publicada. El Consorcio a su vez organiza, clasifica y envía periódicamente el total de la información a sus miembros, eventualmente también lo hace con algún laboratorio no asociado a solicitud de éste. Es evidente que el tener acceso a todos los datos en forma actualizada, completa y organizada, meses, o aun años antes del período normal para su conocimiento público, contribuyó en gran medida a la velocidad con la que los conocimientos sobre el gen y la enfermedad han progresado.

El "Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium" organiza también congresos sobre el tema.

Por todo esto desempeña un papel muy importante en la marcha de los estudios sobre la proteína y la enfermedad.

Las mutaciones hasta hoy descritas son más de 300, de ellas al menos 230 están probablemente asociadas con la enfermedad (Tsui, 1992). La más importante, en función de la abundancia, es una delección de tres timidinas dentro del exón 10 que lleva a la ausencia del aminoácido que ocupa la posición 508 en la proteína (fenilalanina). Por ello la mutación es conocida como $\Delta F508$.

Esa posición corresponde funcionalmente al primer NBF, y su efecto parece ser de bloqueo intracelular de la proteína CFTR, que no llega a madurar correctamente. Es procesada en el retículo endoplasmático donde ocurre una primera glicosilación de base, pero no llega a ser transportada y glicosilada extensivamente por el aparato de Golgi. La proteína CFTR mutada no logra por consiguiente instalarse en la membrana en cantidad suficiente. Su peso molecular, debido a la falta de glicosilación, queda en 140 kD en lugar de los 168kD de la proteína CFTR normal madura.

La proteína CFTR de 140 kD tiene además una cinética de activación más lenta que la normal (la apertura del canal en respuesta a los estímulos lleva un tiempo superior al normal). Aunque este último es un defecto menor que no traería consecuencias por sí solo (Cheng *et al.*, 1990, Dalemans *et al.*, 1991, Barbry, 1992, Wine, 1991, Denning *et al.*, 1992).

El defecto en el transporte y procesamiento por el aparato de Golgi parece corregirse a temperaturas bajas. Cuando el proceso se realiza a 27°C en lugar de los 37°C la proteína CFTR- Δ F508 se glicosila correctamente y logra ubicarse en la membrana celular, por lo que sería entonces una mutante termosensible como ha sido recientemente propuesto (Denning *et al.*, 1992).

La abundancia relativa de la Δ F508 en los cromosomas de pacientes de FQ en el mundo es de 67% (Tsui, 1992). Varía desde cerca del 90% en Dinamarca hasta el 22% de la población de judíos asquenazi en Jerusalén; en modo decreciente desde el noroeste de Europa hacia el sureste, incluyendo las regiones vecinas de Asia (Tsui, 1992).

La mayor parte de las demás mutaciones conocidas tienen una muy baja abundancia relativa. Solo 7 han sido halladas más de 100 veces entre los más de 30.000 cromosomas mutantes examinados en el mundo y 23 más de 10 veces. Mientras que de las otras, mucho más raras aún, algunas fueron halladas tan sólo en un paciente. De todos modos en un 15% de los casos aún no ha sido hallado el defecto genético responsable de la enfermedad (Tsui *et al.*, 1991, Riordan *et al.*, 1989, Tsui, 1992).

Aproximadamente la mitad de las mutaciones conocidas provoca la sustitución de un aminoácido. El otro 50% está representado más o menos equivalentemente por mutaciones de sitio de "splicing", inserción o deleción de un pequeño número de nucleótidos y mutaciones que generan codones de "stop". No han sido hasta el momento descritas mutaciones en el promotor (Tsui, 1992).

Claramente la distribución de las mutaciones a lo largo de la proteína es no casual, puesto que en el NBF1 se halla la mayor densidad, seguido del NBF2 (Cutting *et al.*, 1990, Collins, 1992a, Kerem *et al.*, 1990). Hay zonas donde no se han encontrado a la fecha mutaciones, por ejemplo los exones 6a, 16, 17a y 24 aunque no puede asegurarse que esto tenga algún significado funcional (Tsui, 1992).

Por otro lado aunque la regulación de la actividad como canal de cloruro depende de la fosforilación de la proteína (Cheng *et al.*, 1991), no han sido descritas mutaciones en los potenciales sitios de fosforilación que causen la enfermedad, probablemente debido a la redundancia de estos sitios en la proteína CFTR.

El cuadro de las mutaciones más comunes y su descripción ha sido tomado en Tsui, 1992, es el siguiente:

Nombre	Frecuencia	Descripción	Exón	Referencias
ΔF508	67,2%	Delección de 3 bases que quita una Phe	10	Kerem, 1989b
G542X	3,4%	G pasa a T en nt. 1756, da "STOP"	11	Kerem, 1990
G551D	2,4%	G pasa a A en nt. 1784, cambia aa.	11	Cutting, 1990
W1282X	2,1%	G pasa a A en nt. 3978, da "STOP"	20	Vidaud, 1990
3905insT	2,1%	Inserción de T en nt. 3905, saca de marco de lectura	20	Tsui, 1992
N1303K	1,8%	C pasa a G en nt. 4041, cambia aa.	21	Osborne, 1991
3849+10kbC	1,4%	C pasa a T en intrón cambiando "splicing"	19-20	Tsui, 1992
R553X	1,3%	C pasa a T en nt. 1789, da "STOP"	11	Cutting, 1990
621+1G-T	1,3%	G pasa a T en intrón entre exones 3 y 4, cambia "splicing"	3-4	Zielinski, 1991b
1717-1G-A	1,1%	G cambia a A en último nt. de exón 10, cambia "splicing"	10	Kerem, 1990
1078delT	1,1%	Delección de T en nt. 1078, cambia el marco de lectura	7	Clausters, 1992
2789+5G-A	1,1%	G pasa a A al 3' del intrón 14B, cambia el "splicing"	14-15	Tsui, 1992
3849+4A-G	1,0%	A pasa a G al 5' del intrón 19, cambia el "splicing"	18-19	Ronchetto, 1992
711+1G-T	0,9%	G pasa a T al 5' del intrón 5, cambia el "splicing"	5-6	Vidaud, 1990
R1162X	0,9%	C pasa a T en nt. 3616, da "STOP"	19	Gasparini, 1991

Las proteínas CFTR mutantes pueden dividirse en tres clases según el tipo de disfunción que producen:

Clase I es aquella en la que la proteína no llega a la membrana apical de las células por inconvenientes en su maduración (Cheng *et al.*, 1990). Es la clase más abundante y a ella pertenece la $\Delta F508$. Se ha demostrado que esta delección es funcional si se inserta en la membrana (Denning *et al.*, 1992, Bear *et al.*, 1992, Drumm *et al.*, 1991, Dalemans *et al.*, 1991, Barbry, 1992).

Clase II son las mutantes que aparentemente se procesan correctamente pero no logran abrir el canal de cloruro bajo estimulación de AMP cíclico. A esta clase pertenece la G551D (Cheng *et al.*, 1990).

Clase III son las mutantes en los dominios transmembranales que debieran producir canales de cloruro con las propiedades alteradas. Aún no han sido suficientemente caracterizados.

Otro punto a tratar es el por qué de la abundancia de la FQ.

Si se descuentan los pacientes $\Delta F508$ la cantidad de enfermos es similar al de otras enfermedades hereditarias. Existe la teoría no suficientemente probada, de que la $\Delta F508$ da, a quien la posee en heterocigosis, ventajas comparativas sobre los individuos normales. Por ejemplo en la resistencia a ciertas infecciones, como el cólera e infecciones virales (Barasch *et al.*, 1991), o en la mayor habilidad de sus fagocitos mononucleados para destruir microbios intracelulares (Regelmann *et al.*, 1991), con lo cual la selección natural habría actuado durante mucho tiempo a favor de esta variante.

I.5. Perspectivas terapéuticas

A pesar de haberse avanzado mucho en este terreno en los últimos años, es poco lo que terapéuticamente puede hacerse para aliviar la fibrosis quística.

La mayor sobrevida de los pacientes se basa en mejores sistemas de lucha contra: I) El fenotipo que presenta la enfermedad. II) Las infecciones secundarias que de éste derivan.

Tratando por ejemplo de fluidificar la acumulación de sustancias viscosas de las vías respiratorias utilizando, además de los sistemas tradicionales, amiloride o ADNasas para el primer caso (Collins, 1992a, Alton *et al.*, 1992), o usando antibióticos más potentes y selectivos para el segundo.

Se encuentran también en estudio otros sistemas como el uso de ATP o UTP para estimular la apertura de los canales de cloruro, método que dio buenos resultados "in vitro" con células epiteliales de vías respiratorias (Collins, 1992a).

Una lucha más focalizada contra la enfermedad, no sólo contra los síntomas, requiere de un mayor conocimiento del modo en que funcionan fisiológicamente la proteína CFTR normal y la mutada, y de sistemas imaginativos que permitan corregir las diferencias entre una y la otra. Por ejemplo, como ya se describió, está probado que la $\Delta F508$ es una proteína funcional pero termosensible, y que el problema está en su procesamiento en el aparato de Golgi (Cheng *et al.*, 1990, Denning *et al.*, 1992, Bear *et al.*, 1992, Drumm *et al.*, 1991, Dalemans *et al.*, 1991, Barbry, 1992). El tratamiento que

lograse evitar esta disfunción en la maduración curaría la enfermedad, por lo menos en aquellos pacientes homocigotas o heterocigotas para la $\Delta F508$, que son la mayoría.

La mayor parte del conocimiento que hoy tenemos se adquirió a partir del clonado del gen en 1989 (Riordan *et al.*, 1989, Kerem *et al.*, 1989a), y sólo en los últimos meses se lograron avances importantes en la interpretación de los hechos referentes a la proteína CFTR.

Un paso fundamental es el reciente establecimiento de líneas de ratón transgénicas en las que los genes normales CFTR fueron inactivados, colocándose entonces distintos genes CFTR mutados (Koller *et al.*, 1991, Snouwaert *et al.*, 1992, Clarke *et al.*, 1992, Wilson *et al.*, 1992, Collins *et al.*, 1992b). El acceso a modelos "in vivo" de la enfermedad agilizará en gran medida la investigación, aun teniendo presentes las diferencias con el modelo humano, ya que permite ensayos que no son posibles de realizar en éste. Adicionalmente los resultados y evolución en el tiempo se conocen en un período mucho más breve.

Otro modo de tratar la enfermedad es el reemplazo del gen defectuoso por uno normal, lo que encierra problemas formidables según cómo se lo haga. Existen por ahora dos caminos principales, uno es el trasplante de órganos. Siendo los pulmones los más críticamente afectados, su trasplante es una vía para mejorar los pacientes, aunque las dificultades vienen dadas porque: I) La cantidad de donantes es siempre inferior a la necesaria; II) Habitualmente el organismo del receptor está muy minado por la enfermedad (tanto que suele ser

necesario transplantar también el corazón; III) El hecho de que la FQ persistirá igualmente en los demás tejidos.

De todos modos, y aunque se han logrado progresos importantes en el tiempo y calidad de sobrevivencia de los pacientes operados, es claro que la gran mayoría de los enfermos no podrá seguir este tipo de tratamiento (Hodson, 1992, Heritier et al., 1992).

El segundo camino, sobre el que están depositadas las mayores esperanzas, es la terapia génica (Collins, 1992a).

Aunque existen sistemas para vehiculizar un gen correcto hacia las células enfermas en el organismo, como por ejemplo distintos tipos de virus ingenierizados, liposomas, complejos ADN-proteínas, etc., los problemas no resueltos son muy importantes, mencionemos entre otros (Davies, 1990):

- 1) Establecer en qué tejidos es realmente necesario intervenir.
- 2) Conocer la proporción de células en las que es necesario corregir el defecto para curar la enfermedad en cada tejido.
- 3) Manejar la proporción de células que recibirán efectivamente el gen.
- 4) Evitar que el gen llegue también a tejidos donde no se desea su establecimiento.
- 5) Evitar la propagación no deseada en el ambiente de virus recombinantes con capacidad de infectar, o de material genético proveniente del tratamiento en células germinales de los pacientes tratados.
- 6) La aparición en los pacientes de respuesta inmunitaria al tratamiento.
- 7) Tener control de la expresión de la proteína (¿Cuánto, cuándo, dónde se produce?).

- 8) Conocer la peligrosidad o no de una expresión excesiva.
- 9) Gobernar la estabilidad de la expresión en el tiempo.
- 10) Tener el control de la posición en la que el gen se insertará, ya que puede influir sobre la expresión de otras proteínas, en una gama que va desde la interrupción total hasta el exceso de producción, con consecuencias difícilmente cuantificables "a priori".

Se está trabajando activamente sobre estos ítems (Marx, 1992, Alton *et al.*, 1992).

Se han hecho hasta ahora pruebas exitosas "in vitro" de la eficiencia de retrovirus para vehiculizar el gen CFTR al interior de células (Drumm *et al.*, 1990, Engelhardt *et al.*, 1992). Se hicieron también pruebas "in vivo" con buenos resultados preliminares, controlando la función de distintos virus como vectores para las células epiteliales de las vías respiratorias (Mastrangeli *et al.*, 1993), y para hacer llegar el gen CFTR a las células epiteliales de las vías respiratorias en ratas. Detectándose que la proteína CFTR se produce todavía 14 días después de iniciado el experimento (Rosenfeld *et al.*, 1992).

De todos modos y aunque los resultados son aún muy preliminares pensando en su aplicación práctica en humanos, han sido pedidas autorizaciones para dos ensayos sobre grupos de pacientes en los EEUU., y existe ya la primera aprobación por parte del NIH, faltando sólo la aprobación de la FDA para iniciar estas pruebas (Thompson, 1992).

Al estado actual de la ciencia las soluciones prácticas para todas estas dificultades, con vistas al uso terapéutico rutinario en humanos enfermos de FQ, sólo parecen posibles en el largo plazo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1.1 Marcas de los materiales

Los reactivos fueron adquiridos a Sigma y/o Boehringer Mannheim, en función de la disponibilidad, a menos que se especifique lo contrario

II.1.2. Extracción de ADN genómico de leucocitos

Para preparar el ADN genómico de leucocitos se parte de sangre entera con anticoagulante (EDTA), los pasos a seguir son:

Extraer 5 ml de sangre. Llevar a 10 mM en EDTA pH 8 y colocar en un tubo de polipropileno de 50 ml. Agregar 45 ml de buffer de lisis a 4°C, mezclar suavemente y dejar en hielo durante 10 minutos. Centrifugar a 1000 g a 4°C por 10'. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado resultante 3 veces con buffer fisiológico, después de cada lavado centrifugar a 1000g y 4°C por 10' y descartar el sobrenadante. Resuspender bien en 3 ml de buffer A a temperatura ambiente, agregar 200 µl de SDS 10% y 500 µl de solución de proteasa K, incubar a 37°C durante toda la noche.

Agregar 1 ml de una solución saturada (6 M) de NaCl y agitar vigorosamente por 15", (las proteínas precipitan), centrifugar 15' a 1000g y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de polipropileno de 15 ml, haciéndolo

pasar a través de gasa estéril. Repetir el proceso de centrifugación y filtrado a través de gasa.

Agregar un volumen de isopropanol a temperatura ambiente, mezclar suavemente, el ADN genómico aparecerá como un fino ovillo de hilo. Tomarlo con una pipeta pasteur de vidrio a la que se ha hecho una punta a forma de gancho y sumergirlo durante 30" en etanol 70%. Retirar entonces la pipeta pasteur con el ADN y dejar secar durante 5' a temperatura ambiente, disolver el ADN en 500 μ l de TE y conservar a 4°C.

Medir la absorbancia de 1 μ l de la solución de ADN en 1 ml de agua, a 260 nm para establecer la concentración, y a 280 nm para, comparando con el valor obtenido a 260 nm conocer la pureza del preparado. La relación A_{260}/A_{280} debe ser mayor de 1,5 para considerar al ADN obtenido suficientemente puro.

Una unidad de absorbancia equivale a aproximadamente 50 μ g de ADN/ μ l de solución original.

SOLUCIONES:

Buffer de lisis: 0,32 M en sacarosa
10 mM Tris-HCl pH 7,5
5 mM MgCl₂
1% Tritón X-100

Buffer fisiológico: 0,075 M NaCl
0,025 M EDTA pH 8
Autoclavar y conservar a 4°C

Buffer A: 10 mM Tris-HCl pH 8
400 mM NaCl
2 mM EDTA pH 8
Autoclavar y conservar a 4°C

Solución de proteasa K: 1 mg/ml de proteasa K
1% SDS
2 mM EDTA ph 8

II.1.3 Amplificación por PCR

ADNs de distintas fuentes pueden ser amplificados por PCR, para obtener de ellos gran cantidad de un fragmento específico para su posterior estudio y/o clonado. La cantidad de muestra depende del origen del material a estudiar, pero el resto de las condiciones es prácticamente igual para todos los casos. El protocolo es:

Colocar en un tubo tipo eppendorf de 500 μ l y en el orden dado los siguientes materiales:

1) La cantidad de agua necesaria para llevar el volumen de reacción a 100 μ l finales.

- 2) Veinte μl de Buffer de Taq ADN Polimerasa 5X
- 3) Ocho μl de una solución 2,5 M en cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).
- 4) Cuatro μl de una solución 20 μM del primer "primer" a usar.
- 5) Cuatro μl de una solución 20 μM del segundo "primer" a usar.
- 6) Quinientos ng de ADN genómico o 1/20 del total de la reacción de preparación de ADN copia o 1 μl de la dilución de material proveniente del tratamiento de la sangre o de las vellosidades coriónicas para uso directo en PCR, según sea la fuente de ADN a amplificar.

Colocar a 97°C por 5' y pasar rápidamente a hielo para evitar la renaturalización. Dejar 5' en hielo y centrifugar por 10" a 4°C para recoger la condensación producida. Manteniendo el tubo en hielo agregar 2,5 unidades de Taq ADN Polimerasa, mezclar y agregar 100 μl de aceite mineral. Mantener siempre en hielo hasta que la máquina en que se realizarán los ciclos de temperatura haya llegado a los 80°C en su primer ciclo de desnaturalización, solo entonces colocar los tubos en la máquina, esto se hace para evitar renaturalizaciones inespecíficas.

La enzima usada fue adquirida a Perkin Elmer-Cetus.

Se deben hacer siempre: I) Una reacción de control positivo, usando un ADN previamente amplificado con éxito en caso de tenerlo, y II) Una de control negativo en la que en lugar de la muestra se agregará agua, para estar seguro de que el producto de la reacción depende de las muestras usadas y no de contaminaciones presentes en los reactivos, muy posibles dada la altísima sensibilidad de esta técnica (Saiki, 1989, Innis *et al.*, 1990).

SOLUCIONES:

Buffer para Taq ADN polimerasa 5X: 335 mM Tris-HCl pH 8,8
100mM β -Mercaptoetanol
7,5 mM MgCl₂
0,5 mg/ml Albúmina
83 mM (NH₄)₂SO₄
35 mM EDTA pH 8,8

NÚMERO DE CICLOS, TIEMPOS Y TEMPERATURAS A USAR

Hacer 30 ciclos a menos que el material de partida sea ADN copia en cuyo caso hacer 35 ciclos. Cada ciclo consiste en tres etapas, una primera de desnaturalización que se lleva a cabo a 93°C por 45"-1', la segunda de apareamiento de las cadenas de ADN que se realiza a 58°C por 45"-1' y la tercera de polimerización que se hace a 72°C y se prolonga por un tiempo de un minuto por cada 1000 pares de bases que tenga el producto a amplificar. Estas condiciones se usaron en todos los casos para este trabajo de tesis, es de hacer notar que los tiempos y temperaturas dependen de los sistemas donde se aplicarán. El aparato usado fue un "Thermal Cycler 480" de Perkin-Elmer.

II.1.4. Análisis de los fragmentos de ADN por gel de agarosa

Los geles de agarosa tienen la capacidad de separar fragmentos de ADN en base a sus tamaños. Por eso se corre un 5-10% del producto de la PCR para conocer aproximadamente la cantidad de bases que tiene el material obtenido. Se usan además para conocer las medidas de ADN de distintas fuentes.

Los geles se prepararon de la siguiente manera (Sambrook *et al.*, 1989):

Preparar una solución que puede ser, según el ADN a estudiar, de entre el 0,8% y el 1,5% de agarosa en TBE 1X, disolver la agarosa por calentamiento. Dejar enfriar a menos de 55°C y agregar bromuro de etidio para llegar a una concentración final de 1 µg/ml.

Verter sobre el recipiente horizontal a usar y dejar solidificar. Una vez solidificada la agarosa agregar TBE 1X en cantidad suficiente para cubrir el gel.

Cargar la muestra resuspendida en buffer de carga 1X y correr, usando además un control con bandas de peso molecular conocido, a 10 V/cm.

SOLUCIONES:

TBE 10X: 108 gramos de Tris
55 gramos de Ácido Bórico
9,3 gramos de EDTA
Llevar a un litro con agua.

Buffer de carga 6X: 0,25% Azul de bromofenol
30% Glicerol

Bromuro de Etidio: Solución 10 mg/ml en agua

II.1.4. Análisis de la mutación $\Delta F508$ por gel de acrilamida

El sistema óptimo para individualizar la presencia de la mutación $\Delta F508$, resultó ser el estudio del material amplificado por PCR en geles de acrilamida 8% no desnaturizantes, que se preparan y corren como sigue (Sambrook *et al.*, 1989):

Preparar un gel de 22 cm. x 15 cm. de un espesor de 0,5 mm.. Llenar con acrilamida y N,N' bis-metilen-acrilamida 8% (en proporción 19,2:0,8) sin urea, en tampón TBE 1X, donde por cada 10 ml de material a gelificar se agregaron 100 μ l de persulfato de amonio 10% y 10 μ l de TEMED (N,N,N',N' tetrametil-etilen-diamina). Verter en el molde preparado con vidrios y separadores y dejar polimerizar por al menos una hora.

Se arma el aparato para la corrida usando como tampón TBE 1X.

Una parte del material resultante de la amplificación, variable entre el 10% y el 50% del total, (en función de la eficiencia con la que funcionó la PCR, dato éste que fue previamente testado cargando el 10% del producto en un gel de agarosa 1,5%), se resuspende en buffer de carga idéntico al usado para geles de agarosa y se corre a 30 mA hasta que el azul de bromofenol llegue

a mitad del gel. A este punto se saca el gel y se pone durante 10' en una solución de bromuro de etidio 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, luego se observa y fotografía bajo luz ultravioleta. La existencia de la mutación se conoce por comparación de las muestras incógnita con otras muestras testigo con y sin mutación, que se cargan en el mismo gel.

II.1.6. Pretratamiento de sangre para uso directo en PCR.

Alternativamente al uso de ADN genómico, es posible amplificar por PCR usando directamente sangre con un breve tratamiento previo.

La reacción de amplificación es algo menos eficiente, pero los resultados son más que suficientes para algunos usos, como por ejemplo el estudio de la mutación ΔF508 en la población. El material se trata como sigue:

Colocar 200 μl de sangre en 10 mM EDTA pH 8 dentro de un tubo tipo eppendorf de 500 μl , hervirlos durante 10'. Centrifugar por 10' a 14000 RPM en microcentrifuga, tomar el sobrenadante con gran atención de no llevar también partículas sólidas, es mejor perder sobrenadante pero tomarlo limpio. Repetir la centrifugación y toma de sobrenadante, diluir el líquido obtenido 1/10 y usar 1 μl de la dilución para amplificar (Kogan *et al.*, 1990).

Es necesario hacer en paralelo un proceso igual partiendo de 200 μl de agua en lugar de sangre, para usar 1 μl del producto como control negativo de la posterior amplificación por PCR.

II.1.7. Tratamiento de vellosidades coriónicas para su estudio por PCR

Para producir un diagnóstico prenatal de fallas en el material genético, es posible estudiar éste a partir de la extracción de una pequeñísima cantidad de vellosidades coriónicas extraídas de la madre, ya que poseen la estructura genética del feto, y contamos con medios sumamente poderosos, como la amplificación por PCR para su estudio.

Para hacer un análisis es necesario obtener una muestra, que puede ser tan pequeña como 0,5 mm³ y tratar este material como sigue:

Lavar las vellosidades coriónicas extraídas dos veces con STE en tubo tipo eppendorf. Agregar 20 μ l de solución A y agitar con energía. Ayudar a la ruptura de las células aspirando y dejando caer varias veces con micropipeta.

Hervir durante 2', centrifugar por 10' a 14000 RPM en microcentrifuga. Tomar el sobrenadante y diluir 10 veces en agua, tomar 1 μ l de esta dilución para amplificar (Kogan *et al.*, 1990). Es necesario hacer en paralelo un proceso exactamente igual, donde no se colocarán vellosidades coriónicas, para usar 1 μ l del producto como control negativo de la posterior amplificación por PCR.

SOLUCIONES:

Solución A: 0,1 M NaOH
2 M NaCl
0,5% SDS

STE: 0,1 M NaCl
 10 mM Tris-HCl pH 8
 1 mM EDTA pH 8

II.1.8. Extracción de ARN total de leucocitos

La facilidad del manejo y disponibilidad de la sangre en comparación con otros tejidos, hacen que cuando es posible sea el material de elección para realizar sobre ella los estudios que se desean hacer.

Por ejemplo el análisis de la transcripción de algún gen que pueda producirse en estas células. Para ello se debe purificar ARN total de leucocitos. El sistema consiste en:

Extraer 10 ml de sangre en una jeringa con 200 μ l de EDTA 0,1 M de pH 8 como anticoagulante. Separar de este material los leucocitos como sigue:

Colocar en un tubo de 15 ml la sangre y 2 ml de dextrano T 500 (Pharmacia) al 4,5% en solución de NaCl 0,9%. Agitar y dejar reposar durante 45 minutos. Recoger el sobrenadante y centrifugarlo a 250 g por 7'. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado de células en 3 ml de solución hipotónica, agitar 30" y agregar 7 ml de solución hipertónica. Agitar y centrifugar nuevamente a 250 g por 7'. Enjuagar las células con 5 ml de PBS y luego resuspenderlas en 1 ml de PBS (Segal *et al.*, 1980).

A este punto se encuentran resuspendidos leucocitos lo suficientemente limpios como para preparar ARN como sigue:

Sobre el ml de suspensión agregar 1 ml de solución D y mezclar bien, agregar entonces secuencialmente (Stallcup *et al.*, 1983):

- 1) 0,1 ml de acetato de sodio 2M, pH 4.
- 2) 1 ml de fenol saturado en agua.
- 3) 0,2 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1).

Mezclar bien luego del agregado de cada reactivo, después de una última vigorosa mezcla por 10 segundos, dejar 15' en hielo, centrifugar a 10.000g durante 20' a 4°C. El ADN y las proteínas estarán presentes en la interfase, mientras que el ARN estará en la fase acuosa que se transfiere a un nuevo tubo. Agregar un volumen de alcohol isopropílico y dejar durante al menos una hora a una temperatura de -20°C para precipitar el ARN. Centrifugar a 10000g por 20', descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado obtenido en 0,3 ml de solución D. Transferir a un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml y repetir la precipitación con un volumen de alcohol isopropílico, (una hora a -20°C, centrifugación por 10' en microcentrifuga a 14000 RPM y descartar del sobrenadante). Resuspender en 20 μ l de etanol 75%, secar al vacío y disolver en 50 μ l de agua, en caso de necesidad disolver a 65 °C durante 10' (Sambrook *et al.*, 1989).

Medir la absorbancia a 260 nm de 1 μ l de la solución de ARN obtenido en 1 ml de agua, 1 densidad óptica equivale a 40 μ g de ARN/ μ l de muestra original. Conservar a -80°C.

II.1.9. Preparación de ADN copia de cadena simple

A partir del ARN total sintetizado de leucocitos o células se prepara ADN copia para su posterior amplificación por PCR, el método consiste en (Sambrook *et al.*, 1989):

Tomar 1 μg de ARN total en un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml, agregar agua para llevarlo a 14 μl y calentar durante 3' a 82°C para eliminar la estructura secundaria del ARN. Pasar a hielo por 2'.

Agregar entonces secuencialmente:

- 1) 1 μl (equivalente a 1 unidad) de "RNase Block II" (Stratagene).
- 2) 8 μl de una solución 5 mM en cada uno de los deoxinucleótidos trifosfato, (la concentración final debe ser 1 mM en cada uno de ellos).
- 3) 8 μl de tampón para transcriptasa inversa concentrado 5 veces ("5X RT buffer").
- 4) 100 ng de "primer" específico (de 20 bases de longitud), en caso de querer sintetizar cADN específico, o 500 ng de primer poliT (de 17 bases de largo), en caso de querer preparar cADN total.
- 5) 10 unidades (correspondientes a aproximadamente 1 μl) de Transcriptasa inversa M-MuLV RT ("Moloney-Murine Leukemia Virus") (Stratagene).

Incubar durante 45' a 37°C, conservar a -20°C.

Usar 1/20 del producto para amplificar.

SOLUCIONES:

5X RT Buffer: 250 mM Tris-HCl pH 8,2
350 mM KCl
50 mM MgCl₂
10 mM DTT

II.1.10. PCR anidada

A pesar de ser la amplificación por PCR un método extremadamente potente para obtener gran cantidad de algún fragmento específico de ADN, en ocasiones el material deseado es muy poco abundante al iniciar el proceso. Es entonces necesario realizar una segunda ronda de amplificaciones sobre una alícuota del producto de la primera ronda (se trabaja con el 1% de éste), utilizando esta vez "primers" distintos a los usados en la primera reacción. La secuencia de estos "primers" debe estar ubicada dentro del producto amplificado en la primera reacción. Pueden ser diferentes sólo uno (semianidada), o ambos oligonucleótidos (anidada).

Las condiciones de la reacción por lo demás son idénticas a las usadas para la amplificación normal, incluyendo los controles mencionados. En el caso del control negativo se usará el 1% del producto de la primera ronda de reacción en la que se agregó agua en lugar de ADN, como material de partida para la segunda ronda.

II.1.11. Secuenciación directa del producto de la reacción de amplificación por PCR

Se puede secuenciar sin clonado el producto de una amplificación por PCR, aunque es necesario separarlo de los subproductos indeseados y de los oligonucleótidos remanentes luego de la reacción. Para ello se debe purificar en un *gel de agarosa* el fragmento de ADN a secuenciar.

Es necesario usar al menos 200 ng del material puro y 100 ng de primer específico (de una solución 50 ng/ μ l).

Seguir luego el protocolo normal de reacciones de secuenciación para la ADN Polimerasa de fago T7 "Pharmacia" descrito luego.

II.1.12. Secuenciación de ADN

Para determinar la secuencia de fragmentos de ADN clonados en un plásmido, o provenientes de una reacción de amplificación, se utilizó un equipo de Pharmacia que trabaja por el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1975). El método consiste esquemáticamente en copiar el ADN a secuenciar utilizando una ADN polimerasa y, mezclados en cierta proporción con los deoxinucleótidos, dideoxinucleótidos que interrumpen la reacción cuando son incorporados. Usando selectivamente cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos en distintas reacciones se obtendrán ADN interrumpidos en las posiciones ocupadas por sólo

un tipo de base en cada una. Corriendo en geles de acrilamida es posible conocer la secuencia del ADN.

El equipo ("T7 Sequencing Kit"), tiene todos los reactivos necesarios identificados sólo como "buffer" o "mix", de modo que no es posible dar la composición de cada solución usada. El proceso a seguir es:

Agregar en un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml, 10 μ l del ADN a secuenciar (1,5-2 μ g), 2 μ l de "primer" y 2 μ l de "annealing buffer", mezclar bien y dejar a 37°C por 20'.

Se prepara en otro tubo una solución con 1 μ l de agua, 3 μ l de "labelling mix", 1,5 μ l de "Enzyme dilution buffer", 0,5 μ l de T7 ADN Polimerasa y 1 μ l de dATP o dCTP marcados con "P" o "S". Agregar 6 μ l de esta mezcla al tubo anterior una vez que éste cumplió con los 20' de incubación y llegó a temperatura ambiente. Mezclar bien y dejar 5'.

Pasar alícuotas de 4,5 μ l a cada uno de cuatro tubos que contienen 2,5 μ l de "Mix" A, C, G y T respectivamente, mezclar bien y dejar 5' a 37°C.

Agregar 5 μ l de solución de "stop", mezclar, desnaturalizar por 2' a 80°C y cargar 1 μ l de cada tubo de reacción en "calles" adyacentes de un gel desnaturalizante de acrilamida 8% para secuenciación.

II.1.13. Geles para secuenciación

Es necesario correr los productos de las reacciones de secuenciación en geles de acrilamida desnaturalizantes. Estos permiten una buena separación entre

fragmentos de ADN que difieren entre sí solamente por una base. Ello se hace como sigue (Sambrook *et al.*, 1989):

Preparar un gel de 40 cm. x 20 cm. de un espesor de 0,4 mm., y rellenarlo con una solución de acrilamida-N,N' bis-metilen-acrilamida 8% (en proporción 19,2:0,8) que contiene 7 M de urea, en tampón TBE 1X. Agregar por cada 10 ml de material a gelificar, 100 μ l de persulfato de amonio 10% y 10 μ l de TEMED (N,N,N',N' tetrametil-etilen-diamina). Luego se vierte en el molde preparado con vidrios y separadores, se coloca un peine que forme pozos de 3 mm de ancho para cargar, y se deja polimerizar por al menos una hora.

Armar el aparato para la corrida usando como buffer TBE 1X y colocando sobre los vidrios una placa de aluminio de al menos 4 mm de espesor para disipar uniformemente el calor y lograr así una corrida sin distorsiones.

Correr a 60 Watts constantes, lo que en función de la temperatura alcanzada significan entre 25 y 30 miliampéres y de 1400 a 1900 Volts.

II.1.14. Cultivo de células

Para estudiar los ARN mensajeros de la CFTR y las proteínas de éstos derivados se crecieron distintos tipos de líneas.

Las células T84 (ATCC CCL248) y CaCo2 (ATCC HTB37), ambas de carcinoma de colon y conocidas por expresar gran cantidad de la proteína fueron descongeladas y crecidas como sigue.

DESCONGELADO

Todos los pasos en los que las células se hallan expuestas al ambiente se deben realizar en un flujo laminar de seguridad.

Tomar un tubo que contiene aproximadamente 2×10^6 células en dimetilsulfóxido (15%) y suero fetal bovino (85%), conservado en nitrógeno líquido. Llevarlo velozmente a un baño de agua a 37°C moviéndolo para fundir el contenido en el menor lapso posible. Pasar rápidamente, una vez líquida la suspensión, a un tubo de 15 ml que contenga 10 ml de MEM suplementado con 5% de suero fetal bovino y centrifugar durante 3' a 800 g en una centrífuga de mesa. Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 2ml de MEM suplementado con 5% de suero fetal bovino, pasarlo entonces a una caja de Petri de 90mm de diámetro con medio de cultivo.

PROPAGACIÓN Y PASAJE DE LAS CÉLULAS

Las células se mantienen en MEM suplementado con 5% de suero fetal bovino, en presencia de glutamina 2mM y $50 \mu\text{g/ml}$ de gentamicina, en un incubador de 37° , en ambiente con 5% de CO_2 .

Al llegar a confluencia se diluyen las células del siguiente modo:

Aspirar el medio de cultivo y enjuagar dos veces con 10 ml de PBS, una vez aspirado el último agregado de PBS agregar 1 ml de solución de tripsina. Mover la placa inclinada de modo que la tripsina llegue a todas las células, observar en microscopio invertido hasta que las células se ven casi todas

circulares. Poner 5 ml de medio de cultivo y, aspirando y agregando el líquido con una pipeta de 10 ml, despegar las células del fondo de la caja de Petri. Pasarlas a un tubo de 15 ml y centrifugar a 800 g durante 3', descartar el sobrenadante y resuspender las células en 4 ml de medio. Agregar 1 ml de esta suspensión a una nueva caja de Petri, llevar a 10 ml con medio de cultivo y colocar en incubador.

El suero fetal bovino, el medio MEM, la glutamina, la gentamicina y la tripsina usados fueron marca GIBCO-BRL.

SOLUCIONES:

PBS: 8 g de NaCl
0,2 g de KCl
1,44 g de Na₂HPO₄
0,24 g de KH₂PO₄
Disolver en 800 ml de agua
Llevar a pH 7,4 con HCL
Llevar a 1 l con agua

Tripsina: 0,25% Tripsina
0,02% EDTA
solución en PBS

II.1.15. Preparación de ARN total de células

Se prepara ARN total para aislar y estudiar el ARN mensajero específico de la CFTR, a partir de las células en confluencia crecidas en una caja de Petri de 90 mm de diámetro. Para ello (Sambrook *et al.*, 1989):

Descartar el medio de cultivo y lavar las células una vez con 10 ml de PBS, descartar el PBS y agregar 2ml de solución D. Mover la caja de Petri inclinándola de modo que la solución D llegue bien a toda la superficie. Se produce entonces el lisado de las células. Recolectar en un tubo de polipropileno de 15 ml el líquido viscoso así obtenido.

Repetir la operación con otros 2 ml de solución D y proseguir como en la preparación de ARN de leucocitos, teniendo presente que las proporciones de las soluciones a usar debe ser cuatro veces mayor en este caso ya que el volumen inicial lo es.

Medir la absorbancia a 260 nm de 1 μ l de la solución de ARN en 1 ml de agua, 1 densidad óptica equivale a 40 μ g de ARN/ μ l. Conservar a -80°C.

SOLUCIONES:

Solución D: 4 M Tiocianato de guanidinio
25 mM Citrato de sodio pH 7
0,5% Sarcosil
0,1 M β Mercaptoetanol

II.1.16. Análisis del ADN por enzimas de restricción.

Cortando el ADN con enzimas de restricción podemos identificar, en función del tamaño de los fragmentos resultantes, si el ADN que tenemos es el que buscamos. Podemos también preparar los extremos de fragmentos y vectores para su posterior ligación.

El proceso consiste en (Sambrook *et al.*, 1989): Digerir entre 100 y 500 nanogramos de ADN con 1 unidad de la o las enzimas de restricción a usar en el buffer recomendado y provisto por los productores de las enzimas, en un volumen final de 15 μ l, a las temperaturas adecuadas, (en la mayor parte de los casos 37°C), y durante un mínimo de 30 minutos. Agregar luego 3 μ l de buffer de carga 6X y correr en gel de agarosa 0,8%.

Las enzimas de restricción usadas fueron de Boehringer Mannheim y New England Biolabs, en los catálogos de productos de ambas se pueden encontrar tablas con las temperaturas y buffers óptimos para cada enzima.

SOLUCIONES:

Buffer de carga 6X: 0,25% Azul de bromofenol

30% Glicerol

II.1.17. Marcado de sondas

La finalidad de la sonda en un estudio "Southern Blot" es reconocer fragmentos de ADN que tienen algún grado de homología con ésta, para ello debe ser marcada por algún método, nosotros usamos el marcado radiactivo.

Los protocolos a seguir son distintos según si el ADN a usar es un oligonucleótido o un fragmento de simple o doble hélice de un tamaño mayor o igual a 60 bases. Consisten en:

MARCADO DE FRAGMENTOS DE ADN DE MÁS DE 60 PARES DE BASES

Se utilizó el equipo de marcado de Pharmacia "T7 Labelling Kit" y se siguieron sus instrucciones. El método consiste básicamente en desnaturalizar el ADN. Dejar aparear a éste los "primers" al azar y copiar entonces usando una ADN polimerasa en una solución que incluye todos los deoxinucleótido-trifosfatos, con uno de ellos marcado con ^{32}P en la posición α . Al ser éste incorporado al ADN lo hará radiactivo. Para ello se debe:

Desnaturalizar 25 ng de ADN hirviendo durante 2', luego pasarlo a hielo y agregar un buffer ya preparado que contiene una mezcla de oligonucleótidos de 6 bases de largo que trabajaran como "primers" al azar, además de los distintos desoxinucleotidotrifosfatos, con menor cantidad de dCTP, en una solución adecuada. Agregar luego 5 μl de (α - ^{32}P)dCTP de 10 mCi/ml y

finalmente 1 μ l de T7 ADN polimerasa. Incubar por 15' a temperatura ambiente y usar esta mezcla para hibridar.

MARCADO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos no poseen al ser sintetizados el P 5' terminal, tienen en cambio un OH. Pueden ser fácilmente marcados con ^{32}P usando una pequeña cantidad (10 picomoles) de oligonucleótido en una reacción de quinasa.

Para ello se colocan en un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml, el oligonucleótido, 2 μ l de buffer de quinasa 10X, 5 μ l de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP de 10 mCi/ml, agua hasta un volumen de 19 μ l y 8 unidades de T4 polinucleótido quinasa. Mezclar bien e incubar 45' a 37°C, se puede usar esta solución para hibridar, incluso sin purificar el oligonucleótido marcado (Sambrook *et al.*, 1989).

SOLUCIONES:

10X Buffer de quinasa:	200 mM Tris-HCl pH 8,3
	50 mM MgCl_2
	50 mM Ditioneitol
	500 $\mu\text{g/ml}$ de albúmina bovina

II.1.18. "Southern blot"

El ensayo "southern blot" se usó para individualizar la presencia de secuencias de ADN específicas para la CFTR en productos de PCR y en ADN de fago λ , según el siguiente esquema (Sambrook *et al.*, 1989):

Para material proveniente de la PCR cargar 5-10 μ l del producto en un gel de agarosa 1%. Para ADN de fago λ cortar con varias enzimas de restricción, con cada una en tubos separados, 500 ng de ADN y cargar cada producto en una "calle" de un gel de agarosa 0,8%. Se deben también cargar en distintas calles un control positivo, que contenga un ADN reconocible por la sonda a usar y uno negativo, con ADN extraño a la sonda, en caso de ser posible contar con ellos. El gel se corre y se observa y fotografía bajo luz UV, colocando una regla a su lado para usar como referencia.

Desnaturalizar el ADN colocando el gel por 20' en NaOH 0,5 M y luego neutralizar durante 30 minutos en solución 1. Transferir con 20X SSC durante una noche sobre papel de nitrocelulosa (Millipore) al que se hicieron marcas en los lugares correspondientes a los pozos del gel de agarosa y en una de sus esquinas para poder orientarlo con la radiografía al final del trabajo.

Desnaturalizar el ADN poniendo el filtro bajo luz ultravioleta en un aparato UV Stratalinker de Stratagene. Se preincuba durante 30' a 65 °C en una solución 6X SSC y 0,25% de leche descremada en polvo para bloquear los sitios inespecíficos. Colocar el filtro de nitrocelulosa en el menor volumen posible de

la misma solución (2-10 ml), y agregar la sonda marcada, luego de desnaturalizarla hirviéndola por 5',. Hibridar durante una noche a 65°C.

Lavar el filtro con 200 ml de SSC 3X, SDS 0,3% a 65°C durante 15'. Luego con un volumen igual de solución de SSC 2X, SDS 0,2% durante otros 15' y en caso de ser necesario lavar una tercera vez con 200 ml de 1X SSC. El tercer lavado se realiza si aún se detecta con un geiger radiactividad en las zonas del filtro dónde no debiera haber señal.

Dejar secar y poner a exponer en caja de exposición para radiografías, sobre una radiografía virgen (Kodak), a la que se han hecho marcas para conocer, una vez revelado el film, la posición que ocupaba sobre éste el filtro durante la exposición. Dejar el tiempo necesario, que puede ser entre 30' y varios días en función de la intensidad de la señal.

Una vez revelada la radiografía buscar, (haciendo uso de las marcas puestas en el filtro, la radiografía y la foto del gel original), a que posición de peso molecular y a que calle del gel de agarosa corresponden las señales obtenidas.

SOLUCIONES:

20X SSC: 175,3 g de NaCl
88,2 g de Citrato de Sodio
Agregar 800 ml de agua
Llevar la solución a pH 7 con NaOH
Llevar a 1 l con agua

Solución 1: 0,5 M Tris-HCl pH 8
2 M NaCl

II.1.19. Purificación de fragmentos de ADN

Algunas reacciones de amplificación dan productos que necesitan ser purificados antes de su clonado, estudio de restricción, o secuenciación, para ello:

Se corren 40 μ l del producto de la PCR en un gel de agarosa 0,8% (para fragmentos mayores a 100 pares de bases) con bromuro de etidio, hasta que la banda de ADN a purificar esté bien separada de otros eventuales productos de la reacción de amplificación.

Para evitar daños al ADN tratar de exponer el gel el menor tiempo posible a la luz ultravioleta (UV). Cortar un trozo de agarosa de aproximadamente 2 mm de ancho justo delante (o justo detrás, en función de la conveniencia) de la banda a purificar. Colocar el gel en la cuba de corrida y agregar TBE 1X cuidando de no cubrir la superficie de la agarosa. Agregar dentro del pozo recién hecho TBE 3X y correr la electroforesis a 10 V/cm, observando a breves intervalos con una luz UV portátil, hasta que la banda de interés se halle en el hueco con buffer concentrado. La mayor cantidad de iones presentes en el pozo competirá más efectivamente con el ADN para transportar la corriente, por lo que el ADN se moverá más lentamente que en el gel, facilitando su recolección.

Detener entonces la corrida y, usando una pipeta recolectar en tubo tipo eppendorf de 1,5 ml el buffer 3X que contiene el ADN a purificar.

Llevar a 500 μ l con agua, agregar 55 μ l de acetato de sodio 3 M, pH 5,2, mezclar y agregar 500 μ l de fenol saturado en Tris-HCl 0,1 M de pH 8. Centrifugar a 14000 RPM en microcentrifuga durante 2', recuperar el sobrenadante y extraerlo del mismo modo con cloroformo. Centrifugar por 10" y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo, agregar 1 ml de etanol 96%, mezclar bien y dejar a -80°C durante 30'. Centrifugar por 5' a 14000 RPM en microcentrifuga, descartar el sobrenadante y lavar con 1 ml de etanol 70% durante 1'. Descartar el sobrenadante y secar el precipitado durante 5' con la tapa del tubo quitada a 37 °C. Resuspender en 10 μ l de TE y correr 1 μ l en un gel de agarosa para cuantificar la cantidad de ADN recuperada.

II.1.20. Tratamiento del producto de la PCR para su clonado con extremos romos

El producto de la reacción de amplificación por PCR tiene extremos romos o una adenosina que la Taq ADN polimerasa agrega a veces en la parte 3' de las cadenas. Para eliminar esta base y lograr extremos romos en todas las moléculas, mejorando la eficiencia de la ligación posterior, se procede como sigue (Jozwik, 1990):

Tomar 46,5 μ l del producto de la reacción de amplificación e inactivar la Taq ADN Polimerasa calentando por 10 minutos a 97°C.

Agregar 2,5 μ l de Cloruro de Magnesio 100 mM, (su concentración final debe ser 5mM) y luego de 3 a 6 unidades del fragmento de Klenow de la ADN polimerasa de E. Coli. Mezclar bien con la pipeta y dejar a temperatura ambiente por 20 minutos.

A este punto se debe agregar a los extremos 5' el P en lugar del OH que poseerán los fragmentos por provenir estas partes de los oligonucleótidos usados (los oligonucleótidos se sintetizan con el OH en ambos extremos). Agregar entonces 14 μ l de ATP 5 mM, (la concentración final debe ser 1 mM), luego 1,5 μ l de 10X buffer para T4 polinucleótido quinasa, 2,5 μ l de EDTA 3 mM (pH 8) y 10 unidades de T4 polinucleótido quinasa. Mezclar bien e incubar por 30 minutos a 37°C

Inactivar las enzimas durante 10 minutos a 70°C. Dejar enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos y agregar 7 μ l de acetato de sodio 3 M de pH 5,2, llevado a pH con ácido acético. Mezclar y agregar 160 μ l de etanol 96%. Mezclar y dejar a -70°C o en hielo seco con etanol durante 30 minutos.

Centrifugar en microcentrifuga a 14000 RPM durante 10 minutos y, luego de descartar el sobrenadante, lavar el precipitado con 500 μ l de etanol 70%. Después de 1 minuto descartar el sobrenadante y dejar secar el precipitado a 37°C con el tubo destapado.

Resuspender el precipitado en 10 μ l de TE y cargar 1 μ l en un gel de agarosa 0,8% para estimar la concentración de ADN.

SOLUCIONES:

Buffer de quinasa 10X: 0,5 M Tris-HCl pH 7,6
 0,1 M MgCl₂
 50 mM DTT
 1 mM espermidina
 1 mM EDTA pH 8

TE: 10 mM Tris-HCl pH 8
 1 mM EDTA pH 8

II.1.21. Clonado de fragmentos de ADN en plásmidos

El ADN a ser ligado puede tener extremos adhesivos o romos, en función de ello los procesos a llevar a cabo tienen algunas diferencias, en función de la dificultad de lograr que la enzima T4 ADN ligasa consiga pegar el vector con el fragmento deseado, estos procedimientos son:

CLONADO DE FRAGMENTOS DE ADN CON EXTREMOS ADHESIVOS

Se toman 20-25 ng de ADN plasmídico cortado con la enzima de restricción elegida, y se agrega el fragmento a clonar en una relación molar entre 1:1 y 5:1 (relación plásmido:vector), dependiendo de la cantidad de

fragmento con que se cuenta. Luego 1 μ l de buffer de ligasa 10X, 0,1 unidad de T4 ADN Ligasa (en caso de no ser posible tomar un volumen tan pequeño ya que la concentración habitual de la enzima es 1 U/ μ l, agregar 0,5 μ l de ligasa) y agua hasta 10 μ l (Sambrook *et al.*, 1989).

Dejar a temperatura ambiente (20-23°C) por 30' y transformar entre 1/10 y 1/20 de la ligación, en función de la eficiencia de las células competentes disponibles.

CLONADO DE FRAGMENTOS DE ADN CON EXTREMOS ROMOS

El plásmido a usar es pUC 18 cortado con la enzima de restricción Sma I, que produce extremos romos y tratado con fosfatasa alcalina, provisto por BRL.

Proceder igual que en el caso anterior, excepto que se deben usar 1,5 unidades de ligasa y que la temperatura de incubación puede ser algo inferior (16°C)(Sambrook *et al.*, 1989).

Habiendo sido tratado el vector usado con fosfatasa alcalina, se puede transformar hasta 1/3 del volumen de reacción.

II.1.22. Células competentes

Se llama células competentes a aquellas bacterias que han sido tratadas para incorporar ADN plasmídico cuando son puestas en contacto con éste.

Para ello deben someterse al siguiente proceso:

Tomar una colonia de la bacteria a hacer competente y crecerla durante una noche a 37°C en 5 ml de LB.

A la mañana agregar estos 5 ml de cultivo a 200 ml de LB y crecer hasta que la densidad óptica a 550 nm sea 0,48. Enfriar entonces 5 minutos en hielo y centrifugar a 1800 g por 5' a 4°C. Descartar el sobrenadante y resuspender en 80 ml de TpbI tenido a 4°C, mantener en hielo durante 5'.

Centrifugar nuevamente 5' a 1800 g y 4°C, descartar el sobrenadante y resuspender en 8 ml de TpbII a 4°C. Dejar 15' en hielo y luego dividir en alícuotas de 300 µl en tubos tipo eppendorf y mantener a -70°C hasta su uso.

SOLUCIONES:

LB: 10 g de Bacto-triptona

5 g de Extracto de levadura

10 g de NaCl

Llevar a 900 ml con agua y a pH 7 con NaOH.

Completar a 1 litro con agua y autoclavar.

TpbI: 30 mM Acetato de K

100 mM RbCl o KCl

10 mM CaCl₂

50 mM MnCl₂

15% de glicerol

Llevar a pH 5,8

TpbII: 10 mM MOPS o PIPES
 75 mM CaCl₂
 10 mM RbCl o KCl
 15% de glicerol
 Llevar a pH 6,5

II.1.23. Transformación

Se llama transformación al proceso por el cual se introduce en una bacteria que fue hecha competente, ADN plasmídico para su amplificación. Los pasos a seguir son (Sambrook *et al.*, 1989):

Colocar en un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml la solución de ADN a ser transformado y 50 μ l de células competentes apenas descongeladas, todo mantenido en hielo. Mezclar bien y dejar, siempre en hielo, durante 15'. Colocar 60" a 42°C y luego agregar 100 μ l de LB y crecer por 5' a 37°C. Plaquear en caja de petri con el antibiótico adecuado y crecer a 37°C durante una noche.

II.1.24. Extracción de ADN plasmídico

El estudio de los productos de la ligación debe hacerse sobre el plásmido purificado de las bacterias transformadas, para ello (Sambrook *et al.*, 1989):

Crece al menos por 14 horas un inóculo de la bacteria que contiene el ADN a ser preparado en 2 ml de LB. Centrifugar durante 3' a 2.000 g y descartar el sobrenadante. Luego proceder en el siguiente orden:

- 1) Resuspender en 80 μ l de tampón de lisis, agitando vigorosamente y pasar a un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml.
- 2) Agregar 200 μ l de solución 1 y mezclar invirtiendo varias veces el tubo.
- 3) Agregar inmediatamente 150 μ l de acetato de sodio 3 M de pH 5,2 (llevada a pH con ácido acético) y mezclar invirtiendo varias veces el tubo.
- 4) Centrifugar durante 5' a 14000 RPM en microcentrífuga y recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo.
- 5) Agregar 300 μ l de fenol-cloroformo 1:1, de pH 8, mezclar agitando vigorosamente y centrifugar por 2' a 14000 RPM. Recuperar la fase superior y pasarla a un nuevo tubo.
- 6) Agregar 300 μ l de cloroformo, mezclar bien, centrifugar a 14000 RPM por 10" y pasar la fase superior a un nuevo tubo.
- 7) Agregar 1 ml de etanol 96%, mezclar bien y dejar a temperatura ambiente durante 5'. Luego centrifugar 5' a 14.000 RPM, descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 ml de etanol 70%.
- 8) Descartar el etanol 70% y resuspender en 30 μ l de TE con ARNasa a una concentración final de 20 μ g/ml.

SOLUCIONES:

ARNasa: 10 mM Tris-HCl pH 7,5
5 mM NaCl
10 mg/ml ARNasa A pancreática
Hervir por 15', enfriar y conservar a -20°C

LB: 10 g de Bacto-triptona
5 g de Extracto de levadura
10 g de NaCl
Llevar a 900 ml con agua y a pH 7 con NaOH.
Completar a 1 litro con agua y autoclavar.

Solución 1: 0,2 M NaOH
1% en SDS

TE: 10 mM Tris-HCl pH 8
1 mM EDTA pH 8

II.1.25. Preparación de ADN de fago λ

Crece el fago a confluencia en células L392 en caja de Petri durante una noche. Agregar 3 ml de tampón Tris y dejar eluir por 3 horas en agitación constante a 4°C. Transferir el sobrenadante a un tubo con 0,15 ml de

cloroformo, centrifugar 5' a 1800 RPM, recuperar el sobrenadante en alícuotas de 500 μ l en tubos eppendorf. Agregar a cada tubo 0,01 mg de ADNasaI e incubar a temperatura ambiente por 15'. Agregar 0,5 ml de resina DE-52 (Whatman) equilibrada con LB (pega polisacáridos, ADN y ARN), y 7 μ l de gelatina 0,3% (para evitar el pegado inespecífico de los fagos). Dejar 15' agitando, luego centrifugar por 5' a 5000 g.

Recuperar el sobrenadante y agregar a éste 60 μ l de EDTA 0,5 M de pH 8 y 40 μ g de proteasa K (para degradar la envoltura proteica del fago y liberar su ADN), incubando a 37°C durante 15'. Poner entonces 15 μ l de CTAB (Bromuro de cetil-trimetil-amonio) 5% en NaCl 0,5 M (el CTAB forma un complejo insoluble con el ADN). Dejar a 68°C por 3' y centrifugar 15' a 15000 RPM en microcentrífuga.

Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado con 300 μ l de NaCl 1,2 M y reprecipitar agregando 750 μ l de etanol 75%, centrifugando nuevamente 5' a 15000 RPM.

Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado de ADN en TE, conservar a 4°C.

SOLUCIONES:

Tampón Tris: 10 mM Tris-HCl pH 7,5
 10 mM MgCl₂
 20 mM NaCl

II.1.26. Secuenciación de cantidades mínimas de ADN de fago λ mediante el uso de la PCR

La utilización del método de Sanger y la amplificación por PCR juntos, agregando uno solo de los "primers", permite secuenciar cantidades muy pequeñas de ADN de fago λ , usando para ello el equipo "Circum Vent Sequencing Kit" de New England Biolabs como sigue:

Secuenciar 100 ng de ADN de fago λ que contiene un fragmento de ADN genómico de ratón que incluye el exón 10 y parte del intrón que va hacia el exón 11 (Koller *et al.*, 1991), usando 200 ng de un primer específico de 20 bases de longitud, (tampoco en este caso se conoce la composición de las soluciones usadas en el equipo).

Colocar en un tubo eppendorf de 500 μ l el ADN a secuenciar y el "primer" específico. Luego 1,5 μ l de tampón de secuenciación y 1 μ l de solución de Tritón X-100 (ambos provistos). Completar con agua hasta 12 μ l. Colocar entonces 2 μ l de (α "S)dATP o (α "P) dATP de 500 a 1200 Ci/mM y 2 unidades de Vent ADN Polimerasa, mezclar bien y distribuir 3,2 μ l de esta solución en cada uno de cuatro tubos de 500 μ l con 3 μ l de "mix" A, C, G o T (éstos contienen el dideoxinucleótido correspondiente al nombre de la "mix" de modo que cada tubo será una calle de la secuencia).

Hacer 20 ciclos de: 95°C-20", 55°C-20", 72°C-20". Agregar 4 μ l de tampón de "stop" a cada tubo, desnaturalizar calentando a 80°C por 2' y cargar en el gel de secuenciación.

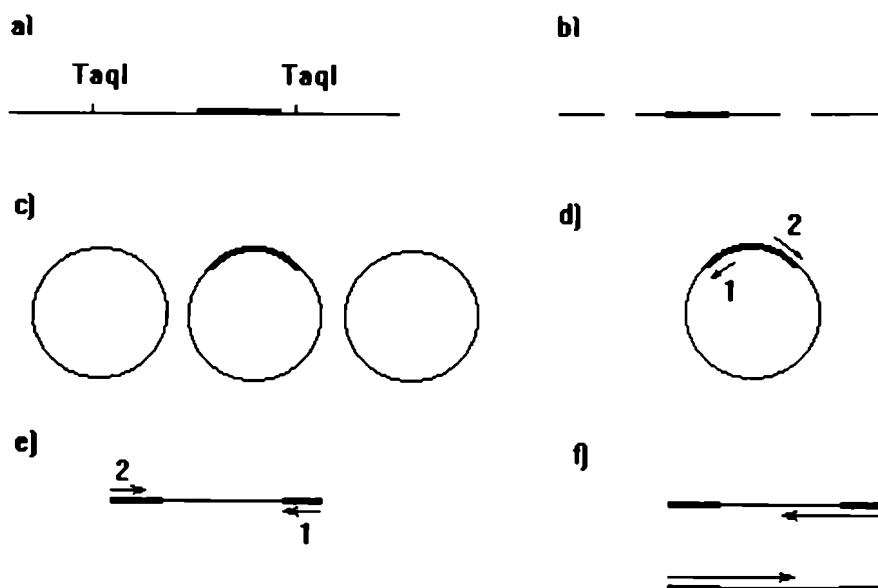
II.1.27. PCR circular

El método llamado PCR circular permite secuenciar regiones no conocidas de ADN que flanquean zonas conocidas, utilizando "primers" ubicados en estas últimas. El proceso, que no sería posible hacer de otro modo, consiste en (Ochman *et al.*, 1989, Ochman *et al.*, 1990):

Cortar 25 ng del ADN a secuenciar con alguna enzima que corte frecuentemente para obtener fragmentos de ADN pequeños (algunos cientos de pares de bases), que deje en lo posible extremidades adhesivas y no corte dentro de la parte conocida de ADN. En nuestro caso elegimos Taq I que reconoce "TCGA" (ver figura 4 a y b). Luego ligar siguiendo el protocolo de ligación de plásmidos. Este paso dejará fragmentos de ADN circulares dónde en alguno de ellos las regiones 5' y 3' no conocidas estarán ligadas entre sí en algún lugar próximo a la región conocida y englobándola (Figura 4 c), y será posible amplificar si los oligonucleótidos usados se encuentran en orden invertido respecto de una amplificación normal (figura 4 d).

Tomar una alícuota de 1 μ l de la ligación y amplificar por PCR usando las condiciones ya descritas. En la molécula de ADN circular que incluye las secuencias de los "primers" se amplificarán todas las regiones desconocidas presentes, y los extremos de la parte conocida que serán también extremos del producto resultante (figura 4 e). La secuenciación de éste con los "primers" usados para amplificar permitirá conocer la secuencia buscada (figura 4 f).

FIGURA 4



En la figura se ven esquemáticamente los pasos de una amplificación por PCR circular.

a) Cortar el ADN a amplificar con una enzima de restricción (Taq I en nuestro caso), la región de ADN conocida está representada en trazo grueso y las desconocidas en trazo fino.

b) Algunos de los fragmentos resultantes del corte de cada molécula de partida tendrán sólo ADNs de secuencia desconocida, mientras que uno de ellos tendrá la parte conocida y sus regiones flanqueantes.

c) La ligación de éstos fragmentos dará ADNs circulares, uno de los cuales tendrá la zona conocida y las regiones flanqueantes a ésta ligadas entre sí.

d) Amplificar por PCR con los dos oligonucleótidos (1 y 2) que no podrían funcionar porque parten en direcciones divergentes sobre el ADN lineal, pero que amplificarán perfectamente el ADN circular si el tamaño de éste lo permite (para nuestro laboratorio el límite máximo está en algo más de 3000 pares de bases).

e) Se obtendrá un fragmento de ADN en el que las regiones correspondientes a los oligonucleótidos estarán ubicadas en las extremidades, flanqueando las zonas que queremos conocer.

f) Secuenciar el producto obtenido en ambas direcciones usando para cada dirección uno de los "primers" con los que se amplificó el ADN.

Para identificar los fragmentos específicos producidos por la amplificación, en caso que sean varios y ya que no es posible conocer el tamaño correcto "a priori", se puede hacer un "southern blot" si se tiene alguna sonda que no incluya los "primers" usados. Secuenciar luego en forma directa la banda positiva, si es necesario en ambas direcciones, usando para cada dirección uno de los oligonucleótidos empleados en la última parte de la reacción de PCR.

II.1.28. Marcado de proteína e inmunoprecipitación

Se puede incorporar material radiactivo a una proteína por varios métodos. Usamos dos de ellos: I) Con metionina marcada con (^{35}S), que se agrega al medio de cultivo y es entonces incorporada en las proteínas que las células sintetizan. II) Con ^{32}P que se incorpora a las proteínas que tienen sitios de fosforilación por la acción de las PKs.

I) El protocolo usado para marcar con metionina fue:

Incubar las células en medio de cultivo libre de metionina, adicionado con (^{35}S) metionina a $100\ \mu\text{Ci/ml}$ durante una noche.

Por la mañana lavar dos veces con PBS, descartar el líquido y lisar las células con 0,5 ml de TNS. Tomar el material lisado con pipeta y pasarlo a un tubo eppendorf.

Aspirar el líquido varias veces con una jeringa para que al pasar a través de la aguja se rompa el ADN en fragmentos pequeños. Agregar entonces Tritón X-100 de una solución 20% para llegar al 2% final.

Agregar CLAP (1:1000), centrifugar 10' a 14000 RPM en microcentrífuga y descartar el precipitado.

Agregar entonces al sobrenadante recuperado 1 μg del anticuerpo y 20 μl de proteína A-sefarosa (50% en PBS). Dejar en rotación tres horas a temperatura ambiente.

Lavar cinco veces con TNSX, dejar rotando 10' entre lavados. Lavar dos veces con una solución 50 mM de Tris-HCl de pH 7,4, secar el "pellet" y resuspender en buffer de carga para proteínas con SDS (Kessler, 1975, Burke, 1987, Harlow *et al.*, 1988).

Correr un gel de acrilamida-SDS para proteínas, agregando además en otras calles marcadores de peso molecular conocido, secar a 80°C al vacío durante una hora y exponer el tiempo necesario hasta lograr una buena radiografía donde pueda verse el peso molecular de las proteínas marcadas reconocidas por el anticuerpo usado.

Es necesario realizar en paralelo un proceso semejante en el que se utilizará un anticuerpo que no reconozca la CFTR. Las bandas comunes a ambos anticuerpos serán consideradas inespecíficas.

II) Para marcar con ^{32}P se procede como sigue:

Incubar las células por 4 horas en medio de cultivo adicionado con ^{32}P a 300 $\mu\text{Ci/ml}$ en presencia de ortovanadato de sodio 50 μM , éste es un inhibidor de fosfatasas (Cheng *et al.*, 1991). Luego proseguir con la lisis de las células, inmunoprecipitación y gel de acrilamida-SDS como en el caso anterior.

SOLUCIONES

TNS: 50 mM Trietanolamina
100 mM NaCl
0,4% SDS
40 $\mu\text{g/ml}$ PMSF

CLAP: 10 mg/ml Quimostatina
10 mg/ml Leupeptina
10 mg/ml Antipaína
10 mg/ml Pepstatina
en DMSO

TNSX: 50 mM Trietanolamina
100 mM NaCl
0,1% SDS
40 $\mu\text{g/ml}$ PMSF
0,5% Tritón X-100

II.1.29. Gel de proteínas

Se pueden diferenciar las proteínas por peso molecular haciéndolas correr en geles de acrilamida desnaturalizantes, el proceso se lleva a cabo del siguiente modo:

Armar primero el gel usando dos tipos de preparaciones de acrilamida. En la parte inferior se usa una concentración del 6% al 20% de acrilamida

según el peso molecular de la proteína a estudiar (nosotros usamos 8%) y en la superior del 4% con un pH distinto que hace que las proteínas corran juntas hasta llegar a la fase inferior, con lo que se logran bandas más definidas.

Se eligió un peine con dientes de 1 mm de espesor por 4 mm de ancho para hacer las "calles".

Resuspender las muestras a correr en buffer de carga de proteínas. Hervir durante 3' para desnaturalizarlas y cargar en el gel, cargando en otra calle un marcador de peso molecular conocido. Correr a 30 mA

Una vez corrido, el gel se puede revelar por distintos métodos: Con una tintura azul para proteínas (coomassie blue R-250), con plata o con la exposición y posterior revelado de una radiografía si las muestras son radiactivas como fue nuestro caso.

SOLUCIONES:

Buffer de carga con SDS 4X:	10% Glicerol
	62 mM Tris-HCl pH 6,8
	0,0012% Azul de bromofenol
	2% SDS
	5% β -Mercaptoetanol

Acrilamida 30%: 29,2 g Acrilamida
0,8 g N',N'-bis-metilen-acrilamida
a 100 ml con agua

Gel inferior: 375 mM Tris-HCl pH 8,8
0,1% SDS
50 μ l persulfato de amonio 10%
Acrilamida 30% para llegar al % deseado
Agua hasta 10 ml
5 μ l N,N,N',N' tetrametil-etilen-diamina

Gel superior: 125 mM Tris-HCl pH 6,8
0,1% SDS
50 μ l persulfato de amonio 10%
4% Acrilamida (de la solución 30%)
Agua hasta 10 ml
5 μ l N,N,N',N' tetrametil-etilen-diamina

II.2. OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS

Los oligonucleótidos usados fueron sintetizados en un aparato 380 B, de Applied Biosystems, con reactivos de la misma compañía.

La numeración del gen a la que corresponden los oligonucleótidos es la de Riordan *et al.*, 1989, excepto para los ubicados en el exón 10b, que sigue nuestra numeración del exón, y los de ratón que se identifican con una "M" delante y siguen la numeración de Tata *et al.*, 1991.

El nombre de los oligonucleótidos incluye un primer número que es el del exón al que pertenecen y una barra que separa a un segundo número, éste da la dirección en la cual está orientado el "primer" en relación al gen, los que llevan número 5 amplificarán o secuenciarán de 5' a 3', los que llevan número 3 lo harán en sentido inverso.

Oligonucleótidos usados para amplificar partes del gen humano CFTR en dirección 5'-3'.

1-5: 5' TAGTAGGTCCTTTGGCATTAG 3', exón 1, nucleótidos 64-83.

5-5: 5' GCAGATGAGAATAGCTATGT3', exón 5, nucleótidos 582-601.

7-5: 5' ATATTCACCACCATCTCAT 3', exón 7, nucleótidos 1138-1216.

8-5: 5' GAAGTAGTGATGGAGAATGT 3', exón 8, nucleótidos 1303-1322.

8-5bis: 5' GAATATAACTTAACGACTACA 3', exón 8, nucleótidos 1282-1302.

10-5: 5' GTTTTCCTGGATTATGCCTGGCAC 3', exón 10, nucleótidos 1611-1634.

10-5bis: 5' GAATTCATTCTGTTCTCA 3', exón 10, nucleótidos 1592-1610.

10b-5: 5' ACTTGGAAGTGGAGATG 3', exón 10b, nucleótidos 1-17 del exón.

Oligonucleótidos usados para amplificar partes del gen humano de la CFTR en dirección 3'-5'.

6-3: 5' AGGAGACTAACAAGTTGTCCA 3', exón 6, nucleótidos 683-663.

10-3: 5' GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC 3', exón 10, nucleótidos 1708-1685.

10b-3: 5' CTGCCTGCTCCTATGACACTGA 3', exón 10b, nucleótidos 119-98 del exón.

11-3: 5' TTCTTGCTCGTTGACCTCCA 3', exón 11, nucleótidos 1798-1779.

11-3bis: 5' CTAAAGAAATTCTTGCTCGT 3', exón 11, nucleótidos 1807-1787.

13-3: 5' GTTAGCCATCAGTTTACAGA 3', exón 13, nucleótidos 1923-1904.

Oligonucleótidos usados para amplificar partes del gen CFTR de ratón en dirección 5'-3'

M10b-5int: 5' TGTTCAACTCCGAGATCT 3', "exón" 10b, nucleótidos 53-70 del "exón".

M10b-5anti: 5' ACTCCGAGATCTTCAAAGT 3', "exón" 10b, nucleótidos 59-77 del "exón".

M10-5: 5' TCTTGGATTATGCCGGGTACT 3', exón 10, nucleótidos 1620-1640

M10-5ex: 5' GGAAGAGTTTCATTCTGCTCT 3', exón 10, nucleótidos 1592-1612.

Oligonucleótidos usados para amplificar partes del gen CFTR de ratón en dirección 3'-5'

M10b-3: 5' AAATCACAAGCATGAGGA 3', exón 10b, nucleótidos 52-35 del exón.

M11-3: 5' CCTTGCACGCTGACCTCCA 3', exón 11, nucleótidos 1801-1783.

II.3. ANTICUERPOS USADOS

Se usó un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína CFTR humana (IgG_{2a}), llamado MATG 1061. El anticuerpo se produjo contra la secuencia aminoacídica de las posiciones 503 a 515, que corresponde a parte de la primera mitad del NBF1 (Puchelle *et al.*, 1991), y fue gentilmente facilitado por el Doctor A. Pavirani (Transgene, Estrasburgo, Francia).

Se usó también un anticuerpo monoclonal de ratón contra el antígeno CD4 (IgG_{2b}), llamado OKT4, que fue recibido de la ATCC, y que sirvió como anticuerpo de control en las inmunoprecipitaciones. Las bandas comunes a ambos anticuerpos se consideran inespecíficas, ya que el OKT4 no reconoce a la proteína CFTR.

III. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Los objetivos del estudio fueron los siguientes:

1°) Mejoramiento de los sistemas de análisis de los defectos en el gen CFTR en la población. La importancia del conocimiento de los defectos genéticos y su detección reside en la posibilidad de:

A) Aumentar la comprensión de los mecanismos con los que actúa la proteína, lo que conlleva a un perfeccionamiento en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

B) Diagnosticar con seguridad los enfermos, ya que los sistemas actualmente usados (evaluación de los síntomas y ensayo del sudor), dan resultados ambiguos en un gran número de casos, con lo que algunos pacientes comienzan a tratarse muy tarde o, en el otro extremo, personas normales pueden seguir el tratamiento sin necesidad.

C) Mejorar el diagnóstico preconcepcivo, para poder informar a padres supuestamente portadores (o, menos comúnmente, enfermos) acerca de su posibilidad de tener hijos enfermos.

D) Mejorar el diagnóstico prenatal. Con lo que se puede comenzar con las terapias apenas el niño nace, mejorando para ellos las expectativas de supervivencia y calidad de vida.

2°) Aplicación de los nuevos métodos al estudio de los pacientes de la región italiana del Friuli-Venezia Giulia.

3°) Búsqueda de posibles isoformas de la proteína CFTR. Los "splicing alternativos" u otros mecanismos pueden dar lugar a familias de proteínas derivantes de un único gen.

En el caso de la proteína CFTR existen indicios de la existencia de algunos de estos procesos, aunque hasta ahora no se ha profundizado en su estudio, lo que en nuestra opinión debería hacerse, sino que han sido sistemáticamente tomados como aberraciones.

El hallazgo de isoformas abriría una puerta muy importante para descifrar las todavía poco conocidas funciones distintas de canal de cloruro de la proteína CFTR, así como los mecanismos a través de los cuales ésta actúa.

IV. y V. DESARROLLO

IV. MEJORAMIENTO DE LAS TÉCNICAS Y ESTUDIOS DE POBLACIÓN (Ítems 1° y 2° de los objetivos)

IV.1. INTRODUCCIÓN

El estudio del gen CFTR en pacientes o portadores presenta varios problemas:

A) El tamaño del gen CFTR (250.000 pares de bases), el número de exones (27) y su separación (muchos intrones miden decenas de miles de pares de bases), hacen que el estudio directo del gen, o al menos de varios exones en un solo análisis, sea imposible con las técnicas actuales.

B) La gran cantidad de mutaciones potencialmente responsables de la enfermedad, las que además se hallan en distintas regiones del gen, hace que el campo de búsqueda sea demasiado grande, en caso de no conocerse a priori la mutación presente en cada caso.

La $\Delta F508$ es la mutación más abundante y por ende la que se busca en primer lugar, para ello se estudia la región del exón 10 donde está el defecto, tratando de hallar en ella la falta de tres bases característica de la mutación.

Al momento de iniciar este trabajo de tesis el método usado era:

Extracción del ADN de 10 ml de sangre del paciente por métodos que incluían largas incubaciones y diálisis, y llevaban al menos 2 días de trabajo. Posterior amplificación de la zona a estudiar, mediante PCR efectuada sobre una fracción del ADN preparado, control del producto para ver si la $\Delta F508$ estaba presente y, en caso positivo, si se hallaba en uno o ambos alelos del paciente. Este control se llevaba a cabo mediante complicados sistemas de gel, que incluían marcado con fósforo radiactivo. Esto implicaba por lo menos 4 días de trabajo en total (Kerem *et al.*, 1989a). La alternativa era el uso de métodos colorimétricos de ensayo inmunoenzimático que son de todos modos largos y complejos (Mazza *et al.*, 1991).

En caso de dar este estudio resultado negativo para la $\Delta F508$ y ser el fenotipo del paciente FQ positivo, se debían buscar otras mutaciones. Era entonces necesario amplificar y secuenciar uno por uno los demás exones hasta encontrar el defecto. Se analizaban primero los exones que codifican para las NBF, que es donde se ubican la mayor cantidad de defectos responsables de la FQ, y se seguía luego con los otros exones (Collins, 1992a, Kerem *et al.*, 1990). Esta parte del trabajo podía llegar a prolongarse por meses y, a veces, sin obtener resultado.

A causa de ello se pensó en seguir dos estrategias:

A) Diseñar un sistema más veloz, confiable, simple, seguro y económico para la búsqueda de la $\Delta F508$ a partir de ADN genómico.

B) Conseguir aislar el cADN de la CFTR a partir de células provenientes de individuos portadores o pacientes, para usar directamente este producto en la

tarea de hallar mutaciones distintas a la $\Delta F508$. Con ello sería posible en un solo ensayo amplificar y secuenciar varios exones a la vez.

Ambas líneas de trabajo fueron llevadas a cabo con éxito.

IV.2. RESULTADOS

IV.2.1.1. Nuevas técnicas de estudio de la $\Delta F508$

Se intentaron buscar mejores métodos para dos de las fases del estudio de la $\Delta F508$, es decir la preparación de la muestra a amplificar y el análisis de los productos obtenidos. Se llegó en ambos a sistemas sumamente sencillos y veloces.

Inicialmente se puso a punto y se usó un protocolo mejorado para preparar ADN genómico.

El nuevo proceso consiste básicamente en el lisado de las células provenientes de 10 ml de sangre, seguido de una incubación con proteasa K y posterior precipitación con solución saturada de NaCl para eliminar la mayor parte de las proteínas. Tratando luego el sobrenadante con isopropanol se aísla un ADN de buena calidad. Ello acortó el tiempo de preparación a menos de un día.

Sobre ese ADN se amplifica por PCR parte del exón 10 en las condiciones vistas en materiales y métodos, haciendo 30 ciclos de 45" a 93°C, 45" a 58°C y 45" a 72°C. Usando un "Thermal Cycler 380" de Perkin Elmer-Cetus la reacción lleva menos de una hora y media. Empleando los oligonucleótidos ya descritos, 10-5 y 10-3, se obtienen fragmentos de ADN de 95 pares de bases para la $\Delta F508$ y 98 pares de bases para el gen normal. Se

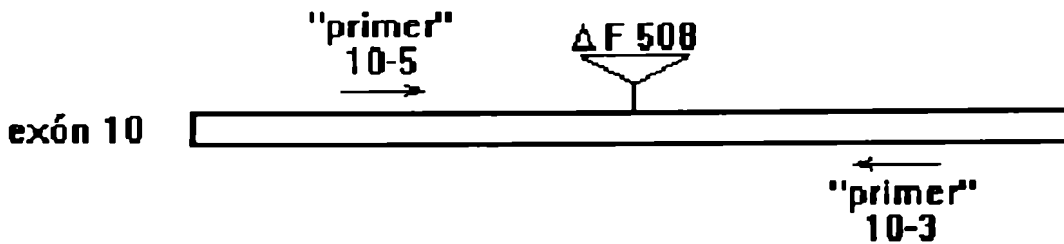
verán también otras mutaciones que impliquen una deleción o agregado de nucleótidos (ver figura 5).

Se probaron distintos sistemas de gel para controlar el producto. Se halló que la técnica óptima es correr el 10% del producto obtenido en la reacción de PCR en un gel vertical de acrilamida-bisacrilamida 8% no desnaturizante (descrito en materiales y métodos) y evidenciar luego con bromuro de etidio la presencia de una o dos bandas, dependiendo de la homocigosis o heterocigosis del paciente para esta mutación. En el mismo gel se cargarán también, en calles contiguas a las muestras en estudio, controles positivos, negativos y heterocigotas para la $\Delta F508$. La comparación de las bandas nos dará la información requerida (ver figura 6).

Con este sistema se busca la presencia de cromosomas mutados, no se detecta específicamente la mutación $\Delta F508$ sino la ausencia o exceso de algunas bases en una región del exón 10. Por ejemplo se puede encontrar también la 1677delTA, que es una deleción de dos bases que ocurre en esta región, su banda de 96 pares de bases es claramente distinguible de la de 95 pares de bases que corresponde a la $\Delta F508$ en los geles (ver figura 7).

La abundancia relativa de la $\Delta F508$, el hecho de que se trabaja sobre individuos que tienen además una alta probabilidad de tener esta mutación, y que no se conoce ninguna deleción de tres bases en la región que no produzca la enfermedad, hacen que la posibilidad de error en el diagnóstico sea prácticamente nula.

FIGURA 5



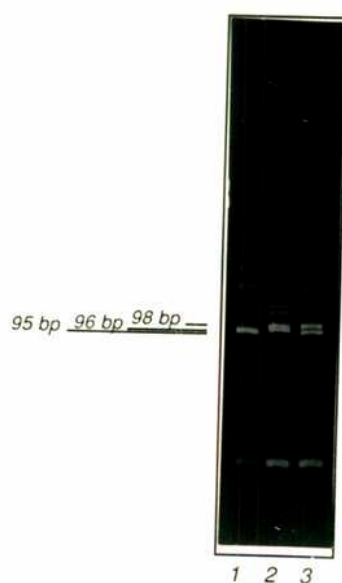
La figura muestra la ubicación de los oligonucleótidos 10-5 y 10-3 en relación al exón 10 y a la mutación $\Delta F508$. Amplificando por PCR con estos "primers" se obtendrá un fragmento de ADN de 95 pares de bases si la mutación $\Delta F508$ está presente o de 98 pares de bases si el ADN estudiado no tiene deleciones. La mutación 1677delTA, que es una deleción de dos bases, da un producto de 96 pares de bases. La diferente movilidad en geles de acrilamida del producto obtenido en cada caso nos dará la información buscada.

FIGURA 6



En la foto se ve el resultado del trabajo descrito, para estudios sobre individuos normales (N/N, calle 1), heterocigotas para la $\Delta F508$ (N/ $\Delta F508$, calle 2), y homocigotas para la mutación ($\Delta F508/\Delta F508$, calle 3). Las bandas obtenidas, claramente reconocibles, de 95 o 98 pares de bases, señalan respectivamente la existencia o no de la delección de tres bases.

FIGURA 7



En la foto se pueden ver, fácilmente diferenciables entre sí, los productos de amplificación provenientes de: I) Un sujeto homocigota para la $\Delta F508$ que da una única banda de 95 pares de bases (calle 1). II) Un paciente con un alelo 1677delTA y el otro normal en la región, que da dos bandas de 96 y 98 pares de bases respectivamente (calle 2). III) Un individuo heterocigota para la $\Delta F508$ y un alelo normal, que da bandas de 95 y 98 pares de bases respectivamente (calle 3).

Se logró mejorar aún más la preparación de la muestra a analizar usando un método de amplificación directa de una pequeña alícuota de sangre, que requiere sólo un breve tratamiento previo de menos de 30 minutos. El método fue descrito anteriormente por otros (Kogan *et al.*, 1990), pero no había sido usado para el análisis de la CFTR hasta ese momento.

La combinación de esta preparación veloz, más la reacción de PCR y posterior control de los productos en gel de acrilamida lleva en total poco más de 4 horas, en lugar de los varios días de los métodos anteriormente usados. Se puede entonces dar el diagnóstico en el mismo día de recibida la muestra lo que es importante cuando los pacientes provienen de lugares geográficamente lejanos al laboratorio en que se hacen los análisis, como fue el caso de algunos de los que participaron en este estudio.

IV.2.1.2. Estudio poblacional de la $\Delta F508$

El "Centro Regionale Fibrosi Cistica" del "Ospedale Infantile Burlo Garofolo" de la ciudad de Trieste, que es el punto de referencia para los enfermos FQ de la región italiana del Friuli-Venezia Giulia, debía hacer un estudio de las familias con miembros enfermos de FQ que estaban bajo su control. Se usó para este estudio el sistema de análisis por amplificación directa sobre una pequeña muestra de sangre y observación en gel de acrilamida no desnaturalizante.

El trabajo se realizó sobre padre, madre e hijo enfermo de 45 familias

Sobre un total de 135 individuos examinados se encontró que la variante $\Delta F508$ estaba presente en 96 de los 180 cromosomas "enfermos" analizados, lo que representa el 53,3%.

En lo que respecta a los 45 pacientes se vio que el 28,8% (n=13) eran homocigotas para la $\Delta F508$ y el 48,8% (n=22) heterocigotas, mientras que del restante 22,4% (n=10) solo se identificó en un cromosoma la rara mutación 1677delTA descrita previamente por otros (Ivaschenko *et al.*, 1991), (ver figura 8).

Los datos obtenidos están en perfecta concordancia con los reportes conocidos para poblaciones sudeuropeas (Tsui, 1992, The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1990).

Se instauró en el "Centro Regionale Fibrosi Cística" un sistema de prevención preconceptiva, por el cual se analiza e informa a personas sospechadas de ser portadoras de la $\Delta F508$ acerca de la existencia o no de la mutación en su material genético.

El método se aplicó también con éxito en la búsqueda de la mutación a partir de vellosidades coriónicas para establecer el diagnóstico prenatal en un caso de padres portadores de la $\Delta F508$ con un hijo enfermo, (ver figura 9) habiendo dado resultado de heterocigosis para el feto al que se estudió. Se envió el mismo material a otros centros especializados que confirmaron el diagnóstico.

FIGURA 8

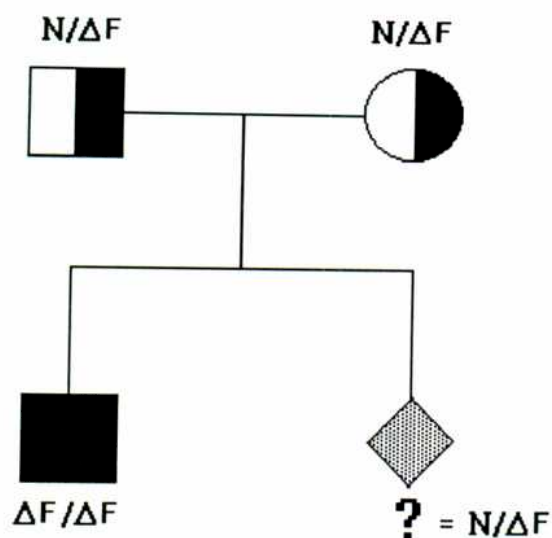
Tabla A)	Cromosomas FQ (n=180)
$\Delta F508$ (n=96)	53,3%
No $\Delta F508$ (n=84)	46,7%

Tabla A): La tabla muestra el porcentaje relativo de cromosomas $\Delta F508$ contra el total de cromosomas FQ estudiados. Se cuentan dos cromosomas FQ por cada enfermo (45 enfermos por 2 cromosomas FQ = 90 cromosomas) y uno por cada padre o madre portador (90 padres por 1 cromosoma FQ cada uno = 90 cromosomas), de modo que se analizaron un total de 180 cromosomas FQ.

Tabla B)	Individuos FQ (n=45)
Homocigotas $\Delta F508$ (n=13)	28,9%
Heterocigotas $\Delta F508$ (n=22)	48,9%
Sin cromosomas $\Delta F508$ (n=10)	22,2%

Tabla B): La tabla muestra, para 45 pacientes estudiados, el porcentaje relativo entre homocigotas para la $\Delta F508$, heterocigotas para la $\Delta F508$, y pacientes que no poseen ningún cromosoma $\Delta F508$.

FIGURA 9



El diagrama muestra el genotipo, con respecto a la $\Delta F508$, de la familia a la que pertenecía la madre de la que se estudiaron las vellosidades coriónicas.

Los cuadrados representan individuos masculinos, el femenino se representa con un círculo y el rombo es el feto de sexo todavía no conocido. N significa genotipo normal, ΔF significa genotipo $\Delta F508$.

La existencia de un primer hijo enfermo, homocigota para la $\Delta F508$, denunciaba claramente a los padres sanos como portadores de la mutación. Por ello se realizó el análisis, que dio heterocigosis para la $\Delta F508$, con lo que se supo que el segundo hijo nacería portador sano de la FQ.

IV.2.2. Estudio del ADN copia de pacientes

El ARN mensajero específico de la CFTR se halla presente con una cierta abundancia sólo en tejidos de muy difícil, si no imposible, disponibilidad en seres vivos, (células epiteliales de pulmones, páncreas, glándulas salivales e intestino).

Se buscó sin éxito en ARN extraído de células de mucosa bucal, donde se presumía debía encontrarse. Posiblemente por ser escasa la cantidad de muestra que se puede recoger de un individuo y plantear algún problema la preparación de ARN a partir de este material. Por ello se pensó en aprovechar un fenómeno conocido como transcripción ilegítima (Chelly *et al.*, 1989), por el cual todos los mARNs se producen en todos los tejidos, aunque sea en muy baja cantidad. Se encuentran también en los que la proteína codificada por el mARN no se detecta ni tiene función alguna conocida, (para la CFTR parece hoy claro que no se trata de transcripción ilegítima, no era tan claro al iniciarse los trabajos (McDonald *et al.*, 1992, Bubien *et al.*, 1990). Por ende se trató de hallar en sangre el transcripto de la CFTR, por ser este el tejido de más fácil disponibilidad.

Para ello se extrajo el ARN de 10 ml de sangre, usando el sistema descrito en materiales y métodos. Sobre 1 μ g de este ARN se sintetizó el ADN copia de filamento simple usando el oligonucleótido 13-3, específico para el exón 13, de modo que el ADN copia así producido contiene sólo los exones del 1 al 12 y parte del 13. Un ventésimo del material así obtenido fue amplificado

mediante PCR usando distintos pares de oligonucleótidos, según la región a estudiar.

Se llegó casi siempre a detectar productos de reacción suficientes para efectuar una secuenciación directa cuando se hicieron PCR anidadas en donde se utilizaron los oligonucleótidos 1-5 y 13-3 en la primera ronda de amplificaciones (exones 1 al 13), y en la segunda distintas combinaciones que fueron:

Oligonucleótidos 1-5 y 6-3 (amplifican 519 pares de bases, exones 1 al 6).

Oligonucleótidos 5-5 y 10-3 (amplifican 1126 pares de bases, exones 5 al 10).

Oligonucleótidos 8-5 y 13-3 (amplifican 620 o 739 pares de bases, exones 8 al 13).

El estudio por este método sobre cuatro enfermos de FQ que no poseen cromosomas $\Delta F508$, de la región de ADN copia comprendida entre los exones 1 y 13 no permitió hallar ningún defecto genético. Probablemente porque: I) El número de individuos estudiados fue bajo. II) No se secuenció la región comprendida entre los exones 13 y 24. III) Aun secuenciando el gen completo por lo menos en el 15% de los pacientes no se encuentran mutaciones (Tsui, 1992).

IV.2.3. CONCLUSIONES SOBRE EL MEJORAMIENTO DE LAS TÉCNICAS Y EL ESTUDIO DE LA $\Delta F508$

Se logró poner a punto un sistema rápido, confiable, simple y económico para la búsqueda rutinaria de deleciones de ADN en la región que corresponde a la $\Delta F508$ en humanos, a partir de un volumen mínimo de sangre, con muy pocas y relativamente sencillas manipulaciones en comparación a los métodos usados antes y que adicionalmente no requiere del uso de sustancias radiactivas.

Se aplicó el sistema al estudio poblacional de la región italiana del Friuli-Venezia Giulia, dónde algunos casos dudosos pudieron ser definidos como FQ y tratados en consecuencia.

En el "Centro Regionale Fibrosi Cística" del "Ospedale Infantile Burlo Garofolo" en Trieste, Italia, es rutinario el uso de nuestro protocolo para los análisis de pacientes.

Se estableció un sistema de diagnóstico prenatal, a través del análisis de las vellosidades coriónicas, que permite conocer si el futuro bebé nacerá con la enfermedad y, en caso positivo, adelantarse con el tratamiento a la aparición de los síntomas.

Se logró un alto porcentaje de éxito en aislar y secuenciar fragmentos de ADN copia de la CFTR de pacientes, a partir de sangre entero.

En comparación con la búsqueda exón por exón sobre ADN genómico, usada hasta el momento, el estudio del cADN es sumamente eficaz para agilizar en el futuro la búsqueda de mutaciones distintas de la $\Delta F508$. Lo engorroso y

largo del viejo método hacía que no se buscaran estas mutaciones en muchos casos dudosos de enfermedad, y no se hicieran estudios preconceptivos y prenatales para muchos individuos no $\Delta F508$. Mejorará entonces la exactitud del diagnóstico para esos casos.

V. ESTUDIO DE ISOFORMAS (Ítem 3° de los objetivos)

V.1. INTRODUCCIÓN

Los motivos para emprender la búsqueda de isoformas de la proteína CFTR en material proveniente de distintas fuentes fueron los siguientes:

a) Está bien estudiada la existencia de varios genes que sufren "splicing alternativos" u otros mecanismos que dan lugar a familias de proteínas que pueden tener distintas actividades.

Por ejemplo la fibronectina (FN) produce diversos "splicing alternativos", que dan lugar en humanos a 20 posibles transcritos. Para varios de ellos se detectó la correspondiente proteína. Las zonas de FN que son removidas en algunas variantes constituyen regiones de pegado de distintos factores. Además la proporción de cada transcrito en un determinado tejido cambia con el tipo de tejido, la edad y otras variables, como podría ser la existencia de un proceso de cicatrización, lo que sugeriría distintas funciones para cada miembro de la familia (Kornblihtt *et al.*, 1985, Han *et al.*, 1992, Schwarzbauer, 1991). Otro buen ejemplo es el de la apolipoproteína B, en la cual un mecanismo de "editing" agrega un codón de "stop" cerca de la mitad del ARN mensajero. Se producen entonces dos proteínas de distintos pesos moleculares (el de la más pequeña es el 48% del de la otra, de allí los nombres de apolipoproteína B100 y B48 en relación a las proporciones de los pesos moleculares), ambas cumplen funciones diferentes (Powell *et al.*, 1987).

b) Existen indicios de la existencia de insertos que no se corresponden con los "normales", y que fueron considerados artificios de clonado, en varios ADN copia de la CFTR (Riordan *et al.*, 1989).

En amplificaciones por PCR de cADN de CFTR fueron vistas bandas, definidas como aberrantes, de tamaño diferente al esperado, además de aquellas con la medida correcta (McDonald *et al.*, 1992).

Estos hechos sugieren fuertemente la presencia de distintas formas de ARN mensajero específicas de la CFTR.

c) Ya fue encontrado en el ARN mensajero de la CFTR un "splicing alternativo", que provoca la delección del exón 9 (la llamaremos 9-). El 9- mantiene intacto el marco de lectura, de modo que de producirse la proteína será la normal menos los aminoácidos codificados por el exón 9. El ARN mensajero 9- se produce en distintos tejidos y en una proporción de moléculas de ARN variable según el individuo, pero que llega a ser más del 90% del total sin que se noten síntomas de la enfermedad (Chu *et al.*, 1991a, 1991b y 1992). Este "splicing" fue también hallado en células pluripotentes HT29, en una abundancia relativa contra la forma 9+ variable según la regulación de la transcripción. Ello sugiere un mecanismo celular para modular las funciones de la proteína CFTR (Montrose-Rafizadeh *et al.*, 1992). En un trabajo recientemente realizado sobre 124 individuos (enfermos y normales), fue encontrada una relación inversa entre el largo de la región politimidínica cercana al sitio aceptor del exón 9 y la abundancia relativa del ARN mensajero 9- (Chu *et al.*, 1993).

Mientras se escribía esta tesis fueron encontrados un segundo "splicing alternativo" que genera la delección del exón 12, y un tercero que inserta un

nuevo exón entre los número 23 y 24, los dos últimos hallazgos son bastante recientes y por ello no sirvieron como antecedentes para esta investigación. Reforzarán de todas formas sus resultados y conclusiones.

La omisión del exón 12 en algunos ARN mensajeros de distintos tipos de células de individuos normales. Es considerado por su descubridor como aberrante sin pruebas para ello (Slomski *et al.*, 1992).

El tercer "splicing" de la CFTR produce, en el punto correspondiente a la unión de los exones 23 y 24 del ADN copia, la inserción de un fragmento del hasta este descubrimiento intrón 23, de 260 pares de bases. Ello introduce un codón de terminación en el marco de lectura, por lo que la proteína correspondiente, que no fue buscada, sería 61 aminoácidos más corta. El ARN mensajero de esta forma representa entre el 3 y el 16% de los transcritos CFTR, tanto de células epiteliales como no epiteliales (Yoshimura *et al.*, 1993).

d) Es muy probable que la proteína CFTR tenga varias funciones distintas (Barinaga, 1992, Higgins, 1992a, Bradbury *et al.*, 1992, Tsui, 1992, Collins, 1992a) (ver página 7), que difícilmente pueden asignarse a una única proteína con su estructura (Higgins, 1992b), lo que haría lógica la existencia, entre otras posibilidades, de una familia de isoformas.

e) A pesar de no haberse aún identificado variantes de la proteína CFTR, existen indicios de bandas no individualizadas en "western blots", correspondientes a pesos moleculares distintos al de la proteína normal. El resultado podría ser específico ya que las bandas desaparecen al establecerse una competición con el péptido perteneciente a la proteína CFTR con que se generó el anticuerpo (Zeitlin *et al.*, 1992).

La búsqueda de isoformas se llevó a cabo tratando inicialmente de identificar transcritos diferentes del conocido, para intentar luego probar la existencia de la proteína codificada por éstos en las células o tejidos estudiados.

V.2. RESULTADOS

V.2.1. NUEVOS TRANSCRIPTOS

V.2.1.1. Estudio de células T84

Se decidió trabajar inicialmente sobre células T84, que son conocidas por producir gran cantidad de la proteína.

Se pensó en analizar los transcritos mediante la síntesis del ARN mensajero específico, seguida de la transcripción inversa a cADN de filamento simple, y de la amplificación por PCR, a partir de este cADN, de fragmentos seleccionados pertenecientes a la región comprendida entre los exones 8 y 11. En esa zona es dónde se dieron buena parte de los hechos descritos en la introducción (Riordan *et al.*, 1989, McDonald *et al.*, 1992) (ver página 99).

El estudio de estos amplificados permitiría saber si existían las distintas formas de ARN mensajero que preveíamos, en cuyo caso se obtendrían varios productos diferentes en una sola reacción.

Se extrajo entonces el ARN de las células, sobre este ARN se sintetizó un ADN copia de filamento simple, específico para la CFTR, usando para ello el oligonucleótido 13-3 (exón 13) como "primer" (ver materiales y métodos).

Este ADN copia fue sujeto a amplificación mediante PCR, usando los oligonucleótidos 8-5bis y 11-3, que amplificarán una región comprendida entre los exones 8 y 11. El producto de estas reacciones, corrido en un gel de agarosa

0,8%, mostró la existencia de dos bandas. Una correspondiente al fragmento ya conocido de 517 pares de bases, y otra minoritaria, que representa aproximadamente un 5% de la anterior, de un tamaño superior a ésta en algo más de 100 pares de bases, probando las suposiciones previas (ver **figura 10, calle 1**).

Podía tratarse todavía de bandas inespecíficas, que es un hecho muy común en PCR.

Para confirmar entonces la identidad de los productos se decidió efectuar sobre éstos un ensayo de "southern blot" identificatorio de regiones específicas, seguido de un mapa de restricción y, en función de los resultados, clonado y secuenciación de los amplificados.

El "southern blot", en el que se usó como sonda el oligonucleótido 10-5, que pertenece al exón 10, dio resultado positivo para ambos amplificados. Estos deben entonces ser específicos y poseer al menos parte del exón 10 del gen CFTR.

Fueron luego purificados separadamente los ADNs pertenecientes a cada banda y se realizaron cortes de restricción sobre ellos, usando las enzimas Bam HI y Ban I en ensayos independientes. Con Bam HI se esperaban dos fragmentos de 225 y 292 pares de bases respectivamente, y con Ban I, otras dos de 351 y 166. La digestión del producto de 517 pares de bases dio los resultados esperados, el corte con Bam HI del ADN de mayor medida dio bandas de 225 y aproximadamente 400 pares de bases y con Ban I de 351 y aproximadamente 270 pares de bases. Se deduce de aquí que perteneciendo las partes con la

medida correcta al extremo 5', debiera haber un inserto no identificado entre la parte 3' del exón 10 y el exón 11 (ver figura 11).

Para estudiar la secuencia de las bandas se procedió a purificarlas separadamente de un gel de agarosa y luego sobre cada fragmento se hizo: A) La secuenciación directa y B) El clonado en vector pUC18 cortado Sma I, luego de tratarlo para convertirlo en romo, y posterior secuenciación de clones así obtenidos.

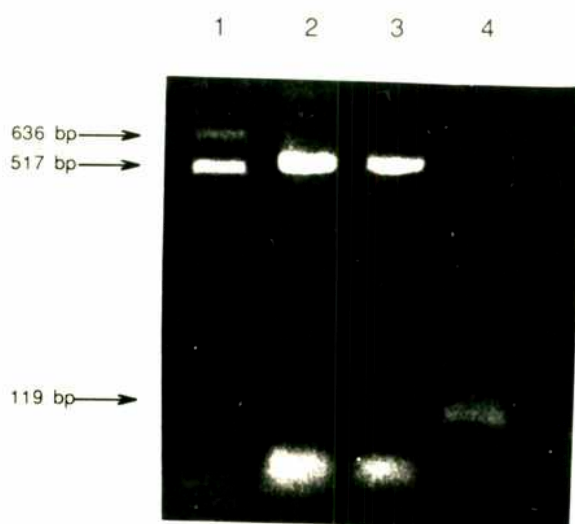
Las secuencias mostraron que el fragmento de 517 pares de bases es el esperado y que el fragmento mayor tiene un inserto de 119 pares de bases, ubicado en el cADN exactamente en la unión entre los exones 10 y 11 (ver figuras 12 y 13), en la posición donde previamente había sido visto un inserto en un ADN copia, justificado como una aberración (Riordan *et al.*, 1989). Al suponerlo producto de un "splicing alternativo" se lo llamó exón 10b. Tiene un codón de terminación en el marco de lectura, a la altura del primer NBF, (ver figura 14), por lo que el ARN que lo contiene generaría una proteína incompleta, de un peso molecular aproximado de 62.000 Dalton, (que llamamos proteína CFTR36 por ser el 36% de la proteína total, siguiendo el razonamiento usado para las proteínas apoB 48 y 100) y que poseería solo uno de los dos grupos transmembrana y parte del primer NBF, careciendo de la zona regulatoria R (ver figura 15).

Se debía ahora demostrar que el "splicing alternativo" era realmente tal y no un artificio de las reacciones, y que no era tampoco resultado de alguna

mutación en la línea celular estudiada, con este fin se decidieron seguir distintas líneas de trabajo:

- a) Buscar su presencia en cADN proveniente de otras células.
- b) Investigar en ADN genómico humano la existencia de la secuencia del 10b.
- c) Probar que éste se encuentra en el ADN genómico dentro del intrón comprendido entre los exones 10 y 11.
- d) Tratar de hallar en otro mamífero el mismo tipo de "splicing" en ADN copia.

FIGURA 10



En la foto se ve el resultado de las amplificaciones de distintos ADNs con los oligonucleótidos 8-5bis y 11-3.

Calle 1: cADN proveniente de células T84 muestra la existencia de dos productos, el esperado de 517 pares de bases y otro minoritario de 636 pares de bases.

Calles 2 y 3: En cADNs de queratinocitos (2) y de fibroblastos (3) sólo es detectable la forma 10b-, de 517 pares de bases.

Calle 4: Banda de 119 pares de bases obtenida amplificando cADN de T84 con los oligonucleótidos 10b-5 y 10b-3.

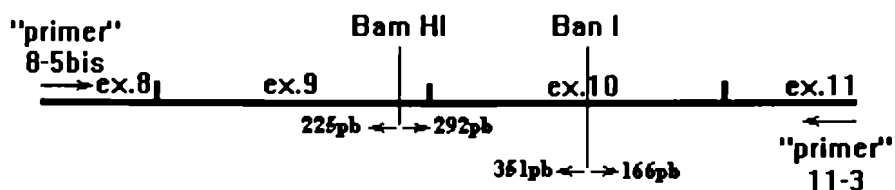
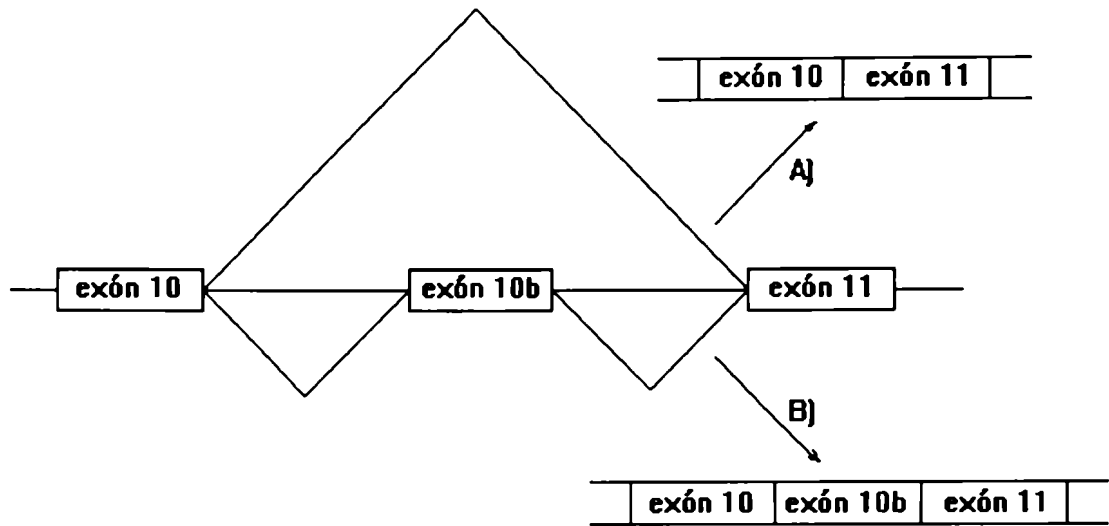


FIGURA 11

En la figura se ve la ubicación de los sitios de corte para Bam HI y Ban I en el fragmento del cADN comprendido entre los exones 8 y 11, que se amplificó con los "primers" 8-5bis y 11-3. El tamaño de los ADNs esperados de un corte de restricción por cada enzima está escrito en las flechas debajo de ellas.

El ADN proveniente de la banda de 517 pares de bases dio los cortes correctos. En cambio, para el ADN de mayor tamaño obtenido en la reacción de PCR, las restricciones dieron en ambos casos, para los fragmentos producidos de la parte 3', medidas mayores en más de 100 pares de bases a las calculadas. Los del lado 5' fueron los normales para estos ADNs.

Se deduce de esto que hacia el lado 3' de ambas enzimas hay, en el cADN de mayor tamaño, un inserto de algo más de 100 pares de bases. El inserto debe estar entonces en alguna posición entre la segunda mitad del exón 10 y la primera del 11.

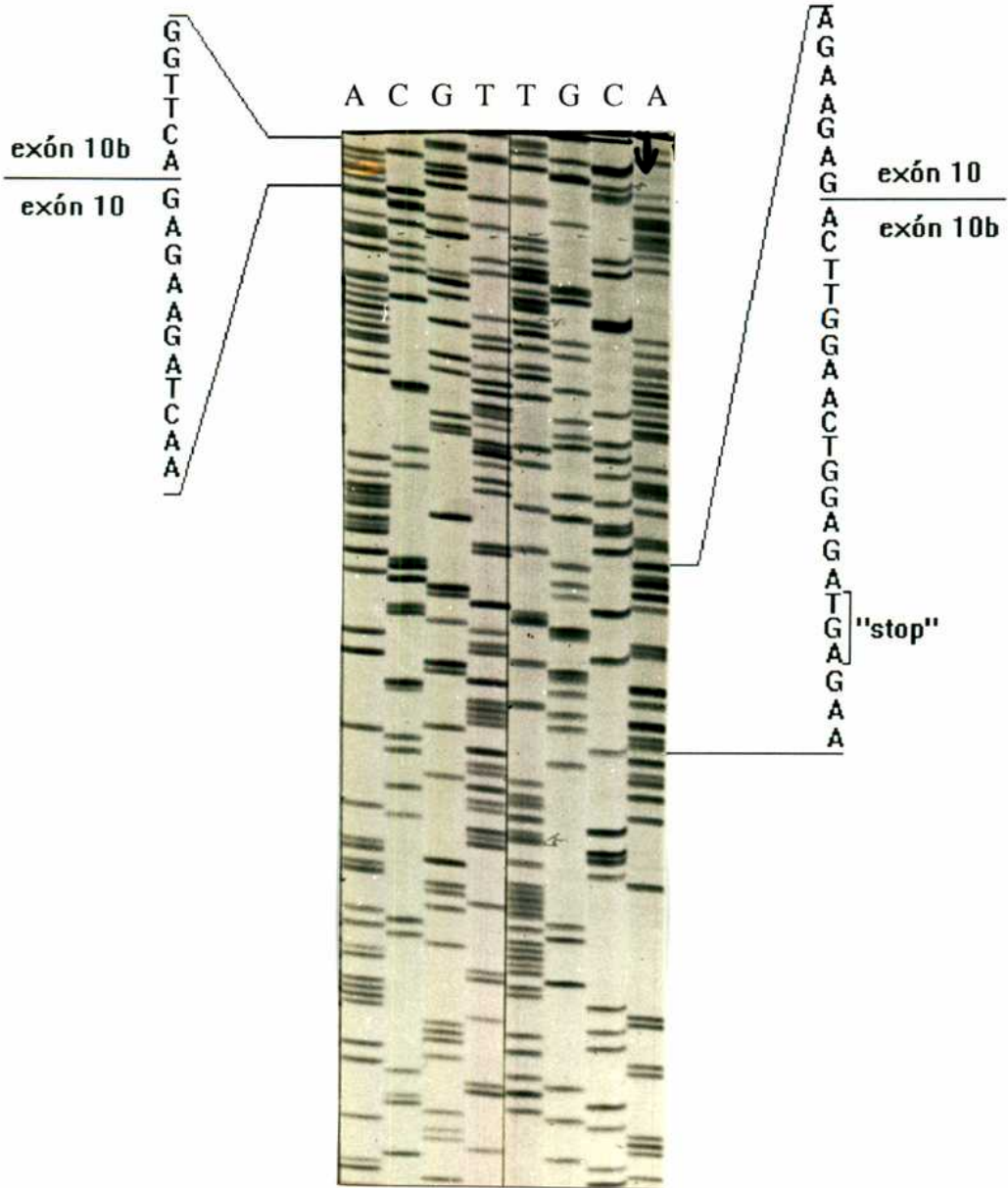


En la figura se ven los "splicing alternativos" en los que participa el exón 10b.

A) La remoción de toda la zona comprendida entre los exones 10 y 11 produce el cADN considerado normal hasta ahora.

B) Alternativamente pueden eliminarse en esta zona dos fragmentos intrónicos, dejando entonces al exón 10b incluido en el cADN resultante.

FIGURA 13



Las secuencias muestran, desde ambas direcciones, la unión entre el exón 10 y el 10b. Están hechas sobre un clon en pUC 18 del fragmento de 636 pares de bases que contiene parte del cADN de la CFTR comprendida entre los exones 8 y 11. Se señala el codón de "stop" en el marco de lectura y el sitio unión de los exones.

FIGURA 14

```

      exón 10      |                               exón 10b
CTA GAA GAG  ACT TGG AAC TGG AGA TGA gaacagaatattatcttcct
leu glu glu  thr trp asn trp arg OPA

                               exón 10b
catttttggtgtttttgttcaactctaagtctgcaaagcacttgcgatgtaatgat

      exón 10b      |      exón 11
gtcagtgatcataggagcaggcag gacatctccaa

```

La figura 14 muestra la secuencia del ADN copia del exón 10b de la CFTR humana y su traducción a proteína, además de un corto fragmento de las regiones flanqueantes correspondientes a los exones 10 y 11. La parte codificante se ve en mayúsculas. La unión entre los exones está evidenciada con la separación de las secuencias y una línea vertical.

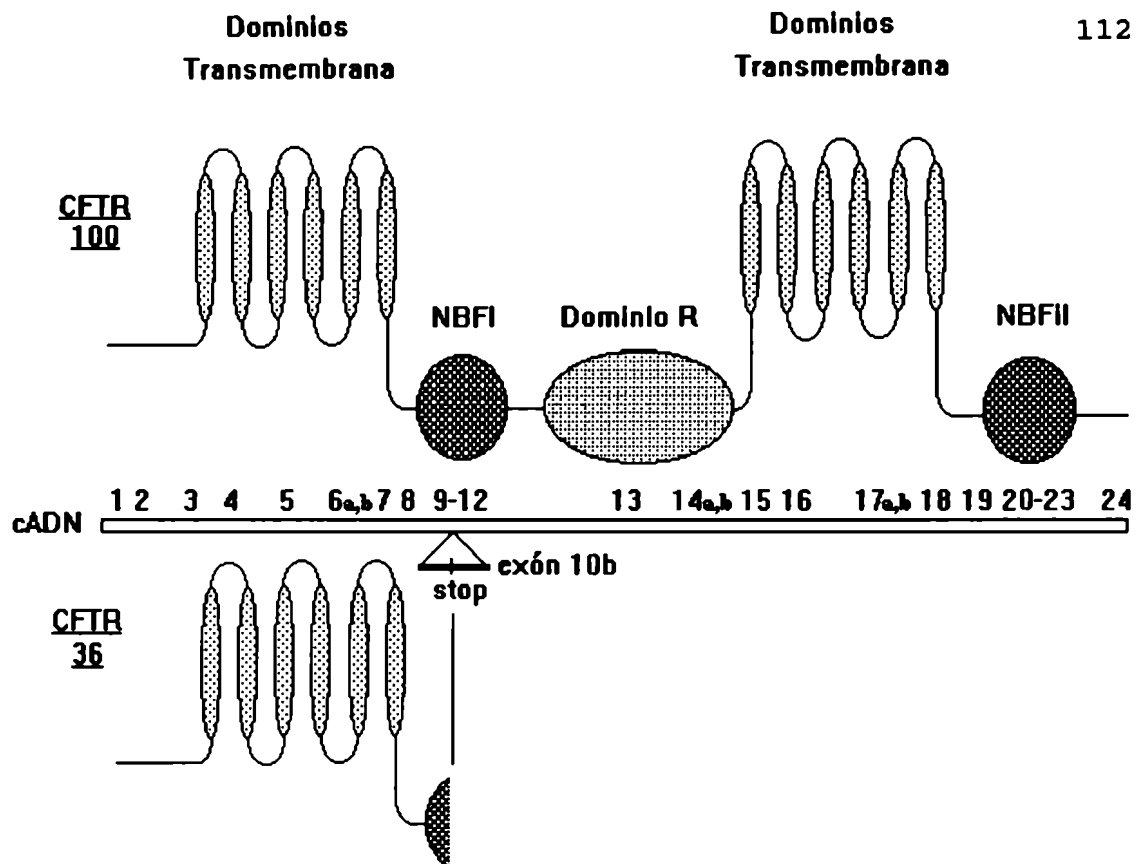


FIGURA 15

En la parte superior de la figura se ve esquemáticamente la proteína CFTR100. Se aprecia la distribución de los dominios, las dos regiones transmembranales, los dos NBF y la zona regulatoria R.

En la línea central está representado el cADN. Los números corresponden a los exones, que están ubicados en correspondencia con las regiones de la proteína para la que codifican.

En el croquis inferior se ve la proteína CFTR36. Se señala la posición del exón 10b, dónde se encuentra el codón de "stop". Como se ve la CFTR36 consta solamente de la primera región de seis dominios transmembrana y de una parte del primer NBF.

V.2.1.2. Nuevos transcritos en leucocitos humanos.

Es importante señalar aquí que muchos consideran como aberrante o como un fenómeno de transcripción ilegítima la existencia de ARN mensajero específico de la CFTR en leucocitos (Harris, 1991, Fonknechten *et al.*, 1992). Sin embargo hay pruebas de que el canal de cloruro dependiente de la proteína CFTR funciona en estas células lo que da entonces un significado fisiológico a la existencia allí del ARN mensajero (Bubien *et al.*, 1990, Graff *et al.*, 1991, Chu *et al.*, 1991b, Krauss *et al.*, 1992a y 1992b, McDonald *et al.*, 1992).

Se buscó, en ARN obtenido de leucocitos, el mensajero específico para la CFTR tal como se hizo para células T84, preparando ARN y luego ADN copia específico con el "primer" 13-3.

Se decidió usar los oligonucleótidos 11-3 y 7-5 para la reacción con leucocitos. El "primer" 7-5 amplifica a partir de la mitad del exón 7, de modo que no puede reconocer como templado el fragmento que va del exón 8 al 11, ya amplificado en el trabajo sobre las células T84. Se evita así el riesgo de amplificar contaminantes en lugar del ADN deseado.

Todo esto se hizo con material proveniente de 15 individuos normales.

Se esperaba hallar el transcrito CFTR100 y tal vez el CFTR36, en caso que existiera en este tipo de células. Se obtuvo en cambio un resultado imprevisto. Contrariamente a las células T84, donde las formas 10b+ y 10b- coexisten, en leucocitos sólo está presente en cantidades detectables una de las

dos dependiendo del sujeto estudiado. De las 15 personas estudiadas 5 fueron 10b+ y 3 fueron 10b-, en las otras 7 no se detectaron transcritos CFTR.

Harris, 1991 y Fonknechten, 1992, amplificaron esta zona sin ver más que las variantes conocidas (10b- con y sin el exón 9). . En ningún caso se hallaron transcritos 9- en este trabajo de tesis (ver figura 16).

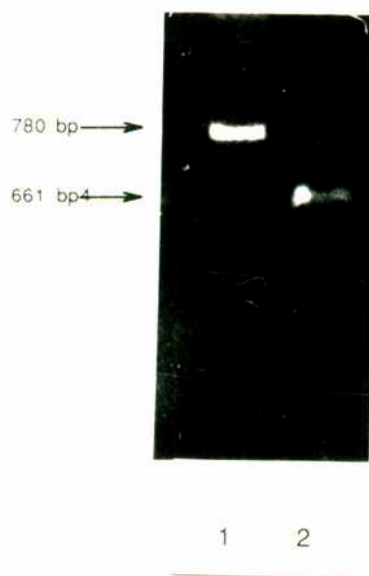
Se decidió ver si el tipo 10b+ dependía de alguna variable fisiológica y para ello se siguió analizando cada 30 días el ARN mensajero leucocitario de dos individuos 10b+ y dos 10b-. Después de 4 meses todos ellos mantenían su fenotipo, lo que descartaría que exista una relación entre el fenotipo (10b+ o 10b-) y la condición fisiológica del individuo.

Se trató entonces de estudiar una familia para ver si se trata de un carácter hereditario.

Se obtuvieron muestras de sangre de los padres de una persona 10b+ y se analizó el fenotipo leucocitario de éstos. Ambos padres resultaron ser 10b-, de modo que el tipo 10b+ no podría ser entonces hereditario dominante.

Un último ensayo fue el análisis de cADNs proveniente de leucocitos de pacientes de FQ. Sobre 6 muestras provenientes de distintos individuos, 2 fueron 10b-, 1 resultó ser 10b+ y en tres no se obtuvieron productos de amplificación. Este resultado sugiere que el fenotipo no depende tampoco de la enfermedad.

Se probó la existencia del "splicing alternativo" en un tipo de células distinto a las T84 . Habiendo obtenido un patrón de transcripción diferente en ambas, se decidió buscar más datos estudiando otras células.

FIGURA 16

En la foto se ven los productos de amplificaciones por PCR, hechas con los "primers" 7-5 y 11-3, sobre cADN de leucocitos de dos individuos, representativos del total estudiado. Uno posee en cantidad detectable solo la forma 10b+, el ADN amplificado es de 780 pares de bases (calle 1). Mientras que en el otro el amplificado es de 661 pares de bases, la única forma detectable en él es la 10b- (calle 2). No se observan amplificados 9-.

V.2.1.3. Nuevos transcritos en otros tipos de células

Se buscó la existencia del tipo 10b+ en tres clases de células distintas: CaCo2, que como las T84 provienen de cáncer de colon, queratinocitos y fibroblastos.

El sistema usado fue: Extraer ARN, preparar el ADN copia, y amplificar con los "primers" 8-5bis y 11-3 la región comprendida entre los exones 8 y 11 de la CFTR.

Células CaCo2: El resultado obtenido fue similar al de las células T84. Se encontraron presentes ambas variantes en una proporción aproximada 95/5 a favor de la forma 10b-.

Queratinocitos: Sólo se pudo detectar el ARN mensajero de la forma 10b+ (ver figura 10, calle 2). (El ARN de queratinocitos fue gentilmente facilitado por el Dr. Laurence Banks, ICGEB, Trieste, Italia).

Fibroblastos: Como en el caso anterior se encontraron solamente transcritos 10b- (ver figura 10, calle 3). (Los fibroblastos fueron cortésmente facilitados por el Dr. Claudio Schneider, ICGEB, Trieste, Italia).

Para aumentar la sensibilidad del ensayo se realizó un "southern blot" buscando transcritos 10b+ sobre los amplificadores provenientes de

queratinocitos y fibroblastos. Se usó como sonda el ADN de 119 pares de bases que resulta de amplificar el exón 10b de ADN copia de células T84 con los oligonucleótidos 10b-5 y 10b-3 (ver **figura 10, calle 4**). El resultado de "southern blot" fue también negativo.

Se ve entonces de los puntos V.2.1.1., V.2.1.2. y V.2.1.3. que: Dos líneas celulares provenientes de distintos cánceres de colon (T84 y CaCo2), poseen dos transcritos CFTR detectables. Otras dos líneas celulares, de queratinocitos y fibroblastos, poseen la forma 10b- y la 10b+ no es detectable. En leucocitos humanos se halla presente en forma detectable e individuo-específica solo una de las dos formas, aunque no se logró aún establecer de qué depende que se encuentre una o la otra en cada sujeto.

V.2.2. Presencia del exón 10b en ADN genómico humano

Los "primers" 10b-5 y 10b-3 fueron utilizados en ensayos distintos sobre ADN genómico extraído de leucocitos de cuatro individuos normales, para buscar en ADN genómico humano la secuencia del exón 10b .

En todos los casos se obtuvo un producto de la reacción de PCR de 119 pares de bases. Cada uno de estos productos fue sujeto a secuenciación directa y a secuenciación luego de tratarlo para convertir sus extremos en romos y clonarlo en plásmido pUC19.

Todas las secuencias realizadas coincidieron en un 100% con la correspondiente al ADN copia de las células T84.

Se probó aquí que el exón 10b se halla codificado en forma conservada dentro del ADN genómico humano.

V.2.3. Ubicación del exón 10b en el ADN genómico entre los exones 10 y 11

El intrón que separa los exones 10 y 11 tiene aproximadamente 15000 pares de bases (Rommens *et al.*, 1989a), y no ha sido secuenciado más que pocas bases flanqueando los exones. El exón 10b no está entre las regiones intrónicas ya conocidas. La prueba de que el exón 10b se halla codificado en ADN genómico entre los exones 10 y 11 puede hacerse entonces de dos modos: D) Amplificar por PCR ADN genómico, utilizando los "primers" 10b-3 y el 10-5. Esta combinación daría un producto en el que la parte 5' corresponde a una fracción del exón 10, seguida de la parte conocida del intrón, luego la zona aún no secuenciada de este intrón y, en el extremo 3', el exón 10b. Al no ser conocida la separación entre los exones no puede determinarse la medida del ADN a buscar, de modo que cualquier producto obtenido deberá ser secuenciado al menos en los extremos para demostrar que posee las características descritas.

Puede ser que el exón 10b esté demasiado lejos del 10 como para que la amplificación por PCR sea posible, y lo suficientemente cerca del 11 como para que funcione. Entonces el procedimiento a seguir sería el mismo utilizando los oligonucleótidos 10b-5 y 11-3 para amplificar por PCR. El producto debe tener en el extremo 5' al exón 10b, seguido de la parte no conocida del intrón y luego

la parte conocida de este intrón vecina al exón 11 seguida de éste en el extremo 3' del fragmento.

Se llevaron a cabo amplificaciones sobre ADN genómico humano con ambas combinaciones de oligonucleótidos y el resultado fue siempre negativo.

Se pensó entonces en aumentar la sensibilidad del método mediante una nueva reacción de PCR semianidada. Para ello se sintetizaron dos oligonucleótidos a ser usados en la primera ronda de PCR, que son: I) El 10-5bis, que está levemente a 5' del 10-5 dentro del exón 10 y que se usó para la primera reacción de amplificación con el 10b-3. Luego sobre una alícuota de este producto se reamplificó con los oligonucleótidos 10-5 y 10b-3. II) El 11-3bis, que está ubicado en el exón 11 encimado y ligeramente a 3' del 11-3. Se utilizó para una primera ronda de amplificación con el 10b-5, siendo el producto reamplificado con los "primers" 11-3 y 10b-5 (ver **figura 17**).

Las reacciones de PCR semianidadas no dieron tampoco producto alguno visible en gel de agarosa ni en un "southern blot" dónde se usó el exón 10b amplificado como sonda marcada. Es rutinaria en nuestro laboratorio la amplificación con éxito de fragmentos de más de 3500 pares de bases a partir de ADN genómico, muchas veces sin necesidad de usar la PCR semianidada. Se supuso entonces, lo que es perfectamente posible por la separación de los exones 10 y 11, que el exón 10b está tan alejado de ambos como para que la amplificación por PCR no sea posible, por ser el tamaño del ADN a amplificar demasiado grande.

II) El otro método es por "southern blot" de ADN genómico. Algunos microgramos de ADN son cortados con diferentes enzimas e hibridados en

ensayos distintos con sondas específicas para cada exón, 10, 10b y 11. Se buscan luego bandas de la misma medida que sean positivas para dos de las sondas al mismo tiempo, lo que significaría que al menos partes de ambas sondas están incluidas en dicha banda. Mediante una combinación de enzimas puede ser posible deducir la ubicación del exón 10b entre el 10 y el 11.

En este punto se recibió, por cortesía del Doctor P. Scambler un clon de fago λ (Koller *et al.*, 1991), que posee clonado ADN genómico de ratón, incluyendo el exón 10 de la CFTR y parte del intrón hacia el exón 11. El exón 10 está ubicado en el extremo 5' del inserto. Si encontramos en este clon el homólogo de ratón del exón 10b humano habremos probado que se halla ubicado en el intrón que separa los exones 10 y 11.

Se vio interesante la búsqueda en este fago de una secuencia homóloga al exón 10b humano, ya que serviría también como una prueba más de apoyo a los resultados ya obtenidos. En caso de hallarla, establecía además la ubicación en el gen del exón 10b por un método mucho más sencillo que el "southern blot" sobre ADN genómico.

Para ello se analizó a través de un ensayo "southern blot" la presencia en el clon de secuencias similares al exón 10b humano, usando como sonda el fragmento de 119 pares de bases amplificado con los oligonucleótidos 10b-5 y 10b-3 sobre ADN genómico humano .

El fago fue cortado separadamente con las enzimas Eco RI, Hind III, Sal I e Hinf I y el producto de cada corte se usó en el análisis. El resultado muestra que el equivalente genómico al exón 10b de ratón está incluido en fragmentos de cerca de 3000 pares de bases flanqueados tanto por Eco RI como por Hind

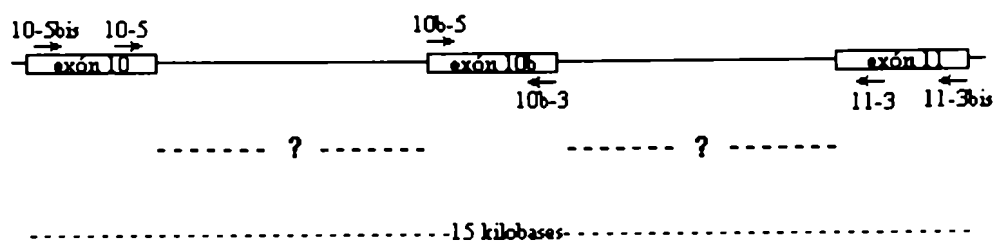
III, de 14000 bases flanqueado por Sal I, y se halla contenido en un pequeño trozo de aproximadamente 400 pares de bases que resulta de la digestión con Hinf I (ver figura 18).

Se tuvo entonces una prueba importante de la existencia de un ADN de ratón lo suficientemente homólogo del exón 10b humano como para hibridar con éste en condiciones de estrictez más o menos rigurosas (65 °C, SSC 1X), (para simplificar se llamará R10b a este ADN, porque no puede llamarse exón al no haber sido aún detectada su presencia en ARN mensajero). El próximo paso fue aislar esta región homóloga y secuenciarla para compararla con la humana.

Se decidió intentar amplificar el R10b utilizando los "primers" del exón 10b humano (10b-5 y 10b-3). Dependiendo de la ubicación de las homologías entre los "primers" y el R10b se podía o no obtener algún producto. En efecto, según las condiciones usadas, es a veces posible obtener buenos resultados en una reacción de amplificación por PCR en la que se emplean "primers" no perfectamente homólogos al ADN a amplificar. Solo la parte 3' de los oligonucleótidos debe ser obligatoriamente igual al ADN usado como templado. El experimento resultó en la obtención de un fragmento de poco más de 100 pares de bases.

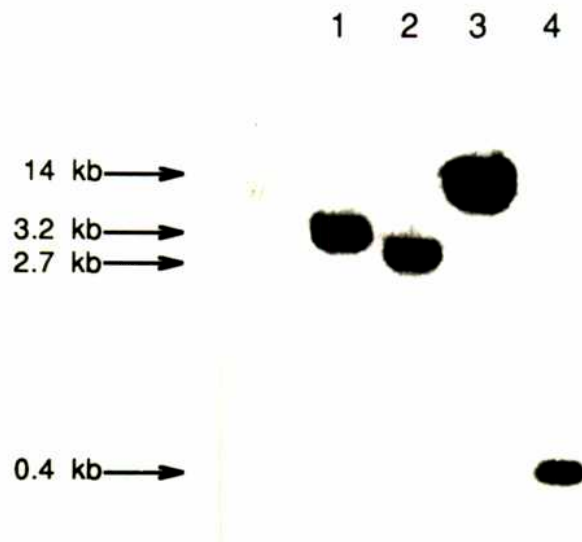
Éste fue secuenciado en forma directa en los dos sentidos, con los oligonucleótidos 10b-3 y 10b-5 respectivamente. Resultó tener 117 pares de bases. Las 17 ubicadas en el extremo 5' y las 21 del extremo 3' correspondían a los "primers" usados para amplificar, ya que la reacción de PCR "humanizó" estas zonas. De las 79 bases intermedias que eran parte del R10b, 58 coincidían con la secuencia humana.

FIGURA 17



En la figura 17 puede verse un esquema de la amplificación por PCR semianidada intentada. Los rectángulos representan los exones 10, 10b y 11. Las líneas enteras son los intrones y las líneas punteadas señalan la cantidad de bases que separa los exones. La separación entre los exones 10 y 11 es de 15 kilobases, la separación entre el exón 10b y cada uno de los otros no es conocida. Si alguna de estos intrones de tamaño desconocido fuese menor de 3500 bases sería posible amplificarlo usando las combinaciones de "primers" explicadas en las páginas 118 y 119 y cuya ubicación se señala en el gráfico.

FIGURA 18



La foto muestra el resultado del "southern blot" efectuado sobre el clon de ADN genómico de ratón en fago λ , hibridado con el exón 10b humano. El fago incluye al exón 10 y parte del intrón que va hacia el exón 11,

En la calle 1 el fago fue cortado con Eco RI, en la 2 con Hind III, en la 3 con Sal I y en la 4 con Hinf I. Se obtienen bandas positivas a 3200, 2700, 14000 y 400 pares de bases respectivamente. En la calle siguiente a la 4 (no numerada), se corrió fago λ cortado Hind III que se usó como marcador de peso molecular y control negativo.

Faltaba conocer las regiones intrónicas que flanquean el exón y la secuencia real de las zonas correspondientes a los oligonucleótidos usados para amplificar, para establecer con estos datos: I) El % de homología con el exón 10b humano. II) La existencia del codón de "stop" en el marco de lectura. III) Comparar la región intrónica con las secuencias consenso de "splicing" para justificar la existencia de este proceso en ratones, en caso de hallarlo .

Se pensó en secuenciar en forma directa el fago usando "primers" ubicados en la región de ratón ya conocida. Se sintetizaron los oligonucleótidos M10b-5int y M10b-3, que permiten "leer" cada uno en un sentido distinto.

Se hicieron las reacciones de secuenciación y reiteradamente se fracasó en el estudio de la zona 5' con el "primer" M10b-3. Con el M10b-5int se pudo conocer el extremo 3' del R10b, así como la secuencia flanqueante en la misma dirección.

El fracaso del análisis del fago para hallar los datos correspondientes a la secuencia nucleotídica flanqueante en la dirección 5', se debió probablemente a problemas que hubo en crecer y purificar la cantidad de fago suficiente.

Ya que la cantidad de ADN de partida no es tan crítica para la PCR inversa semianidada se decidió seguir este camino (Ochman *et al.*, 1989, Ochman *et al.*, 1990). Se utilizaron los "primers" M10b-5int y M10b-3 para una primera ronda de amplificación y M10b5-anti y M10b-3 para la segunda, seguida de secuenciación directa hecha con el oligonucleótido M10b-3 (ver **figura 4 en página 70**).

El ensayo fue exitoso y se pudo entonces determinar con precisión las zonas flanqueantes y la secuencia del R10b. Éste resultó tener 120 pares de

bases con una homología del 74% con el exón 10b humano. Posee también como éste un codón de "stop" en el marco de lectura, (ver figuras 19 y 20) aunque desplazado 75 bases hacia el extremo 3'. En caso de ser transcrito y traducido produciría una proteína 25 aminoácidos más grande que la humana (ver figura 21).

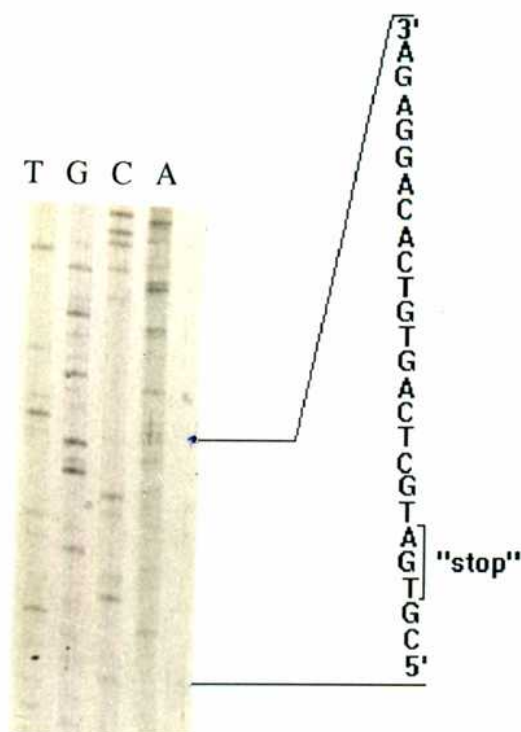
El estudio de la región flanqueante en sentido 5', suponiendo que el R10b fuese un exón que se inicia en la misma posición que el humano, mostró que posee una secuencia perfectamente consenso en la región que está -40 del sitio supuesto de "splicing" (Mount, 1982, Padgett *et al.*, 1986, Krainer *et al.*, 1988). De las 20 bases ubicadas entre +1 y -19, 7 no corresponden al consenso (ver figura 22).

En los sitios de "splicing" del gen CFTR humano, el número de bases no coincidentes con el consenso es alrededor de 4 para cada exón en la misma región (Zielinski *et al.*, 1991a).

Se probó entonces que existe en ratón una secuencia de ADN que es 74% homóloga al exón 10b humano. Está ubicada en el ADN genómico en el intrón que separa los exones 10 y 11.

Del estudio de las regiones flanqueantes no codificantes y la homología mencionada se desprende la posibilidad de que sea transcrita.

FIGURA 19



La foto muestra la secuencia directa hecha sobre fago λ con el "primer" M10b-5int. Aunque la calidad de la foto no es buena, en la radiografía original puede leerse la secuencia sin dudas. Se señala una parte de la secuencia en la que se marca el codón de "stop" en el marco de lectura (si el sitio supuesto de "splicing" es el real). Para saber que este codón estaba en el marco de lectura fue necesario hacer la secuenciación de la parte 5' del ADN, que se realizó sobre el producto de la reacción de PCR circular.

FIGURA 20

```

Ratón
gcatgacctgtggacggtcccatttgcgaaaccagacattcatgactctgtttgcac

Ratón
tctgactgctgaagttgatctgtttctcagtgtgctgcatcaagGCTTGGGAATCAGAG
                                 :::::   :::
                                 ACTTGGAACTGGAG

Humano

Ratón
ATGGGGATGGGATATCCTCCTTCCTCATGCTTGTGATTTTGTTCAACTCCGAGATCTTC
::: : : : :::: ::::: : :::: : ::::: : ::::: : ::::: : ::::: :
ATGAGAACAGAATATTATCCTCCTCATTTTTGTGTTTTTGTTCAACTCTAATGTCTGC
Humano

Ratón
AAAGTCCCTGTGTGTCGTGATGCT---CAGTGTACAGGAGAATGTGAGTgtggaag
::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
AAAG-CACTTGCGTAT-GTAATGATGCTCAGTGTACATAGGAGCAGG-CAG-

Humano

Ratón
ggcaagcaatgcacaacg

```

En la figura 20 puede verse en letras mayúsculas la secuencia de ADN genómico de ratón homóloga al exón 10b humano y su comparación con éste. Las homologías están señaladas con dos puntos. El hipotético sitio dador de "splicing" para ratón, siendo algo diferente de las secuencias consenso, fue supuesto porque GTgtg es el lugar de "splicing" del exón 22 del gen CFTR. El sitio aceptor de "splicing" es más predecible. Para éste existe una cierta secuencia consenso "upstream", que señala una posición coincidente con la ubicación en que ocurre el proceso en humanos. De todos modos la posición real sólo podrá determinarse definitivamente si se encuentra y secuencia el ADN copia de ratón. Los codones de "stop" en el marco de lectura se encuentran subrayados. En letras minúsculas se ven la secuencias que flanquean al R10b.

FIGURA 21

		10		10B
Ratón	SYDEYRYKSVVKACQLQQ			AWNQRWGDILFLMLVILFNSEIFKVPCVSO <u>PA</u>
	: : : : :	: :		: : :
Humano	SYDETRTRSVIKACQLEE			TWNW <u>ROPA</u>

En la figura 21 se muestra la secuencia aminoacídica carboxi-terminal de la proteína CFTR36. Corresponde a la traducción de la última parte del exón 10 y al R10b de ratón (en caso que fuera traducido). Las homologías con la secuencia humana están marcadas con dos puntos. Los "stop" están subrayados, y se usa el código de una letra para los aminoácidos. El comienzo del exón 10b está señalado con la separación de las secuencias y una línea vertical .

FIGURA 22

```

          -40          -30          -20          -10          +1          +10
          .           .           .           .           .           .
gcactctgactgctgaagttgatctgtttctcagtgctgcatcaagGCTTGGAAATC
  :::::           :::  :  :  :  :  :  :  :  :
ynytray          YYYYYYYYYYYYYYYYYnyagG

```

En la figura se ve en letras minúsculas la secuencia a 5' del R10b (que está escrito en mayúsculas). La segunda línea muestra las secuencias consenso de "splicing" según Mount, 1992. Con dos puntos se señalan las bases del gen de ratón que coinciden con el consenso.

y = T o C r = A o G n = A o C o G o T

V.2.4. Búsqueda de transcritos 10b+ en ratón

Habiendo estudiado la zona de ADN genómico del ratón correspondiente al R10b, y siendo conocida la secuencia completa del ADN copia de la CFTR de este animal, se decidió buscar transcritos 10b+ en distintos tejidos de ratón (Tata *et al.*, 1991).

La escasa cantidad de material que puede obtenerse de un solo ratón hizo que para algunos tejidos debieran utilizarse juntas muestras provenientes de varios animales.

Se buscaron inicialmente transcritos 10b+ sobre ADN copia de simple cadena, sintetizado usando "primer" poliT, a partir de ARN extraído de 5 ml de sangre. Se amplificó el ADN copia con los oligonucleótidos M10-5 y M10b-3 sin obtener resultados. Se intentó amplificar el transcritos 10b-, con los "primers" M10-5 y M11-3, pero tampoco se obtuvieron resultados.

Se buscaron entonces transcritos 10b+, por PCR semianidadas, usando para la primera ronda de amplificaciones la combinación M10-5ex, que se ubica en el gen ligeramente hacia 5' del M10-5, y M10b-3, y en la segunda ronda los "primers" M10-5 y M10b-3. Nuevamente no se obtuvo producto de amplificación alguno detectable en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Un "southern blot", hibridado con el ADN resultante de amplificar el R10b con los "primers" humanos 10b-5 y 10b-3 del R10b de material genómico, tampoco mostró resultados. La reacción semianidadada para el fragmento 10b- dio en

cambio la banda esperada de 183 pares de bases, aunque la cantidad de producto fue muy baja.

Se pensó que tal vez en ratón la transcripción de la CFTR en leucocitos es tan escasa que apenas alcanza para detectar el producto mayoritario, y ésto sólo después de una PCR semianidada.

Se intentó entonces el mismo procedimiento sobre pulmones, en los que se esperaba que hubiera más transcritos. El resultado fue, como en el caso anterior, negativo.

No se pudieron detectar tampoco transcritos 10b+ en intestinos y en un homogenato hecho con el total de los órganos de un animal.

En conclusión no se pudieron encontrar ARN mensajeros específicos para la CFTR del tipo 10b+ en ratones y los mensajeros 10b- fueron detectados en muy escasa cantidad y sólo después de una reacción de PCR semianidada. Puede ser que los métodos usados carecieran de la sensibilidad necesaria, los "primers" elegidos no fueran los mejores o en este animal el "splicing alternativo" buscado no se produce. Por ejemplo la fibronectina tiene 20 "splicing alternativos" diferentes en humanos, 12 en ratas y sólo 8 en pollos (Kornblihtt *et al.*, 1985, Schwarzbauer *et al.*, 1987, Norton *et al.*, 1987).

V.2.5. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA CFTR36

Un resultado muy importante del trabajo en este punto era demostrar que el transcripto hallado es traducido en proteína, porque sería la primera variante proteica de la CFTR encontrada.

Para detectar la proteína CFTR36 era necesario contar con anticuerpos específicos para algún epítoto desplazado hacia el extremo N-terminal en comparación con el exón 11. Nuestra proteína, de existir, no posee las regiones codificadas del exón 11 incluido en adelante. Los anticuerpos contra la proteína CFTR no son comerciales y sólo pueden obtenerse mediante la cortesía de quien los desarrolló o haciéndolos por cuenta propia. El segundo proceso implicaba en el mejor de los casos algunos meses de trabajo, de modo que se buscó quién nos pudiera facilitar el material. El Dr. A. Pavirani de Transgene, Estrasburgo, Francia, gentilmente nos envió el anticuerpo monoclonal anti-CFTR llamado MATG 1061, que reconoce un epítoto codificado por el exón 10 (ver materiales y métodos, página 80).

En el tiempo de espera del anticuerpo se decidió agregar una nueva prueba al trabajo. La demostración de que el exón 10b se halla presente en una molécula de mRNA que, al menos en la parte 5' codificante, está completa.

El método seguido fue amplificar a partir de ADN copia de células T84, un fragmento de 1770 pares de bases (exones 1 al 10b inclusive). Ya que el ADN a amplificar era relativamente grande y no muy abundante, llevamos a

cabo una reacción semianidada con una primera ronda de amplificaciones usando los oligonucleótidos 1-5 y 13-3 y la segunda usando los "primers" 1-5 y 10b-3.

Se obtuvo la banda esperada, visible en gel de agarosa. Este ADN fue clonado y secuenciado, habiéndose hallado que la secuencia es la ya descrita para la CFTR del exón 1 al 10 (Riordan *et al.*, 1989), con el agregado del exón 10b en su extremo 3' (ver figura 23).

El resultado de este trabajo nos animó aún más a buscar la proteína CFTR36 cuyo hallazgo sería la prueba de un posible significado fisiológico del "splicing alternativo" descubierto. Se hizo sobre células T84 y CaCo2, en las que se sabe que existe cuantitativamente la mejor transcripción entre los sistemas que se estudiaron.

Se esperaba hallar una proteína que tal vez no fuera lo suficientemente abundante como para ser detectada en un ensayo de "western blot", por lo que se decidió buscarla mediante una inmunoprecipitación. Se marcaron las proteínas con ^{32}P , que se incorpora en los sitios de fosforilación, o con metionina marcada con azufre agregada al medio de cultivo de las células, de modo que las proteínas sintetizadas incorporen el radiactivo en sus metioninas.

En el ensayo realizado marcando las proteínas con ^{32}P se detectó solamente la CFTR100 en ambos tipos de células con el anticuerpo MATG 1061. El anticuerpo OKT4, no específico para la CFTR, no evidenció a la proteína. Este resultado es lógico ya que la CFTR36 no posee la región R que es donde se hallan la mayor parte de los sitios de fosforilación, de modo que no

resulta marcada con fósforo y no puede verse en las radiografías (ver **figura 24**).

Cuando se marcaron las proteínas celulares con metionina radiactiva, que debe marcar tanto a la CFTR100 como a la CFTR36, se vio en las células T84 y en las CaCo2 que el anticuerpo MATG 1061 evidenciaba, entre muchas otras bandas menores, la correspondiente a la CFTR100 y la de 62 kD que corresponde a la CFTR36. Se repitió el proceso usando el anticuerpo de control OKT4, en este caso se vieron casi todas las bandas menores pero no las asignadas a las CFTRs, con lo que se prueba la especificidad del resultado (ver **figura 25**).

La relación proteína CFTR100/ proteína CFTR36, como se ve claramente en la figura, es menor que la esperada en función de la abundancia relativa de los ARN mensajeros correspondientes, lo que puede reflejar una diferencia en la eficiencia con que las proteínas son inmunoprecipitadas.

Se repitió el experimento completo una segunda vez obteniéndose los mismos resultados (ver **figura 26**).

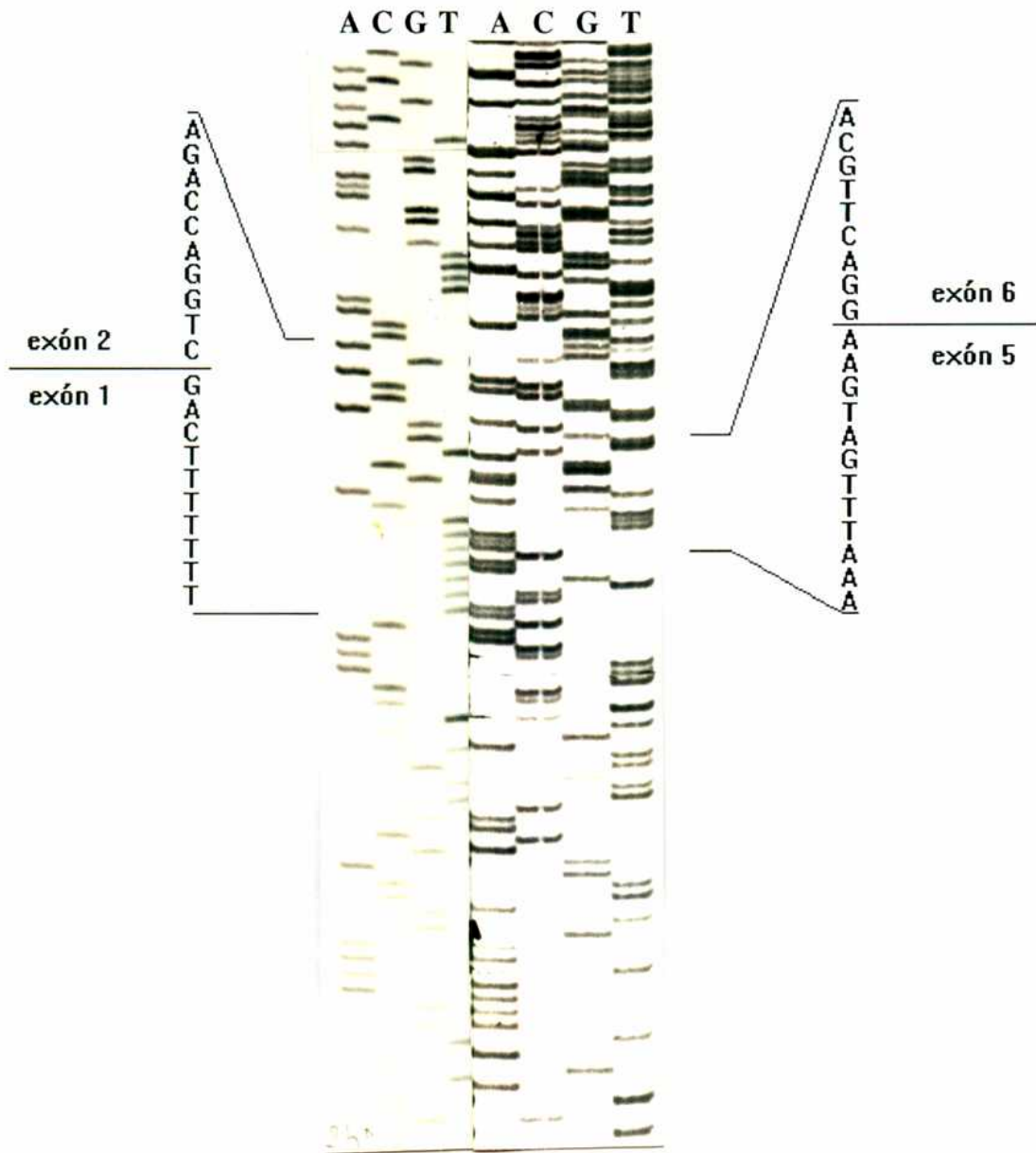
Se obtuvieron entonces pruebas de considerable peso de la existencia de la proteína CFTR36. La especificidad del resultado se demuestra en que el anticuerpo no específico para la CFTR, en ambos tipos de marcado, así como el específico MATG 1061, cuando se marcó con ^{32}P , no reconocieron proteína alguna de 62 kD

La proteína CFTR36 presenta un gran paralelo con la apolipoproteína B, donde un "editing" genera un codón de "stop" que hace sintetizar una proteína con sólo el 48% aminoterminal de la normal, la apo B48 carece de regiones involucradas en muy importantes funciones, como la interacción de la apolipoproteína B con los receptores en la superficie celular de las lipoproteínas de baja densidad (Powell *et al.*, 1987). También en este caso la proteína CFTR pierde una gran parte de la porción carboxi-terminal que incluye una región transmembranal, una de unión de nucleótido y la única región reguladora R, donde se hallan la mayoría de los sitios sustrato para quinasas de proteína.

Como se mencionó anteriormente la proteína CFTR posee varias actividades distintas difícilmente asignables a la proteína CFTR100. Se debe determinar cual es la función de la proteína CFTR36. Se sabe que no forma por sí sola el canal de cloruro de la CFTR, porque se ha probado que una proteína CFTR troncada en una posición bastante similar a la CFTR36 (pocos aminoácidos más corta) en un modelo animal en ratones, genera una obstrucción intestinal similar a la que produce la FQ, llevando a la muerte de los animales en menos de treinta días de su nacimiento (Snouwaert *et al.*, 1992). Fue también descrita una forma grave de la enfermedad producida por una variante genética que da una proteína CFTR ligeramente mas corta que la proteína CFTR36, ya que el ARN mensajero tiene un codón de "stop" para la posición aminoacídica 515, (Ivaschenko *et al.*, 1991). La proteína resultante es entonces parecida a la CFTR 36 que termina en la posición 528 más 5 aminoácidos codificados por el exón 10b.

La proteína CFTR36 puede tener alguna otra función crítica. Sería por ejemplo interesante ver si existe algún fenotipo común a los pacientes que poseen codones de "stop" cerca del exón 11, así como estudiar si, en células que no expresen proteína CFTR, transfectadas con el gen CFTR36, se produce algún fenómeno asignable a la proteína.

FIGURA 23



En la figura se muestran dos secuencias hechas sobre un fragmento de cADN que abarca desde el exón 1 al 10b clonado en pUC18. En la radiografía de la izquierda se ve parte de los exones 1 y 2 y su unión. en la de la derecha se leen partes de los exones 5 y 6 y su unión.

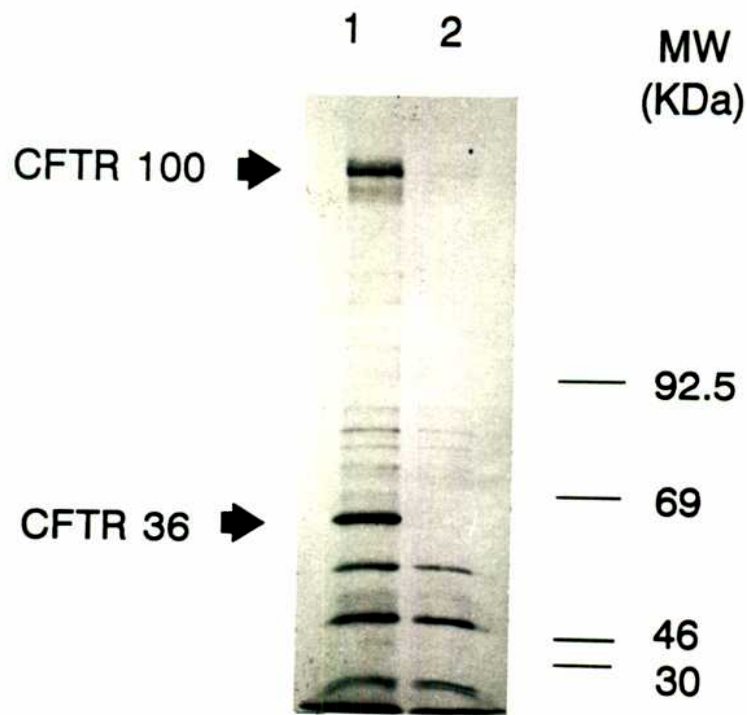
FIGURA 24



La foto muestra el resultado de la inmunoprecipitación efectuada sobre células T84 y CaCo2 marcando las proteínas con ^{32}P . Sobre las calles se ve el tipo de célula usado y debajo de ellas el anticuerpo con que se inmunoprecipitó.

Al nivel de 62 kD no hay bandas evidentes. La única banda neta obtenida con el anticuerpo específico que no se ve en las calles con el anticuerpo de control corresponde a la CFTR100.

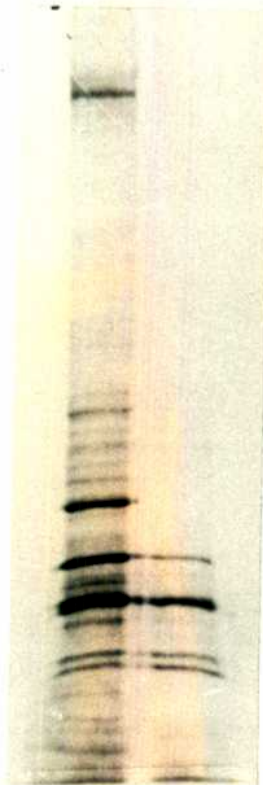
FIGURA 25



La foto corresponde a la primera inmunoprecipitación hecha sobre proteínas de células T84 marcadas con metionina.

En la calle 1, que corresponde a las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo específico MATG 1061. Se ven, señaladas con flechas, las bandas correspondientes a la CFTR36 y a la CFTR100. La especificidad de las bandas se demuestra en la calle 2, en la que se usó el anticuerpo OKT4. Mientras allí se repiten la mayor parte de las otras bandas no hay señales de las asignadas a las proteínas CFTR36 y CFTR100.

FIGURA 26



1 2

En la foto se muestra el resultado de la repetición de la inmunoprecipitación hecha sobre proteínas de células T84 marcadas con metionina radiactiva. Son nuevamente visibles en la calle 1, que corresponde al anticuerpo específico, las bandas de la CFTR36 y la CFTR100. Dichas señales no se repiten con el anticuerpo inespecífico en la calle 2, mientras que la mayor parte de las otras bandas son inespecíficas porque se ven en ambas calles.

V.2.6. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO DE ISOFORMAS

Se analizó extensamente y en distintos tejidos humanos la región que corresponde a los exones 8 a 11 del ARN mensajero específico para la CFTR, encontrando la existencia de un "splicing" alternativo que da lugar al agregado de un nuevo exón (10b) de 119 bases entre los exones 10 y 11. Este nuevo exón introduce un codón de "stop", por lo que genera una proteína, truncada con respecto a la original, de sólo 62 kD contra los 168kD de la proteína completa.

Del total de ARN mensajero CFTR, la proporción de la forma 10b+ varía según el tipo de célula. Mientras que es la única forma que se vio en leucocitos de ciertos individuos, no es detectable en leucocitos de otros. Es el 5% en células de cáncer de colon y no se encontró en fibroblastos y queratinocitos.

Se probó la existencia en el genoma humano de la secuencia codificante para el exón 10b y se aisló y secuenció su homólogo de ADN genómico de ratones, éste tiene un 74% de homología con el humano, y posee también un codón de "stop" en el marco de lectura, las semejanzas sugieren que el R10b podría ser un exón funcional. Se comprobó que se halla ubicado en el intrón que separa los exones 10 y 11.

Se probó concluyentemente por primera vez la existencia de una variante proteica de la CFTR, ya que hasta el momento sólo fueron hallados transcritos distintos del original, pero nunca las proteínas correspondientes.

Hasta hoy las detecciones hechas con sondas o anticuerpos específicos para la CFTR de ARNs mensajeros o proteínas distintas a la proteína CFTR100 fueron sistemáticamente consideradas aberraciones o artificios y nunca estudiadas seriamente (Riordan *et al.*, 1989, McDonald *et al.*, 1992, Zeitlin *et al.*, 1992). La aparición de la proteína CFTR36 puede cambiar este modo de pensar fomentando el estudio de otras posibles isoformas.

Aunque al momento sólo se puede especular sobre las funciones de la proteína CFTR36, se abre un interesante campo de estudio para conocer su vinculación en algunos mecanismos en los que podría intervenir, como por ejemplo:

a) El ORCC, un tipo de canal de cloruro con propiedades fisiológicas y bioquímicas diferentes del canal producido por la proteína CFTR, es activado con PKA sólo en células que expresan la CFTR normal. Ésta no forma parte del canal pero posiblemente lo regula. Entre los muchos modos posibles de regulación se puede pensar en una interacción directa de la proteína CFTR con la ORCC en la membrana apical de las células. Puede ser también que la regulación del ORCC sea consecuencia de la función de la CFTR como canal (Higgins, 1992a, Egan *et al.*, 1992).

b) La formación de un canal de cloruro puede ocurrir como consecuencia de una interacción intermolecular entre los dominios transmembranales de moléculas de proteína CFTR36, en lugar de intramolecular como se sugiere para la proteína CFTR100. Existe un ejemplo recientemente descrito de este tipo de canales (Collins, 1992a, Paulmichl *et al.*, 1992).

c) La proteína CFTR36 puede intervenir en los procesos celulares de endocitosis y exocitosis (Bradbury *et al.*, 1992).

d) Otras actividades asignables a la CFTR vistas en neutrófilos, fagocitos mononucleados y granulocitos (Regelmann *et al.*, 1991, Graff *et al.*, 1991, Saak *et al.*, 1990).

No tienen aún explicación lógica las inconsistencias entre la disfunción de un canal de cloruro de baja conductancia con una relación lineal voltaje-corriente como el que produce la CFTR, y el fenotipo de los enfermos de FQ (Higgins, 1992b, Barinaga, 1992). La proteína CFTR36 y otras isoformas podrían ser la respuesta, a través de las actividades mencionadas o de otras funciones todavía no descubiertas.

La mayor comprensión de los mecanismos con los que actúan la proteína normal y la mutada llevan al mejoramiento de la interpretación de los hechos referidos a la enfermedad, y ello a la posibilidad de hallar mejores terapias. Variantes proteicas como la CFTR36 deberán ser tenidas en cuenta en las implicaciones funcionales de cada mutación anterior al exón 11 y en cada diseño de terapia génica.

Nuestro descubrimiento sitúa a la CFTR como un sistema mucho más complejo del supuesto hasta hoy de proteínas codificadas por un solo gen, y abre caminos de no poca importancia para el estudio de la fibrosis quística.

VI. Publicaciones

Partes de este trabajo de tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

1) Melo, C., Serra, C., Stoyanova, V., Aguzzoli, C., Faraguna, D., Tamanini, A., Berton, G., Cabrini, G y Baralle, F.. *"Alternative splicing of a previously unidentified CFTR exon introduces an in frame stop codon 5' of the R region"*.

Aceptado para su publicación en *Proc. of the Natl. Acad. Sci. USA*.

2) Aguzzoli, C., Serra, C., Melo, C., Giglio, A., Faraguna, D. y Baralle F..

"Un metodo rapido per l'identificazione delle mutazioni $\Delta F508$ e 1677 in pazienti con fibrosi cistica". Aceptado para su publicación en *Clinica e laboratorio*.

VII. REFERENCIAS

Alton, E., Caplen, N., Geddes, D. y Williamson, R. (1992). *British Med. Bull.* **48**, 785-804.

Ames, G., Immure, C. y Shyamala, V. (1990). *FEMS Microbial. Rev.* **6**, 429.

Anderson, M., Gregory, R., Thompson, S., Souza, D., Paul, S., Mulligan, R., Smith, A. y Welsh, M. (1991a). *Science* **253**, 202-205.

Anderson, M., Berger, H., Rich, D., Gregory, R., Smith, A. y Welsh, M. (1991b). *Cell* **67**, 775-784.

Anderson, M., Rich, D., Gregory, R., Smith, A. y Welsh, M. (1991c). *Science* **251**, 679-681.

Anderson, M. y Welsh, M. (1992). *Science* **257**, 1701-1704.

Barasch, J., Gershon, M., Nunez, E., Tamir, H. y Al Awquati, Q. (1988). *J. Cell Biol.* **107**, 2137-2147.

Barasch, J., Kiss, B., Prince, A., Saiman, N., Gruenert, D. y Al-Awquati, Q. (1991). *Nature* **352**, 70-73.

Barbry, P. (1992). *Médecine* **8**, 160-162.

Barinaga M.(1992). *Science* **256**, 444-445.

Beaudet, A., Bowcock, A., Buchwald, M., Cavalli-Sforza, L., Farrall, M., King, M., Klinger, K., Lalouel, J., Lathrop, G., Naylor, S., Ott, J., Tsui, L., Wainwright, B., Watkins, P., White, R. y Williamson, R. (1986). *Am. J. Hum. Genet.* **39**, 681-693.

Bear, C., Li, C., Kartner, N., Bridges, R., Jensen, T., Ramjeesingh, M. y Riordan, J. (1992). *Cell* **68**, 809-818.

Boat, T., Welsh, M. y Beaudet, A. (1989). En: *"The Metabolic Basis of Inherited Disease"*, Mc Graw-Hill, New York, sexta edición, capítulo 108, 2649-2679.

Bradbury, N., Jilling, T., Berta, G., Sorscher, E., Bridges, R. y Kirk, K. (1992). *Science* **256**, 530-532.

Bubien, J., Kirk, K., Rado, T. y Frizzell, R. (1990). *Science* **248**, 1416-1419.

Burke, B. (1987). En: "EMBO Practical Course, "Antibodies in Cell Biology", EMBL, Heidelberg", 72-77.

Burke, W., Aitken, M., Chen, S. y Scott, C. (1992). *Chest* **102**, 506-509.

Caton, A. y Koprowski, H. (1990). *Proc of the Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6450-6454.

Caton, A. y Koprowski, H. (1991). *Proc. of the Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1590.

Claustres, M., Gerrard, B., White, M., Desgeorges, M., Kjellberg, P., Rollin, P. y Dean, M. (1992). *Genomics* **13**, 907.

Clarke, L., Grubb, B., Gabriel, S., Smithies, O., Koller, B. y Boucher, R. (1992). *Science* **257**, 1125-1128.

Collins, F., Drumm, M., Cole, J., Lockwood, W., Vande Woude, G. y Ianuzzi, M. (1987). *Science* **235**, 1046-1049.

Collins, F. (1992a). *Science* **256**, 774-779.

Collins, F. y Wilson, J. (1992b). *Nature* **358**, 708-709.

Crawford, I., Maloney, P., Zeitlin, P., Guggino, W., Hyde, S., Turley, L., Gatter, K., Harris, A. y Higgins, C. (1991). *Proc. of the Natl. Acad. of Sci. USA* **88**, 9262-9266.

Cutting, G., Kasch, L., Rosenstein, B., Zielinski, J., Tsui, L., Antonarakis, S. y Kazazian H. (1990). *Nature* **346**, 366-369.

Chelly, J., Concorde, J., Kaplan, J. y Kahn, A. (1989). *Proc. of the Natl. Acad of Sci. USA* **86**, 2617-2621.

Cheng, S., Gregory, R., Marshall, J., Paul, S., Souza, D., White, G., O'Riordan, C. y Smith, A. (1990). *Cell* **63**, 827-834.

Cheng, S., Rich, D., Marshall, J., Gregory, R., Welsh, M. y Smith, A. (1991). *Cell* **66**, 1027-1036.

Chou, J., Rozmahel, R. y Tsui, L. (1991) *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 24471-24476.

Chu, C., Trapnell, B., Murtagh, J., Moss, J., Dalemans, W., Jallat, S., Mercenier, A., Pavirani, A., Lecocq, J., Cutting, G., Guggino, W. y Crystal, R. (1991a). *The EMBO Journal* **10**, 1355-1363.

Chu, C., Trapnell, B., Murtagh, J., Moss, J., Dalemans, W., Jallat, S., Mercenier, A., Pavirani, A., Lecocq, J., Cutting, G., Guggino, W. y Crystal, R. (1991b). *The EMBO Journal* **11**, 379-380.

Chu, C., Trapnell, B., Curristin, S., Cutting, G. y Crystal, R. (1992). *Journal of Clinical Investigation* **90**, 785-790.

Chu, C., Trapnell, B., Curristin S., Cutting, G. y Crystal, R. (1993). *Nature Genetics* **3**, 151-156.

Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., Crystal, R., Pavirani, A., Lecocq, J. y Lazdunski M. (1991). *Nature* **354**, 526-528.

Davies, K. (1990). *Nature* **348**, 110-111.

Denning, G., Anderson, M., Amara, J., Marshal, J., Smith, A. y Welsh, M. (1992). *Nature* **358**, 761-764.

Dorin, J. y Porteus, D. (1991). *TIBTech* **9**, 48-52.

Drumm, M., Pope, H., Cliff, W., Rommens, J., Marvin, S., Tsui, L., Collins, F., Frizzell, R. y Wilson, J. (1990). *Cell* **62**, 1227-1233.

Drumm, M., Wilkinson, D., Smit, L., Worrell, R., Strong, T., Frizzell, R., Dawson, D. y Collins, F. (1991). *Science* **254**, 1797-1799.

Egan M., Flotte, T., Afione, S., Solow, R., Zeitlin, P., Carter, B. y Guggino, W. (1992). *Nature* **358**, 581-584.

Eiberg, H., Mohr, J., Schmiegelow, K., Nielsen, L. y Williamson, R. (1985). *Clin. Genet.* **28**, 265-271.

Engelhardt, J., Yankaskas, J. y Wilson, J. (1992). *Journal of Clinical Investigation* **90**, 2598-2607.

Estivill, X., Farrall, M., Scambler, P., Bell, G., Hawley, K., Lench, N., Bates, G., Kruyer, H., Frederick, P., Stainer, P., Watson, E., Williamson, R. y Wainwright, B. (1987). *Nature* **326**, 840-845.

Farrall, M., Wainwright, B., Feldman, G., Beaudet, A., Sretenovic, Z., Halley, D., Simon, M., Dickerman, L., Devoto, M., Romeo, G., Kaplan, J., Kitzis, A. y Williamson, R. (1988). *Am. J. Hum. Genet.* **43**, 471-475.

Fonknechten, N., Chelly, J., Lepercq, J., Kahn, A., Kaplan, J., Kitzis, A. y Chomel, J. (1992). *Human Genetics* **88**, 508-512.

Gasparini, P., Nunes, V., Savoia, A., Dognini, M., Morral, N., Gaona, A., Bonizzato, A., Chillon, M., Sangiuolo, F. y Novelli, G. (1991). *Genomics* **10**, 193-200.

Gerlach, J., Endicott, J., Juranka, P., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K. y Ling, V. (1986). *Aptitude* **324**, 485-489.

Graff, I., Schramdumont, A. y Szpirer, C. (1991). *Cellular Signaling* **3**, 259-266.

Gros, P., Croop, J. y Housman, D. (1986). *Cell* **47**, 371-380.

Han, K. y Kulesz-Martin M. (1992). *Nucleic Acids Res.* **20**, 1979-1981.

Harlow, E. y Lane, D. (1988). En "*Antibodies: A Laboratory Manual*", (Cold Spring Harbor, New York), 421-470.

Harris, A. (1991). *The EMBO Journal* **11**, 379.

Hasegawa, H., Skach, W., Baker, O., Calayag, M. Lingappa, V. y Verkman, A. (1992). *Science* **258**, 1477-1479.

Heritier, F., Madden, B., Hodson, M. y Yacoub, M. (1992). *European Resp. J.* **5**, 1262-1278.

Hess, J., Wels, W., Vogel, M. y Goebel, W. (1986). *FEMS Microbiol. Lett.* **34**, 1.

Higgins, C., Hiles, I., Salmond, G., Gill, D., Downie, J., Evans, I., Holland, I., Gray, L., Buckel, S., Bell, A. y Hermodson, M. (1986). *Nature* **323**, 448-450.

Higgins, C. y Hyde, S. (1991). *Nature* **352**, 194-195.

Higgins, C. (1992a). *Nature* **358**, 536.

Higgins, C. (1992b). *British Med. Bull.* **48**, 754-765.

Hodson, M. (1992). *European J. Pediat.* **151**, S55-S58.

Hyde, S., Emsley, P., Hartshorn, M., Mimmack, M., Gileadi, U., Pearce, S., Gallagher, M., Gill, D., Hubbard, R. y Higgins, C. (1990). *Nature* **346**, 362-365.

Innis, M. y Gelfand, D. (1990). En "*PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*" (Academic Press), 1-12.

Ivaschenko, T., White, M., Dean, M. y Baranov, V. (1991). *Genomics* **10**, 298-299.

Jozwik, C. (1990). *The Red Book Bulletin* suplemento número **12**.

Kaiser, R., Weber, J., Grzeschik, K., Edstrom, J., Driesel, A., Zengerling, S., Buchwald, M., Tsui, L. y Olek, K. (1987). *Mol. Biol. Rep.* **12**, 3-6.

Kartner, N., Hanrahan, T., Jensen, T., Naismith, A., Sun, S., Ackerley, C., Reyes, E., Tsui, L., Rommens, J., Bear, C. y Riordan J. (1991). *Cell* **64**, 681-691.

Katz, S. y Holsclaw, D. (1980). *Am. J. Clin. Poignancy.* **73**, 682.

Kerem, B., Rommens, J., Buchanan, J., Markiewicz, D., Cox, T., Chakravarti, A., Buchwald, M. y Tsui, L. (1989a). *Science* **245**, 1073-1080.

Kerem, B., Buchanan, J., Durie, P., Corey, M., Levison, H., Rommens, J., Buchwald, M. y Tsui, L. (1989b). *Am. J. Hum. Genet.* **44**, 827-834.

Kerem, B., Zielinski, J., Markiewicz, D., Bozon, D., Gazit, E., Yahaf, J., Kennedy, D., Riordan, J., Collins, J., Rommens, J. y Tsui, L. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8447-8451.

Kessler, S. (1975). *J. Immunol.* **115**, 1617.

Knowlton, R., Cohen-Haguenaer, O., Van Cong, N., Frazel, J., Brown, V., Barker, D., Braman, J., Schummn, J., Tsui, L., Buchwald, M. y Donis-Keller, H. (1985). *Nature* **318**, 380-382.

Kogan, S. y Gitschier, J. (1990). En: "*PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*", Academic Press, Inc., páginas 288-292.

Koller, B., Kim, H., Latour, A., Brigman, K., Boucher, R., Scambler, P., Wainwright, B. y Smithies, O. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10730-10734.

Kornblihtt, A., Umezawa, K., Vibe-Pedersen, K. y Baralle, F. (1985). *The EMBO J.* **4**, 1755-1759.

Krainer, A. y Maniatis, T. (1988). En "*Transcription and Splicing*", IRL Press, Oxford, Páginas 131-206.

Krauss, R., Bubien, J., Drumm, M., Zheng, T., Peiper, S., Collins, F., Kirk, K., Frizzell, R. y Rado, T. (1992a). *The EMBO Journal* **11**, 875-883.

Krauss, R., Berta, G., Rado, T. y Bubien, J. (1992b). *Am. J. Physiol.* **263**, C1147-C1151.

Krupinski, J., Coussen F., Bakalyar, H., Tang, W., Feinstein, P., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R. y Gilman, A. (1989). *Science* **244**, 1558-1564.

Marx, J. (1989). *Science* **245**, 923-925.

Marx, J. (1992). *Science* **255**, 289.

Mastrangeli, A., Danel, C., Rosenfeld, M., Stratford-Perricaudet, R., Perricaudet, M., Pavirani, A., Lecocq, J. y Crystal, R. (1993). *Journal of Clinical Investigation* **91**, 225-234.

Mazza, C., Mantero G. y Primi, D. (1991). *Molecular and Cellular Probes* **5**, 156-160.

McDonald, T., Nghiem, P., Gardner, P. y Martens, C. (1992). *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 3242-3248.

Michiels, F., Burmeister, M. y Lehrach, H. (1987). *Science* **236**, 1305-1308.

Montroze-Rafisadeh, C., Blackmon, D., Hamosh, A., Oliva, M., Curristan, S., Griffin, C., Yang, V., Guggino, W. y Cutting, G. (1992). *Journal of Biological Chemistry* **267**, 19299-19305.

Mount, S. (1982). *Nucl. Acids Res.* **10**, 459-472.

Norton, P. y Hynes, R. (1987). *Mol. Cell. Biol.* **7**, 4297-4307.

Ochman, H., Ajioka, J. Garza, D. y Hartl, D. (1989). En: "*PCR Technology. Principles and application for cDNA amplification*" (Stockton Press), 105-111.

Ochman, H., Medhora, M., Garza, D. y Hartl, D. (1990). En: "*PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*" (Academic Press), 222-227.

O'Hare, K., Murphy, C., Levis, R. y Rubin, G. (1984). *J. Mol. Biol.* **180**, 437-455.

Osborne, L., Knight, R., Santis, G. y Hodson, M. (1991). *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 608-612.

Padgett, R., Grabowski, P., Konarska, M., Seiler, S. y Sharp, P. (1986). *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 1119-1150.

Paulmichl, M., Li, Y., Wickman, K., Hackerman, M., Peralta, E. y Clapham, D. (1992). *Nature* **356**, 238-241.

Picciotto, M., Cohn, J., Bertuzzi, G., Greengard, P. y Nairn, A. (1992). *J. Mol. Biol.* **267**, 12742-12752.

Powell, L., Wallis, S., Pease, R., Edwards, Y., Knott, T. y Scott, J. (1987). *Cell* **50**, 831-840.

Puchelle, E., Gaillard, D., Hinrasky, J., Fuchey, C., Boutterin, M., Jallat, J., Slos, P., Dott, K., Dieterle, A., Mercenier, A., Pavirani, A. y Dalemans, W. (1991). *Pediatr. Pulmonol. Suppl.* **6**, A257.

Quinton, P. y Reddy, M. (1992). *Nature* **360**, 79-81.

Regelmann, W., Skubitz, K. y Herron, J. (1991). *Am. Journal of Resp. cell and Mol. Biol.* **5**, 27-33.

Rich, D., Anderson, M., Gregory, R., Cheng, S., Paul, S., Jefferson, D., McCann, J., Klinger, K., Smith, A. y Welsh, M. (1990). *Nature* **347**, 358-363.

Rich, D., Gregory, R., Anderson, M., Manavalan, P., Smith, A. y Welsh, M. (1991). *Science* **253**, 205-207.

Riordan, J., Rommens, J., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielinski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J., Drumm, M., Iannuzzi, M., Collins, F. y Tsui L. (1989). *Science* **245**, 1066-1072.

Riordan, J., Alon, N., Grzelczak, Z., Dubel, S. y Sun, S. (1991). *Adv. Exp. Med. Biol.* **290**, 19-29.

Riordan, J y Chang, X. (1992). *Bioch. Bioph. Acta* **1101**, 221-222.

Rommens, J., Zengerling, S., Burns, J., Melmer, G., Kerem, B., Plavsic, N., Zsiga, M., Kennedy, D., Markiewicz, D., Rozmahel, R., Riordan, J., Buchwald, M. y Tsui, L. (1988). *Am. J. Hum. Genet.* **43**, 645-663.

Rommens, J., Ianuzzi, M., Kerem, B., Drumm, M., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J., Kennedy, D., Hidaka, N., Zsiga, M., Buchwald, M., Riordan, J., Tsui, L. y Collins, F. (1989a). *Science* **245**, 1059-1065.

Rommens, J., Zengerling-Lentes, S., Kerem, B., Melmer, G., Buchwald, M. y Tsui, L. (1989b). *Am. J. Hum. Genet.* **45**, 932-944.

Ronchetto, P., Orriols, J., Fanen, P., Cremonesi, L., Ferrari, M., Magnani, C., Seia, M., Goossens, M., Romeo, G. y Devoto, M. (1992). *Genomics* **12**, 417-418.

Rosenfeld, M. Yoshimura, K., Trapnell, B., Yoneyama, K., Rosenthal, E., Dalemans, W., Fukayama, M., Bargon, J., Stier, L., Stratford-Perricaudet, L., Perricaudet, M., Guggino, W., Pavirani, A., Lecocq, J. y Crystal, R. (1992). *Cell* **68**, 143-155.

Rutland, J. y Cole P. (1981). *Thorax* **36**, 654.

Saak, A., Schonfeld, W., Knoller, J., Steinkamp, G., Vonderhardt, H. y Konig, W. (1990). *Intl. Archives of Allergy and Applied Immunology* **93**, 227-236.

Saiki, R. (1989). En: "*PCR Technology. Principles and application for cDNA amplification*" (Stockton Press), 7-16.

Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis T. (1989). *"Molecular Cloning: A Laboratory Manual"*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second edition.

Sanger, F. y Coulson, A. (1975). *J. Mol. Biol.* **94**, 441.

Schwarzbauer, J., Patel, R., Fonda, D. y Hynes, R. (1987). *Cell* **35**, 421-431.

Schwarzbauer, J. (1991). *BioEssays* **13**, 527-533.

Segal, A., Dorling, J. y Coade, S. (1980). *J. Cell Biology* **85**, 42-59.

Slomski, R., Schloesser, M., Berg, L., Wagner, M., Kakkar, W., Cooper, D. y Reiss, J. (1992). *Human Genetics* **89**, 615-619.

Snouwaert, J., Brigman, K., Latour, A., Malouf, N., Boucher, R., Smithies, O. y Koller, B. (1992). *Science* **257**, 1083-1088.

Stallcup, M. y Washington, L. (1983). *J. Biol. Chem.* **258**, 2802-2810.

Tabcharani, J., Chang, X., Riordan, J y Hanrahan, J. (1991). *Nature* **352**, 628-631.

Tata, F., Stainer, P., Wicking, C., Halford, S., Kruyer, H., Lench, N., Scambler, P., Hansen, C., Braman, C., Williamson, R. y Wainwright, B. (1991). *Genomics* **10**, 301-307.

The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (1990). *Am. J. Hum. Genet.* **47**, 354-359.

Thompson, L. (1992). *Science* **258**, 1728.

Tsui, L., Buchwald, M., Barker, D., Braman, J., Knowlton, R., Schumm, J., Eiberg, H., Mohr, J., Kennedy, D., Plasvic, N., Zsiga, M., Markiewicz, D., Akots, G., Brown, B., Helms, C., Gravius, T., Parker, C., Rediker, K. y Donis-Keller, H. (1985). *Science* **230**, 1054-1057.

Tsui, L. y Buchwald, M. (1991). *Adv. Hum. Genet.* **20**, 153.

Tsui, L. (1992). *Trends in Genetics* **8**, 392-398.

Vidaud, M., Fanen, P., Martin, J., Ghanem, N., Nicolas, S. y Goossens, M. (1990). *Hum. Genet.* **85**, 446-449.

Wainwright, B., Scambler, P., Schmidtke, J., Watson, E., Law, H., Farrall, M., Cooke, H., Eiberg, H. y Williamson, R. (1985). *Nature* **318**, 384-385.

Wainwright, B., Scambler, P., Stainer, P., Watson, E., Bell, G., Wicking, C., Estivill, X., Courtney, M., Boue, A., Pedersen, P., Williamson, R. y Farrall, M. (1988). *The EMBO Journal*. **7**, 1743-1748.

Watson, J., Gilman, M., Witkowski, J. y Zoller, M. (1992) en: "*Recombinant DNA*", 2ª edición, páginas 25, 147, 529 y 598.

White, R., Woodward, S., Leppert, M., O'Connell, P., Hoff, M., Herbst, J., Lalouel, J., Dean, M. y Vande Woude, G. (1985). *Nature* **318**, 382-384.

Wilson, J. y Collins, F. (1992). *Nature* **359**, 195-196.

Wine, J. (1991). *Nature* **354**, 503-504.

Wood, R., Wanner, A., Hirsch, J. y Farrell, P. (1975). *Am. Rev. Respir. Dis.* **111**, 733.

Yoshimura, K., Nakamura, H., Trapnell, B., Chu, C., Dalemans, W., Pavirani, A., Lecocq, J. y Crystal, R. (1991). *Nucleic Acid Research* **19**, 5417-5423.

Yoshimura, K., Chu, C. y Crystal, R. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 686-690.

Zeitlin, P., Crawford, I., Lu, L., Woel, S., Cohen, M., Donowitz, M., Montrose, M., Hamosh, A., Cutting, G., Gruenert, D., Haganir, R., Maloney, P. y Guggino, W. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 344-347.

Zielinski, J., Rozmahel, R., Bozon, D., Kerem, B., Grzelczak, K., Riordan, J., Rommend, M. y Tsui, L. (1991a). *Genomics* **10**, 214-228.

Zielinski, R., Bozon, D., Kerem, B., Markiewicz, D., Durie, P., Rommens, J. y Tsui, L. (1991b). *Genomics* **10**, 229-235.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. Zielinski', written in a cursive style.