

Tesis Doctoral

Modulación de la expresión del gen MTND4 mitocondrial mediada por la actividad del CFTR

Valdivieso, Angel Gabriel

2009

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:

Valdivieso, Angel Gabriel. (2009). Modulación de la expresión del gen MTND4 mitocondrial mediada por la actividad del CFTR. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Valdivieso, Angel Gabriel. "Modulación de la expresión del gen MTND4 mitocondrial mediada por la actividad del CFTR". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



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

MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN
***MTND4* MITOCONDRIAL MEDIADA POR LA**
ACTIVIDAD DEL CFTR

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

Lic. Angel Gabriel Valdivieso

Director de Tesis: Dr. Tomás A. Santa Coloma

Consejero de Estudios: Dra. Rosa Wainstok

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir (antes Fundación Campomar),
Instituto de Investigaciones Bioquímicas (FCEyN) y de Buenos Aires
(CONICET) y
Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA)
Buenos Aires, 2009

***“Anyone who has read the literature
in Cystic Fibrosis and says
he isn’t confused,
is confused”***

Efraim Rakers (1985, NIH)

MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *MTND4* MITOCONDRIAL MEDIADA POR LA ACTIVIDAD DEL CFTR

Resumen

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva producida por mutaciones en el gen que codifica el canal de cloruro CFTR. Mediante la metodología de “Differential Display” (DD) detectamos que la expresión del gen mitocondrial *MTND4* está regulada negativamente en FQ. *MTND4* es un gen que codifica para la subunidad ND4 del Complejo I mitocondrial (CIm). Esta subunidad es fundamental para la correcta actividad del CIm. Nuestro objetivo principal fue determinar si la reducción de la expresión de *MTND4* en FQ induciría una falla en la actividad del CIm. Primero, validamos los resultados del DD mediante RT-PCR semi-cuantitativa en células FQ (CFDE) así como también en células donde la expresión del CFTR había sido corregida (CFDE/6RepCFTR) y en células CFDE/6RepCFTR tratadas con inhibidores de la actividad del CFTR (glibenclamida y CFTR(inh)-172). A su vez, medimos la actividad del CIm mediante la técnica “Blue Native-PAGE”, en mitocondrias extraídas desde diferentes modelos de células FQ. Así, observamos una disminución significativa de la actividad del CIm en los distintos modelos FQ. También detectamos un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células FQ, mediante la sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). Finalmente, medimos el número de copias de ADN mitocondrial (ADNmt) mediante “Real-Time”-PCR para determinar si existía una disminución en el número de copias que pudiese explicar la reducción de la expresión de *MTND4*. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre las células FQ y sus controles. Nuestros resultados sugieren que existe una relación causal entre la falla del CFTR y la disminución de la expresión de *MTND4*. Esta disminución en la expresión de *MTND4* está acompañada de una reducción en la actividad del CIm y por un aumento en la producción de ROS, lo que podría tener un rol trascendental en

los procesos inflamatorios y apoptóticos observados en FQ, para los cuales no se conocen los mecanismos ni las implicancias fisiopatológicas.

Palabras claves: Fibrosis Quística; CFTR; *MTND4*; Complejo I mitocondrial; ROS; apoptosis.

**MODULATION OF EXPRESSION OF THE MITOCHONDRIAL GENE *MTND4*
MEDIATED BY CFTR ACTIVITY****Summary**

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by mutations in the gene encoding CFTR chloride channel. By using the "Differential Display" (DD) methodology, we detected that *MTND4* gene expression is down-regulated in CF. *MTND4* is a mitochondrial gene encoding for the ND4 subunit of mitochondrial Complex I (mCI). This subunit is essential for correct activity of mCI. Our main objective was to determine whether reduced expression of *MTND4* in CF induces a failure in the activity of the mCI. First, we validate the DD results by semi-quantitative RT-PCR in CF cells (CFDE) as well as in CFDE cells where CFTR expression has been corrected (CFDE/6RepCFTR) and in CFDE/6RepCFTR cells treated with inhibitors of the CFTR activity (glibenclamide and CFTR(inh)-172). In addition, we measured the mCI activity by using the Blue Native-PAGE technique, on mitochondria extracts from different CF models cells. Thus, we observed a significant decrease in the mCI activity in the different CF models. We also detected, through diacetate 2',7'-dichlororofluorescein probe (DCFH-DA), an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) in the different CF cells. Finally, we measured the copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) by Real-Time-PCR to determine if there was a decrease in the number of copies that could explain the reduction in the *MTND4* expression. However, we found no significant differences between the CF cells and their controls. Our results suggest a causal relationship between CFTR failure and *MTND4* decreased expression. This decrease in the *MTND4* expression is accompanied by a reduction in the mCI activity and an increased ROS production, which could have an important role in inflammatory and apoptotic processes observed in CF, for which there are no known mechanisms and pathophysiological implications.

Keywords: Cystic fibrosis, CFTR; *MTND4*; mitochondrial complex I, ROS, apoptosis.

Agradecimientos

Al Dr. Tomás Santa Coloma, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por enseñarme el extraordinario mundo de la ciencia y tratar de que no me faltase nada para poder investigar.

Al Dr. Marcelo Dankert por el apoyo brindado a nuestro laboratorio.

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

A la Fundación Favaloro, por los cortes de pulmón.

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

A mis compañeros de laboratorio,

Los que se fueron: Mariana Brocardo, Beatriz Reyes, Verónica Sotomayor, Florencia Marcucci; por el buen recibimiento en el laboratorio.

Y los que están: Guillermo Taminelli, Celeste Marín, Eleonora Pagano; por la colaboración en las tareas de laboratorio y por las fructíferas discusiones.

A mis amigos,

Al Dr. Joel Walicki, a quien conocí en mi primer día de facultad y terminamos la carrera juntos, por haberme contactado con el Dr. Santa Coloma para hacer esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Carlos Marfil, Fernando Ezquer y Germán Dunger, por las largas horas de estudio y asados compartidos.

Al Dr. Maxi Juri Ayub y a Bárbara, por su amistad y consejos.

A los amigos cosechados en la Capi (Hernán, Cristian, Adrián, César, Lorena, Julia, etc), por los momentos compartidos.

A mis amigos del alma, Diego y Darío, por tenerme siempre presente.

A mi familia,

A mis padres, Miguel e Inés, porque siempre me apoyaron en todo, aunque eso significara que estuviese a muchos kilómetros de distancia. Gracias por el amor que siempre me brindaron.

A mis hermanos, Sergio y Facundo, por confiar en mí y apoyarme, yo también los extraño.

A mi abuela Antonia, por sus lágrimas cada vez que vuelvo a casa.

A mi tía Olga, por darme un hogar al llegar a Buenos Aires y por el afecto que me brindó desde mi llegada. A Esteban, a los melli (Miguel y Gabriel), a Jorge, a Ale y a toda su familia (Paula, Daniela, Eduardo y a todos los chicos).

A Liliana y Alfredo, por el apoyo brindado.

A mi novia Sole, por darme su paciencia, su apoyo y su amor.

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosina trifosfato
ADNmt	ADN mitocondrial
CFTR	“cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”
CI_m	complejo I mitocondrial
Cl⁻	ión cloruro
CO₂	dióxido de carbono
DCFH-DA	diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DD	“differential display”
DMEM	medio de cultivo Dulbecco
DMSO	(dimetil sulfóxido)
DNasa rh	desoxirribonucleasasa recombinante humana
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
FQ	fibrosis quística
I⁻	ión yoduro
IBMX	isobutilmetilxantina
LB4	leucotrieno B4
MOPS	ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico
MSD	“membrane spanning domain”
MTND4	Subunidad ND4 del Complejo I mitocondrial
<i>MTND4</i>	Gen de la subunidad ND4 del Complejo I mitocondrial
NBD	“nucleotide-binding domain”
NBT	“nitro blue tetrazolium”
NHE-RF	factor regulador del intercambio sodio-protones
NPPB	5-nitro-2(3-phenylpropyl amino) benzoato
ORCC	“outwardly rectifying Cl ⁻ channels”
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C

ROS	“reactive oxygen species”
RT-PCR	transcripción reversa seguida de PCR
SD	“Standard Deviation”
shARNi	“short hairpin” ARN de interferencia
SPQ	6-methoxy-N-3-sulfopropyl
SRC/c-Src	tirosina quinasa SRC (pp60c-Src)

ÍNDICE

RESUMEN	ii
SUMMARY	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
ABREVIATURAS	viii
ÍNDICE	x
INTRODUCCIÓN	2
1. ASPECTOS CLÍNICOS DE LA FQ	3
1.1. Fisiopatología y manifestaciones clínicas de la enfermedad ...	3
1.2. Infecciones e inflamación pulmonar	4
2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL CFTR	5
2.1. Las numerosas mutaciones del gen <i>CFTR</i>	5
2.2. Clasificación de las mutaciones del CFTR	6
2.3. Estructura y función	7
2.4. Regulación general del CFTR	8
2.5. Interacciones del CFTR	10
2.6. Rol del CFTR en FQ	13
3. DIAGNÓSTICO DE LA FQ	15
4. TERAPIAS EXISTENTES PARA FQ	16
4.1. Despeje de las vías respiratorias (“Airway clearance”)	16
4.2. Terapia con antibióticos	17
4.3. Tratamiento con DNasa	18

4.4. Terapia antiinflamatoria	18
5. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN FQ	18
5.1. Antecedentes	18
5.2. El modelo utilizado para el “Display” diferencial (DD).....	20
6. ANORMALIDADES MITOCONDRIALES ASOCIADAS A FQ	20
7. EL COMPLEJO I MITOCONDRIAL (CI_m)	21
7.1. Función del CI _m	21
7.2. Estructura del CI _m	23
7.3. Posible función de MTND4	23
HIPOTESIS DE TRABAJO	25
OBJETIVOS	26
Objetivo general	26
Objetivos particulares	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Cultivos celulares	28
1.1. Células CFDE y células CFDE/6RepCFTR	28
1.2. Células IB-3 y S9	29
1.3. Células T84	29
1.4. Células Caco-2	30
1.5. Condiciones de cultivo	30
2. Congelamiento y descongelamiento de las células	31
2.1. Descongelamiento	31
2.2. Congelamiento	31

3. Bloqueo de la actividad del transporte de	
cloruro a través del CFTR mediante inhibidores sintéticos	31
4. Extracción de ARN total	32
5. Purificación de ADN total	33
6. RT-PCR (« Reverse Transcription - Polimerase	
Chain Reaction ») Semicuantitativa	33
6.1. Transcripción Reversa (RT)	33
6.2. RT-PCR “multiplex” semicuantitativa	34
6.3. RT-PCR semicuantitativa con curva estándar	34
6.4. Cuantificación del nivel de copias de	
ADN mitocondrial (ADNmt) por “Real Time”-PCR	35
6.5. Condiciones de amplificación por PCR	36
6.6. Construcción de plásmido	
estándar para PCR cuantitativa	36
7. Análisis de los productos de traducción	
mitocondriales mediante marcado isotópico (“pulse-labeling”)	38
8. Preparación de bacterias competentes para “heat-shock”	38
9. Transformación de bacterias competentes (método de CaCl₂)	39
10. Selección de bacterias recombinantes por “colony PCR”	40
11. Preparación de plásmidos (“mini, midi y maxipreps”)	40
12. Secuenciación	41
13. Bloqueo de la expresión del CFTR por ARN de interferencia (ARNi)	42
13.1. Construcción de un ARN de interferencia específico de CFTR	42
13.2. Transfección por electroporación	
de células T84 con plásmidos shARNi	43

14. Medición espectrofluorométrica de la actividad del CFTR	
en células T84 tratadas con shARNi del CFTR.....	43
15. Medición de actividad del complejo I mitocondrial mediante	
BN-PAGE (“Blue Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis”)	44
15.1. Extracción de mitocondrias	44
15.2. Preparación de la muestra para la corrida en BN-PAGE	45
15.3. Preparación del gel de poliacrilamida para BN-PAGE.....	45
15.4. Condiciones de electroforesis	46
15.5. Tinción de los geles BN-PAGE con “coomassie blue”.....	46
15.6. Determinación de la actividad catalítica del	
Complejo I mitocondrial (CI _m), <i>in situ</i>	46
16. Medición de especies reactivas de	
oxígeno (ROS, “<u>R</u>eactive <u>O</u>xygen <u>S</u>pecies”)	47
17. Análisis estadístico	48
RESULTADOS	49
I) Resultados previos	50
1.1. “Differential Display” o “Display” Diferencial (DD)	50
1.2. Hibridación <i>in situ</i> en tejido pulmonar humano	51
II) Resultados del presente trabajo de tesis	52
Objetivo 1	52
1.1. RT-PCR “multiplex” semicuantitativa	53
1.2. Efectos del inhibidor	
CFTR(inh)-172 sobre la expresión de <i>MTND4</i>	55

1.3. Análisis de la síntesis de proteínas mitocondriales en células FQ mediante marcación isotópica (“pulse labeling”)	58
Objetivo 2	61
2.1. Células CFDE y CFDE/6RepCFTR	61
Objetivo 3	63
3.1. Nuevo modelo celular FQ	63
3.1.1. Células S9 e IB-3	63
3.2. Modelo celular no-FQ	65
3.2.1. Células T84 tratadas con <i>inhibidores de la actividad del CFTR</i>	66
3.2.2. Células Caco-2 tratadas <i>con inhibidores de la actividad del CFTR</i>	67
3.2.3. ARN de interferencia del CFTR en células T84	68
Objetivo 4	74
4.1. Medición de especies reactivas de oxígeno (ROS) en FQ	74
Objetivo 5	76
5.1. Cuantificación del nivel de copias de ADNmt	76
DISCUSIÓN	78
CONCLUSIONES	98
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad de transmisión autosómica recesiva más severa y frecuente en la población americana de origen europeo (caucásica) y constituye en esa población la causa más importante de enfermedad pulmonar crónica y de insuficiencia pancreática exócrina en las tres primeras décadas de vida. La incidencia de ésta enfermedad en dicha población es de 1 en 2500 recién nacidos vivos (Gregg *et al.*, 1993). Este valor varía en los diferentes grupos étnicos; por ejemplo, en los afro-americanos es mucho menos frecuente (1 en 15.300 nacidos) (Hamosh *et al.*, 1998). También se ha reportado en indígenas americanos y asiáticos, pero con muy baja incidencia (1 en 90.000 nacidos vivos) (Grebe *et al.*, 1992; Powers *et al.*, 1996).

La principal complicación a la que se enfrentan los pacientes FQ es el daño pulmonar crónico y progresivo, aunque otros órganos y todas las glándulas de secreción exócrina se encuentran afectados, en mayor o menor grado. Aproximadamente el 90 % de los pacientes con FQ presentan insuficiencia pancreática exocrina (Zielenski, 2000) y entre el 10 y el 20 % de los recién nacidos presentan íleo meconial, causado por un tapón espeso de mucus que obstruye el colon (Eggermont, 1996).

La FQ es provocada por mutaciones en el gen *CFTR* (siglas de “Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator”). El mismo fue aislado por Riordan en el año 1989 (Riordan *et al.*, 1989), por clonado posicional; se localizó así en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31). El gen contiene 27 exones que cubren una región de 250 kilobases (Kb) y codifican un ARN mensajero maduro (ARNm) de 6,5 Kb (Rommens *et al.*, 1989).

La proteína codificada por el gen *CFTR* funciona como canal de transporte de iones cloruro a través de la membrana apical de células epiteliales, principalmente del páncreas, glándulas salivares, glándulas sudoríparas, pulmón y tractos gastrointestinal y genitourinario (Bradbury, 1999). La actividad de transporte de Cl⁻ por el CFTR es regulada por AMP cíclico (AMPC) (Anderson *et al.*, 1991), principal característica que lo diferencia de otros canales de Cl⁻.

1. ASPECTOS CLÍNICOS DE LA FQ

1.1. Fisiopatología y manifestaciones clínicas de la enfermedad

El defecto o ausencia de la proteína CFTR lleva a la producción de secreciones alteradas de iones y de mucus, que generan la obstrucción del tracto respiratorio, los conductos pancreáticos, los conductos hepatobiliares, el lumen intestinal y los vasos deferentes (Leigh, 1999).

La FQ no sigue el mismo patrón en todos los pacientes, sino que afecta a los portadores de las distintas mutaciones en grado y formas diferentes. Así, en la mayoría de los casos no existe una correlación significativa entre el tipo de mutación que afecta al CFTR (genotipo) y el grado de severidad de la enfermedad (fenotipo) (Collins, 1992; Welsh & Smith, 1995). De modo que todavía no es posible realizar una predicción fiable de la evolución clínica del paciente según el genotipo y existe una enorme variabilidad en la magnitud de la enfermedad pulmonar dentro de genotipos similares (Welsh & Smith, 1995).

Numerosos factores pueden modificar las manifestaciones clínicas de la enfermedad, principalmente aquellos vinculados al daño pulmonar. Estos incluyen factores genéticos distintos al *CFTR*, diferencias en el tratamiento clínico, influencia del medio ambiente y diversas infecciones (particularmente bacterianas y virales) (Welsh & Smith, 1995). Por otra parte, es importante destacar que los heterocigotas para FQ no presentan síntomas clínicos fácilmente reconocibles (Noone & Knowles, 2001). Esto indica que una sola copia del *CFTR* salvaje es suficiente para restaurar el transporte normal de cloruro.

La expectativa de vida de los pacientes con FQ está determinada, en gran medida, por la progresión del daño pulmonar, que representa la causa de más del 90 % de los casos letales. Durante el curso de la enfermedad se desarrolla una obstrucción pulmonar crónica, que se caracteriza por una progresión lenta desde la bronquiectasia (dilatación patológica de los bronquios o bronquiolos por acumulación de secreciones) hasta la muerte por paro cardiorrespiratorio. Otras complicaciones que aparecen durante el transcurso de la enfermedad

son las infecciones sucesivas con distintos patógenos, principalmente *Staphilococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Guggino, 1999).

1.2. Infecciones e inflamación pulmonar

En la Fibrosis Quística, la actividad mucociliar defectuosa, sumada a la viscosidad anormal del mucus, hace que las vías respiratorias sean incapaces de eliminar eficientemente las bacterias (Koch & Hoiby, 1993). Está aún en discusión si el aumento de viscosidad del mucus se debe a una mayor acumulación de éste por la sobreproducción de mucinas (Gonzalez-Guerrico *et al.*, 2002), a una mayor deshidratación del mismo (Potter *et al.*, 1967; Kilbourn, 1978), o a ambas causas. Además, algunos datos sugieren que el líquido de la superficie de las vías respiratorias en los pacientes con FQ presenta una importante disminución en la actividad de sustancias antibacterianas endógenas, como por ejemplo β -defensinas y lisozima (Goldman *et al.*, 1997).

Todos los factores indicados contribuyen a la susceptibilidad de los pacientes frente a las infecciones, en las cuales *Pseudomonas aeruginosa* es el principal patógeno bacteriano (Guggino, 1999). Esta bacteria coloniza las vías respiratorias inferiores, primero intermitentemente y después de forma crónica, observándose con el transcurso del tiempo un cambio en el morfotipo de *P. aeruginosa*. En infecciones tempranas predomina el morfotipo clásico, mientras que en las infecciones crónicas se encuentra un morfotipo denominado “mucoide”, debido a la biosíntesis y secreción de grandes cantidades de un polisacárido (alginato) por parte de estas cepas. Cabe destacar que todas las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes FQ pueden producir alginato, aún las consideradas no mucoides. Esto sugiere que el microambiente del pulmón FQ presenta factores que estimulan la expresión del fenotipo mucoide (Gilligan, 1991). El alginato permite a los microorganismos un crecimiento en microcolonias, que se encuentran protegidas frente a los anticuerpos o antibióticos, favoreciendo así la persistencia de la infección. De todos modos, el mecanismo exacto que lleva a esta falla inmune en FQ no está claro y no se pueden descartar otras posibles causas, cómo una falla generalizada de los mecanismos de defensa innata (Pier, 2000) o de

defensa adquirida (Krauss *et al.*, 1992; Moss *et al.*, 2000; Bubien, 2001), por causa del transporte ineficiente de Cl⁻. El estudio de estos aspectos apenas ha comenzado y queda mucho por ser analizado.

La infección bacteriana en el pulmón estimula la respuesta inflamatoria desencadenando un círculo vicioso. Las *Pseudomonas* comienzan a producir poderosos quimioattractantes de neutrófilos, lo que establece su infiltración en el pulmón en forma persistente. A su vez, los neutrófilos se autoactivan y liberan más quimioattractantes, entre ellos leucotrieno B4 (LB4), que sostienen la infiltración neutrofílica. También se estimula la secreción de IL-8 desde las células epiteliales por la acción de la elastasa liberada por los neutrófilos. Este reclutamiento masivo de neutrófilos no es efectivo para destruir las bacterias y causa un daño considerable al pulmón (Kim *et al.*, 1989; DiMango *et al.*, 1995; DiMango *et al.*, 1998).

Según estudios realizados en muestras de fluido bronqueoalveolar de niños asintomáticos, el aumento de IL-8 parece ser una característica temprana de la enfermedad en las vías aéreas (Armstrong *et al.*, 1995; Cantin, 1995; Khan *et al.*, 1995). Las células epiteliales son una importante fuente de IL-8 en FQ, observándose una regulación positiva para la expresión de esta citoquina en dichas células. Por otro lado, se encuentra disminuida la expresión de IL-10, una citoquina de característica antiinflamatoria. También se ha encontrado aumentada la concentración de otras citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8) en el fluido de lavados bronqueoalveolares de las vías aéreas FQ (Bonfield *et al.*, 1995a; Bonfield *et al.*, 1995b).

2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL CFTR

2.1. Las numerosas mutaciones del gen *CFTR*

Hasta el momento se han descrito más de 1600 mutaciones diferentes en el gen *CFTR* ("Cystic Fibrosis Mutation Data Base"), pero la mutación mas común es la pérdida de la fenilalanina de la posición 508 (Δ F508), que ocurre en el 66 % de los casos (Mateu *et al.*, 2002). Se ha observado un amplio rango de función pulmonar en los pacientes homocigotas con la mutación Δ F508;

hecho que reflejaría la interacción de diversas variables, incluyendo influencias genéticas distintas al gen *CFTR*, medio ambiente, eventos infecciosos y diferencias en el tratamiento de la enfermedad (Knowles *et al.*, 1983; Noone & Knowles, 2001).

2.2. Clasificación de las mutaciones del *CFTR*

Las mutaciones en el *CFTR* han sido divididas en cinco grupos o clases, de acuerdo a las alteraciones encontradas en el camino biosintético o en la función del *CFTR* (Tsui, 1992; Welsh & Smith, 1993).

- **Mutaciones Clase I:** Resultan en una producción proteica defectuosa del *CFTR*, que por lo general refleja mutaciones de terminación temprana de la traducción. También se las puede asociar con ARNm inestables (rápidamente degradados) (Hamosh *et al.*, 1992). Las mutaciones W1282X y R553X pertenecen a esta clase.
- **Mutaciones Clase II:** Se caracterizan por el procesamiento defectuoso de la proteína. Estas incluyen a la mutación más común (66 %), caracterizada por la pérdida de la fenilalanina en la posición 508 ($\Delta F508$), que genera una proteína con glicosilación alterada, mal plegada y que se degrada en gran proporción antes de llegar a la membrana plasmática (Cheng *et al.*, 1990) (Riordan, 1999). Sin embargo, estudios realizados *in vitro*, han demostrado que la mutante $\Delta F508$ se pliega normalmente a bajas temperaturas (23-30 °C) y se dirige normalmente a la membrana apical, donde exhibe una función parcial como canal de cloruro regulado por AMPc (Anderson & Welsh, 1992; Li *et al.*, 1993). De modo que la actividad del canal no estaría alterada en FQ, sino el transporte del mismo hacia la membrana plasmática.
- **Mutaciones Clase III:** Corresponden a defectos en la regulación del canal *CFTR*. Aunque el transporte de la proteína a la membrana plasmática es correcto, las mutaciones pueden tanto impedir su función en forma drástica (mutación G551D) como dejar alguna actividad

residual (mutación G551S) (Strong *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1993; Welsh & Smith, 1993).

- **Mutaciones Clase IV:** Estas afectan la conductividad de los iones cloruro (Sheppard *et al.*, 1993; Welsh & Smith, 1993). Muchas involucran residuos de arginina en la región transmembrana del canal. Estas mutaciones presentan una conductividad residual y con frecuencia los pacientes tienen una función pancreática exócrina normal. Las más comunes de este tipo son: R117H, G314E, R334W y R347P.
- **Mutaciones Clase V:** Este tipo de mutaciones crean o alteran sitios de procesamiento del ARNm del *CFTR*, sin alterar la secuencia codificante (Highsmith *et al.*, 1994; Zielenski *et al.*, 1995; Highsmith *et al.*, 1997). Estas mutaciones pueden provocar una reducción parcial o total de la proteína CFTR. La mutación más común de este tipo es la 3849+10Kb C a T, que crea un sitio de procesamiento activo en el intrón 19 y lleva a una inserción de 84 pares de bases con un codón de terminación.

2.3. Estructura y función

El CFTR es una glicoproteína integral de membrana, que funciona como canal de cloruro. Su estructura primaria la ubica dentro de la familia de proteínas transportadoras llamadas “ATP-binding cassette” (ABC), que poseen al menos un sitio de unión de ATP. Varios miembros de esta familia utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para transportar sustancias a través de la membrana en forma activa. Entre ellos se incluyen las proteínas mediadoras de la multiresistencia a fármacos antineoplásicos, la glicoproteína-P, y diferentes transportadores de membrana de bacterias y levaduras (Sheppard & Welsh, 1999).

En la Figura 1 se muestra un modelo del canal CFTR, derivado principalmente de la estructura primaria y por comparación con otros transportadores de la familia. Se destacan 12 hélices que atraviesan la membrana celular en dos grupos de 6 regiones, que contribuyen a la formación

del poro selectivo a Cl^- . También presenta dos dominios de unión a nucleótidos (NBD, “nucleotide-binding domain”), que hidrolizan ATP para regular el bombeo del canal, y una zona intracitoplasmática, que es el dominio regulatorio (R), el cuál es fosforilado por las quinasas PKA (Sheppard & Welsh, 1999) y PKC (Jia *et al.*, 1997) para controlar la actividad del mismo (Hwang & Sheppard, 1999; Sheppard & Welsh, 1999).

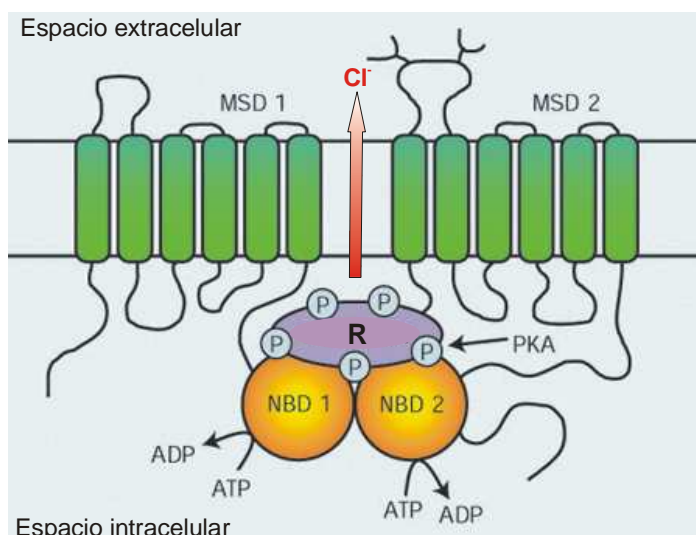


Figura 1: Modelo del CFTR. MSD (“Membrane-spanning Domain”), dominios transmembrana; R, dominio regulatorio; NBD (“Nucleotide Binding Domain”), dominios de unión a nucleótidos.

Mientras que la mayoría de los transportadores ABC se componen de cuatro dominios (dos dominios transmembrana y dos dominios de unión a nucleótidos), el CFTR es el único miembro de la familia que presenta un dominio regulatorio. Además, el CFTR posee dos sitios de glicosilación en N-Asn, en el cuarto rulo extra-citoplasmático (Chang *et al.*, 1994). Aunque algunos estudios realizados con mutantes sugieren que las glicosilaciones no son necesarias para la actividad normal del canal ni para su correcto plegamiento, hay otros estudios que indican alteraciones en la actividad del canal (Chang *et al.*, 1994).

2.4. Regulación general del CFTR

El transporte de Cl^- a través del CFTR depende de dos factores. Por un lado, depende de la fosforilación de 4 residuos serina situados en el dominio

regulatorio (R) de la proteína mediante PKA (Sheppard & Welsh, 1999) y PKC (Jia *et al.*, 1997) y por otro, de un cambio conformacional inducido por la hidrólisis de ATP (Cheng *et al.*, 1991). Ambos eventos deben ocurrir para que el canal funcione correctamente.

La Figura 2 muestra un modelo de cómo ocurriría la regulación del CFTR. La fosforilación por PKA de los residuos serina del dominio R induce un cambio conformacional por el cual el poro se despeja. Luego, la unión e hidrólisis de ATP por el dominio NBD1 provocan la apertura del canal y permanece abierto hasta que NBD2 une e hidroliza otra molécula de ATP. Cuando esto ocurre, el dominio R se vuelve accesible a fosfatasas y se inactiva por desfosforilación. De esta forma el canal vuelve al estado de quiescencia (cerrado) (Berger *et al.*, 1993). Estas características hacen que la apertura del canal CFTR esté estrechamente controlada por el balance de las actividades quinasa y fosfatasa dentro de la célula, además de los niveles de ATP.

Mientras que PKA activa el CFTR por fosforilación directa de los sitios dentro del dominio R, la activación por PKC es mucho menor, aunque incrementa la sensibilidad de respuesta a PKA (Jia *et al.*, 1997). Aunque el mecanismo molecular de regulación por PKC es pobremente entendido, ha sido reportado que la actividad del CFTR puede ser modulada por interacciones mediadas por el dominio PDZ a través de proteínas de la familia NHERF (factor regulador del intercambio sodio-protones) (Wang *et al.*, 2000 ; Raghuram *et al.*, 2001) y que dichas interacciones serían reguladas por la fosforilación mediada por PKC en la Ser-162 del dominio PDZ2 de NHERF (Raghuram *et al.*, 2003).

Por otra parte, hay datos que sugieren que la fosforilación por la tirosina quinasa SRC/c-Src es capaz de producir la apertura del CFTR (Fischer & Machen, 1996).

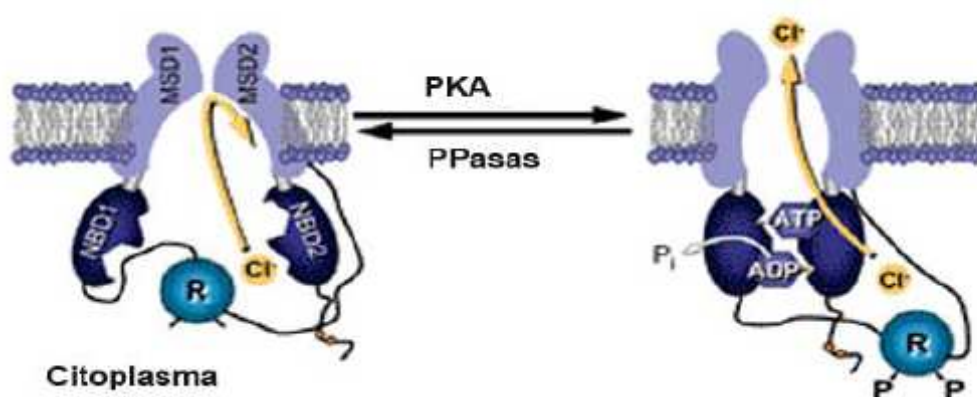


Figura 2: Modelo de regulación del canal CFTR por fosforilación y ATP intracelular. La fosforilación de R por PKA abre el paso a los iones cloruro y la hidrólisis de ATP en el dominio NBD1 permite la apertura del canal. La acción de las fosfatasa permite que el canal vuelva a cerrarse. PKA, proteína quinasa dependiente de AMPc; PPasas, fosfatasa; ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; P_i, fosfato inorgánico; P, fosforilaciones del dominio regulador. Imagen obtenida de (Li *et al.*, 2007).

2.5. Interacciones del CFTR

Varios trabajos sugieren que el CFTR se acopla con diversos procesos intracelulares a través de interacciones con otras proteínas. En una de éstas observaciones, se encontró que el extremo N-terminal del CFTR interactúa con sintaxina 1A, un componente de membrana que forma parte de la maquinaria de tráfico celular. La sintaxina 1A inhibe al canal por interacciones físicas directas (Naren *et al.*, 1998). De esta manera, en células epiteliales, la regulación del transporte de Cl⁻ se encuentra acoplada a la regulación del tráfico proteico intracelular (Peters *et al.*, 1999; Kirk, 2000). Por otro lado, los mismos autores (Peters *et al.*, 1999) proponen que esta interacción modula los eventos de fusión de membrana que regulan a su vez el número de moléculas de CFTR en la membrana plasmática.

El dominio C-terminal del CFTR presenta una secuencia consenso T-K/R-L, conservada desde *Xenopus* hasta humanos (Wang *et al.*, 2000), que constituye un motivo de unión a proteínas con dominios PDZ (Figura 3). Las proteínas con dominios PDZ son generalmente multivalentes (presentan varios dominios PDZ) y promueven interacciones homotípicas o heterotípicas entre

proteínas. Estas interacciones podrían facilitar la formación de agregados de los canales iónicos en microdominios sobre la superficie celular (“clustering”) y de esta forma promover el ensamblado de complejos de señalización en la membrana plasmática (Ranganathan & Ross, 1997). Entre las proteínas que interactúan con CFTR mediante dominios PDZ podemos mencionar a NHERF1 (isoforma 1 del factor regulador del intercambiador Na^+/H^+), también conocida como EBP50 (proteína de unión a ezrina, con localización apical). Esta última es responsable de la localización del CFTR en la membrana apical de células epiteliales (Moyer *et al.*, 1999).

Se especula que las interacciones mediadas por PDZ facilitan la intercomunicación (“cross-talk”) entre CFTR y otros transportadores de iones con mecanismos de regulación paralelos. En efecto, además de funcionar como canal de cloruro, el CFTR modula canales de Na^+ epiteliales (Chinet *et al.*, 1994; Stutts *et al.*, 1995), canales ORCC (“Outwarly Rectifying Cl Channels”) (Gabriel *et al.*, 1993; Schwiebert *et al.*, 1995), canales de K^+ apicales (McNicholas *et al.*, 1997), canales de aquaporina (Schreiber *et al.*, 1999), intercambiadores de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Lee *et al.*, 1999) y mecanismos de liberación de ATP (Reisin *et al.*, 1994; Schwiebert *et al.*, 1995; Prat *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1998).

También se propone que el dominio de unión a PDZ podría acoplar el canal de Cl^- a moléculas de señalización específicas (quinasas y fosfatasas), a elementos del citoesqueleto y a otras proteínas de transporte. Por ejemplo, el CFTR se encuentra unido a la proteína fosfatasa 2C, la cual regula su actividad (Travis *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1999; Dahan *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha observado que la dimerización del CFTR, que ocurre por la interacción de los dominios PDZ de la región C-terminal, produce un aumento en la probabilidad de apertura del canal (Raghuram *et al.*, 2001).

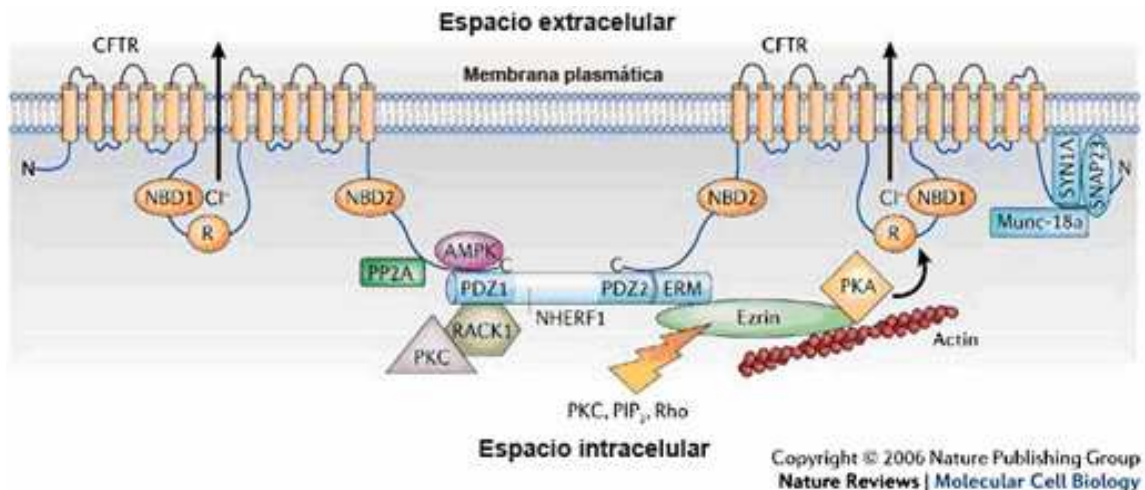


Figura 3: Interacciones del CFTR: Se muestran algunas proteínas que interactúan directa o indirectamente con el CFTR, entre ellas la proteína fosfatasa-2A (PP2A), AMP quinasa (AMPK), sintaxina 1A (SYN1A), la proteína asociada a sinaptosoma de 23 KDa (SNAP23) y Munc-18A. Estas proteínas inhiben la actividad del canal y reducen la secreción de Cl⁻ mediada por CFTR a través de la membrana plasmática apical en células epiteliales. Otras proteínas que interactúan con el CFTR potencian su actividad directa o indirectamente; entre otras la isoforma 1 del factor regulador del intercambiador Na⁺/H⁺ (NHERF1), el receptor de quinasa-1-C (RACK1), proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa A (PKA) y la proteína ezrin. NBD, "Nucleotide Binding Domain" (Dominio de Unión a Nucleótido); PIP₂, fosfatidilinositol bifosfato; R, dominio regulador. La figura fue levemente modificada desde una ya publicada (Guggino & Stanton, 2006).

Un caso muy interesante de interacción a través de los dominios PDZ, es el que conduce a la modulación de la expresión, dependiente del CFTR, de la citoquina RANTES. Esta citoquina promueve de manera selectiva la trans migración de los linfocitos T CD45 RO⁺ y eosinófilos (Schwiebert *et al.*, 1999b). Recientemente, se ha reportado que las células epiteliales aéreas FQ expresan poco y nada de la proteína o ARNm de RANTES comparado con los controles no FQ (Schwiebert *et al.*, 1999b). A su vez, se demostró que la corrección de las células FQ, mediante la inserción de CFTR salvaje, es capaz de restaurar la expresión de RANTES a nivel transcripcional por un mecanismo dependiente de NF-κB. Por otra parte, los datos aportados por el grupo de Schwiebert (Estell *et al.*, 2003) demuestran que el CFTR dispara la expresión de RANTES por un mecanismo independiente de la actividad del canal de cloruro CFTR, ya que ni la inhibición selectiva del transporte de Cl⁻ por el CFTR

ni la expresión de canales de Cl⁻ alternativos (por ejemplo CIC-2), afectó la expresión de RANTES. De esta manera, mediante estudios de expresión de CFTR con fragmentos truncados, se determinó que el extremo C-terminal del CFTR, incluyendo su dominio PDZ, es necesario para la expresión del gen RANTES dependiente del CFTR. Estudios complementarios, sugieren que la proteína EBP50 de unión a PDZ podría estar involucrada en el mecanismo de regulación de la expresión de RANTES y de activación de NF-κB dependientes de CFTR (Estell *et al.*, 2003). Por lo tanto, para la modulación de la expresión del gen RANTES dependiente del CFTR sería necesaria la presencia del CFTR en la membrana plasmática para formar un complejo macromolecular de señalización.

2.6. Rol del CFTR en FQ

El alto grado de conservación del CFTR entre especies sugiere un rol crucial de su función (Diamond *et al.*, 1991). Por otro lado, ciertos defectos en las funciones celulares del epitelio, en enfermos FQ, no pueden ser vinculados únicamente a la falla de una proteína que solo funciona como canal de Cl⁻ (Schwiebert *et al.*, 1999a). Entre los efectos secundarios que aparecen por el mal funcionamiento del CFTR, puede mencionarse la desregulación de los canales de Cl⁻ ORCC (Hryciw & Guggino, 2000 Nov).

Otra anomalía, no relacionada con los defectos en los canales de Cl⁻, fue propuesta originalmente por Quinton (Quinton, 1983) e identificada por Boucher y colaboradores (Boucher *et al.*, 1986); se trata de la hiperabsorción de Na⁺ a través del epitelio respiratorio y la hiperactividad de los canales de Na⁺ en células epiteliales aisladas del sistema respiratorio de pacientes FQ (Chinet *et al.*, 1994). De modo que, indirectamente, el CFTR regula el transporte de diversos canales.

Asimismo, tanto la falta de regulación de la endocitosis y la exocitosis por AMPc en células FQ, como la falta de una acidificación suficiente en sus organelas han sido bien documentadas (Barasch & al-Awqati, 1993; Imundo *et al.*, 1995). Una consecuencia de esto podría ser las fallas en las modi-

ficaciones post-traduccionales y en el tránsito del CFTR y de otras glicoproteínas a la membrana.

En síntesis, la enfermedad podría ser causada por una combinación compleja de defectos primarios en la función del CFTR como canal de Cl⁻ (Welsh & Smith, 1993), defectos secundarios en las conductancias de otros canales iónicos regulados por CFTR, tales como los canales ORCC (Gabriel *et al.*, 1993; Schwiebert *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1998; Hryciw & Guggino, 2000 Nov), los canales epiteliales de Na⁺ (Knowles *et al.*, 1983; Boucher *et al.*, 1986), los canales renales de K⁺ (McNicholas *et al.*, 1997), y por una posible perturbación terciaria en las modificaciones, el tráfico y el plegamiento de otras proteínas.

Además de los efectos provocados por el CFTR sobre la función de otros canales iónicos, ha sido demostrado que el CFTR también es capaz de regular la expresión de varios genes involucrados en la respuesta inflamatoria, incluyendo RANTES (Schwiebert *et al.*, 1999b), interleuquina- (IL-8) (DiMango *et al.*, 1995; DiMango *et al.*, 1998), IL-10 (Bonfield *et al.*, 1995a) y la óxido nítrico sintetasa inducible (Steagall *et al.*, 2000). Como se describió en el caso de la regulación de RANTES, la misma involucra la interacción del CFTR con la proteína EBP50, con la que formaría un complejo macromolecular de activación de factores de transcripción, como por ejemplo NF-κB (Schwiebert *et al.*, 1999b). Estos datos, sugieren un posible rol del CFTR en la función epitelial durante la respuesta inmune innata y adquirida.

Por otra parte, se han reportado diversas alteraciones en la actividad mitocondrial en FQ, lo que sugiere un rol muy importante del transporte de Cl⁻ a través del CFTR en los procesos de fosforilación oxidativa y homeostasis del calcio intracelular (Feigal & Shapiro, 1979; Feigal *et al.*, 1982; Shapiro, 1988, , 1989). Este tema se desarrollará con detalle más adelante, ya que es el tema principal de esta tesis.

3. DIAGNÓSTICO DE LA FQ

En los países desarrollados, gracias al diagnóstico precoz y a la disponibilidad de tratamientos adecuados, son pocos los casos en los que el estado final de la enfermedad ocurre en la primera década de vida. En contraste, en los países subdesarrollados el tiempo de supervivencia es mucho menor, con una vida media de 12 años, en lugar de 35 a 40 años, como ocurre en los países desarrollados (Macri C, 1996).

De los diversos métodos de examen para diagnosticar FQ, el “test” del sudor es el más utilizado y consiste básicamente en cuantificar la concentración de NaCl presente en el sudor. En este examen, se frota una pequeña cantidad de un compuesto químico llamado pilocarpina (de carga positiva) en el brazo o en la pierna del paciente. Luego, se colocan electrodos que generan una pequeña corriente eléctrica indolora y que permite mediante iontoforesis la penetración del compuesto. La pilocarpina induce así la sudoración. Posteriormente, con un paño de gasa o un papel de filtro se cubre la zona por unos 30 minutos y finalmente el sudor colectado en la gasa o en el filtro es analizado para medir los niveles de NaCl. Niveles muy elevados de cloruro pueden indicar FQ, pero no la severidad de la enfermedad.

Debido a que los niños recién nacidos no producen cantidades significativas de sudor se recurre al “test” inmunoreactivo para tripsinógeno, que analiza la presencia de tripsinógeno en sangre. Este “test” es obligatorio desde hace algunos años, por Ley. La desventaja del ensayo de tripsinógeno es la frecuente presencia de falsos positivos, lo que hace necesaria su confirmación mediante el “test” de sudor y posterior análisis molecular.

En los casos en los que se tiene sospecha clínica de la enfermedad o en los casos en que los análisis mencionados han dado positivos, se recurre al diagnóstico mediante ensayos basados en técnicas de biología molecular, con el fin de caracterizar el genotipo. El diagnóstico molecular permite realizar tanto diagnósticos prenatales como detección de portadores y se encuentra incluido en algunos programas de detección precoz cuando se determina hepertripsinemia (Ranieri *et al.*, 1994). En general, la estrategia para realizar el

diagnóstico molecular comienza con el análisis de las mutaciones más frecuentes en FQ. Si estas mutaciones no son identificadas, se realiza un rastreo del gen *CFTR* por técnicas que permitan detectar cualquier cambio existente en la secuencia del ADN de la muestra. Algunas de las técnicas utilizadas inicialmente fueron la electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE) (Costes *et al.*, 1993) y el análisis de la conformación de ADN de cadena simple (SCCA) (Orita *et al.*, 1989). En la actualidad, los centros de diagnóstico especializados cuentan con nuevas plataformas tecnológicas que permiten realizar análisis a gran escala y que varían en costos, flexibilidad y análisis de datos.

4. TERAPIAS EXISTENTES PARA FQ

La FQ permanece incurable y los tratamientos empleados en la actualidad tienen como objetivo aliviar los síntomas o desacelerar el proceso, a fin de mejorar la calidad de vida del paciente. Debido a que en FQ la principal causa de enfermedad y mortalidad se debe a la enfermedad pulmonar, los tratamientos están enfocados en reducir el daño en las vías respiratorias. Los distintos tipos de terapias se ajustan a las necesidades de cada paciente y combinan el uso de antibióticos y antiinflamatorios, en conjunto con diferentes estrategias para eliminar el mucus espeso de los pulmones.

4.1. Despeje de las vías respiratorias (“Airway clearance”)

Una vez establecida la infección e inflamación en las vías aéreas, las células inflamatorias muertas liberan altas concentraciones de ADN, confiriéndole mayor viscosidad a las secreciones aéreas. Se suma a esto una mayor deshidratación de la capa de líquido luminal y el posible aumento en la secreción de mucus. Como consecuencia, se reduce el despeje de las vías aéreas, lo que permite que el ciclo de infección e inflamación continúe y conduzca al daño pulmonar (Davis, 1999).

La finalidad de las técnicas de despeje de las vías respiratorias es ayudar a remover las secreciones aéreas viscosas, que contienen altas

concentraciones de bacterias, elastasas, citoquinas y otros productos bacterianos. Existen varios métodos para llevar a cabo esta terapia; entre ellos se encuentran la fisioterapia de pecho tradicional, el ejercicio físico, el uso de aparatos mecánicos y técnicas de respiración y tos específicas (Davidson AGF, 1995). Es importante que la terapia comience tan pronto como sea posible, ya que desde un comienzo muy temprano de la enfermedad se pueden encontrar mediadores inflamatorios y bacterias, por lo que la intervención para eliminar las secreciones bronqueoalveolares es muy beneficioso (Konstan *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 1995).

4.2. Terapia con antibióticos

El desarrollo de antibióticos potentes de amplio espectro, en particular los dirigidos contra *Pseudomonas*, han permitido aumentar la supervivencia de los pacientes con FQ desde hace varias décadas (Pedersen *et al.*, 1987). La finalidad del uso racional de antibióticos en FQ es reducir la infección bacteriana crónica que induce la inflamación de las vías aéreas, la obstrucción de las mismas y la bronquiectasia. La infección con *P. aeruginosa* no puede ser completamente erradicada a pesar de una terapia agresiva con antibióticos, pero si puede ser reducida (en conjunto con otras terapias como el despeje de las vías respiratorias), observándose una mejora en los síntomas y en la función pulmonar (Smith *et al.*, 1988).

Los antibióticos pueden ser administrados en forma intravenosa, oral o aerosolizados, lo que depende de la situación clínica de cada paciente en particular. Para realizar una terapia exitosa con antibióticos administrados por vía intravenosa, es fundamental usar la combinación y la dosis apropiada de drogas durante un tiempo adecuado. También es muy importante identificar las bacterias presentes en el esputo del paciente para guiar la elección de los antibióticos. La terapia intravenosa es generalmente aplicada a las exacerbaciones severas de la enfermedad. La terapia oral en cambio, se encuentra más limitada a las exacerbaciones de severidad moderada. Los antibióticos de amplio espectro pueden proveer beneficios clínicos aún cuando no sean activos contra las especies de *Pseudomonas*, ya que son efectivos contra otras

bacterias presentes en el tracto respiratorio inferior (Jewes & Spencer, 1990). El uso de antibióticos administrados por inhalación presenta la ventaja de aportar una mayor concentración de la droga en las vías aéreas (Littlewood *et al.*, 1993; Toso *et al.*, 1996).

4.3. Tratamiento con DNasa

Debido a que la presencia de altas concentraciones de ADN en las secreciones de las vías aéreas aumentan la viscosidad del mucus, su ruptura mediante el tratamiento con desoxirribonucleasa recombinante humana (DNasa rh) favorecería el despeje de las vías aéreas. La DNasa rh ha sido probada en análisis clínicos y aprobada por la "U.S. Food and Drug Administration" (Shak, 1995). Los estudios *in vitro* junto con los estudios clínicos demostraron que la DNasa reduce las propiedades viscoelásticas del esputo en FQ (Aitken *et al.*, 1992; Hubbard *et al.*, 1992; Ramsey *et al.*, 1993).

4.4. Terapia antiinflamatoria

El tratamiento de la inflamación es fundamental para el manejo de la enfermedad pulmonar en FQ, particularmente por la evidencia de inflamación en la vida temprana de los pacientes. El uso sistémico de corticosteroides para este propósito está limitado por la alta incidencia de efectos laterales (Rosenstein & Eigen, 1991). Por otra parte, el ibuprofeno es el antiinflamatorio no esteroideo más utilizado en FQ por su capacidad de inhibir la migración de los neutrófilos (Konstan, 1998), aunque también posee algunos efectos secundarios. En la actualidad, se buscan alternativas antiinflamatorias de menor toxicidad.

5. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN FQ

5.1. Antecedentes

Desde 1994 nuestro laboratorio estudia la expresión de genes que pudiesen estar modulados específicamente en la FQ, con el fin de conocer con mayor detalle los mecanismos involucrados en la enfermedad. En ese

entonces no se conocía ningún gen CFTR-dependiente y no se conocían las interacciones del CFTR a través de los dominios PDZ. Tampoco se sabía si el transporte de Cl⁻ podría tener algún efecto genómico (aún hoy se ignora con certeza). Para explorar la hipótesis de la existencia de genes CFTR-dependientes se utilizó el método denominado “differential display” o “display” diferencial (DD) (Liang & Pardee, 1992; Cafferata *et al.*, 1996). De ésta manera se lograron observar diferentes genes cuya expresión dependía de la presencia o de la actividad del CFTR. Uno de los fragmentos de ADN copia (ADNc) observados en el “display” diferencial de células CFDE (fenotipo FQ) fue clonado, secuenciado e identificado como correspondiente a la tirosina quinasa SRC (González-Guerrico, 2001; Gonzalez-Guerrico *et al.*, 2002). Asimismo, se comprobó el incremento de la actividad de SRC y se observó que la expresión de MUC1 se encontraba aumentada en células FQ, por lo que SRC podría ser el puente entre la sobreproducción de mucinas y la falla del CFTR en FQ (Gonzalez-Guerrico *et al.*, 2002).

Este trabajo de tesis comenzó a partir de los resultados obtenidos en un “display” diferencial (Marcucci, 2003; Valdivieso *et al.*, 2007). El mismo fue realizado con la finalidad de continuar con el estudio de genes dependientes del CFTR, pero al contrario que en el caso de c-Scr, cuyo gen era sobreexpresado (González-Guerrico, 2001), se buscó un gen cuya expresión se encontrara reducida en FQ. Entonces, se seleccionó del DD una banda con expresión disminuida en FQ, que luego fue identificada como un ARNm correspondiente al gen *MTND4*. Dicho gen codifica para la subunidad ND4 del complejo I mitocondrial (CI_m), una de las 7 subunidades de este complejo codificadas por el genoma mitocondrial (Chomyn *et al.*, 1985; Chomyn *et al.*, 1986).

En la actualidad se desconoce la función exacta de dicha subunidad y si la misma se encuentra o no involucrada en la transferencia de electrones o en la translocación de protones. Sin embargo, se ha reportado en varios trabajos que la subunidad ND4 es un componente fundamental para la correcta actividad del CI_m (Degli Esposti *et al.*, 1994).

5.2. El modelo utilizado para el “Display” diferencial (DD)

Brevemente, el DD fue realizado con ARNm aislado de células CFDE (provenientes de un paciente con FQ), células CFDE/6RepCFTR (células CFDE normalizadas en la expresión de CFTR salvaje) y éstas últimas tratadas con un inhibidor del CFTR (glibenclamida). El inhibidor se utilizó para revertir el fenotipo normalizado de las células CFDE/6RepCFTR hacia un fenotipo enfermo. De esta manera, se descartaron los genes que podían tener afectada su expresión por causas diferentes a la alteración del transporte de Cl⁻ por CFTR; por ejemplo, debido a efectos producidos por la transfección, por alguna variación en la historia de las células post transfección (p.e., selección clonal de las mutantes que tuviesen mayor velocidad de crecimiento), o por la simple presencia de la proteína CFTR en la membrana. Así, los genes cuya expresión depende exclusivamente de la actividad del CFTR deberían tener niveles diferentes en las células transfectadas y este cambio debería poder revertirse tras el tratamiento con el inhibidor del CFTR. En otras palabras, buscábamos identificar en el DD aquellos fragmentos de expresión diferencial entre las células corregidas y las FQ, que podían revertirse con el tratamiento con glibenclamida. Además, esta reversión observada tras el tratamiento con un inhibidor del canal, indicaría que no solo existe una correlación entre la expresión diferencial del gen en estudio y la actividad del CFTR, sino una relación causa-efecto.

6. ANORMALIDADES MITOCONDRIALES ASOCIADAS A FQ

Antes de conocerse la existencia de la falla del *CFTR* en FQ, se habían descrito diversas anormalidades mitocondriales asociadas a esta enfermedad. Entre otros efectos, se había reportado que las mitocondrias de células FQ incorporaban más calcio (Feigal & Shapiro, 1979; Feigal *et al.*, 1982) y que el consumo de oxígeno era mayor que en células normales usadas como controles (Shapiro *et al.*, 1979). La incorporación de calcio por la mitocondria es una compleja reacción dirigida por el gradiente de protones que se establece entre ambos lados de la membrana interna mitocondrial debido al

sistema de fosforilación oxidativa. Por otro lado, el consumo de oxígeno celular está determinado por la actividad de dicho sistema.

Estos datos sugerían que en FQ la cadena de transporte de electrones presentaba modificaciones con respecto a un fenotipo normal, e incluso llegaron a pensar que el gen mutante responsable de la FQ se encontraba en el Complejo I mitocondrial (CI_m) (Shapiro *et al.*, 1979). Más aún, en 1988 Dechecchi y col. (Dechecchi *et al.*, 1988) encontraron alteraciones significativas en las propiedades del CI_m de la cadena respiratoria mitocondrial en células FQ. Pero luego del descubrimiento de la falla en el CFTR en FQ (Riordan *et al.*, 1989), todas estas teorías fueron descartadas y dejadas en el olvido. Sin embargo, según de Meer y col. (de Meer *et al.*, 1995), las anomalías observadas explicarían los defectos en la eficiencia oxidativa en el músculo esquelético de pacientes FQ.

7. EL COMPLEJO I MITOCONDRIAL (CI_m)

7.1. Función del CI_m

El CI_m, también conocido como complejo NADH:ubiquinona oxidoreductasa o complejo NADH deshidrogenasa, es la puerta de entrada del NADH proveniente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs) a la cadena respiratoria, en la cual se lleva a cabo la producción de energía mediante fosforilación oxidativa. La producción de energía ocurre gracias a la acción concertada de cinco complejos enzimáticos embebidos en la membrana interna mitocondrial. Así, el CI_m acopla la oxidación de NADH y la reducción de ubiquinona con la generación de una parte del gradiente de protones utilizado para la síntesis de ATP. Los electrones son transferidos a través de nueve “clusters” de hierro-azufre hasta el aceptor de electrones ubiquinona y luego a lo largo del sistema de fosforilación oxidativa hasta el complejo IV para reducir oxígeno molecular. La energía liberada durante este proceso es utilizada para translocar los protones a través de la membrana interna mitocondrial (Figura 4). Por cada NADH que se oxida, el CI_m transporta 4

protones hacia el espacio intermembrana (Galkin *et al.*, 1999; Galkin *et al.*, 2006).

Todavía se debate sobre el mecanismo involucrado en el acoplamiento entre la transferencia de electrones y la translocación de protones. Algunos autores sostienen que la transferencia de electrones podría estar acoplada directamente por la proximidad del sitio de unión de ubiquinona a la translocación de protones, en tanto que otros apoyan la hipótesis de que estaría acoplada a través de cambios conformacionales del complejo enzimático (Vinogradov, 2001; Brandt, 2006).

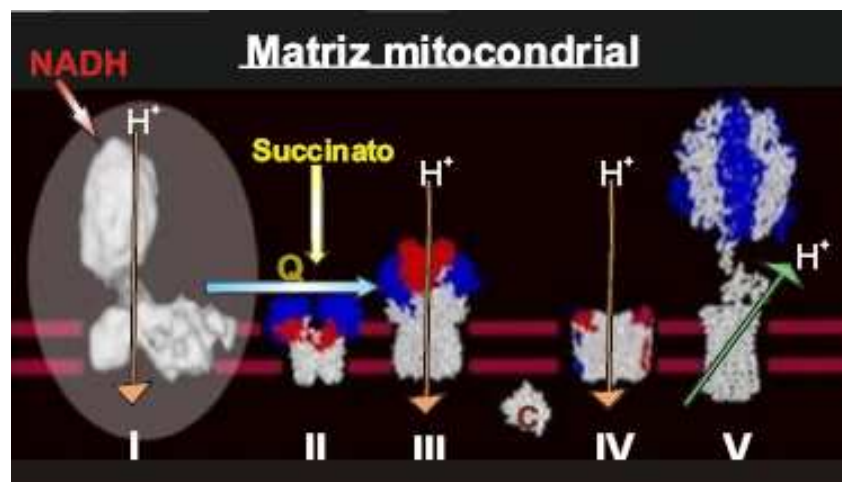


Figura 4: Esquema de la cadena respiratoria mitocondrial. Se muestran los 5 complejos del sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial (I, II, III, IV: cadena de transporte de electrones (CTE) y V: ATPasa), ubicados sobre la membrana interna mitocondrial. Q, es ubiquinona (Coenzima Q10 o CoQ10), que transporta los electrones que ingresan a la cadena por la oxidación de NADH en el CI_m. Esta figura fue modificada de la original publicada por la empresa "Mitoscience" (URL: http://www.mitosciences.com/complex_i.html).

7.2. Estructura del CI_m

A partir de imágenes de microscopía electrónica, se ha podido observar que el CI_m tiene forma similar a una bota, o forma de L, y puede ser dissociado en dos sub-complejos principales que corresponden al tobillo y al pie de la bota (Figura 5). El tobillo constituiría un sub-complejo que se dirige desde la

membrana hacia la matriz mitocondrial y contiene la mayoría de los grupos involucrados en las reacciones de oxido-reducción, entre ellos, al sitio de unión de NADH. El pie del complejo, formado por subunidades hidrofóbicas, se encuentra embebido en la membrana interna mitocondrial y contiene al sitio catalítico en el cual se produce la reducción de la ubiquinona y la unión de inhibidores específicos. En esta porción del C1m se encuentran las subunidades codificadas por el genoma mitocondrial (Figura 5) (Janssen *et al.*, 2006; Vogel *et al.*, 2007).

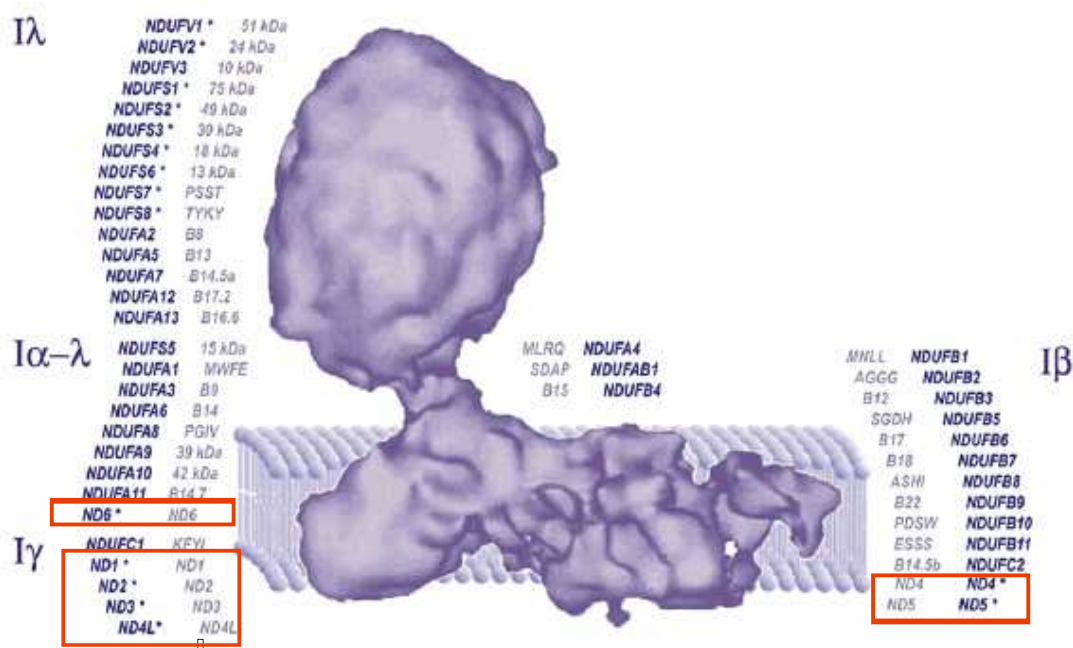


Figura 5: Topología de las subunidades del C1m. Se muestra la separación del Complejo I mitocondrial en distintos fragmentos denominados I α , I β , I λ e I γ . La figura muestra como se distribuyen las 45 subunidades que conforman al C1m en cada uno de los fragmentos. En rojo se encuadran las subunidades codificadas por el genoma mitocondrial. Esta figura fue modificada del original en un trabajo de Janssen y col. (Janssen *et al.*, 2006).

7.3. Posible función de MTND4

Aparentemente, la subunidad MTND4 estaría involucrada en la formación de un dominio necesario para la asociación de las deshidrogenasas mitocondriales ligadas a NADH con el complejo enzimático, facilitando la transferencia de NADH entre ambos. Dicha hipótesis se sustenta en trabajos

que han demostrado la existencia de varias deshidrogenasas mitocondriales asociadas al CIm (Sumegi & Srere, 1984). De esta forma, la mutación ND4/11778 determinaría una baja eficiencia en la oxidación mitocondrial de sustratos ligados a NADH (Majander *et al.*, 1991). Por otro lado, hay autores que proponen que MTND4 estaría involucrada en el ensamblado de la porción del complejo unida a membrana o en la formación de un dominio necesario para el ensamblado de ambas partes del complejo y su posterior localización en la membrana interna (Hofhaus & Attardi, 1993; Chomyn, 2001). Esto es apoyado por otro trabajo donde se ha demostrado que aún en la ausencia de MTND4 o MTND5, se produce la formación de un subcomplejo del brazo periférico (Bourges *et al.*, 2004).

En este trabajo de Tesis hemos observado claramente una disminución en la actividad del CIm concomitante con la disminución de la expresión de *MTND4* en células FQ o en células normales tratadas con inhibidores del CFTR, una disminución que podría explicar las fallas mitocondriales asociadas a FQ mencionadas anteriormente. Estos resultados serán también descritos y discutidos en esta Tesis.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Como se indicó anteriormente, hemos demostrado la existencia de genes dependientes de la actividad del CFTR mediante DD. Ahora, hemos encontrado otro gen CFTR-dependiente: el gen *MTND4*, que codifica una de las subunidades del Clm. Debido a que se ha demostrado que la subunidad MTND4 es de gran importancia para la actividad de dicho complejo enzimático, nuestra hipótesis de trabajo es que la actividad del canal de cloruro CFTR podría regular de manera directa o indirecta la actividad del Clm y ser responsable del aumento de especies reactivas de oxígeno en FQ.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Demostrar la expresión diferencial del gen mitocondrial *MTND4* en fibrosis quística mediada por la falla del canal de cloruro CFTR y determinar si existe una disminución de la actividad del Clm en FQ.

Objetivos particulares:

1. Validar los resultados obtenidos por DD sobre la regulación negativa del gen *MTND4* en FQ.
2. Determinar si la reducción de *MTND4* tiene consecuencias en la actividad del Clm.
3. Utilizar distintos modelos celulares de FQ para confirmar los resultados anteriores.
4. Determinar si la falla del Clm en FQ genera un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).
5. Determinar el número de copias de ADN mitocondrial (ADNmt) en células FQ y células normales, para saber si la disminución de la expresión del gen *MTND4* puede ser atribuida a una disminución en el número de copias del ADNmt.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

1.1. Células CFDE y células CFDE/6RepCFTR

CFDE es una línea celular proveniente de células epiteliales de glándula traqueobronquial de un paciente con Fibrosis Quística (Lei *et al.*, 1996). CFDE/6RepCFTR son células CFDE transfectadas con el plásmido pRep5/CFTR, que expresa en forma episomal el CFTR salvaje y corrige el transporte de cloruro dependiente de AMP cíclico (AMPC), afectado en FQ. Estas células fueron facilitadas por el Dr. Dieter Gruenert (Human Molecular Genetics Unit, Department of Medicine, University of Vermont, Burlington, VT, USA) (Lei *et al.*, 1996).

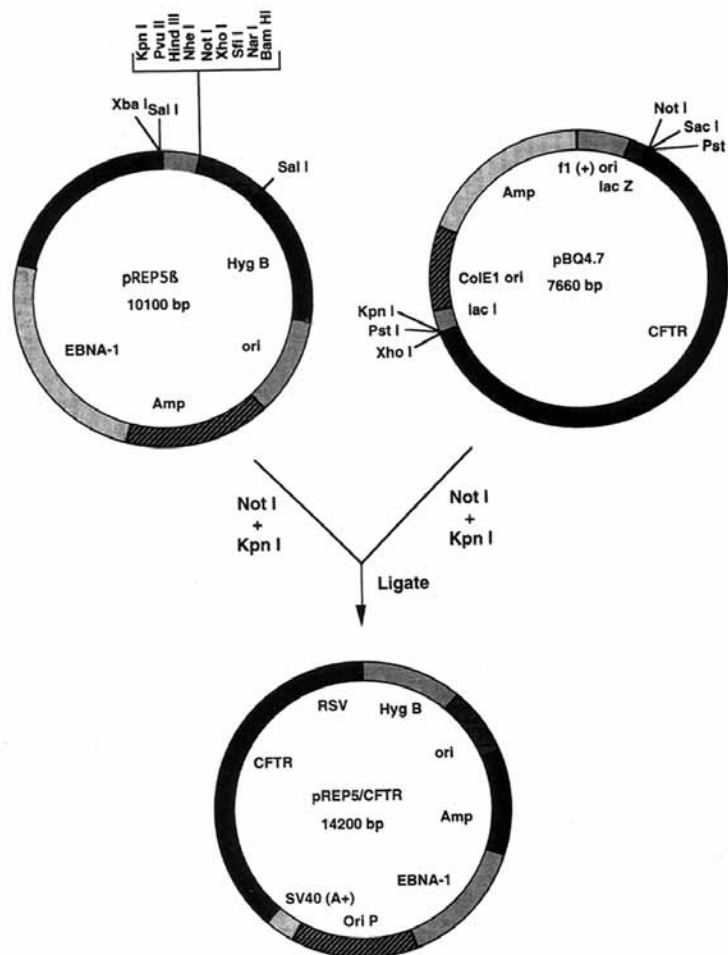


Figura 6: Esquema de la construcción del plásmido p5REP/CFTR.

Un fragmento de *CFTR* de 4,7 kb fue obtenido por digestión del plásmido pBQ4,7. (B) El plásmido pBQ4,7 es un plásmido pBluescript KS+ con un inserto del ADNc del gen *CFTR*,

obtenido por digestión con PstI. Para escindir el inserto cftr del sitio de clonado de pBluscript KS+, el plásmido fue digerido con NotI y KpnI. El fragmento de *CFTR* fue insertado en el sitio de clonado del vector pREP5 β (A) previamente clivado con NotI y KpnI, para que el *CFTR* quede en la orientación correcta; el extremo 5' del fragmento quedó adyacente al promotor RSV LTR y el extremo 3' a la región de poliadenilación de SV40. Las secuencias EVB oriP y EBNA1 facilitan la replicación episomal y el mantenimiento de (C) pRep5/CFTR.

1.2. Células IB-3 y S9

Estas células fueron adquiridas a ATCC, Rockville, MD. Las células IB-3 poseen la mutación más común en FQ (Δ F508) y una mutación sin sentido (W1282X), con una señal de terminación prematura (hoja de datos de ATCC) (Zeitlin *et al.*, 1991). Las células S9 son células IB-3 que han sido transducidas con un vector viral (en lugar de un plásmido como es el caso de las CFDE/6RepCFTR). Expresan CFTR en forma estable, con lo cual, a diferencia de las CFDE/6RepCFTR, no requieren antibióticos para mantener la expresión del CFTR normal. La desventaja con respecto a las CFDE es que el gen está insertado al azar en el genoma sin que se conozcan posibles efectos laterales y, además, por el mismo motivo, podría existir selección clonal (múltiples clones con distintos puntos de inserción).

1.3. Células T84

Esta línea celular fue obtenida de ATCC (CCL 248) (ATCC, Rockville, MD) y proviene de células epiteliales de carcinoma de colon humano. Expresan CFTR salvaje (Gregory, 1990; Cafferata, 2000; Cafferata, 2001). El objetivo de usar estas células es evitar la existencia de una posible selección clonal o los efectos de antibióticos, como ocurre con las dos líneas anteriormente descritas (CFDE y IB-3). El modelo consiste en inhibir la actividad del CFTR para provocar en estas células una fibrosis quística "inducida". Así, tanto los controles (T84) como las tratadas con inhibidores, difieren únicamente en la presencia del inhibidor. Aquí la desventaja podría ser que los controles no llevan inhibidor y podrían existir efectos colaterales del inhibidor, no específicos de la inhibición del CFTR. Por este motivo, lo más adecuado es verificar los resultados en varios modelos y comprobar que se obtienen los mismos resultados. En particular, el uso de ARNi es adecuado para validar los datos obtenidos con inhibidores (se describe más adelante).

1.4. Células Caco-2

Esta línea celular fue obtenida de ATCC (HTB-37) (ATCC, Rockville, MD) y proviene de células epiteliales de carcinoma de colon humano. Expresan CFTR salvaje en niveles similares a las células T84. Se utilizaron para corroborar los resultados obtenidos con células T84.

1.5. Condiciones de cultivo

Las células CFDE y CFDE/6RepCFTR fueron crecidas sobre una matriz de colágeno y fibronectina, en botellas o cajas de Petri de plástico aptas para el cultivo de células, como fue previamente descrito por Lei (Lei *et al.*, 1996). Para preparar la matriz de colágeno y fibronectina se colocaron 1-2 ml de la siguiente solución en placas o botellas de cultivo:

Medio de cultivo DMEM-F12 (1:1)	100 ml
Seroalbúmina bovina (1mg/ml)	10 ml
Colágeno tipo I (2,9 mg/ml)	1 ml
Fibronectina humana	1 mg

Las placas se dejaron con la solución a 37 °C durante 2 hs y luego se retiró el excedente.

Todas las líneas celulares utilizadas se cultivaron en medio de cultivo DMEM-F12 1:1 (Life Technologies, Gibco-BRL, Rockville, MD) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (BIOSER, Buenos Aires, Argentina), 10 U/ml penicilina, 10 µg/ml estreptomina y 50 µM anfotericina B (Life Technologies, Rockville, MD); en una atmósfera de aire saturado de agua y equilibrado con 5 % de CO₂.

Las células CFDE/6RepCFTR se cultivaron en presencia de 100 µg/ml de higromicina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para mantener la selección del plásmido que expresa el CFTR. Luego de la selección, 24 horas antes de los ensayos, el medio con higromicina B fue reemplazado por medio sin este antibiótico (para minimizar posibles efectos laterales de este antibiótico).

2. Congelamiento y descongelamiento de las células

2.1. Descongelamiento

Se retiró el criotubo con células del nitrógeno líquido y se sumergió en un baño de agua a 37 °C con agitación constante. Inmediatamente después del descongelamiento, las células se pasaron a una botella de 75 cm² con 10 ml del medio de cultivo descrito anteriormente. A las 2 o 3 horas, una vez adheridas al fondo, el medio fue reemplazado por medio fresco, para eliminar los restos de DMSO (dimetil sulfóxido) presentes en el medio de congelamiento. Las células se crecieron en estufa a 37 °C, con una atmósfera de aire saturado de agua y con 5 % de CO₂.

2.2. Congelamiento

Con el fin de preservar las características originales de la línea celular, luego del descongelamiento y replicación, se procedió a congelar parte de las células obtenidas. El rango de concentración celular utilizado osciló entre 2 y 8 x 10⁶ cél. /ml /criotubo. Las células subconfluentes se trataron con una solución de tripsina-EDTA (0,25 % tripsina / 0,02 % EDTA en PBS 1X), aproximadamente durante 5 minutos, hasta que las células se disgregaron. Luego se inactivó la tripsina utilizando medio de cultivo suplementado con 10 % de suero fetal bovino y las células disgregadas fueron centrifugadas a 400 x g durante 5 minutos; se retiró el medio sobrenadante y se resuspendieron las células en medio de congelamiento (10 % DMSO, 50 % suero fetal bovino, 40 % de medio DMEM-F12). Posteriormente, se incubaron en hielo durante 15 min, luego se almacenaron a -70 °C durante 16 hs (dentro de un recipiente de telgopor para disminuir la pendiente de congelamiento) y finalmente a -196 °C, en un termo con nitrógeno líquido.

3. Bloqueo de la actividad del transporte de cloruro a través del CFTR mediante inhibidores sintéticos

Las células fueron cultivadas hasta un 70-80 % de confluencia en placas de cultivo de 78 cm². Una vez alcanzada dicha confluencia, se recambió el medio por otro sin suero y se dejaron 24 horas en incubación, a 37 °C. Luego se agregaron, en medio sin suero, los inhibidores adecuados para cada

tratamiento, a diferentes concentraciones (glibenclamida [50, 100 y 150 μM]; CFTR(inh)-172 [2,5; 5 y 10 μM]) y se incubó durante 24-48 horas, a 37 °C. Las incubaciones de 24 horas se realizaron para la medición de la expresión del ARNm de *MTND4*. Las incubaciones de 48 horas se hicieron para los ensayos de medición de la actividad del complejo I mitocondrial. Una vez determinada la concentración óptima para cada inhibidor, se utilizó solamente esa concentración (100 μM para glibenclamida y 5 μM para CFTR(inh)-172).

4. Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo *TRI Reagent* (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Las células fueron lavadas con 2 ml de PBS 1X frío y lisadas con 1-3 ml de *TRI Reagent*. Para separar el ARN del ADN y las proteínas, por cada 1 ml de reactivo se agregaron 200 μl de cloroformo y se mezcló vigorosamente. Se incubó a temperatura ambiente ($T^{\circ}\text{A}$) 5 min y se centrifugó a 12000 x g durante 15 min a 4 °C, para facilitar la separación de fases. Luego se extrajo la fase acuosa, que contiene el ARN total, con cuidado de no tocar la interfase que contiene el ADN genómico y la mayor parte de las proteínas (y ARNasas). Se precipitó el ARN de la fase acuosa con un volumen de isopropanol y se centrifugó a 12000 x g por 10 min a 4 °C. El precipitado se lavó tres veces con etanol 75 % (v/v en agua) frío para eliminar los restos de isotocianato de guanidina y se dejó secar. Finalmente, se disolvió el precipitado en agua tratada con 0.1 % de dietilpirocarbonato (DEPC; libre de ribonucleasas) a razón de 30 μl por cada 5×10^6 células y se guardó a -70 °C. La cuantificación se realizó espectrofotométricamente (GenQuant, Pharmacia Biotech, SP, Cambridge, England). Para verificar la pureza del ARN, se usaron las relaciones de absorbancia A260 nm/A230 nm (menor a 2,0 implica que aún hay exceso de sales y deben repetirse los lavados) y A260 nm/A280 nm (para tener en cuenta impurezas proteicas; el cociente es considerado aceptable a partir de 1,7).

5. Purificación de ADN

La extracción de ADN fue realizada usando el “Wizard Genomic DNA Purification KIT” de Promega (Promega, Madison, WI, USA) según las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Brevemente, se cosecharon 5×10^6 células con rastrillo, se transfirieron a tubos de 1,5 ml y se centrifugaron a $13.000 \times g$ 10 seg. Se removió el sobrenadante y se lavaron las células con 200 μ l de PBS 1X. Luego se agregaron 600 μ l de la solución de lisis (solución provista por el fabricante) y se resuspendió por agitación hasta obtener una solución homogénea. Se agregaron 3 μ l de solución de RNasa (“RNase”; solución provista por el fabricante) (12 μ g), se mezcló e incubó a 37 °C por 15 min y se dejó el tubo en hielo durante 5 min. Luego se agregaron 200 μ l de solución de precipitación de proteínas (solución provista por el fabricante) y se agitó en vórtex durante 20 seg a máxima velocidad. Se centrifugó a $13.000 \times g$ durante 1 min y se transfirió el sobrenadante con el ADN a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml que contenía 600 μ l de isopropanol, a T^oA. Se mezcló suavemente hasta que se hicieron visibles unas pequeñas fibras blancas formadas por el ADN y se centrifugó a $13.000 \times g$ durante 1 min. Luego se descartó el cuidadosamente el sobrenadante y se agregaron 600 μ l de etanol 70 % a T^oA, para lavar el ADN. Se descartó el etanol y se dejó secar el precipitado durante 15 min a T^oA. Finalmente, se agregaron 100 μ l de agua libre de DNasa (DNAsa) y se rehidrató el ADN incubando la solución a 65 °C por 1 hr. Finalmente, el ADN fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

6. RT-PCR (“Reverse Transcription - Polimerase Chain Reaction”) Semicuantitativa

6.1. Transcripción Reversa (RT)

Las muestras de ARN total (4 μ g), extraídas de células CFDE, CFDE/6RepCFTR y CFDE/6RepCFTR tratadas con distintas concentraciones de glibenclamida o CFTR(inh)-172, se trataron con “RQ1 RNase-Free DNase I” (1 U/ μ g total RNA; Promega, Madison, WI) durante 30 min a 37 °C y luego se detuvo la reacción con solución de detención, incubando a 65 °C durante 10

min. Se realizó la reacción de RT usando transcriptasa reversa M-MLV (Promega) según las instrucciones del fabricante, con unas pocas modificaciones. Brevemente, se usó 1 µg de ARN libre de ADN, 4 µM de cebadores antisentido (“reverse primers”) específicos para *MTND4* y *GAPDH* (secuencias en Tabla I) y 100 U de transcriptasa reversa/µg de ARN. La amplificación de *GAPDH* fue utilizada como control interno.

6.2. RT-PCR “multiplex” semicuantitativa

Se agregaron diferentes diluciones de las muestras de ADNc a 40 µl de mezcla de reacción de PCR (reacción de polimerasa en cadena) (1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM desoxinucleótidos trifosfatos, 1 U de *Taq* DNA polimerasa [Promega] y los cebadores “reverse” y “forward” de la Tabla I) y se efectuaron 30 ciclos de amplificación como se indica más adelante (en 6.4. Condiciones de amplificación por PCR). En cada experimento, se realizaron ensayos preliminares con diferentes diluciones de ADNc para determinar la fase exponencial de la amplificación por PCR. Luego se separaron los productos de la reacción de PCR por electroforesis en geles de agarosa 3 % (p/v), preparados en solución amortiguadora (“buffer”) TAE 1X (Tris base 40 mM, ácido acético 18 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Las bandas fueron visualizadas y la imagen digitalizada utilizando un transiluminador y analizador de geles Biorad, Para calcular el nivel de expresión de *MTND4*, se cuantificó la intensidad de las bandas de los productos de PCR usando el programa Scion Image (Scion Corp., Frederick, MD) y se calculó la relación entre los valores obtenidos para *MTND4* y *GAPDH*. Se hicieron al menos cuatro experimentos, cada uno por cuadruplicado, para realizar los análisis estadísticos.

Tabla I: Secuencias de los cebadores (“primers”) y longitud de sus productos.

Gen Diana	Cebador “forward”	Cebador “reverse”	Largo del producto de PCR en pares de bases (bp)
<i>MTND4</i>	5'-CTCACAACACCCTAGGCTCA-3'	5'-GACTGTGAGTGCCTTCGTA-3'	500
<i>GAPDH</i>	5'-CCCATCACCATCTTCCAGGA-3'	5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'	300

6.3. RT-PCR semicuantitativa con curva estándar

Para lograr una mayor reproducibilidad y eliminar los artefactos (dímeros, amplificaciones inespecíficas, etc.) que suelen aparecer en las PCR

“multiplex”, adaptamos una técnica de PCR cuantitativa con curva estándar, previamente creada por Miller y col. (Miller *et al.*, 2003) para cuantificar ADN mitocondrial (ADNmt). Brevemente, se usó un único plásmido recombinante como referencia, que contenía una copia de cada secuencia de ADN diana, *MTND4* (gen mitocondrial) y *GAPDH* (gen nuclear), cuya construcción se describe más adelante. Se hicieron dos reacciones de PCR separadas, una amplificando *MTND4* y la otra *GAPDH*, a partir de ADNc obtenido por RT. Aquí se diferencia de los ensayos de PCR “multiplex”, en los cuales los cebadores para los dos genes se agregan juntos, en el mismo tubo de reacción. En cada amplificación se utilizó el plásmido *pGEM-ND4-GAPDH* como control y para construir la curva estándar. La mezcla de reacción fue la misma que la usada en la PCR “multiplex”, pero con un par de cebadores para amplificar un solo gen. Se usaron varias diluciones de ADNc para determinar la fase exponencial de la amplificación por PCR y asegurar que los productos se encontrasen dentro de este rango exponencial. Para la amplificación de cada gen, se hicieron diluciones seriales del plásmido estándar (de concentración conocida) y se separaron en tubos independientes; se amplificaron en la misma reacción de PCR que los ADNc correspondientes a cada tratamiento para permitir la comparación con estos productos. La abundancia de los productos correspondientes a cada tratamiento fue inicialmente expresada como nanogramos equivalentes de plásmido. Finalmente, la expresión de *MTND4* se expresó calculando el cociente entre los productos obtenidos de *MTND4* y *GAPDH*. Debido a la variabilidad intrínseca de estos ensayos, para realizar el análisis estadístico se hicieron al menos cuatro experimentos, cada uno por cuadruplicado.

6.4. Cuantificación del nivel de copias de ADN mitocondrial (ADNmt) por “Real Time”-PCR

La cuantificación del nivel número de copias de ADNmt se realizó mediante una adaptación de la técnica descrita por Miller y col. (Miller *et al.*, 2003), para la cuantificación del número de copias de ADNmt, a la nueva tecnología de PCR en tiempo real (“Real Time PCR”). Básicamente, la técnica se asemeja a la que usamos para cuantificar el nivel de expresión de *MTND4* por el método de la curva estándar. En este caso, utilizamos ADN total

extraído de las células en estudio, en lugar de ADNc proveniente de una reacción de transcripción. El resto de la reacción de PCR se realizó en las mismas condiciones, con el agregado del colorante “EvaGreen” (Biotium Inc., Hayward, CA) para detectar los productos de amplificación mediante el uso de un termociclador iQ cycler (Bio-Rad, Hercules, CA), con lector de amplificación en tiempo real. Los cebadores utilizados se encuentran detallados en la Tabla I. Se calculó la concentración relativa de cada gen a partir de los resultados de la curva estándar, mediante el programa de computación provisto con el termociclador. Se cuantificó el nivel de copias de ADNmt con la relación entre la concentración del gen mitocondrial y la del gen nuclear (*MTND4/GAPDH*). Se realizaron dos experimentos independientes para cada tipo celular y se realizó cada uno por cuadruplicado.

6.5. Condiciones de amplificación por PCR

Tanto la PCR “multiplex” como las PCR con curva estándar se realizaron en las siguientes condiciones: 94 °C (4 min) y 30 ciclos de 94 °C (30 seg), 50 °C (40 seg), 72 °C (60 seg) y 2 min de extensión final a 72 °C. Al finalizar la PCR, 10 µl de cada mezcla de PCR fueron separados en geles de agarosa 3 % con bromuro de etidio, visualizados por transiluminación UV con un documentador de geles (UVP, Inc. Upland, CA, U.S.A.) y guardados como imágenes para su posterior cuantificación.

6.6. Construcción del plásmido estándar para PCR cuantitativa

Un fragmento de 300 pb correspondiente al gen *GAPDH* y uno de 500 pb con una parte de la secuencia del gen *MTND4*, fueron insertados en un plásmido utilizando el sistema “pGEM-T Easy Vector” (Promega). En primer lugar, se amplificó por PCR el fragmento de *MTND4* a partir de 0,1 µg de ADN extraído de células IB-3; la amplificación se hizo utilizando los cebadores que se muestran en la Tabla I y en las condiciones ya mencionadas. El producto fue visualizado en un gel de agarosa 3 %: la banda de 500 pb fue eluida desde el gel mediante “GENCLEAN II KIT” (BIO101, Vista CA, USA) y se cuantificó por espectrofotometría a 280 nm. Posteriormente, el fragmento fue ligado al plásmido pGEM-T siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez hecha la ligación, el plásmido fue introducido en bacterias DH5α competentes, mediante

transformación. Se examinó por “colony PCR” (se describe más adelante) la presencia del inserto en distintas colonias. Se eligió una de las colonias que dieron amplificación positiva y se realizó una mini preparación de plásmido (se describe más adelante). La presencia del inserto fue testeada por digestión con la enzima de restricción *Eco RI*, siguiendo el protocolo del fabricante (Promega). Para la segunda parte del clonado, se sintetizaron nuevos cebadores correspondientes al fragmento de 300 pb de *GAPDH*, que fueron modificados con el agregado de sitios de corte para las enzimas de restricción *Nsi I* y *Pst I* en los extremos 5’ (Tabla II). A partir de los productos de amplificación de este gen obtenidos por RT-PCR (para no incluir intrones en el inserto), se hizo una PCR con los nuevos “primers” y se visualizó el producto de 300 pb mediante gel de agarosa 3 %. El producto de la amplificación obtenido fue digerido con las enzimas de digestión *Nsi I* y *Pst I* en paralelo con el plásmido seleccionado, que contenía el inserto correspondiente a *MTND4*. Los productos de digestión fueron corridos en geles de agarosa 3 % y eluidos mediante “GENCLEAN II” para purificarlos; luego fueron cuantificados y ligados con ligasa de T4 (Promega) según las instrucciones del fabricante. Se transformaron nuevamente bacterias con el producto de ligación, se colocaron en placas de Petri con medio LB-agar (NaCl 1 %, triptona 1 %, extracto de levadura 0.5 %, agar 1,5 %), que contenían 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C toda la noche. Se realizó una “colony PCR”, amplificando por separado con los cebadores correspondientes a cada gen (Tabla I) y se identificaron las colonias que llevaban el plásmido con los dos insertos. Finalmente, se amplificó y purificó el clon seleccionado mediante “mini-preps” y se confirmó la presencia de los dos insertos por secuenciación de los plásmidos purificados.

Cebador “forward” <i>GAPDH</i> (<i>Nsi I</i>)	5’- <i>ggtcacgatgcat</i> ccccatcccatcttcca-3	Tm: 71 °C
Cebador “reverse” <i>GAPDH</i> (<i>Pst I</i>)	5’- <i>tgaggacctgcagt</i> gtggatcatgagtccttc-3’	Tm: 69.2 °C

Tabla II: Secuencias de los cebadores de *GAPDH* modificados con sitios de restricción. Las letras en negritas corresponden a los sitios de corte de las enzimas de restricción. En letra *itálica* se muestran las bases extras de secuencia al azar, agregadas para facilitar el corte de restricción.

7. Análisis de los productos de traducción mitocondriales mediante marcado isotópico (“pulse-labeling”)

El análisis de la síntesis de proteínas mitocondriales se realizó mediante “pulse-labeling”, que permite cuantificar la síntesis *de novo* de proteínas mitocondriales, utilizando una mezcla de metionina-cisteína [³⁵S], como ha sido descrito por otros autores (Chomyn *et al.*, 1985; Hayashi *et al.*, 1994), con algunas modificaciones. Para cada tratamiento se incubaron toda la noche (ON) 2×10^6 de células en placas de Petri p60. Luego se lavaron las células con PBS 1X y se incubaron con medio DMEM sin metionina durante 30 min. Posteriormente, a distintas placas se agregaron 50-200 µg de emetina (inhibidor de la traducción citoplasmática) por ml de medio y se incubaron 7 min a 37 °C, en 3 ml del mismo medio. Luego, se realizó el marcado con metionina-cisteína [³⁵S] (0,2 mCi [1,175 Ci/mmol] por placa) y las células se incubaron entre 30 min y 2 hs. Las células marcadas fueron tratadas con tripsina 0,25 % en DMEM, lavadas y lisadas en 1 % de dodecil sulfato de sodio (SDS). En experimentos paralelos, se realizó un aislamiento de mitocondrias a partir de las células cosechadas. Se midió la concentración proteica de las muestras mediante Bradford (Bradford, 1976) y 40-80 µg de muestra fueron sometidos a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida con un gradiente exponencial de 15-20 %. Luego de la corrida, el gel fue secado y revelado utilizando un “PhosphorImager Storm 860”, durante 4-6 hs.

8. Preparación de bacterias competentes

Se utilizaron bacterias *E. coli* DH5α (Novagen). Para hacerlas competentes se utilizó el protocolo de CaCl₂ descrito en el manual de Sambrook y col. (Sambrook J, 1989), con algunas modificaciones. Se cultivaron las bacterias sobre medio LB agar a 37 °C, durante 24 hs. Se aisló una colonia, se la inoculó en un tubo con medio LB y se incubó con agitación durante 16 hs a 37 °C. Se diluyeron 100 µl del cultivo en 100 ml de medio LB y se continuó el crecimiento bacteriano a 37 °C, con agitación, hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0,4-0,6, a 600 nm. Luego se mantuvieron las bacterias en hielo durante 20 min y se centrifugaron a 4.000 rpm (rotor J-14, en centrífuga Beckman) durante 10 min, a 4 °C. Se descartó el medio de cultivo y

se resuspendió el precipitado bacteriano en 50 ml de una solución de CaCl_2 50 mM, pre-enfriada a 4 °C. Se mantuvieron las bacterias en hielo durante 10 min y luego se centrifugaron a 4.000 rpm, durante 10 min, a 4 °C. Posteriormente se resuspendió el precipitado en 4 ml de CaCl_2 50 mM, se agregaron 140 μl de DMSO, se mezcló suavemente y se dejó 15 min en hielo. Se agregaron 140 μl de DMSO adicionales por cada suspensión, se mezcló y se dejó en hielo 10 min. Las suspensiones se fraccionaron en volúmenes de 100-200 μl , en tubos de 1,5 ml previamente enfriados, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C hasta su uso.

9. Transformación de bacterias competentes (método de CaCl_2)

La transformación de las bacterias competentes se realizó según el protocolo de Sambrook y col. (Sambrook J, 1989), con algunas modificaciones. Las bacterias competentes (guardadas previamente a -70 °C) se mantuvieron en hielo durante 10 a 15 min, hasta que se descongelaron. Se agregaron 1-5 μl del producto de ligación o del plásmido deseado cada 100 μl de bacterias competentes y la mezcla se dejó en hielo durante 30 min. Luego se incubaron las bacterias a 42 °C durante 90 seg e inmediatamente se pasaron a hielo por 5 min. Se agregaron 900 μl de medio LB sin antibióticos y se dejaron incubando a 37 °C con agitación durante 1 hr, para permitir que se recupere la pared de las bacterias antes del agregado del antibiótico usado para seleccionar las que fueron transformadas (ampicilina). Luego se sembraron entre 50 y 200 μl de bacterias en placas de Petri que contenían medio LB agar al 1,5 % y ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En el caso de seleccionar bacterias transformadas con plásmido pGEM-T, las placas se prepararon con isopropil- β -D-tiogaláctidopiranosido (IPTG) 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido (X-Gal), 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Posteriormente se incubó a 37 °C durante 16 hr. Cuando se transformó con plásmido pGEM-T, se seleccionaron las colonias blancas, que corresponden a la actividad de β -galactosidasa anulada por la inserción de los fragmentos de ADNc (las azules generalmente no tienen inserto dentro del plásmido, pero puede ocurrir que en algunos casos excepcionales sí lo tengan, sin afectar la actividad de la β -galactosidasa; esto debe tenerse en cuenta en casos de difícil transformación, cuando se está en

presencia únicamente de colonias azules, sobre todo, si son algo más débiles), y fueron cultivadas en 5 ml de medio LB líquido para hacer “minipreps”.

10. Selección de bacterias recombinantes por “colony PCR”

Se siguió fundamentalmente el método descrito por Sandhu y col (Sandhu *et al.*, 1989) con algunas modificaciones. Se picó una colonia de la placa con un “tip” estéril, se la colocó en un microtubo con 10 μ l de agua estéril y se dejó luego el tip en 2 ml de medio LB, toda la noche a 37 °C. El tubo con la colonia resuspendida fue hervido durante 5 min para lisar las bacterias y se centrifugó a 12.000 x g durante 5 min. Finalmente, se usaron 5 μ l del sobrenadante para realizar la reacción de PCR con los cebadores adecuados, con el fin de identificar la presencia del inserto deseado. Una vez identificada la colonia positiva para la presencia del inserto por PCR, se procedió a realizar una preparación de plásmido a partir del cultivo correspondiente.

11. Preparación de plásmidos (“mini, midi y maxipreps”)

Se utilizó el sistema comercial de purificación de plásmidos a baja escala “Wizard Plus SV Miniprep” (Promega, Madison, WI, USA), según las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Se precipitaron las bacterias provenientes de un cultivo bacteriano de 5-10 ml mediante centrifugación a 10.000 x g, durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se dejó el tubo boca abajo, sobre un papel, para remover el exceso de líquido. Las bacterias se resuspendieron en 250 μ l de una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 10 mM y 100 μ g/ml ARNasa A. Se agregaron 250 μ l de solución de lisis (NaOH 0,2 M con 1 % de SDS) y se mezcló por inversión (no se utilizó vortex para evitar la ruptura del ADN cromosómico y la posterior contaminación del plásmido). Una vez obtenida una solución más clara, se agregaron 10 μ l de proteasa alcalina y se incubó durante 5 min a T^oA. Luego se agregaron 350 μ l de solución de neutralización (hidrocloruro de guanidinio, 4,09 M, ácido acético glacial, 2,12 M y acetato de potasio, 0,76 M, pH 4,2) y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces (esta rápida neutralización produce la precipitación del ADN cromosómico). Se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min y el sobrenadante se purificó por cromatografía en columna, para la que se usó una minicolumna

“Wizard Plus Miniprep Column” según las instrucciones del fabricante. Brevemente, luego de sembrar la solución con el plásmido sobre el lecho, la columna fue lavada dos veces con una solución que contenía acetato de potasio 60 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y etanol 60 %. Luego, el plásmido fue eluido con 100 μ l de agua bidestilada libre de DNAsas.

Para obtener una mayor cantidad de plásmidos se realizaron purificaciones a mayor escala aumentando los volúmenes de cultivo de bacterias. Las “midi” preparaciones se hicieron con el sistema de purificación comercial “Wizard *Plus* Midipreps” (Promega, Madison, WI, USA), a partir de 100 ml de cultivo, según las instrucciones del fabricante. En los casos en que la producción de plásmidos obtenida por “midi” preparaciones no fue suficiente, se hicieron “maxi” preparaciones de plásmido a partir de 500 ml de cultivo de bacterias, según el protocolo de Sambrook y col. (Sambrook J, 1989).

En todos los casos, la concentración de plásmido fue medida a partir de la absorbancia a 260 nm. La pureza del mismo fue determinada utilizando las relaciones entre las absorbancia a 260/230 nm (sales, mayor a 2,0) y 260/280 nm (proteínas, mayor a 1,7). Los plásmidos fueron separados en geles de agarosa 0,8 % en solución amortiguadora TAE 1X (Tris base 40 mM, Ac. Acético 18 mM, EDTA 1 mM, pH 8), a 100 Volts durante 40 min. Las bandas fueron visualizadas con bromuro de etidio por transiluminación UV en un documentador de geles (UVP, Inc. Upland, CA, U.S.A.), para determinar su integridad.

12. Secuenciación

Los plásmidos obtenidos a partir de las “minipreps” se secuenciaron utilizando un secuenciador automático ALF, de Pharmacia LKB y un “kit” de marcación fluorescente del mismo fabricante (servicio institucional). Los plásmidos pGEM-T con insertos se secuenciaron utilizando los “primers” T7 y SP6.

13. Bloqueo de la expresión del CFTR por ARN de interferencia (ARNi)

13.1. Construcción de un ARN de interferencia específico de CFTR

Para preparar un “short hairpin” ARN de interferencia (shARNi) específico contra CFTR, usamos una secuencia previamente utilizada como oligonucleótido antisentido (complementario a los nucleótidos 1-18 de ARNm del CFTR) y que era capaz de inhibir la expresión del CFTR (Gonzalez-Guerrico *et al.*, 2002). La secuencia antisentido y su complementaria se sintetizaron en un sintetizador Oligo1000M DNA (Beckman-Coulter, Fullerton, CA); luego se hibridaron entre sí y se clonaron en el vector pSILENCER 1.0 U6 (Ambion, Austin, TX, Figura 7), entre los sitios de restricción EcoRI y BamHI. La secuencia insertada fue 5'-GTACGTCTCCAGCGGAGACAAGTTCTCTGTCTCCGCTGGAGACGTACAAAAA-3'. Este inserto contiene la secuencia diana de reconocimiento del ARNm del CFTR (nucleótidos 1-18) seguida por nueve bases al azar y una secuencia complementaria a los primeros dieciocho nucleótidos, con una cola de seis adeninas. Dentro de las células, el inserto se expresará bajo la dirección del promotor U6. Al ser expresado (Elbashir *et al.*, 2001; Hannon, 2002; Paddison *et al.*, 2002) reconocerá el ARNm blanco y lo conducirá a la maquinaria de degradación por ARN de interferencia (Figura 7).

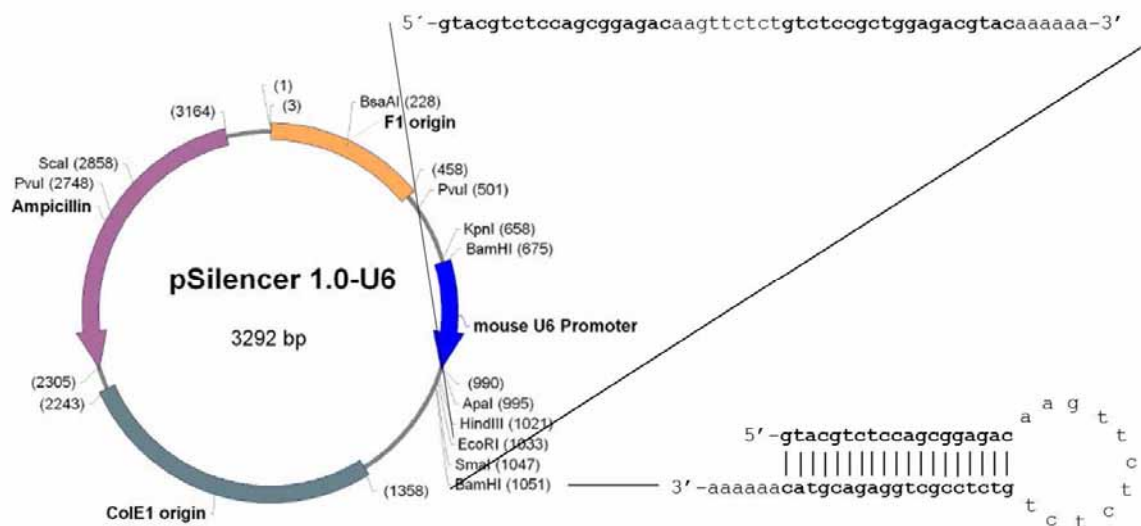


Figura 7: Esquema de la construcción del plásmido pSilencer con el inserto dirigido contra el ARNm del CFTR. Se muestra los sitios en que el inserto se encuentra clonado y el “short hairpin” formado al ser expresado (shARNi-CFTR).

13.2. Transfección por electroporación de células T84 con plásmidos shARNi

Se cultivaron células T84 en DMEM/F12 con 10 % de suero hasta un 70 % de confluencia, se levantaron con 0,5 % Tripsina/PBS 1X, se lavaron con DMEM/F12 sin suero 2 veces, y se llevaron a una concentración de 20×10^6 células/ml en DMEM/F12. Los plásmidos se transfectaron mediante electroporación utilizando un electroporador de onda cuadrada BTX-ECM-830 (Genetronix Inc., San Diego, CA). Se usaron las siguientes condiciones de electroporación: 140 Volts, 70 mseg, 1 pulso, en cubetas de 4 mm de ancho "Gene Pulser" (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se usaron 4×10^6 células por electroporación y se probaron diferentes concentraciones de plásmido shARNi (20-80 μg) con el fin de determinar la concentración óptima de plásmido.

14. Medición espectrofluorométrica de la actividad del CFTR en células T84 tratadas con shARNi del CFTR

Para medir la actividad del transporte de Cl^- a través del CFTR se utilizó la sonda fluorescente SPQ ("6-methoxy-N-[3-sulfopropyl] quinolinium"; Molecular Probes), cuya fluorescencia es extinguida ("quenched") por iones halogenuros. Usamos un método basado en el descrito por Verkman, Stern, col. y Tondelier y col. (Verkman, 1990; Stern *et al.*, 1995; Tondelier *et al.*, 1999), pero con una modificación importante, utilizamos un espectrofluorímetro (Hitachi F-2000) y medimos los cambios de fluorescencia en una población de células, en lugar de medir en células individuales por microscopía. De esta forma es posible cuantificar millones de células simultáneamente y aumentar la sensibilidad del método. Se utilizaron células T84 electroporadas con el plásmido de ARN de interferencia del CFTR (construido en pSilencer) y con el plásmido vacío como control. Se electroporaron 4×10^6 células con 40 μg de plásmido y se incubaron sobre cubreobjetos rectangulares (22 x 8 mm), previamente cubiertos con una matriz de colágeno y fibronectina. Las células se incubaron a dos tiempos diferentes luego de la electroporación, 24 hs y 48 hs. En cada caso, las células se incubaron 16-20 hs con el fluoróforo SPQ (6 mM) en medio DMEM-F12 sin suero. Posteriormente, los cubreobjetos con las células se lavaron dos veces con una solución amortiguadora de NaI [NaI 135

mM, Glucosa 10 mM, CaSO₄ 1 mM, MgSO₄ 1 mM, solución amortiguadora de ensayo (Hepes 10 mM, K₂HPO₄ 2,4 mM, KH₂PO₄ 0,6 mM)] manteniendo a 4 °C y se siguió incubando en la solución amortiguadora de NaI a 37 °C por 30 min. Esta incubación es para reemplazar el Cl⁻ por yoduro (I⁻), ya que extingue la fluorescencia de SPQ más fuertemente que el Cl⁻ y también es transportado a través del CFTR. En este método, se mide el transporte de Cl⁻ por el cambio en la fluorescencia al intercambiar Cl⁻ (en nuestro caso I⁻) con NO₃⁻, un anión que no extingue la fluorescencia de SPQ. Para la medición se utilizó una celda de cuarzo conectada a una bomba peristáltica, agitador magnético y baño termostático a 37 °C. El cubreobjetos se colocó en la celda con la solución amortiguadora de NaI y por perfusión se hizo pasar el NaI. Se realizó una medición espectro-fluorométrica basal, con un filtro de excitación de 344 nm y un filtro de emisión de 443 nm durante 200 seg. Posteriormente, se paso una solución amortiguadora de NaNO₃ (NaNO₃ 135, mM, Glucosa 10 mM, CaSO₄ 1 mM, MgSO₄ 1 mM, solución amortiguadora de ensayo), se midió otros 200 seg; luego se agregó un cóctel de estimulación de la actividad del CFTR (AMPc 200 μM, IBMX 200 μM e isoproterenol 20 μM) para provocar la salida de I⁻, lo que produce un incremento en la fluorescencia, se midió otro 300 seg. Finalmente, se extinguió la fluorescencia con el agregado de Valinomicina 5 μM, para asegurarnos que la fluorescencia regresa al fondo (“background”) original. Los datos colectados fueron analizados por ANOVA y graficados como F (fluorescencia)/F₀ (fluorescencia inicial)-1 en función del tiempo.

15. Medición de actividad del complejo I mitocondrial mediante BN-PAGE (“Blue Native - Polyacrylamide Gel Electrophoresis”)

15.1. Extracción de mitocondrias

La extracción de mitocondrias se realizó de acuerdo al método descrito por Majander y col. (Majander *et al.*, 1991), con algunas modificaciones. Brevemente, las células se lavaron con PBS 1X frío en presencia de inhibidores de proteasas (10 μM pepstatin, 10 μM leupeptin, 100 μM PMSF, 2 mM EDTA, pH 7.0); se levantaron con rastrillo y se centrifugaron a 600 x g, 5 min, a 4 °C. Las células fueron luego resuspendidas (250 mg/ml) en solución amortiguadora de aislamiento [0,25 M sacarosa, 25 mM MOPS (ácido 3-[N-

morfolino]propanosulfónico), pH 7,4] que contenía el mismo cóctel de inhibidores de proteasas. Se agregó digitonina 0,12 % p/v por 40 seg, se diluyó en tres volúmenes de solución amortiguadora de aislamiento y se aplicó un pulso de 10 seg con un homogenizador ULTRA-TURRAX (Ika Labortechnik, Alemania), manteniendo la muestra en hielo. Luego se centrifugó a 10.000 x g, por 20 min, a 4 °C, se resuspendió el precipitado en 500-800 µl de solución amortiguadora de aislamiento y se centrifugó nuevamente a 800 x g a 4 °C durante 5 min. El sobrenadante resultante se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min. El precipitado final se resuspendió en 20-40 µl de “buffer” de muestra A de BN-PAGE (1 M ácido aminocaproico, 50 mM bis-Tris-HCl, pH 7,0) con cóctel de inhibidores de proteasas y se almacenó a -80 °C hasta su utilización. La cuantificación de proteínas se realizó con el método de Lowry (Lowry, 1951).

15.2. Preparación de la muestra para la corrida en BN-PAGE

Los complejos mitocondriales se solubilizaron desde las mitocondrias extraídas de acuerdo al protocolo de Schägger y col. (Schagger & von Jagow, 1991), con leves modificaciones. Alícuotas de 50-150 µg de proteínas mitocondriales se resuspendieron en “buffer” de muestra A de BN-PAGE a una concentración de 3 µg/µl. Los complejos proteicos fueron solubilizados con el detergente dodecil-maltósido 0,8 % (concentración final en “buffer” de muestra A) por resuspensión suave, seguido de una centrifugación a 100.000 x g, 15 min, a 4 °C o, alternativamente, a 20.000 x g, 45 min, a 4 °C. El sobrenadante fue mezclado con “buffer” de muestra B de BN-PAGE (5 % “coomassie brilliant blue” G-250 en 1 M ácido aminocaproico, 50 mM bis-Tris-HCl, pH 7,0) en una proporción de 1:14 (volumen de “buffer”:muestra) (Zerbetto *et al.*, 1997).

15.3. Preparación del gel de poliacrilamida para BN-PAGE

Las separaciones por el método BN-PAGE se realizaron en un aparato de “mini gel” (Miniprotean III Bio-Rad). Se prepararon geles con un gradiente del 5 al 13 % de poliacrilamida, y con un gel concentrador del 4 %. Todas las soluciones amortiguadoras usadas para la separación y la preparación del gel se prepararon según lo descrito por Schägger y von Jagow (Schagger & von

Jagow, 1991), con leves modificaciones. Los geles se prepararon desde una solución de acrilamida 30 % y una solución amortiguadora para BN-PAGE 3X (bis-Tris-HCL 500 mM, ácido aminocaproico 1,5 M, pH 7.0). El gel, las soluciones amortiguadoras y el equipo de electroforesis fueron pre-enfriados a 4 °C antes de cargar las muestras (el volumen máximo de carga por muestra fue de 20 µl); en las corridas se cargaron entre 40 y 100 µg de proteína por calle. También se corrieron marcadores de alto peso molecular (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England).

15.4. Condiciones de electroforesis

Los geles se corrieron a 4-7 °C con la cuba de electroforesis en hielo durante todo el ensayo. La electroforesis se inició a 80 Volts (V) hasta que la muestra entró en el gel de separación. Luego, el voltaje se subió a 200 V, manteniéndose una corriente limitante de 15 mA. Se usaron dos soluciones amortiguadoras para la corrida, una solución amortiguadora de cátodo (Tricina 50 mM, bis-Tris-HCl 15 mM, 0,02 % de “coomassie blue” G-250, pH 7,0) y una solución amortiguadora de ánodo (bis-Tris-HCL 50 mM, pH 7,0). Cuando el frente de corrida llegó al medio del gel de separación, se reemplazó la solución amortiguadora de cátodo con “coomassie blue” por otra solución amortiguadora de cátodo sin el colorante, para disminuir el fondo azul en el gel.

15.5. Tinción de los geles BN-PAGE con “coomassie blue”

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

15.6. Determinación de la actividad catalítica del Complejo I mitocondrial (CI_m), *in situ*.

Luego de la corrida, para revelar la actividad del CI_m, se incubó el gel en una solución compuesta por Tris-HCl 0,1 M, NADH 0.14 mM y NBT (“nitro blue tetrazolium”) 1 mg/ml, pH 7.4 (Lojda, 1979), durante 30-40 min. Una vez que revelada la actividad del CI_m, la reacción se detuvo utilizando una solución de fijación (45 % metanol, 10 % ácido acético). El gel se dejó en esta solución

toda la noche para eliminar el fondo generado por la tinción con el “coomassie blue” que lleva la solución amortiguadora de cátodo. Los geles se digitalizaron con un “scanner” HP4C y se guardaron como archivos en formato TIFF (con una resolución de 600 dpi) para la posterior cuantificación densitométrica. Posteriormente, los geles fueron teñidos con “coomassie blue”, como se detalló anteriormente y fueron digitalizados para cuantificar por densitometría la carga de proteínas en cada calle del gel. La cuantificación de la actividad del Clm fue normalizada a la cuantificación de la carga de proteínas mitocondriales, obteniéndose de este modo la actividad relativa del Clm (actividad Clm/carga de proteínas=actividad relativa del Clm), lo que nos permitió poder comparar entre los distintos ensayos. La actividad relativa de cada muestra control fue considerada como el 100 % de actividad.

16. Medición de especies reactivas de oxígeno (ROS, “Reactive Oxygen Species”)

El nivel intracelular de ROS se midió mediante el cambio de fluorescencia resultante de la oxidación de la sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA; Molecular Probes) (LeBel *et al.*, 1992). El DCFH-DA fue disuelto en DMSO a una concentración final de 20 mM (2000 X). Se crecieron las células sobre cubreobjetos rectangulares (22 x 8 mm) hasta unos 90 % de confluencia; luego se incubaron en medio sin suero durante 24 hs y se trataron con CFTR(inh)-172 o glibenclamida por 48 hs. Como control positivo de producción de ROS se incubaron las células en rotenona (inhibidor del complejo I mitocondrial) durante 2 hs antes de la medición. Para la medición de ROS, las células se incubaron con 10 μ M de DCFH-DA a 37 °C por 30 min. Se lavaron las células con PBS 1X para remover el exceso de DCFH-DA. Se colocó un cubreobjeto con células, por cada medición, en una celda de cuarzo con 2 ml de PBS 1X. La medición de la intensidad de fluorescencia se realizó en un espectrofluorímetro (HITACHI F-2000), utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una de emisión de 535 nm. La intensidad de fluorescencia se midió durante 8 min. El nivel de ROS fue calculado como la relación: Fluorescencia de las células tratadas con inhibidores/Fluorescencia de las células sin tratar (control) = ROS. Los datos fueron graficados como el nivel de ROS \pm SE en el tiempo.

17. Análisis estadístico.

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

RESULTADOS

I- Resultados Previos**1.1. “Differential Display” o “Display” Diferencial (DD)**

Brevemente, como se mencionara en la introducción, comenzamos este trabajo a partir de los resultados obtenidos en uno de los DD realizados en nuestro laboratorio (Marcucci, 2003). Se utilizó como modelo experimental células CFDE (FQ), células CFDE/6RepCFTR provenientes de células CFDE transfectadas con un plásmido que expresa CFTR salvaje (“células corregidas”), y éstas últimas tratadas con un inhibidor del transporte de cloruro a través del CFTR (glibenclamida, 24 h, 50 μ M).

En el DD realizado, se identificó una banda correspondiente a un gen que se encontraba expresado en forma diferencial en las células CFDE/6RepCFTR con respecto a las células FQ y CFDE/6RepCFTR tratadas con glibenclamida (Figura 8 A). Se observó así que la banda mostraba una mayor concentración en las muestras provenientes de las células CFDE/6RepCFTR (corregidas) que en las células FQ (CFDE); es decir, la expresión del gen identificado se encontraba disminuida en células FQ. Como podía esperarse de un gen cuya expresión dependiese de la actividad del CFTR, se observó como la expresión del fragmento seleccionado se revertía en las células CFDE/6RepCFTR tratadas con glibenclamida, un inhibidor del transporte de Cl⁻ a través del CFTR (Figura 8, 6Rep+Gli), asemejándose ahora al patrón de expresión de las células CFDE. Los genes que habíamos estudiado anteriormente, SRC y MUC1 (Gonzalez-Guerrico *et al.*, 2002), presentaban un comportamiento opuesto, es decir, estaban sobreexpresados en FQ. Por éste motivo resultó interesante caracterizar este gen que disminuía su expresión en FQ.

El fragmento de ADNc de esta banda fue aislado desde el gel del DD (Figura 8 A), amplificado por PCR, purificado por gel de agarosa y finalmente clonado y secuenciado. Luego de la secuenciación, mediante una búsqueda en BLAST, el fragmento aislado fue identificado como el gen mitocondrial *MTND4* (secuencia en la Figura 8 B). Como se mencionó en la introducción,

este gen se encuentra localizado en el genoma mitocondrial y codifica para la subunidad ND4 del Complejo I mitocondrial (CI_m) (Marcucci, 2003) (Valdivieso *et al.*, 2007) .



Figura 8: Display Diferencial (DD) de células CFDE y CFDE/6RepCFTR. (A) DD de células provenientes de un paciente FQ (células CFDE) y células CFDE corregidas mediante la expresión ectópica de CFTR salvaje (células CFTR/6RepCFTR). Las células CFDE/6RepCFTR fueron tratadas con glibenclamida (Gli) 50 μ M, 24 hs. **(B)** Secuencia correspondiente al fragmento de ADNc indicado con una flecha en (A). Esta secuencia fue 100 % idéntica a la secuencia del gen *MTND4*, excepto por los tres polimorfismos indicados en negritas.

1.2. Hibridación *in situ* en tejido pulmonar humano

Con el fin de determinar si la expresión diferencial de *MTND4* en FQ también podía observarse en tejidos provenientes de pacientes FQ y controles normales, se hicieron ensayos de hibridación *in situ* en cortes de pulmón humano (Marcucci, 2003) (Valdivieso *et al.*, 2007). Como se muestra en la Figura 9, la tinción del tejido pulmonar marcado con la sonda de reconocimiento específica para *MTND4* muestra una menor intensidad en el tejido proveniente del paciente FQ (Figura 9 C), comparado la tinción observada en el paciente control (Figura 9 A). Estos resultados sugerían una menor expresión de *MTND4* en la muestra del paciente FQ (Figura 9 C).

En los cuadros 9 B y D, se muestran los controles de especificidad correspondientes a incubaciones de competencia con sonda sin marcar.

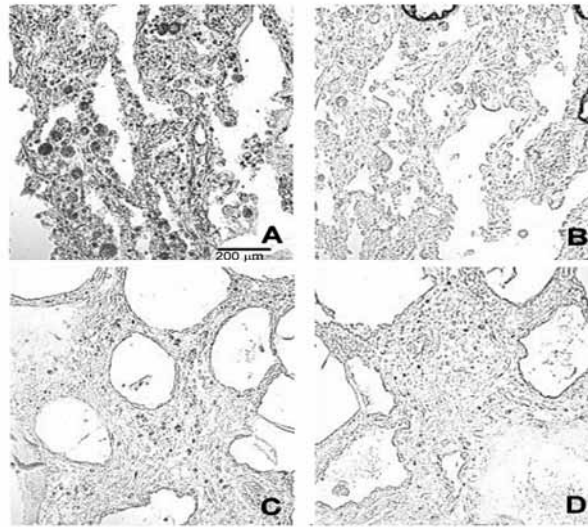


Figura 9: Hibridación *in situ* en tejido de pulmón. La sonda de *MTND4* fue marcada con biotina y revelada con fosfatasa alcalina-streptavidina. **(A, B):** Tejido de pulmón humano proveniente de cortes que expresan CFTR salvaje. **(C, D):** Cortes provenientes de un paciente FQ. **(B, D)** Controles de competencia incubados con sonda sin marcar (100 X).

Si bien estos resultados mostraban una tendencia a la disminución del gen *MTND4* en FQ, no eran suficientes para confirmar las observaciones del DD, porque la disminución de *MTND4* podía deberse a otras causas. Por ejemplo, a efectos colaterales de las infecciones y de los tratamientos que podrían haber sufrido los pacientes de los que provenían los cortes de pulmón. Además, los cortes que se usaron como controles derivaban de un único paciente. Debido a estas consideraciones, decidimos validar los resultados del DD por otros métodos más precisos y tratar de encontrar qué consecuencia tenía la disminución de la expresión del gen *MTND4* en nuestro modelo experimental. A partir de estos resultados previos comienza el trabajo correspondiente a esta Tesis.

II- Resultados del la tesis

Objetivo 1: Validar los resultados obtenidos por DD sobre la regulación negativa del gen *MTND4* en FQ.

1.1. RT-PCR “multiplex” semicuantitativa

Para llevar a cabo la validación de los resultados obtenidos por DD, empezamos por ensayar la modulación de la expresión de *MTND4* utilizando o no glibenclamida (100 μ M por 24 horas) para inhibir la actividad del canal CFTR en células CFDE/6RepCFTR, imitando con los inhibidores el fenotipo de las células CFDE. Para medir la expresión diferencial de *MTND4* usamos la técnica de RT-PCR (“Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction”) “multiplex” (amplificación de más de un gen simultáneamente) semicuantitativa. Previamente al tratamiento con inhibidores del CFTR, las células fueron crecidas hasta un 50-60 % de confluencia y fueron luego incubadas 24 hs en medio sin suero (ayuno). Este paso es muy importante ya que el suero fetal bovino contiene una alta concentración de factores de crecimiento, hormonas y otros factores que mantienen a las células en un estado altamente estimulado. Así, las células reducen la velocidad de crecimiento estabilizando su metabolismo basal y las señales no se encuentran saturadas. El tiempo que permanecieron en ayuno las células tratadas con inhibidor y las células control fue el mismo (24 hs). Una vez extraído el ARN total de las células, se lo trató con desoxirribonucleasa I (DNAsa I) para eliminar cualquier traza de ADN contaminante que pueda haber quedado luego de la purificación y evitar falsos positivos en la RT-PCR. Este paso es fundamental para cuantificar *MTND4*, debido a que el genoma mitocondrial no posee intrones, y cualquier traza contaminante de ADN mitocondrial daría un producto de PCR de igual tamaño que el esperado para el ARNm de *MTND4*.

En la Figura 10 se muestran los niveles de expresión de *MTND4* observados para las distintas células y tratamientos. Los productos obtenidos a partir de la RT-PCR “multiplex” fueron corridos en gel de agarosa (Figura 10 A). El gel es representativo de cuatro experimentos independientes. Se puede observar que la banda correspondiente a *MTND4* (ND4 en la Figura 10 A) es más intensa en las células CFDE/6RepCFTR que en las células CFDE y CFDE/6RepCFTR tratadas con glibenclamida, mientras que la intensidad de la banda correspondiente a *GAPDH*, usado como estándar interno, es igual en todas las células. En el gel, también se muestra que no hubo amplificación en

los controles a los que no se les agregó la enzima transcriptasa reversa, en la reacción de RT-PCR, lo que indica que no hubo amplificación inespecífica a partir de ADN. Este control es fundamental, ya que los falsos positivos podrían conducir a interpretaciones erróneas.

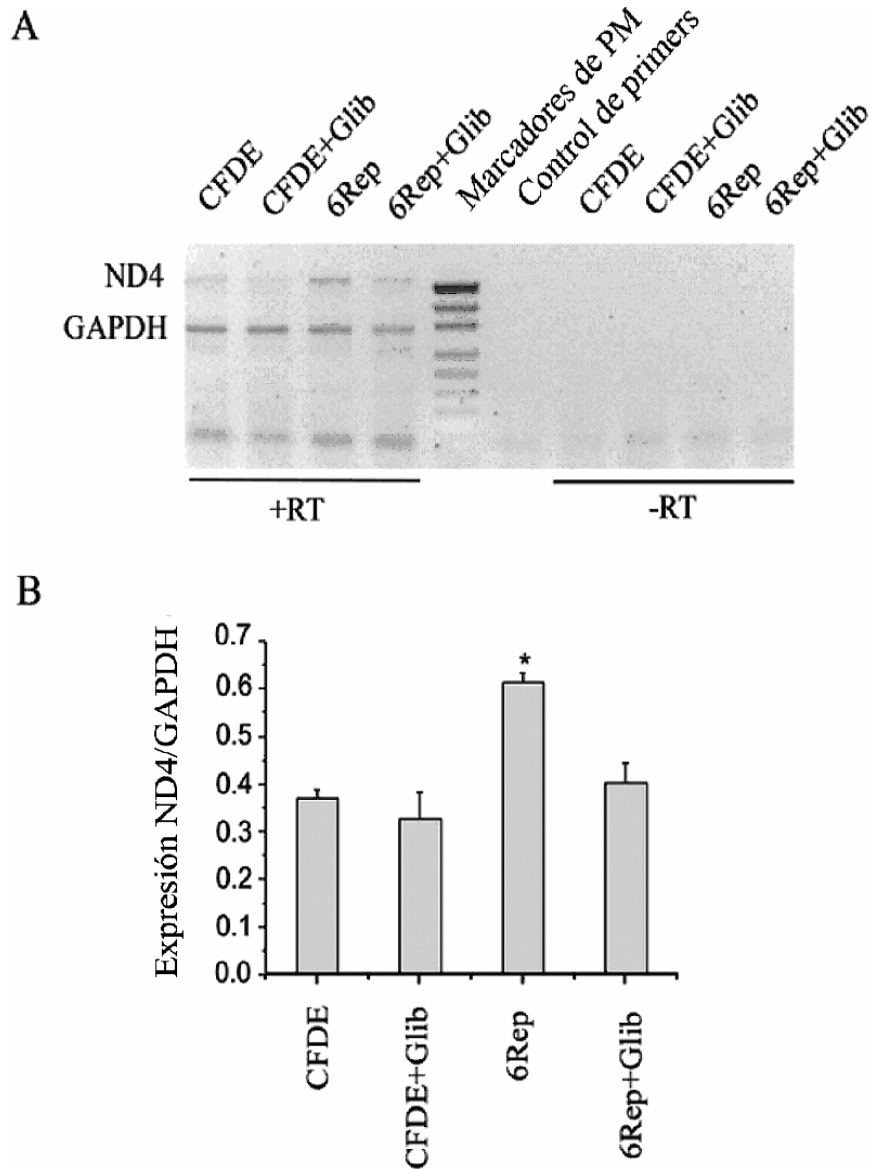


Figura 10: Validación del DD por RT-PCR. (A) Gel de agarosa corrido con los productos de una RT-PCR multiplex semicuantitativa, representativo de cuatro experimentos independientes (n=4). El ARN total fue extraído desde células CFDE, CFDE/6RepCFTR tratadas o sin tratar con glibenclamida (100 μ M, 24 hs). La leyenda + y - RT indica la presencia o ausencia de la transcriptasa reversa durante la reacción de retrotranscripción. **(B)** Niveles relativos de ARNm (ND4/GAPDH). Los resultados fueron analizados por ANOVA de una sola vía. (*= $p < 0.05$).

En la Figura 10 B se muestra el gráfico correspondiente al promedio de cuatro experimentos independientes, con el nivel de expresión del gen *MTND4* representado por la relación entre su expresión y la del gen nuclear *GAPDH*. El nivel de expresión de ARNm de *MTND4* en las células CFDE/6RepCFTR fue significativamente mayor que en las células CFDE (FQ) y que en las CFDE/6RepCFTR tratadas con glibenclamida. Por otra parte, las células CFDE tratadas con glibenclamida no mostraron una diferencia significativa en la expresión de *MTND4* con respecto a las células CFDE sin tratar.

1.2. Efectos del inhibidor CFTR(inh)-172 sobre la expresión de *MTND4*

En años recientes ha comenzado a usarse un nuevo inhibidor de la actividad de transporte de Cl⁻ por CFTR, el CFTR(inh)-172, desarrollado en el laboratorio de Verkman (Ma *et al.*, 2002). Este nuevo inhibidor es un derivado de las tiazolidinonas; ha sido demostrado que es más potente, no presenta toxicidad y no tiene los efectos secundarios característicos de la glibenclamida (Ma *et al.*, 2002). Por lo tanto, decidimos usar éste inhibidor del CFTR para confirmar la modulación de la expresión de *MTND4* por el transporte de Cl⁻ a través del CFTR. Además, el uso de este inhibidor más específico y potente permitiría descartar posibles efectos secundarios de la glibenclamida. El efecto de CFTR(inh)-172 sobre la expresión de *MTND4* fue medido mediante RT-PCR semicuantitativa a partir de ARN total extraído de células CFDE y CFDE/6RepCFTR, tratadas con diferentes concentraciones de inhibidores (glibenclamida 50, 100 y 150 µM; CFTR(inh)-172 2.5, 5, 10 µM). En este caso usamos una estrategia de RT-PCR semicuantitativa diferente, ya que usamos el método de cuantificación por curva estándar (Miller *et al.*, 2003; Valdivieso *et al.*, 2007) en lugar de un ensayo multiplex, como se describe en Materiales y Métodos. Brevemente, se amplificaron por PCR en tubos separados las secuencias correspondientes a los genes *MTND4* y *GAPDH*, a partir de ADNc obtenido por retrotranscripción. En cada amplificación se utilizó un plásmido que contenía las dos secuencias a amplificar (*pGEM-ND4-GAPDH*) para construir curvas con concentraciones de plásmido conocidas, a partir de las

cuales se calculó la concentración de cada gen, relativa a la concentración de plásmido. El nivel de expresión de *MTND4* fue obtenido mediante la relación $\text{ngMTND4}/\text{ngGAPDH}$. Para la amplificación por PCR se utilizaron diluciones seriales del ADNc de cada muestra, con el fin de cuantificar productos que estuviesen dentro del rango exponencial de amplificación. Encontramos que la cuantificación con esta estrategia resultó ser más reproducible que en el caso de la RT-PCR “multiplex”, debido a que se generan menos artefactos entre los “primers” (dímeros, etc).

Los resultados de la Figura 11 son representativos de cuatro experimentos diferentes. Para la cuantificación, los productos de PCR (3-4 diluciones por muestra) fueron corridos en gel de agarosa junto con la curva de estándar, visualizados con bromuro de etidio, documentados y cuantificados densitométricamente. Los productos que se encontraban en el rango lineal de amplificación fueron cuantificados como nanogramos relativos a la curva estándar de plásmido. Una vez realizada esta cuantificación, tanto para el gen *MTND4* como para el gen *GAPDH* (control interno), se calculó la relación $\text{ngMTND4}/\text{ngGAPDH}$ para obtener los niveles de expresión de *MTND4* (Figura 11).

Los resultados se analizaron por ANOVA-Tukey y se observó una disminución significativa en los niveles de mensajero para *MTND4* prácticamente en todos los tratamientos con inhibidor, salvo para la concentración de 50 μM con glibenclamida. Además, es notable la diferencia observada entre los tratamientos con los distintos inhibidores, ya que se observó una reducción mayor en los niveles del mensajero de *MTND4* cuando se trató con CFTR(inh)-172, obteniendo niveles de expresión similares a los encontrados en células CFDE (células FQ).

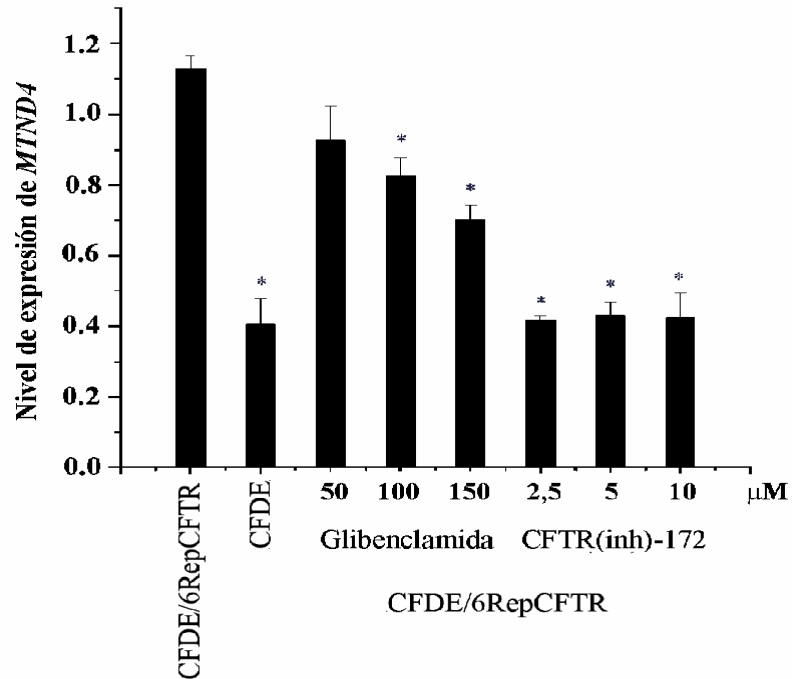


Figura 11: Medición de la modulación de *MTND4* por RT-PCR. En la abscisa se indican los tratamientos de las células CFDE/6Rep y la concentración en μM de los inhibidores. El nivel de expresión de *MTND4* está normalizado con respecto a la expresión de GAPDH. Las diferencias significativas se encuentran señaladas con un * ($p < 0,05$). Estos resultados representan el promedio de cuatro experimentos diferentes ($n=4$).

En la Figura 12, se muestran las curvas utilizadas con el fin de calcular el ED_{50} de los inhibidores (glibenclamida y CFTR(inh)-172) con respecto a su efecto sobre la regulación negativa de *MTND4*. Se determinó así que teniendo en cuenta la expresión de *MTND4* en cultivos de células CFDE/6RepCFTR, el CFTR(inh)-172 ($\text{ED}_{50}=1,7 \mu\text{M} \pm 0,6$, $n=4$) es casi 100 veces más potente que glibenclamida ($\text{ED}_{50}=150 \mu\text{M} \pm 14,76$ [$n=3$]), con una concentración efectiva que va de 2,5 a 10 μM . Estas observaciones coinciden con lo publicado sobre el poder inhibitorio del CFTR(inh)-172 sobre el transporte de Cl^- por CFTR (Ma *et al.*, 2002).

Por otra parte, se observó que a partir de una concentración de 2,5 μM de CFTR(inh)-172, los niveles de expresión de *MTND4* no variaron con el aumento de la concentración del inhibidor (Figuras 11 y 12 A). Aunque no lo hemos medido con precisión, hemos notado que a partir de 10 μM el inhibidor

comienza a perder efecto por problemas de insolubilidad. Los resultados mostrados hasta aquí fueron publicados en la revista BBRC en el año 2007 (Valdivieso *et al.*, 2007).

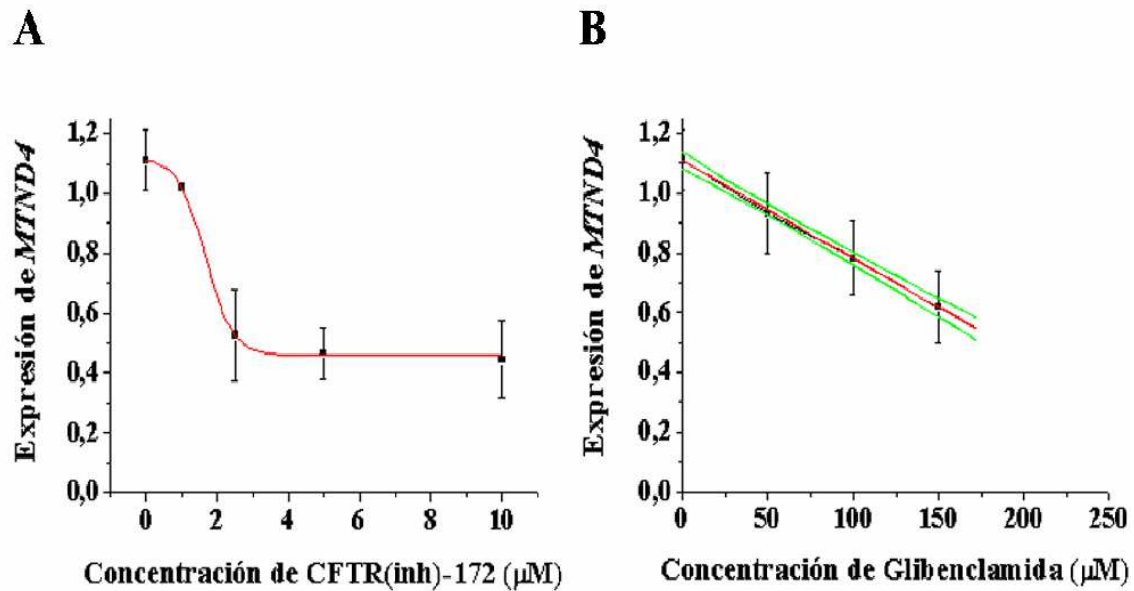


Figura 12: Cálculo del ED₅₀ correspondiente a la disminución de la expresión de *MTND4* con cada inhibidor. Se muestran las barras de SD para cada punto de la curva. Los gráficos representan los promedios de 4 experimentos. Glibenclamida: ED₅₀ = 150 μM ± 14,76 (n=3); CFTR (inh)-172: ED₅₀=1,7 μM ± 0,6 (n=4).

1.3. Análisis de la síntesis de proteínas mitocondriales en células FQ mediante marcación isotópica (“pulse labeling”).

Decidimos analizar la traducción de proteínas mitocondriales con el fin de determinar si en FQ también se encontraba reducida la expresión de la subunidad ND4, al igual que su ARNm. Para esto elegimos la técnica de “pulse-labeling”, que básicamente consiste en marcar la síntesis *de novo* de proteínas mitocondriales utilizando como marcador una mezcla de cisteína y metionina-[³⁵S]. Durante la marcación, la síntesis de proteínas citoplasmáticas se encuentra inhibida con el uso de emetina (Chomyn *et al.*, 1985). Por esta técnica, es posible observar el patrón de expresión de algunas subunidades de los complejos mitocondriales y establecer su localización en un gel (Chomyn *et*

al., 1985; Hayashi *et al.*, 1994; Chomyn, 2001). De esta manera, hicimos un “pulse-labeling” a partir de células CFDE, CFDE/6RepCFTR y estas últimas tratadas con los inhibidores del transporte de Cl⁻ glibenclamida y “5-nitro-2(3-phenylpropyl amino) benzoato” (NPPB). En estos experimentos no obtuvimos un patrón de bandas que nos permitiera identificar las subunidades de los complejos mitocondriales en forma precisa (Figura 13 A): fundamentalmente no pudimos localizar la correspondiente a MTND4, aunque sí encontramos algunos datos interesantes. Por un lado, el inhibidor NPPB, a una concentración de 100-150 μ M, abolió casi completamente la síntesis *de novo* de las proteínas mitocondriales (Figura 13 A). En este experimento se usaron proteínas obtenidas tanto a partir de mitocondrias aisladas como de extracto de proteínas totales. En la Figura 13 B, se muestra el gel teñido con “coomassie blue”, para comparar la carga de las muestras.

Por otra parte, aunque no identificamos un patrón de bandas que nos permitiera localizar MTND4 en forma precisa, observamos que las bandas marcadas con flechas en la Figura 13 A se encontraban disminuidas en las células CFDE y CFDE/6RepCFTR tratadas con glibenclamida, con respecto a las observadas en células CFDE/6RepCFTR (CFTR salvaje).

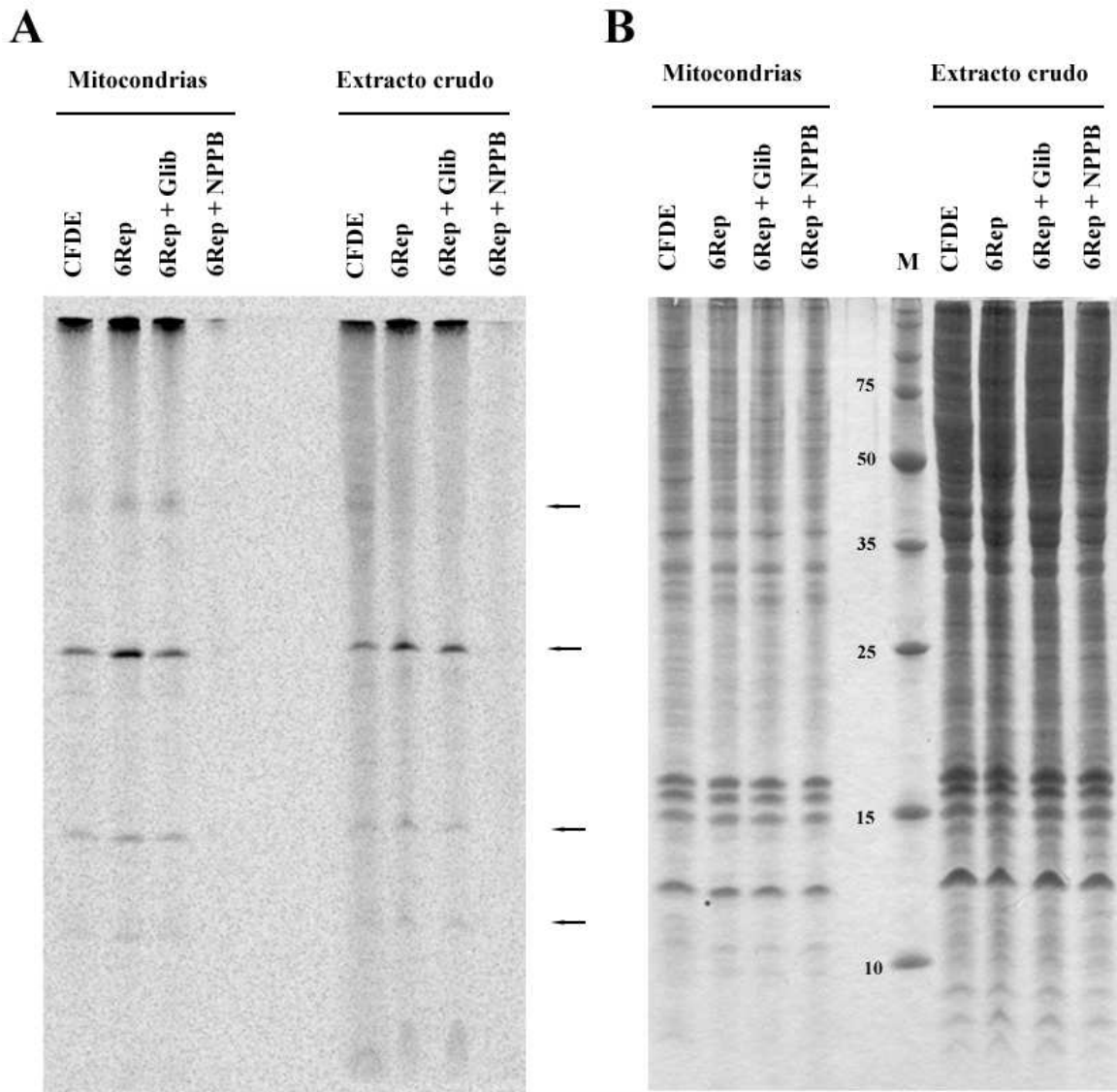


Figura 13: Síntesis de proteínas mitocondriales en células FQ (“pulse-labeling”). 2×10^6 células CFDE, CFDE/6RepCFTR y estas últimas tratadas con inhibidores del CFTR (glibenclamida $100 \mu\text{M}$, NPPB $100 \mu\text{M}$) fueron incubadas en medio sin metionina en presencia de metionina- ^{35}S y emetina ($200 \mu\text{g}$, inhibidor de la traducción citoplasmática). Proteínas provenientes de mitocondrias aisladas y de extractos totales fueron corridas en un gel SDS-PAGE, construido con un gradiente exponencial de poliacrilamida 15-20 %. **A:** Revelado radiográfico del gel donde se muestran las proteínas mitocondriales sintetizadas *de novo*. Las flechas indican las bandas que cambian su expresión en células con fenotipo FQ (CFDE y CFDE/6RepCFTR + glibenclamida) con respecto a las células no FQ (CFDE/6RepCFTR). **B:** Tinción con “coomassie blue” del gel para comparar la carga de las muestras y revelar el marcador de peso molecular (M).

Debido a las dificultades para detectar MTND4 por este método, decidimos avanzar los con otros objetivos, hasta que pudiésemos contar con un anticuerpo específico de MTND4 que nos permitiese inmunoprecipitar la proteína marcada.

Objetivo 2: Determinar si la reducción de *MTND4* tiene consecuencias en la actividad del Clm.

Este es un objetivo importante. La subunidad ND4 es un componente fundamental para la correcta actividad del Clm (Degli Esposti *et al.*, 1994). Por lo tanto, tal como lo hemos postulado en nuestra hipótesis de trabajo, la regulación negativa del ARNm de *MTND4* observada en células y tejidos FQ podría inducir una falla en la actividad del Clm. Para demostrar esta hipótesis medimos la actividad del Clm mediante la técnica denominada “Blue Native-PAGE” (BN-PAGE) (Schägger H, 1991). El método permite ensayar *in situ* la actividad de los distintos complejos de la cadena respiratoria, luego de una electroforesis en condiciones no desnaturizantes, utilizando proteínas de mitocondrias extraídas desde los distintos tipos celulares en estudio (Lojda, 1979; Schägger H, 1991; Zerbetto *et al.*, 1997).

2.1. Actividad del Clm en Células CFDE y CFDE/6RepCFTR

Los estudios iniciales para determinar la actividad del Clm en células FQ fueron realizados en células CFDE, CFDE/6RepCFTR y estas últimas tratadas con glibenclamida 100 μ M, durante 24 horas, en medio sin suero. En la Figura 14 A se muestra el resultado de la reacción catalítica del Clm, que lleva a la oxidación del NADH y la reducción del NBT. Al reducirse, el NBT deja un depósito insoluble de color violáceo sobre la posición en que se encuentra el complejo catalítico, lo que permite medir la actividad relativa de la enzima sobre el gel. La imagen del gel con la actividad del Clm revelada, fue digitalizada y transformada a escala de grises para cuantificar la intensidad de la banda. La posición del Clm en el gel fue confirmada por el peso molecular de la banda revelada y por la incubación paralela con rotenona durante el revelado (la

rotenona inhibe al Clm), que efectivamente redujo la intensidad de la banda correspondiente a la actividad del Clm (Figura 14 A).

Como puede observarse en la Figura 14 B, hay una disminución significativa de la actividad del Clm en células CFDE con respecto a las células CFDE/6RepCFTR. Estos resultados concuerdan con la reducción de los niveles de expresión de *MTND4* encontrados en las células CFDE. A su vez, también se observó una disminución de actividad del Clm en células CFDE/6RepCFTR tratadas con glibenclamida.

Estos resultados corresponden a tres experimentos independientes, hechos cada uno por duplicado y analizados estadísticamente por ANOVA-Tukey (Figura 14 B). Para el análisis estadístico, la actividad de Clm en las células CFDE/6RepCFTR fue considerada como el 100 % de actividad, ya que éstas corresponden a células “normalizadas” con respecto a la actividad del CFTR, y a ellas referimos el cálculo de actividad del resto de las células. La actividad del Clm en las células CFDE fue de $47 \% \pm 3,7$ ($\bar{x} \pm SD$, $n= 3$); en tanto que la actividad en las células CFDE/6RepCFTR tratadas con glibenclamida fue de $71,3 \% \pm 6,8$ ($\bar{x} \pm SD$, $n= 3$), con un valor de p menor a 0,005. La diferencia de actividad entre las células CFDE y las células CFDE/6RepCFTR tratadas con glibenclamida también resultó significativa, lo que sugiere que la inhibición del transporte de Cl^- con este inhibidor no fue completa, aunque alcanzó para lograr una reversión en la actividad del Clm en las células normalizadas con la expresión ectópica de CFTR salvaje.

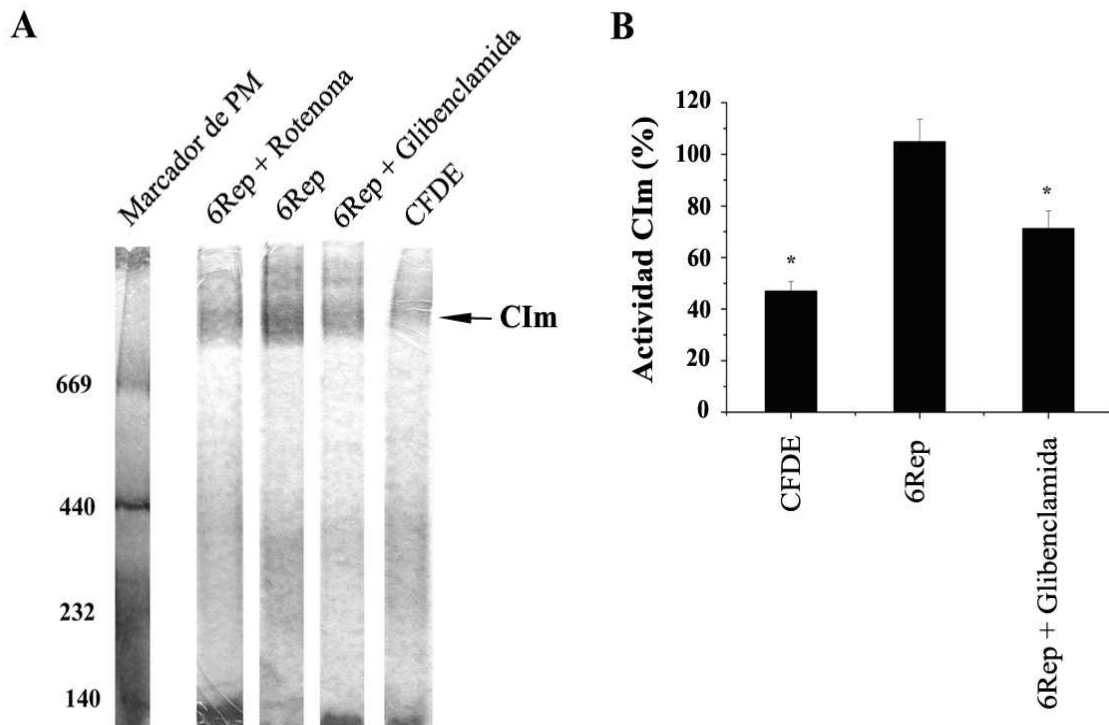


Figura 14: Actividad del Complejo I por BN-PAGE. Se utilizaron mitocondrias extraídas de células CFDE, CFDE/6Rep y CFDE/6Rep tratadas con glibenclamida. **A:** Geles con tinción *in situ* de la actividad del Complejo I mitocondrial (CI_m) utilizando NADH y NBT. **B:** Gráfico de la actividad del CI_m (%), realizado a partir de la cuantificación densitométrica y el análisis estadístico de los resultados mostrados en el panel A, para cada replicado. La actividad del CI_m de las células CFDE/6Rep se consideró como el 100 %. Estos resultados corresponden a tres experimentos independientes, cada uno por duplicado. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA (Tukey). * indica una reducción significativa de la actividad del CI_m respecto a las células con la actividad del CFTR normalizada, $p < 0,005$.

Objetivo 3: Utilizar distintos modelos celulares para confirmar los resultados anteriores.

3.1. Nuevo modelo celular FQ

3.1.1. Células S9 e IB-3

Para demostrar que las diferencias observadas con las células CFDE y CFDE/6RepCFTR no se debían exclusivamente al modelo celular utilizado ni a artefactos generados por una presión de selección diferente (debido al antibiótico higromicina B usado para mantener el plásmido en las células CFDE/6RepCFTR o a una selección clonal diferente), decidimos usar el modelo

de células S9 e IB-3, las cuales son también provenientes de un paciente FQ, pero de un origen diferente. Las células IB-3 poseen la mutación más común en FQ ($\Delta F508$) y una mutación sin sentido (W1282X), con una señal de terminación prematura. Las células S9 son células IB-3 que han sido transducidas con un vector viral para expresar CFTR en forma estable (en las CFDE/6RepCFTR se utilizó un plásmido que se pierde si no se mantiene el antibiótico). Esto presenta el beneficio de no requerir antibióticos para mantener la expresión del CFTR nativo (“wild type”) ectópico en las células normalizadas. Las células S9 e IB-3 representan una clara ventaja en este sentido. Otra característica importante de estas células es que a diferencia de las células CFDE, que son de un genotipo desconocido, las células IB-3 poseen la mutación más común en FQ ($\Delta F508$). La desventaja es que puede existir una selección clonal diferente y que la inserción del vector en el genoma es al azar y de consecuencias impredecibles. En realidad, no existe un modelo celular perfecto. Por eso es necesario utilizar varios modelos distintos y comprobar que en todos se observa la misma respuesta.

En el ensayo de actividad del Clm mediante BN-PAGE (Figura 15), encontramos que la actividad del Clm en células IB-3 y S9 mostraba una tendencia similar a la observada en las células CFDE y CFDE/6Rep, aunque la alta varianza no nos permitió observar diferencias significativas. Debido a que la escasa diferencia observada podría deberse al hecho de haber crecido las células en las mismas condiciones basales en que cultivamos las células CFDE, decidimos probar estimular la actividad del CFTR mediante el uso simultáneo de AMPc, IBMX e isoproterenol, cóctel que estimula la actividad de la proteína quinasa A (PKA) y por lo tanto la actividad del CFTR. Como puede observarse en la Figura 15, cuando las células S9 e IB-3 fueron incubadas con dicho cóctel de estimulación del CFTR, pudo apreciarse una diferencia significativa y reproducible en la actividad del Clm entre células FQ (IB-3) y no-FQ (S9). Los resultados corresponden a cinco experimentos individuales analizados por ANOVA-Tukey. En este análisis estadístico, consideramos la actividad de Clm en células S9 como el 100 % de actividad y a ellas referimos el cálculo de actividad de las células IB-3. La actividad del Clm en las células

IB-3 fue de $54,4 \% \pm 15,6$ ($\bar{x} \pm SD$, $n=5$, $p < 0,005$). Por lo tanto, la disminución de la actividad del CIm en las células IB-3, respecto a las células S9, fue de aproximadamente el 50 %; prácticamente la misma diferencia que se observó en las células CFDE comparadas con las células que expresaban CFTR normal (CFDE/6RepCFTR).

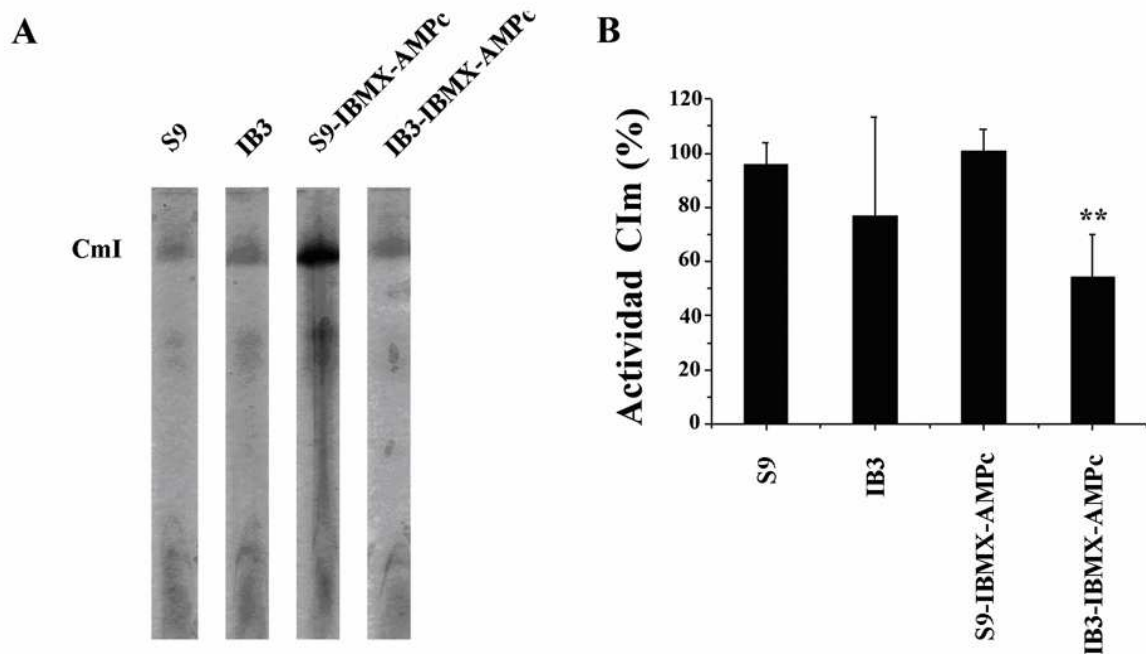


Figura 15: Actividad del Complejo I por BN-PAGE. Se utilizaron mitocondrias extraídas de células S9 e IB-3, tratadas y sin tratar con cóctel de AMPc, IBMIX e isoproterenol. **A:** Geles con tinción *in situ* de la actividad del CIm. **B:** El porcentaje de actividad del CIm fue estimado considerando la actividad de las células S9 como el 100 % de actividad. Estos resultados son representativos de cinco experimentos, cada uno por duplicado. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA (Tukey). El doble asterisco ** representa una reducción muy significativa de la actividad del CIm ($p < 0,005$).

3.2. Modelo celular no-FQ

En ninguno de los dos modelos FQ utilizados se pueden descartar posibles problemas de selección clonal de una población predominante que no sea en realidad representativa. Por este motivo, es importante usar además inhibidores en las células corregidas, para probar que se pueden revertir los efectos. Con el fin de excluir posibles efectos de selección clonal, decidimos utilizar también como modelo células T84 y Caco-2, que expresan CFTR

salvaje e inducir una respuesta “cuasi-FQ” inhibiendo la actividad del CFTR. De esta forma, tanto las células tratadas como las controles provendrían de un mismo estado de selección clonal.

3.2.1. Células T84 tratadas con inhibidores de la actividad del CFTR.

En una primera aproximación, modulamos la actividad del canal de Cl⁻ en la línea celular T84 de cáncer de colon con inhibidores sintéticos del CFTR. Los inhibidores utilizados fueron glibenclamida (100 μM) y CFTR(inh)-172 (5 μM), tal como los habíamos hecho hasta ahora. Las células, luego de haber sido crecidas hasta un 50-60 % de confluencia, fueron incubadas en medio sin suero durante 24 hs (ayuno); posteriormente se agregaron los inhibidores a las concentraciones mencionadas y se incubó a dos tiempos diferentes, 24 hs y 48 hs.

Como se muestra en la Figura 16 A, a las 24 hs de incubación, se observó una disminución de 51 % ± 5,6 ($\bar{x} \pm SD$, n=3) en la actividad del Clm para el tratamiento con glibenclamida (Figura 16 A y C) con respecto a las observada en las células T84 control (tratadas con DMSO en la misma proporción que las inhibidas), mientras que las células tratadas con el inhibidor CFTR(inh)-172 no mostraron cambios en la actividad del Clm. Sin embargo, a las 48 hs de incubación con el inhibidor CFTR(inh)-172 (Figura 16 B y D) la actividad del Clm fue de 64,4 % ± 7,2 ($\bar{x} \pm SD$, n=3), con una reducción de aproximadamente un 35 % con respecto a las células control. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA-Tukey, con un *p* menor a 0,05 (Figuras 16 C y D). Los resultados corresponden a tres experimentos individuales.

El hecho de que el efecto del inhibidor CFTR(inh)-172 sobre la actividad del Clm haya sido observada a las 48 hs es razonable, si tenemos en cuenta que el tiempo transcurrido para disminuir la expresión del mensajero de *MTND4* fue de 24 hs y, aunque no se conoce el tiempo de vida media del complejo en la membrana mitocondrial, sin duda puede esperarse que el efecto del inhibidor sobre la concentración de la proteína sea más tardío que el efecto sobre el mensajero.

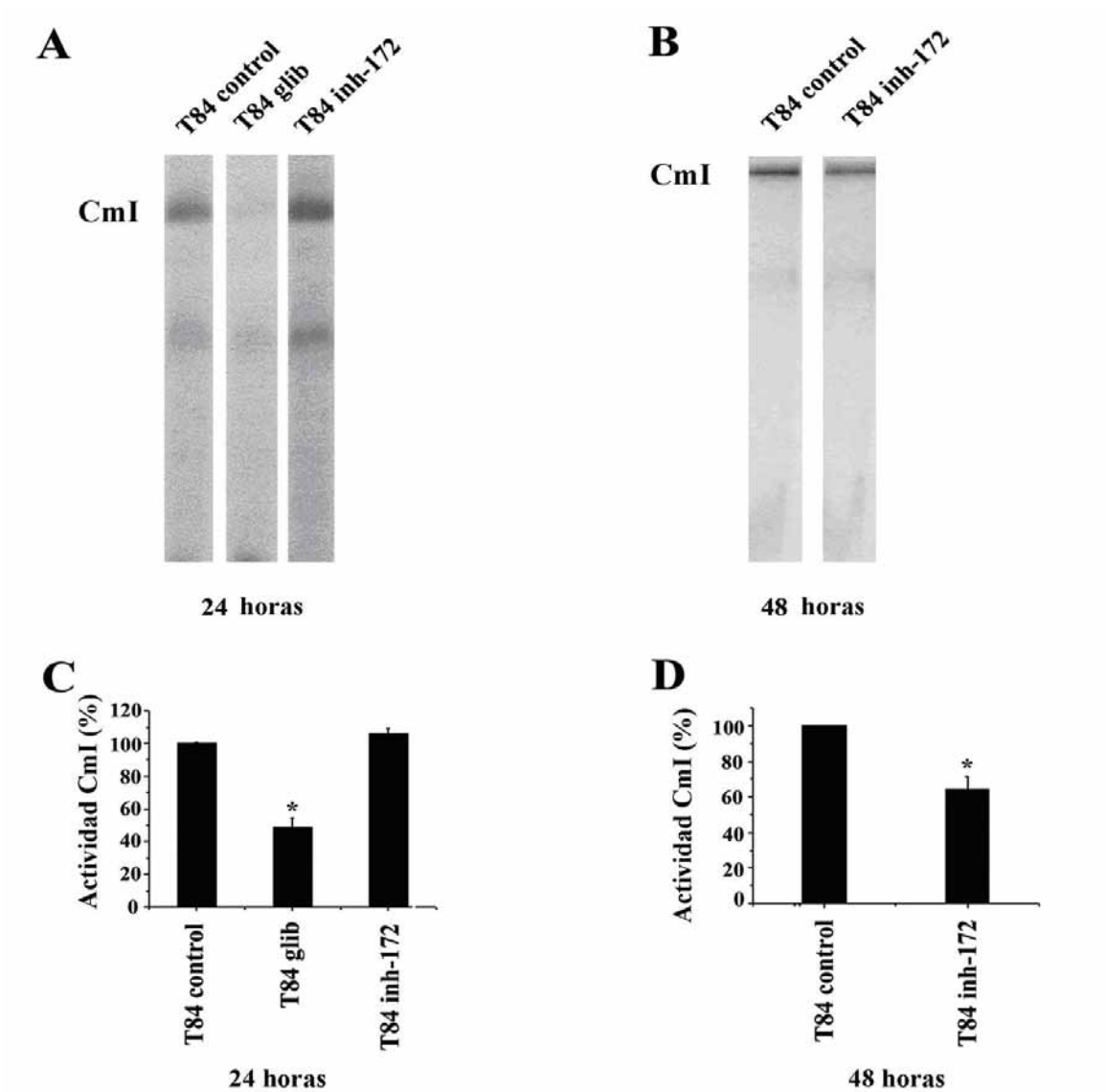


Figura 16: Actividad del Complejo I por BN-PAGE. Se utilizaron mitocondrias extraídas de células T84, tratadas y sin tratar con los inhibidores del CFTR. Gli: glibenclamida (100 μ M). Inh-172: CFTR(inh)-172 (5 μ M). **A y B:** Geles con tinción *in situ* de la actividad del CmI. **C y D:** Cuantificación densitométrica expresada como porcentaje de la actividad del CmI, ANOVA y análisis de Tukey. Estos resultados son representativos de tres experimentos individuales por duplicado. El símbolo * indica una reducción significativa de la actividad del CmI ($p < 0,05$).

3.2.2. Células Caco-2 tratadas con inhibidores de la actividad del CFTR

También obtuvimos resultados similares a los de T84 utilizando la línea celular Caco-2, proveniente de cáncer de colon, que expresa CFTR salvaje en niveles comparables a las células T84 (Figura 17). En la Figura 17 A se

muestran los resultados de la tinción *in situ* de la actividad del CI_m en células Caco-2 tratadas con el inhibidor CFTR(inh)-172 y con DMSO como control. En la Figura 17 B se observa el gel teñido con “coomassie blue” para controlar la carga de las muestras. Se observa que mientras la carga de proteínas es la misma, la actividad del CI_m se reduce considerablemente, en concordancia con los resultados obtenidos anteriormente.

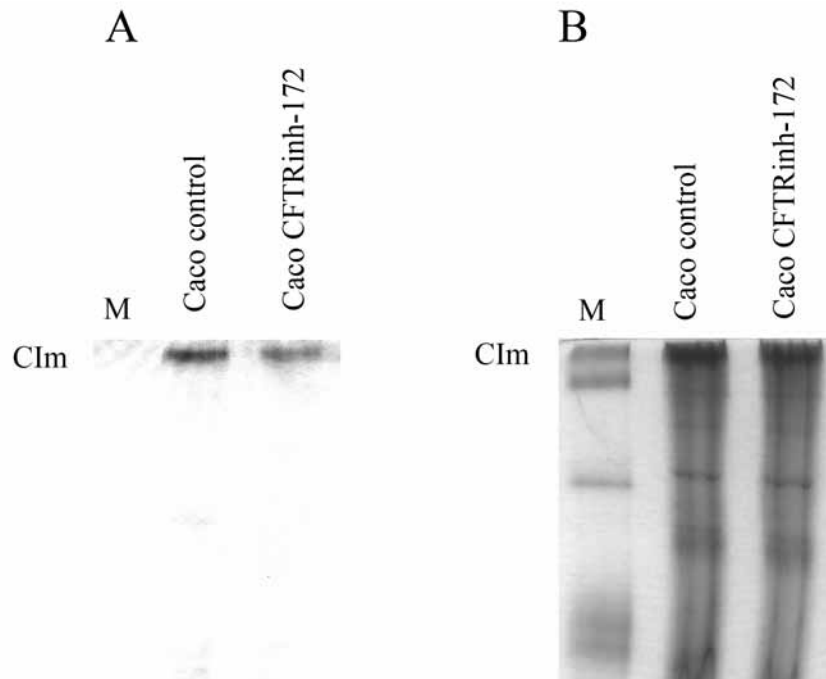


Figura 17: Actividad del Complejo I por BN-PAGE. Se utilizaron mitocondrias extraídas de células Caco-2, tratadas y sin tratar con CFTR(inh)-172. **A:** tinción *in situ* de la actividad del CI_m. **B:** tinción con “coomassie blue” del gel, como control de carga. Estos resultados son representativos de 2 experimentos diferentes.

3.2.3. ARN de interferencia del CFTR en células T84

Para asegurarnos de que los resultados obtenidos con los inhibidores del CFTR no eran debidos a efectos inespecíficos de estas drogas sobre otros blancos, decidimos utilizar la técnica de “short hairpin” ARN de interferencia (shARNi) (Hannon, 2002; Paddison *et al.*, 2002), con el fin de reducir la expresión del CFTR en células T84.

Como una primera aproximación a esta técnica, comenzamos a usar un plásmido comercial (pSILENCER 1.0 U6 vector de Ambion), al que le agregamos un inserto que expresa una secuencia dirigida contra los nucleótidos 1-18 de la secuencia del *CFTR*, seguida de nueve bases al azar y 18 nucleótidos de secuencia complementaria a la secuencia blanco. Al ser expresada, dicha secuencia formará un ARN de doble cadena (a través de un “hairpin-loop”) que se apareará con el ARNm del *CFTR*, conduciéndolo a los elementos de la maquinaria de ARN de interferencia (ARNi) que regulan la expresión de genes que codifican proteínas en la célula (Hannon, 2002; Paddison *et al.*, 2002). Este pequeño ARN de interferencia (Elbashir *et al.*, 2001) imita los productos generados por la enzima Dicer, que cataliza el paso inicial del proceso de ARNi (Bernstein *et al.*, 2001) y presumiblemente entra en la vía de silenciamiento. Como control utilizamos el mismo plásmido sin ningún inserto (plásmido vacío) para confirmar que los efectos observados no se deben a la incorporación de ADN extraño a la célula (plásmido).

En primer lugar, se realizó una curva para determinar el tiempo óptimo de incubación de las células que permitiese observar una disminución en la actividad del Clm, luego de la transfección de las células. Para esto, usamos una concentración fija de plásmido ($50 \mu\text{g}/4 \times 10^6$ células/400 μl de medio sin suero), cantidad que ya habíamos utilizado con buenos resultados en electroporaciones con otros plásmidos en células T84. Así, determinamos que el tiempo necesario y óptimo para observar una disminución en la actividad del Clm era de 48 horas.

Debido a la alta concentración de plásmido utilizada para realizar las electroporaciones, fue necesario hacer grandes preparaciones de plásmido y verificar que estuviera en condiciones adecuadas de pureza e integridad. Esto es importante, ya que variaciones en la cuantificación o integridad del plásmido pueden llevar a transfecciones ineficientes y a resultados confusos. En la Figura 18 se muestra una electroforesis en gel de agarosa obtenida con los plásmidos antes de electroporar, para verificar que estuviesen en iguales condiciones de pureza, integridad y concentración.

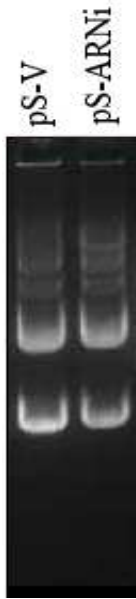


Figura 18: Comparación del estado de los plásmidos antes de realizar la electroporación. Electroforesis en gel de agarosa 1 %. pS-V: plásmido pSilencer-Vacío (sin inserto). pS-ARNi: pSilencer con el inserto para ARN de interferencia del CFTR. Se corrieron 0,5-1 μ g por calle. Tinción con bromuro de etidio.

Posteriormente, buscamos ajustar la concentración de plásmido a electroporar mediante curvas de concentración del mismo, para determinar a qué concentración comenzaba a observarse un efecto sobre la actividad del Clm. Se electroporaron células T84 con 20, 40 y 80 μ g de plásmido por punto, que luego fueron incubadas durante 48 hs. Las incubaciones fueron realizadas en medio con suero 10 % durante las primeras 24 horas, para que las células se recuperaran luego del “shock” sufrido en la electroporación y con medio sin suero las 24 hs de incubación restantes. Para cada punto se midió la actividad del Clm mediante BN-PAGE, se cuantificó por densitometría y se graficó (Figura 19). La curva nos permitió establecer que la concentración óptima de plásmido a electroporar, para poder observar una disminución en la actividad del Clm, era de 40 μ g de plásmido cada 4 millones de células en un volumen de 400 μ l.

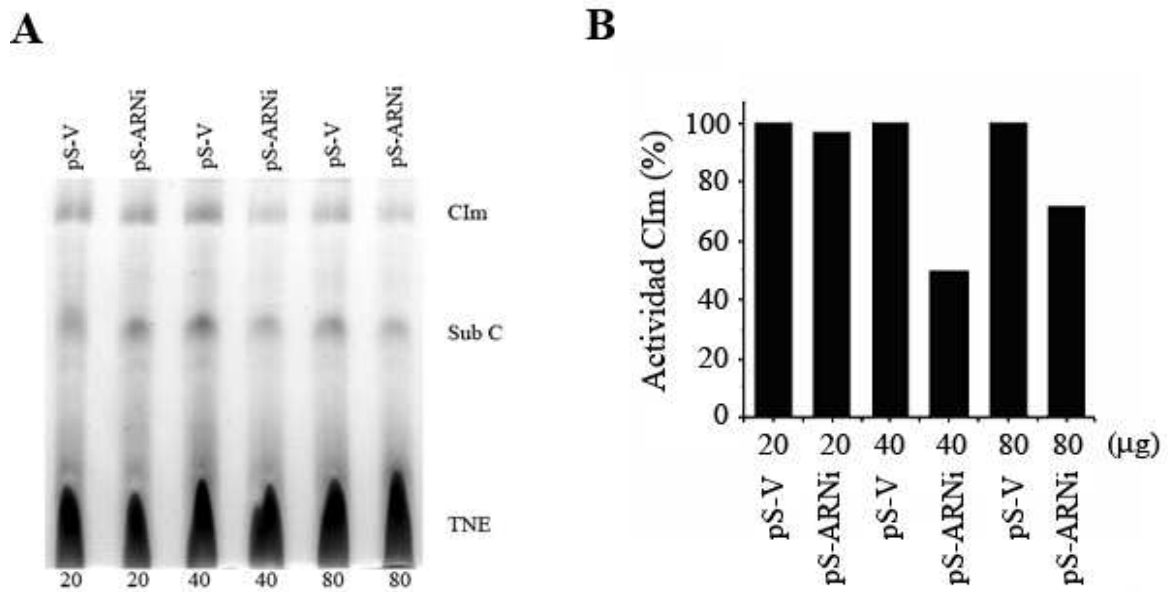
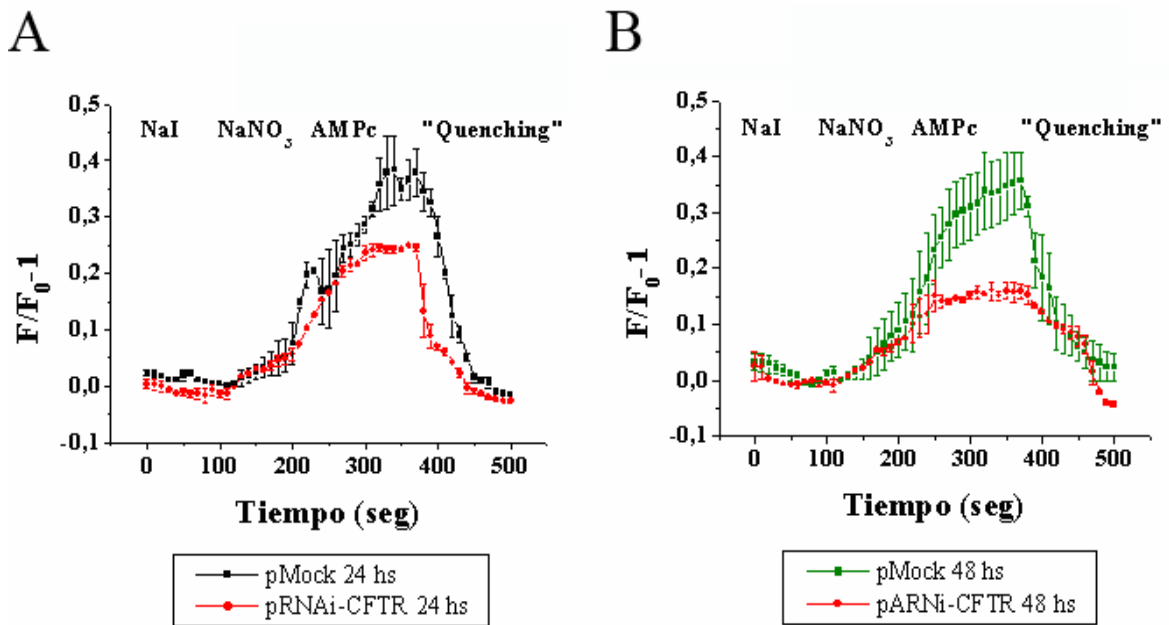


Figura 19: Curva de concentración de plásmidos shARNi frente a la actividad del Clm. **A:** actividad del Clm por BN-PAGE. **Clm**, Complejo I mitocondrial; **Sub C**, subcomplejo con actividad NADH deshidrogenada; **TNE**, tinción no específica del “coomassie blue”. **B:** Cuantificación densitométrica de los resultados. En ambas Figuras 20, 40 y 80 son las concentraciones de los plásmidos en µg. **pS-V**, control con plásmido vacío. **pS-ARNi**, plásmido de ARN de interferencia para el CFTR.

Para confirmar que la reducción de la expresión del CFTR mediante la técnica de ARNi fue realmente efectiva, medimos la actividad de transporte de Cl⁻ dependiente del CFTR en las células tratadas con shARNi y las células control (plásmido vacío). En definitiva, la medición de la actividad del canal es la mejor prueba de la reducción del CFTR y de que el shARNi funcionó. Así, realizamos la medición por una técnica espectrofluorométrica con el fluoróforo SPQ como sonda, que fue previamente puesta a punto en nuestro laboratorio (en colaboración con Celeste Marín, becaria del CONICET). Realizamos la medición de actividad a las 24 hs y a las 48 hs luego de haber electroporado las células T84 con el plásmido shARNi del CFTR y el plásmido control respectivamente. Brevemente, las células fueron incubadas con el colorante SPQ 24 hs antes de la medición. Al comienzo del experimento, la fluorescencia del SPQ se encuentra extinguida por el ioduro que contiene la solución en que se incuban las células. Posteriormente, mediante perfusión, el I⁻ es reemplazado por el ión NO₃⁻ y las células son estimuladas con un cóctel de

estimulación del CFTR (AMPC-IBMX e isoproterenol). Se pudo, observar así un claro aumento de la fluorescencia del SPQ por la activación del CFTR.

En la Figura 20 A y B se observan los resultados de la medición de la actividad del CFTR a las 24 y 48 hs después de la electroporación, respectivamente. A las 24 hs de realizada la electroporación con el plásmido shARNi-CFTR, comenzó a observarse una disminución significativa de la actividad del transporte de Cl⁻ dependiente del CFTR, comparado con la actividad de transporte de Cl⁻ de las células electroporadas con el plásmido vacío (Figura 20 A). Esta diferencia de actividad se hace más pronunciada a las 48 hs post-electroporación (Figura 20 B). En la Figura 20 C se muestra el solapamiento de los resultados a los dos tiempos, donde se puede apreciar mejor la disminución con el tiempo post-electroporación. Los experimentos fueron realizados por duplicado a cada uno de los tiempos analizados.



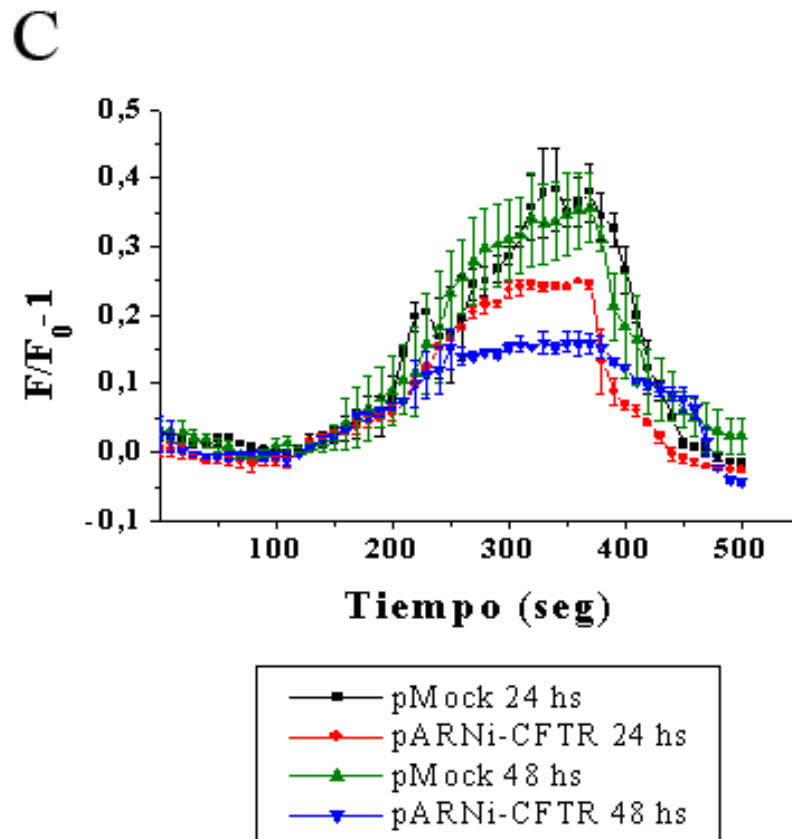


Figura 20: Medición espectrofluorométrica con el colorante SPQ de la actividad de transporte de Cl⁻ dependiente del CFTR en células T84 tratadas con ARNi. A: Actividad del CFTR a las 24 hs luego de la electroporación con los plásmidos shARNi. **B:** Actividad del CFTR a las 48 hs luego de la electroporación con los plásmidos shARNi. **C:** Solapamiento de los resultados A y B. **F:** fluorescencia; **F₀:** fluorescencia inicial. **pMock:** plásmido vacío (control). **pARNi-CFTR:** plásmido shARNi del CFTR.

Una vez demostrada la eficacia del ARNi, se midió la actividad del Clm. En la Figura 21 se muestra el resultado de la medición de la actividad del Clm y el análisis estadístico, luego de cuatro experimentos independientes realizados por la técnica de shARNi. Se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) de la actividad del Clm en las células tratadas con el shARNi del CFTR (pS-ARNi) comparado con las células tratadas con el plásmido vacío (pS-V). Para el análisis estadístico, la actividad de Clm en células electroporadas con el plásmido vacío fue considerada como el 100 % de actividad. La disminución de la actividad del Clm en las células electroporadas con el shARNi para el

CFTR fue significativa, alcanzando un valor del 57 % \pm 19,1 ($\bar{x} \pm SD$, n= 4, $p < 0,05$) con respecto al control.

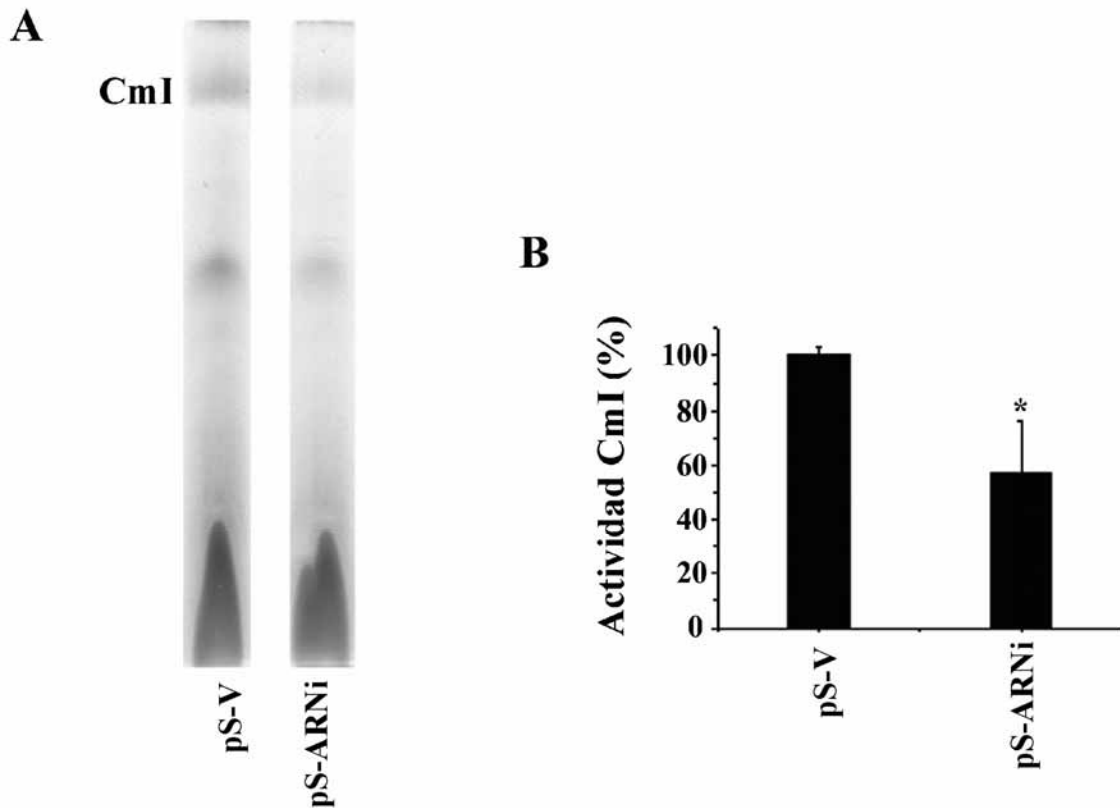


Figura 21: Actividad del Complejo I por Blue Native-PAGE en células T84 tratadas con shARNi del CFTR. Se utilizaron mitocondrias extraídas de células T84 tratadas con los plásmidos pSilencer, para ARN de interferencia del CFTR (pS-ARNi) y con plásmido vacío (pS-V). Estos resultados son representativos de cuatro experimentos individuales, cada uno por duplicado. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA (+Tukey). EL símbolo * indica reducción significativa de la actividad del CmI respecto al control. $p < 0,05$.

Objetivo 4: Determinar si la falla del CmI en FQ genera un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

4.1. Medición de especies reactivas de oxígeno (ROS) en FQ

Ha sido ampliamente demostrado que las fallas en la actividad del CmI generan una producción aumentada de ROS (Pitkanen & Robinson, 1996; Robinson, 1998). Por lo tanto decidimos medir si esto también ocurría en FQ.

Un aumento de la producción de ROS en FQ, podría explicar algunas características fenotípicas de la enfermedad (Shapiro *et al.*, 1979; Shapiro, 1988,, 1989; de Meer *et al.*, 1995). Para cuantificar el nivel de ROS utilizamos como modelo las células T84 y Caco-2 tratadas con inhibidores del CFTR (CFTR(inh)-172 y glibenclamida) en las mismas condiciones en las que observamos la reducción del Clm. Como control positivo de producción de ROS hicimos incubaciones con un conocido inhibidor de la actividad del Clm (rotenona), lo que nos permitiría medir el nivel de producción de ROS por inhibición del Clm exclusivamente. Para medir el nivel de ROS intracelular utilizamos la sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), la cual al ingresar a la célula pierde el grupo acetato (DA) por la acción de esterasas intracelulares generando DCFH, que al ser oxidado por ROS forma el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Smith & Weidemann, 1993). Por lo tanto, el aumento en la intensidad de la fluorescencia emitida refleja la concentración de ROS intracelular.

En la Figura 22 se muestran los niveles de fluorescencia, equivalentes a la concentración de ROS, correspondientes a cada tratamiento celular. Como puede observarse en la Figura, los niveles de ROS se encontraron aumentados en las células tratadas con los inhibidores del CFTR con respecto al control de células sin tratar. Incluso, el nivel de producción de ROS en las células tratadas con glibenclamida fue similar al de las células tratadas con rotenona, en tanto que para las células tratadas con el inhibidor CFTR(inh)-172 fue mayor aún que con rotenona.

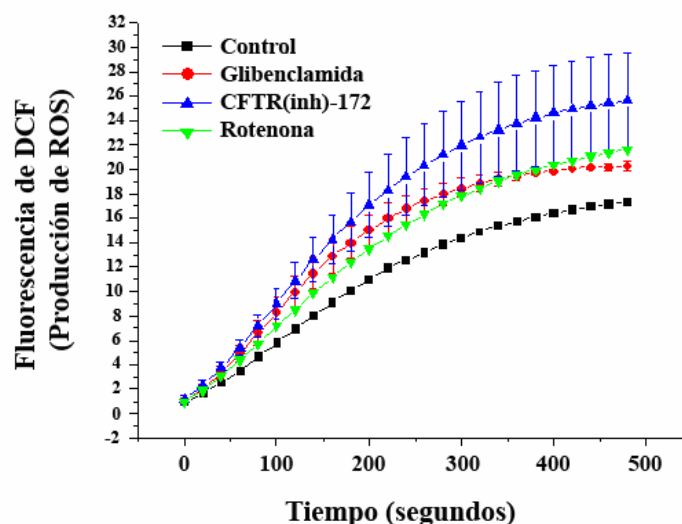


Figura 22: Medición de la producción de ROS por fluorescencia de DCHF. Los resultados corresponden a los niveles de ROS producidos en células caco-2 tratadas con inhibidores del canal CFTR y con el inhibidor del Clm rotenona. En el gráfico se muestran los niveles de ROS expresados en valores de fluorescencia de la sonda DCF para los distintos tratamientos. Negro: control (vehículo DMSO). Rojo: tratamiento con glibenclamida. Azul: tratamiento con CFTR(inh)-172. Verde: tratamiento con rotenona.

Objetivo 5: Medir el nivel de copias de ADN mitocondrial (ADNmt) en células FQ y células normales, para determinar si la disminución de la expresión del gen *MTND4* puede ser atribuida a una reducción en el número de copias del ADNmt.

5.1. Cuantificación del nivel de copias de ADNmt

La cantidad de ADNmt por célula varía según el tipo celular estudiado, de modo que su concentración celular podría determinar el nivel de expresión de cada gen mitocondrial. Por lo tanto, decidimos determinar si la reducción transcripcional de *MTND4* en FQ se debía a una disminución en el número de copias de ADNmt. Con este objetivo, recurrimos a la técnica de “Real Time”-PCR para cuantificar el nivel de copias de ADNmt en células con fenotipo FQ y normal. Brevemente, la técnica consistió en cuantificar la concentración de un gen mitocondrial (*MTND4*) y referirla a la de un gen nuclear de una sola copia (*GAPDH*), mediante PCR. Cada gen fue cuantificado en forma individual por el método de la curva estándar (Miller *et al.*, 2003), con una estrategia similar a la utilizada para cuantificar el nivel del mensajero de *MTND4*, pero en este caso, amplificamos por PCR a partir del ADN extraído de las células en estudio y la cuantificación se realizó por “Real Time”-PCR. El nivel de copias de ADNmt fue calculado a partir de la relación entre la concentración relativa del gen mitocondrial y el gen nuclear (*MTND4/GAPDH*).

El nivel de copias de ADNmt fue medido a partir del ADN extraído de células T84 tratadas y sin tratar con el inhibidor CFTR(inh)-172 y de células IB-3 y S9 tratadas con el cóctel de estimulación del CFTR (AMPc, IBMX e isoproterenol). Como se muestra en la Figura 23 A, no se observaron

diferencias significativas en el nivel de copias de ADNmt entre células T84 control y T84 tratadas con CFTR(inh)-172. En la Figura 23 B se muestran los resultados obtenidos con las células IB-3 (FQ) y S9 (CFTR salvaje), donde tampoco se observó una disminución significativa del nivel de copias de ADNmt. Estos resultados corresponden a dos experimentos individuales para cada tipo celular, cada uno de ellos por cuadruplicado. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía, con un valor de significancia de p menor a 0,05 y graficados como la media de la relación $(ng)MTND4/(ng)GAPDH \pm SD$, $n=2$.

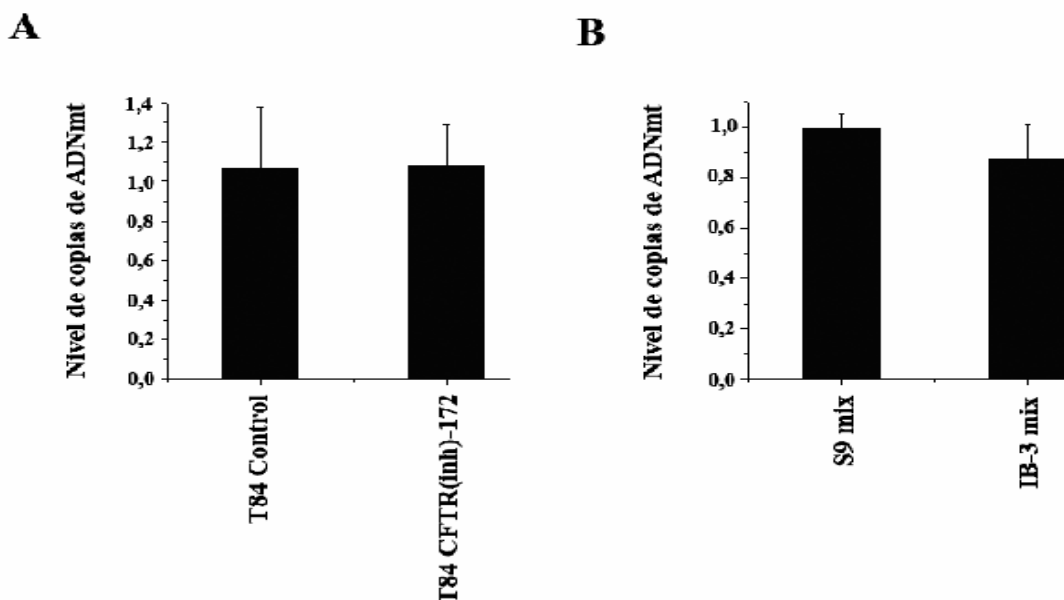


Figura 23: Medición del nivel de copias de ADNmt en FQ por “Real Time”-PCR. A: Se muestra el nivel de copias de ADNmt en células T84 y T84 tratadas con CFTR(inh)-172. **B:** Se muestra el nivel de copias de ADNmt en células IB-3 (FQ) y S9 (CFTR salvaje) tratadas con el cóctel de estimulación del CFTR (AMPc, IBMX e isoproterenol). Los resultados corresponden a dos experimentos individuales para cada tipo celular, cada uno de ellos por cuadruplicado. Los datos fueron analizados por ANOVA y graficados como la media de la relación $(ng)MTND4/(ng)GAPDH \pm SD$ ($\bar{x} \pm SD$, $n=2$).

DISCUSIÓN

En esta sección se discutirán los resultados obtenidos en el estudio de la expresión diferencial del gen *MTND4* en FQ y sus implicancias en la función mitocondrial, en particular con respecto a la actividad del CI_m. Además, se discutirán las ventajas y desventajas de cada modelo celular utilizado y las posibles explicaciones de los resultados obtenidos. Finalmente, se plantearán las perspectivas y la relevancia del estudio de la modulación de la actividad mitocondrial mediada por el canal CFTR.

Expresión diferencial de genes. Regulación negativa del gen *MTND4* en FQ.

Desde hace varios años se estudia en nuestro laboratorio la expresión diferencial de genes en FQ. La falla del CFTR en FQ juega un rol importante en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, no está claro de qué forma el transporte de cloruro puede determinar los múltiples desórdenes manifestados en esta enfermedad, sobre todo en pulmón. De esta manera, el estudio de la expresión diferencial de genes en FQ resulta ser una herramienta de estudio interesante para tratar de entender las consecuencias fisiopatológicas de la falla del CFTR. La caracterización de genes cuya expresión dependa de la actividad del CFTR, podría ayudar a comprender mejor el fenotipo FQ y definir nuevos posibles blancos de terapia.

Este trabajo de tesis se inició a partir de los resultados obtenidos en un DD, en el que se encontró un gen con expresión reducida en células FQ. El mismo fue identificado como *MTND4*, un gen mitocondrial que codifica para la subunidad 4 del Complejo I mitocondrial (CI_m) o complejo NADH-ubiquinona oxidoreductasa (Valdivieso *et al.*, 2007). Como podía esperarse de un gen cuya expresión dependiese de la actividad del CFTR, se observó cómo la expresión del fragmento seleccionado se revertía en las células CFDE/6Rep-CFTR (CFTR salvaje) tratadas con el inhibidor del transporte de Cl⁻ glibenclamida, asemejándose así al patrón de expresión de las células CFDE (FQ). Este efecto del inhibidor sugería que las diferencias debían atribuirse realmente a la actividad de transporte del CFTR y no a un artefacto de selección clonal o a una falsa señal de la RT-PCR (falso positivo/negativo).

Elegimos estudiar este gen con mayor detalle debido a que su expresión diferencial en células FQ era contraria a la del gen *SRC*, el cual se encontraba regulado positivamente (González-Guerrico, 2001; Radrizzani *et al.*, 2001; Gonzalez-Guerrico *et al.*, 2002). Una vez identificada la secuencia del fragmento aislado del DD, encontramos en la literatura datos que hacían aún más interesante su estudio. Varios trabajos habían reportado que la subunidad MTND4 codificada por este gen era un componente fundamental para la correcta actividad del Complejo I mitocondrial (CI_m), tanto en mamíferos como en otros organismos (Hofhaus & Attardi, 1993; Cardol *et al.*, 2002). El ejemplo más destacado de la importancia de MTND4 es la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), que ha sido asociada al funcionamiento anormal del CI_m a causa de mutaciones en esta subunidad (Degli Esposti *et al.*, 1994). Resultó aún más interesante que varios trabajos, décadas atrás, habían sugerido que una falla mitocondrial podía estar asociada a la FQ. De esta manera, la reducción de este gen en FQ podría explicar algunas anomalías a nivel mitocondrial reportadas por otros autores (Antonowicz *et al.*, 1972; Feigal & Shapiro, 1979; Shapiro *et al.*, 1979; Feigal *et al.*, 1982; Shapiro *et al.*, 1982; von Ruecker *et al.*, 1984; Dechechchi *et al.*, 1988; Shapiro, 1988, , 1989). De modo que cuando observamos que uno de los genes diferenciales en FQ correspondía a un gen mitocondrial, *MTND4*, decidimos caracterizar con más detalle a este gen. Además, no sólo se trataba de un gen mitocondrial, sino que precisamente correspondía a un gen sumamente importante para la actividad del CI_m, cuyo Km, décadas atrás, había sido encontrado disminuido en FQ (Dechechchi *et al.*, 1988). Todos los resultados previos mencionados eran consistentes con nuestra observación de una expresión disminuida de *MTND4* en FQ. De modo que *MTND4* podría ser la clave para explicar estas fallas mitocondriales y también la falta de tolerancia al ejercicio (de Meer *et al.*, 1999) y en la capacidad para generar ATP de manera eficiente (de Meer *et al.*, 1995). Nuestra hipótesis primordial fue que *MTND4* estaba disminuida en FQ y que esta disminución debía provocar una disminución en la actividad del CI_m. A demostrar esta hipótesis dedicamos la mayor parte del trabajo de Tesis. No sabíamos en ese entonces que, además, esta disminución determinaría el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), como se discutirá más adelante, un resultado muy significativo.

El primer paso fue la validación de los resultados del DD. Los experimentos de hibridación *in situ* en cortes de tejido de pulmón de pacientes FQ y no FQ, nos permitieron observar una clara tendencia a la disminución de *MTND4* en FQ. Sin embargo, dicha reducción podría deberse a la historia clínica del paciente del que provenían los cortes de pulmón (tratamiento con antibióticos, infecciones, etc.). Por lo tanto, no consideramos estos resultados como una validación indiscutible del DD, aunque sí constituyen una aproximación interesante para conocer el estado de este gen en pacientes FQ.

En esta tesis, logramos confirmar la expresión diferencial de *MTND4* en células FQ mediante RT-PCR semicuantitativa. Al igual que en el DD, las células CFDE/6RepCFTR tratadas con glibenclamida revirtieron la expresión del ARNm de *MTND4* y llegaron a tener un nivel transcripcional similar al observado en células CFDE. Esta reversión de los efectos de la expresión ectópica del CFTR salvaje, en células CFDE/6RepCFTR tratadas con glibenclamida, sugiere que la expresión diferencial se debe a la actividad del transporte de Cl⁻ a través del canal y no solamente a la presencia del CFTR en la membrana celular, como ocurre con la citoquina RANTES, cuya expresión depende de la presencia del CFTR y no de su actividad (Estell *et al.*, 2003). De esta manera, la expresión de *MTND4* se encontraría regulada negativamente en FQ por la falla en el transporte de Cl⁻, o dicho de otro modo, el transporte activo de Cl⁻ a través del CFTR modularía positivamente la expresión de *MTND4*.

Por otro lado, se observó que las células CFDE tratadas con glibenclamida no mostraron diferencia significativa en la expresión de *MTND4* con respecto a las células CFDE sin tratar. Esto indicaría que la expresión de *MTND4* es regulada negativamente por la falla en el transporte de Cl⁻ por el CFTR hasta un cierto nivel y más allá de este punto la célula mantendría un nivel basal de expresión de *MTND4*, que dependería de otras vías de regulación. Posiblemente estos resultados reflejen la presencia de una vía de regulación alternativa de la expresión de un gen mitocondrial, *MTND4*, mediada por la actividad del canal CFTR, algo que nunca había sido descrito. Si esta

vía depende de la concentración de iones Cl^- , capaces de modular otras proteínas como es el caso de RunX (Backstrom *et al.*, 2002), o por el contrario, depende de la actividad de proteínas asociadas al CFTR capaces de transducir la actividad del canal, es un tema sumamente interesante que deberá determinarse en el futuro.

El uso de glibenclamida como inhibidor específico del transporte de Cl^- ha sido bastante cuestionado debido a que presenta efectos secundarios, entre otros, inhibir los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) (Rabe *et al.*, 1995; Engbersen *et al.*, 2005). Por lo tanto, fue necesario confirmar la reversión de la expresión de *MTND4* en células CFDE/6RepCFTR con un nuevo inhibidor del CFTR llamado CFTR(inh)-172, desarrollado por el grupo de Verkman (Ma *et al.*, 2002). Ha sido demostrado que el inhibidor CFTR(inh)-172 no posee los efectos secundarios de glibenclamida y que la concentración necesaria para inhibir la actividad del CFTR es mucho más baja, lo que lo convierte en un inhibidor del CFTR más específico, menos tóxico y más potente (Ma *et al.*, 2002). La única desventaja de este inhibidor es su baja solubilidad en soluciones acuosas (5-20 μM), comportamiento que ha sido descrito por otros autores (Akiba *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004; Akiba *et al.*, 2005) y que nosotros también hemos observado. Esto nos impidió hacer curvas de dosis respuesta a concentraciones mayores de 20 μM , limitándonos a llegar a concentraciones efectivas hasta 10 μM . Sin embargo, la concentración efectiva del inhibidor CFTR(inh)-172 para reducir el nivel de expresión de *MTND4* fue casi 100 veces menor que la utilizada con glibenclamida, lo que da nota de su mayor potencia (Valdivieso *et al.*, 2007).

A partir de una concentración de 2,5 μM de CFTR(inh)-172, observamos la máxima reducción de los niveles de expresión de *MTND4*, la cual no varió con el aumento de la concentración del inhibidor (Figura 11). Este efecto podría explicarse por la baja solubilidad del inhibidor en medio acuoso, lo que sólo permitiría utilizar este inhibidor en un estrecho rango de concentración, más allá del cual podrían formarse agregados o micelas que reducirían su eficiencia para inhibir el canal. Otra posible explicación a este fenómeno, es que los niveles de ARNm de *MTND4* sean regulados por el transporte de Cl^- a

través del CFTR hasta un cierto punto, como se discutió anteriormente. Esto quiere decir que por más que el transporte de Cl⁻ a través del canal estuviese completamente inhibido, la célula mantendría un nivel basal de expresión de *MTND4*.

Resumiendo, los resultados con el uso del inhibidor CFTR(inh)-172 coincidieron con los obtenidos en el DD y la RT-PCR semicuantitativa, donde se utilizó glibenclamida para inhibir el canal. De esta manera, se confirmó que la expresión de *MTND4* se encuentra disminuida en células CFDE, que la inhibición de la actividad de transporte de Cl⁻ por el CFTR resulta en una regulación negativa de *MTND4* y que éste efecto puede ser obtenido usando glibenclamida o CFTR(inh)-172. Al modular la actividad del CFTR mediante el uso de inhibidores, demostramos que hay una relación causal entre la actividad del CFTR y la expresión de *MTND4*.

Sobre la síntesis de proteínas mitocondriales

Una vez confirmada la reducción en el nivel de expresión del ARNm de *MTND4* en FQ, decidimos determinar si la proteína también se encontraba disminuida. Con este fin, elegimos la técnica de “pulse-labeling”, que ha sido usada en varios trabajos pioneros en el estudio de las subunidades del Clm y permite observar el patrón de expresión de las subunidades de algunos complejos mitocondriales y su localización en un gel (Chomyn *et al.*, 1985; Hayashi *et al.*, 1994; Chomyn, 2001). En teoría, la técnica nos permitiría visualizar la concentración de *MTND4* a partir de la síntesis *de novo* de proteínas mitocondriales y de este modo medir su nivel de traducción en FQ. En este experimento utilizamos las células CFDE, CFDE/6RepCFTR y estas últimas tratadas con inhibidores del CFTR, glibenclamida y NPPB. Durante estos experimentos no contábamos con el inhibidor CFTR(inh)-172, por lo que usamos el inhibidor NPPB y también glibenclamida. Las principales desventajas de estos dos inhibidores, con respecto al inhibidor CFTR(inh)-172, es la alta concentración utilizada para inhibir el CFTR, lo que puede ocasionar efectos tóxicos a nivel celular y sobre todo en modelos animales (Lukacs *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 2002).

Aunque no logramos identificar las subunidades de los complejos mitocondriales de la manera en que fue descrita por Chomyn y col. (Chomyn *et al.*, 1985), el efecto causado por el inhibidor NPPB fue contundente. Las células tratadas con este inhibidor perdieron completamente la capacidad de sintetizar proteínas mitocondriales de *novo*. Si bien esto no había sido descrito anteriormente, hay trabajos que indican que tanto NPPB como glibenclamida afectan el metabolismo mitocondrial, observándose una reducción en los niveles de ATP que afectaría la actividad de los canales de K⁺ sensibles a ATP (K_{ATP}) (de Weille & Lazdunski, 1990; Lukacs *et al.*, 1991; Sheppard & Welsh, 1992; Engbersen *et al.*, 2005).

Por otra parte, si bien no logramos identificar MTND4 en forma precisa, observamos que la síntesis de proteínas mitocondriales se encontraba disminuida en las células CFDE y CFDE/6RepCFTR tratadas con glibenclamida respecto a la observada en las células CFDE/6RepCFTR. A diferencia del resultado obtenido con NPPB, la disminución de la síntesis *de novo* de proteínas mitocondriales en células CFDE y CFDE/6Rep tratadas con glibenclamida fue similar, reduciendo la posibilidad de que estas observaciones se deban a algún efecto tóxico del inhibidor. Sin embargo, es apresurado atribuir la reducción de la síntesis de proteínas mitocondriales exclusivamente a la inhibición del CFTR debido a los posibles efectos de los inhibidores sobre los canales K_{ATP} en nuestras condiciones de trabajo. De todos modos, resulta muy interesante el hecho de que en células FQ (CFDE) también se observe una reducción de la síntesis de proteínas mitocondriales. Los canales de K_{ATP} podrían jugar un papel como sensores de la concentración de Cl⁻ con la consecuente reducción del metabolismo mitocondrial en FQ. Por otro lado, también existe la posibilidad de que la actividad del CFTR dispare alguna vía de señalización que module la actividad mitocondrial independientemente de los canales de K_{ATP}. Por lo tanto, sería muy importante repetir estos ensayos con el inhibidor CFTR(inh)-172, el cual se ha demostrado que no afecta la actividad de los canales de K_{ATP} (Ma *et al.*, 2002). De esta manera, podríamos confirmar o descartar si estos canales están involucrados en la regulación mediada por el CFTR.

Finalmente, estos datos sugerirían que la actividad del CFTR ejerce una modulación positiva de la síntesis de varias proteínas mitocondriales, de modo que la falla del canal en FQ podría alterar varias funciones mitocondriales. Estos resultados deberán ser confirmados mediante una mejor puesta a punto de la técnica y con el uso del inhibidor CFTR(inh)-172, junto con otros estudios complementarios que ayuden a determinar si los cambios observados son significativos y específicos, como el uso de anticuerpos específicos contra MTND4 para realizar una inmunoprecipitación específica de la proteína marcada y lograr así su detección. Realizamos varios experimentos con un anticuerpo que nos envió el Dr. Doolittle, RF (Universidad de California en San Diego, departamento de Química), pero este anticuerpo era sumamente inespecífico y no logramos resultados positivos (resultados no mostrados). Decidimos entonces enfocar el trabajo hacia lo más importante de nuestra hipótesis, que era demostrar una falla en la actividad del Clm en FQ.

Actividad del Clm en FQ

La regulación negativa del ARNm de *MTND4* en células y tejido FQ, nos condujo a probar si esta reducción afectaba la actividad del Clm. Como se mencionó, esta hipótesis surgió a partir de los numerosos reportes que demostraban la importancia de la subunidad MTND4 para la correcta función del Clm (Hofhaus & Attardi, 1993; Degli Esposti *et al.*, 1994; Cardol *et al.*, 2002) y de nuestra observación sobre la disminución de la expresión de *MTND4* en FQ.

Para medir la actividad del Clm utilizamos la técnica denominada “Blue Native-PAGE” (BN-PAGE) (Schägger H, 1991), que permite ensayar *in situ* la actividad de los distintos complejos de la cadena respiratoria luego de una electroforesis en condiciones no desnaturizantes, utilizando proteínas solubilizadas desde mitocondrias extraídas de los distintos tipos celulares en estudio (Lojda, 1979; Schägger H, 1991; Zerbetto *et al.*, 1997). La ventaja principal de esta técnica sobre el tradicional método espectrofotométrico para mediciones de actividad del Clm (Rustin *et al.*, 1994), es que la medición de la actividad NADH:deshidrogenasa se restringe exclusivamente a la actividad del Clm en la banda correspondiente, identificada por su peso molecular en un gel de

poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. En el método espectrofotométrico, en cambio, el inconveniente que se presenta es que la actividad de oxidación del NADH puede deberse a otras deshidrogenasas presentes en el extracto mitocondrial y a subcomplejos intermedios del Clm, que si bien muestran actividad de oxidación del NADH, evidentemente no pueden contribuir al transporte de electrones como lo hace el complejo intacto. Además, la técnica de BN-PAGE nos permite determinar si existe alguna alteración en el ensamblado del complejo proteico, algo que es imposible de determinar por el método espectrofotométrico (se hace cuantificando la proporción entre los distintos complejos). Creemos que éste es el motivo por el cual otros autores no han sido capaces de demostrar con anterioridad, de manera convincente, fallas en el Clm en FQ. Cómo ya se mencionó, los trabajos pioneros de Shapiro y col. (Shapiro *et al.*, 1979; Shapiro *et al.*, 1982; Dehecchi *et al.*, 1988; Shapiro, 1988, , 1989) sugerían que existía una falla a nivel del Clm en FQ, pero esta hipótesis no había sido demostrada fehacientemente. Tal es así, que por muchos años la hipótesis de Shapiro fue totalmente descartada por el resto de los autores. Incluso, este mismo grupo abandonó las investigaciones cuando el CFTR fue clonado y se descubrió que el responsable de la FQ era un canal de Cl⁻. Lo irónico de esta historia es que en realidad el Dr. Shapiro y sus colaboradores sólo se apresuraron en pensar que el gen responsable de la FQ estaba en las mitocondrias; pero evidentemente no estaban errados al afirmar que en FQ había una falla mitocondrial. Nuestros resultados, como se discutirá a continuación, demuestran claramente que no estaban equivocados. Solamente les faltaba el dato de que esta regulación de la actividad mitocondrial era indirecta, a través del CFTR.

Actividad del Clm en modelos celulares FQ

Comenzamos el estudio de la actividad del Clm en FQ con el modelo de células CFDE y CFDE/6RepCFTR, como lo hicimos en los experimentos donde determinamos que la expresión de *MTND4* se encontraba reducida en FQ. Confirmando nuestra hipótesis, encontramos una disminución significativa en la actividad del Clm en células CFDE y CFDE/6RepCFTR tratadas con glibenclamida al comparar esta actividad con la de las células

CFDE/6RepCFTR, que expresan ectópicamente CFTR salvaje. Nuevamente, al igual que con la expresión de *MTND4*, se observó una reversión del efecto en la actividad del Clm por la inhibición del transporte de cloruro, lo que sugiere que la diferencia de actividad encontrada corresponde en realidad a una relación causal entre la actividad del CFTR y la actividad del Clm y no sólo a una correlación. De modo que los resultados sugieren que la disminución de la actividad del complejo Clm esta ligada a la reducción en los niveles de *MTND4* en FQ.

Algunas críticas hacia el modelo celular utilizado inicialmente (CFDE) se basan en que los resultados podrían estar sujetos a artefactos generados por una presión de selección diferente (debido al antibiótico higromicina B usado para mantener el plásmido en las células CFDE/6RepCFTR), sumado a que la mutación del CFTR en estas células aún no ha podido ser identificada. Por estas razones, estudiamos la actividad del Clm en un nuevo modelo celular FQ que nos permitió independizarnos de algunos defectos del modelo anterior. Este modelo consistió en la línea celular IB-3, también proveniente de un paciente FQ (heterocigota $\Delta F508$ y $W1282X$) (Zeitlin *et al.*, 1991) y las células S9, que son las células IB-3 transducidas con un vector viral para expresar CFTR salvaje. Las células S9 no requieren ser seleccionadas con antibiótico, como es el caso de las células CFDE/6RepCFTR.

En este nuevo modelo, también observamos una reducción de la actividad del Clm en las células FQ respecto a las células normalizadas. Sin embargo, sólo encontramos una diferencia significativa en la actividad del Clm cuando las células fueron estimuladas con un cóctel de activación del CFTR (isoproterenol, AMPc e IBMX). La diferencia de comportamiento encontrada bajo condiciones basales de crecimiento, entre las dos líneas celulares FQ (CFDE e IB-3) y normalizadas (CFDE/6Rep y S9), posiblemente se deba a una variación en las cantidades de CFTR expresado en los distintos tipos celulares (mayor en las CFDE/6RepCFTR), aunque esto no lo hemos medido.

Los resultados obtenidos con los dos modelos de células FQ sugieren fuertemente que la actividad del Clm se encuentra reducida por la falla del CFTR y que puede ser modulada por la actividad de transporte de Cl⁻.

Actividad del Clm en modelos celulares no-FQ

Si bien se observó en los dos tipos celulares FQ (CFDE e IB-3) una disminución de la actividad del Clm por la falla en la actividad del CFTR, en el caso de las células IB-3 y S9 fue necesario estimular la actividad del CFTR con el cóctel de AMPc, IBMX e isoproterenol. Esta estimulación podría activar vías alternativas que podrían opacar o confundir los resultados. Hay que tener en cuenta que normalmente el CFTR no se encuentra tan estimulado; solamente se encuentra altamente estimulado cuando se producen diarreas de origen bacteriano o una alta estimulación adrenérgica (“stress”, etc.). Además, no podemos descartar totalmente posibles efectos de selección clonal diferente, ya que ambos tipos celulares (FQ y corregidas) se seleccionan en forma independiente y podríamos estar comparando células totalmente distintas, pero por otros motivos (dependiente del lugar de inserción del gen corrector, etc.).

Por estas razones, buscamos un nuevo modelo que no dependiese del uso del cóctel de estimulación del canal y que tampoco tuviese el problema de la posible selección clonal por sucesivas selecciones con antibiótico. De esta manera, elegimos una línea celular que expresara el CFTR salvaje en forma normal con el fin de modular su actividad, ya sea con el uso de inhibidores sintéticos del transporte de Cl⁻ a través del CFTR o mediante la técnica de ARN de interferencia, con el fin de disminuir la expresión del canal y por lo tanto su actividad. La línea celular elegida en primera instancia fue T84, de carcinoma de colon humano, la cual expresa CFTR en forma abundante y ha sido utilizada como modelo en otros trabajos de nuestro laboratorio (Cafferata *et al.*, 2000; Cafferata *et al.*, 2001 May).

Los resultados con el modelo de células T84 tratadas con inhibidores del CFTR mostraron que la actividad del transporte de Cl⁻ por el CFTR modula de manera positiva la actividad del Clm. Así, a las 24 hs de tratamiento con glibenclamida y a las 48 hs de tratamiento con CFTR(inh)-172 se observó una

reducción significativa de la actividad del Clm. Estos resultados con el inhibidor CFTR(inh)-172 también fueron obtenidos utilizando la línea celular Caco-2, proveniente de cáncer de colon humano, resultados que fueron concordantes con las observaciones en células T84. Teniendo en cuenta que la reducción de la expresión del ARNm de *MTND4* en células tratadas con CFTR(inh)-172 comienza a apreciarse a las 24 hs de tratamiento, resulta razonable que la reducción de la actividad del Clm sea posterior, ya que primero debe ocurrir una reducción en la síntesis de la subunidad MTND4 y luego un recambio del complejo enzimático en la membrana mitocondrial. Estas observaciones también concuerdan con estudios reportados por otros autores, que sugieren que la vida media de los complejos de la cadena de transporte de electrones es relativamente larga (Hare & Hodges, 1982; Yadava *et al.*, 2004).

Debido a que el inhibidor CFTR(inh)-172 no actúa sobre los canales de K_{ATP} (Ma *et al.*, 2002), la presunción de que la actividad del CFTR modularía la actividad mitocondrial a través de dichos canales no tendría aquí sustento. Sin embargo, no se puede descartar que alguna otra vía de señalización, que involucre el transporte de Cl^- , pueda regular los canales de K_{ATP} . Por otra parte, el mayor efecto de glibenclamida sobre la actividad del Clm podría deberse a una combinación de la inhibición del CFTR y de los canales de K_{ATP} , siendo el segundo un efecto inespecífico, algo que no ocurriría cuando se trata con el inhibidor CFTR(inh)-172. A través de estas observaciones, podemos sugerir que no es la presencia *per se* del CFTR en la membrana celular la que modularía la actividad del Clm sino la actividad de transporte activo de iones Cl^- a través del canal. Sin embargo, existe la posibilidad de que ambos inhibidores tengan la capacidad de inhibir la actividad del Clm en forma independiente de la actividad de transporte del CFTR, a través de la inducción de un cambio conformacional en el CFTR, que pueda ser detectado por algún camino de señalización.

Para descartar definitivamente que los efectos observados pudiesen deberse a efectos inespecíficos de los inhibidores sintéticos, decidimos ir más allá y confirmar estos resultados reduciendo la expresión del CFTR (y por lo tanto su actividad) mediante el “knock-down” de su expresión utilizando ARN

de interferencia (ARNi). Para ello usamos la estrategia denominada “short hairpin” ARN de interferencia (shARNi) y como se describió en Materiales y Métodos, elegimos los primeros 18 nucleótidos del mensajero del CFTR como secuencia de reconocimiento. Dicha secuencia fue utilizada anteriormente con éxito en nuestro laboratorio para reducir la expresión del CFTR, cuando utilizamos oligonucleótidos “sense” y “antisense” (González-Guerrico, 2001; Radrizzani *et al.*, 2001; Gonzalez-Guerrico *et al.*, 2002).

El tiempo y la concentración de plásmido se pusieron a punto mediante las correspondientes curvas, las cuales se realizaron midiendo la actividad del Clm como variable dependiente, ya que este era el efecto final que deseábamos medir. Para confirmar la eficacia del ARNi, como control, medimos la actividad de transporte de Cl⁻ por el CFTR en las células tratadas con shARNi respecto a las células control y confirmamos que la actividad del canal se encontraba reducida. Cabe destacar que la reducción de la actividad del CFTR fue evidente a partir de las 24 hs de tratamiento con el shARNi, en tanto que a las 48 hs la inhibición aumentó el doble (Fig. 20).

El análisis estadístico mostró una reducción significativa de la actividad del Clm en las células tratadas con el shARNi-CFTR respecto a las células control. Como mencionamos anteriormente, con este modelo nos independizamos de los posibles efectos secundarios de los inhibidores, como así también de la posible selección clonal que podría ocurrir en los otros modelos de células FQ (CFDE y IB-3).

Dada la importancia que tiene este complejo para la correcta función mitocondrial, nuestras observaciones podrían indicar un rol primordial de esta organela, bajo la influencia de la falla de la actividad del CFTR, en las características fenotípicas de la FQ. Asimismo, no debe olvidarse el rol fisiológico normal del CFTR, como receptor de *Salmonella typhi* (Lyczak *et al.*, 2001) y de *Pseudomonas aeruginosa* (Pier, 2000). Frente a una infección, se produce la endocitosis del CFTR junto con la bacteria y evidentemente esto lleva a una inhibición del transporte de cloruro. Por nuestras observaciones, este efecto debería afectar la actividad mitocondrial. Dado el reciente rol

atribuido a las mitocondrias en la defensa inmune innata (McWhirter *et al.*, 2005), nuestras observaciones abren el camino hacia el estudio del posible rol de la modulación de la defensa inmune innata a través de las mitocondrias bajo modulación de la actividad del CFTR y de su posible relevancia en la falla inmune localizada preferentemente en los pulmones de los pacientes FQ.

El número de copias de ADNmt

En un intento por dilucidar el posible mecanismo involucrado en la reducción del nivel de transcripción del ARNm de *MTND4*, estudiamos si la cantidad de copias de ADNmt se encontraba reducida en FQ. Nuestros resultados sugieren que el número de copias de ADNmt no puede explicar la disminución de la expresión del gen *MTND4* ni la disminución de la actividad del Clm. Más aún, resultados preliminares de nuestro laboratorio (María Luz Teiber, resultados no mostrados) sugieren que la masa mitocondrial se encuentra en realidad aumentada en células T84 tratadas con CFTR(inh)-172, de modo que ni el cambio en el número de copias de ADNmt ni la masa mitocondrial se encontrarían afectadas bajo las mismas condiciones en las que se observa una clara disminución de la actividad del Clm, cercana al 50 %. En principio, estos resultados sugieren que el mecanismo de regulación de la vía CFTR→Clm no parece estar mediada por la regulación de la biogénesis mitocondrial ni por el cambio en el número de copias de ADN mitocondrial. Por lo tanto, en estudios futuros se intentará encontrar la vía de señalización por la cual el CFTR es capaz de regular la actividad del Clm, así como también la transcripción de *MTND4*.

Efectos de la reducción de la actividad del Clm

El objetivo principal de la fosforilación oxidativa es la producción de energía en forma de ATP. Ha sido demostrado que la inhibición de la respiración mitocondrial puede conducir a una reducción en la síntesis de nucleótido (Gattermann *et al.*, 2004), de modo que la disminución de la actividad del Clm en FQ podría provocar una reducción en la síntesis de ATP, como ocurre en la enfermedad de LHON (Baracca *et al.*, 2005). En concordancia con estas observaciones, se ha encontrado una síntesis de ATP reducida en el músculo esquelético de pacientes FQ (de Meer *et al.*, 1995), lo que provocaría la

intolerancia al ejercicio atribuida a fallas en la actividad del Clm (DiMauro, 1999).

Otra de las consecuencias de la falla en la actividad del Clm, es el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS, “Reactive Oxxygen Species”). Nosotros medimos los niveles de ROS en células Caco-2 tratadas con el inhibidor de la actividad del CFTR CFTR(inh)-172, en las mismas condiciones y tiempo que en las mediciones de la actividad del Clm. Así, demostramos que existe un incremento de ROS en nuestro modelo con inhibidores del CFTR (Figura 22). El aumento en los niveles de ROS, en nuestro modelo FQ, es similar al aumento observado en las células que fueron tratadas con el inhibidor del Clm rotenona. Anteriormente, Velsor y col. habían reportado un aumento de ROS en FQ, utilizando un modelo de ratones “knock out” para el CFTR, pero lo atribuyeron a una disminución del glutatión reducido mitocondrial (GSH) (Velsor *et al.*, 2006).

Algunos autores han demostrado un déficit de transporte de GSH extracelular por la falla del CFTR, lo que disminuiría la protección celular frente al estrés oxidativo (Linsdell & Hanrahan, 1998; Gao *et al.*, 1999; Velsor *et al.*, 2001; Kogan *et al.*, 2003). Sin embargo, estos autores no conocían nuestras observaciones sobre la disminución de la actividad del Clm en FQ, con un incremento significativo de las ROS. En varios trabajos, ha sido ampliamente demostrado que la reducción o la falla en la actividad del Clm conduce a un incremento intracelular de las ROS (Pitkanen & Robinson, 1996; Luo *et al.*, 1997; Robinson, 1998). Por otra parte, Barrientos y Moraes han publicado estudios en los que examinan los aspectos fisiopatológicos de la deficiencia del Clm en un modelo celular que presenta una deficiencia del 40 % en el Clm (Barrientos & Moraes, 1999), una reducción similar a la observada por nosotros en FQ, donde encontraron una formación de ROS aumentada.

El aumento en la producción de ROS observado en nuestros modelos FQ, sugiere que la reducción de la actividad del Clm podría estar involucrada en la disminución de los niveles de GSH encontrada por otros autores (Linsdell & Hanrahan, 1998; Gao *et al.*, 1999; Velsor *et al.*, 2001; Kogan *et al.*, 2003;

Velsor *et al.*, 2006). En un trabajo reciente, se ha propuesto que el transporte deficiente de GSH, a través del CFTR, es el responsable del aumento de ROS (Velsor *et al.*, 2006). Sin embargo, nuestras observaciones nos permiten sugerir una situación alternativa (Figura 24), donde la reducción de la actividad del CIm en FQ podría estar involucrada en el aumento de ROS, lo que conduciría a una disminución en los niveles de GSH observados por Velsor y col. (Velsor *et al.*, 2001; Velsor *et al.*, 2006). Por otra parte, el déficit en el transporte de GSH extracelular acentuaría el desbalance entre glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG), lo que disminuiría la protección antioxidante de la célula.

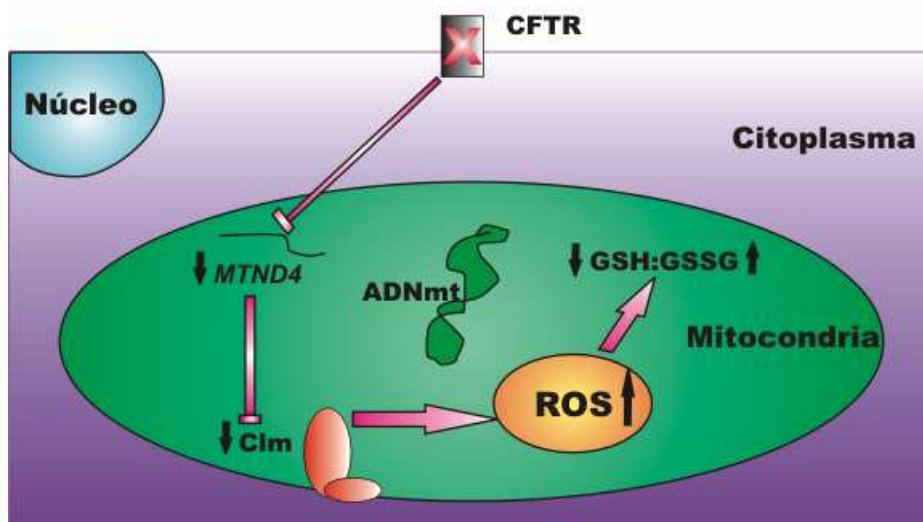


Figura 24: Modelo para el aumento de ROS en FQ. La falla en la actividad del CFTR produce una disminución de la expresión del ARNm de *MTND4*, esto causaría la disminución de la actividad del CIm que conduciría a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El aumento de ROS llevaría a un desbalance en la proporción de GSH:GSSG en la mitocondria.

De todos modos, estas dos alternativas no son excluyentes, ya que si el aumento de ROS ocurre por una disminución de los niveles de GSH, los daños causados por las ROS podrían llevar a la reducción de la actividad del CIm. Incluso, la baja expresión de *MTND4* podría ser una consecuencia de la elevada concentración de ROS en FQ, algo que ha sido observado en un

modelo de Parkinson, en el cual se recupera la expresión de *MTND4* por tratamiento con “N-tert-butyl-alpha-(2-sulfophenyl)-nitron”, un secuestrador de ROS (“spin trap”) (Conn *et al.*, Lett 2001 Jun 29). Por lo tanto, sería muy importante determinar si el déficit de GSH en FQ es un efecto anterior, posterior o simultáneo a la reducción de la actividad del Clm. De todos modos, estos resultados apuntan a la producción de ROS como blanco de terapia en FQ, ya sea enfocándose en la actividad del Clm o en los niveles de GSH.

El aumento de ROS tiene importantes consecuencias fisiopatológicas para las células, que podrían explicar algunas características de la FQ. Las células cuentan con sistemas de protección contra el ataque de las ROS a los lípidos, proteínas y ADN, que consiste en un sistema de defensa antioxidante de origen enzimático o no enzimático. Los agentes antioxidantes más conocidos son las superóxido dismutasas, las glutatión peroxidasas y antioxidantes lipofílicos como α -tocoferol y β -caroteno (Halliwell, 1991). Se ha propuesto que una alteración en la función del sistema de fosforilación oxidativa podría aumentar el desbalance entre la producción y la eliminación de ROS, lo que conduciría a una secuencia de eventos perjudiciales para la célula (Nohl *et al.*, 1989; Cleeter *et al.*, 1992; Brunmair *et al.*, 2004), entre ellos el daño al ADN mitocondrial (mtADN) (Pitkanen & Robinson, 1996).

Por otra parte, ha sido demostrado que las células de pulmón liberan mediadores inflamatorios y citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina (IL)-1 e IL-8, en respuesta al estrés oxidativo. Esta liberación de citoquinas induciría el reclutamiento de neutrófilos y la activación de factores de transcripción claves como el factor nuclear- κ B (NF- κ B) y la proteína activadora- (AP-1), lo que aumentaría la respuesta inflamatoria y el daño tisular (Brennan & O'Neill, 1995; Rahman & MacNee, 1998; Filosto *et al.*, 2002; Filosto *et al.*, 2003). En neutrófilos, la mieloperoxidasa cataliza la formación de ácido perclórico, un potente oxidante, a partir de H₂O₂ en presencia de iones Cl⁻. Por su parte, las células epiteliales del pulmón pueden liberar ROS (van Klaveren *et al.*, 1997; Rochelle *et al.*, 1998) y así estimular las células inflamatorias directamente, lo que amplificaría la inflamación del pulmón y los eventos oxidativos. Esto último es de gran relevancia, dado que en FQ se

encuentran alterados los procesos inflamatorios e inmunológicos (Bonfield *et al.*, 1995a; Bonfield *et al.*, 1995b; Konstan & Berger, 1997) y se han encontrado elevados niveles de citoquinas, aún en ausencia de cuadro clínico o de infección detectable. Recientemente, ha sido reportado que el estrés oxidativo causaría una hiperacetilación del promotor de IL-8 en un modelo de células FQ (Bartling & Drumm, 2009). Estos datos sugieren que las células con fallas en el CFTR se encuentran bajo estrés oxidativo, lo que estaría en concordancia con nuestras observaciones.

Sumado a estas consideraciones, recientemente Perez y col. (Perez *et al.*, 2007) han reportado que la inhibición del CFTR es capaz de imitar el perfil inflamatorio de FQ. En este trabajo usaron como modelo un cultivo primario de células epiteliales que expresa el CFTR en forma normal y modularon la actividad del canal con el inhibidor CFTR(inh)-172, al igual que en nuestro modelo con células T84 y caco-2. Estos autores, observaron un incremento en la secreción basal de IL-8 y en respuesta a *Pseudomonas*, así como también un aumento en la translocación de NF- κ B sobre la estimulación de TNF- α e IL-1 β . Lo interesante de estas observaciones es que fueron obtenidas luego de inhibir el CFTR en forma continua durante tres a cinco días, en tanto que nosotros observamos una disminución de la actividad del Clm y un aumento de ROS a los dos días de realizada la inhibición del CFTR. Por lo tanto, podríamos sugerir que el aumento de ROS que observamos en nuestro sistema es el causante del aumento de la expresión de las citoquinas inflamatorias y que esto se debe a la disminución de la actividad del Clm en FQ. De este modo, podríamos sugerir que la reducción de la actividad del Clm es un evento muy temprano causado por la falla de la actividad del CFTR, lo que convierte a este complejo en un blanco importante en la terapia de la FQ.

En nuestro laboratorio, ha sido demostrado que existe un efecto inhibitorio de la expresión del CFTR a altas concentraciones de IL-1 β (Cafferata *et al.*, 2000), por lo que sería posible que se genere un círculo vicioso que involucraría un aumento en la producción de ROS, con la consecuente estimulación de IL-1 β y la disminución de la expresión del CFTR.

Una revisión reciente de Sten Orrenius describe la relación entre las fallas en la actividad del Clm, la generación de ROS y la apoptosis (Ott *et al.*, 2007). Por otra parte, Perier y col. demostraron que la deficiencia del Clm sensibiliza a las neuronas para la apoptosis dependiente de mitocondria en respuesta al agonista de muerte celular Bax mediante el daño oxidativo (Perier *et al.*, 2005). También, algunos estudios han documentado la existencia de apoptosis en FQ (Kim *et al.*, 1999; Rottner *et al.*, 2007), notando una marcada susceptibilidad en sus modelos FQ. Rottner y col. observaron que en células FQ la apoptosis estaba ligada a la activación de la vía de NF- κ B, sugiriendo que las citoquinas proinflamatorias secretadas por estas células promovieron la apoptosis (Rottner *et al.*, 2007). La apoptosis contribuiría a auto-perpetuar el proceso inflamatorio, por lo que es muy importante determinar el mecanismo por el cual esto ocurre en FQ. De ser nuestras presunciones correctas, el aumento en el nivel de ROS provocado por la disminución del Clm ayudaría a explicar el fenómeno de apoptosis descrito por otros autores.

El hecho de que la actividad del CFTR sea capaz de modular la actividad del Clm en células que expresan el CFTR normal (células T84 y Caco-2), sugiere que esta modulación no tiene sólo un rol patológico en FQ, sino también un rol fisiológico muy importante en la función celular. En estudios futuros, será importante determinar el alcance de la disminución de la actividad del Clm en FQ en los procesos de apoptosis y fallas inmunológicas. Esta tarea será realizada mediante la restauración de la actividad del Clm en nuestros modelos de células FQ. Para ello, se realizarán transfecciones con un plásmido que expresa el Clm de levadura (ND11), desarrollado por el grupo del Dr. Yagi y col. (Seo *et al.*, 1998). El Clm de levadura está formado por una única subunidad que es insensible a rotenona y ha sido utilizada en varios trabajos para rescatar la actividad del Clm en células que tienen su función alterada (Bai *et al.*, 2001; Marella *et al.*, 2008). Esto nos permitirá determinar si las alteraciones observadas son debidas exclusivamente a la reducción de la actividad del Clm y si estas pueden ser revertidas por la actividad del Clm de levadura. Finalmente, será de gran ayuda determinar los mecanismos involucrados en la modulación de la actividad del Clm mediada por la actividad del

canal de cloruro CFTR, de modo que puedan establecerse nuevos blancos de terapia para la FQ.

CONCLUSIONES

1. Se ha confirmado una vez más la existencia de genes CFTR-dependientes.
2. Existe una correlación entre la falla del CFTR en FQ y la expresión del gen mitocondrial *MTND4*.
3. Esta correlación es en realidad una relación causal, ya que la modulación de la actividad del CFTR por los inhibidores glibenclamida y CFTR(inh)-172 modulan también la expresión de *MTND4*.
4. *MTND4* es un nuevo gen CFTR-dependiente, cuya expresión se encuentra regulada positivamente por la actividad del CFTR, o dicho en otras palabras, regulado negativamente en fibrosis quística.
5. Respecto a la reducción de la expresión de *MTND4*, glibenclamida tiene una $ED_{50} = 150 \mu\text{M} \pm 14,76$ (n=3) y CFTR (inh)-172: $ED_{50} = 1,7 \mu\text{M} \pm 0,6$ (n=4), por lo tanto aún en cultivos celulares el CFTR(inh)-172 es mucho más potente que la glibenclamida.
6. La síntesis de proteínas mitocondriales parecería estar reducida en las células con fenotipo FQ, aunque los resultados deben ser corroborados con otros modelos celulares.
7. La actividad del Complejo I mitocondrial se encuentra disminuida en FQ y existe una correlación entre la expresión de *MTND4* y la actividad del CIm.
8. Los niveles de ROS se encuentran aumentados en FQ, lo que sería una de las principales consecuencias de la disminución de la actividad del CIm.
9. El número de copias de ADNmt no varía en células FQ, por lo que no explicaría la disminución de la expresión del gen *MTND4* ni la disminución de la actividad del CIm.
10. Se ha demostrado que en fibrosis quística existe una falla mitocondrial que se manifiesta en la actividad del Complejo I. Esta falta de actividad podría ser responsable de la inducción de una alta concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de apoptosis, ambos fenómenos ya descritos en FQ, para los cuales no se conoce el mecanismo. En estudios futuros se intentará

encontrar la vía de señalización por la cual el CFTR es capaz de regular la actividad del Complejo I.

11. Cómo las mitocondrias tienen un papel muy importante en la inmunidad innata (McWhirter *et al.*, 2005; Hiscott *et al.*, 2006), es posible que la falla del CIm pueda explicar, al menos parcialmente, la hipersensibilidad de los pacientes FQ a las infecciones pulmonares.
12. Estos resultados podrían abrir el camino hacia la identificación de nuevos blancos de terapia en esta enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- Aitken ML, Burke W, McDonald G, Shak S, Montgomery AB & Smith A (1992). Recombinant human DNase inhalation in normal subjects and patients with cystic fibrosis. A phase 1 study. *Jama* **267**, 1947-1951.
- Akiba Y, Furukawa O, Guth PH, Engel E, Nastaskin I, Sassani P, Dukkipatis R, Pushkin A, Kurtz I & Kaunitz JD (2001). Cellular bicarbonate protects rat duodenal mucosa from acid-induced injury. *J Clin Invest* **108**, 1807-1816.
- Akiba Y, Jung M, Ouk S & Kaunitz JD (2005). A novel small molecule CFTR inhibitor attenuates HCO₃⁻ secretion and duodenal ulcer formation in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G753-759.
- Anderson MP, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE & Welsh MJ (1991). Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* **251**, 679-682.
- Anderson MP & Welsh MJ (1992). Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains. *Science* **257**, 1701-1704.
- Antonowicz I, Sippell WG & Shwachman H (1972). Cystic fibrosis: lysosomal and mitochondrial enzyme activities of lymphoid cell lines. *Pediatr Res* **6**, 803-812.
- Armstrong DS, Grimwood K, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A & Phelan PD (1995). Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *Bmj* **310**, 1571-1572.
- Backstrom S, Wolf-Watz M, Grundstrom C, Hard T, Grundstrom T & Sauer UH (2002). The RUNX1 Runt domain at 1.25Å resolution: a structural switch and specifically bound chloride ions modulate DNA binding. *J Mol Biol* **322**, 259-272.
- Bai Y, Hajek P, Chomyn A, Chan E, Seo BB, Matsuno-Yagi A, Yagi T & Attardi G (2001). Lack of complex I activity in human cells carrying a mutation in MtDNA-encoded ND4 subunit is corrected by the *Saccharomyces cerevisiae* NADH-quinone oxidoreductase (NDI1) gene. *J Biol Chem* **276**, 38808-38813.
- Baracca A, Solaini G, Sgarbi G, Lenaz G, Baruzzi A, Schapira AH, Martinuzzi A & Carelli V (2005). Severe impairment of complex I-driven adenosine triphosphate synthesis in leber hereditary optic neuropathy cybrids. *Arch Neurol* **62**, 730-736.
- Barasch J & al-Awqati Q (1993). Defective acidification of the biosynthetic pathway in cystic fibrosis. *J Cell Sci Suppl* **17**, 229-233.
- Barrientos A & Moraes CT (1999). Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *J Biol Chem* **274**, 16188-16197.

- Bartling TR & Drumm ML (2009). Oxidative stress causes IL8 promoter hyperacetylation in cystic fibrosis airway cell models. *Am J Respir Cell Mol Biol* **40**, 58-65.
- Berger HA, Travis SM & Welsh MJ (1993). Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* **268**, 2037-2047.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM & Hannon GJ (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.
- Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB & Berger M (1995a). Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **13**, 257-261.
- Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H & Berger M (1995b). Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* **152**, 2111-2118.
- Boucher RC, Stutts MJ, Knowles MR, Cantley L & Gatzky JT (1986). Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest* **78**, 1245-1252.
- Bourges I, Ramus C, Mousson de Camaret B, Beugnot R, Remacle C, Cardol P, Hofhaus G & Issartel JP (2004). Structural organization of mitochondrial human complex I: role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin. *Biochem J* **383**, 491-499.
- Bradbury NA (1999). Intracellular CFTR: localization and function. *Physiol Rev* **79**, S175-191.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brandt U (2006). Energy Converting NADH:Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annu Rev Biochem*.
- Brennan P & O'Neill LA (1995). Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor kappa B activation in three different cell lines: evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals. *Biochim Biophys Acta* **1260**, 167-175.
- Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, Roden M, Gnaiger E, Nohl H, Waldhausl W & Fornsinn C (2004). Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes* **53**, 1052-1059.

- Bubien JK (2001). CFTR may play a role in regulated secretion by lymphocytes: a new hypothesis for the pathophysiology of cystic fibrosis. *Pflugers Arch* **443 Suppl 1**, S36-39.
- Cafferata EG, Gonzalez-Guerrico AM, Giordano L, Pivetta OH & Santa-Coloma TA (2000). Interleukin-1beta regulates CFTR expression in human intestinal T84 cells. *Biochim Biophys Acta* **1500**, 241-248.
- Cafferata EG, Gonzalez-Guerrico AM, Pivetta OH & Santa-Coloma TA (1996). Identification by differential display of a mRNA specifically induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in T84 human colon carcinoma cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **42**, 797-804.
- Cafferata EG, Guerrico AM, Pivetta OH & Santa-Coloma TA (2001 May). NF-kappaB activation is involved in regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by interleukin-1beta. *J Biol Chem* **276**, 15441-15444.
- Cantin A (1995). Cystic fibrosis lung inflammation: early, sustained, and severe. *Am J Respir Crit Care Med* **151**, 939-941.
- Cardol P, Matagne RF & Remacle C (2002). Impact of mutations affecting ND mitochondria-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in *Chlamydomonas*. Implication for the structural organization of the enzyme. *J Mol Biol* **319**, 1211-1221.
- Cleeter MW, Cooper JM & Schapira AH (1992). Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J Neurochem* **58**, 786-789.
- Collins FS (1992). Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* **256**, 774-779.
- Conn KJ, Ullman MD, Eisenhauer PB, Fine RE & Wells JM (Lett 2001 Jun 29). Decreased expression of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) subunit 4 in 1-methyl-4-phenylpyridinium -treated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci* **306**, 145-148.
- Costes B, Fanen P, Goossens M & Ghanem N (1993). A rapid, efficient, and sensitive assay for simultaneous detection of multiple cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat* **2**, 185-191.
- Chang XB, Hou YX, Jensen TJ & Riordan JR (1994). Mapping of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane topology by glycosylation site insertion. *J Biol Chem* **269**, 18572-18575.
- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR & Smith AE (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* **63**, 827-834.

- Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ & Smith AE (1991). Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* **66**, 1027-1036.
- Chinet TC, Fullton JM, Yankaskas JR, Boucher RC & Stutts MJ (1994). Mechanism of sodium hyperabsorption in cultured cystic fibrosis nasal epithelium: a patch-clamp study. *Am J Physiol* **266**, C1061-1068.
- Chomyn A (2001). Mitochondrial genetic control of assembly and function of complex I in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr* **33**, 251-257.
- Chomyn A, Cleeter MW, Ragan CI, Riley M, Doolittle RF & Attardi G (1986). URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science* **234**, 614-618.
- Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MW, Ragan CI, Matsuno-Yagi A, Hatefi Y, Doolittle RF & Attardi G (1985). Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature* **314**, 592-597.
- Dahan D, Evagelidis A, Hanrahan JW, Hinkson DA, Jia Y, Luo J & Zhu T (2001). Regulation of the CFTR channel by phosphorylation. *Pflugers Arch* **443 Suppl 1**, S92-96.
- Davidson AGF MM (1995). Airway clearance techniques in cystic fibrosis. *New Insights Cystic Fibrosis* **3**, 6-11.
- Davis P (1999). Clinical Pathophysiology and Manifestations of Lung Disease. In *Cystic Fibrosis in Adults*. ed. Knowles Jyam, pp. 45-67. Lippincott- Raven, Philadelphia.
- de Meer K, Gulmans VA & van Der Laag J (1999). Peripheral muscle weakness and exercise capacity in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **159**, 748-754.
- de Meer K, Jeneson JA, Gulmans VA, van der Laag J & Berger R (1995). Efficiency of oxidative work performance of skeletal muscle in patients with cystic fibrosis. *Thorax* **50**, 980-983.
- de Weille JR & Lazdunski M (1990). ATP-sensitive K⁺ channels reveal the effects of intracellular chloride variations on cytoplasmic ATP concentrations and mitochondrial function. *Biochem Biophys Res Commun* **168**, 1137-1142.
- Dehecchi MC, Girella E, Cabrini G & Berton G (1988). The Km of NADH dehydrogenase is decreased in mitochondria of cystic fibrosis cells. *Enzyme* **40**, 45-50.
- Degli Esposti M, Carelli V, Ghelli A, Ratta M, Crimi M, Sangiorgi S, Montagna P, Lenaz G, Lugaresi E & Cortelli P (1994). Functional alterations of the

- mitochondrially encoded ND4 subunit associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *FEBS Lett* **352**, 375-379.
- Diamond G, Scanlin TF, Zasloff MA & Bevins CL (1991). A cross-species analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Potential functional domains and regulatory sites. *J Biol Chem* **266**, 22761-22769.
- DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S & Prince A (1998). Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* **101**, 2598-2605.
- DiMango E, Zar HJ, Bryan R & Prince A (1995). Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* **96**, 2204-2210.
- DiMauro S (1999). Exercise intolerance and the mitochondrial respiratory chain. *Ital J Neurol Sci* **20**, 387-393.
- Eggermont E (1996). Gastrointestinal manifestations in cystic fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **8**, 731-738.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K & Tuschl T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- Engbersen R, Masereeuw R, van Gestel MA, van der Logt EM, Smits P & Russel FG (2005). Glibenclamide depletes ATP in renal proximal tubular cells by interfering with mitochondrial metabolism. *Br J Pharmacol* **145**, 1069-1075.
- Estell K, Braunstein G, Tucker T, Varga K, Collawn JF & Schwiebert LM (2003). Plasma membrane CFTR regulates RANTES expression via its C-terminal PDZ-interacting motif. *Mol Cell Biol* **23**, 594-606.
- Feigal RJ & Shapiro BL (1979). Mitochondrial calcium uptake and oxygen consumption in cystic fibrosis. *Nature* **278**, 276-277.
- Feigal RJ, Tomczyk MS & Shapiro BL (1982). The calcium abnormality in cystic fibrosis mitochondria: relative role of respiration and ATP hydrolysis. *Life Sci* **30**, 93-98.
- Filosto M, Tonin P, Vattemi G, Savio C, Rizzuto N & Tomelleri G (2003). Transcription factors c-Jun/activator protein-1 and nuclear factor-kappa B in oxidative stress response in mitochondrial diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* **29**, 52-59.
- Filosto M, Tonin P, Vattemi G, Spagnolo M, Rizzuto N & Tomelleri G (2002). Antioxidant agents have a different expression pattern in muscle fibers of patients with mitochondrial diseases. *Acta Neuropathol* **103**, 215-220.

- Fischer H & Machen TE (1996). The tyrosine kinase p60c-src regulates the fast gate of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Biophys J* **71**, 3073-3082.
- Gabriel SE, Clarke LL, Boucher RC & Stutts MJ (1993). CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* **363**, 263-268.
- Galkin A, Drose S & Brandt U (2006). The proton pumping stoichiometry of purified mitochondrial complex I reconstituted into proteoliposomes. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1575-1581.
- Galkin AS, Grivennikova VG & Vinogradov AD (1999). $\text{H}^+/\text{2e}^-$ stoichiometry in NADH-quinone reductase reactions catalyzed by bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett* **451**, 157-161.
- Gao L, Kim KJ, Yankaskas JR & Forman HJ (1999). Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Physiol* **277**, L113-118.
- Gattermann N, Dadak M, Hofhaus G, Wulfert M, Berneburg M, Loeffler ML & Simmonds HA (2004). Severe impairment of nucleotide synthesis through inhibition of mitochondrial respiration. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **23**, 1275-1279.
- Gilligan PH (1991). Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **4**, 35-51.
- Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M & Wilson JM (1997). Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* **88**, 553-560.
- González-Guerrico A (2001). Expresión de genes asociados a Fibrosis Quística. In *Fundación Instituto Federico Leloir*. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Gonzalez-Guerrico AM, Cafferata EG, Radrizzani M, Marcucci F, Gruenert D, Pivetta OH, Favaloro RR, Laguens R, Perrone SV, Gallo GC & Santa-Coloma TA (2002). Tyrosine kinase c-Src constitutes a bridge between cystic fibrosis transmembrane regulator channel failure and MUC1 overexpression in cystic fibrosis. *J Biol Chem* **277**, 17239-17247.
- Grebe TA, Doane WW, Richter SF, Clericuzio C, Norman RA, Seltzer WK, Rhodes SN, Goldberg BE, Hernried LS, McClure M & et al. (1992). Mutation analysis of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in Native American populations of the southwest. *Am J Hum Genet* **51**, 736-740.
- Gregg RG, Wilfond BS, Farrell PM, Laxova A, Hassemer D & Mischler EH (1993). Application of DNA analysis in a population-screening program for neonatal diagnosis of cystic fibrosis (CF): comparison of screening protocols. *Am J Hum Genet* **52**, 616-626.

- Guggino WB (1999). Cystic fibrosis and the salt controversy. *Cell* **96**, 607-610.
- Guggino WB & Stanton BA (2006). New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 426-436.
- Hall RA, Ostedgaard LS, Premont RT, Blitzler JT, Rahman N, Welsh MJ & Lefkowitz RJ (1998). A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8496-8501.
- Halliwell B (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* **91**, 14S-22S.
- Hamosh A, Fitz-Simmons SC, Macek M, Jr., Knowles MR, Rosenstein BJ & Cutting GR (1998). Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J Pediatr* **132**, 255-259.
- Hamosh A, Rosenstein BJ & Cutting GR (1992). CFTR nonsense mutations G542X and W1282X associated with severe reduction of CFTR mRNA in nasal epithelial cells. *Hum Mol Genet* **1**, 542-544.
- Hannon GJ (2002). RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.
- Hare JF & Hodges R (1982). Turnover of mitochondrial inner membrane proteins in hepatoma monolayer cultures. *J Biol Chem* **257**, 3575-3580.
- Hayashi J, Ohta S, Kagawa Y, Kondo H, Kaneda H, Yonekawa H, Takai D & Miyabayashi S (1994). Nuclear but not mitochondrial genome involvement in human age-related mitochondrial dysfunction. Functional integrity of mitochondrial DNA from aged subjects. *J Biol Chem* **269**, 6878-6883.
- Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Boat TE, Spock A, Gorvov JD, Quittel L, Friedman KJ, Silverman LM & et al. (1994). A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *N Engl J Med* **331**, 974-980.
- Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Strong TV, Smith T, Friedman KJ, Silverman LM, Boucher RC, Collins FS & Knowles MR (1997). Identification of a splice site mutation (2789 +5 G > A) associated with small amounts of normal CFTR mRNA and mild cystic fibrosis. *Hum Mutat* **9**, 332-338.
- Hiscott J, Lin R, Nakhaei P & Paz S (2006). MasterCARD: a priceless link to innate immunity. *Trends Mol Med* **12**, 53-56.
- Hofhaus G & Attardi G (1993). Lack of assembly of mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase and loss of enzyme activity in a human cell mutant lacking the mitochondrial ND4 gene product. *Embo J* **12**, 3043-3048.

- Hryciw DH & Guggino WB (2000 Nov). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the outwardly rectifying chloride channel: a relationship between two chloride channels expressed in epithelial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**, 892-895.
- Hubbard RC, McElvaney NG, Birrer P, Shak S, Robinson WW, Jolley C, Wu M, Chernick MS & Crystal RG (1992). A preliminary study of aerosolized recombinant human deoxyribonuclease I in the treatment of cystic fibrosis. *N Engl J Med* **326**, 812-815.
- Hwang TC & Sheppard DN (1999). Molecular pharmacology of the CFTR Cl⁻ channel. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 448-453.
- Imundo L, Barasch J, Prince A & Al-Awqati Q (1995). Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3019-3023.
- Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP & Smeitink JA (2006). Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* **29**, 499-515.
- Jewes LA & Spencer RC (1990). The incidence of anaerobes in the sputum of patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* **31**, 271-274.
- Jia Y, Mathews CJ & Hanrahan JW (1997). Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J Biol Chem* **272**, 4978-4984.
- Jiang Q, Mak D, Devidas S, Schwiebert EM, Bragin A, Zhang Y, Skach WR, Guggino WB, Foskett JK & Engelhardt JF (1998). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP release is controlled by a chloride sensor. *J Cell Biol* **143**, 645-657.
- Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ & Riches DW (1995). Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **151**, 1075-1082.
- Kilbourn JP (1978). Bacterial content and ionic composition of sputum in cystic fibrosis. *Lancet* **1**, 334.
- Kim JA, Kang YS, Lee SH, Lee EH, Yoo BH & Lee YS (1999). Glibenclamide induces apoptosis through inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl⁻ channels and intracellular Ca²⁺ release in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **261**, 682-688.
- Kim KC, Nassiri J & Brody JS (1989). Mechanisms of airway goblet cell mucin release: studies with cultured tracheal surface epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1**, 137-143.

- Kirk KL (2000). New paradigms of CFTR chloride channel regulation. *Cell Mol Life Sci* **57**, 623-634.
- Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fischer N, Gatzky JT & Boucher RC (1983). Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* **221**, 1067-1070.
- Koch C & Hoiby N (1993). Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* **341**, 1065-1069.
- Kogan I, Ramjeesingh M, Li C, Kidd JF, Wang Y, Leslie EM, Cole SP & Bear CE (2003). CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *Embo J* **22**, 1981-1989.
- Konstan MW (1998). Therapies aimed at airway inflammation in cystic fibrosis. *Clin Chest Med* **19**, 505-513, vi.
- Konstan MW & Berger M (1997). Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol* **24**, 137-142; discussion 159-161.
- Konstan MW, Hilliard KA, Norvell TM & Berger M (1994). Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* **150**, 448-454.
- Krauss RD, Berta G, Rado TA & Bubien JK (1992). Antisense oligonucleotides to CFTR confer a cystic fibrosis phenotype on B lymphocytes. *Am J Physiol* **263**, C1147-1151.
- LeBel CP, Ischiropoulos H & Bondy SC (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* **5**, 227-231.
- Lee MG, Choi JY, Luo X, Strickland E, Thomas PJ & Muallem S (1999). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in mouse submandibular and pancreatic ducts. *J Biol Chem* **274**, 14670-14677.
- Lei DC, Kunzelmann K, Koslowsky T, Yezzi MJ, Escobar LC, Xu Z, Ellison AR, Rommens JM, Tsui LC, Tykocinski M & Gruenert DC (1996). Episomal expression of wild-type CFTR corrects cAMP-dependent chloride transport in respiratory epithelial cells. *Gene Ther* **3**, 427-436.
- Leigh M (1999). Airways Secretions. In *Cystic Fibrosis in Adults*. ed. In Knowlws Jyam. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Li C, Ramjeesingh M, Reyes E, Jensen T, Chang X, Rommens JM & Bear CE (1993). The cystic fibrosis mutation (delta F508) does not influence the chloride channel activity of CFTR. *Nat Genet* **3**, 311-316.

- Li H, Cai Z, Chen JH, Ju M, Xu Z & Sheppard DN (2007). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl(-) channel: a versatile engine for transepithelial ion transport. *Sheng Li Xue Bao* **59**, 416-430.
- Liang P & Pardee AB (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-971.
- Linsdell P & Hanrahan JW (1998). Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol* **275**, C323-326.
- Littlewood JM, Smye SW & Cunliffe H (1993). Aerosol antibiotic treatment in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* **68**, 788-792.
- Lojda Z, Gossrau, R., and Schiebler, T. H. (1979). in *Enzyme Histochemistry, a Laboratory Manual*. 256-266.
- Lowry OH, Rosebroug, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem* **193**, 265- 275.
- Lukacs GL, Nanda A, Rotstein OD & Grinstein S (1991). The chloride channel blocker 5-nitro-2-(3-phenylpropyl-amino) benzoic acid (NPPB) uncouples mitochondria and increases the proton permeability of the plasma membrane in phagocytic cells. *FEBS Lett* **288**, 17-20.
- Luo X, Pitkanen S, Kassovska-Bratinova S, Robinson BH & Lehotay DC (1997). Excessive formation of hydroxyl radicals and aldehydic lipid peroxidation products in cultured skin fibroblasts from patients with complex I deficiency. *J Clin Invest* **99**, 2877-2882.
- Lyczak JB, Zaidi TS, Grout M, Bittner M, Contreras I & Pier GB (2001). Epithelial cell contact-induced alterations in Salmonella enterica serovar Typhi lipopolysaccharide are critical for bacterial internalization. *Cell Microbiol* **3**, 763-772.
- Ma T, Thiagarajah JR, Yang H, Sonawane ND, Folli C, Galietta LJ & Verkman AS (2002). Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J Clin Invest* **110**, 1651-1658.
- Macri C PO, Gentile A, Cafferata EGA, Luna MC. (1996). *"Cystic Fibrosis in Latinamerica"* Chapter 9. Birkhauser Verlag., Basel, Boston, Berlin.
- Majander A, Huoponen K, Savontaus ML, Nikoskelainen E & Wikstrom M (1991). Electron transfer properties of NADH:ubiquinone reductase in the ND1/3460 and the ND4/11778 mutations of the Leber hereditary optic neuroretinopathy (LHON). *FEBS Lett* **292**, 289-292.
- Marcucci F (2003). Identificación de genes regulados por CFTR, canal de cloruro afectado en fibrosis quística. In *Departamento de Química Biológica-FCEyN*, pp. 1-81. Universidad Nacional de Buenos Aires, Capital Federal.

- Marella M, Seo BB, Nakamaru-Ogiso E, Greenamyre JT, Matsuno-Yagi A & Yagi T (2008). Protection by the NDI1 gene against neurodegeneration in a rotenone rat model of Parkinson's disease. *PLoS ONE* **3**, e1433.
- Mateu E, Calafell F, Ramos MD, Casals T & Bertranpetit J (2002). Can a place of origin of the main cystic fibrosis mutations be identified? *Am J Hum Genet* **70**, 257-264.
- McNicholas CM, Nason MW, Jr., Guggino WB, Schwiebert EM, Hebert SC, Giebisch G & Egan ME (1997). A functional CFTR-NBF1 is required for ROMK2-CFTR interaction. *Am J Physiol* **273**, F843-848.
- McWhirter SM, Tenoever BR & Maniatis T (2005). Connecting mitochondria and innate immunity. *Cell* **122**, 645-647.
- Miller FJ, Rosenfeldt FL, Zhang C, Linnane AW & Nagley P (2003). Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Res* **31**, e61.
- Moss RB, Hsu YP & Olds L (2000). Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes. *Clin Exp Immunol* **120**, 518-525.
- Moyer BD, Denton J, Karlson KH, Reynolds D, Wang S, Mickle JE, Milewski M, Cutting GR, Guggino WB, Li M & Stanton BA (1999). A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J Clin Invest* **104**, 1353-1361.
- Naren AP, Quick MW, Collawn JF, Nelson DJ & Kirk KL (1998). Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10972-10977.
- Nohl H, de Silva D & Summer KH (1989). 2,3,7,8, tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces oxygen activation associated with cell respiration. *Free Radic Biol Med* **6**, 369-374.
- Noone PG & Knowles MR (2001). 'CFTR-opathies': disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. *Respir Res* **2**, 328-332.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T & Hayashi K (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**, 874-879.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S & Zhivotovsky B (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**, 913-922.
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ & Conklin DS (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* **16**, 948-958.

- Pedersen SS, Jensen T, Hoiby N, Koch C & Flensburg EW (1987). Management of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in Danish cystic fibrosis patients. *Acta Paediatr Scand* **76**, 955-961.
- Perez A, Issler AC, Cotton CU, Kelley TJ, Verkman AS & Davis PB (2007). CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**, L383-395.
- Perier C, Tieu K, Guegan C, Caspersen C, Jackson-Lewis V, Carelli V, Martinuzzi A, Hirano M, Przedborski S & Vila M (2005). Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 19126-19131.
- Peters KW, Qi J, Watkins SC & Frizzell RA (1999). Syntaxin 1A inhibits regulated CFTR trafficking in xenopus oocytes. *Am J Physiol* **277**, C174-180.
- Pier GB (2000). Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8822-8828.
- Pitkanen S & Robinson BH (1996). Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest* **98**, 345-351.
- Potter JL, Matthews LW, Spector S & Lemm J (1967). Studies on pulmonary secretions. II. Osmolality and the ionic environment of pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis, and laryngectomy. *Am Rev Respir Dis* **96**, 83-87.
- Powers CA, Potter EM, Wessel HU & Lloyd-Still JD (1996). Cystic fibrosis in Asian Indians. *Arch Pediatr Adolesc Med* **150**, 554-555.
- Prat AG, Reisin IL, Ausiello DA & Cantiello HF (1996). Cellular ATP release by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol* **270**, C538-545.
- Quinton PM (1983). Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* **301**, 421-422.
- Rabe A, Disser J & Fromter E (1995). Cl⁻ channel inhibition by glibenclamide is not specific for the CFTR-type Cl⁻ channel. *Pflugers Arch* **429**, 659-662.
- Radrizzani M, Vila-Ortiz G, Cafferata EG, Di Tella MC, Gonzalez-Guerrico A, Perandones C, Pivetta OH, Carminatti H, Idoyaga Vargas VP & Santa-Coloma TA (2001). Differential expression of CPD1 during postnatal development in the mouse cerebellum. *Brain Res* **907**, 162-174.
- Raghuram V, Hormuth H & Foskett JK (2003). A kinase-regulated mechanism controls CFTR channel gating by disrupting bivalent PDZ domain interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9620-9625.

- Raghuram V, Mak DD & Foskett JK (2001). Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1300-1305.
- Rahman I & MacNee W (1998). Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* **53**, 601-612.
- Ramsey BW, Astley SJ, Aitken ML, Burke W, Colin AA, Dorkin HL, Eisenberg JD, Gibson RL, Harwood IR, Schidlow DV & et al. (1993). Efficacy and safety of short-term administration of aerosolized recombinant human deoxyribonuclease in patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* **148**, 145-151.
- Ranganathan R & Ross EM (1997). PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Curr Biol* **7**, R770-773.
- Ranieri E, Lewis BD, Gerace RL, Ryall RG, Morris CP, Nelson PV, Carey WF & Robertson EF (1994). Neonatal screening for cystic fibrosis using immunoreactive trypsinogen and direct gene analysis: four years' experience. *Bmj* **308**, 1469-1472.
- Reisin IL, Prat AG, Abraham EH, Amara JF, Gregory RJ, Ausiello DA & Cantiello HF (1994). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem* **269**, 20584-20591.
- Riordan JR (1999). Cystic fibrosis as a disease of misprocessing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator glycoprotein. *Am J Hum Genet* **64**, 1499-1504.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL & et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073.
- Robinson BH (1998). Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim Biophys Acta* **1364**, 271-286.
- Rochelle LG, Fischer BM & Adler KB (1998). Concurrent production of reactive oxygen and nitrogen species by airway epithelial cells in vitro. *Free Radic Biol Med* **24**, 863-868.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N & et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**, 1059-1065.
- Rosenstein BJ & Eigen H (1991). Risks of alternate-day prednisone in patients with cystic fibrosis. *Pediatrics* **87**, 245-246.

- Rottner M, Kunzelmann C, Mergey M, Freyssinet JM & Martinez MC (2007). Exaggerated apoptosis and NF-kappaB activation in pancreatic and tracheal cystic fibrosis cells. *Faseb J* **21**, 2939-2948.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM & Munnich A (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* **228**, 35-51.
- Sambrook J FE, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual*, vol. 1, New York.
- Sandhu GS, Precup JW & Kline BC (1989). Rapid one-step characterization of recombinant vectors by direct analysis of transformed Escherichia coli colonies. *Biotechniques* **7**, 689-690.
- Schägger H vJG (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**, 223-231.
- Schagger H & von Jagow G (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**, 223-231.
- Schreiber R, Nitschke R, Greger R & Kunzelmann K (1999). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells. *J Biol Chem* **274**, 11811-11816.
- Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ & Guggino WB (1999a). CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev* **79**, S145-166.
- Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR & Guggino WB (1995). CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* **81**, 1063-1073.
- Schwiebert LM, Estell K & Propst SM (1999b). Chemokine expression in CF epithelia: implications for the role of CFTR in RANTES expression. *Am J Physiol* **276**, C700-710.
- Seo BB, Kitajima-Ihara T, Chan EK, Scheffler IE, Matsuno-Yagi A & Yagi T (1998). Molecular remedy of complex I defects: rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria restores the NADH oxidase activity of complex I-deficient mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9167-9171.
- Shak S (1995). Aerosolized recombinant human DNase I for the treatment of cystic fibrosis. *Chest* **107**, 65S-70S.
- Shapiro BL (1988). Mitochondrial dysfunction, energy expenditure, and cystic fibrosis. *Lancet* **2**, 289.

- Shapiro BL (1989). Evidence for a mitochondrial lesion in cystic fibrosis. *Life Sci* **44**, 1327-1334.
- Shapiro BL, Feigal RJ & Lam LF (1979). Mitochondrial NADH dehydrogenase in cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 2979-2983.
- Shapiro BL, Lam LF & Feigal RJ (1982). Mitochondrial NADH dehydrogenase in cystic fibrosis: enzyme kinetics in cultured fibroblasts. *Am J Hum Genet* **34**, 846-852.
- Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE & Welsh MJ (1993). Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature* **362**, 160-164.
- Sheppard DN & Welsh MJ (1992). Effect of ATP-sensitive K⁺ channel regulators on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride currents. *J Gen Physiol* **100**, 573-591.
- Sheppard DN & Welsh MJ (1999). Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* **79**, S23-45.
- Smith AL, Redding G, Doershuk C, Goldmann D, Gore E, Hilman B, Marks M, Moss R, Ramsey B, Rubio T & et al. (1988). Sputum changes associated with therapy for endobronchial exacerbation in cystic fibrosis. *J Pediatr* **112**, 547-554.
- Smith JA & Weidemann MJ (1993). Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods* **162**, 261-268.
- Steagall WK, Elmer HL, Brady KG & Kelley TJ (2000). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent regulation of epithelial inducible nitric oxide synthase expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**, 45-50.
- Stern M, Munkonge FM, Caplen NJ, Sorgi F, Huang L, Geddes DM & Alton EW (1995). Quantitative fluorescence measurements of chloride secretion in native airway epithelium from CF and non-CF subjects. *Gene Ther* **2**, 766-774.
- Strong TV, Smit LS, Turpin SV, Cole JL, Hon CT, Markiewicz D, Petty TL, Craig MW, Rosenow EC, Tsui LC & et al. (1991). Cystic fibrosis gene mutation in two sisters with mild disease and normal sweat electrolyte levels. *N Engl J Med* **325**, 1630-1634.
- Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC & Boucher RC (1995). CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* **269**, 847-850.
- Sumegi B & Srere PA (1984). Complex I binds several mitochondrial NAD-coupled dehydrogenases. *J Biol Chem* **259**, 15040-15045.
- Tondelier D, Brouillard F, Lipecka J, Labarthe R, Bali M, Costa de Beauregard MA, Torossi T, Cougnon M, Edelman A & Baudouin-Legros M (1999). Aspirin and

- some other nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein gene expression in T-84 cells. *Mediators Inflamm* **8**, 219-227.
- Toso C, Williams DM & Noone PG (1996). Inhaled antibiotics in cystic fibrosis: a review. *Ann Pharmacother* **30**, 840-850.
- Travis SM, Berger HA & Welsh MJ (1997). Protein phosphatase 2C dephosphorylates and inactivates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11055-11060.
- Tsui LC (1992). The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends Genet* **8**, 392-398.
- Valdivieso AG, Marcucci F, Taminelli G, Guerrico AG, Alvarez S, Teiber ML, Dankert MA & Santa-Coloma TA (2007). The expression of the mitochondrial gene MT-ND4 is downregulated in cystic fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* **356**, 805-809.
- van Klaveren RJ, Roelant C, Boogaerts M, Demedts M & Nemery B (1997). Involvement of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in superoxide anion and hydrogen peroxide generation by rat type II cells. *Thorax* **52**, 465-471.
- Velsor LW, Kariya C, Kachadourian R & Day BJ (2006). Mitochondrial oxidative stress in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**, 579-586.
- Velsor LW, van Heeckeren A & Day BJ (2001). Antioxidant imbalance in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L31-38.
- Verkman AS (1990). Development and biological applications of chloride-sensitive fluorescent indicators. *Am J Physiol* **259**, C375-388.
- Vinogradov AD (2001). Respiratory complex I: structure, redox components, and possible mechanisms of energy transduction. *Biochemistry (Mosc)* **66**, 1086-1097.
- Vogel RO, Smeitink JA & Nijtmans LG (2007). Human mitochondrial complex I assembly: a dynamic and versatile process. *Biochim Biophys Acta* **1767**, 1215-1227.
- von Ruecker AA, Bertele R & Harms HK (1984). Calcium metabolism and cystic fibrosis: mitochondrial abnormalities suggest a modification of the mitochondrial membrane. *Pediatr Res* **18**, 594-599.
- Wang S, Yue H, Derin RB, Guggino WB & Li M (2000). Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* **103**, 169-179.

- Wang XF, Reddy MM & Quinton PM (2004). Effects of a new cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibitor on Cl⁻ conductance in human sweat ducts. *Exp Physiol* **89**, 417-425.
- Welsh MJ & Smith AE (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* **73**, 1251-1254.
- Welsh MJ & Smith AE (1995). Cystic fibrosis. *Sci Am* **273**, 52-59.
- Yadava N, Houchens T, Potluri P & Scheffler IE (2004). Development and characterization of a conditional mitochondrial complex I assembly system. *J Biol Chem* **279**, 12406-12413.
- Zeitlin PL, Lu L, Rhim J, Cutting G, Stetten G, Kieffer KA, Craig R & Guggino WB (1991). A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* **4**, 313-319.
- Zerbetto E, Vergani L & Dabbeni-Sala F (1997). Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **18**, 2059-2064.
- Zhu T, Dahan D, Evagelidis A, Zheng S, Luo J & Hanrahan JW (1999). Association of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and protein phosphatase 2C. *J Biol Chem* **274**, 29102-29107.
- Zielenski J (2000). Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* **67**, 117-133.
- Zielenski J, Markiewicz D, Lin SP, Huang FY, Yang-Feng TL & Tsui LC (1995). Skipping of exon 12 as a consequence of a point mutation (1898 + 5G-->T) in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene found in a consanguineous Chinese family. *Clin Genet* **47**, 125-132.