

ESTUDI DELS MECANISMES MOLECULARS SUBJACENTS EN
MUTACIONS *CFTR* QUE AFECTEN L'EFICIÈNCIA DE L'*SPLICING*.
DESENVOLUPAMENT DE TÈCNiques COMPLEMENTÀRIES PER
A LA CARACTERITZACIÓ A NIVELL DE DNA, RNA I PROTEÏNA EN
CÈL·LULES EPITELIALS



**Estudi dels mecanismes moleculars subjacents en mutacions *CFTR* que afecten
l'eficiència de l'*splicing*.
Desenvolupament de tècniques complementàries per a la caracterització a nivell de DNA,
RNA i proteïna en cèl·lules epitelials.**

Memòria presentada per
Laia Masvidal Sanz

per optar al grau de Doctor en Biologia
per la Universitat Autònoma de Barcelona

Aquest treball s'ha realitzat sota la direcció de la **Dra Teresa Casals Senent** al
Laboratori de Genètica Molecular de l'Institut de Recerca Biomèdica de Bellvitge
(IDIBELL)

Tesi adscrita al Departament de Genètica i Microbiologia de la Facultat de Ciències de
la Universitat Autònoma de Barcelona (Bienni 2008-2010)
Tutora: Antonia Velázquez Henar

Directora de Tesis

Tutora de Tesis

Doctoranda

Dra Teresa Casals
Senent

Dra Antonia Velázquez
Henar

Laia Masvidal
Sanz

Als meus pares

“Defensa el teu dret a pensar, perquè fins i tot pensar de forma errònia
és millor que no fer-ho”

Hipàtia D'Alexandria (Filòsofa, matemàtica i astrònoma. Segle IV)

ÍNDIX DE CONTINGUTS

ABREVIACIONS I ACRÒNIMS.....	17
------------------------------	----

INTRODUCCIÓ	21
--------------------	-----------

1.- FIBROSI QUÍSTICA	23
1.1 Introducció.....	23
1.2 Breu història	23
1.3 Manifestacions clíniques i fisiopatologia	24
1.3.1 El sistema respiratori	24
1.3.2 El sistema gastrointestinal	28
1.3.3 Desordres endocrins	28
1.3.4 L'aparell reproductor.....	29
1.3.5 Les glàndules sudorípares.....	29
1.4 Diagnòstic	30
2.- CFTR: DEL GEN A LA PROTEÏNA.....	34
2.1 El gen i el transcrit <i>CFTR</i>	34
2.2 La proteïna CFTR	35
2.2.1 Biogènesi de la proteïna	35
2.2.2 Estructura i funció electrofisiològica del canal	36
2.2.3 Alteracions en la biogènesi i l'activitat del canal CFTR per mutacions <i>CFTR</i> : relació genotip - fenotip	39
3.- TERÀPIES	42
3.1 Tractament simptomàtic.....	42
3.2 Teràpies específiques per CFTR	43
4.- EL PROCÉS D' <i>SPLICING</i>	45
4.1 L' <i>splicing</i> alternatiu (AS)	45
4.2 La regulació del procés d' <i>splicing</i>	48
4.3 <i>Splicing</i> i malaltia	49

OBJECTIUS	53
------------------	-----------

MATERIAL I MÈTODES	57
---------------------------	-----------

1.- TIPUS CEL·LULARS.....	59
1.2 Eiteli nasal.....	59
1.2 Pòlip nasal.....	61
1.3 Línies cel·lulars.....	61
1.4 Sang	64

2.- PACIENTS I CONTROLS	64
3.- NOMENCLATURA	64
4.- ESTUDI DE MUTACIONS <i>MISSENSE</i> , <i>NONSENSE</i> I <i>D'SPLICING</i>	65
4.1 Anàlisi de les seqüències d' <i>splicing</i>	65
4.2 Anàlisi de la seqüència proteica	65
5.- <i>CFTR</i> : ANÀLISI MUTACIONAL	66
5.1 Extracció de DNA	66
5.2 Quantificació d'àcids nucleics	67
5.3 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	67
5.4 Electroforesi	68
5.4.1 Gels d'agarosa	68
5.4.2 Gels de poliacrilamida.....	69
5.5 Cribatge del gen.....	70
5.5.1 SSCP/HD	70
5.5.2 DGGE.....	73
5.6 Seqüenciació.....	74
5.6.1 Purificació de productes de PCR	74
5.6.2 PCR de seqüenciació	75
5.6.3 Purificació de la PCR de seqüenciació	75
6. TREBALL AMB RNA	76
6.1 Manipulació de l'RNA	76
6.2 Extracció d'RNA	76
6.3 Caracterització de l'RNA	78
7.- <i>CFTR</i> : QUANTIFICACIÓ DE TRANSCRITS	78
7.1 Transcripció inversa (RT)	79
7.2 RT-qPCR	80
7.2.1 Gens de referència	80
7.2.2 Mutacions <i>CFTR</i>	80
7.2.3 Encebadors i sondes	81
7.2.4 RT-qPCR.....	82
7.3 Estudi de l'expressió	83
7.4 Avaluació dels gens de referència.....	83
7.5 Anàlisi estadística	85
8.- TÈCNiques HISTOLÒGIQUES	85
8.1 Tinció simple: tinció de Papanicolau.....	86
8.2 Tincions complexes.....	87

8.2.1 Immunohistoquímica.....	87
8.2.2 Immunofluorescència	88
9.- REACTIUS.....	89

RESULTATS	95
1.- ESTUDI DE MUTACIONS <i>MISSENSE</i> , <i>NONSENSE</i> I D' <i>SPLICING</i>	97
1.1 Anàlisi computacional de la seqüència.....	97
1.2 Anàlisi qualitativa de la seqüència.....	103
2.- <i>CFTR</i> : ANÀLISI MUTACIONAL	107
2.1 Cribatge del gen.....	107
2.2 Estudi del polimorfisme c.2562T>G (p.=)	109
3.- EPITELI NASAL.....	110
3.1 Caracterització de cèl·lules epitelials.....	110
3.2 Optimització dels protocols per a mostres d'epiteli nasal	111
3.2.1 Extracció i caracterització de l'RNA.....	111
3.2.2 Transcripció inversa de l'RNA.....	112
3.2.3 RT-qPCR.....	114
3.3 Caracterització de mostres	114
4.- <i>CFTR</i> : QUANTIFICACIÓ DE TRANSCRITS	115
4.1 Validació dels gens de referència.....	115
4.1.1 Interval d'expressió i eficiència	115
4.1.2 Validació en mostres de pacients i controls	116
4.2 Estudi de l'expressió de <i>CFTR</i>	119
4.2.1 c.580-1G>T.....	119
4.2.2 c.2657+5G>A	121
4.2.3 c.3718-1G>A	122
4.3 Estudi comparatiu de l'expressió de <i>CFTR</i> a les tres mutacions.....	123
5.- <i>CFTR</i> : IMMUNOLocalització DE LA PROTEÏNA.....	124
6.- PARÀMETRES CLÍNICS.....	126
DISCUSSIÓ	127
1.- PARÀMETRES RELLEVANTS EN L'ANÀLISI DE TRANSCRITS	129
2.- ESTUDI D'EXPRESSIÓ DE <i>CFTR</i>	132
CONCLUSIONS	141

REFERÈNCIES	145
1.- BIBLIOGRAFIA	147
2.- PÀGINES WEB	160
ANNEX	161
Annex 1.....	163
Nomenclatura de mutacions <i>CFTR</i>	163
Annex 2.....	165
MIQE checklist.....	165
ANNEX 3	169
Article:	169
“The p.Arg258Gly mutation in intracellular loop 2 of CFTR is associated with CFTR-related disorders”	169
Annex 4.....	175
Article:	175
“ <i>CFTR</i> rearrangements in Spanish cystic fibrosis patients: first new duplication (35kb) characterised in the Mediterranean countries”.....	175

ÍNDIX DE FIGURES

INTRODUCCIÓ

Figura 1.- Patofisiologia de la malaltia pulmonar en FQ.....	26
Figura 2.- Diagrama esquemàtic dels diferents graus d’hidratació de l’ASL	27
Figura 3.- La glàndula sudorípara i la secreció de la suor	30
Figura 4.- Algoritme per al diagnòstic de FQ en presentacions típiques de la malaltia	32
Figura 5.- Algoritme per al diagnòstic de FQ en presentacions atípiques de la malaltia i/o amb test de la suor negatiu o en el llindar	33
Figura 6.- Localització del gen <i>CFTR</i>	34
Figura 7.- Representació esquemàtica dels dominis que constitueixen <i>CFTR</i>	37
Figura 8.- Estructura de la proteïna <i>CFTR</i>	38
Figura 9.- Funcionament del canal <i>CFTR</i>	39
Figura 10.- Classes de mutacions a <i>CFTR</i>	41
Figura 11.- Elements que determinen el fenotip de la FQ.....	42
Figura 12.- Patofisiologia i tractament de la malaltia pulmonar en FQ	43
Figura 13.- Diferents patrons d’ <i>splicing</i> incrementen la diversitat de l’mRNA	46
Figura 14.- Senyals que intervien en el procés d’ <i>splicing</i>	48

MATERIAL I MÈTODES

Figura 15.- Disseny dels assaigs <i>Taqman</i> [®] per a les tres mutacions en estudi	81
Figura 16.- Procés de normalització de dades del programa qBase ^{Plus}	84

RESULTATS

Figura 17.- Localització de les mutacions estudiades <i>in silico</i>	97
Figura 18.- Anàlisi <i>in silico</i> de mutacions (Splice Site Prediction By Neural Network)	100
Figura 19.- Anàlisi qualitativa de transcrits.....	104
Figura 20.- Anàlisi directa de la mutació c.580-1G>T	105
Figura 21.- Anàlisi qualitativa de la mutació c.2657+5G>A.....	106
Figura 22.- Anàlisi qualitativa de la mutació c.3718-1G>A	107
Figura 23.- Anàlisi mutacional del gen <i>CFTR</i>	108
Figura 24.- Tècniques de detecció de mutacions al gen <i>CFTR</i>	109
Figura 25.- Tincions simples i complexes de l'EN	110
Figura 26.- Extracció d'RNA: visualització dels resultats en gel d'agarosa	111
Figura 27.- Transcripció inversa: visualització de resultats en gels d'agarosa I	113
Figura 28.- Transcripció inversa: visualització de resultats en gels d'agarosa II	113
Figura 29.- Interval d'expressió dels gens de referència	115
Figura 30.- Estudi preliminar de l'expressió dels gens de referència	117
Figura 31.- Ampliació de l'estudi de l'expressió dels gens de referència	119
Figura 32.- Expressió relativa de <i>CFTR</i> per a la mutació c.580-1G>T	120
Figura 33.- Anàlisi de l'expressió de <i>CFTR</i> per a la mutació c.580-1G>T	120
Figura 34.- Expressió relativa de <i>CFTR</i> per a la mutació c.2657+5G>A.	121
Figura 35.- Anàlisi de l'expressió de <i>CFTR</i> per a la mutació c.2657+5G>A.....	122
Figura 36.- Expressió relativa de <i>CFTR</i> per a la mutació c.3718-1G>A	123
Figura 37.- Anàlisi de l'expressió de <i>CFTR</i> per a la mutació c.3718-1G>A.....	123
Figura 38.- Estudi comparatiu de l'expressió de <i>CFTR</i> en les mutacions c.580-1G>T, c.2657+5G>A i c.3718-1G>A	124
Figura 39.- Immunolocalització de <i>CFTR</i>	125

ÍNDIX DE TAULES

INTRODUCCIÓ

Taula 1.- Classificació dels trets clínics de la FQ segons l'edat d'aparició	25
--	----

MATERIAL I MÈTODES

Taula 2.- Encebadors d'amplificació de cDNA de <i>CFTR</i>	70
Taula 3.- Encebadors per a SSCP/HD	73
Taula 4.- Encebadors per a DGGE	74
Taula 5.- Gens de referència avaluats en aquest estudi.....	80
Taula 6.- Gen diana dels estudis d'expressió.....	80

RESULTATS

Taula 7.- Anàlisi <i>in silico</i> de les mutacions <i>missense</i> , <i>nonsense</i> i <i>splicing</i> (Alamut™)	101
Taula 8.- Anàlisi teòrica de mutacions a nivell proteic	103
Taula 9.- Dades de concentració i de ràtio 260/280	112
Taula 10.- RT-qPCR	114
Taula 11.- Interval i eficiència dels gens de referència	116
Taula 12.- Paràmetres clínics	126

ABREVIACIONS I ACRÒNIMS

3'ss: Lloc d'*splicing* 3' (3' *splice site*)

5'ss: Lloc d'*splicing* 5' (5' *splice site*)

16HBE14o: *Human Bronchial Epithelial Cell Line*

°C: Graus centígrads

A2b: Adenosina 2b

ABC: *ATP Binding Cassette*

ABCD: Agenèsia bilateral de conductes deferents

ABPA: Aspergil·losi al·lèrgica broncopulmonar (*allergic bronchopulmonary aspergillosis*)

ADO: Adenosina

AG: Aparell de Golgi

AMPc: Adenosina 3'-5' - Monofosfat cíclica

AS: *Splicing* alternatiu (*alternative splicing*)

ASL: Líquid de la superfície de les vies aèries (*airway surface liquid*)

ATP: Adenosina trifosfat

B2M: *Beta-2 microglobulin*

BP: *Branch Point*

BrEt: Bromur d'etidi

CaCCl: Canal de clorur activat per calci (*calcium activated chloride channel*)

cDNA: Àcid desoxiribonucleic complementari (*complementary deoxyribonucleic acid*)

CERES: *Composite Exonic Regulatory Elements of Splicing*

CFF: *Cystic Fibrosis Foundation*

CFMDB: *CF Mutation Database*

CFRD: Diabetis mellitus associada a fibrosi quística (*cystic fibrosis related diabetes*)

CFTR: *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

CFTR-RD: Fenotips associats a *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator related disorders*)

CGH: Hibridació genòmica comparada (*comparative genomic hybridization*)

Cl: Ió clorur

cm: Centímetres

CNRQ: *Calibrated Normalized Relative Quantities*

Cq: Cicle de quantificació

cSNP: Polimorfisme d'un sol nucleòtid codificant (*coding single-nucleotide polymorphism*)

csp: *Cantidad suficiente para*

CTLs: Controls

C.V.: Coeficient de variació

Da: Dalton

DGGE: Electroforesis en gel amb gradient desnaturalitzant (*denaturing gradient gel electrophoresis*)

DIOS: Síndrome d'obstrucció intestinal distal (*distal intestinal obstruction syndrome*)

DMEM: *Dubelcco's Modified Eagle's Medium*

DNA: Àcid desoxiribonucleic

DPX: *Disteryne, Plasticizer, Xylene*

EDTA: Àcid etilendiaminotetraacètic

EN: Epiteli nasal
ENaC: Canal epitelial de sodi (*e*pithe*l*ial *s*odium *c*hannel)
ERAD: Degradació associada al reticle endoplasmàtic (*e*ndoplasmic *r*eticulum *a*ssociated *d*egradation)
ERQC: Control de qualitat del reticle endoplasmàtic (*e*ndoplasmic *r*eticulum *q*uality *c*ontrol)
ESE: Elements potenciadors de l'*s*plicing als exons (*e*xonic *s*plicing *e*nhancers)
ESS: Elements repressors de l'*s*plicing als exons (*e*xonic *s*plicing *s*ilencers)
EtOH: Etanol
FASTA: *Fast-All*
FBS: Sèrum fetal boví (*f*etal *b*ovine *s*erum)
FCS: Solució de fibronectina (*f*ibronectin *c*oating *s*olution)
FQ: Fibrosi quística
GUSB: *Beta Glucoronidase*
h: Hores
HBS: *Hepes Buffered Saline*
HCO₃⁻: Ió bicarbonat
HEK293: *Human Embryonic Kidney Cell Line*
Hepes: Àcid N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfònic
HGVS: Human Genome Variation Society
HPOA: Osteoartritis hipertònica pulmonar (*h*ypertonic *p*ulmonar *o*steoarthritis)
HPRT1: *Hypoxanthine Fosforibosiltransferase I*
Hsp: *Heat Shock Protein*
ICM: Mesura de clorur intestinal (*i*ntestinal *c*hloride *m*easurement)
IF: Tinció immunofluorescent
IHQ: Tinció immunohistoquímica
IP: Insuficiència pancreàtica
IRT: Tripsina immunoreactiva (*i*mmunoreactive *t*ripsine)
ISE: Elements potenciadors de l'*s*plicing a introns (*i*ntronic *s*plicing *e*nhancers)
ISS: Elements repressors de l'*s*plicing a introns (*i*ntronic *s*plicing *s*ilencers)
Kb: Kilobases
KDa: Kilodaltons
L: Litres
MAD: Desviació absoluta de la mediana (*m*edian *a*bsolute *d*eviation)
MEM: *Minimal Essential Medium*
MIQE: *Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments*
ml: Mil·lilitres
MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*
mm: Mil·límetres
mM: Mil·limolar
mmol: Mil·limols
mRNA: Àcid ribonucleic missatger (*m*essenger *r*ibonucleic *a*cid)
MSD: Domini transmembrana (*m*embrane *s*panning *d*omain)
µg: Micrograms
µl: Microlitres
Na⁺: Ió sodi
NBD: Domini d'unió a nucleòtid (*n*ucleotide *b*inding *d*omain)
NF: Factor de normalització (*n*ormalization *f*actor)

ng: Nanograms
nm: Nanòmetres
NMD: *Nonsense Mediated Decay*
NPD: Diferència de potencial nasal (*nasal potential difference*)
NRQ: *Normalized Relative Quantity*
OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*
ORCC: *Outwardly Rectifying Chloride Channel*
PAGE: Electroforesi en gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*)
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PCL: Líquid periciliar (*periciliar liquid*)
PCR: Reacció en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
PKA: Proteïna quinasa dependent d'AMPc
PKC: Proteïna quinasa C
PLI: Pèrdua d'un lloc d'*splicing*
PMCA4: *Plasma Membrane Calcium ATPase*
PN: Pòlip nasal
PolyPhen: *Polymorphism Phenotyping*
PTC: Codó de terminació prematura (*premature termination codon*)
qPCR: PCR quantitativa (*quantitative real-time PCR*)
R: Domini regulador (*regulatory domain*)
RE: Reticle endoplasmàtic
RIN: *RNA Integrity Number*
RNA: Àcid ribonucleic
ROMK: *Inward Rectifier Potassium Channel*
rpm: Revolucions per minut
RQ: *Relative Quantity*
rRNA: Àcid ribonucleic ribosòmic
RT: Transcripció inversa (*reverse transcription*)
RT-qPCR: PCR quantitativa per a l'estudi de l'expressió de l'RNA (*reverse transcription quantitative real-time PCR*)
S.C.: Sense canvis
SF1: Factor d'*splicing* 1 (*splicing factor 1*)
SIFT: *Sorting Intolerant From Tolerant*
SNP: Polimorfisme d'un sol nucleòtid (*single-nucleotide polymorphism*)
snRNP: *Small Nuclear Ribonucleoproteins*
SR: *Serine Rich proteins*
SSCP/HD: Anàlisi de la conformació de la cadena senzilla / heteroduplex (*single strand conformation polymorphism / heteroduplex*)
T^a: Temperatura
TA: Temperatura ambient
TBE: Tris, borat i EDTA
TE: Tris i EDTA
U: Unitats
U2AF: Factor auxiliar U2 (*U2 auxiliary factor*)
v: Volts
wt: Al·lel salvatge (*wild-type*)

INTRODUCCIÓ

1.- FIBROSI QUÍSTICA

1.1 Introducció

La fibrosi quística (FQ; OMIM #219700) és la malaltia genètica recessiva letal més comú a la població caucàsica. Presenta una freqüència de portadors de 1/22-35 individus i una prevalença de 1/2.000-5.000 naixements dependent de l'origen geogràfic i ètnic de la població (Welsh MJ 2001). La infecció pulmonar crònica i la insuficiència pancreàtica (IP) són els trets principals que defineixen aquesta malaltia causada per mutacions al gen *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* [*CFTR* (ABCC7); OMIM #602421] (Kerem, Rommens et al. 1989; Riordan, Rommens et al. 1989; Rommens, Iannuzzi et al. 1989). En l'actualitat hi ha identificades més de 1.800 mutacions [CF Mutation Database (CFMDB); www.genet.sickkids.on.ca], però gairebé el 70% dels al·lels mutants tenen una deleció de tres parells de bases al codó 508, p.Phe508del (c.1521_1523delCTT).

1.2 Breu història

Escrits datats a la edat mitjana fan referència a nens amb pell salada com infants embuixats que morien molt aviat en la seva infantesa. Aquests escrits descriuen una de les característiques claus de la malaltia, l'alteració d'electròlits en la suor.

La FQ va ser definida per primera vegada com a entitat gnoseològica per la Dra. Dorothy H. Andersen l'any 1938 en el seu article "Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study" (Andersen 1938). Els símptomes observats per la Dra Andersen eren la presència de lesions pancreàtiques i la manca de secreció d'enzims, que donaven lloc a desnutrició i, en conseqüència, produïen una major vulnerabilitat a infeccions pulmonars. No va ser fins l'any 1953 que un jove pediatra, Paul di Sant'Agnese, va descriure científicament la presència d'un excés de clorur sòdic en els nens afectats de FQ (Di Sant'Agnese, Darling et al. 1953), correlacionant així les observacions dels escrits trobats a l'edat mitjana i la FQ. Sobre la base descrita per Paul di Sant'Agnese, els Drs Gibson i Cooke van establir un mètode per a la quantificació de la concentració de sals en la suor que avui dia segueix sent un dels pilars diagnòstics de la malaltia (Gibson and Cooke 1959). L'any 1983, el Dr Paul Quinton va identificar que l'augment de sals en la suor era degut al transport anòmal de ions clorur (Cl⁻) a les glàndules sudorípares (Quinton 1983), a la vegada que el grup dels Drs Knowles i Boucher descrivia un increment en la reabsorció de sodi (Na⁺) en l'epiteli respiratori (Knowles, Stutts et al. 1983).

El gen *CFTR*, responsable de la FQ, va ser el primer gen identificat sense conèixer-se la seva funció. L'any 1985 es va localitzar al cromosoma 7 (7q31.2) (Tsui,

Buchwald et al. 1985) i quatre anys després, el 1989, els Drs Collins, Tsui i Riordan van identificar-lo per clonatge posicional i van descriure'n la primera mutació, p.Phe508del (Kerem, Rommens et al. 1989; Riordan, Rommens et al. 1989; Rommens, Iannuzzi et al. 1989). La dècada posterior al descobriment de *CFTR* va ser un període en el qual s'avançà de forma considerable en el coneixement de l'estructura i la funció del producte genètic i en la terapèutica de la FQ.

1.3 Manifestacions clíniques i fisiopatologia

La patologia de la FQ està relacionada amb un defecte en el transport de ions i la deshidratació de fluids que causa la secreció d'un moc dens i viscos que bloqueja i destrueix els òrgans en els quals cursa la malaltia (Burgel, Montani et al. 2007). Gairebé tots els teixits amb funció exocrina estan implicats, però n'hi ha tres que destaquen per la seva importància: 1) la glàndula sudorípara, pel diagnòstic de la malaltia, 2) el pàncrees, com a causa principal de la desnutrició del pacient i 3) el teixit pulmonar, causant de la major mortalitat i morbiditat de la malaltia. La disfunció de la proteïna es manifesta de forma diversa en cadascun dels òrgans on s'expressa. Aquesta resposta variable és causada, d'una banda, per la funció pròpia de cada òrgan i, de l'altra, per les diferents activitats de *CFTR* com a canal de Cl^- , regulador d'altres canals iònics (Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , etc.) i en la resposta immune. La variabilitat es manifesta en una gran heterogeneïtat fenotípica en els pacients diagnosticats amb FQ. Hi ha individus que presenten un curs sever de la malaltia amb un empitjorament ràpid de la funció pulmonar i alteracions pancreàtiques greus, mentre que altres individus presenten un curs molt més lleu amb una variable afectació pulmonar i en la majoria dels casos sense alteracions pancreàtiques (Taula 1). La intervenció d'altres factors en la determinació del fenotip, com són els gens modificadors, els factors ambientals, l'estil de vida i l'edat del malalt no permeten, en un gran nombre d'ocasions, establir una barrera clara entre ambdós grups.

1.3.1 El sistema respiratori

Les alteracions en l'expressió i funció de *CFTR* a l'epiteli pulmonar FQ s'associen a hipersecreció de mucositat, inflamació i infecció, processos que s'inicien molt aviat i determinen un cercle viciós amb greu obstrucció de les vies aèries que acaba produint el fracàs respiratori (Figura 1). El deteriorament pulmonar és el que determina la gravetat i l'evolució de la malaltia. La malaltia pulmonar es caracteritza per una gran variabilitat clínica, fins i tot en pacients amb el mateix genotip. La interacció de factors ambientals i genètics és la causa de la difícil predicció del fenotip pulmonar (Accurso 1997).

Taula 1.- Classificació dels trets clínics de la FQ segons l'edat d'aparició

(Adaptació de O'Sullivan and Freedman 2009).

APARELL RESPIRATORI		
Infecció	ABPA Sinusitis Poliposi	ABPA Hemoptisi, pneumotòrax Sinusitis, poliposi, anosmia
APARELL DIGESTIU		
Ecografia fetal intestinal hiperrefringent Ili meconial Insuficiència pancreàtica Prolapse rectal	DIOS Invaginació intestinal Estatorrea, fibrosi biliar Prolapse rectal	DIOS Invaginació intestinal Fibrosi biliar, cirrosi Adenocarcinoma
DESORDRES RENALS, ENDOCRINS...		
Deshidratació Alcalosi metabòlica	Càlculs renals Alcalosi metabòlica	Pubertat tardana, osteoporosis, CFRD Càlculs renals, fracàs renal ABCD, HPOA Artritis, vasculitis Alcalosi metabòlica

ABCD: Absència bilateral de conductes deferents; **ABPA:** Aspergil·losi al·lèrgica broncopulmonar; **CFRD:** Diabetis mellitus relacionada a FQ; **DIOS:** Síndrome d'obstrucció intestinal distal; **HPOA:** Osteoartritis hipertònica pulmonar.

A diferència del pàncrees i l'intestí, els pulmons dels nadons FQ són gairebé normals en aparença, però ràpidament es veuen infectats i inflamats. La colonització de les vies aèries és produïda per diferents microorganismes. La primera infecció és causada per l'*Haemophilus influenzae* o l'*Staphylococcus aureus*, que ràpidament dona pas a la infecció per *Pseudomonas aeruginosa*, que es converteix en el principal bacteri dels individus FQ (>80%) (Rosenfeld, Ramsey et al. 2003). Altres microorganismes que colonitzen les vies aèries són el complex de la *Burkholderia cepacea*, l'*Staphylococcus aureus* resistent a la meticil·lina, o l'*Stenotrophomonas maltophilia*.

El procés d'infecció i inflamació es veu agreujat per la presència d'un moc anormalment adherent i viscos, característic de les vies aèries FQ, i la incapacitat de la resposta immune per defensar-se en front d'aquests bacteris (Davis 2006). El fracàs dels sistemes de defensa reflecteix la vulnerabilitat de la superfície epitelial a la deshidratació causada per l'absència de secreció de Cl⁻ mediada per CFTR, la deficient regulació del canal epitelial de sodi (ENaC) i la dependència de l'adenosina trifosfat (ATP) extracel·lular per equilibrar aquests processos de transport d'ions a través de la via de senyalització del receptor purinèrgic P2Y₂ (Tarran, Grubb et al. 2001; Tarran, Trout et al. 2006).

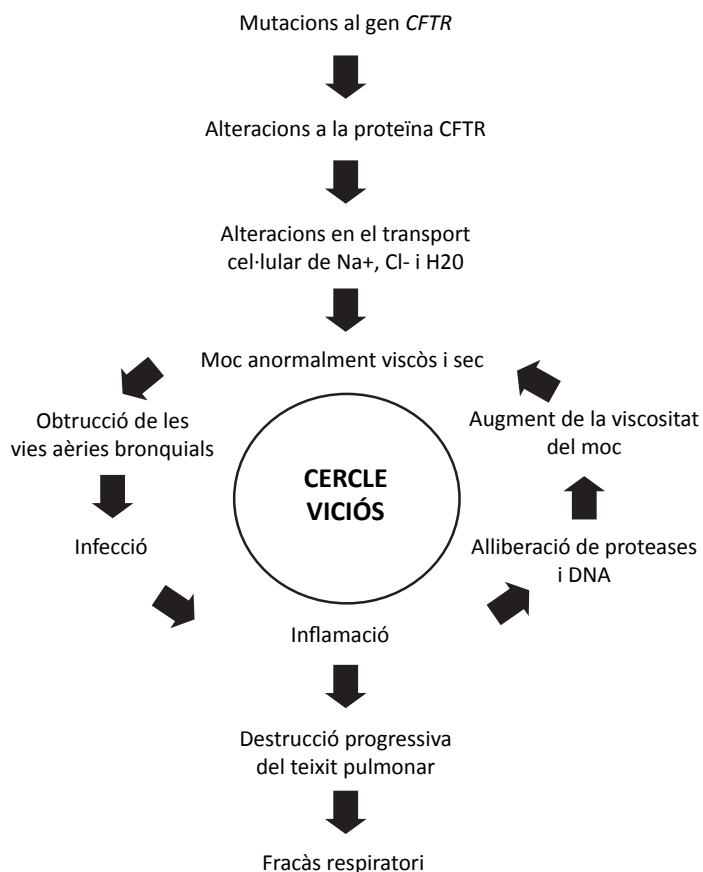


Figura 1.- Patofisiologia de la malaltia pulmonar en FQ

Adaptació de la web www.answers4families.org/family/special-needs/medical-disabilities/advances-cystic-fibrosis-cf.

L'eliminació efectiva de les partícules dipositades a les vies aèries (aclariment mucociliar) requereix l'activitat coordinada d'un sistema bifàsic de gels: 1) el líquid periciliari (PCL), que té l'alçada dels cilis de la superfície cel·lular (7 μm) i forma un medi de baixa fricció ideal per al seu moviment, a més de no permetre l'adhesió de la capa superior (Raviv, Giasson et al. 2003) i 2) una capa mucosa formada per llargs polímers altament glicosilats, anomenats mucines, que es troben a la part superior del PCL, encara que en aquest també se n'han descrit (Knowles and Boucher 2002). A les vies aèries es troben principalment les mucines MUC5A i MUC5B, organitzades de tal manera que deixen un porus de mida suficient per atrapar i retenir qualsevol partícula aspirada (Matsui, Wagner et al. 2006). La capa mucosa, a més a més, té unes propietats viscoelàstiques que ajuden el moviment dels cilis i que estan determinades per la seva composició tant de mucines (1%), com de sals (1%), com d'aigua (98%). La hidratació d'aquest sistema bifàsic és el principal determinant de l'eficàcia del transport i recanvi del moc a les vies i està controlada pel transport actiu net de ions Na^+ i Cl^- (Tarran, Grubb et al. 2001; Tarran, Trout et al. 2006). L'epiteli normal té la

capacitat de mantenir un volum adequat de líquid a la superfície de la via aèria (ASL), ajustant la concentració de Na^+ i Cl^- , fet que permet el moviment dels cilis estesos durant períodes llargs de temps. En FQ, la mida d'aquesta capa és pràcticament la meitat, 3-4 μm (Figura 2). La depleció de l'ASL produeix que l'entramat format per les mucines s'estrenyi i impedeixi, d'una banda, l'eliminació dels bacteris que s'acumulen al lloc de la infecció i, de l'altra, l'arribada dels mecanismes de defensa de l'hoste (neutròfils, lactoferrina, lisozimes, etc.). Aquest fet facilita la perpetuació del cicle de retenció d'esput, infecció i inflamació característic de la FQ (Matsui, Grubb et al. 1998; Boucher 2004; Lazarowski, Tarran et al. 2004; Tarran, Button et al. 2006).

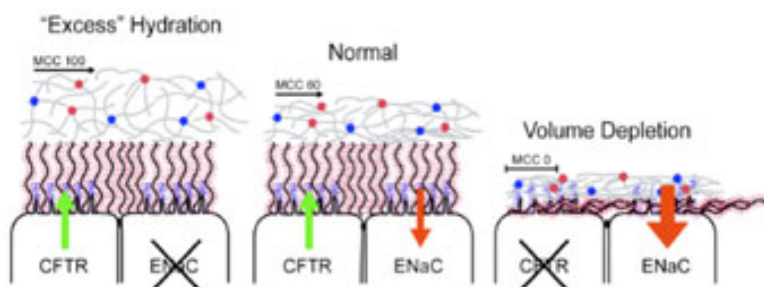


Figura 2.- Diagrama esquemàtic dels diferents graus d'hidratació de l'ASL

Al panell esquerre, s'observa que la pèrdua de funció d'ENaC produeix una secreció inadequada d'aigua que dona lloc a un excés de volum d'ASL i un moc fluid que s'elimina de forma molt més ràpida. És característic del pseudohipoaldosteronisme. Al panell del mig, s'observa la situació normal de l'epiteli, on hi ha un equilibri d'absorció i secreció d'ions que manté el volum adequat d'ASL i permet el correcte moviment dels cilis. Per últim, al panell de la dreta, veiem com la falta de CFTR duu a una secreció deficient de Cl^- i una absorció inapropiada de Na^+ que produeix una deshidratació de la superfície i un augment en la densitat del moc que condueix al col·lapse dels cilis. Aquest moc adherent pot provocar la inflamació de les vies a més de proveir un ambient òptim per a la colonització bacteriana (Adaptació de Clunes and Boucher 2007).

Dues molècules extracel·lulars, l'ATP i l'adenosina (ADO), juguen un paper molt important en el manteniment de l'equilibri iònic i, per tant, del volum d'ASL. L'ATP s'allibera de forma constitutiva i en resposta a l'estrès. En aquesta última situació, l'ATP interacciona amb el receptor purinèrgic P2Y_2 , que inhibeix ENaC i activa CFTR i el canal de clorur activat per calci (CaCCl) (Lazarowski, Tarran et al. 2004; Tarran, Button et al. 2006). L'ATP també pot ser metabolitzat a ADO (Picher, Burch et al. 2004), que interacciona de forma apical amb els receptors d'adenosina 2b (A2b). Aquest mecanisme és dependent de l'adenosina 3'-5' monofosfat cíclica (AMPc) i activa CFTR, que a la seva vegada inhibeix ENaC (Stutts, Canessa et al. 1995). En FQ, les vies aèries són capaces de secretar ATP en condicions d'estrès, i la regulació que aquest exerceix sobre ENaC i CaCCl és correcta (Watt, Lazarowski et al. 1998; Okada, Nicholas et al. 2006; Button, Picher et al. 2007), però ADO no és capaç d'unir-se al seu receptor i, per tant, les vies esdevenen vulnerables a la deshidratació.

1.3.2 El sistema gastrointestinal

L'afectació principal del sistema gastrointestinal és la insuficiència pancreàtica (IP) que pot estar present al naixement o evolucionar durant el primer any de vida del nadó (Kopelman, Durie et al. 1985).

Tal i com hem vist, en les vies respiratòries el transport deficient d'ions és el responsable de la viscositat en les secrecions. Al pàncrees, la pèrdua de CFTR redueix la secreció de Cl^- i bicarbonat (HCO_3^-), que resulta en un suc pancreàtic menys alcalí i poc hidratat. El descens del volum de les secrecions i la baixa concentració d'enzims i HCO_3^- produeixen la retenció dels proenzims en els conductes pancreàtics, que condueix a la destrucció i fibrosi del teixit. Els pacients presenten maldigestió de proteïnes i greixos que es manifesta en esteatorrea, pèrdua de massa ponderal i, finalment, un quadre crònic de malabsorció per la insuficiència pancreàtica.

La presència d'ili meconial s'ha descrit en un 15% dels nounats afectats i pot ser un indicador de FQ. Recolzada per altres paràmetres clínics i/o genètics, condueix a un diagnòstic precoç de la malaltia. La cronicitat de la malaltia és determinant en l'aparició d'altres complicacions del sistema gastrointestinal, amb una freqüència que augmenta amb l'edat dels pacients i pot oscil·lar entre el 10% i el 70%. Cal assenyalar, entre aquestes complicacions, el reflux gastroesofàgic, l'obstrucció intestinal distal, el prolapse del recte, la cirrosi biliar i l'osteoporosi (Welsh MJ 2001).

1.3.3 Desordres endocrins

L'augment de l'esperança de vida dels malalts amb FQ (37 anys de mitjana; The Cystic Fibrosis Foundation, www.cff.org, 2006) ha produït un creixement de la incidència de patologies endocrines en majors de 25 anys (Anon 2007). Aproximadament, el 30% dels pacients presenta alguna d'aquestes alteracions, sent la diabetis mellitus (CFRD) la que té una major prevalença, aproximadament d'un 5%. Pràcticament el 100% dels pacients amb CFRD presenten IP (Rosenecker, Eichler et al. 1995; Koch, Rainisio et al. 2001). Com s'ha descrit en l'apartat anterior, la IP provoca l'autòlisi de les zones pancreàtiques afectades i la seva substitució per greix. Quan una proporció dels illots pancreàtics es perden per la remodelació del teixit, els individus amb FQ desenvolupen insuficiència d'insulina i/o resistència als carbohidrats (Marshall, Butler et al. 2005). Una despesa d'energia elevada, infeccions agudes i cròniques, una deficiència de glucagó, una disfunció hepàtica, un trànsit intestinal disminuït i un major treball respiratori són diferents factors del metabolisme de la glucosa que fan que la CFRD sigui atípica (Marshall, Butler et al. 2005). Els pacients que presenten aquesta alteració endocrina tenen una mala funció pulmonar, una major afectació per exacerbacions pulmonars i un estat nutricional inadequat. Cal destacar que les dones FQ amb CFRD tenen pitjor pronòstic que els homes (Milla, Billings et al. 2005).

Altres patologies endocrines s'estan reconeixent a poc a poc com complicacions de la FQ. Entre aquestes trobem l'osteoporosi secundària a la deficiència de vitamina D i l'osteopènia, que comença a la infantesa però es manifesta en l'edat adulta. La reabsorció de l'os és major que la seva formació, fins i tot en nens estables clínicament i sense problemes nutricionals (Aris, Merkel et al. 2005).

1.3.4 L'aparell reproductor

El pas a l'adolescència es dona amb cert retard entre els afectats, sent la infertilitat masculina una característica diferencial entre els sexes. En l'aparell reproductor masculí, els conductes deferents són molt sensibles a les disfuncions de CFTR. Un 98% d'homes FQ presenten alteracions en el conducte de Wolf que es manifesten en malformacions o absència dels conductes deferents, de l'epidídim i de les vesícules seminals (Denning, Sommers et al. 1968; Wilschanski, Corey et al. 1996). Aquestes alteracions són la causa de l'azoospermia obstructiva i, per tant, de la infertilitat dels pacients.

L'agenèsia bilateral dels conductes deferents (ABCD) es pot donar de forma aïllada. L'ABCD constitueix el fenotip més comú d'azoospermia i causa infertilitat en el 1-5% d'individus (Castellani, Cuppens et al. 2008). A més és un dels síndromes relacionats amb CFTR (CFTR-RD) millor estudiats, per la seva gran incidència mutacional (Anguiano, Oates et al. 1992).

Les dones FQ tenen el sistema reproductor correctament desenvolupat, però presenten una reducció en la seva fertilitat. La deshidratació del moc vaginal i l'alteració en la secreció d' HCO_3^- en podrien ser la causa (Oppenheimer, Case et al. 1970). La manca d' HCO_3^- ha estat associada a la inhabilitat de l'úter i l'oviducte per a la capacitat dels espermatozoides (Wang, Zhou et al. 2003; Chan, Shi et al. 2006).

1.3.5 Les glàndules sudorípares

Les glàndules sudorípares dels individus amb FQ són estructuralment i funcionalment normals però incapaces de reabsorbir les sals, per tant, el fluid que produeixen té una concentració de sals 3-5 vegades superior a la dels individus normals. La secreció de la suor es fa en dos passos: en primer lloc, es secreta un fluid isotònic que va modificant la seva composició a mesura que avança per la glàndula. En segon lloc, les sals presents en el líquid isotònic s'absorbeixen i produeixen el líquid hipotònic que serà secretat en forma de suor (Figura 3). Aquest últim pas està alterat en FQ, i els pacients perden una gran concentració de clorur sòdic i potàssic (NaCl_2 i KCl) (Figura 3). El canal de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ compensa parcialment la pèrdua de sals, però no de forma suficient (Davis 2006; Quinton 2007).

En un context clínic suggestiu de FQ, la prova de la suor és un paràmetre

essencial per al diagnòstic. Determinacions superiors a 60 mmol/l orienten vers el diagnòstic de FQ (Gibson and Cooke 1959).

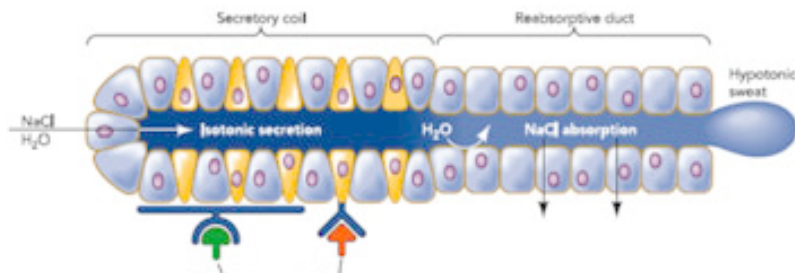


Figura 3.- La glàndula sudorípara i la secreció de la suor

Model de Schwartz-Thaysen per a la secreció exocrina de la glàndula que explica la composició final del fluid excretat. En general, en primer lloc s'excreta un fluid isotònic a la part secretora de la glàndula, que està estimulada per agonistes colinèrgics i agonistes adrenèrgics que en FQ fallen per la falta de CFTR funcional. El fluid isotònic serà modificat en el seu pas pel conducte de reabsorció per formar un fluid hipotònic que s'excretarà a l'exterior. En el cas de FQ, aquest fluid no es modificarà i serà excretat amb una alta concentració de sals, característic de la malaltia (Adaptació de Quinton 2007).

1.4 Diagnòstic

La FQ és una malaltia multisistèmica i complexa caracteritzada per una gran heterogeneïtat en les manifestacions clíniques (Orenstein, Winnie et al. 2002; WHO/ICF(M)A/ECFTN 2002). Per aquesta raó, és molt important diferenciar-les en els pacients i tenir un consens sobre la terminologia dels diferents patrons de presentació, per evitar tractaments innecessaris i assumpcions incorrectes en la prognosi. L'any 2008, Castellani i col·l. van publicar unes guies en les quals basar el diagnòstic de la FQ i els diferents fenotips CFTR-RD (Castellani, Cuppens et al. 2008). L'article indica la necessitat que el diagnòstic es faci segons les característiques fenotípiques en conjunció amb marcadors tant bioquímics com genètics de la disfunció de CFTR. Aquests tres paràmetres permetran distingir un patró greu de presentació d'un patró lleu i identificar un espectre de malalties distingibles i no letals associades a mutacions *CFTR*.

Davant una sospita clínica de FQ, el diagnòstic s'iniciarà amb un test de la suor que es repetirà en cas d'obtenir un resultat positiu (>60 mmol/l). Si els nivells de clorur a la suor confirmen el diagnòstic, es realitzarà l'anàlisi mutacional del gen per caracteritzar les mutacions, conèixer millor el possible desenvolupament de la malaltia i poder oferir assessorament genètic a la família (Figura 4). Individus amb una concentració de sals dins de l'interval normal (<30 mmol/l) o en el llindar (30-59 mmol/l) i fenotip FQ en almenys un òrgan requeriran la detecció d'una mutació a *CFTR* a cada al·lel o la mesura directa de la diferència del potencial nasal (NPD) per confirmar el diagnòstic FQ (Figura 5).

Per últim, hi ha altres malalties que s'han relacionat amb mutacions *CFTR*, com ABCD, la pancreatitis crònica i les bronquièctasis. Aquestes malalties no són letals per a l'individu i requereixen l'estudi genètic per confirmar la seva relació amb *CFTR*. En els casos on només hi hagi una mutació, la definició del fenotip dels pacients implicarà la intervenció d'altres gens. La distinció d'aquestes malalties ha permès la classificació de mutacions al gen *CFTR* com 1) causants de FQ, 2) associades a CFTR-RD, 3) sense rellevància clínica o 4) de rellevància clínica desconeguda o incerta (Castellani, Cuppens et al. 2008).

En els darrers anys, l'anàlisi de mutacions freqüents s'ha fet fàcilment abordable mitjançant equips comercials que posen a l'abast la tecnologia necessària per a la detecció simultània de mutacions, en nombre que pot assolir d'una dotzena a un centenar. El nivell de detecció a cada població depèn de la freqüència de les mutacions analitzades i pot variar entre el 90%, en poblacions amb baixa heterogeneïtat mutacional, i el 70%, en poblacions més heterogènies. Tanmateix, a la majoria de poblacions, l'heterogeneïtat és suficientment alta com per justificar el criatge del gen. L'anàlisi de la conformació de la cadena senzilla (SSCP/HD) i d'electroforesis en gel de gradient desnaturalitzant (DGGE), la cromatografia líquida d'alt rendiment (dHPLC) i la seqüenciació directa han permès augmentar la detecció de mutacions al 95-98%. Recentment, s'han inclòs tècniques de *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) i la hibridació genòmica comparada (CGH) per a la detecció de grans delecions i/o insercions al gen que per la seva extensió són difícilment abastables per tècniques de rutina. El diagnòstic molecular permet l'assessorament genètic acurat, oferint la possibilitat dels estudis "en cascada" dintre la família, així com el diagnòstic preimplantacional i prenatal.

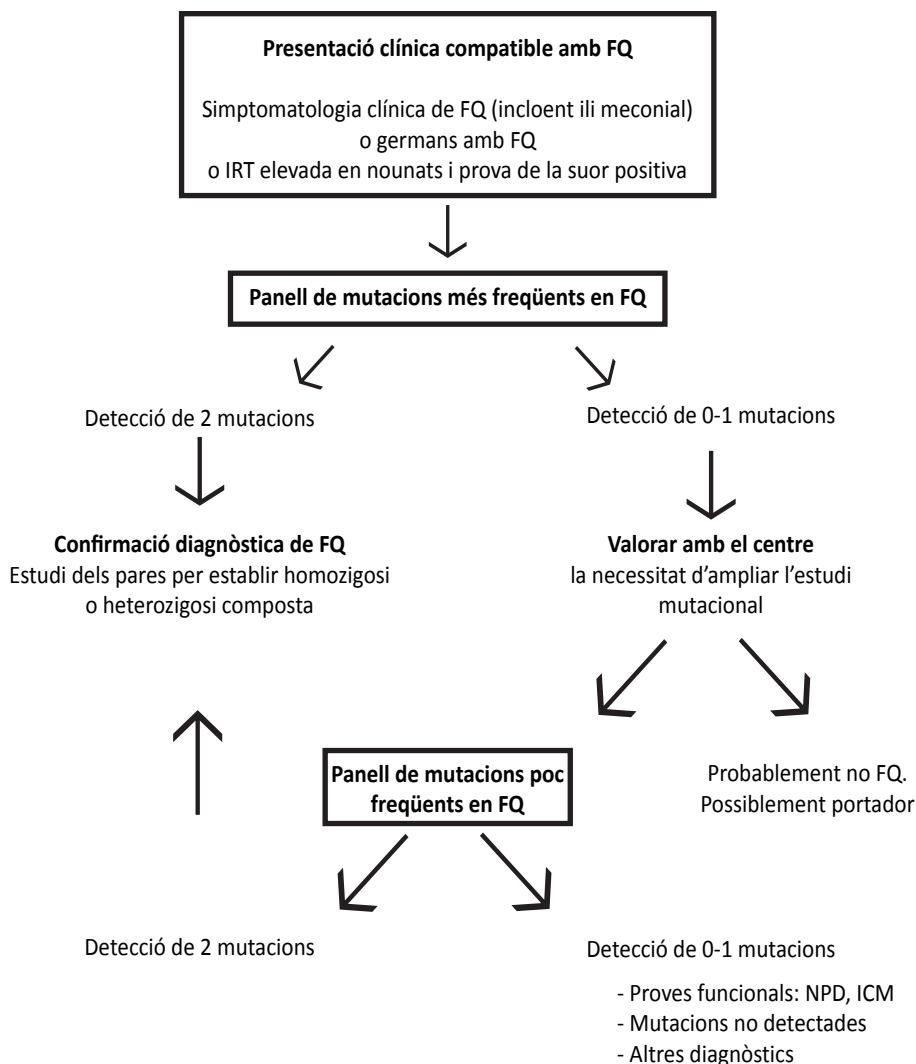


Figura 4.- Algoritme per al diagnòstic de FQ en presentacions típiques de la malaltia

S'aplica independentment de l'edat del pacient, des del diagnòstic primerenc en nadons fins al diagnòstic tardà en adults. **IRT**: Tripsina immunoreactiva; **NPD**: Diferència de potencial nasal; **ICM**: Mesura de clorur intestinal (Adaptació de Dequeker, Stuhmann et al. 2009).

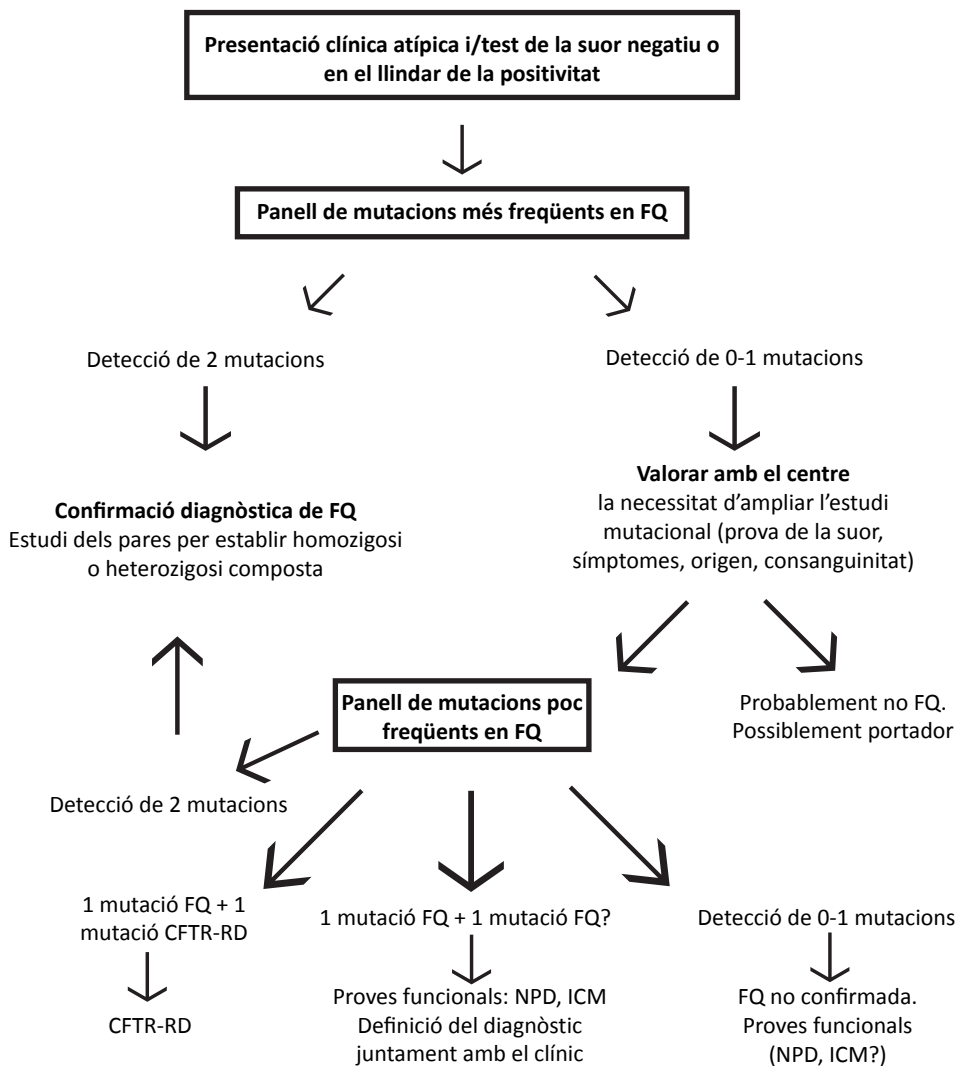


Figura 5.- Algorisme per al diagnòstic de FQ en presentacions atípiques de la malaltia i/o amb test de la suor negatiu o en el llindar

L'estudi genètic és necessari per a la confirmació del diagnòstic. **CF?**: Mutació de rellevància clínica desconeguda (Adaptació de Dequeker, Stuhmann et al. 2009).

2.- CFTR: DEL GEN A LA PROTEÏNA

2.1 El gen i el transcrit *CFTR*

El gen *CFTR* va ser identificat l'any 1989 (Figura 6) al braç llarg del cromosoma 7 (7q31.2) (Kerem, Rommens et al. 1989; Riordan, Rommens et al. 1989; Rommens, Iannuzzi et al. 1989). Dos factors van ser claus: l'alta prevalença de la malaltia, que va facilitar els estudis de lligament, i el desenvolupament de les tècniques de clonatge posicional. Comprèn una seqüència genòmica d'aproximadament 190 kb organitzada en vint-i-set exons (Zielenski, Rozmahel et al. 1991; Ellsworth, Jamison et al. 2000). El cDNA identifica un transcrit de 6,1 Kb i 4.440 nucleòtids codificants.

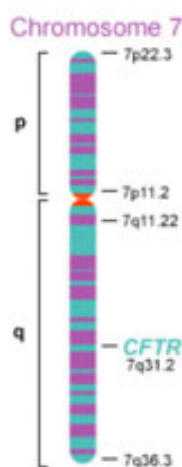


Figura 6.- Localització del gen *CFTR*

Localització del gen *CFTR* a la regió 7q31.2 del braç llarg del cromosoma 7 segons el mapa cromosòmic de l'NCBI Entrez Map Viewer. Adaptació de la web www.thetech.org/genetics/ask.

Han passat més de vint anys des del descobriment del gen i els mecanismes pels quals se'n regula l'expressió encara no es comprenen. Malgrat que el patró d'expressió de *CFTR* es troba altament regulat tant en l'espai com en el temps, el seu promotor no presenta els elements necessaris per aconseguir aquesta regulació. El promotor *CFTR* té característiques de gen *housekeeping*: absència de motius TATA o CCAAT, alt contingut de seqüències CpG hipometilades, diferents punts d'inici de la transcripció i potencials llocs d'unió a la proteïna Sp1 i AP-1. Altres elements de regulació en aquesta regió, com elements CRE (*cAMP Response Elements*), C/EBP (*CCAAT - Enhancer Binding Protein*) i elements de resposta a corticoides, també han estat descrits (McCarthy and Harris 2005). L'absència dels elements en el promotor que permetin la regulació específica suggereix la implicació d'altres elements reguladors. En una sèrie d'articles publicats pel grup de la Dra Harris (2009) es presenten evidències estructurals i funcionals que suggereixen que existeix un llaç transcripcional de *CFTR* que permet que elements reguladors claus s'apropin al promotor per activar-ne la transcripció específica a cada teixit. En aquests treballs, a més, també s'han descrit diversos llocs d'hipersensibilitat a DNasa en diferents introns de *CFTR* que regulen

positivament l'activitat del seu promotor i que permeten la interacció de potenciadors de l'activitat del gen amb el promotor i amb factors de transcripció tant específics de teixit (HNF1) com generals (P300) (McCarthy and Harris 2005; Blackledge, Ott et al. 2009; Ott, Blackledge et al. 2009; Ott, Blackledge et al. 2009; Ott, Suszko et al. 2009; Lewandowska, Costa et al. 2010).

L'expressió de *CFTR* s'ha detectat a tots els teixits relacionats amb el curs clínic de la malaltia: vies aèries, teixit gastrointestinal, teixits reproductors i glàndules sudoríparaes i salivars (Trezise and Buchwald 1991). Els seus nivells, tant en fetus com en adults, són similars, a excepció del teixit pulmonar, on són molt reduïts (Tizzano, Chitayat et al. 1993; Trezise, Chambers et al. 1993; Tizzano, Silver et al. 1994). Les diferències trobades en el pulmó fetal i adult humà indiquen especificitat al llarg del desenvolupament i suggereixen la seva implicació en la regulació del promotor (White, Higgins et al. 1998; Chiba-Falek, Parad et al. 1999).

2.2 La proteïna CFTR

El gen *CFTR* és un membre únic de la superfamília dels transportadors *ATP-Binding Cassettes* (ABC) que codifica per un canal de clorur de regulació molt complexa (Sheppard and Welsh 1999; Gadsby, Vergani et al. 2006). Els transportadors ABC són un gran grup de proteïnes transmembrana que utilitzen l'energia de la hidròlisi de l'ATP per transportar diversos substrats en contra del gradient de concentració (Higgins 1992).

El paper principal que desenvolupa el canal CFTR és el transport de fluid transepitelial i d'electròlits a través de la membrana. L'activitat està regulada directament per la fosforilació de la proteïna quinasa A (PKA) i permet el trànsit dels ions en qualsevol direcció, fet que el diferencia dels altres membres de la família. A banda del flux de Cl^- , la manca de CFTR afecta els canals que depenen de la seva regulació, principalment al canal ENaC, el bescanviador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ i també altres implicats en transport de Cl^- (ORCC), K^+ (ROMK2) i Ca^{2+} (CaCC) (Vankeerberghen, Cuppens et al. 2002).

A més de la seva responsabilitat en l'electrofisiologia cel·lular, s'atribueix a CFTR un paper en la immunitat de la cèl·lula i una contribució activa en la resistència a les infeccions (Pier, Grout et al. 1997; Pier, Grout et al. 1998).

2.2.1 Biogènesi de la proteïna

Els 4.440 nucleòtids codificants de *CFTR* es tradueixen en una proteïna de 1.480 aminoàcids i pes molecular de 170 Kda (Riordan, Rommens et al. 1989). L'inici de la seva biogènesi és al reticle endoplasmàtic (RE), on es duu a terme l'N-glicosilació. En aquest pas, la proteïna passa de 130 KDa a 145 KDa, que és la forma precursora

imadura. Les xaperones Hsp70 i Hsp90 ajudaran el pèptid a adoptar la conformació correcta, evitant la seva degradació (Farinha, Nogueira et al. 2002; Amaral 2004). En l'aparell de Golgi (AG), on la proteïna arriba des del RE, es forma la proteïna madura de 170 KDa després de glicosilar-se. És aquesta conformació final la que li permet arribar a la membrana citoplasmàtica i funcionar com a canal. Un cop a la membrana citoplasmàtica, la proteïna entra en el cicle de reciclatge mitjançant les vesícules de clatrina (Ameen, Silvis et al. 2007). Si es considera la ràpida internalització de CFTR (5-10%/min) i la limitada taxa de proteïna traduïda, el retorn de la proteïna endocitada a la membrana citoplasmàtica és un punt clau de control del nombre de canals a la membrana (Lukacs, Segal et al. 1997).

Diferents controls de qualitat, al llarg del procés de biogènesi, s'encarreguen de marcar aquelles proteïnes mal plegades i de conduir-les a la via de degradació del proteasoma (Ward, Omura et al. 1995). Cal destacar el control de qualitat del RE (ERQC) i les vies de degradació associades a aquest (ERAD). Entre les mutacions que afecten la capacitat de ser plegada correctament i madurar es troba la mutació p.Phe508del (Farinha and Amaral 2005).

2.2.2 Estructura i funció electrofisiològica del canal

CFTR és un canal de Cl⁻ caracteritzat per una baixa conductància (7-10 pS) i una permeabilitat selectiva als anions seguint l'ordre Br⁻ > Cl⁻ > I⁻ > F⁻ (Anderson, Gregory et al. 1991). El canal no presenta una relació corrent-voltatge lineal a voltatges positius, sinó que rectifica cap a l'interior a potencials superiors a +50 mV, aproximadament. S'ha postulat que les propietats intrínseques del propi porus podrien ser les responsables d'aquesta rectificació, facilitarien el transport des de l'interior cap a l'exterior cel·lular i dificultarien el pas en sentit oposat (Cai, Scott-Ward et al. 2003).

La cinètica d'obertura i tancament del canal es caracteritza per llargs períodes d'obertura interromputs per ràpids moviments de tancament i obertura i per llargs períodes de tancament (Chen and Hwang 2008).

Les proteïnes de transport tenen dos motius simètrics, cadascun amb un domini transmembrana (TMD1 i TMD2) i una regió citosòlica hidrofílica d'unió a l'ATP (NBD1 i NBD2). Els dos motius queden units per un cinquè domini citosòlic i hidrofílic que es fosforila per PKA i PKC. Aquest és el domini regulador (R), que només es troba a CFTR i que constitueix un altre dels seus trets diferencials. Així mateix, els extrems NH₂- i COOH- terminal són intracel·lulars (Figura 7) (Riordan, Rommens et al. 1989).

Els dominis NB són dominis comuns a tots els membres de la família. Presenten un 29% d'homologia i contenen els motius Walker A i B, a més d'una regió d'enllaç (LSGGQ), tots tres necessaris per a la unió i hidròlisi de l'ATP una vegada el canal ha estat activat per la PKA. A NBD2 hi ha altres elements conservats essencials

pel tancament que podrien estar involucrats en la regulació de CFTR però no en la unió a l'ATP. Aquest domini es diferencia dels altres NBDs per un àcid glutàmic que permet la hidròlisi de l'ATP. En canvi, la resta presenta una serina que confereix estabilitat a l'ATP. Per tant, hi ha una petita asimetria estructural entre ambdós dominis (Figura 8).

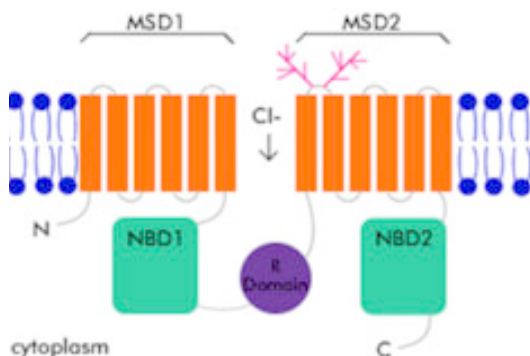


Figura 7.- Representació esquemàtica dels dominis que constitueixen CFTR

Està constituït per dos TMDs (taronja), dos dominis NBDs (verd) i un domini R (lila) (Adaptació de Sheppard and Welsh 1999).

El model general per l'obertura i tancament dels transportadors ABC no es correspon exactament amb el funcionament de CFTR. Molts dels detalls del model específic són encara desconeguts i es troben sota debat (Vergani, Basso et al. 2005; Aleksandrov, Aleksandrov et al. 2007; Cheung, Kim Chiaw et al. 2008). Per analogia amb altres transportadors, s'ha proposat la formació d'una estructura prototípica de dímer amb una orientació cap i cua dels NBDs que seria essencial per al transport efectiu d'ions (Moody and Thomas 2005; Vergani, Lockless et al. 2005; Linton and Higgins 2007). La unió de l'ATP és necessària per a la formació de l'heterodímer i l'obertura del canal. Pròpiament, l'activitat del canal s'inicia amb la unió i hidròlisi de l'ATP al NBD1, mentre que la posterior unió ATP-NBD2 perllonga l'estat d'activació i la hidròlisi el finalitza (Aleksandrov, Aleksandrov et al. 2002; Basso, Vergani et al. 2003; Berger, Ikuma et al. 2005; Vergani, Lockless et al. 2005). Per assegurar un bon cicle de transport, el trencament de la dimerització és molt ràpid després d'aquesta hidròlisi.

Les mutacions situades a aquests dominis tenen un efecte molt greu. La mutació p.Gly551Asp es troba en la seqüència signatura de NBD1 i dona lloc a una proteïna que arriba a la membrana però no respon a l'activació per PKA (Qu, Strickland et al. 1997; Howell, Borchardt et al. 2000). Mutacions situades al NBD2 afecten la hidròlisi i conseqüentment retarden el tancament del canal i, per tant, alteren els cicles de transport (Gunderson and Kopito 1995; Vergani, Nairn et al. 2003; Berger, Ikuma et al. 2005).

El domini R està codificat per l'exó 13 i comprèn els aminoàcids entre les posicions 509 i 830 (240 aminoàcids). L'extrem COOH- del domini R, entre els residus 780 i 830, està menys conservat que l'extrem NH₂- i conté la majoria de llocs per a la fosforilació de PKA i PKC. El canvi estructural que permet que s'iniciï el procés d'obertura

és conseqüència de la fosforilació d'aquests residus (Zegarra-Moran, Monteverde et al. 2007). Per tant, encara que els NBDs siguin essencials per a la regulació de l'obertura i el tancament del canal, no són suficients per activar-lo. Ostedgaard i col·l. (2001) suggereixen un augment de fins a 100 vegades de l'activitat del canal posterior a la fosforilació (Ostedgaard, Baldursson et al. 2001).

El fet que cap altra proteïna de la família ABC tingui un domini R i que encara no s'hagi obtingut una estructura terciària d'alta resolució de tota la proteïna dificulten poder conèixer la forma i localització exacta d'aquest domini.

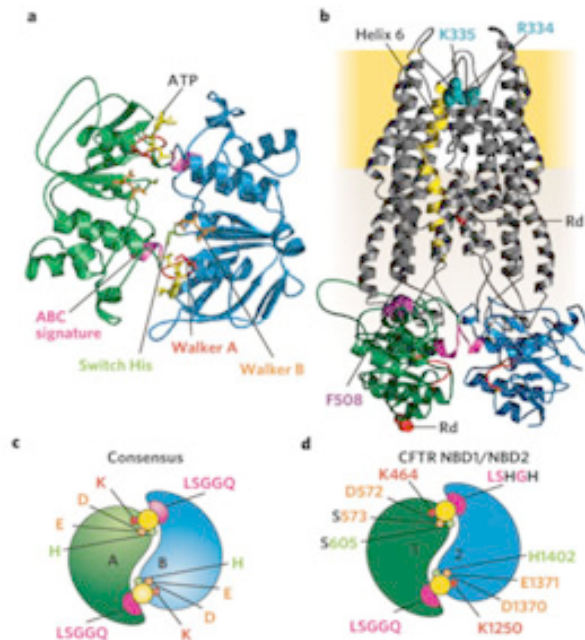


Figura 8.- Estructura de la proteïna CFTR

a) Predicció de l'homologia del model heterodimèric dels dominis NBD de CFTR. NBD1 (verd) i NBD2 (blau) es troben units per molècules d'ATP (groc). S'identifiquen els motius Walker A (vermell), Walker B (taronja) i la signatura ABC (rosa). **b)** Representació gràfica dels diferents dominis de la proteïna CFTR formant el canal a la membrana apical. **c)** Seqüència consens de Walker A i B en els transportadors ABC. **d)** Seqüència Walker A i B del canal CFTR on es poden observar les diferències entre els dos NBD2 (Adaptació de Gadsby, Vergani et al. 2006).

Els dominis TM són dos dominis homòlegs amb sis fragments helicoïdals cada un. L'estructura cristal·litzada de baixa resolució obtinguda mostra que aquestes dues regions s'alineen formant un porus central, a través del qual els ions travessen la membrana. No se sap, però, quins dels residus formen el porus, ni quantes molècules de CFTR el formen. Diferents estudis bioquímics, d'imatge i electrofisiològics mostren que CFTR pot actuar com a monòmer i com a dímer (Haggie and Verkman 2008). Tot i així, on no existeixen controvèrsies és en l'alineament de múltiples hèlix α per formar el porus (Locher, Lee et al. 2002; Rosenberg, Kamis et al. 2004; Reyes, Ward et al.

2006), que és més profund a la part intracel·lular que a la part extracel·lular. Ambdues parts es troben separades per un filtre selectiu que permet al canal distingir el Cl^- i el HCO_3^- dels grans ions com fosfats (PO_4^{3-}) i sulfats (SO_4^{2-}) (Sheppard and Welsh 1999).

El porus només s'obrirà després de la fosforilació del domini R i la unió i hidròlisi del l'ATP, indicant la interacció entre els dominis TM i els dominis al citosol (Figura 9). Quin són els punts d'interacció i com aquesta es produeix aquesta és encara un tema a debat.

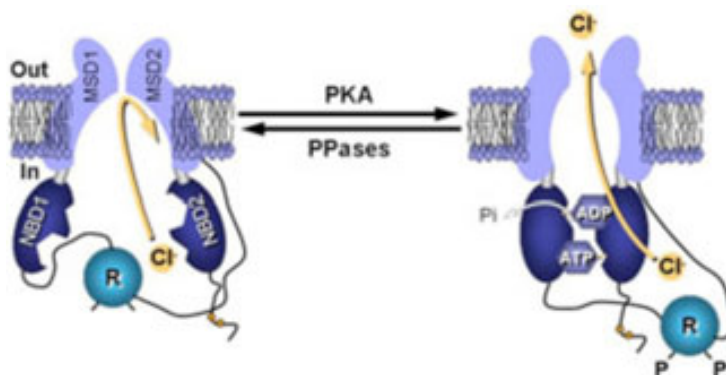


Figura 9.- Funcionament del canal CFTR

Canvis conformationals al canal CFTR durant els cicles d'obertura i tancament. A l'esquerra s'observa el canal en estat de repòs i a la dreta durant la seva activació. Existeix una comunicació entre els dos NBDs i també entre aquests i els dos TMDs (Adaptació de Chen and Hwang 2008).

2.2.3 Alteracions en la biogènesi i l'activitat del canal CFTR per mutacions *CFTR*: relació genotip - fenotip

Davant la complexa regulació de la proteïna CFTR és previsible que diferents tipus d'alteracions en la seqüència nucleotídica del gen modifiquin la síntesi o funció de la proteïna per diferents mecanismes. Fins ara, s'han identificat més de 1.800 mutacions (www.genet.sickkids.on.ca), sent p.Phe508del la mutació més comú (66% dels al·lels). El terç restant d'al·lels presenta una gran variabilitat mutacional tant en la freqüència com en la distribució. Les mutacions *CFTR* són majoritàriament canvis puntuals que afecten un o pocs nucleòtids, encara que també s'han identificat grans delecions. Atès el tipus d'alteració, les mutacions es classifiquen en: mutacions d'error de sentit (41%), en les quals el canvi determina la substitució d'un aminoàcid; mutacions de canvi de pauta de lectura (17%) produïda per la inserció/deleció d'un o pocs nucleòtids; mutacions d'*splicing* (12%) que afecten la correcta definició de l'exó i/o l'eliminació dels introns, i les mutacions sense sentit (9%) que originen un codó de terminació prematura. Només un 4% correspon a grans delecions i insercions. El tant per cent restant correspon a variacions de seqüència (14%), mutacions al promotor (1%) i canvis d'efecte desconegut (2%) (www.genet.sickkids.on.ca). El principal problema d'aquesta

gran variabilitat és el desconeixement de la conseqüència patològica de la majoria de les mutacions, principalment les d'error de sentit, que són el grup més nombrós. Malgrat aquest desconeixement, les mutacions s'han agrupat en cinc classes segons el tipus de mecanisme molecular pel qual alteren la biogènesis i/o l'activitat del canal (Figura 10) (Zielenski and Tsui 1995; Haardt, Benharouga et al. 1999).

Mutacions de classe I. Són mutacions sense sentit que donen lloc a un codó de parada prematura de la transcripció (PTC), o bé a un canvi en el marc de lectura, o el senyal d'*splicing*, produint un RNA missatger inestable i/o proteïnes truncades que seran degradades.

Mutacions de classe II. Aquestes mutacions afecten el procés de glicosilació i maduració de la proteïna a l'ER i l'AG. El plegament incorrecte de la proteïna implica la seva retenció en l'ER i posterior degradació. Excepcionalment, algunes d'aquestes proteïnes arriben a membrana, però la seva estabilitat i probabilitat d'obertura és molt reduïda respecte a la proteïna salvatge. Entre les mutacions d'aquest grup destaca p.Phe508del.

Mutacions de classe III. La regulació del canal depèn de la fosforilació del domini R i de la unió i la hidròlisi de l'ATP als dominis NBD. Les mutacions de classe III alteren aquesta regulació i per tant redueixen l'activitat. Les proteïnes són conduïdes i inserides a la membrana però són resistents a la fosforilació o a la unió d'ATP. En aquest grup cal destacar la mutació p.Gly551Asp en aquest grup.

Mutacions de classe IV. La formen les mutacions que afecten els aminoàcids situats al porus del canal, minvant la conducció iònica. Són mutacions d'error de sentit que es troben als dominis TMD i generalment estan associades a un fenotip lleu.

Mutacions de classe V. Les mutacions que s'inclouen en aquest grup determinen una disminució en la síntesis de proteïna. La majoria són mutacions que afecten l'*splicing* normal, encara que aquest no es troba totalment anul·lat i per tant, es produeix una quantitat reduïda de proteïna funcional.

En general les mutacions de classe I i II s'associen a un fenotip FQ-IP, mentre que les mutacions III-V s'associen a una àmplia variabilitat clínica. Forçosament, la classificació és flexible, i així una mutació que afecti la funció normal de la proteïna per diferents mecanismes pot ser indistintament de més d'una classe.

Els estudis de correlació genotip/fenotip a nivell poblacional són útils per determinar associacions, però a nivell clínic no són indicatius per la prognosi d'un sol individu. Els fenotips FQ no només depenen del genotip del pacient, sinó que també

intervenent altres factors, com gens modificadors i factors ambientals (Figura 11). La gran variabilitat clínica observada en els pacients amb FQ que presenten la mateixa combinació de mutacions corrobora aquest fet. Encara que la correlació genotip-fenotip en pacients és imprecisa (Castellani, Cuppens et al. 2008), el fenotip del pacient acostuma a reflectir la pèrdua completa de CFTR o l'activitat residual de la seva funció en un dels al·lels mutants. Per exemple, els individus que tenen un al·lel p.Arg117His (mutació de classe IV) presenten una permeabilitat iònica major a la membrana i generalment un fenotip més lleu que aquells pacients en els quals aquesta permeabilitat o la proteïna està absent (Reddy and Quinton 2003). El perfil genètic de l'individu influeix significativament en el fenotip. Variacions de seqüència del propi gen *CFTR* que han estat considerades polimorfismes sense expressió fenotípica al coincidir amb un altre canvi formen els al·lels complexos que poden millorar o empitjorar l'efecte de la mutació principal (Romey, Guittard et al. 1999; Pagani, Stuani et al. 2003).

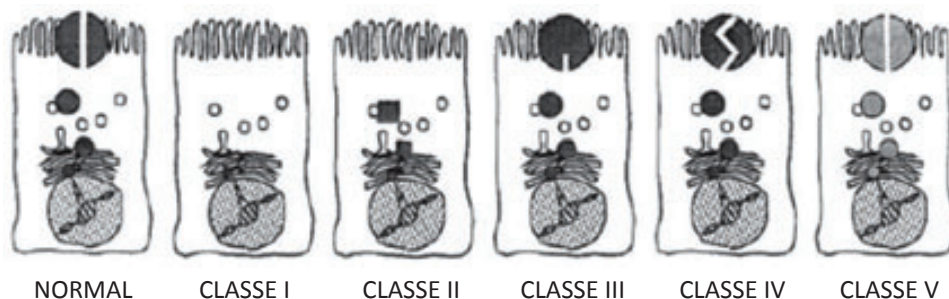


Figura 10.- Classes de mutacions a *CFTR*

Representació de les diferents classes de mutacions que afecten *CFTR* i les seves conseqüències sobre la proteïna (Adaptació de Wilschanski and Durie 2007).

L'impacte del genotip *CFTR* en el fenotip és específic de cada òrgan. Per exemple, la capacitat de funcionament correcte del pàncrees exocrí té una bona correlació amb el genotip *CFTR*; en canvi, el nivell de gravetat de l'afectació pulmonar, no (Zielenski 2000). Sens dubte, la influència dels factors ambientals als quals l'aparell respiratori és més susceptible, contribueixen a la malaltia pulmonar. Les mutacions clarament associades a afectació pulmonar lleu són excepcionals. Aquest és el cas dels pacients amb la mutació p.Ala455Glu, que tenen un deteriorament lent de la funció pulmonar. Altres estudis mostren com mutacions correlacionen amb un baix risc de patir infeccions per *Pseudomonas aeruginosa* (Cutting 2005).

La disponibilitat d'eines per a l'estudi del genoma a gran escala i els estudis d'associació han permès la identificació de gens modificadors que permetrien entendre millor la variabilitat clínica de la malaltia i identificar noves dianes per al tractament. La majoria d'aquests gens estan implicats en la resposta immune als microorganismes patògens i en la inflamació, per tant jugarien un paper clau en la determinació de la

gravetat de la malaltia pulmonar (Collaco and Cutting 2008).

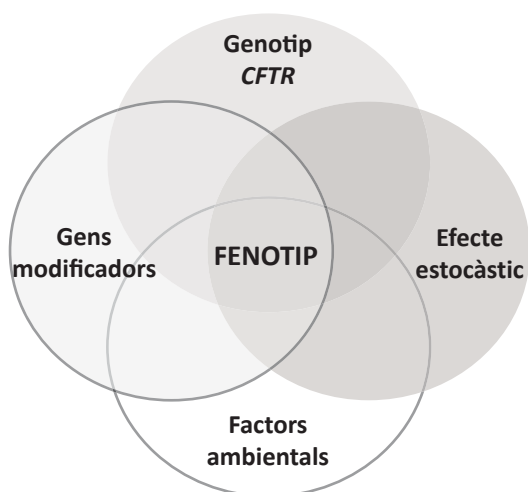


Figura 11.- Elements que determinen el fenotip de la FQ

Les variacions fenotípiques en malalties monogèniques com la FQ poden atribuir-se a diferents fonts, incloent les mutacions al gen, els gens modificadors, factors ambientals i interaccions entre qualsevol d'aquestes (Adaptació de Collaco and Cutting 2008).

3.- TERÀPIES

Les teràpies a l'abast pel tractament de la FQ estan focalitzades en la resolució de les conseqüències de la deficiència de CFTR, és a dir, són tractaments simptomàtics. Malgrat tot, les recents millores tècniques combinades amb dues dècades de recerca han resultat en el desenvolupament i l'assaig clínic de noves teràpies dirigides a la correcció del defecte bàsic de les mutacions a *CFTR* (Figura 12).

3.1 Tractament simptomàtic

Les teràpies simptomàtiques, juntament amb el trasplantament pulmonar i el diagnòstic precoç, han aconseguit augmentar l'edat de supervivència fins als 37 anys de mitjana (www.cff.org; 2006). Cal destacar la complementació amb enzims pancreàtics exògens per la millora de l'estat nutricional dels infants i pels efectes molt positius en l'estat de salut a llarg termini d'aquests pacients (McPhail, Acton et al. 2008).

Diverses teràpies, tant fisioterapèutiques com farmacològiques, dirigides als diferents punts del cercle viciós d'infecció - inflamació - dany tissular, han estat desenvolupades per al tractament de l'afectació pulmonar (Figura 12). La DNasa humana recombinant és un agent mucolític que degrada el DNA alliberat pels neutròfils i ajuda a fer el moc més líquid i fàcil d'eliminar. El sèrum salí hipertònic actua com a agent osmòtic per hidratar les vies aèries i contrarestar la depleció de l'ASL, facilitant l'eliminació del moc. Fàrmacs d'ús comú com l'ibuprofè o la prednisona també han demostrat la seva eficàcia en el tractament de la inflamació pulmonar (Flume, O'Sullivan et al. 2007; Konstan 2008). D'altra banda, la infecció pulmonar pot ser tractada amb tobramicina inhalada, que ha demostrat la seva eficàcia en pacients

infectats per *Pseudomonas aeruginosa* (MacLusky, Gold et al. 1989; Ramsey, Astley et al. 1993; Ramsey, Pepe et al. 1999).

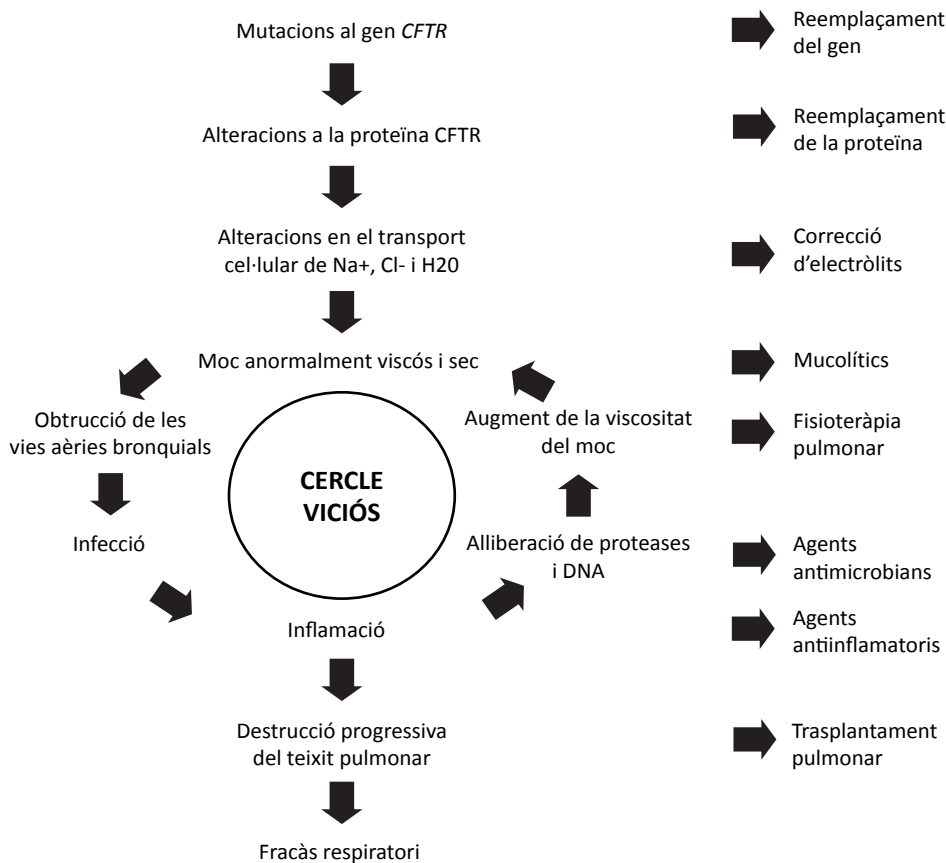


Figura 12.- Patofisiologia i tractament de la malaltia pulmonar en FQ

Adaptació de la web www.answers4families.org/family/special-needs/medical-disabilities/advances-cystic-fibrosis-cf.

3.2 Teràpies específiques per CFTR

La recerca per a la correcció del defecte bàsic a CFTR s'està duent a terme en dues línies principals. La primera és el reemplaçament parcial o complet del gen mitjançant teràpia gènica per tal de restablir-ne la funció. La segona és la utilització de petites molècules que permetin la correcció del CFTR aberrant i/o potenciïn la seva funció.

Encara que en teoria senzilla, la teràpia gènica en FQ està sent difícil de realitzar. Des del descobriment del gen, s'ha intentat la correcció del defecte de CFTR, però no s'ha aconseguit una transferència gènica eficient per a la seva aplicació clínica. Les principals dificultats s'han trobat en el propi gen, en el vector utilitzat i en la resposta de l'hoste. Les primeres proves es van realitzar amb vectors basats en adenovirus, però la seva baixa eficiència i immunogeneïtat els van descartar (Walters, Grunst

et al. 1999). La utilització de virus adeno-associats tampoc ha mostrat una millora significativa en la funció pulmonar després del tractament (Moss, Milla et al. 2007). Recentment, Mitomo i col·l. (2010) han dissenyat un vector basat en el virus de la immunodeficiència dels simis (SiV) pseudotipat amb proteïnes de l'envolta del virus Sendai (SeV). Aquest disseny els ha permès produir concentracions pel seu ús *in vivo* i transduir cèl·lules de l'epiteli respiratori de ratolí a nivells que poden ser rellevants en clínica. *In vitro* també han estat capaços de transduir i produir CFTR funcional a membrana (Mitomo, Griesenbach et al. 2010). Per evitar els efectes immunogènics dels vectors vírics s'han emprat els liposomes, però fins ara no s'ha aconseguit una correcció permanent de NPD (Caplen, Alton et al. 1995; Goddard, Ratcliff et al. 1997).

Paral·lelament a la teràpia gènica, s'han desenvolupat estratègies per corregir el defecte específic de la proteïna. Les teràpies dirigides a la correcció de mutacions de classe II (correctors), com p.Phe508del, i de classe III (potenciadors), com p.Gly551Asp, avui dia representen un esforç considerable en aquest camp, perquè podrien beneficiar gairebé el 90% dels pacients. Els correctors són compostos que permeten el rescat de la proteïna CFTR mutant marcada per la seva degradació al RE, per tant podrien arribar a membrana (Wang, Venable et al. 2006; Amaral and Kunzelmann 2007). Actualment s'està reclutant pacients homozigots p.Phe508del per començar un estudi clínic de fase II amb la molècula correctora VX-809. Els potenciadors són compostos que milloren les característiques d'obertura i tancament del canal CFTR mutant. L'augment del temps d'obertura del canal facilita el pas a un major número d'ions clorur (Amaral and Kunzelmann 2007).

El benefici clínic d'aquests compostos ja ha començat a entreveure's. L'any 2008, el grup Vertex, juntament amb la CFF, va presentar els resultats d'un estudi fase IIb amb el compost VX770, on la millora dels pacients amb almenys una mutació p.Gly551Asp era considerable, tant a nivell pulmonar com a nivell de glàndula sudorípara. Els resultats de l'estudi clínic de fase III, que s'està duent a terme, semblen corroborar aquesta millora. S'espera que aquest any 2011 es presentin els resultats finals.

Sortir del RE i arribar a la membrana, però, no garanteix el funcionament del CFTR mutant. Per aquest motiu, s'està treballant per trobar molècules que puguin actuar com a correctors i/o potenciadors o una combinació d'ambdós que pugui ser tolerada i funcional per a aquelles mutacions rescatades de la via de degradació.

Altres teràpies específiques estan dirigides a aquelles mutacions que produeixen PTCs i, per tant, una proteïna truncada (classe I). Els pacients que podrien beneficiar-se d'aquests compostos representen aproximadament un 5% dels malalts amb FQ (Kreindler 2010). Les tècniques de *high-throughput screening* han permès identificar el compost no aminoglicà PTC124, àcid 3-[5-(2-fluorophenyl)-[1,2,4]oxidazol-3-yl]-benzoic, que està disponible per a teràpia oral i suprimeix la terminació

prematura de la transcripció (Hirawat, Welch et al. 2007). Actualment hi ha en marxa un estudi de fase III amb aquest compost en pacients amb una o dues mutacions sense sentit.

4.- EL PROCÉS D'SPLICING

L'*splicing* del pre-mRNA és un procés fonamental en l'expressió gènica i la generació de la diversitat proteica (Graveley 2001). El procés s'inicia al nucli, on es reconeixen els elements codificants (exons) que s'uneixen per formar l'mRNA i s'eliminen les regions no codificants (introns). Al citoplasma, l'mRNA és traduïrà a proteïna (Black 2003). Tradicionalment, el flux d'informació s'havia caracteritzat pel pas de DNA a RNA i la seva traducció a proteïna, però amb el temps s'ha provat que l'expressió gènica està controlada per una xarxa complexa de mecanismes, interrelacionats entre si físicament i funcional, dels quals l'RNA no és únicament un intermediari passiu. La transcripció, l'*splicing* constitutiu i alternatiu, la modulació mitjançant miRNA i seqüències llargues d'RNA no codificants, la selecció de llocs de poliadenilació, l'edició de l'RNA, la localització i estabilitat dels transcrits, la degradació per *nonsense mediated decay* (NMD) i la regulació de l'eficiència de la traducció són part d'aquesta xarxa complexa que determinarà l'expressió final d'un gen. En aquest treball ens centrarem en el procés d'*splicing* i la seva importància com a causant i modulador de malaltia.

La reacció d'*splicing* es pot dividir funcionalment en diferents passos, que inclouen: l'assemblatge de l'esplíceosoma, l'activació, la catàlisi i l'alliberament, i el reciclatge dels components. Tots aquests passos es duen a terme al nucli de manera co- o post-transcripcional per reduir la complexitat en el reconeixement de les unions intró-exó (Pandit, Wang et al. 2008). L'assemblatge de la maquinària d'*splicing* comença amb el reconeixement del lloc d'*splicing* 5' (5'ss) per la molècula snRNP U1, la unió del factor d'*splicing* 1 (SF1) al *branch point* (BP) i del factor auxiliar U2 (U2AF) a la cua de polipirimidines i al dinucleòtid AG del lloc d'*splicing* 3' (3'ss). Una doble reacció de transesterificació permet l'eliminació dels introns i la unió posterior dels exons per formar l'mRNA.

4.1 L'*splicing* alternatiu (AS)

Tècniques de seqüenciació *high-throughput* han evidenciat que el 95% dels pre-mRNAs amb més d'un exó en la seva seqüència són processats per donar lloc a múltiples transcrits en un procés anomenat *splicing* alternatiu (AS) (Pan, Shai et al. 2008; Wang, Sandberg et al. 2008). Es tracta d'un procés pel qual els diferents elements codificants i no codificants del pre-mRNA es poden processar combinatorialment per donar lloc a diferents ordenacions i així produir mRNAs madurs, la traducció dels

quals donarà lloc a isoformes diferents de la mateixa proteïna amb localitzacions i funcions diverses (Blencowe 2006), fins i tot antagoniques (Garcia-Blanco, Baraniak et al. 2004).

L'AS és la major font de diversitat transcriptòmica i genòmica en humans i ha jugat un paper molt important en l'evolució i especialització tant dels diferents tipus cel·lulars com de les seves funcions. A més, constitueix un dels mecanismes més importants per a la regulació de l'expressió gènica en eucariotes. És un punt de control reversible, induïble i/o reprimible especialment important en l'expressió tant espacial com temporal de les diferents isoformes produïdes en aquest procés (Boutz, Chawla et al. 2007; Makeyev, Zhang et al. 2007; Sanchez 2008).

El procés d'AS va ser descrit per primera vegada fa 30 anys, en observar que els anticossos de membrana i els secretats eren codificats per un mateix gen (Alt, Enea et al. 1980; Early, Rogers et al. 1980; Rogers, Early et al. 1980). La inclusió o exclusió diferencial d'exons és la responsable d'aquest fenomen. Enguany, s'han descrit diferents mecanismes que fan possible l'augment de transcrits a partir d'un únic gen (Figura 13) (Caceres and Kornblihtt 2002; Black 2003).

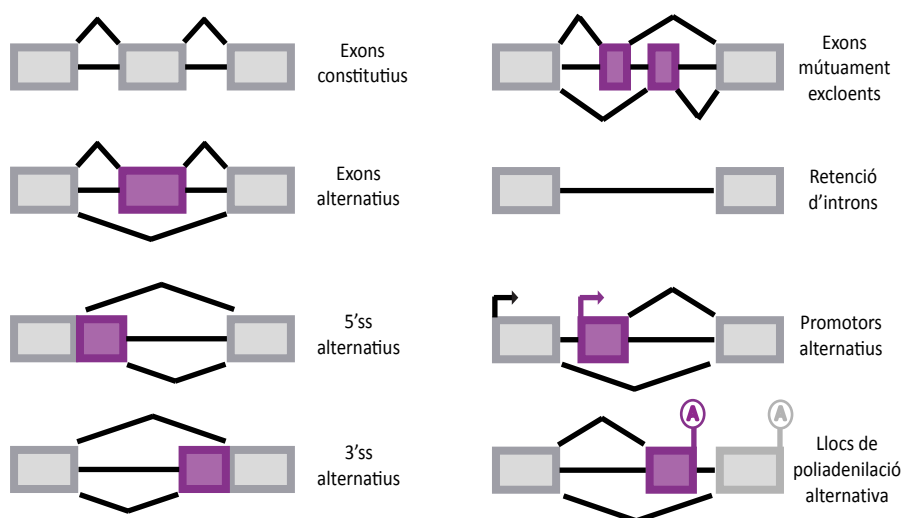


Figura 13.- Diferents patrons d'*splicing* incrementen la diversitat de l'mRNA

L'ús alternatiu d'exons, introns, promotors i llocs de poliadenilació augmenten de forma considerable la diversitat de transcrits de mRNA (Adaptació de Ward and Cooper 2009).

La discriminació dels elements codificants es realitza pel reconeixement de tres elements essencials: 5'ss, 3'ss i el BP (Mount 1982). Són seqüències molt curtes i degenerades amb una alta afinitat pels complexos de la maquinària d'*splicing*; per tant, tenen una major eficiència en el procés.

5'ss: Es caracteritza pel dinucleòtid invariant "GU" que s'uneix per aparellament de bases amb ribonucleoproteïna snRNP U1 (*U-rich small nuclear riboprotein*) (Forch,

Merendino et al. 2003). Es situa a l'extrem 5' de l'exó.

3'ss: Està format per dos elements, 1) un tram de pirimidines que s'uneix a la subunitat de 65 kDa d'U2AF i 2) el dinucleòtid invariant "AG" que s'uneix a la subunitat de 35 kDa del mateix U2AF (Forch, Merendino et al. 2003). La seqüència consens és 5'-(Py)_nAG-3' i es troba a l'extrem 3' de l'exó.

BP: Es troba a 18-40 nucleòtids d'"AG" (3'ss) i és reconegut per complementarietat de bases pel snRNP U2 (Parker, Siliciano et al. 1987) a les etapes pre-catalítiques de la reacció d'*splicing*. La seqüència consens és 5'-ynyuray-3', on "y" són pirimidines i "r" són purines.

Els tres senyals descrits caracteritzen els introns constitutius (>99%), però hi ha una petita part d'introns, anomenats U12, que utilitzen senyals alternatius i són processats per diferents components de l'espliceosoma (Hall and Padgett 1994).

La inesperada complexitat de l'*splicing* ha revelat l'existència de nous elements, tant a regions codificants com no codificants. Per tant, la correcta definició exònica i intrònica no només inclou el reconeixement dels elements 5'ss, 3'ss i BP, sinó també la contribució d'elements auxiliars en *cis* i *trans* que influeixen en l'elecció dels llocs d'*splicing* i en l'eficiència del procés (Figura 14) (Cartegni, Chew et al. 2002). La seqüència consens dels elements auxiliars no està tan ben definida com la dels elements clàssics de reconeixement i s'han classificat pel seu efecte en l'*splicing*.

Elements potenciadors de l'*splicing* a exons (ESE): Són seqüències que permeten la unió de diferents elements en *trans* per promoure la inclusió de l'exó en el transcrit final (Blencowe 2000; Cartegni, Chew et al.; Fairbrother, Yeh et al. 2002). La família de proteïnes SR (*serine arginine rich proteins*) és el conjunt de proteïnes millor caracteritzat i constitueix un dels principals factors d'*splicing* que reconeixen els ESEs per reclutar l'espliceosoma i activar llocs 3'ss subòptims (Graveley 2000). Es tracta d'un conjunt de proteïnes altament conservades en eucariotes que es caracteritzen per tenir un o dos dominis de reconeixement a RNA i un domini ric en serines i arginines a la part C-terminal.

Elements repressors de l'*splicing* a exons (ESS): Són seqüències a les quals s'uneixen elements reguladors negatius i que, per tant, disminueixen la inclusió d'un determinat exó. La família de ribonucleoproteïnes heterogènies nuclears (hnRNP) és un ampli grup de molècules que van ser identificades originalment per la seva unió al pre-mRNA naixent (Martinez-Contreras, Cloutier et al. 2007). La més estudiada és l'hnRNP1, que s'uneix a la seqüència UAGGG(A/U) dels ESS encara que, ha estat també

identificada per la seva capacitat d'associar-se a elements intrònics.

La localització precisa dels elements exònics ajuda a la definició dels exons, afectant de manera important l'elecció dels llocs d'*splicing* quan hi ha exons críptics o múltiples llocs d'*splicing* amb una afinitat semblant (Wang, Rolish et al. 2004).

Elements potenciadors i repressors de l'*splicing* a introns (ISE, ISS). Aquests elements no han estat tan estudiats com els exònics però realitzen una funció molt similar perquè permeten la modulació en la inclusió o exclusió d'una determinada seqüència. La seva localització és a zones adjacents a 5'ss o a BP i al tracte de polipirimidines, encara que també han estat descrits a centenars de nucleòtids de distància de l'exó regulat.

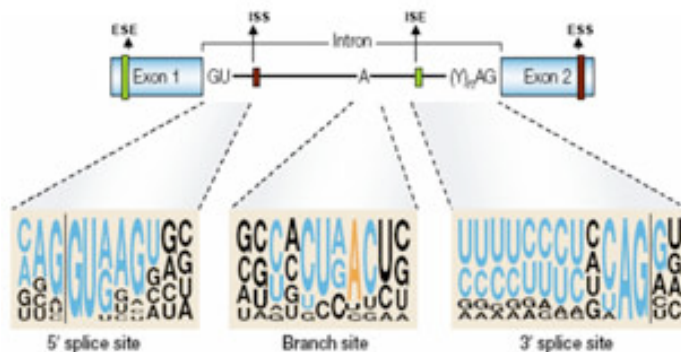


Figura 14.- Senyals que intervenen en el procés d'*splicing*

Es mostren els dinucleòtids invariants GU i AG als extrems 5' i 3' de l'intró, la cua de polipirimidines precedents a AG i el nucleòtid A, que marca el lloc BP en un pre-mRNA de dos exons. Per cada una de les seqüències consens, la mida del nucleòtid en cada posició és proporcional a la freqüència d'aquest en l'alineació de seqüències conservades de 1.683 exons humans. En blau es mostren els nucleòtids que formen part dels senyals clàssics d'*splicing*, a excepció del BP, que és taronja. Tant en l'exó com en l'intró es poden veure les seqüències auxiliars (ESE, ESS, ISE, ISS) que intervenen en la definició dels exons tant constitutius com alternatius (Adaptació de Cartegni, Chew et al. 2002).

4.2 La regulació del procés d'*splicing*

El procés d'*splicing*, com la majoria de processos cel·lulars, està sotmès a regulació. El número de mecanismes coneguts involucrats en la regulació s'aproxima al número de decisions específiques d'*splicing* que s'han analitzat en detall. Els mecanismes descrits fins al moment engloben des del bloqueig estèric directe dels llocs d'*splicing* (Valcarcel, Singh et al. 1993), al reclutament positiu de la maquinària d'*splicing* (Zuo and Maniatis 1996), mecanismes que es compliquen quan es considera el procés des d'una vessant dinàmica, composta d'una sèrie de passos cinètics (Zuo and Maniatis 1996), i no únicament bioquímica (Smith, Query et al. 2008).

El primer punt de regulació el constitueixen els tres elements clàssics de reconeixement dels introns constitutius, 5'ss, 3'ss i el BP i les seqüències accessòries ESE, ESS, ISE i ISS. L'eficiència de l'*splicing* dependrà del grau de conservació de les seqüències consens i del reconeixement d'aquests elements accessoris. La interrelació d'aquests factors que es troben en *cis* i els factors en *trans* modulen la interacció de molts complexos proteics de DNA i RNA que intervindran en la regulació. El context genètic d'aquests elements i la seva distribució també són molt importants per a la regulació. Cal destacar la seva localització en relació amb els exons (Wang and Burge 2008). La tendència és trobar-se agrupats al voltant dels llocs d'*splicing* (Berget 1995) i presentar-se amb una densitat major en exons constitutivament expressats, on destaca una distribució diferenciada dels motius d'unió a proteïnes SR (Wang, Smith et al. 2005). L'equilibri de tots aquests elements serà essencial per controlar el nivell d'inclusió dels transcrits (Smith and Valcarcel 2000).

Actualment, el número conegut d'elements reguladors d'*splicing* no arriba a 50, i són menys de 300 les proteïnes d'unió a RNA conegudes, per tant elles soles no poden ser les responsables de controlar tots els processos d'*splicing* descrits fins al moment. Hi ha alguns casos en que l'AS pot estar regulat per mecanismes que no involucren els elements reguladors esmentats anteriorment. Cal destacar factors que tenen efectes importants en els patrons d'expressió, com la velocitat de transcripció (Kornblihtt 2007), els nivells dels diferents components de la maquinària d'*splicing* presents a la cèl·lula (Park, Parisky et al. 2004; Pleiss, Whitworth et al. 2007), la mida dels introns (Fox-Walsh, Dou et al. 2005), la competència entre llocs d'*splicing* (Yu, Maroney et al. 2008) o l'estructura de la cromatina (Allo, Buggiano et al. 2009; Kornblihtt, Schor et al. 2009; Schwartz, Meshorer et al. 2009).

4.3 *Splicing* i malaltia

L'AS és un procés altament regulat que no es basa en un sistema del tot o res, sinó en un equilibri en les proporcions dels diferents mRNAs, que pot ser modulable segons el teixit, l'etapa de desenvolupament o els senyals intra- i extracel·lulars. És important determinar quines variables d'*splicing* s'expressen en cada moment, en cada localització, la seva abundància i la seva funció biològica per entendre no només la funció del gen, sinó també per saber com la funció del mateix s'altera en cas de malaltia (Zhong, Liu et al. 2006). Defectes en aquest procés estan relacionats amb múltiples malalties i amb la seva severitat, entre elles la FQ. Aquests defectes poden sorgir com a resultat de mutacions en la seqüència que alteren els elements i els factors d'*splicing* o per l'expressió desequilibrada de les diferents formes constitutives i alternatives d'un gen (Pettigrew and Brown 2008). Per determinar les potencials conseqüències sobre l'*splicing* d'una variació de seqüència s'han de tenir en compte

tots els factors que intervenen en el procés. En el cas de *CFTR*, un 12% de mutacions han estat classificades com a mutacions d'*splicing*, però en un 40% d'aquestes no es coneix el mecanisme pel qual afecten aquest procés (Faa, Coiana et al. 2010).

L'efecte deleteri en l'expressió gènica de grans delecions, canvis de nucleòtids als llocs consens GU/AG, variacions que produeixen codons *stop*, canvis radicals d'aminoàcid o variacions significatives al promotor són relativament fàcils de predir. Variacions en els nucleòtids flanquejants a GU/AG són més difícils de classificar com a deletèries per la variabilitat en les seqüències consens (Zhang, Li et al. 2008). Canvis *missense* i sinònims són ignorats, en la majoria d'ocasions, perquè només es considera l'efecte sobre la funció proteica. El mateix succeeix amb mutacions en els introns que tampoc són avaluades pel seu potencial efecte sobre l'*splicing*. Estudis recents han emfatitzat la importància del que prèviament era caracteritzat com a polimorfismes d'un sol nucleòtid localitzat en zones codificants (cSNP). De fet, els cSNPs poden afectar directament diferents elements que influeixen en el reconeixement dels exons, per exemple, per la disrupció o creació d'ESEs i/o ESSs (Pagani and Baralle 2004). Pagani i col·l. (2004) identifiquen seqüències exòniques que intervenen en el procés de regulació induint nivells variables de proteïna normal. L'efecte d'aquestes seqüències anomenades *composite exonic regulatory elements of splicing* (CERES) és dependent del context en què es troben i pot augmentar o disminuir l'eficiència de l'*splicing*. L'anàlisi d'aquests elements ha posat de manifest que aproximadament el 30% de mutacions silencioses identificades a l'exó 12 de *CFTR* redueixen la seva inclusió i es troben sota pressió selectiva per assegurar l'eficiència de l'*splicing* (Pagani and Baralle 2004).

L'anàlisi genètica dels gens *NF1* i *ATM* ha mostrat que en més del 50% dels pacients, les mutacions causen defectes en l'*splicing* (Teraoka, Telatar et al. 1999; Ars, Serra et al. 2000). Mutacions puntuals són les responsables de l'*splicing* aberrant. Les grans delecions o inversions genòmiques també produeixen alteracions en els patrons d'*splicing*, perquè apropen llocs acceptors i donadors que d'altra manera estarien massa lluny per interactuar o activen exons que estarien en la cadena antisentit de l'RNA. A més, altres mutacions poden afectar els elements que actuen en *trans*, els diferents components de la maquinària d'*splicing* o alterar la regulació del procés per l'expressió inadequada de les diferents isoformes d'mRNA.

Mutacions en *cis*: Són aquelles mutacions que només afecten el fragment de DNA que les conté físicament. Poden trobar-se en els senyals d'*splicing* o en les seqüències auxiliars, per tant alterarien la unió dels diferents factors d'*splicing* o de les proteïnes reguladores. L'expressió final del gen mutat pot donar lloc a formes d'*splicing* aberrant, produir alteracions en la proporció d'isoformes de la proteïna, activar la via de l'NMD o alterar l'expressió local o temporal (Cooper and Mattox 1997; Pagani and Baralle 2004). Hi ha altres mutacions que afecten seqüències que es troben lluny d'on

s'ha produït la mutació activant senyals d'*splicing* preexistents (Pagani, Buratti et al. 2002), consistents amb la proposta de què els introns contenen seqüències inhibidores de l'*splicing* (Fairbrother and Chasin 2000). En la major part dels casos, la utilització dels llocs d'*splicing* no naturals o retenció d'introns produeix una alteració de la pauta de lectura i com a conseqüència PTCs que resulten en la degradació per NMD i en la pèrdua de l'al·lel mutat.

Mutacions en *trans*: Es troben a gens que codifiquen per proteïnes de la maquinària d'*splicing* o dels complexos reguladors de l'*splicing* o per factors de transcripció, per tant el seu efecte és principalment deleteri. No afecten un únic gen sinó el conjunt de gens controlats pel gen mutat. La dependència de l'expressió de factors que actuen en *trans* també representa una característica important a l'hora d'explicar la variabilitat en les característiques d'una malaltia, com l'edat de presentació, la susceptibilitat individual o l'afectació d'uns òrgans en concret.

Conèixer i entendre el mecanisme d'*splicing* i el seu paper en malaltia expandeix el potencial per a la creació de noves teràpies adreçades directament a la causa o per evitar els processos danyats. La identificació d'aquestes mutacions, a més a més, és molt important per a l'assessorament genètic.

OBJECTIUS

Com s'ha evidenciat al llarg de la introducció, el procés d'*splicing* està estrictament regulat per diferents seqüències genòmiques i factors de transcripció. Aquest fi engranatge és susceptible de veure's afectat de forma absoluta o parcial per la presència de mutacions, donant lloc a un número variable de transcrits i, en conseqüència, a un ampli espectre fenotípic. Per tant, determinar la quantitat de transcrits normals és un paràmetre fonamental, que permet una estimació de l'abundància de proteïna funcional.

L'RT-qPCR ha demostrat ser un mètode útil per quantificar l'expressió gènica en mostres amb un número de cèl·lules reduït, una condició que afavoreix l'estudi de gens amb baixa expressió en mostres limitades. En la FQ, aquestes característiques havien suposat una limitació per al desenvolupament d'estudis *ex vivo*. Ara les cèl·lules de l'epiteli nasal, representatives de la mucosa pulmonar, constitueixen un model idoni per abordar aquest tipus d'estudi.

Partint d'aquestes premisses, l'objectiu principal del projecte ha estat l'estudi dels mecanismes moleculars subjacents en mutacions *CFTR* que afecten l'*splicing*, mitjançant el desenvolupament de tècniques complementàries per a la seva caracterització a nivell de DNA, RNA i proteïna.

Per dur a terme el projecte s'han abordat els següents objectius específics:

- 1) Anàlisi genòmica i selecció de mostres.
- 2) Identificar mutacions amb *splicing* aberrant.
- 3) Optimitzar el raspallat nasal i validar les cèl·lules epitelials.
- 4) Determinar l'eficiència del procés d'*splicing*.
 - a. Validar gens de referència.
 - b. Quantificar transcrits.
- 5) Localitzar la proteïna en frotis nasal.
- 6) Correlacionar els paràmetres moleculars amb el fenotip.

MATERIAL I MÈTODES

1.- TIPUS CEL·LULARS

En aquest treball s'han utilitzat quatre tipus de mostres: 1) mostres d'epiteli nasal (EN) de pacients i controls (CTLs), 2) pòlip nasal (PN) d'un pacient FQ, 3) dues línies cel·lulars, HEK293 i 16HBE14o i 4) sang perifèrica. Els cultius cel·lulars han servit per a la posada a punt dels diferents protocols utilitzats en el treball amb RNA i com a control positiu i negatiu en les tècniques histològiques. El PN ha estat emprat per comprovar que els protocols desenvolupats en línia cel·lular eren adients en mostres i condicions molt més semblants a EN, que han estat les mostres en les que s'han dut a terme els estudis. De la mostra de sang perifèrica se n'ha extret el DNA pel cribatge mutacional dels individus.

1.2 Epiteli nasal

La importància de validar l'EN com a mostra per a la realització de l'estudi ve donada per la gravetat de la malaltia a nivell del sistema respiratori. El pulmó és el teixit idoni per dur a terme la recerca en FQ perquè és el teixit més afectat per la malaltia, però presenta dos problemes importants. La necessitat d'utilitzar una tècnica invasiva per obtenir la mostra, dificulta comptar amb un número suficient d'individus, i la presència de bacteris responsables d'infeccions recurrents que la contaminen. L'EN es presenta com una bona alternativa per la seva semblança en composició a l'epiteli pulmonar i té l'avantatge de ser fàcilment obtingut, el que permet comptar amb un major número de mostres (Penque, Mendes et al. 2000).

L'EN s'ha utilitzat per a l'obtenció d'RNA i per a les tècniques d'immunohistoquímica (IHQ) i immunofluorescència (IF). Per a l'obtenció de la mostra es van testar diferents tipus de raspalls, per tal de trobar el que permetés escamar bé l'EN i reduir el trencament de les cèl·lules, que degradaria el material de partida. Moltes publicacions utilitzen raspalls interdentials i en menor freqüència raspalls de citologia. En aquest treball es van fer proves amb ambdós tipus i el rendiment més elevat es va obtenir amb el raspall de citologia (Cat 07020000, Eurogene S.L.).

PROTOCOL

Tot el material utilitzat és lliure d'RNases:

- 1) Netejar la cavitat nasal del pacient amb solució salina.
- 2) Raspallar la part inferior dels cornets amb un raspall de citologia.
- 3) Col·locar immediatament el raspall en un eppendorf amb 1 ml d'RNAlater (Cat 50976106, Qiagen).
- 4) Netejar el raspall amb l'ajuda d'una punta de pipeta prèviament tallada amb una ganiveta estèril per recuperar el màxim de cèl·lules possibles.

- 5) Guardar els tubs a 4 °C durant 24 h i procedir a l'extracció d'RNA o bé guardar-los a -80 °C fins a l'extracció.

Per a les diferents tècniques d'histologia emprades, el procediment d'obtenció ha estat el mateix que per l'extracció d'RNA. En aquest cas, les cèl·lules obtingudes després del raspallat es conserven en medi de cultiu DMEM/F12 (1:1) (Dubelcco's modified eagle's medium/F12. Cat 21331-020, Invitrogen) en gel i en el menor temps possible es porten al laboratori, on es centrifuguen i es fixen en fred amb una solució de formaldehid al 4% durant 30 minuts. Passat aquest temps, es centrifuguen i es resuspenen en un tampó fosfat 1x (PBS). L'ús d'una citocentrífuga (Cytospin 4. Cat A78300002, Thermo scientific) ha permès l'extensió de cèl·lules en portaobjectes per realitzar les tincions. S'han realitzat diferents proves amb altres fixadors i condicions per comprovar amb quin mètode s'obtenia una major quantitat cel·lular, evitant la pèrdua tant de la morfologia com de les característiques epitelials de les cèl·lules.

PROTOCOL

- 1) Netejar la cavitat nasal del pacient amb solució salina.
- 2) Raspallar la part inferior dels cornets del pacient amb un raspall de citologia.
- 3) Posar el raspall en un eppendorf amb 1 ml de medi de cultiu DMEM/F12 (1:1) i conservar-lo ràpidament en gel per evitar la degradació.
- 4) Netejar el raspall amb l'ajuda d'una punta de pipeta prèviament tallada amb una ganiveta estèril per recuperar el màxim de cèl·lules possibles.
- 5) Centrifugar durant 5' a 3.000 rpm.
- 6) Aspirar el sobrenedant i incubar la mostra en gel durant 30' en 1 ml de solució de formaldehid al 4% i 3,7% de sacarosa.
- 7) Centrifugar durant 5' a 3.000 rpm.
- 8) Aspirar el sobrenedant i afegir 1 ml de PBS 1x fred al botó cel·lular.
- 9) Repetir els passos 7-8 dues vegades.
- 10) Centrifugar durant 5' a 3.000 rpm i afegir de 300 a 1.000 µl de PBS 1x depenent de la mida del botó cel·lular.
- 11) Centrifugar les cèl·lules en portaobjectes prèviament tractats amb poli-l-lisina (Poly-L-Lysine solution. Cat P8920, Sigma), en una citocentrífuga durant 5' a 800 rpm.
 - Preparar una dissolució de poli-l-lisina 1:10 en aigua destil·lada.
 - Rentar els portaobjectes en etanol 70% i deixar-los assecar completament.
 - Posar els portaobjectes en la dissolució de poli-l-lisina durant 5'.
 - Assecar-los 1 h a 60 °C o a temperatura ambient (TA) tota la nit.

- 12) Deixar assecar els portaobjectes i conservar-los a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins a la seva utilització.

1.2 Pòlip nasal

La mostra de pòlip nasal (PN) prové d'un pacient homozigot per la mutació p.Phe508del.

1.3 Línies cel·lulars

La primera línia cel·lular que s'ha emprat prové de ronyó embrionari humà, HEK293, i ha estat transfectada amb un plasmidi que conté el gen *CFTR* en la seva forma salvatge (wt), per tant *CFTR* es troba sobreexpressat. El plasmidi (pCMVCFTRNot6.2wt) ha estat cedit per la Dra J. Rommens.

HEK293 s'ha emprat per posar a punt el protocol d'extracció d'RNA i la transcripció inversa. Les cèl·lules es cultiven en medi DMEM (Cat 61965-026, Invitrogen) complementat (DMEMC) amb 10% de sèrum fetal boví (FBS) (Cat 16000044, Invitrogen), 100 U/ml de penicil·lina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'estreptomicina (Cat 15140-122, Invitrogen) i 2 mM de glutamina (Cat 25030-149, Invitrogen) i es mantenen en una atmosfera humida a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ amb un 5% de CO_2 . La transfecció amb el plasmidi s'ha realitzat amb el reactiu Polyfect transfection reagent (Cat 301105, Qiagen) seguint les instruccions del fabricant. Les cèl·lules (5×10^6) en cultiu es recullen 48 h post transfecció en el tampó de lisi corresponent als diferents kits d'extracció d'RNA a utilitzar i es conserven a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins al seu processament.

PROTOCOL

CULTIUS

- 1) Engagar la campana 20' abans de començar a treballar. Escalfar els medis i les solucions necessàries a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 2) Netejar la campana amb aigua destil·lada i etanol 70%.
- 3) Treure una alíquota de cèl·lules del nitrogen líquid. Descongelar-les en un bany a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 4) En un tub cònic (15 ml), posar 9 ml de medi DMEMC i 1 ml de la línia cel·lular prèviament descongelada.
- 5) Centrifugar a 1.000 rpm durant 5'.
- 6) Descartar el sobrenedant i resuspendre en 8 ml de medi DMEMC.
- 7) Sembrar en una placa de 100 mm de diàmetre.
- 8) Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ amb un 5% CO_2 durant 24 h.
- 9) Treure les cèl·lules de l'incubador i mirar-ne l'aspecte. Sempre treballar el més ràpid possible per no variar les condicions de temperatura i CO_2 .

- 10) Aspirar el medi.
- 11) Posar 10 ml de medi DMEMC.
- 12) Mantenir les cèl·lules a l'incubador durant 48 h.
- 13) Repetir els passos 9-10.
- 14) Afegir 1 ml de tripsina/EDTA 1X (Cat 25200062, Invitrogen).
- 15) Posar la placa a l'incubador durant 2', donar-li uns copets per desenganxar les cèl·lules.
- 16) Afegir 5 ml de DMEMC a la placa per inactivar la tripsina.
- 17) Recollir les cèl·lules en un tub cònic (15 ml) i afegir medi fins a 10 ml.
- 18) Comptar les cèl·lules en la càmera de Neubauer (10 μ l).
- 19) Centrifugar a 1.000 rpm durant 5'.
- 20) Aspirar el sobrenedant.
- 21) Resuspendre el pèl·let en 12 ml de DMEMC.
- 22) Afegir 1 ml de suspensió cel·lular i 10 ml de DMEMC en una nova placa.
- 23) Incubar a 37 °C i un 5% CO₂ durant 72 h.
- 24) Repetir el procediment quan les cèl·lules estiguin confluents.

TRANSFECIÓ

- 1) Preparar la següent mix per cada una de les plaques a transfectar:
 - 204 μ l de DMEM
 - 16 μ l (500 ng/ μ l) DNA pCMVCFTRNot6.2wt
 - 80 μ l de Polyfect transfection reagent
- 2) Retirar el medi de la placa i afegir 7 ml de DMEMC.
- 3) Afegir la mix preparada gota a gota a la placa.
- 4) Incubar durant 48 h.
- 5) Recollir les cèl·lules transfectades (passos 14-22).

CONGELACIÓ DE CÈL·LULES

- 1) Centrifugar a 1.000 rpm durant 5'.
- 2) Treure el medi sense endur-se el botó cel·lular.
- 3) Resuspendre en medi de congelació.
- 4) Repartir les cèl·lules en criotubs, 1,5 x 10⁶ cèl·lules en 1 ml de medi.
- 5) Posar-les en un *frosty* a -80 °C 16 h i posteriorment congelar-les en nitrogen líquid.

La segona línia cel·lular emprada ha estat una línia epitelial bronquial humana anomenada 16HBE14o-. Es deriva de la primera bifurcació de bronquis humans i expressa *CFTR* de manera endògena. Aquesta segona línia cel·lular ha estat utilitzada com a control positiu i negatiu en les tincions immunohistoquímiques. Les cèl·lules

es cultiven amb medi MEM w/Earle's salt (Cat 31095-029, Invitrogen) en plaques prèviament tractades amb una solució de fibronectina (FCS), per facilitar l'adherència de les cèl·lules, i es mantenen en un incubador a 37 °C amb un 5% de CO₂. Posteriorment es fixen directament a la placa amb metanol durant 10' a -20 °C i es conserven en PBS fins a la seva utilització.

PROTOCOL

- 1) Engegar la campana 20' abans de començar a treballar i escalfar els medis i les solucions necessàries a 37 °C.
- 2) Netejar la campana amb aigua destil·lada i etanol 70%.
- 3) Posar 1,5 ml de FCS a les plaques de 100 mm i 500 µl en cada un dels pouets d'una placa de sis pous. Cada un dels pous té dos cobreobjectes rodons.
- 4) Incubar a 37 °C durant 3 h.
- 5) Aspirar l'FCS, tapar les plaques amb paper de plata i conservar-les a 4 °C fins a realitzar els cultius cel·lulars.
- 6) Treure una alíquota de cèl·lules del nitrogen líquid. Descongelar-les en un bany a 37 °C.
- 7) En un tub cònic (15 ml), posar 9 ml de MEM w/Earle's salt i 1 ml de 16HBE14o-prèviament descongelats.
- 8) Centrifugar a 1.000 rpm durant 5'.
- 9) Descartar el sobrenedant i resuspendre en 8 ml de MEM w/Earle's salt.
- 10) Posar la suspensió cel·lular en una placa de 100 mm de diàmetre.
- 11) Incubar a 37 °C amb un 5% CO₂ fins a la seva confluència.
- 12) Treure les cèl·lules de l'incubador i mirar l'aspecte. Sempre treballar el més ràpid possible per no variar les condicions de T^a i CO₂.
- 13) Aspirar el medi.
- 14) Afegir 1 ml de tripsina/PET.
- 15) Posar la placa a l'incubador durant 4'. Donar-li uns copets per desenganxar les cèl·lules.
- 16) Posar 5 ml de MEM w/Earle's salt per inactivar la tripsina/PET i resuspendre les cèl·lules.
- 17) Passar-les a un tub cònic de 15 ml.
- 18) Comptar les cèl·lules en la càmera de Neubauer (10 µl).
- 19) Centrifugar a 1.000 rpm durant 5'.
- 20) Treure el medi sense endur-se el botó cel·lular.
- 21) Resuspendre el botó cel·lular en MEM w/Earle's salt per sembrar 2 x 10⁵ cèl·lules en cada pouet per a l'IHQ.

RECOLLIDA DE CÈL·LULES PER IMMUNOHISTOQUÍMICA

- 1) Rentar els pous amb PBS 1X fred.
- 2) Repetir el procés 3 vegades.
- 3) Fixar amb metanol, 10' a -20 °C.
- 4) Rentar tres vegades amb PBS 1x.
- 5) Mantenir les cèl·lules en PBS 1x fins a realitzar la IHQ.

A l'apartat 9 es poden trobar els diferents reactius i la preparació de les solucions utilitzades en aquests protocols.

1.4 Sang

S'ha obtingut sang total amb anticoagulant EDTA, aproximadament 8 ml, de tots els individus. El DNA extret s'ha utilitzat per al cribatge del gen *CFTR*.

2.- PACIENTS I CONTROLS

Les mostres emprades en aquest treball provenen de la Unitat de Fibrosi Quística de l'Hospital Vall d'Hebron. El protocol utilitzat per a l'obtenció de mostres ha estat prèviament aprovat pel comitè d'ètica i tots els individus han signat un consentiment informat.

Els individus s'han agrupat segons el seu genotip. En primer lloc, el grup de CTLs, negatius que reuneix individus sense criteris diagnòstics de FQ i amb cap mutació al gen (wt/wt). El segon grup està format per individus afectats de FQ i homozigots per la mutació p.Phe508del (p.Phe508del/p.Phe508del) i serà el grup de CTLs positius. El tercer grup consta d'individus sense simptomatologia associada a FQ però que són portadors d'una mutació al gen (CF/wt). L'últim grup està format per individus afectats de FQ, que anomenarem grup de pacients (CF/CF).

De tots els individus s'ha obtingut mostra d'EN i sang perifèrica.

3.- NOMENCLATURA

En aquest treball s'ha utilitzat el sistema de nomenclatura indicat per la Human Genome Variation Society (HGVS). A l'annex I s'indica el nom de cada una de les mutacions citades segons el seu nom comú (*Legacy name*), que numera l'A del codó ATG +133 (GenBank NM_00492.3; www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) i que ha estat utilitzada fins ara per la CFMDB (www.genet.sickkids.on.ca).

4.1 Anàlisi de les seqüències d'*splicing*

Basats en les seqüències consens dels elements d'*splicing*, diversos programes informàtics han estat desenvolupats per a la predicció de la seva localització i les conseqüències de les seves alteracions.

Les seqüències dels diferents exons en estudi i les seves regions flanquejants han estat analitzades amb el programa Splice Site Prediction by Neural Network (www.fruitfly.org) (Reese, Eeckman et al. 1997), que atorga un valor entre 0 i 1 (*score*) a cada seqüència que detecta com a susceptible de ser lloc acceptor o donador d'*splicing*. El valor 0 indica els llocs amb menor afinitat per la maquinària d'*splicing*, mentre que 1 són els llocs de major afinitat. La comparació dels valors (*score*) obtinguts, tant en la seqüència wt com en les diferents mutacions estudiades, ofereix una idea del seu possible efecte en el procés d'*splicing*.

Per completar l'estudi, s'han analitzat els efectes de les mutacions en els elements exònics (ESEs) emprant els programes ESEfinder 3.0 (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>) (Cartegni, Wang et al. 2003; Smith, Zhang et al. 2006) i Rescue Ese (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>) (Fairbrother, Yeh et al. 2002). La identificació d'aquests elements és especialment rellevant en aquells exons que presenten llocs dèbils d'*splicing*. El primer programa identifica com a ESE les seqüències consens d'unió a proteïnes SR (SF2/ASF, SC35, SRp40 i SRp55) i els atorga un valor (*score*). La comparació d'aquests valors, tal com passa en el cas anterior, ens dóna una idea del possible efecte de la mutació en el procés d'*splicing*. El segon programa identifica hexanucleòtids consens en les seqüències com a possibles ESEs i permet comparar l'al·lel wt i el mutant per i comprovar si hi ha guanys o pèrdues.

Totes les dades s'han comprovat i ampliat amb el programa Alamut™ (www.interactive-biosoftware.com/alamut.html). L'anàlisi amb aquest programa ha permès la utilització de diferents algoritmes per a l'estudi de les alteracions intròniques. L'Alamut™ empra els algoritmes dels següents programes: 1) MaxEntScan, 2) NNSplice, 3) GeneSplicer i 4) Splice Site Finder like. Els elements exònics són analitzats pels programes prèviament esmentats, ESEfinder i Rescue Ese.

Totes les mutacions estudiades (intròniques i exòniques) han estat analitzades amb aquests quatre programes a partir de seqüències en format *Fast-all* (FASTA) (Lipman and Pearson 1985) obtingudes del CFMDB.

4.2 Anàlisi de la seqüència proteica

Les mutacions que donen lloc a canvis d'aminoàcids també poden ser analitzades a nivell teòric mitjançant programes que permeten la predicció del possible

efecte en la funció i en l'estructura proteica. Aquestes prediccions estan basades en les propietats físiques dels aminoàcids i la seva localització, en l'estructura proteica global i en les homologies de la seva seqüència amb la d'altres de diferents espècies.

En aquest treball s'han emprat dos programes per predir l'efecte del canvi d'aminoàcid en diferents posicions de la proteïna CFTR. El primer, ha estat el programa SIFT, Sorting Intolerant From Tolerant (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) (Ng and Henikoff 2002). S'ha introduït la seqüència de la proteïna i els canvis que es volien testar i com a resultat s'ha obtingut l'alineació de CFTR amb altres proteïnes homòlogues i un valor (*score*) calculat basant-se en els aminoàcids que apareixen a cada una de les posicions de l'alineació. Valors menors a 0,05 es consideren com a no tolerats, per tant la proteïna no seria funcional. El segon programa emprat ha estat el PolyPhen, Polymorphism Phenotyping (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) (Ramensky, Bork et al. 2002) que, encara que també es basa en l'alineació de seqüències, utilitza un algoritme de càlcul diferent al del SIFT anomenat PSIC. Aquest crea una matriu de ràtios logarítmiques de la probabilitat que l'aminoàcid estigui en aquesta posició i no en qualsevol altra. El programa dóna el valor absolut de la diferència dels dos aminoàcids testats, el normal i el mutant. Aquest valor s'utilitza per determinar si el canvi afecta probablement, possiblement o és benigne per a la proteïna. Ambdós programes també es troben inclosos en l'Alamut™.

5.- CFTR: ANÀLISI MUTACIONAL

S'han estudiat les vint-i-set regions codificants *CFTR* i les seves seqüències annexes, a més de la regió polimòrfica c.1210-12(T)3-9. El protocol seguit ha estat el següent:

- Extracció de DNA genòmic de sang perifèrica.
- Amplificació dels exons i seqüències annexes mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).
- Cribatge de mutacions i SNPs mitjançant les tècniques de SSCP/HD i DGGE.
- Seqüenciació directa de les mostres amb patrons alterats en les tècniques de cribatge.

5.1 Extracció de DNA

El DNA s'ha aïllat de sang perifèrica utilitzant el kit de purificació Wizard® Genomic DNA (Cat 1620, Promega) seguint les instruccions del fabricant.

PROTOCOL

- 1) Per cada 1 ml de mostra afegir 3 ml de tampó *cell lysis solution* en un tub cònic

- de 50 ml.
- 2) Agitar suaument durant 10' a TA.
 - 3) Centrifugar a 4.500 rpm durant 10' a TA.
 - 4) Decantar el sobrenedant i resuspendre el botó cel·lular amb l'ajuda d'un vòrtex.
 - 5) Afegir la mateixa quantitat de tampó *nuclei lysis solution* que teníem inicialment de sang i barrejar amb una pipeta *pasteur*.
 - 6) Afegir *protein precipitation solution* (1/3 del volum inicial de sang) i resuspendre amb l'ajuda d'un vòrtex fins a observar un precipitat.
 - 7) Centrifugar a 4.500 rpm durant 10' a TA.
 - 8) Passar el sobrenedant a un tub de 50 ml, on prèviament s'ha posat el volum inicial d'isopropanol. Barrejar la solució fins a veure aparèixer la medusa.
 - 9) Recollir la medusa i rentar-la amb etanol 70%. Deixar-la assecar.
 - 10) Posar la medusa en un criotub, on prèviament s'haurà posat un volum de *rehydration solution* (≥ 500 ml).
 - 11) Deixar en agitació 16 h.
 - 12) Comprovar que el DNA s'ha resuspès i, si no és així, afegir més *rehydration solution* i mantenir-lo en agitació.

5.2 Quantificació d'àcids nucleics

Els àcids nucleics absorbeixen llum a longituds d'ona entre 250-270 nm amb un màxim a 260 nm. La lectura a 260 nm permet el càlcul de la concentració d'àcid nucleics en una mostra de DNA o RNA. Una densitat òptica de valor 1 correspon aproximadament a 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de doble cadena i a 40 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de cadena senzilla o RNA.

La relació entre les lectures de 260 nm i 280 nm proporciona una estimació de la puresa dels àcids nucleics. Les preparacions pures de DNA i RNA tenen unes pureses de 1,8 i 1,95, respectivament. Es consideraran purs aquells RNAs amb una relació 260/280 nm entre 1,8 i 2,1 i els DNA entre 1,8 i 2,0.

5.3 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR és una tècnica molecular bàsica per a l'amplificació tant de fragments de DNA com de cDNA. Cada un dels fragments a amplificar requereix una optimització precisa per evitar l'amplificació inespecífica. El disseny d'encebadors, la temperatura d'anellament, el número de cicles o la concentració de reactius són factors a tenir en compte en l'optimització de la tècnica. Els encebadors utilitzats han estat dissenyats de manera manual o utilitzant els programes Primer Express (Applied Biosystems) o Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3>).

Totes les reaccions s'han realitzat amb l'enzim *Taq* DNA polimerasa i el seu tampó corresponent (Cat 1147-633, Roche) en un termociclador Geneamp PCR system 9700 d'Applied Biosystems.

PROTOCOL

- 1) Preparar la mix (μl /mostra):

Tampó 10x	2,5 μl
dNTP's 1,25 mM	3 μl
Encebador directe	15 pmol
Encebador revers	15 pmol
Taq polimerasa (5 U/ μl)	0,15 μl
Aigua destil·lada csp	25 μl

- 2) Distribuir la mix en tubs de 0,2 ml i afegir de 200 a 400 ng de DNA.
- 3) Posar les mostres al termociclador i iniciar el programa corresponent:

94°C	5'	
94°C	20''	
Tª anellament	30''	30-40 cicles
72°C	30''	
72°C	7'	

5.4 Electroforesi

L'electroforesi permet la separació de molècules amb càrrega elèctrica que es troben en solució. Les mostres es sotmeten a un camp elèctric que afavoreix la seva migració a través d'una matriu d'agarosa o d'acrilamida. La velocitat de migració de les molècules és directament proporcional a la seva càrrega i inversament proporcional a la seva mida.

5.4.1 Gels d'agarosa

Els gels d'agarosa s'han emprat per a la visualització dels fragments amplificats per PCR que posteriorment han estat emprats per les tècniques de criatge.

PROTOCOL

- 1) Pesar la quantitat necessària d'agarosa (Cat 8008, Pronadisa. Laboratorios Conda) depenent del tant per cent i el volum final.
- 2) Dissoldre per calor l'agarosa en tampó Tris: Borate: EDTA (TBE) 0,5x.
- 3) Posar la solució d'agarosa tibia en un motlle horitzontal prèviament segellat i col·locar una pinta amb els pouets necessaris per carregar les mostres.
- 4) Deixar solidificar la mescla.

- 5) Preparar les mostres (proporció 3:1, mostra: tampó de càrrega).
- 6) Retirar la pinta i submergir el gel en la cubeta d'electroforesi prèviament omplerta amb TBE 0,5x.
- 7) Carregar les mostres i un marcador de pes molecular en un dels extrems.
- 8) Connectar la cubeta a una font d'alimentació (80-100 v) i deixar córrer les mostres fins a aconseguir la separació desitjada.
- 9) Tenyir el gel amb una solució de bromur d'etidi (0,5 µg/ml) durant 15-20'. Si l'agarosa s'ha fet amb SYBR safe® (10:1, agarosa:SYBR safe) (Cat S33102, Invitrogen) no és necessari fer aquest pas.
- 10) Visualitzar els fragments en un transil·luminador de llum ultraviolada.

5.4.2 Gels de poliacrilamida

Per a la separació acurada de fragments petits s'han utilitzat els gels d'acrilamida. La porositat dels gels ve donada per la concentració total d'acrilamida en el gel i per la proporció relativa d'acrilamida:bis-acrilamida, que és la que permet la separació. Aquest gel han estat utilitzats per a la caracterització qualitativa de transcrits normals i alternatius de diferents mutacions del gen *CFTR* prèviament estudiades de forma teòrica. Els encebadors d'amplificació han estat dissenyats als exons adjacents on es troben les mutacions en estudi (Taula 2).

PROTOCOL (per gels de 20x20 cm i 6% d'acrilamida)

- 1) Netejar els dos vidres necessaris per fer l'acrilamida amb aigua destil·lada i una vegada secs amb etanol al 70%.
- 2) Col·locar els dos vidres un sobre l'altre amb dos separadors (0,8 mm) i posar una pinça a cada extrem.
- 3) Preparar l'acrilamida.
- 4) Per capil·laritat col·locar la mescla entre els dos vidres lentament evitant que es formin bombolles i posar la pinta.
- 5) Deixar polimeritzar mínim 1 h.
- 6) Col·locar el gel en una cubeta d'electroforesi vertical que prèviament s'ha omplert de TBE 0,5x.
- 7) Preparar les mostres:
 - 3 µl de solució de càrrega
 - 10-12 µl d'amplificat (depenent de la quantitat del mateix)
 - 10-12 µl de marcador
- 8) Carregar les mostres al gel i deixar córrer el temps necessari per a la seva separació (depenent de la mida dels fragments) a 160 v.
- 9) Una vegada finalitzada l'electroforesi, separar els dos vidres amb ajuda d'un

dels separadors, intentant que el gel quedi en un dels vidres i procurant que no es trenqui.

- 10) Tenyir el gel en una solució de BrEt (0,5 µg/ml) durant uns 15-20'.
- 11) Visualitzar els fragments en un transil·luminador de llum ultraviolada.

A l'apartat 9 es poden trobar els diferents reactius i la preparació de les solucions utilitzades en aquests protocols.

Taula 2.- Encebadors d'amplificació de cDNA de CFTR

Oligonucleòtids emprats per a l'amplificació dels fragments de cDNA corresponents a les diferents mutacions *missense* i d'*splicing* estudiades.

Exó	Encebadors amplificació	Seqüència dels encebadors 5' > 3'	Tª	Mida fragment
5	ex4F	CCA TTT TTG GCC TTC ATC AC	58	247
	ex6aR	GGC AGA CGC CTG TAA CAA CT		
6a	ex5F	AAG CTG TCA AGC CGT GTT CT	58	347
	ex6bR	CAT TGC TTC TTC CCA GCA GT		
6a	ex5F2	GAC AAC TTG TTA GTC TCC TTT CC	55	294
	ex6aR2	CCA ATC TGT TAA GGC ATA CTG		
12	ex11F	ATC ACA CTG AGT GGA GGT CAA	55	238
	ex13R	TTG CAT GAA GGT AGC AGCT		
14a	ex14aF	TCG ATA TAT TAC TGT CCA C	56	211
	ex15R	CAC GTA AAT GTA AAA CAC ATG AT		
15	ex14aF	GTG GCT GCT TCT TTG GTT GT	58	346
	ex16R	GAG GCA GAA GGT CAT CCA AA		
18	ex17bF	AAC ACT GCG CTG GTT CCA AAT	55	214
	ex19R	CTT AAA GAC TCG GCT CAC AGA		
20	E19D1	GCC CGA CAA ATA ACC AAG TGA	55	465
	E21R2	ACT CCA CTG TTC ATA GGG ATC CAA		

5.5 Cribatge del gen

S'han utilitzat dues tècniques de cribatge: l'anàlisi de la conformació de la cadena senzilla (SSCP/HD) i d'electroforesis en gel de gradient desnaturalitzant (DGGE). Les tècniques de cribatge mostren una sensibilitat per a la detecció de mutacions puntuals i es basen en què qualsevol alteració que es produeix en la seqüència d'un fragment de DNA modifica la seva estructura i determina un canvi en la seva mobilitat, el qual és detectable en un camp elèctric. Per obtenir una bona sensibilitat (>95%) amb aquestes tècniques es recomana que la mida dels fragments no sigui superior a 500 pb.

5.5.1 SSCP/HD

La tècnica dels SSCP/HD (Orita, Suzuki et al. 1989) permet la separació electroforètica d'àcids nucleics de cadena senzilla basant-se en petites diferències

en la seva seqüència (fins a una única base). Una conformació secundària diferent produeix patrons de mobilitat alterats que es visualitzen en un gel no desnaturalitzant. Per separar i visualitzar els fragments s'ha utilitzat el sistema electroforesi horitzontal Genephor (Cat 18-1115-82, GE Healthcare Europe GMBH) amb gels comercials de poliacrilamida al 12,5% (Cat 17-6000-14, GE Healthcare Europe GMBH) i tinció amb nitrat de plata (DNA Silver Staining Kit. Cat 17-6000-30, GE Healthcare Europe GMBH). S'han analitzat tots els exons amb excepció del 9 i el 14a.

PROTOCOL

- 1) Amplificar els exons de *CFTR* i les regions adjacents no codificants per PCR (Taula 3A).
- 2) Comprovar l'amplificat en un gel d'agarosa al 1,5%.
- 3) Preparar les mostres:
 - 1 µl d'amplificat
 - 3 µl d'aigua destil·lada
 - 3,5 µl de solució *stop* + 10 mM NaOH
- 4) Sobre la base de l'electroforesi horitzontal afegir 1-2 ml de gasolina especial per encenedors.
- 5) Posar el gel a la cubeta.
- 6) Col·locar els elèctrodes a 0,5 cm de distància dels pous i del final del gel, respectivament.
- 7) Desnaturalitzar les mostres a 98 °C durant 2' i posar-les immediatament en gel.
- 8) Carregar el gel i iniciar l'electroforesi: 600 v-, 30 mA i 18 W.
- 9) El temps de carrera dependrà dels fragments a visualitzar (Taula 3A).
- 10) Tenyir amb nitrat de plata:
 - Fixar: incubar en 25 ml de *fixing solution* + 25 ml d'etanol absolut + 75 ml d'aigua destil·lada, durant 20' en agitació.
 - Nitrat de plata: incubar en 25 ml de *staining solution* + 100 ml d'aigua destil·lada, durant 20' en agitació.
 - Rentar: incubar amb aigua destil·lada, durant 2' en agitació.
 - Revelar: incubar en 25 ml de carbonat de sodi + 125 µl de tiosulfat de sodi + 125 µl de formaldehid + 100 ml d'aigua destil·lada en agitació, fins a la visualització de les bandes.
 - Conservar: incubar en 25 ml de solució de *stop* + 100 ml d'aigua destil·lada, durant 30' en agitació.
- 11) Deixar assecar el gel a TA un màxim de 24 h. Passat aquest temps posar una transparència per a la seva conservació.
- 12) Seqüenciar aquells fragments amb mobilitat anòmala.

A)

Exó	Encebadors amplifícató	Seqüència dels encebadors 5' > 3'	Tª	Mida fragments	Temps de carrera	Encebadors seqüenciació
1	I1D9	GCA CCC AGA GTA GTA GGT CT	57	192	1h 15'	I1D9
	I1i3'	ACA CGC CCT CCT CTT TCG TG'				
2	I2D2	GAC CAA ATC AAG TGA ATA TCT G	55	334	1h 45'	I2D2
	I2R2	GGT CTC AAG CAA TCC TCT CA				
3	I3D1	CTT GGG TTA ATC TCC TTG GA	54	309	1h 45'	I3D1
	I3R1	ATT CAC CAG ATT TCC TAG TC				
4	I4D2	TCA CAT ATG GTA TGA CCC TCT	55	436	2h	I4R2
	I4R2	GTA CCA GCT CAC TAC CTA ATT				
5	I5D1	GAG AAG ATA GTA AGC TAG AT	54	466	2h 15'	I5D1
	I5R1	TAT TAA CAA CAG GCT AAG GT				
6a	6ai5'	TTA GTG TGC TCA GAA CCA CG	54	358	1h 45'	E6R6
	6ai3'	CTA TGC ATA GAG CAG TCC TG				
6b	I6bD1	AAT AAT GCC CAT CTG TTG AAT AA	54	331	1h 45'	6bi3'
	6bi3'	GAG GTG GAA GTC TAC CAT CA				
7	7i5'	AGA CCA TGC TCA GAT CTT CCA T	54	410	2h	6bi3'
	7i3'	GCA AAG TTC ATT AGA ACT GAT C				
8	I8D1	AAT TCA TAT ATA AGA TGT AGC AC	54	328	1h 45'	I8R1
	I8R1	GAG TGA TCC TCC TTC CAG T				
10	10i5'	GCA GAG TAC CTG AAA CAG GA	55	493	2h 15'	10i5'
	10i3'	CAT TCA CAG TAG CTT ACC CA				
11	I11D1	TTC AGC AAT GTT GTT TTT GAC CAA C	54	322	1h 45'	I11D1
	I11R1	TTA CAG CAA ATG CTT GCT AGA CC				
12	I12D1	GTG AAT CGA TGT GGT GAC CA	56	426	2h	I12D1
	I12R1	CTG GTT TAG CAT GAG GCG G				
13	13ai5'	TGC TAA AAT ACG AGA CAT ATT GCA	55	532	2h 30'	13ai5'
	13ai3'	CAG AAT CTG GTA CTA AGG ACA G				
	13bi5'	CTC AAT CCA ATC AAC TCT ATA CGA A	55	498	2h 15'	13bi3'
	13bi3'	TAC ACC TTA TCC TAA TCC TAT GAT				
14b	I14bD1	CAT CAA ATG GTG TGA TGT GAA T	54	211	1h 30'	I14bD1
	I14bR1	TAC ATA CAA ACA TAG TGG ATT AC				
15	15i5'	GGT GCA TGC TCT TCT AAT G	54	485	2h 30'	15i3'
	15i3'	AAG GCA CAT GCC TCT GTG C				
16	I16D1	AAT GCG TCT ACT GTG ATC	54	294	1h 30'	I16D1
	I16R1	GCA ATA GAC AGG ACT TCA A				
17a	I17aD1	AAG AAA TAA ATC ACT GAC ACA CT	54	294	1h 30'	I17aD1
	I17aR1	GAA TCT CAA ATA GCT CTT ATA GC				
17b	I17bD1	CAT TTT GTG TTT ATG TTA TTT GCA	55	358	1h 45'	I17bD1
	17bi3'	GAT AAC CTA TAG AAT GCA GCA				
18	I18D1	GGC AAC ACT TTC CTA ATA TTC	55	483	2h 30'	I18D1
	18i3'	AGT GGC TAT CTA TGA GAA GGA				
19	I19D2	ATT TCC TGT TAG TTC ATT GAA AA	56	588	2h 45'	K19D
	I19R2	GTT CAG ACT CTG CAA ATT AAA				
20	I20D1	GGT CAG GAT TGA AAG TGT GCA	56	474	2h 30'	I20D1
	I20R1	CTA TGA GAA AAC TGC ACT GGA				
21	21iD1	GGT AAG TAC ATG GGT GTT TC	58	377	1h 45'	I21D1
	21i3'	CAA AAG TAC CTG TTG CTC CA				
22	I22D2	CAT AAG CTT TCA GAA CTC CTG	54	339	1h 45'	I22D2
	22i3'	TGT CAC GAA GCA GGC AT				
23	I23D1	GAA CAA TAG ACA TAT TAT CAA GG	54	249	1h 40'	I23D1
	I23R1	GTG AGA TTG TTA TCA AGA ATT AC				
24	I24D2	TTT GAG CCT GTG CCA CTT TCT	54	362	1h 45'	I24D2
	I24R2	AGC TCC AAT TCC ATG AGG TGA				

Taula 3.- Encebadors per a SSCP/HD

A) Encebadors emprats per a l'amplificació dels fragments que s'analitzaran mitjançant SSCP/HD i seqüenciació en cas de trobar patrons alterats de mobilitat. **B)** Encebadors per a la seqüenciació dels exons 6, 9, 14a i 19.

B)

Exó	Encebadors seqüenciació	Seqüència dels encebadors 5' > 3'
6	E6R6	TTC AAG TTA TGA AAA TAG GTT GC
9	I9R1	AGA CAT GGA CAC CAA ATT AAG
14a	I14aD1	ACA CTT AGA TTC AAG TAA TAC TAT
19	K19D	GAA AAG CCC GAC AAA TAA CCA

5.5.2 DGGE

L'anàlisi de DGGE (Lerman and Silverstein 1987) es basa en el punt de fusió del DNA de cadena doble. El punt de fusió depèn de la seqüència i es defineix com la temperatura a la qual la meitat del fragment es troba desnaturitzat. Els canvis en la seqüència modifiquen la temperatura de fusió i la mobilitat electroforètica. El gradient del gel afavoreix la desnaturització de les cadenes. La incorporació d'una cua de GCs (≈ 40 nucleòtids) aporta un increment en el punt de fusió i assegura la detecció de qualsevol alteració al fragment analitzat. Els exons 9 i 14a s'han analitzat en una electroforesi vertical (Dcode™ Universal Mutation Detection System. Cat 170-9080 a 170-9104, Bio-Rad) i s'han visualitzat en una solució de BrEt.

PROTOCOL

- 1) Amplificar per PCR els exons 9 i 14a i les seves seqüències adjacents (Taula 4).
- 2) Comprovar l'amplificació del fragment en una agarosa al 1,5%.
- 3) Netejar els dos vidres necessaris per fer l'acrilamida amb aigua destil·lada i, una vegada secs, amb etanol al 70%.
- 4) Muntar la cambra amb els vidres i els separadors (0,8 mm) en el suport adequat.
- 5) Preparar el gel de gradient d'acrilamida (10-60%) en un formador de gradients.
- 6) Deixar polimeritzar durant 1 h i guardar a 4 °C durant 16 h.
- 7) Preparar les mostres per carregar-les al gel:
 - 10 μ l d'amplificat
 - 3 μ l de tampó de càrrega
- 8) Muntar el gel en el suport vertical i esperar que assoleixi una temperatura de carrera (60 °C).
- 9) Carregar les mostres en el gel i deixar córrer durant 4 h i 30' a 180 v.

- 10) Una vegada finalitzada l'electroforesi, separar els dos vidres amb l'ajuda d'un dels separadors, procurant que no es trenqui.
- 11) Tenyir el gel en una solució de BrEt (0,5 µg/ml) durant 15-20'.
- 12) Visualitzar els fragments en un transil·luminador de llum ultraviolada.
- 13) Seqüenciar aquells fragments amb mobilitat anòmala.

Taula 4.- Encebadors per a DGGE

Encebadors emprats per a l'amplificació dels fragments que s'analitzaran mitjançant DGGE i seqüenciació en cas de trobar patrons alterats de mobilitat.

Exó	Encebadors amplificació	Seqüència dels encebadors 5' > 3'	Tª	Mida fragments	Temps de carrera	Encebadors seqüenciació
9	CF9	TGA AAA TAT CTG ACA AAC TC	56	335	4h 30'	I9R1
	GCCF9	CGT CGC CCC GCT CGG CCC GTC CCC CTC GCG CCC GGC GCC C CC TTC CAG CAC TAC AAA CTA				
14a	CF14a	TGT ATA CAT CCC CAA ACT ATC T	48	249	4h 30'	I14aD1
	GCCF14a	GCC CGC CGG CCC GAC CCC CGC GCG TCC GGC GCC CGG GTG GCA TGA AAC TGT ACT G				

5.6 Seqüenciació

Les mostres que presentaven un patró alterat en els gels han estat amplificades de nou i els productes de PCR purificats en columnes, Jet Quick Spin Column Technique kit (Cat 410205, Genomed). S'han comprovat els fragments purificats en un gel agarosa per seqüenciar-los posteriorment. La seqüenciació consisteix, en primer lloc, en una PCR amb un únic encebador (Taula 3A, 3B i 4), que dona un producte lineal en lloc d'exponencial i dideoxinucleòtids marcats (ddNTPs), que actuen com a finalitzadors de l'extensió. Per la PCR s'ha utilitzat el sistema comercial Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Cat 4337456, Applied Biosystems), que conté ddNTPs marcats amb diferents fluorescències. En segon lloc, l'amplificat es purifica per gelfiltració amb el kit Autoseq™ G50 Dye Terminator Removal (Cat 27-5340-01 GE Healthcare Europe GMBH) per eliminar ddNTPs que no s'incorporen a la reacció. Els fragments obtinguts s'analitzen per electroforesi utilitzant l'ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Per a la comparació de seqüències s'ha emprat el programa FinchTV (www.geospiza.com/finchtv/).

5.6.1 Purificació de productes de PCR

PROTOCOL (Jet Quick Spin Column Technique kit)

Abans d'utilitzar el kit:

- Reconstituir la solució H2 afegint 140 ml d'etanol 96-100%.

A realitzar abans de cada una de les purificacions:

- Posar la solució de Tris:EDTA (TE) a 65 °C en un bany sec.
- 1) Afegir 400 µl de solució H1 a cada mostra d'amplificat de PCR (25 µl ó 50 µl) i barrejar bé amb la pipeta.
 - 2) Posar els 400 µl a una columna prèviament marcada i col·locada en un tub de recol·lecció.
 - 3) Centrifugar 1' a 14.000 rpm. Eliminar l'eluit i tornar a posar la columna al tub de recol·lecció.
 - 4) Afegir 500 µl de solució H2 a la columna.
 - 5) Centrifugar 1' a 14.000 rpm i descartar el filtrat.
 - 6) Col·locar la columna sobre un eppendorf prèviament marcat i afegir 10-35 µl de TE al centre de la columna sense tocar les parets ni la membrana. Deixar 1' a TA.
 - 7) Centrifugar 2' a 14.000 rpm.
 - 8) Descartar la columna i guardar l'eluit a 4 °C.
 - 9) Visualitzar els fragments en un gel d'agarosa al 1,5%.

5.6.2 PCR de seqüenciació

PROTOCOL

- 1) Preparar la següent mix (µl/mostra):

Tampó Big Dye	1µl
Big Dye	1µl
Encebador seqüenciació	40pmol
Amplificat	200ng

- 2) Distribuir en tubs de 0,2 ml. Iniciar el programa al termociclador:

96°C	30''	
59°C	20''	25 cicles
74°C	30''	

5.6.3 Purificació de la PCR de seqüenciació

PROTOCOL

- 1) Col·locar les columnes AutoSeq™ G-50 en tubs de 2 ml i posar la solució Sephadex G-50 fins a omplir-la.
- 2) Centrifugar 1' a 4.500 rpm i descartar l'eluit.
- 3) Afegir 10 µl d'aigua destil·lada al centre de la columna de Sephadex G-50.
- 4) Centrifugar a 4.500 rpm durant 1'.

- 5) Posar les columnes a nous tubs de 1,5 ml prèviament marcats i afegir els 10 µl del producte de PCR al centre de la columna.
- 6) Centrifugar a 4.500 rpm durant 1'.
- 7) Col·locar els tubs amb l'eluït a la bomba de buit durant 60'.
- 8) Guardar el producte liofilitzat a -20 °C fins a la reacció de seqüenciació.

A l'apartat 9 es poden trobar els diferents reactius i la preparació de les solucions utilitzades en aquests protocols.

6. TREBALL AMB RNA

6.1 Manipulació de l'RNA

En totes les tècniques emprades s'han seguit les precaucions i recomanacions per a la manipulació de l'RNA (Ausubel 1987; Sambrook 2000): usar guants sense pols, usar material de plàstic estèril i exclusiu per RNA, usar material de vidre fornejat (a 200°C mínim 4 hores) i preparar sempre les solucions en aigua lliure d'RNases.

6.2 Extracció d'RNA

La necessitat d'optimitzar l'extracció d'RNA ve donada per la limitació en la quantitat de mostra d'EN. Amb aquesta finalitat, s'ha fet una comparativa de cinc kits d'extracció en mostres de línia cel·lular HEK293 i PN per veure quin d'ells proporcionava un millor rendiment (major concentració i millor qualitat). S'han emprat quatre kits basats en columnes d'afinitat: 1) RNAqueous-4PCR (Cat 1914, Ambion); 2) RNA Nucleospin II (Cat 22740955, Machery-Nagel); 3) RNAeasy Miniprep (Cat 50974104, Qiagen) i 4) Absolutely RNA Miniprep (Cat 50400800, Stratagene). Els kits basen l'extracció i puresa de l'RNA en la seva unió selectiva a una membrana de sílice. En un primer pas, un tampó d'alta concentració salina permet la unió de l'RNA a la membrana. Posteriorment, diferents tampons netegen de contaminants l'RNA i per últim s'elueix en aigua lliure d'RNases o tampó d'elució. El cinquè kit utilitzat es basa en una extracció fenòlica: 5) Tripure Isolation Reaction (Cat 1667157, Roche), que és una mescla de fenol i tiocianat de guanidina que inactiva les RNases endògenes. En tots els kits s'ha partit de la mateixa quantitat de cèl·lules HEK293, 5×10^6 i aproximadament 20 mg de pòlip nasal. S'han seguit els protocols marcats pels fabricants en tots els kits utilitzats.

En aquest estudi comparatiu, el kit Absolutely RNA Miniprep ha estat el que ens ha proporcionat una major concentració i qualitat de l'RNA, per tant és el que s'ha utilitzat per a les mostres d'EN.

PROTOCOL (Absolutely RNA Miniprep)

En utilitzar el kit per primera vegada:

- Reconstituir l'enzim *RNase free DNase I* afegint 290 ml de solució reconstituent.
- Afegir 16 ml d'etanol 100 % a la solució *high-salt buffer*.
- Afegir 68 ml d'etanol 100 % a la solució *low-salt buffer*.

A realitzar abans de cada una de les extraccions:

- Preparar etanol 70%; 350 µl per cada mostra a extreure.
- Preparar la solució de lisis: 350 µl de *lysis solution* + 2,5 µl de β-mercaptoetanol per mostra.

- 1) Centrifugar la mostra a 14.000 rpm durant 5'.
- 2) Eliminar la solució d'RNA later sense endur-se el botó cel·lular.
- 3) Afegir 350 µl de solució de lisi al botó cel·lular i homogeneïtzar la mostra amb ajuda d'un vòrtex.
- 4) Posar la columna de pre-filtració en un tub de 2 ml i afegir els 350 µl de l'homogeneïtzat.
- 5) Centrifugar a 14.000 rpm durant 5'. Descartar la columna i quedar-se amb el filtrat.
- 6) Posar un volum equivalent d'etanol 70% al filtrat, barrejar-ho bé i transferir-ho a la columna d'unió d'RNA prèviament col·locada en un tub de recol·lecció de 2 ml.
- 7) Centrifugar la mostra a 14.000 rpm durant 1' i descartar el filtrat.
- 8) Afegir 600 µl de solució *low-salt buffer* al centre de la columna.
- 9) Centrifugar la mostra a 14.000 rpm de 30-60'' i descartar el filtrat.
- 10) Centrifugar a 14.000 rpm durant 2'.
- 11) Preparar la solució de DNasa: 50 µl de solució de digestió + 5 µl d'*RNase-Free DNasa I*.
- 12) Afegir la solució al centre de la columna i incubar a 37 °C durant 15'.
- 13) Afegir 600 µl de solució *high-salt buffer* al centre de la columna.
- 14) Centrifugar la mostra a 14.000 rpm durant 30-60'' i descartar el filtrat.
- 15) Afegir 600 µl de solució *low-salt buffer* al centre de la columna.
- 16) Centrifugar la mostra a 14.000 rpm de durant 1' i descartar el filtrat.
- 17) Afegir 300 µl de solució *low-salt buffer* al centre de la columna.
- 18) Centrifugar la mostra a 14.000 rpm durant 2' i descartar el filtrat.
- 19) Repetir el pas anterior per eliminar el tampó residual.
- 20) Transferir la columna a un eppendorf prèviament identificat.
- 21) Afegir 30-100 µl de solució d'elució a la columna i incubar-la 5' a TA
- 22) Centrifugar la mostra a 14.000 rpm durant 1'.

23) Posar l'eluït de nou a la columna i repetir els passos 21 i 22.

6.3 Caracterització de l'RNA

Per als experiments d'optimització amb els diferents kits d'extracció d'RNA, la concentració d'RNA i la ràtio d'absorbància 260/280 nm s'han mesurat amb el NanoDrop® ND-100 (Nanodrop Technologies). La degradació de l'RNA s'ha comprovat de forma visual emprant una electroforesi en gel d'agarosa (1,5 %). La presència d'un *smear* de baix pes molecular ha estat indicatiu de degradació del material de partida. Les bandes 28s i 18s d'RNA ribosòmic (rRNA) han de tenir una relació aproximada de 2:1. Depenent de l'extracció, és possible observar un *smear* per sota de la banda 18s corresponent a la població dels diferents mRNAs.

Per a les mostres d'EN s'han mesurat la concentració i la puresa ($A_{260/280}$) amb el NanoDrop® ND-100 (Nanodrop Technologies), però la integritat de l'RNA ha estat avaluada amb el kit RNA 6000 Nano Labchip (Cat 5065 4476, Agilent Technologies) a l'Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). El RIN (*RNA Integrity Number*) és un algoritme que analitza la ràtio convencional entre 28s i 18s a més de sis regions de l'electroferograma generat pel kit (Schroeder, Mueller et al. 2006). El valor obtingut ha estat utilitzat com a criteri de qualitat per als experiments posteriors.

El criteri d'inclusió de mostres s'ha basat en aquest tres paràmetres pels quals s'ha considerat una concentració ≥ 50 ng/ μ l, una puresa $\geq 1,95$ i un valor de RIN ≥ 5 .

7.- CFTR: QUANTIFICACIÓ DE TRANSCRITS

La PCR quantitativa per a l'estudi de l'expressió de l'RNA (RT-qPCR) és una tècnica molt acurada que permet l'anàlisi de l'expressió gènica en mostres amb baix contingut cel·lular. És una tècnica altament sensible per a la quantificació de transcrits rars o poc comuns i permet la detecció de petits canvis en la seva expressió. Per aquestes característiques ha estat escollida per a l'anàlisi i quantificació de transcrits de *CFTR* en aquest treball. Aquesta tècnica consta de dos passos: 1) la transcripció inversa (RT), que és la síntesi de la cadena complementària de DNA (cDNA) a partir d'un motlle d'RNA i 2) la detecció de productes de PCR basada en la incorporació i quantificació d'un *reporter* fluorescent. Teòricament, hi ha una relació quantitativa entre la quantitat de mostra diana inicial i la quantitat de fluorescència a qualsevol dels cicles de la reacció. El senyal del *reporter* augmenta en proporció directa a la quantitat de producte de PCR. Per tant, l'enregistrament de la quantitat de fluorescència en cada un dels cicles fa possible la monitorització de la reacció durant la fase exponencial. Per a la realització d'aquesta tècnica s'han de tenir en compte una sèrie de factors que proporcionaran la robustesa i precisió necessàries per a la quantificació, com són el

mètode de quantificació utilitzat, la quantitat i qualitat del material de partida, els controls de qualitat necessaris per a la quantificació o escollir un bon mètode estadístic (Bustin, Benes et al. 2009).

7.1 Transcripció inversa (RT)

S'han provat quatre kits diferents de transcripció inversa: 1) Superscript II Reverse Transcriptase (Cat 18064-014, Invitrogen), 2) First-Strand cDNA kit (Cat 27-9261-01, GE Healthcare Europe GMBH), 3) Omniscript Reverse Transcription (Cat 509205113, Qiagen) i 4) High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Cat 4374966G, Applied Biosystems). Aquests kits utilitzen enzims diferents, i emprant un gel d'agarosa (1,5%) s'ha comprovat la seva eficiència. La presència d'un *smear* indica la transcripció completa del material de partida. Si en el gel de comprovació encara es visualitzen les bandes 28s i 18s, la transcripció ha estat incompleta.

Per a l'estudi comparatiu, tots els kits han estat utilitzats segons les instruccions del fabricant partint d'1 µg d'RNA obtingut d'HEK293 i de PN. Per a les mostres d'EN, s'han retrotranscrit 500 ng d'RNA amb hexàmers a l'atzar utilitzant el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription segons les instruccions del fabricant. De cada una de les mostres s'han realitzat dues RT independents. El cDNA obtingut es mantindrà a -20 °C fins al seu ús. De tots els CTLs negatius emprats en el treball s'ha retrotranscrit un 1 µl (500 ng) en un únic tub per obtenir un *pool* de mostres que posteriorment serà usat per a l'obtenció de les corbes estàndard.

PROTOCOL (High-Capacity cDNA Reverse Transcription)

- 1) Descongelar els components del kit en gel.
- 2) Incubar 500 ng d'RNA en un volum final de 10 µl d'aigua lliure d'RNases a 65 °C durant 10' i posar-lo immediatament en gel.
- 3) Preparar la següent mix (µl/mostra):

Tampó RT 10x	2 µl
dNTP's 25x (100 mM)	0,8 µl
Encebadors a l'atzar (10x)	2 µl
Multiscribe reverse transcriptase (50 U/µl)	1 µl
Inhibidor d'RNases	1 µl
Aigua lliure d'RNases	3,2 µl

- 4) Barrejar suaument i incubar-la en gel fins al seu ús.
- 5) Posar 10 µl de la mix en tubs de 0,2 ml lliures de DNases i RNases.
- 6) Afegir-hi els 10 µl d'RNA prèviament incubats a 65 °C i barrejar suaument pipetejant un parell de vegades.
- 7) Condicions de la reacció:

25°C	10'
37°C	120'
85°C	5''

7.2 RT-qPCR

7.2.1 Gens de referència

El mètode de quantificació escollit dependrà del grau d'expressió del gen en estudi i de les necessitats de quantificació absoluta o relativa. En aquest treball s'ha emprat la quantificació relativa, és a dir, l'estudi de l'expressió del nostre gen (*CFTR*) respecte a una sèrie de gens de referència. Els gens de referència són aquells gens que tenen una expressió constant en els diferents teixits i condicions experimentals i escollir els adients és un pas clau per a una quantificació correcta. Si existeixen variacions en l'expressió d'aquests gens es pot subestimar o sobreestimar l'expressió del gen en estudi, a més de no poder obtenir resultats replicables.

El criteri de selecció que s'ha seguit per escollir els gens de referència es fonamenta en la literatura. S'han preseleccionat tres gens, que codifiquen per proteïnes citoplasmàtiques, dels més utilitzats en diferents articles d'RT-qPCR (Hsiao, Dangond et al. 2001; Radonic, Thulke et al. 2004; de Kok, Roelofs et al. 2005). A més, s'han considerat aquells gens que poden tenir una expressió similar a *CFTR*. Per últim, s'ha escollit un gen que codifica per una proteïna atòpica de membrana de la mateixa família de transportadors ABC que *CFTR* (Calcagno, Chewing et al. 2006) (Taula 5).

Taula 5.- Gens de referència avaluats en aquest estudi

GEN	SÍMBOL	NÚM. D'ACCÉS	FUNCIÓ	LOCALITZACIÓ
<i>Beta-2-microglobuline</i>	<i>B2M</i>	NM_004048	Cadena beta del complex major d'histocompatibilitat	15q21-q22
<i>Beta glucuronidase</i>	<i>GUSB</i>	NM_000181	Degradació de glucosaminoglicans	7q21.11
<i>Hypoxanthine fosforibosil-transferase I</i>	<i>HPRT1</i>	NM_000194	Síntesi de purines a la ruta salvatge	Xq26
<i>Plasma membrane calcium ATPase</i>	<i>PMCA4</i>	NM_001684	Transportador de calci a la membrana plasmàtica	1q32.1

7.2.2 Mutacions *CFTR*

S'han analitzat les mutacions a *CFTR* c.580-1G>T (intró 5), c.2657+5G>A (intró 14b) i c.3718-1G>A (intró 19) (Taula 6).

Taula 6.- Gen diana dels estudis d'expressió

GEN	SÍMBOL	NÚM. D'ACCÉS	FUNCIÓ	LOCALITZACIÓ
<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>	<i>CFTR</i>	NM_001104950	Canal iònic de membrana	7q31.2

7.2.3 Encebadors i sondes

Escollits els gens de referència a utilitzar i les mutacions a testar en *CFTR*, s'han dissenyat assaigs Taqman® (dos encebadors i una sonda d'hidròlisi) (Applied Biosystems). Per als gens de referència, els assaigs han estat predissenyats per Applied Biosystems [*GUSB*: Hs99999908_m1; *HPRT1*: Hs01003267_m; *PMCA4*: Hs00608066_m1 (ATP2B4) i *B2M*: Hs00984230]. Per al nostre gen diana ens interessa quantificar l'expressió normal, és per això que s'ha intentat que la sonda sigui complementària a la seqüència d'unió d'exons adjacents. Aquesta localització ha permès només amplificar el transcrit normal i evitar les amplificacions inespecífiques. La seqüència d'interès s'ha enviat a Applied Biosystems, que ha dissenyat els diferents assaigs. Per a la detecció de la mutació c.2657+5G>A la sonda s'ha sintetitzat entre els exons 14a i 14b (Figura 15), mentre que la mutació c.580-1G>T no ha estat possible sintetitzar en la unió entre exons i es troba en l'exó 6a molt a prop de la unió amb l'exó 5 (Figura 15). Per a la mutació c.3718-1G>A (Figura 15) s'ha utilitzat un assaig sintetitzat prèviament per Applied Biosystems (Hs1565546_m1). Per als experiments d'optimització de la tècnica s'ha utilitzat un assaig amb una sonda complementària a la zona d'unió entre els exons 21 i 22 de *CFTR* (Hs00357011_m1), predissenyat per Applied Biosystems.

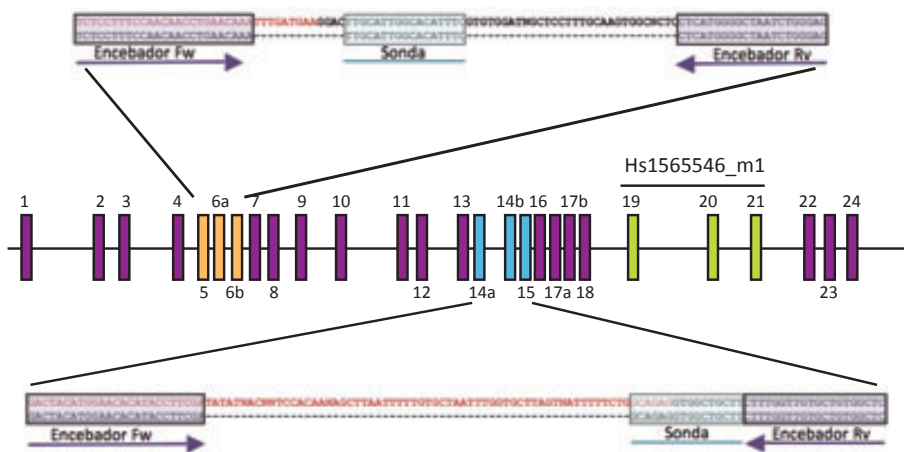


Figura 15.- Disseny dels assaigs Taqman® per a les tres mutacions en estudi

Localització i seqüència dels assaigs Taqman® per a les mutacions c.2657+5G>A i c.580-1G>T. En lila es poden veure la seqüència i localització dels encebadors que componen cada un dels assaigs Taqman® i en verd les seves corresponents sondes.

L'especificitat de les sondes d'hidròlisi fa que no sigui necessària l'optimització de les condicions de la reacció, però s'han fet corbes estàndard de tots elles per calcular-ne l'eficiència. L'eficiència de la reacció de PCR pot canviar segons la procedència de l'RNA (teixits, línies cel·lulars...), és per això que s'han fet corbes patró tant de la línia cel·lular HEK293 com de PN i d'EN. El *pool* de cDNA obtingut prèviament (7.1) s'ha

diluït seriadament (1, 1/5, 1/25, 1/125) i s'ha amplificat per crear una corba patró (basada en el model de regressió lineal) per cada un dels gens. L'eficiència de la reacció s'ha calculat a partir de la pendent obtinguda de la recta de regressió d'aquesta corba amb la fórmula corresponent a l'eficiència; $e = 100 \times [10^{(-1/pendent)} - 1]$.

7.2.4 RT-qPCR

La reacció i l'anàlisi de l'amplificació dels fragments s'ha realitzat en la plataforma ABI 7300 (Applied Biosystems), que permet amplificar fins a 96 mostres en cada experiment (Cat N8010560, MicroAmp 96-Well Plates. Applied Biosystems). En un volum total de 20 μ l, cada reacció conté 10 μ l de Universal Master Mix No UNG 2x (Cat 4324018G, Applied Biosystems), 1 μ l de l'assaig Taqman® (20x) corresponent, 1 μ l de cDNA i 8 μ l d'aigua lliure d'RNases. Cada una de les mostres retrotranscrites s'ha amplificat per triplicat. A cada placa s'ha inclòs: un control negatiu (aigua lliure d'RNases en lloc de cDNA) per cada assaig, per tal de detectar contaminacions de la PCR, i una mostra calibradora, seguint les recomanacions del Butlletí anual d'ABI Prism (Applied-Biosystems 2001). Aquesta última mostra, que ha estat un CTL negatiu, permet la correcció de la variació tècnica introduïda entre plaques, i se li ha donat el valor 1. Per últim, es va amplificar una mostra d'RNA per testar la possible presència de DNA genòmic.

Les condicions d'amplificació són universals per a tots els assaigs i han estat establertes per Applied Biosystems, per tant no ha estat necessari fer una optimització prèvia.

PROTOCOL

- 1) Preparar una mix per cada un dels assaigs a avaluar:

Universal master mix no UNG (2x)	10 μ l
Assaig Taqman® (20x)	1 μ l
Aigua lliure d'RNases	8 μ l

- 2) Distribuir la mix en una placa de 96 pouets.
- 3) Afegir 1 μ l de cDNA.
- 4) Centrifugar breument la placa.
- 5) Posar les mostres al termociclador i iniciar el programa corresponent:

50°C	2'	
95°C	10'	
95°C	15''	40 cicles
60°C	60''	

L'anàlisi de les dades inicials s'ha realitzat amb el software del propi aparell (SDS v1.3.1), que ha permès obtenir el cicle en el qual es detecta un augment significatiu de la fluorescència, que s'anomena cicle de quantificació (Cq). El llindar s'ha fixat de

forma manual en 0,200 perquè sigui el mateix en totes les plaques i no introduir un altre paràmetre als càlculs posteriors. El Cq ha estat el paràmetre utilitzat per al càlcul de l'expressió de cada una de les mostres i els C.V. de l'expressió de cada un dels gens d'una mateixa placa (intra-placa) i en el seu conjunt (inter-placa).

7.3 Estudi de l'expressió

S'ha emprat el programa qBase^{Plus} (Hellemans, Mortier et al. 2007) (<http://www.biogazelle.com/products/qbaseplus>) per obtenir les ràtios d'expressió del gen *CFTR* i dels gens de referència. Aquest programa es basa en el mètode de comparació de Cqs ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) (Livak and Schmittgen 2001), que es modifica per incloure múltiples gens de referència per obtenir resultats més acurats i robustos. Un factor de normalització (NF) basat en l'expressió d'aquests gens s'utilitzarà per a la normalització de les dades. A més, s'apliquen les eficiències específiques d'amplificació de cada un dels gens analitzats i es corregeixen les diferències entre les reaccions dels gens que s'estudien per a la calibració inter-placa. També inclou diversos controls de qualitat durant el procés, com l'avaluació de l'estabilitat dels gens de referència i la correcta propagació de l'error en cada un dels passos. Els valors d'expressió normalitzada calibrada (CNRQ) obtinguts s'han utilitzat pels posteriors tests estadístics (Figura 16).

7.4 Avaluació dels gens de referència

S'han utilitzat diferents programes per avaluar l'estabilitat dels gens de referència: 1) NormFinder, 2) qBase^{Plus} (geNorm) i 3) SPSS versió 12 per a Windows.

NormFinder (Andersen, Jensen et al. 2004) (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>) basa els càlculs en les dades crues de fluorescència (Cq), amb les quals mesura les diferències intra-grup i inter-grup per obtenir un valor d'estabilitat de cada un dels gens i per trobar la millor combinació de dos gens. Aquest programa proporciona una mesura directa de la variació estimada i permet a l'usuari avaluar l'error sistemàtic que s'introduiria en utilitzar un gen com a referència. Aquesta aproximació ha estat anomenada "*model-based approach to estimation of expression variation*".

L'aplicació geNorm inclosa en el programa qBase^{Plus} calcula, basant-se en les ràtios d'expressió transformats logarítmicament (RQ), un valor d'estabilitat M (Vandesompele, De Preter et al. 2002), que és la mitjana de la variació dels gens de dos en dos per a totes les combinacions de gens utilitzats. Aquesta aproximació, anomenada "*pairwise variation model*", assumeix que els gens no estan corregulats i elimina els gens amb un valor M més alt fins a obtenir la combinació de dos o més gens estables. Es consideren estables aquelles combinacions de dos o més gens amb un valor $M < 0,5$ en mostres homogènies.

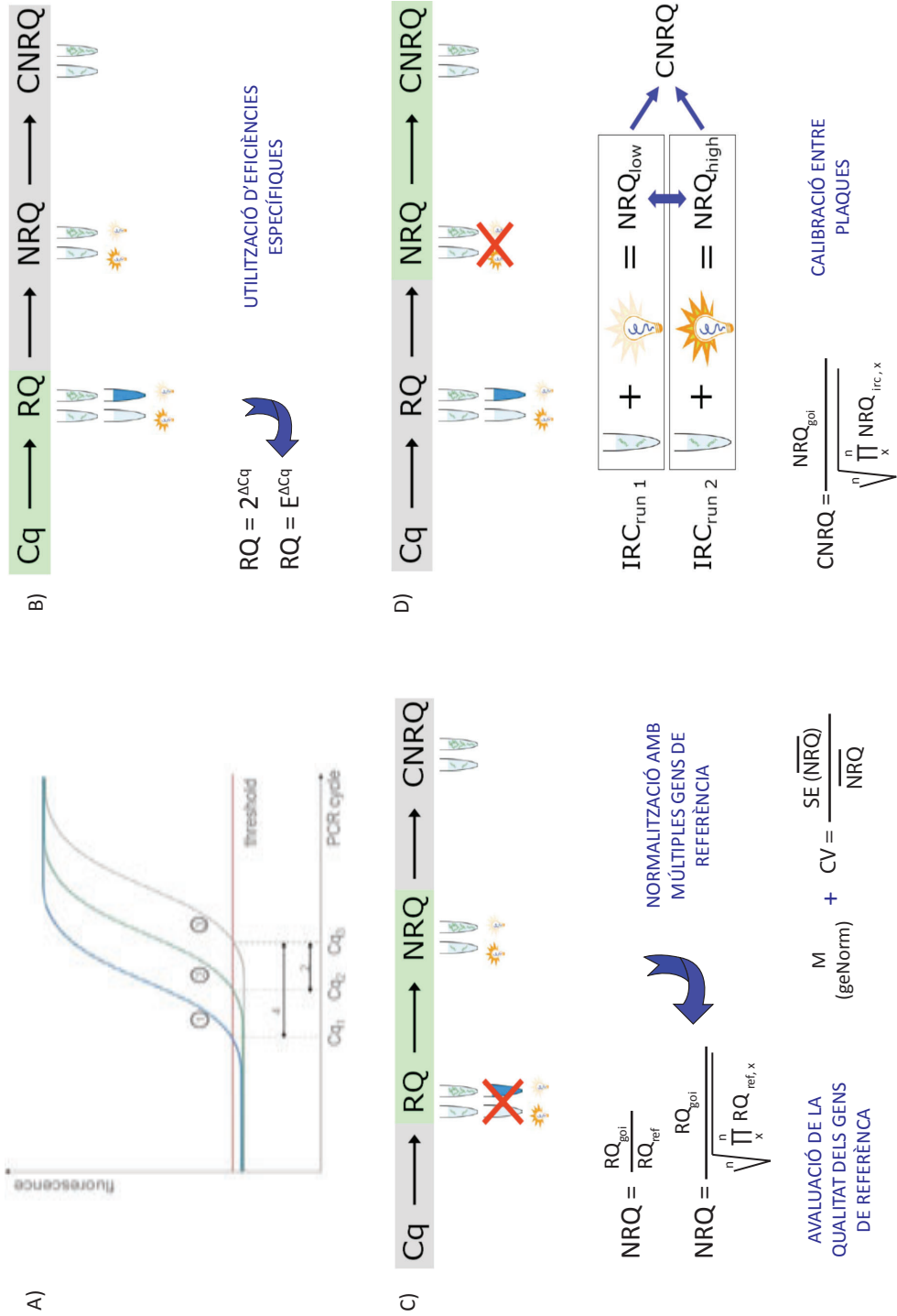


Figura 16.- Procés de normalització de dades del programa qBase^{Plus}

Aquest programa ha permès **A)** l'obtenció de la representació gràfica de l'amplificació dels gens. **B)** La utilització de les eficiències de cada un dels assaigs per l'obtenció de les quantitats relatives d'expressió (RQ). **C)** A més, la utilització de múltiples gens de referència permet l'avaluació de la seva estabilitat i l'obtenció de resultats més robustos en la normalització de l'expressió relativa (NRQ). **D)** Per últim, permet la correcció de les variacions interplaca per cada un dels gens en estudi (CNRQ) (Adaptació de Hellemans, Mortier et al. 2007).

El qBase^{Plus} també ha permès el càlcul del coeficient de variació (C.V.) específic de cada gen una vegada s'han obtingut els valors d'expressió normalitzada (NRQ) de cada una de les mostres. S'han considerat com a estables els gens amb un C.V.<20%.

Per últim, amb el programa SPSS s'ha comprovat si les diferències en l'expressió de cada un dels gens en els diferents grups de mostres han estat o no significatives. L'expressió normalitzada calibrada (CNRQ) de cada una de les mostres que s'han obtingut amb el qBase^{Plus} s'ha exportat a l'SPSS i s'ha analitzat amb un test no paramètric que permet la comparació de n mostres independents, de Kruskal-Wallis, establint un valor de $p < 0,05$ com a estadísticament significatiu.

7.5 Anàlisi estadística

Les medianes de l'expressió del conjunt de mostres analitzades per cada un dels grups s'han comparat amb un test no paramètric de Kruskal-Wallis i s'han considerat valors $p < 0,05$ com a estadísticament significatius. No s'ha utilitzat cap correcció del valor de p, per exemple la correcció de Bonferroni, perquè és massa restrictiva i no es té un número suficient de mostres perquè sigui rellevant en l'estudi. En l'anàlisi estadística tampoc s'han exclòs les mostres determinades com a *outliers* degut al baix número de mostres del que es disposa.

Com a mesura de variabilitat en l'expressió intra-grup s'ha emprat la desviació absoluta de la mediana (MAD), que és defineix com la mediana de les desviacions absolutes de cada una de les mostres respecte a la mediana del grup a la que pertanyen.

$$\text{MAD} = \text{mediana}[X_i - \text{mediana}(X_j)]$$

Per a l'anàlisi estadística de les variables qualitatives (absència o presència d'un al·lel) s'ha emprat un test exacte de Fisher, mentre que per a les variables clíniques quantitatives (edat, test de la suor, FVC i FEV1) s'ha utilitzat un test t-student de dues cues i variàncies independents. Per a totes les anàlisis estadístiques s'ha considerat un valor de $p < 0,05$ com a significatiu.

8.- TÈCNIQUES HISTOLÒGIQUES

Les tincions histològiques permeten posar de manifest tant la topografia tissular i els diferents tipus cel·lulars com determinats orgànuls i estructures intracel·lulars. En aquest treball s'han utilitzat tincions histològiques senzilles amb colorants estàndard (tinció de Papanicolau) i tincions complexes que necessiten la utilització de substrats com anticossos per a la visualització de les estructures (IHQ i IF).

8.1 Tinció simple: tinció de Papanicolau

Es tracta d'una tinció tricròmica en la que cada un dels colorants tenyeix diferents estructures facilitant la seva ràpida identificació al microscopi. Aquest tipus de tinció ha permès diferenciar els tipus cel·lulars que componen l'EN en les mostres recollides i fixades amb formaldehid al 4%.

De color blau es distingeixen els nuclis cel·lulars, de color vermell o taronja, les cèl·lules o parts cel·lulars acidòfiles, i de color verd o blau verdós es veuen les cèl·lules o parts cel·lulars basòfiles. Les cèl·lules sanguínies o fragments es tenyiran de color taronja o taronja verdós.

PROTOCOL

- 1) Passar ràpidament el portaobjectes per una solució d'etanol 50% i seguidament per aigua destil·lada.
- 2) Submergir en hematoxilina de Harris (Cat 1.09253.2500, Merck) durant 1'.
- 3) Rentar amb aigua corrent fins que aquesta quedi transparent.
- 4) Rentar els portaobjectes amb alcohol clorhídric 4''.
- 5) Rentar els portaobjectes amb aigua corrent 15''.
- 6) Rentar els portaobjectes amb aigua amoniacal 4-8''.
- 7) Rentar els portaobjectes amb aigua corrent 15''.
- 8) Passar ràpidament els portaobjectes per etanol 96%.
- 9) Repetir el pas anterior.
- 10) Submergir els portaobjectes en colorant EA50 (Cat 1.09272.0500, Merck) durant 3'.
- 11) Passar ràpidament els portaobjectes per etanol 96%.
- 12) Repetir el pas anterior.
- 13) Submergir els portaobjectes en colorant Orange (Cat 1.15925.0025, Merck) durant 3'.
- 14) Passar ràpidament els portaobjectes per etanol 96%.
- 15) Rentar amb aigua destil·lada.
- 16) Passar per etanol 100%.
- 17) Rentar amb xilol durant 15''.
- 18) Repetir el pas anterior dues vegades.
- 19) Muntar els portaobjectes amb medi de muntatge (DPX; *disteryne*, *plasticizer*, *xylene*).

A l'apartat 9 es poden trobar els diferents reactius i la preparació de les solucions utilitzades en aquest protocol.

8.2 Tincions complexes

L'IHQ i l'IF permeten la identificació de determinats antígens característics de diferents línies o funcions cel·lulars. L'aplicació directa d'anticossos monoclonals o policlonals en les preparacions permet la localització microanatòmica de la seva expressió i la correlació amb diferents paràmetres morfològics.

8.2.1 Immunohistoquímica

L'IHQ ha permès comprovar la natura epitelial de les cèl·lules obtingudes en el raspallat nasal emprant un anticòs monoclonal en front a diferents citoqueratines produïdes en ratolí. L'anticòs (*monoclonal anticytokeratin pan antibody*, Cat C2562, Sigma Aldrich) reconeix les citoqueratines humanes 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18, 19 i reacciona únicament amb cèl·lules dels epitelis pseudoestratificats i esquamosos. S'ha emprat el sistema EnVision+ Dual Link System-HRP (Cat K4065, DakoCytomation), seguint les instruccions del fabricant. Han estat necessàries diverses proves per a l'optimització de la concentració de l'anticòs en la línia cel·lular 16HBE14o-. S'ha establert una dilució 1:5000 com a adient. La contratinció nuclear s'ha realitzat amb hematoxilina de Harris, que tenyeix de blau el nucli i les regions àcides del citoplasma. L'anàlisi i les imatges d'aquestes preparacions s'han fet amb un microscopi òptic i el programa Spot Imaging Advanced (SPOT Imaging Solutions).

PROTOCOL

- 1) Temperar els components del kit.
- 2) Incubar en solució de bloqueig durant 1 h.
- 3) Rentar en solució durant 5' i treure l'excés de tampó amb paper absorbent.
- 4) Repetir el procediment dues vegades.
- 5) Posar una gota de *dual endogenous enzyme block* que cobreixi les cèl·lules i incubar 5-10'.
- 6) Rentar en solució (passos 3-4).
- 7) Incubar amb anticòs primari (1:5000 en solució d'incubació) 30' a TA (*monoclonal anticytokeratin pan antibody*. Cat C2562, Sigma Aldrich).
- 8) Rentar amb solució de rentat durant 5' (aquí es pot interrompre el protocol un màxim d'1 h a TA en nova solució de rentat sense afectar la tinció).
- 9) Treure l'excés de solució amb un paper absorbent.
- 10) Aplicar una gota de *labelled polymer* i incubar 30' (que cobreixi les cèl·lules).
- 11) Rentar en solució (passos 3-4).
- 12) Netejar els portaobjectes.
- 13) Aplicar una gota de *substrate-chromogen* i incubar 5-10'.
- 14) Rentar amb aigua destil·lada.

- 15) Contratenyir amb hematoxilina 40''.
- 16) Rentar amb aigua corrent durant 2'.
- 17) Deshidratar i transparentar:
 - 17.1. EtOH 70% - EtOH 96% I - EtOH 96% II, passar ràpid per les cubetes en aquest ordre.
 - 17.2. EtOH 100% I - EtOH 100% II - EtOH/Xilol 50% - Xilol I - Xilol II, 5' en cada una d'elles.
- 18) Muntar amb medi de muntatge DPX.

8.2.2 Immunofluorescència

Per a la localització cel·lular de la proteïna CFTR s'ha utilitzat una tinció immunofluorescent que ha permès veure la proteïna tant a la membrana cel·lular, on es troba en forma salvatge, com en el citoplasma, on es localitza la forma mutada. El protocol emprat va ser prèviament establert per Gené i col·l. (2008) (Gene, Llobet et al. 2008).

Les preparacions es permeabilitzen prèviament amb la solució de bloqueig i CFTR es detecta mitjançant un anticòs primari (1:500 en solució d'incubació), que reconeix el domini R de la proteïna (Cat MAB1660, R&D Systems). L'anticòs secundari anti-ratolí generat en cabra (1:500 en solució d'incubació) unit a una molècula Alexa 568 (Cat A-11004, Molecular Probes) ha permès la visualització en un microscopi confocal. La solució To-Pro (1:3.000 en PBS) (Cat T3605, Invitrogen) s'ha emprat per a la tinció nuclear.

Les imatges de les tincions fluorescents s'han adquirit en un microscopi confocal espectral model Leica TCS SL (Leica). S'ha emprat l'objectiu d'immersió 63x amb dos longituds d'ona d'excitació (He/Ne 543 nm, He/Ne 633 nm). Posteriorment, les imatges s'han tractat amb el programa LCS Leica Confocal Software (Leica).

PROTOCOL

- 1) Bloquejar amb solució de bloqueig durant 1 h a TA.
- 2) Incubar amb l'anticòs Anti-CFTR MAB1660 (1:500 en solució d'incubació) durant 2 h a TA en una cambra humida i fosca.
- 3) Rentar tres vegades amb PBS durant 5'.
- 4) Incubar amb l'anticòs secundari conjugat amb Alexa Fluor 568 (1:500 en solució d'incubació) durant 1 h a TA.
- 5) Rentar amb PBS. Repetir el procediment tres vegades.
- 6) Incubar amb TO-PRO (1:3000 en PBS) 1 h a TA.
- 7) Rentar 3x5' amb PBS.
- 8) Muntar els portaobjectes amb medi de muntatge Vectashield (Cat H-1000, Vector Laboratories) per evitar la pèrdua de senyal fluorescent.

A l'apartat 9 es poden trobar els diferents reactius i la preparació de les solucions utilitzades en aquest protocol.

9.- REACTIUS

9.1 Línies cel·lulars

DMEM: Dubelco's modified eagle's medium

Medi sense complementar:

- DMEM 500 ml

Medi complementat

- DMEM 435 ml
- Glutamina (1X) 5 ml
- Penicil·lina/estreptomicina (1x) 5 ml
 - 10.000 unitats/ml de penicil·lina
 - 10.000 mcg/ml d'estreptomicina
- Non Essential AminoAcids (NEAA 1x) 5 ml
- FBS inactivat (1 h a 60 °C) 50 ml

MEM complet

- Minimum essential medium w/Earle's salt 450 ml
- FBS inactivat (1 h a 60°C) 50 ml
- L-Glutamina 200 mM (Cat 25030-149, Invitrogen) 5 ml
- Penicil·lina/estreptomicina (1X) 5 ml
 - 10.000 mcg/ml d'estreptomicina
 - 10.000 unitats/ml de penicil·lina

FCS: Fibronectin Coating Solution

- Medi LHC (Cat 118-000 Invitrogen) 88 ml
- Albúmina de sèrum boví, 1 mg/ml, 0,1% (Cat 15260037, Invitrogen) 10 ml
- Vitrogen 100 (3 mg/ml Col·lagen I, boví) (Cohesion FXP-019, Cat BD 40231 BD laboratories) 1 ml
- Fibronectina humana (1 mg/ml) (Cat BD 40008, BD laboratories)

HBS: Hapes Buffered Solution 4 L (pH 7,4-7,6)

- Hapes (Cat H3784, Sigma) 19,04 g
- NaCl (Cat S5886, Sigma) 28,52 g
- Glucosa (Cat G7021, Sigma) 0,80 g
- Na₂HPO₄·7H₂O (dibàsic) (Cat S9390, Sigma) 6,80 g

- Phenol Red 0,5% (Cat P0290, Sigma) 1 ml

PET: Solució de tripsina; 50 ml

- HBS 36 ml
- Polivinilpirrolidona 10% (Cat P0930, Sigma) 5 ml
- EGTA a HBS 0,2% (Cat E0396, Sigma) 5 ml
- Tripsina, 0,25% en 0.02% EDTA 4 ml

Medi de congelació; 50 ml

- Sèrum fetal boví (50%) 25 ml
- MEM complet (40%) / DMEM 20 ml
- DMSO (10%) (Cat D2650, Sigma) 5 ml

9.2 Electroforesi

9.2.1 Gels d'agarosa

TBE 5x: 2,5 L

- Tris 135 g (450 mM)
- Àcid bòric 68,75 g (360 mM)
- EDTA 9,25 g (12 mM)
- Aigua destil·lada csp 2,5 L
- Agitar fins a dissoldre els components

Tampó de càrrega

- Blau de bromofenol 0,25 g
- Sacarosa 40 g
- Aigua destil·lada csp 10 ml

Marcador 1 kb

- Tris (10 mM)/EDTA (1 mM) 960 µl (pH 7,4-7,6)
- Colorant taronja 210 µl
 - 0,25% Colorant taronja
 - 40% Sacarosa
 - Aigua destil·lada
- Marcador (Invitrogen) 60 µl

9.2.2 Gels de poliacrilamida

- Solució de bis-acrilamida 19:1 (40%) 3,9 ml
- TBE (5x) 5 ml

- | | |
|---------------------|---------|
| ○ APS (10%) | 180 µl |
| ○ TEMED | 18 µl |
| ○ Aigua destil·lada | 16,1 ml |

9.3 Cribatge del gen

Solució *stop* + 10 mM NaOH

- | | |
|-----------------------|-------|
| ○ Formamida | 95% |
| ○ EDTA | 20 mM |
| ○ Blau de bromofenol | 0,05% |
| ○ Xilencianol (5%) FF | 0,05% |
| ○ NaOH | 10 mM |

Formamida desionitzada

- | | |
|-------------|--------|
| ○ Formamida | 100 ml |
| ○ Resina | 2 g |

Agitar durant 2 h, filtrar i fer alíquotes de 40 ml i conservar-les a -20 °C.

Poliacrilamida DGGE (solució 0%): 100 ml

- | | |
|------------------------------------|----------|
| ○ Acrilamida:bis-acrilamida 37,5:1 | 15,55 ml |
| ○ TAE (50x) | 2 ml |
| ○ Aigua destil·lada | 11 ml |

Conservar a TA o a 4 °C.

Poliacrilamida DGGE (solució 80%): 100 ml

- | | |
|--------------------------|------------|
| ○ Acrilamida | 15,15 ml |
| ○ TAE (50x) | 2 ml |
| ○ Formamida desionitzada | 32 ml |
| ○ Urea (7 M) | 42 g (7 M) |
| ○ Aigua destil·lada csp | 100 ml |

Conservar a TA o a 4 °C.

TAE 50x

- | | |
|-------------------------|---------|
| ○ Tris Base | 121,1 g |
| ○ Ac. acètic glacial | 28,55 g |
| ○ EDTA 0,5 M (pH 8) | 50 ml |
| ○ Aigua destil·lada csp | 500 ml |

Ajustar el pH a 7,4 amb ac. Acètic glacial.

Conservar a TA.

Gel gradient 10-60%

	10% (-)	60% (+)
○ Solució 0%	11,3 ml	3,25 ml
○ Solució 80%	1,6 ml	9,75 ml
○ APS 10%	130 µl	130 µl
○ Temed	6,5 µl	6,5 µl

Stacking

○ Acrilamida (0%)	6 ml
○ APS (10%)	60 µl
○ TEMED	3 µl

Tampó de càrrega: 50 ml

○ Glicerol	25 ml
○ TAE (50x)	1 ml
○ Blau de bromofenol	100 mg
○ Aigua destil·lada csp	50 ml

TRIS-HCL 2M (pH: 7,5)

○ Tris	121,14 g
○ Aigua destil·lada csp	400 ml

Afegir aproximadament 35 ml d'HCL, ajustar a pH: 7,5 amb la mateixa solució.

Un cop la solució té un pH de 7,5 afegir aigua destil·lada fins a 500 ml.

Conservar a TA o a 4 °C.

TRIS-HCL 10 mM/EDTA 1 mM (pH: 7,5)

○ Tris-HCL 2 M (pH: 7,5)	500 µl
○ EDTA 0,25 M (pH: 8,0)	400 µl
○ Aigua destil·lada csp	100 ml

Conservar a 4°C (no cal ajustar el pH de la solució).

9.4 Seqüenciació

Sephadex (Sephadex G-50 Fine, GE Healthcare):

- 1) Posar 15 g de sephadex en 250 ml TE.
- 2) Barrejar mitjançant agitació suau durant 30' a 65 ° C.
- 3) Deixar reposar i canviar la fase aquosa superior per TE fresc.
- 4) Barrejar mitjançant agitació suau durant 30' a 65 ° C.
- 5) Deixar reposar i canviar la fase aquosa superior per aigua destil·lada.
- 6) Barrejar mitjançant agitació suau durant 30' a 65 ° C.

7) Autoclavar.

9.5 Tècniques histològiques

9.5.1 Tinció de Papanicolau

Hematoxilina

Solució 1a de Papanicolau

Solució d'hematoxilina segons Harris (no cal diluir) 2,5 L

Colorant EA50

Solució 3b de Papanicolau

Solució policroma EA50 (no cal diluir) 500 ml

Colorant Orange

Solució *stock*

- Aigua destil·lada 500 ml
- Colorant Orange 25 g

En un matràs, agitar la mescla fins a la dissolució completa del colorant i deixar reposar una setmana fins a la seva utilització.

Solució de treball

- Etanol 96% 950 ml
- Solució *stock* 50 ml
- Àcid fosfotúnic (Cat B775783, Merck) 0,15 mg

9.5.2 Immunohistoquímica

Solució de Rentat: 1 L

- PBS (1x) 1000 ml
- Tritó 1 ml

Es pot preparar i mantenir a TA.

Solució de bloqueig: 1 L

- PBS (1x) 1.000 ml
- Tritó 1 ml
- Llet en pols 30 gr

Substrate-chromogen

- *Substrate buffer* 1 ml
- *DAB+ chromogen* 20 µl

Barrejar bé la solució. Es pot guardar cinc dies a la nevera. S'aconsella fer la quantitat necessària per a les mostres que es tenyeixen.

9.5.3 Immunofluorescència

Solució de bloqueig I: 50 ml

- | | |
|---------------|-------|
| ○ PBS | 40 ml |
| ○ Tritó X-100 | 0,2% |
| ○ FBS | 20% |

Solució d'incubació

- | | |
|---------------|-------|
| ○ PBS | 49 ml |
| ○ FBS | 1% |
| ○ Tritó X-100 | 0,02% |

RESULTATS

1.- ESTUDI DE MUTACIONS MISSENSE, NONSENSE I D'SPLICING

En aquest treball s'han analitzat de forma teòrica vint-i-quatre mutacions *missense*, tres mutacions *nonsense* i vuit mutacions d'*splicing* (Figura 17).

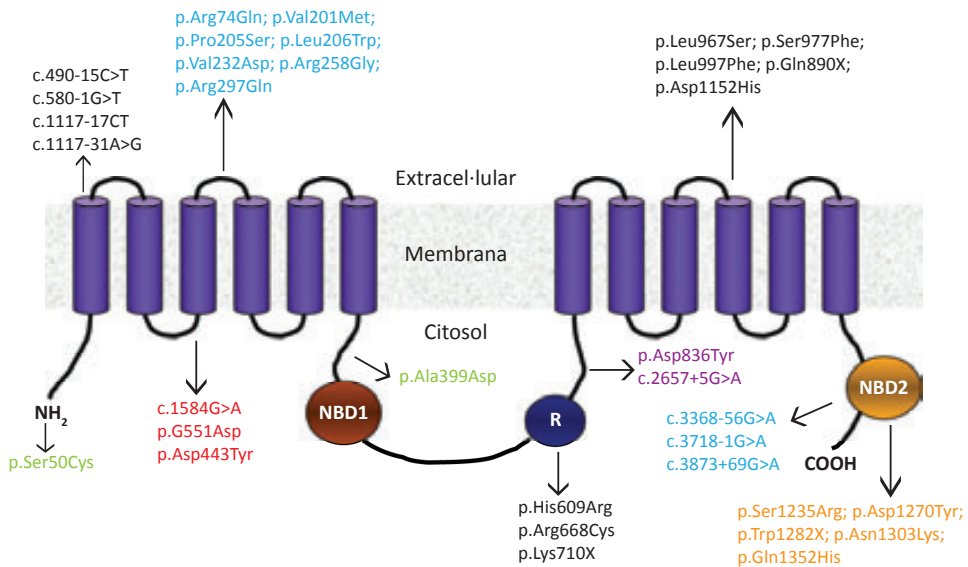


Figura 17.- Localització de les mutacions estudiades *in silico*

Localització de les mutacions exòniques i intròniques estudiades a nivell teòric en l'estructura de la proteïna CFTR.

1.1 Anàlisi computacional de la seqüència

Per determinar les possibles alteracions de les diferents mutacions sobre l'expressió de *CFTR* s'ha estudiat el seu efecte a nivell teòric basant-se en quatre punts: **1)** l'efecte del canvi de nucleòtid en els diferents elements d'*splicing*, **2)** la conservació de l'aminoàcid a les mutacions exòniques, **3)** la natura del canvi de l'aminoàcid i la seva localització a la proteïna i **4)** l'efecte que causa el canvi d'aminoàcid a la proteïna. S'han emprat els programes de forma individual i englobats en l'Alamut™ per a l'anàlisi de la seqüència tant de DNA com de proteïna (pàgina 65).

1) Els efectes més clars en els elements d'*splicing* s'han observat a les mutacions c.580-1G>T, c.2657+5G>A i c.3718-1G>A. Totes tres produeixen una marcada disminució o abolicció dels llocs consens de l'*splicing* (Figura 18). El canvi d'afinitat s'ha detectat en dos o més dels algorismes emprats. L'alteració en els llocs d'unió a diverses proteïnes SR també ha estat predita amb el programa ESEfinder per a les mutacions c.580-1G>T i c.2657+5G>A. La primera perd un lloc d'unió a la proteïna SRp40 i la segona a la proteïna SC35. Els resultats del programa Rescue Ese només mostren el guany d'un lloc consens per la unió d'aquestes proteïnes a la mutació c.2657+5G>A.

Per a la mutació c.3718-1G>A no s’ha observat cap alteració en els elements exònics. En les altres cinc mutacions intròniques no s’ha observat cap canvi indicatiu de la seva implicació en l’alteració d’aquest procés (Taula 7).

A)

Exó 6a; wt

```
atgtttaagcacattgctatgtgctccatgtaatgattacctagattttagtgtgctcagaaccacza-
agtgtttgatcatataagctccttttactgtcttctttcatatatgattgttagtttctaggggtgga-
agatacaatgacacctgttttctgtgcttttattttccagGGACTTGCATTGGCACATTTTCGTGTG-
GATCGTCCTTTTGAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTAATCTGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTG-
GACTTGGTTTTCCTGATAGTCCCTTGCCCTTTTTCAGGCTGGGCTAGGGAGAATGATGATGAAGTACAGGtag-
caacctattttcataaacttgaaagttttaaaaattatgttttcaaaaagcccacttttagtaaaaccag-
gactgctctatgcatagaacagtgatcttcagtgctcattaaatTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTgagaca-
gagtctagatctgtcaccagctggagtgcagtgccacgatcttggtcactgcaacttctgctcc-
caggctcaagcaattctcctgcctcagcctccggagtagctg
```

Exó 6a; c.580-1G>T

```
atgtttaagcacattgctatgtgctccatgtaatgattacctagattttagtgtgctcagaaccacga-
agtgtttgatcatataagctccttttactgtcttctttcatatatgattgttagtttctaggggtgga-
agatacaatgacacctgttttctgtgcttttattttccatGGACTTGCATTGGCACATTTTCGTGTG-
GATCGTCCTTTTGAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTAATCTGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTG-
GACTTGGTTTTCCTGATAGTCCCTTGCCCTTTTTCAGGCTGGGCTAGGGAGAATGATGATGAAGTACAGGtag-
caacctattttcataaacttgaaagttttaaaaattatgttttcaaaaagcccacttttagtaaaaccag-
gactgctctatgcatagaacagtgatcttcagtgctcattaaatTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTgagaca-
gagtctagatctgtcaccagctggagtgcagtgccacgatcttggtcactgcaacttctgctcc-
caggctcaagcaattctcctgcctcagcctccggagtagctg
```

Acceptor site predictions for Exó 6a; wt:

Start	End	Score	Intron	Exon
110	150	0,67	tatatgattgttagtttctaggggtggaagatacaatgaca	
159	199	0,97	tgctgtgcttttattttcca g ggacttgcattggcacattt	
240	280	0,62	ctaatctgggagttgttacaggcgtctgccttctgtggact	
274	314	0,66	gtggacttggtttctgatagtccttgcctttttcaggct	
291	331	0,98	atagtccttgcctttttcaggctgggctagggagaatgat	
462	502	0,93	TTTTTTTTTTTTTTTTTgagacagagtctagatctgtcac	
541	581	0,88	actgcaacttctgcctcccaggctcaagcaattctcctgcc	

Acceptor site predictions for Exó 6a; c.580-1G>T:

Start	End	Score	Intron	Exon
110	150	0,67	tatatgattgttagtttctaggggtggaagatacaatgaca	
240	280	0,62	ctaatctgggagttgttacaggcgtctgccttctgtggact	
274	314	0,66	gtggacttggtttctgatagtccttgcctttttcaggct	
291	331	0,98	atagtccttgcctttttcaggctgggctagggagaatgat	
462	502	0,93	TTTTTTTTTTTTTTTTTgagacagagtctagatctgtcac	
541	581	0,88	actgcaacttctgcctcccaggctcaagcaattctcctgcc	

B)

Exó 14b; wt

ggaataggtgaagatgtagaaaaaaatcaactgtgtcttggtccattccagGTGGCTGCTTCTTTGGTTGT-
GCTGTGGCTCCTTGAAAgtagatattccatgtcctattgtgtagattgtgttttatttctgttgattaaat-
attgt

Exó 14b; c.2657+5G>A

ggaataggtgaagatgtagaaaaaaatcaactgtgtcttggtccattccagGTGGCTGCTTCTTTGGTTGT-
GCTGTGGCTCCTTGAAAgtagaatattccatgtcctattgtgtagattgtgttttatttctgttgattaaat-
attgt

Donor site predictions for Exó 14b; wt:

Start	End	Score	Exon	Intron
1	15	0,01	ggaataggtgaagat	
47	61	0,10	attccaggtggctgc	
85	99	0,86	ttggaaagtga	g at

Donor site predictions for Exó 14b; c.2657+5G>A:

Start	End	Score	Exon	Intron
1	15	0,01	ggaataggtgaagat	
47	61	0,10	attccaggtggctgc	
85	99	0,01	ttggaaagtga	a at

C)

Exó 20; wt

gtttctctatttctgttccaaggtgtgttctccatataatcaacattgggtcaggattgaaagtgtgcaa-
caaggttgaatgaataagtgaaaatcttccactggtgacaggataaaatattccaatgggtttttattgaa-
tacaactgaattatggttatggcatggtacctatattgtcacagaagtgatcccatcacttttaccttata**g-**
GTGGGCCTCTTGGGAAGAACTGGATCAGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTGAGACTACTGAACACT-
GAAGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCTTGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTG-
GAGTGATACCACAGgtgagcaaaaggacttagccagaaaaaggcaactaaattatatttttactgctattt-
gatacttgactcaagaaattcatattactctgcaaaaatataatttggttatgcattgctgtctttttctcca-
gtgcagttttctcatagccagaaaagatgtctctaaaagtttggaaattctcaaatctggttattgaaatgt-
tcatagctttgatagtggtttttcagaa

Exó 20; c.3718-1G>A

gtttctctatttctgttccaaggtgtgttctccatataatcaacattgggtcaggattgaaagtgtgcaa-
caaggttgaatgaataagtgaaaatcttccactggtgacaggataaaatattccaatgggtttttatt-
gaagtacaactgaattatggttatggcatggtacctatattgtcacagaagtgatcccatcacttttac-
cttata**a**GTGGGCCTCTTGGGAAGAACTGGATCAGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTGAGAC-
TACTGAACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCTTGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAG-
GAAAGCCTTTGGAGTGATACCACAGgtgagcaaaaggacttagccagaaaaaggcaactaaattatattttt-
tactgctatttgatacttgactcaagaaattcatattactctgcaaaaatataatttggttatgcattgct-
gtctttttctccagtgagttttctcatagccagaaaagatgtctctaaaagtttggaaattctcaaatctg-
gttattgaaatgttcatagctttgatagtggtttttcagaa

Acceptor site predictions for Exó 20; wt:

Start	End	Score	Intron	Exon
1	41	0,40	gtttctctattctgttccaaggttgtttgtctccatata	c
194	234	1,00	cccatcacttttaccttata	g gtgggcctcttgggaagaac
482	522	0,94	attgctgtctttttctccagtgcagttttctcatagggcag	
498	538	0,86	tccagtgcagttttctcatagggcagaaaagatgtctctaaa	

Acceptor site predictions for Exó 20; c.3718-1G>A:

Start	End	Score	Intron	Exon
1	41	0,40	gtttctctattctgttccaaggttgtttgtctccatata	c
482	522	0,94	attgctgtctttttctccagtgcagttttctcatagggcag	
498	538	0,86	tccagtgcagttttctcatagggcagaaaagatgtctctaaa	

Figura 18.- Anàlisi *in silico* de mutacions (Splice Site Prediction By Neural Network)

Detall de l'anàlisi *in silico* de les mutacions c.580-1G>T (intró 5), c.2657+5G>A (intró 14b) i c.3718-1G>A (intró 19). Es pot observar la seqüència salvatge i mutada corresponent a cada exó i els seus introns flanquejants. **A)** En la mutació c.580-1G>T s'ha perdut un lloc acceptor de *splicing* (0,97>0,00). **B)** La mutació c.2657+5G>A ha disminuït de forma significativa l'afinitat per un lloc donador d'*splicing* (0,86>0,01), mentre que **C)** la mutació c.3718-1G>A ha perdut un lloc acceptor d'*splicing* (1,00>0,00). En vermell s'ha marcat la base on es produeix el canvi i s'han subratllat els elements acceptors i donadors d'*splicing* que han quedat modificats per les mutacions.

Pel que respecta a les mutacions situades a la seqüència exònica, no s'ha trobat cap efecte clar als diferents elements d'*splicing*. Hi ha mutacions que produeixen canvis en l'afinitat en elements d'*splicing*, però aquests han estat menors al 20% o únicament detectables per un dels diferents algorismes que empra l'Alamut™. La majoria d'aquests canvis s'han observat en elements que es troben en els exons i que per si sols tenen una baixa afinitat per la maquinària d'*splicing*. A la taula 7 es mostren detallats els resultats d'aquestes anàlisis.

2) Dels vint-i-quatre canvis d'aminoàcid que s'han analitzat, tretze han presentat una conservació total, és a dir, s'han trobat en aquesta posició en el 100% de les espècies analitzades pel programa Alamut™. La resta d'aminoàcids s'han trobat conservats a més del 80% de les espècies, a excepció de la mutació p.Val232Asp, que s'ha observat en un 72%

3) Els aminoàcids es classifiquen segons la seva cadena lateral en quatre grups: polars, no polars, carregats negativament i carregats positivament. Basant-se en aquesta classificació, s'ha analitzat si el canvi d'aminoàcid alterava les propietats de la cadena lateral i per tant si afectaria més o menys la proteïna sintetitzada. En el 23% dels casos el canvi no ha alterat les propietats de la cadena lateral. En el 77% restant s'han trobat diferents combinacions, excepte canvis d'aminoàcids de càrrega negativa a no polar, de polar a càrrega negativa i de no polar a càrrega positiva.

Taula 7. - Anàlisi *in silico* de les mutacions *missense*, *nonsense* i *splicing* (Alamut™)

MUTACIÓ	MUTACIONS INTRÒNIQUES										INTRÓ		
	5'ss					3'ss						ESE Finder	Rescue ESE
	NNSPLICE	MaxEntScan	SpliceSiteFind	GeneSplicer	BranchPoint	NNSPLICE	MaxEntScan	SpliceSiteFind	GeneSplicer				
c.2657+5G>A	PLI	91%*	<20	PLI	----	----	----	----	----	PLI	NLI	14b	
c.3873+69A>C	S.C	PLI	S.C	S.C	----	----	----	----	----	S.C	S.C	20	
c.490-15C>T	----	----	----	----	45%	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	4	
c.580-1G>T	----	----	----	----	<20%	PLI	PLI	PLI	PLI	PLI	S.C	5	
c.1117-17C>T	----	----	----	----	S.C	23%	<20%	S.C	<20%	S.C	S.C	7	
c.1117-31A>G	----	----	----	----	PLI	S.C	PLI	S.C	<20%	NLI	S.C	7	
c.3368-56G>A	----	----	----	----	NLI	S.C	PLI	S.C	S.C	<20%	S.C	17b	
c.3718-1G>A	----	----	----	----	<20%	PLI	<20%	<20%	PLI	<20%	S.C	19	

MUTACIÓ	MUTACIONS EXÒNIQUES										EXÓ		
	5'ss					3'ss						ESE Finder	Rescue ESE
	NNSPLICE	MaxEntScan	SpliceSiteFind	GeneSplicer	BranchPoint	NNSPLICE	MaxEntScan	SpliceSiteFind	GeneSplicer				
c.1584G>A (p.=)	S.C	37%*	<20%	<20%	NLI	S.C	S.C	S.C	S.C	PLI	2 NLI	10	
p.Lys710X (c.2128A>T)	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	3 PLI	13	
p.Gln890X (c.2668C>T)	S.C	S.C	S.C	S.C	<20%/60%	S.C	<20%	S.C	S.C	PLI	2 NLI	15	
p.Trp1282X (c.3846G>A)	S.C	S.C	S.C	<20%	NLI/<20%	S.C	<20%	S.C	S.C	PLI	3 NLI	20	
p.Ser50Cys (c.148C>G)	S.C	S.C	S.C	S.C	23%*	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	PLI	2	
p.Arg74Gln (c.221G>A)	S.C	S.C	S.C	S.C	NLI	S.C	NLI	NLI	S.C	PLI / NLI	NLI	3	
p.Val201Met (c.601G>A)	S.C	S.C	S.C	S.C	NLI	S.C	S.C	S.C	S.C	NLI	S.C	6a	
p.Pro205Ser (c.613C>T)	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	NLI	<20%	PLI / NLI	S.C	6a	
p.Leu206Trp (c.617T>G)	S.C	S.C	S.C	S.C	<20%	S.C	S.C	<20%	S.C	PLI	S.C	6a	
p.Val232Asp (c.695T>A)	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	<20%	<20%	<20%	100%	PLI	S.C	6a	

MUTACIÓ	5'ss										3'ss										ESE Finder	Rescue ESE	EXÓ
	NNSPLICE	MaxEntScan	SplicSiteFind	GeneSplicer	BranchPoint	NNSPLICE	MaxEntScan	SplicSiteFind	GeneSplicer		NNSPLICE	MaxEntScan	SplicSiteFind	GeneSplicer									
p.Arg258Gly (c.772A>G)	S.C	S.C	S.C	S.C	PLI	S.C	S.C	S.C	S.C		S.C	S.C	S.C	S.C	S.C								
p.Arg297Gln (c.890G>A)	S.C	S.C	S.C	S.C	NLI	S.C	S.C	S.C	S.C		S.C	S.C	S.C	S.C	S.C								
p.Ala399Asp (c.1196C>A)	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C		S.C	S.C	<20%	PLI / NLI	NLI								
p.Asp443Tyr (c.1327G>T)	S.C	S.C	S.C	S.C	24%*	S.C	PLI	PLI	PLI		PLI	PLI	S.C	S.C	3 PLI								
p.Gly551Asp (c.1652G>A)	S.C	<20%	S.C	<20%	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C		S.C	S.C	S.C	S.C	<20%	2 NLI							
p.Phe587Ile (c.1759T>A)	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C		S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C.							
p.His609Arg (c.1826A>G)	S.C	S.C	S.C	S.C	PLI	S.C	PLI	PLI	PLI		S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	PLI							
p.Arg668Cys (c.2002C>T)	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	<20%	23%	<20%	<20%		<20%	<20%	72%	S.C	S.C	S.C.							
p.Asp836Tyr (c.2506G>T)	S.C	S.C	S.C	<20%	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C		S.C	S.C	<20%	S.C	S.C	S.C.							
p.Leu967Ser (c.2900T>C)	S.C	S.C	S.C	<20%	S.C	S.C	PLI	PLI	PLI		PLI	PLI	S.C	PLI / <20%	PLI	15							
p.Ser977Phe (c.2930C>T)	S.C	S.C	S.C	S.C	63%/-23%	S.C	S.C	S.C	S.C		S.C	S.C	S.C	S.C	NLI	16							
p.Leu977Phe (c.2991G>C)	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C		S.C	S.C	<20%	S.C	S.C.	17a							
p.Asp1152His (c.3454G>C)	S.C	S.C	S.C	28%	<20%	S.C	<20%	S.C	S.C		S.C	S.C	S.C	NLI	S.C.	18							
p.Ser1235Arg (c.3705T>G)	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	S.C	100%	<20%	<20%		S.C	<20%	S.C	PLI	S.C.	19							
p.Asp1270Tyr (c.3808G>T)	60%*	S.C	S.C	<20%	NLI/<20%	S.C	S.C	S.C	S.C		S.C	S.C	S.C	NLI / <20%	2 NLI	20							
p.Asn1303Lys (c.3909C>G)	S.C	S.C	S.C	S.C	24%* / <20%	S.C	45%*	S.C	S.C		S.C	S.C	S.C	S.C	2 NLI	21							
p.Gln1352His (c.4056G>T)	S.C	S.C	S.C	S.C	<20%	S.C	48%	S.C	S.C		S.C	S.C	S.C	S.C	PLI	22							

Resum dels resultats obtinguts amb els diferents algorismes inclosos en el programa Alamut per a la caracterització de l'efecte de mutacions en els diferents elements implicats en l'*splicing*.

S.C.: Sense canvis; **PLI:** Pèrdua d'un lloc d'*splicing*; **NLI:** Guany d'un lloc d'*splicing*; **<20%:** El canvi en l'afinitat pel lloc d'*splicing* és menor al 20%; **%*:** Tant per cent de disminució en l'afinitat pel lloc d'*splicing*; **%:** Tant per cent d'augment en l'afinitat pel lloc d'*splicing*.

4) L'efecte del canvi d'aminoàcid ha estat nociu per a la funció proteica en totes les mutacions a excepció de p.Ser1235Arg. Aquests resultats han estat obtinguts amb el programa SIFT. En canvi, l'anàlisi del programa PolyPhen no només ha considerat la mutació p.Ser1235Arg com a benigna sinó també les mutacions p.Leu997Phe, p.Arg297Gln i p.Arg74Gln. Per a la resta de mutacions, ambdós programes han presentat els mateixos resultats.

Els resultats corresponents als apartats 2, 3 i 4 es mostren detallats a la taula 8.

Taula 8.- Anàlisi teòrica de mutacions a nivell proteic

Resum de les dades obtingudes de l'anàlisi de la proteïna en les diferents mutacions *missense* estudiades.

ANÀLISI DE LA PROTEÏNA					
MUTACIÓ	CONSER AA	DOMINI	CANVI AA	EFECTE	
				SIFT	POLYPHEN
p.Ser50Cys	97%	NH2	Pol / Pol	0,00	Ps Dmg
p.Arg74Gln	84%	NH2	C Pos / Pol	0,00	BNG
p.Val201Met	91%	TM1	No Pol / No pol	0,01	BNG
p.Pro205Ser	100%	TM1	No Pol / Pol	0,00	Ps Dmg
p.Leu206Trp	100%	TM1	No Pol / No pol	0,00	Ps Dmg
p.Val232Asp	72%	TM1	No Pol / C Neg	0,00	Ps Dmg
p.Arg258Gln	100%	TM1	C Pos / No Pol	0,00	Pr Dmg
p.Arg297Gln	97%	TM1	C Pos / Pol	0,00	BNG
p.Ala399Asp	100%	UNIÓ	No Pol / C Neg	0,00	Pr Dmg
p.Asp443Tyr	100%	NBD1	C Neg / Pol	0,01	Pr Dmg
p.Gly551Asp	100%	NBD1	No Pol / C Neg	0,00	Pr Dmg
p.Phe587Ile	100%	UNIÓ	No Pol / No pol	0,00	Pr Dmg
p.His609Arg	95%	R	C Pos / C Pos	0,04	Pr Dmg
p.Arg668Cys	100%	R	C Pos / Pol	0,00	Pr Dmg
p.Asp836Tyr	100%	UNIÓ	C Neg / Pol	0,00	Pr Dmg
p.Leu967Ser	81%	TM2	No Pol / Pol	0,00	Ps Dmg
p.Ser977Phe	84%	TM2	Pol / No Pol	0,00	Ps Dmg
p.Leu997Phe	100%	TM2	No Pol / No pol	0,00	BNG
p.Asp1152His	84%	TM2	C Neg / C Pos	0,00	Ps Dmg
p.Ser1235Arg	82%	NBD2	Pol / C Pos	0,42	BNG
p.Asp1270Tyr	100%	NBD2	C Neg / Pol	0,00	Ps Dmg
p.Asn1303Lys	100%	NBD2	Pol / C Pos	0,00	Pr Dmg
p.Gln1352His	100%	NBD2	Pol / C Pos	0,00	Pr Dmg

C Pos: Càrrega positiva; **C Neg:** Càrrega negativa; **Pol:** Polar; **No Pol:** No polar; **Ps Dmg:** Possiblement nociu; **Pr Dmg:** Probablement nociu; **BNG:** Benigne.

1.2 Anàlisi qualitativa de la seqüència

L'aproximació teòrica emprada s'ha comprovat de forma experimental a nivell d'RNA (cDNA) en una electroforesis en gels de poliàcrilamida (PAGE 6%) tenyits amb BrEt (pàgina 69). Han estat comparats els productes d'amplificació d'un individu normal (wt/wt) amb els d'un pacient heterozigot compost per cada una de les següents mutacions.

A) Mutacions exòniques

S'ha obtingut RNA de set mutacions basant-se en els resultats obtinguts de l'estudi *in silico*, en la nostra casuística i/o en el fenotip associat (Alonso, Heine-Suner et al. 2007; Castellani, Cuppens et al. 2008).

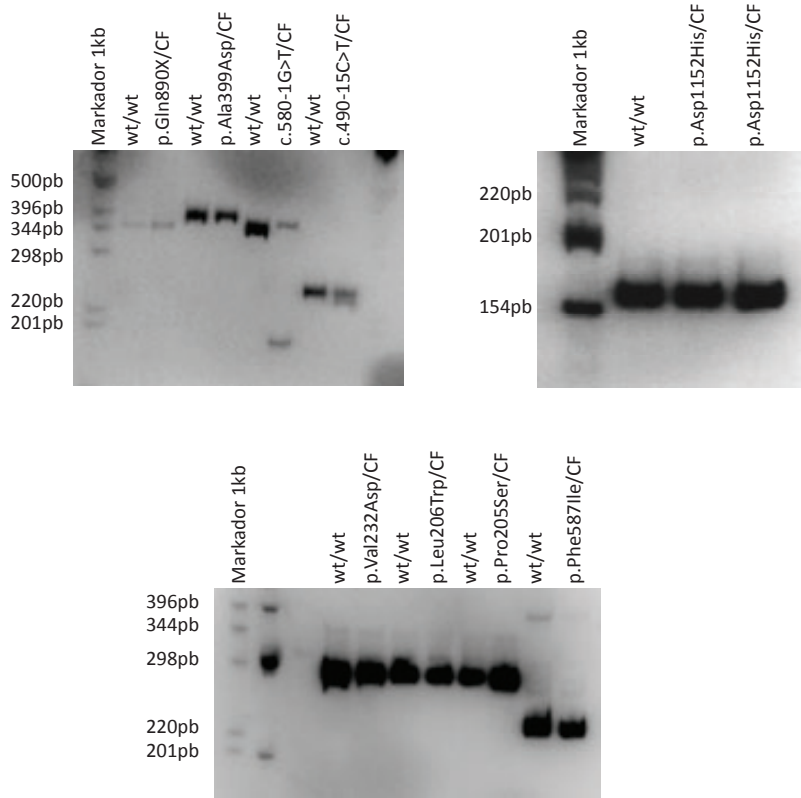


Figura 19.- Anàlisi qualitativa de transcrits

El cDNA s'ha amplificat per cada regió específica i el producte s'ha visualitzat en gels de poliacrilamida (PAGE 6%) tenyits amb BrEt. L'anàlisi de les mutacions **A)** p.Val232Asp, p.Leu206Trp i p.Phe587Ile., **B)** p.Asp1152His i **C)** p.Gln890X, p. Ala399Asp, c.580-1G>T i c.490-15C>T i els CTLs negatius corresponents. No s'ha observat la presència de cap transcrit alternatiu a les mutacions exòniques. En el pacient portador de la mutació *c.580-1G>T* s'ha observat una segona banda que ha estat seqüenciada de forma directa (Figura 20).

En cada cas, s'ha amplificat de forma específica l'exó corresponent a les mutacions següents:

- Exó 6a (ex5F2-ex6aR2, pàgina 69): p.Leu206Trp té una freqüència de 1,64% en la població espanyola, pertany a la classe II de mutacions i és causant de FQ i fenotips associats. p.Val232Asp té una freqüència de 0,71% en la nostra casuística, pertany a la classe IV de mutacions i està associada a FQ. p.Pro205Ser té una freqüència del 0,30%, pertany a la classe IV de mutacions i el seu fenotip FQ és lleu.

- Exó 8 (ex7F-ex9R, pàgina 69): p.Ala399Asp s’ha identificat en un únic al·lel de la població espanyola (0,10%), pertany a la classe IV i el seu efecte és desconegut.
- Exó 12 (ex11F-ex13R, pàgina 69): p.Phe587Ile pertany a la classe IV de mutacions i està associada a FQ.
- Exó 15 (ex14aF1-ex16R, pàgina 69): p.Gln890X té una freqüència a la població espanyola de 1,43%, pertany a la classe I i per tant està associada a FQ .
- Exó 18 (ex17bF-ex19R, pàgina 69): p.Asp1152His té una freqüència del 0,10% en la població espanyola, pertany a la classe IV i pot estar associada a FQ o a fenotips associats.

El producte d’amplificació específic ha estat de la mida esperada pels al·lells wt i en cap cas s’ha observat la presència de transcrits alternatius (Figura 19).

B) Mutacions intròniques

De les vuit mutacions intròniques estudiades, quatre s’han analitzat de forma específica. A les mutacions c.580-1G>T, c.2657+5G>A i c.3718-1G>A s’ha detectat una banda addicional.

c.580-1G>T

En la mostra amb la mutació c.580-1G>T s’han observat dues bandes, una primera de 347pb que correspon a la mida esperada (ex5F-ex6bR, pàgina 69) i una segona de 184pb (Figura 19). La seqüència directa d’ambdós fragments ha evidenciat la pèrdua de 163pb en l’amplicó petit, que es corresponen a l’exó 6a (Figura 20). La pèrdua de l’exó 6a altera la pauta de lectura i crea un codó de terminació prematura en el triplet 9 (TGA) de l’exó 6b.

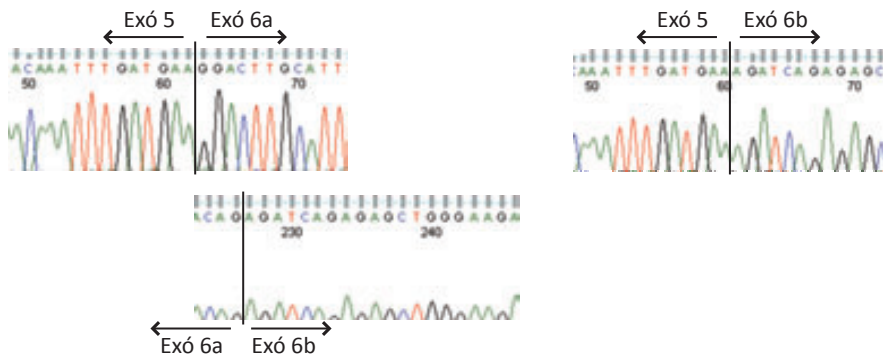


Figura 20.- Anàlisi directa de la mutació c.580-1G>T

La seqüenciació de les dues bandes observades en el gel de poliacrilamida (PAGE 6%). Figura 19) ha permès la identificació d’un transcrit alternatiu, en l’individu amb la mutació c.580-1G>T, que perd l’exó 6a (dreta), i el transcrit normal (exons 5, 6a i 6b) present en ambdós individus (esquerra). Les seqüències s’han realitzat amb l’encebador directe.

Aquesta mutació té una prevalença en població espanyola del 0,92%, pertany a la classe I de mutacions i per tant està associada a FQ (Alonso, Heine-Suner et al. 2007; Castellani, Cuppens et al. 2008).

c.2657+5G>A

En la mutació c.2657+5G>A s’han observat dues bandes, una primera banda de 211pb que correspon a la mida esperada (ex14aF-ex15R, pàgina 69) i una segona de 173pb. La seqüenciació directa d’ambdós fragments ha evidenciat la pèrdua de 38pb que corresponen a l’exó 14b (Figura 21). L’anàlisi de la seqüència d’aquest transcrit alternatiu revela l’alteració del marc de lectura i la creació d’un codó de terminació prematura al triplet número 9 (TAG) de l’exó 15.

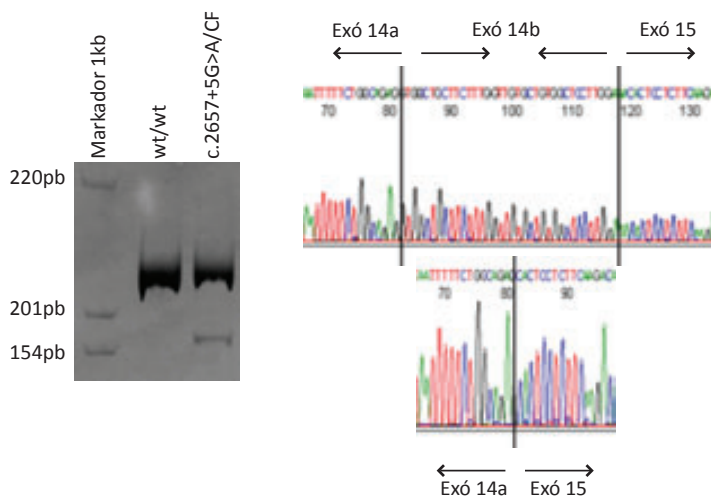


Figura 21.- Anàlisi qualitativa de la mutació c.2657+5G>A

A) S’ha amplificat de forma específica el cDNA per a un fragment corresponent als exons 14a, 14b i 15 i el producte s’ha visualitzat en gels de poliacrilamida (PAGE 6%) tenyits amb BrEt. S’ha observat una banda corresponent a aquest fragment en l’individu control i una segona banda que ha perdut 38pb en el pacient. **B)** La seqüenciació de les dues bandes ha permès la identificació d’un transcrit alternatiu que perd l’exó 14b (dreta) en el pacient i el transcrit normal en ambdós individus (esquerra). Les seqüències s’han realitzat amb l’encebador directe.

Aquesta mutació té una prevalença en població espanyola del 1,23%, pertany a la classe V de mutacions i dona lloc a un fenotip FQ lleu o a CFTR-RD (Alonso, Heine-Suner et al. 2007; Castellani, Cuppens et al. 2008).

c.3718-1G>A

També en aquest cas, la mostra amb la mutació c.3718-1G>A, presenta dos productes d’amplificació. Un fragment de 465pb que es correspon a la seqüència normal (ex19F-ex21R, pàgina 69) i un segon fragment de 309pb que ha perdut l’exó 20 (Figura 22). A diferència de les dues mutacions anteriors, l’estudi del transcrit alternatiu no determina un canvi en la pauta de lectura, però la seva localització en

el domini NBD2 i concretament en la seqüència consens Walker A implica l'eliminació d'un punt d'unió a l'ATP i, per tant, s'impedeix l'activitat del canal.

Aquesta mutació pertany a la classe I i ha estat identificada en la nostra casuística en un pacient èxitus en les primeres 24 h de vida.

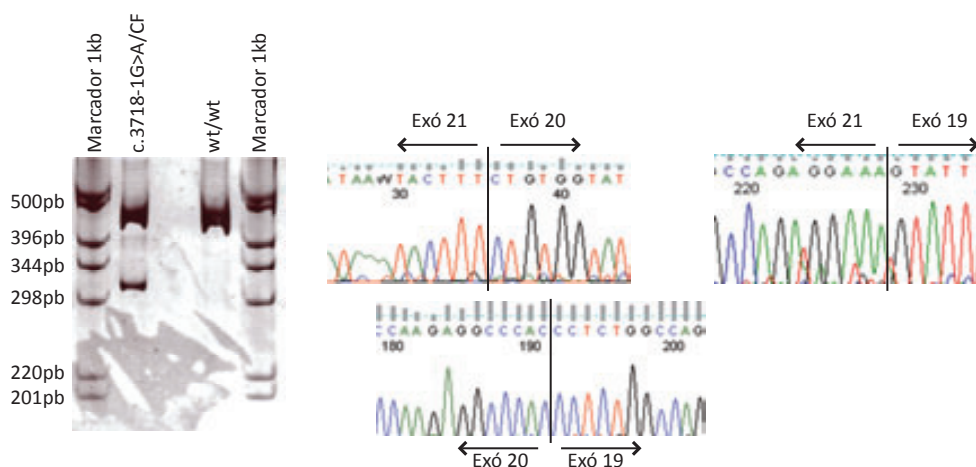


Figura 22.- Anàlisi qualitativa de la mutació c.3718-1G>A

A) S'ha amplificat de forma específica el cDNA per a un fragment corresponent als exons 19, 20 i 21 i el producte s'ha visualitzat en gels de poliacrilamida (PAGE 6%) tenyits amb BrEt. S'ha observat una banda corresponent a aquest fragment en l'individu control i una segona banda que ha perdut 156pb en el pacient. **B)** La seqüenciació de les dues bandes observades ha permès la identificació d'un transcrit alternatiu que perd l'exó 20 (dreta) i el transcrit normal present en ambdós individus (esquerra). Ambdues seqüències s'han realitzat amb l'encebador revers.

L'estudi *in silico* i qualitatiu d'aquestes mutacions s'ha pres com a criteri d'inclusió per al posterior estudi de l'expressió de *CFTR*. Les mutacions c.580-1G>T, c.2657+5G>A i c.3718-1G>A han presentat alteracions en l'afinitat per diferents elements d'*splicing*, que s'ha traduït en la presència de transcrits alternatius que s'utilitzaran en els estudis d'expressió.

2.- *CFTR*: ANÀLISI MUTACIONAL

2.1 Cribatge del gen

S'ha realitzat l'anàlisi mutacional complet de seixanta-cinc individus, quaranta-sis dels quals són individus sans o amb malaltia pulmonar no relacionada amb *CFTR* (CTLs negatius) i divuit presenten un fenotip FQ (pacients). Per a l'anàlisi mutacional s'han emprat les tècniques de cribatge SSCP/HD, DGGE i la seqüenciació directa (pàgina 70).

Del grup CTLs negatius s'han exclòs quinze individus per la detecció de diferents variants a la seqüència (Figura 23):

1. Modificació de l'*splicing*. S'han identificat les mutacions c.1210-12T5 en l'intró 8 (n=3), c.1584G>A en l'exó 10 (n=5) i c.490-15C>T, en l'intró 4 (n=1).
2. Canvi d'aminoàcid. S'ha identificat l'al·lel compost [p.Gly576Ala; p.Arg668Cys] en els exons 12 i 13, respectivament (n=3), i les mutacions p.Ser50Cys a l'exó 2 (n=1), p.Gly576Ala a l'exó 12 (n=1) i p.Leu967Ser a l'exó 15 (n=1).

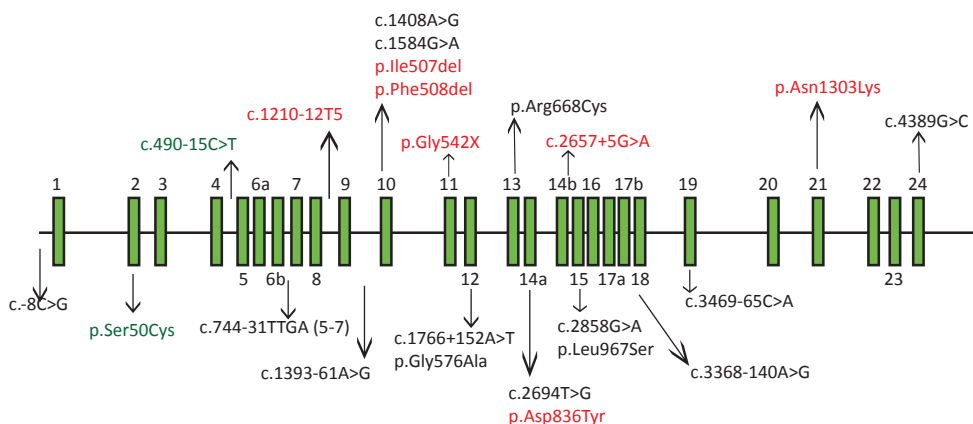


Figura 23.- Anàlisi mutacional del gen *CFTR*

Representació gràfica de l'estructura del gen *CFTR* i la localització de les mutacions associades a FQ (vermell), mutacions no associades a FQ (negre) i mutacions d'efecte desconegut detectades (blau) en l'anàlisi del gen. En verd es destaquen els canvis c.490-15C>T i p.Ser50Cys no descrits anteriorment i dels quals es desconeix l'efecte fenotípic.

Dues de les mutacions no havien estat caracteritzades prèviament, p.Ser50Cys i c.490-15C>T, per tant es desconeix la seva expressió fenotípic. L'estudi *in silico* (Taula 6 i 7) indica un efecte nociu del canvi d'aminoàcid i un augment en l'afinitat pel *branch point* en el canvi intrònic.

La majoria de pacients FQ ja havien estat caracteritzats prèviament al Laboratori de Diagnòstic Molecular, IDIBELL. El cribatge s'ha realitzat únicament en divuit pacients, que han presentat els següents genotips:

- c.2657+5G>A/p.Phe508del (n=5)
- c.2657+5G>A/p.Asn1303Lys (n=1)
- p.Phe508del/p.Phe508del (n=11)
- p.Phe508del/p.Ile507del (n=1)

El cribatge del gen ha permès determinar/corroborar el genotip de totes les mostres analitzades i aplicar el primer criteri d'exclusió de mostres. Els CTLs amb alteracions de la seqüència van ser exclosos dels estudis posteriors (Figura 24).

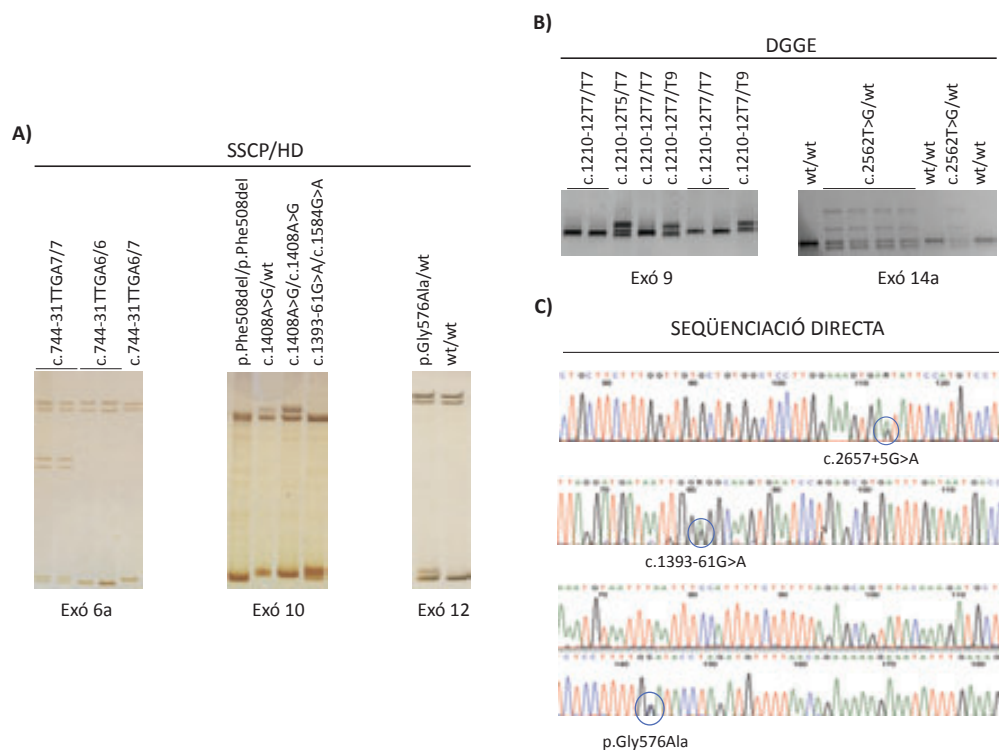


Figura 24.- Tècniques de detecció de mutacions al gen *CFTR*

A) Anàlisi dels exons 6b, 12 i 10 per SSCP/HD. Es detecten diferents patrons: c.744-31TTGA(5_7), p.Gly576Ala, c.1408A>G, c.1393-61A>G, c.1584G>A i p.Phe508del en homozigosi. **B)** Anàlisi dels exons 9 i 14a per DGGE. A l'exó 9 es detecta la variant patològica c.1210-12T5 i les variants polimòrfiques c.1210-12T7 i c.1210-12T9. A l'exó 14a es pot observar la variant c.2562T>G en homozigosi i heterozigosi. **C)** En la seqüència directa de l'exó 14a i part de l'intró 14b s'observa el canvi de base G>A, que es correspon a la mutació c.2657+5G>A.

2.2 Estudi del polimorfisme c.2562T>G (p.=)

S'ha caracteritzat de forma específica la freqüència del polimorfisme c.2562T>G (p.=) (SNPs: rs1042077:T>G) en l'exó 14a en els següents grups:

- En CTLs negatius (n=21): 26,19% (11/42 al·lels)
- En portadors de la mutació c.2657+5G>A/wt (n=9): 61,18% (11/18 al·lels)
- En pacients amb el genotip c.2657+5G>A/FQ (n=8): 50,00% (8/16 al·lels)
- En pacients amb el genotip p.Phe508del/p.Phe508del (n=7): 14,28% (2/14 al·lels)

L'anàlisi estadística d'aquestes dades ha evidenciat diferències significatives en els grups estudiats (p=0,012).

3.- EPITELI NASAL

3.1 Caracterització de cèl·lules epitelials

S'ha comprovat la natura epitelial de les cèl·lules recollides i la capacitat de distingir els diferents tipus cel·lulars presents en les mostres. S'han emprat dues tincions per caracteritzar-les. En primer lloc, una tinció immunohistoquímica contra citoqueratines humanes específiques de teixits epitelials, i en segon lloc una tinció tricròmica de Papanicolau que ha permès la distinció dels diferents tipus cel·lulars (pàgina 85).

La majoria de cèl·lules que s'han observat en aquestes preparacions són positives per l'anticòs contra citoqueratines, per tant, epitelials. En la tinció de Papanicolau, s'han identificat cèl·lules columnars ciliades, cèl·lules basals i cèl·lules caliciformes (Figura 25).

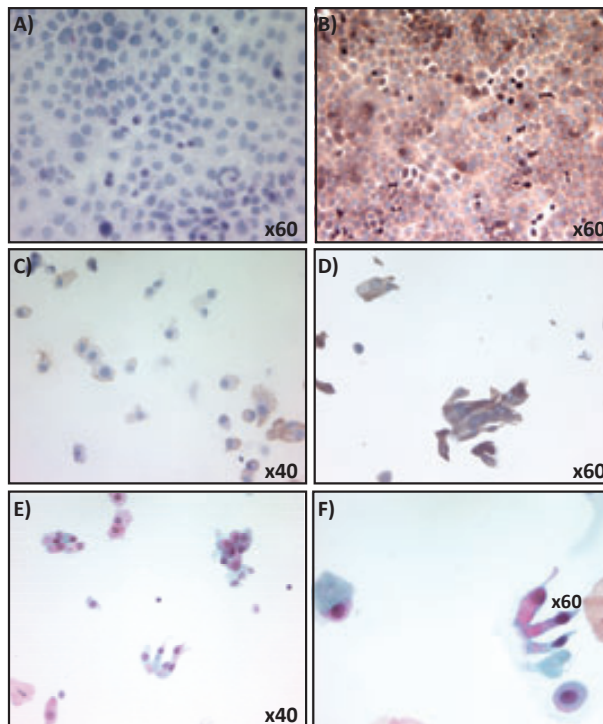


Figura 25.- Tincions simples i complexes de l'EN

Exemples representatius de la tinció immunohistoquímica amb citoqueratines i de Papanicolau. **A)** En la tinció immunohistoquímica a x40 s'observa com la majoria de cèl·lules presents són epitelials i en concret columnars. **B)** Si canviem l'augment (x60) es poden veure en detall els cilis de les cèl·lules columnars ciliades. **C)** La línia cel·lular 16HBE14o- s'ha incubat sense l'anticòs en front a citoqueratines i ha servit com a control negatiu. No s'ha observat senyal positiu per a l'anticòs (x40) en aquesta preparació. **D)** La tinció de Papanicolau permet distingir les cèl·lules en la seva majoria columnars, **E)** però també es poden distingir altres morfologies cel·lulars de l'epiteli: cèl·lules caliciformes i cèl·lules basals.

3.2 Optimització dels protocols per a mostres d'epiteli nasal

L'extracció i caracterització de l'RNA, així com l'optimització de la transcripció inversa, han estat fonamentals per a la posada a punt del protocol experimental emprat en aquest treball. La línia cel·lular HEK293 i un pòlip nasal (PN) han servit per trobar els kits d'extracció d'RNA i de transcripció inversa amb major rendiment.

3.2.1 Extracció i caracterització de l'RNA

En primer lloc s'ha realitzat l'extracció d'RNA de la línia cel·lular HEK293 amb cinc kits d'extracció diferents. S'ha mesurat la concentració de l'RNA obtingut i la seva puresa de forma analítica emprant la ràtio 260/280 nm. La visualització en agarosa tenyida amb BrEt ha permès corroborar les dades analítiques obtingudes (pàgina 68).

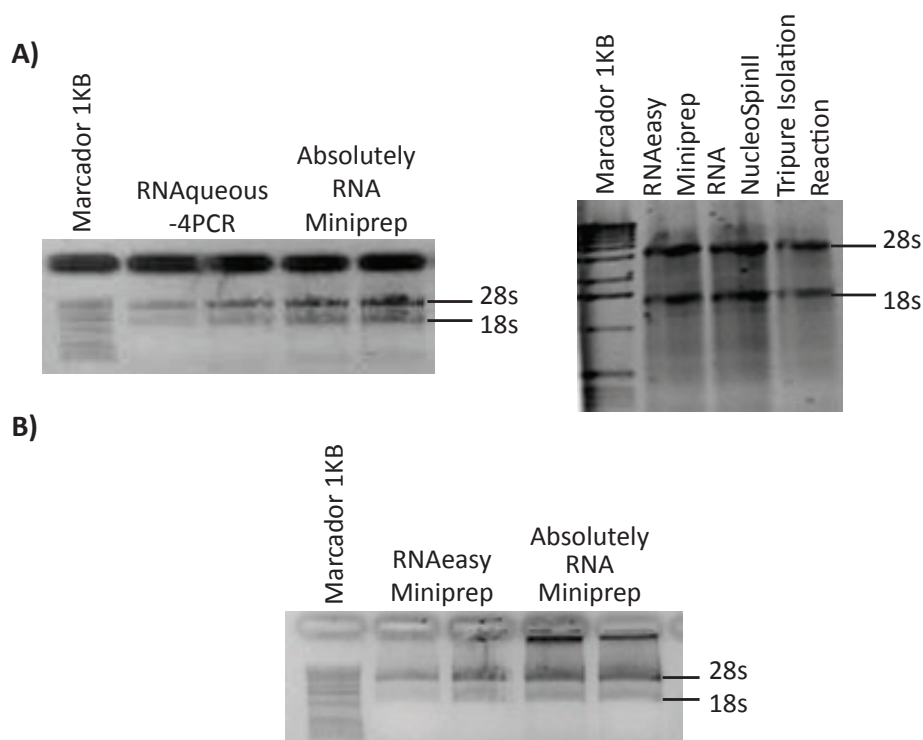


Figura 26.- Extracció d'RNA: visualització dels resultats en gel d'agarosa

Comprovació de la qualitat del RNA extret de **A)** línia cel·lular i **B)** PN en gels d'agarosa a l'1,5% (20' a 80V) tenyits amb BrEt.

Tots els kits d'extracció, excepte l'RNAqueous -4 PCR i una extracció amb Tripure Isolation Reactive, han tingut un rendiment per sobre els 300 ng/ μ l i les ràtios 260/280 nm han complert els criteris de puresa establerts (1,8-2,1) (Taula 9A).

Taula 9.- Dades de concentració i de ràtio 260/280

Dades obtingudes amb els diferents kits d'extracció d'RNA en **A)** la línia cel·lular i **B)** PN.

A)

KIT D'EXTRACCIÓ	(ng/μl)	260/280
RNAqueous -4 PCR (Ambion)	123	2,02
	118	2,05
Absolutely RNA Miniprep (Stratagene)	422	2,03
	513	1,98
RNA NucleoSpin II (Machery-Nagel)	318	2,07
	328	2,07
RNAeasy Miniprep (Qiagen)	343	2,05
	408	2,03
Tripure Isolation Reactive (Roche)	400	1,93
	93	1,65

B)

KIT D'EXTRACCIÓ	(ng/μl)	260/280
RNAeasy Miniprep (Qiagen)	190,49	2,05
	187,62	2,07
Absolutely RNA Miniprep (Stratagene)	245,20	1,99
	264,43	2,06

L'anàlisi qualitativa de les mostres en gels d'agarosa no ha mostrat diferències apreciables entre els cinc kits utilitzats. Les bandes que s'han observat en tots els casos han estat la 28s i la 18s, sent la ràtio entre ambdues 2:1. No s'ha observat un *smear* de baix pes molecular, que indicaria degradació, però sí un *smear* per sota la banda 18s, que es correspon a la població de diferents mRNAs presents en l'RNA total que s'ha extret (Figura 26).

Dels cinc kits testats, en funció del seu rendiment i qualitat, s'han escollit l'Absolutely RNA Miniprep i el RNAeasy Miniprep per valorar la seva eficiència en una mostra de PN. Els resultats han estat acceptables amb els dos kits i es mostren a la figura 26 i la taula 9B.

3.2.2 Transcripció inversa de l'RNA

L'RNA de línia cel·lular que s'ha obtingut amb els kits RNAeasy Miniprep i Absolutely RNA Miniprep ha estat retrotranscrit amb quatre kits de transcripció inversa. El rendiment de les diferents reaccions s'ha comprovat visualment en gels d'agarosa. S'han descartat els kits Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) i First-Strand cDNA Synthesis kit (GE Healthcare Europe GMBH) perquè han produït una síntesi incompleta del cDNA. Les bandes 28s i 18s encara són presents després de la reacció (Figura 27).

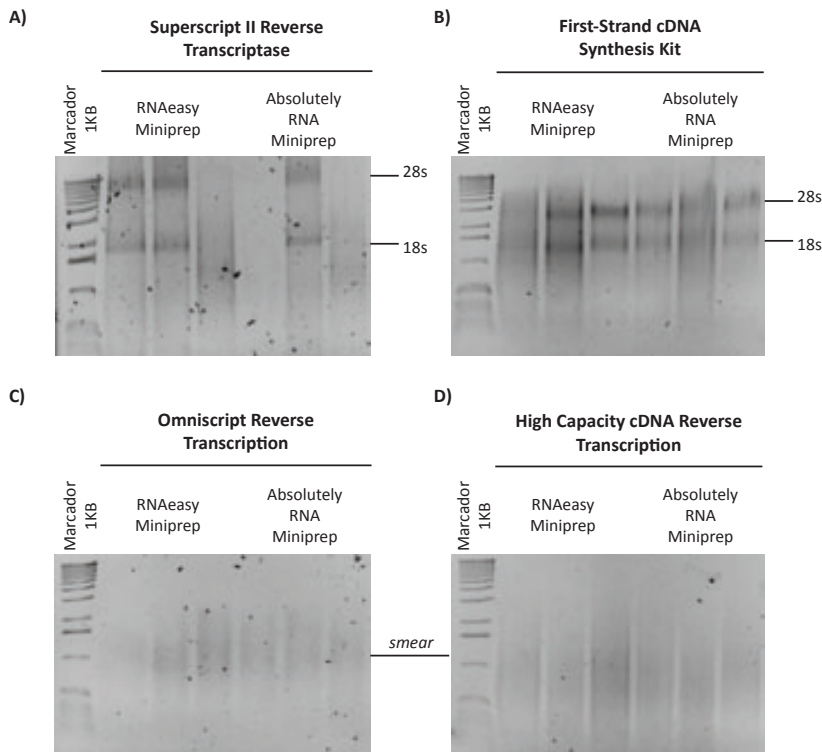


Figura 27.- Transcripció inversa: visualització de resultats en gels d'agarosa I

Resultats de la transcripció inversa de l'RNA d'HEK293 amb RNAeasy Miniprep i Absolutely RNA Miniprep. El cDNA s'ha obtingut amb els kits **A)** Superscript II Reverse Transcriptase; **B)** First-Strand cDNA Synthesis kit; **C)** Omniscript Reverse Transcription; **D)** High-Capacity cDNA Reverse Transcription.

L'RNA de PN ha estat retrotranscrit amb els kits Omniscript Reverse Transcription (Qiagen) i High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). L'Omniscript Reverse Transcription ha funcionat millor amb l'RNA que havia estat extret amb el kit Absolutely RNA Miniprep (Figura 28). Es poden distingir les bandes 28s i 18s en el cDNA obtingut amb aquest kit quan l'extracció d'RNA s'havia fet amb RNAeasy Miniprep. En canvi, amb el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription s'ha observat una síntesi completa en totes les mostres (Figura 28). Aquest últim ha estat escollit per a la realització de l'RT en les mostres d'EN.

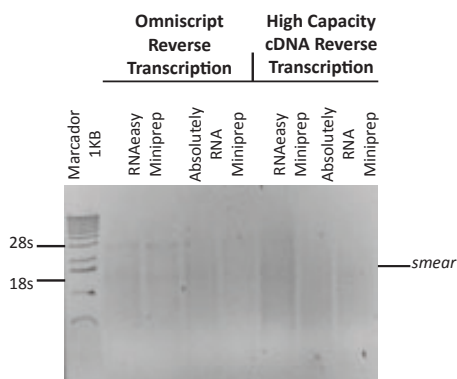


Figura 28.- Transcripció inversa: visualització de resultats en gels d'agarosa II

Visualització dels resultats de la transcripció inversa de l'RNA de PN amb els kits Omniscript Reverse Transcription i High-Capacity cDNA Reverse Transcription.

3.2.3 RT-qPCR

Per poder discriminar entre els dos kits d'extracció d'RNA, s'ha realitzat una reacció d'RT-qPCR amb una parella d'encebadors i una sonda situada entre els exons 21-22 de *CFTR*. S'ha fixat el mateix llindar de quantificació a totes les mostres (0,200) i el valor de Cq s'ha pres com a valor comparatiu (pàgina 80). Per a les reaccions s'han emprat tant el cDNA de línia cel·lular com de PN, i encara que s'ha decidit utilitzar el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription, també s'ha provat la reacció utilitzant el cDNA de l'Omniscrypt Reverse Transcription.

En la línia cel·lular, les diferències entre ambdós kits d'extracció d'RNA són d'aproximadament un cicle. S'ha obtingut un Cq de 16,84 per a l'RNA extret amb l'Absolutely RNA Miniprep, mentre que el Cq ha estat de 15,49 per a l'RNA extret amb el kit RNAeasy Miniprep. Aquestes diferències no s'evidencien a les reaccions realitzades utilitzant l'RNA de PN: els Cq han estat de 25,93 i 25,86 per els kits Absolutely RNA Miniprep i RNAeasy Miniprep, respectivament. Utilitzant el kit d'RT Omniscrypt Reverse Transcription, s'observen diferències de més d'un cicle entre ambdós, tant en les mostres de línia cel·lular com en PN (Taula 10).

Taula 10.- RT-qPCR

Validació del protocol d'extracció i transcripció inversa per a RT-qPCR. **A)** Línia cel·lular i **B)** pòlip nasal.

A)

KIT D'EXTRACCIÓ	KIT TRANSCRIPCIÓ INVERSA	Cq
Absolutely RNA Miniprep	Omniscrypt Reverse Trans.	17,35
	High-Capacity cDNA Reverse Trans.	16,84
RNAeasy Miniprep	Omniscrypt Reverse Trans.	16,01
	High-Capacity cDNA Reverse Trans.	15,49

B)

KIT D'EXTRACCIÓ	KIT TRANSCRIPCIÓ INVERSA	Cq
Absolutely RNA Miniprep	Omniscrypt Reverse Trans.	26,45
	High-Capacity cDNA Reverse Trans.	25,93
RNAeasy Miniprep	Omniscrypt Reverse Trans.	25,38
	High-Capacity cDNA Reverse Trans.	25,86

Tenint en compte els resultats obtinguts en PN, qualsevol dels dos kits d'extracció és vàlid per a la realització de l'estudi. En aquest treball s'ha utilitzat el kit Absolutely RNA Miniprep.

3.3 Caracterització de mostres

L'anàlisi qualitativa de les mostres d'EN s'ha completat amb la mesura de la concentració, la puresa ($A_{260/230}$) i la integritat (RIN) de l'mRNA. Aquests tres paràmetres s'han utilitzat per definir els criteris d'inclusió de mostres i s'han establert en concentracions d'RNA ≥ 50 ng/ul, $A_{260/230} \geq 1,95$ i un RIN ≥ 5 . Tenint en compte aquests paràmetres, per a l'estudi de la mutació c.2657+5G>A s'han inclòs nou mostres de

pacients heterozigots compostos per la mutació i nou individus portadors. Per a la mutació c.580-1G>T s’han utilitzat quatre mostres de pacients heterozigots compostos i tres portadors. Per últim, s’ha emprat un únic individu portador de la mutació c.3718-1G>A. A més d’aquests grups específics, també s’han utilitzat set pacients homozigots per a la mutació p.Phe508del com a CTLs positius i vint-i-un individus sense mutacions com a CTLs negatius.

4.- CFTR: QUANTIFICACIÓ DE TRANSCRITS

4.1 Validació dels gens de referència

No existeix un gen de referència universal, per tant és necessari trobar el gen o gens que s’adaptin millor a cada tipus de mostra i experiment. És, doncs, un pas previ essencial l’avaluació dels gens candidats per validar la seva estabilitat i idoneïtat. En aquest treball s’han avaluat quatre gens, *HPRT1*, *GUSB*, *PMCA4* i *B2M* (pàgina 80), tenint en compte els següents paràmetres.

4.1.1 Interval d’expressió i eficiència

El primer pas per a l’avaluació dels gens de referència ha estat fer una corba patró amb una dilució seriada (1, 1/5, 1/25, 1/125) de cDNA, per veure l’interval d’expressió de cada un d’ells i la seva eficiència d’amplificació. S’han escollit aquells gens amb un interval d’expressió el més semblant possible a *CFTR* i una eficiència d’amplificació d’entre 1,8-2. En primer lloc, s’han realitzat les corbes estàndard amb la línia cel·lular i el PN i, posteriorment, amb EN.

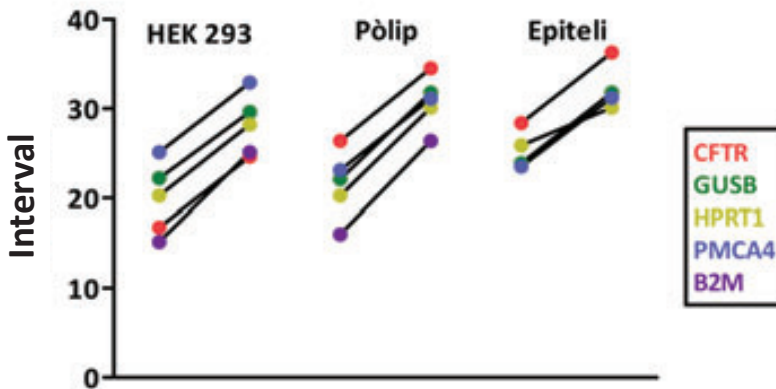


Figura 29.- Interval d’expressió dels gens de referència

Representació esquemàtica de l’interval d’expressió dels cinc gens avaluats (*CFTR*, *GUSB*, *PMCA4*, *HPRT1* i *B2M*) en cada una de les mostres (HEK293, PN i EN) estudiades.

En la comparació d'interval d'expressió dels quatre gens en HEK293, el gen *B2M* ha tingut una expressió (16,0 - 26,4), superior a *GUSB*, *HPRT1* i *PMCA4*, però no a *CFTR* (16,8 - 24,6), perquè la línia cel·lular el sobreexpressa. En PN, on *CFTR* s'expressa de forma endògena, les diferències no han estat tan evidents per als gens *GUSB*, *HPRT1* i *PMCA4*, sent els seus intervals d'expressió de 3-5 cicles superiors als observats per *CFTR* (22,1 - 31,8; 20,3 - 30,1 i 23,1 - 31,1 respectivament). Les diferències s'accentuen quan es compara amb *B2M*, amb un interval d'expressió 10 cicles superior a *CFTR*. Aquest gen ha estat eliminat dels estudis posterior degut a aquestes diferències tan marcades en l'interval d'expressió (Taula 11 i Figura 29).

Taula 11.- Interval i eficiència dels gens de referència

Dades de l'interval d'expressió dels quatre gens de referència estudiats i l'eficiència corresponent a la corba estàndard.

MOSTRA	CFTR	
	INTERVAL	EFICIÈNCIA
HEK293	16,8 - 24,6	1,879
PN	26,4 - 34,5	1,875
EN	28,4 - 36,3	1,883

MOSTRA	GUSB		PMCA4		HPRT1		B2M	
	INTERVAL	EFICIÈNCIA	INTERVAL	EFICIÈNCIA	INTERVAL	EFICIÈNCIA	INTERVAL	EFICIÈNCIA
HEK293	22,2 - 29,6	1,867	25,1 - 32,9	1,853	20,3 - 28,2	1,864	15,2 - 25,1	1,861
PN	22,1 - 31,8	1,901	23,1 - 31,1	1,893	20,3 - 30,1	1,857	16,0 - 26,4	1,859
EN	23,9 - 31,8	1,884	23,5 - 31,2	1,840	25,9 - 33,7	1,864	Eliminat de l'estudi	

En la mostra d'EN els valors obtinguts senyalen petites diferències en els intervals d'expressió de tots els gens respecte a *CFTR*, però es mantenen entre els 3-5 cicles (Figura 29).

Els valors d'eficiència obtinguts per als quatre gens es troben dins de l'interval marcat entre 1,8 i 2 i han estat pràcticament iguals entre ells (Taula 11).

4.1.2 Validació en mostres de pacients i controls

El segon pas en l'avaluació dels gens de referència ha estat comprovar l'estabilitat de *GUSB*, *HPRT1* i *PMCA4* en les condicions experimentals emprades. Aquest estudi s'ha realitzat en dues fases. En primer lloc, s'ha utilitzat un grup de pacients amb genotip c.2657+5G>A/FQ (n=9) i un grup de CTLs negatius (n=7). Posteriorment, s'ha ampliat l'estudi amb un grup de portadors (c.2657+5G>A/wt, n=9) i s'han inclòs catorze nous CTLs negatius. Per a l'anàlisi de les dades d'expressió s'han emprat tres programes informàtics diferents: NormFinder, qBase^{plus} i SPSS.

El programa NormFinder (pàgina 83) ha considerat el gen *HPRT1* com el més estable per a la normalització de dades, amb un valor d'estabilitat de 0,083, i la millor combinació de dos gens correspon a *HPRT1* i *PMCA4*, amb un valor de 0,093. A tall

individual, tant *GUSB*, amb un valor de 0,150, com *PMCA4*, amb un valor de 0,153, compleixen les condicions d'estabilitat. Aquestes dades s'obtenen a partir de la variació intragrup i intergrup que calcula el programa a partir dels Cqs dels tres gens.

El programa qBase^{Plus} (pàgina 83), que s'ha utilitzat per obtenir les dades d'expressió, té una aplicació per a l'avaluació dels gens de referència basada en l'algoritme que usa el geNorm. El geNorm calcula un valor d'estabilitat M i un coeficient de variació (C.V.) per cada un dels gens, basats en les dades crues d'expressió (RQ). El valor M obtingut per a *GUSB* és 0,571, per a *HPRT1* és de 0,787 i per a *PMCA4* és de 0,596 (M<0,500), per tant inestables. El C.V. de *GUSB* ha estat de 0,200, d'*HPRT1* de 0,453 i de *PMCA4* de 0,193, que és l'únic que compleix el criteri d'estabilitat (C.V.<0,200). Aquests resultats canvien si s'elimina el gen *HPRT1* del factor de normalització i tant *PMCA4*, M=0,354 i C.V.=0,119, com *GUSB*, M=0,354 i C.V.=0,128 compleixen els criteris d'estabilitat.

L'última anàlisi ha estat un test de Kruskal-Wallis amb el programa estadístic SPSS. No s'aprecien diferències significatives (p>0,050) entre els grups de pacients i CTLs en cap dels tres gens estudiats. Els valors de p han estat 0,090 per a *GUSB*; 0,203 per a *HPRT1* i 0,832 per a *PMCA4*. Tanmateix, hem calculat el valor de p quan no s'inclou *HPRT1* en el factor de normalització i s'han obtingut els següents resultats: p=0,222 per a *GUSB* i p=0,289 per a *PMCA4* (Figura 30).

Els resultats obtinguts amb els tres programes en l'estudi preliminar han estat contradictoris per al gen *HPRT1*.

	CTLs NEGATIUS (n=7)	PACIENTS (n=9)	VALOR P
<i>HPRT1</i>	1,018 ± 0,132	1,201 ± 0,088	0,203
<i>GUSB</i>	0,960 ± 0,075	0,859 ± 0,065	0,09
<i>PMCA4</i>	0,984 ± 0,082	0,980 ± 0,085	0,832

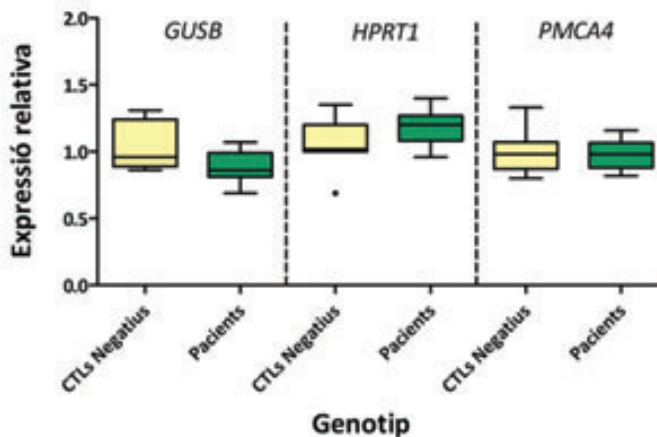


Figura 30.- Estudi preliminar de l'expressió dels gens de referència

Boxplot de l'expressió de cada un del gens en els grups de pacients i CTLs negatius i les corresponents dades de mediana i MAD. En ambdós casos s'ha utilitzat *HPRT1* en el càlcul del factor de normalització.

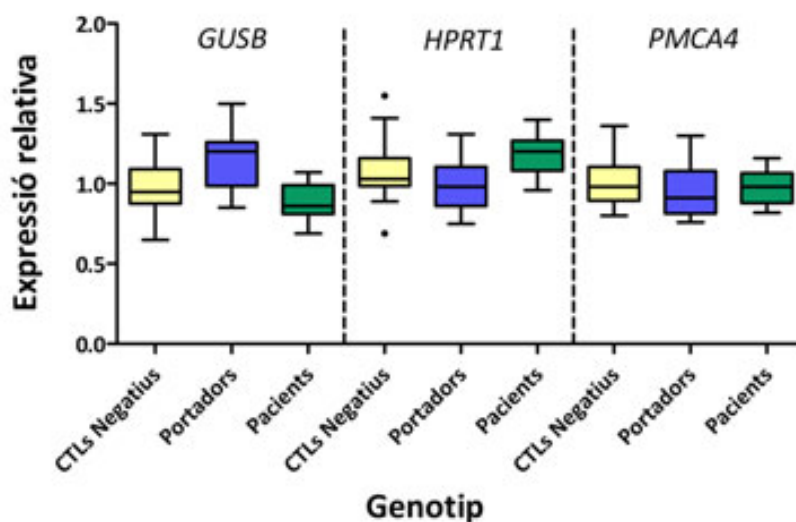
En l'estudi d'ampliació els valors d'estabilitat que s'han obtingut amb el programa NormFinder han estat 0,003 per a *GUSB*; 0,004 per a *PMCA4* i 0,006 per a *HPRT1*. En aquest cas el gen més estable ha estat *GUSB*, amb un valor de 0,003, i la millor combinació de gens ha estat la formada per *GUSB* i *PMCA4*, amb el mateix valor.

En l'anàlisi amb el geNorm, com en l'estudi preliminar, l'eliminació de *HPRT1*, $M=0,689$ i $C.V.=0,376$ millora els paràmetres d'estabilitat dels dos gens restants. *GUSB* ha passat de tenir un valor que no complia els criteris, $M=0,537$ i $C.V.=0,220$, a valors dins els paràmetres establerts, $M=0,363$ i $C.V.=0,127$. En el cas de *PMCA4*, el valor M inicial no compleix els criteris, $M=0,515$ i $C.V.=0,193$, però disminueix amb l'eliminació d'*HPRT1*, $M=0,363$ i $C.V.=0,125$.

Per últim, el test de Kruskal-Wallis ha trobat diferències significatives per a *GUSB* ($p=0,010$) i *HPRT1* ($p=0,047$), però no per a *PMCA4* ($p=0,642$). L'eliminació d'*HPRT1* canvia la significació de *GUSB* ($p=0,276$) i de *PMCA4* ($p=0,140$) (Figura 31 A i B).

A)

	CTLs NEGATIUS (n=21)	PORTADORS (n=9)	PACIENTS (n=9)	VALOR DE P
<i>HPRT1</i>	1,030 ± 0,110	0,975 ± 0,053	1,201 ± 0,088	0,047
<i>GUSB</i>	0,953 ± 0,071	1,198 ± 0,123	0,859 ± 0,065	0,01
<i>PMCA4</i>	0,984 ± 0,073	0,907 ± 0,115	0,980 ± 0,085	0,642



B)

	CTLs NEGATIUS (n=21)	PORTADORS (n=9)	PACIENTS (n=9)	VALOR DE P
<i>GUSB</i>	0,992 ± 0,070	1,046 ± 0,080	0,933 ± 0,058	0,276
<i>PMCA4</i>	1,011 ± 0,061	0,954 ± 0,088	1,070 ± 0,072	0,14

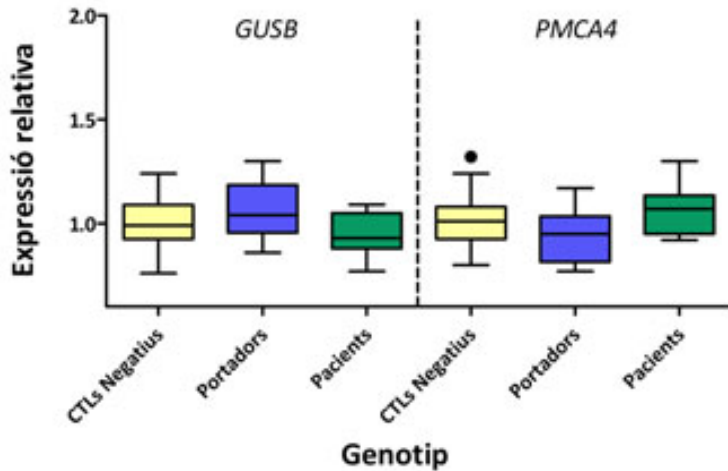


Figura 31.- Ampliació de l'estudi de l'expressió dels gens de referència

Boxplot de l'expressió de cada un dels gens en els grups de CTLs negatius, portadors i pacients i les seves corresponents medianes i MAD, A) emprant *HPRT1* en el factor de normalització i B) una vegada exclòs *HPRT1* del factor de normalització.

A conseqüència dels resultats observats s'ha eliminat *HPRT1* com a gen de referència i s'han utilitzat *GUSB* i *PMCA4*, que han estat estables en ambdós estudis.

4.2 Estudi de l'expressió de *CFTR*

4.2.1 c.580-1G>T

Per a la realització de l'estudi d'expressió s'han analitzat trenta-cinc individus en quatre grups: CTLs negatius (wt/wt, n=21); CTLs positius (p.Phe508del/p.Phe508del, n=7); portadors (c.580-1G>T/wt, n=3) i pacients (c.580-1G>T/p.Phe508del, n=2; c.580-1G>T/p.Ala399Asp, c.580-1G>T/p.Gly542X, n=1). De cada un d'ells s'han realitzat dues reaccions d'RT independents i s'han obtingut els Cqs per triplicat per cada una de les mostres i assaigs (*CFTR* c.580-1G>T, *GUSB* i *PMCA4*). Tots els Cqs obtinguts s'han introduït al programa qBase^{Plus} per a l'obtenció dels valors d'expressió relativa normalitzada per cada una de les RTs realitzades i s'ha obtingut la mitjana dels valors. La mediana i MAD (pàgina 85) de l'expressió de cada un dels grups s'ha determinat i s'ha emprat per a la realització del posterior estudi estadístic.

Abans de començar l'anàlisi de l'expressió s'han avaluat diferents paràmetres. En primer lloc, s'ha calculat el C.V. intraplaca i interplaca de l'estudi. Per a *CFTR* han estat de 0,008 i 0,026, per a *GUSB* han estat de 0,005 i 0,018 i per a *PMCA4* de 0,007 i 0,017, respectivament. En segon lloc, la inclusió d'una corba patró ha permès calcular de l'eficiència de cada un dels assaigs i emprar-la posteriorment en la seqüència de normalització de les dades que utilitza el programa qBase^{Plus} (Figura 16). Els valors obtinguts han estat 1,822 per a c.580-1G>T, 1,888 per a *GUSB* i 1,817 per a *PMCA4*.

Per últim, s'ha avaluat de nou l'estabilitat dels dos gens de referència amb l'aplicació geNorm. Els valors obtinguts han estat $M=0,347$ i $C.V.=0,121$ per a ambdós gens, per tant compleixen els criteris d'estabilitat.

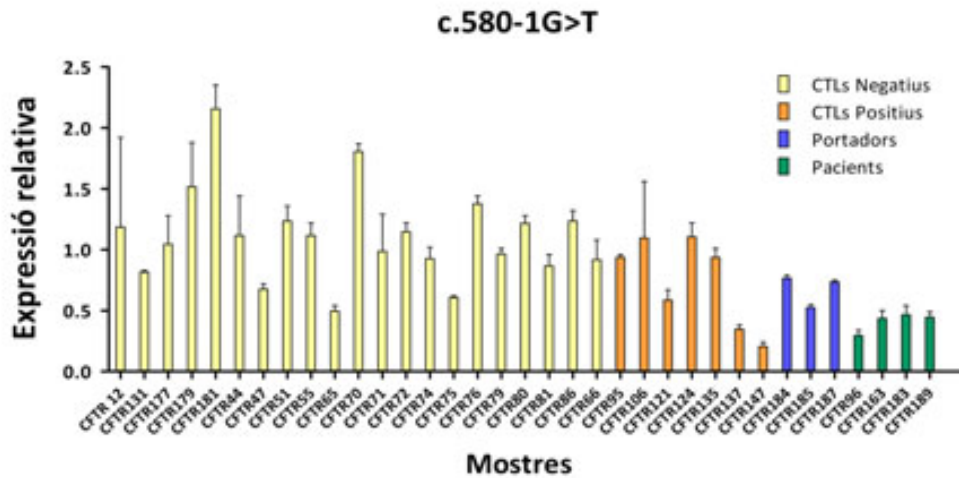


Figura 32.- Expressió relativa de *CFTR* per a la mutació c.580-1G>T
 Representació gràfica de l'expressió i la desviació estàndard de cada una de les mostres analitzades per a l'estudi de la mutació c.580-1G>T.

En la figura 32 es representen els valors d'expressió per cada individu inclòs en l'estudi i la desviació estàndard corresponent. Com s'observa, hi ha una disminució progressiva del número de transcrits depenent de la presència de la mutació. A més, també hi ha una àmplia variabilitat en els diferents grups inherent als propis individus. La mediana i MAD d'expressió obtinguda per als CTLs negatius ha estat de $1,120 \pm 0,187$; per als CTLs positius s'ha obtingut un valor de $0,935 \pm 0,170$. Els dos grups amb la mutació han presentat una mediana de $0,735 \pm 0,030$ en els portadors i $0,445 \pm 0,015$ en els pacients.

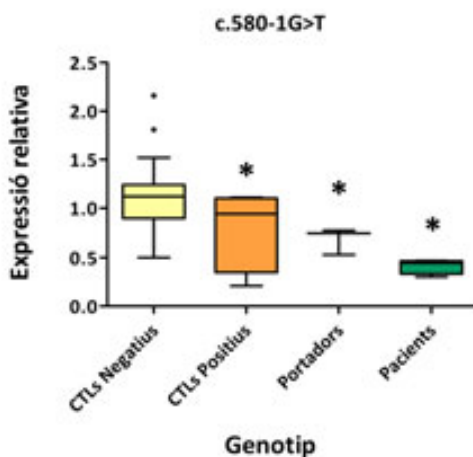


Figura 33.- Anàlisi de l'expressió de *CFTR* per a la mutació c.580-1G>T
 Boxplot de l'expressió relativa de cada un dels grups analitzats. * indica les diferències significatives respecte dels CTLs negatius.

Per a l'anàlisi estadística de les dades s'ha realitzat una comparació de l'expressió de cada un dels grups amb els CTLs negatius mitjançant un test de Kruskal-Wallis. La comparativa amb els CTLs positius ha donat un valor de $p=0,041$; amb els portadors, ha estat de $0,032$ i per últim, amb els pacients, de $0,002$. En tots tres casos, les diferències han estat estadísticament significatives ($p<0,050$) (Figura 33).

4.2.2 c.2657+5G>A

Per a la realització de l'estudi d'expressió d'aquesta mutació s'han analitzat quaranta-sis individus en quatre grups: CTLs negatius (wt/wt, $n=21$), CTLs positius (p.Phe508del/p.Phe508del, $n=7$), portadors (c.2657+5G>A/wt, $n=9$) i pacients (c.2657+5G>A/p.Phe508del, $n=6$; c.2657+5G>A/p.Asn1303Lys, c.2657+5G>A/p.Gly542X i c.2657+5G>A/c.273+1G>A, $n=1$). Tal i com s'ha fet en l'estudi de la mutació c.580-1G>T, s'han avaluat el C.V. intraplaca i interplaca, l'eficiència dels assaigs i l'estabilitat dels gens de referència. El C.V. intraplaca i interplaca per a *CFTR* ha estat de $0,006$ i $0,014$, respectivament; per a *GUSB*, de $0,005$ i $0,017$, i per a *PMCA4*, de $0,006$ i $0,017$. L'eficiència de cada un dels assaigs ha estat $1,822$ per a c.2657+5G>A; $1,888$ per a *GUSB* i a $1,817$ per a *PMCA4*, i s'ha aplicat als càlculs de normalització del programa qBase^{Plus}. Per últim, els valors d'estabilitat han estat $M=0,381$ per a ambdós gens i un C.V. de $0,133$ i $0,132$ per a *GUSB* i *PMCA4*, respectivament, que per tant compleixen els criteris d'estabilitat.

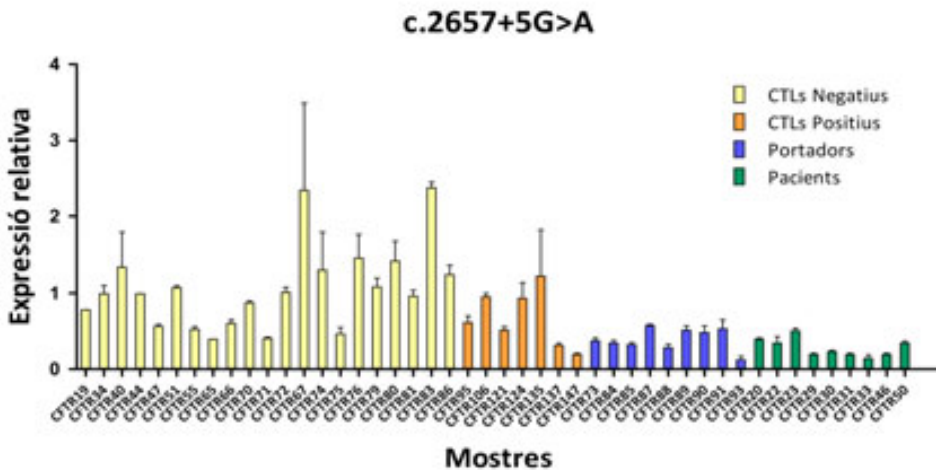


Figura 34.- Expressió relativa de *CFTR* per a la mutació c.2657+5G>A.

Representació gràfica de l'expressió i la desviació estàndard de cada una de les mostres analitzades per a l'estudi de la mutació c.2657+5G>A.

En l'estudi d'expressió s'ha observat, com en el cas anterior, una disminució en el número de transcrits en els diferents grups estudiats depenent de la mutació i una variació inherent als individus dins cada un dels grups (Figura 34). Els CTLs negatius

han presentat una mediana d'expressió i una MAD de $1,000 \pm 0,350$; pels CTLs positius la mediana ha estat de $0,620 \pm 0,320$; pels portadors la mediana ha tingut un valor de $0,380 \pm 0,105$. Per últim, els pacients han presentat una mediana de $0,240 \pm 0,090$.

La comparativa dels CTLs negatius en front els CTLs positius ha donat un valor $p=0,067$ ($p<0,05$), per tant no estadísticament significatiu, mentre que en els dos grups restants, el valor, de $p<0,001$, si que ho ha estat (Figura 35).

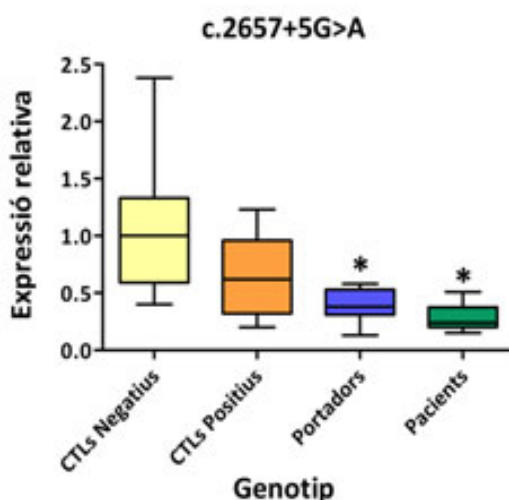


Figura 35.- Anàlisi de l'expressió de *CFTR* per a la mutació c.2657+5G>A

Boxplot de l'expressió de cada un dels grups analitzats. * indica les diferències significatives respecte dels CTLs negatius.

4.2.3 c.3718-1G>A

Per últim, s'ha estudiat l'efecte de la mutació c.3718-1G>A en tres grups: CTLs negatius (n=21), CTLs positius (n=7) i un únic individu portador. Aquesta anàlisi s'ha realitzat conjuntament amb la mutació c.580-1G>T, per tant els valors de C.V., d'eficiència de l'assaig i l'avaluació dels gens de referència han estat els mateixos. Pel que respecta a *CFTR*, els valors de C.V. intraplaca i interplaca han estat 0,009 i 0,058, respectivament i la seva eficiència 1,811.

El valor d'expressió de cada un dels grups avaluats ha estat el següent. Els CTLs negatius han presentat una mediana d'expressió i una MAD de $0,505 \pm 0,075$; per als CTLs positius la mediana ha estat de $0,305 \pm 0,255$. L'únic portador ha presentat un valor d'expressió de 0,268, que s'ha obtingut en fer la mitjana de les rèpliques. La desviació estàndard de les rèpliques ha estat de 0,174. A la figura 36 es pot observar el valor d'expressió i desviació estàndard per cada un dels individus inclosos en l'estudi de la mutació.

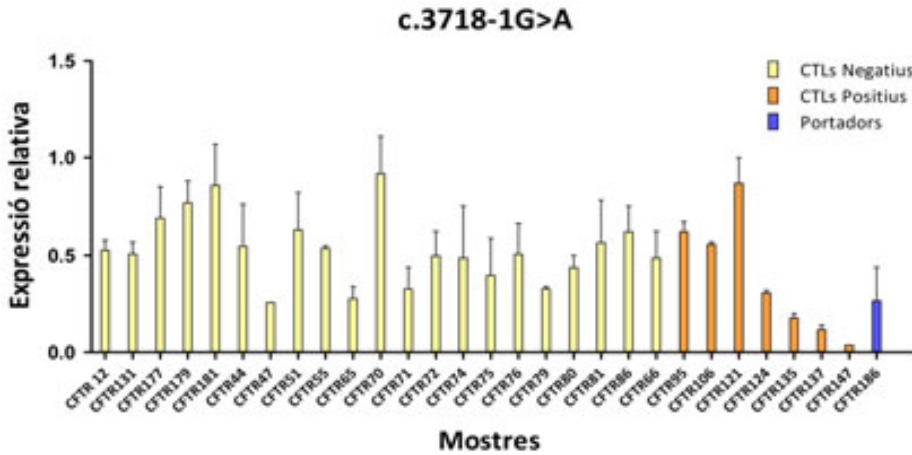


Figura 36.- Expressió relativa de *CFTR* per la mutació c.3718-1G>A

Representació gràfica de l'expressió i la desviació estàndard de cada una de les mostres analitzades per a l'estudi de la mutació c.3718-1G>A.

L'anàlisi estadística s'ha realitzat únicament entre els dos grups CTLs. El valor de significació estadística obtingut de la comparativa ha estat de $p=0,243$, per tant no s'observen diferències significatives (Figura 37).

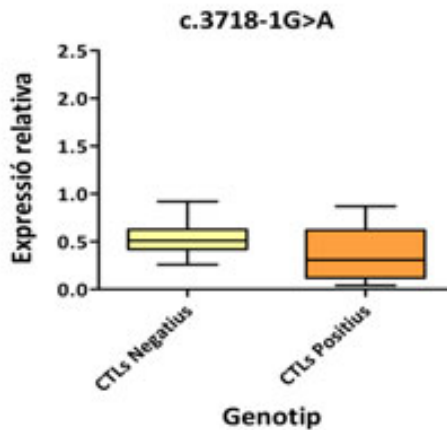


Figura 37.- Anàlisi de l'expressió de *CFTR* per a la mutació c.3718-1G>A

Boxplot de l'expressió de cada un dels grups analitzats. * indica les diferències significatives respecte dels CTLs negatius.

4.3 Estudi comparatiu de l'expressió de *CFTR* a les tres mutacions

Per poder avaluar els resultats obtinguts de les tres mutacions de forma conjunta, el valor de la mediana dels CTLs negatius s'ha pres com a 1 i s'han transformat les dades d'expressió de tots els grups tenint en compte aquest paràmetre. Aquesta normalització permet el càlcul i la comparació de la pèrdua de transcrits produïda per

cada una de les mutacions. En el cas de la mutació c.2657+5G>A, aquesta transformació no ha estat necessària perquè la mediana dels CTLs negatius ja era igual a 1. Per a la mutació c.580-1G>T, els valors obtinguts de la transformació han estat 0,835 per als CTLs positius, 0,656 per als portadors i 0,397 per als pacients. Per la mutació c.3718-1G>A, els CTLs positius han presentat un valor de 0,604 i l'individu portador, de 0,531 després de la transformació.

Aquestes dades han permès observar una disminució de transcrits en els CTLs positius d'entre el 16 i el 39% depenent de l'assaig que s'ha emprat, sent pràcticament igual en les mutacions c.2657+5G>A i c.3718-1G>A, 38 i 40%, respectivament. En els portadors de cada una de les mutacions, s'ha observat que la disminució de transcrits és menor en la mutació c.580-1G>T, un 34%. Els portadors de la mutació c.2657+5G>A han perdut un 62%, que representa aproximadament un 50% de l'expressió dels portadors de la mutació c.580-1G>T. Per últim, el portador de la mutació c.3718-1G>A té una pèrdua intermèdia, un 47% de transcrits. En pacients, s'ha observat la mateixa tendència: els pacients amb la mutació c.580-1G>T han perdut un 60%, mentre que els pacients amb la mutació c.2657+5G>A han perdut un 76%, en aquest cas un 16% més que els anteriors (Figura 38).

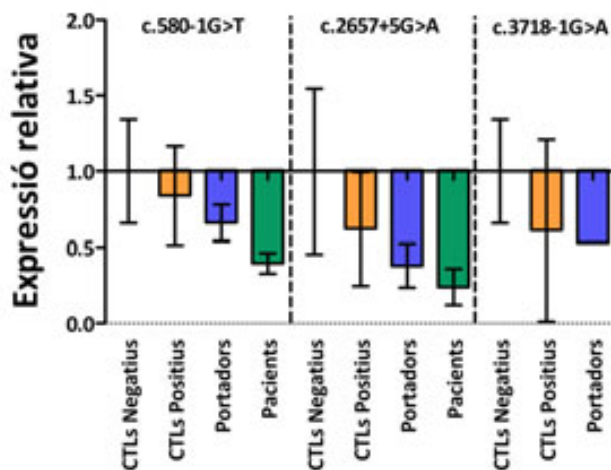


Figura 38.- Estudi comparatiu de l'expressió de *CFTR* en les mutacions c.580-1G>T, c.2657+5G>A i c.3718-1G>A

La normalització de les dades d'expressió per a les tres mutacions ha permès la comparació de l'expressió dels diferents grups en cada una de les mutacions analitzades.

5.- CFTR: IMMUNOLocalITZACIÓ DE LA PROTEÍNA

Estimats els nivells moleculars d'expressió del gen, s'ha procedit a l'estudi de la localització de la proteïna CFTR en cèl·lules d'EN. La distribució de CFTR depèn del seu estat de maduració, sent el seu destí funcional la membrana citoplasmàtica apical.

L'estudi de la distribució subcel·lular de la proteïna CFTR s'ha realitzat amb un assaig d'IF (pàg). En els CTLs negatius, CFTR es localitza majoritàriament a la part apical de la membrana citoplasmàtica. Una petita part s'ha detectat a l'interior cel·lular i es correspon amb la fracció de proteïna que es troba en procés de maduració. El comportament de CFTR en CTLs positius, portadors i pacients de les tres mutacions en estudi ha estat molt similar en cada grup. La proteïna s'ha localitzat majoritàriament en els compartiments intracel·lulars i només una petita part s'ha pogut observar a la membrana citoplasmàtica apical. En les tres mutacions d'*splicing* estudiades, la degradació de transcrits aberrants ha disminuït la proteïna apical. En el cas dels individus portadors, les imatges suggereixen una pèrdua intermèdia. Aquesta distribució proteica s'ha observat fonamentalment en les cèl·lules columnars ciliades, que són les cèl·lules més madures de l'epiteli pseudoestratificat, on l'expressió de CFTR és major (Figura 39).

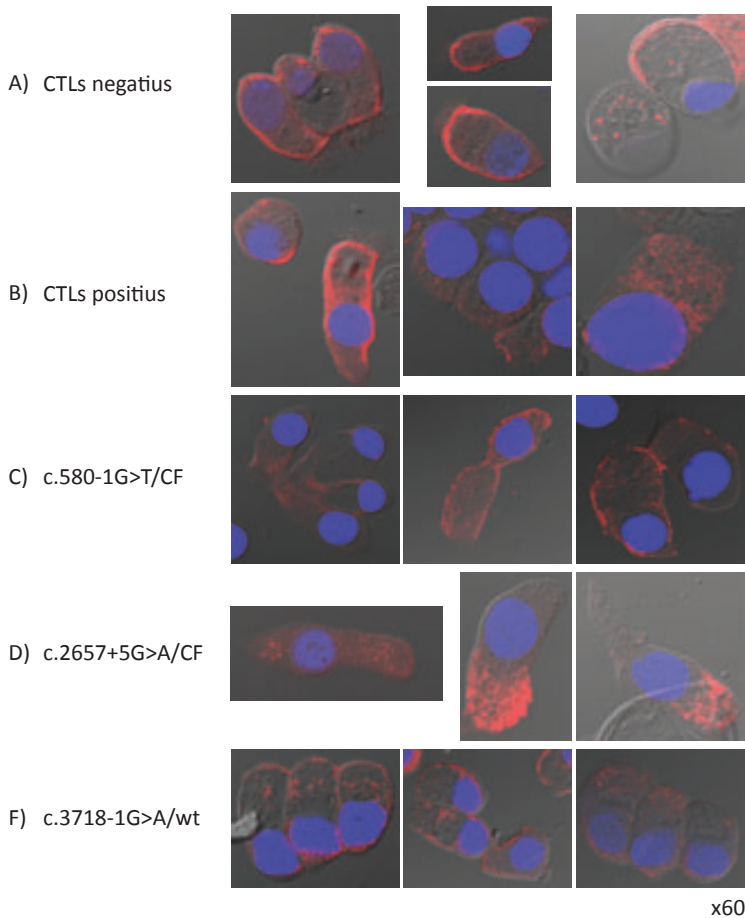


Figura 39.- Immunolocalització de CFTR

Distribució subcel·lular de la proteïna CFTR en cèl·lules epitelials de **A)** CTLs negatius, **B)** CTLs positius, pacients de les mutacions **C)** c.580-1G>T **D)** c.2657+5G>A, i un individu portador de la mutació **E)** c.3718-1G>A. Els marcatges de CFTR s'han realitzat amb l'anticòs primari MAB1660 (vermell) i el nucli s'ha visualitzat amb TO-PRO3 (en blau). Les imatges han estat superposades i adquirides amb llum transmesa i microscòpia confocal (x63).

La manca de proteïna respon als mecanismes de control cel·lular per l'incorrecte plegament de la molècula (p.Phe508del) i la degradació de transcrits aberrants per NMD (c.580-1G>T i c.2657+5G>A). Com ja s'ha esmentat, la mutació c.3718-1G>A determina la pèrdua de l'exó 20 i la seqüència consensus Walker A, el que fa inviable la proteïna.

6.- PARÀMETRES CLÍNICS

Les diferències observades en els pacients c.2657+5G>A marquen un fenotip més lleu, almenys a l'inici de la malaltia. L'edat de diagnòstic és tardana i la funció pulmonar millor. L'edat actual, però, significativament superior en el grup control, denota complicacions que no s'observen en els CTLs positius, per exemple l'hemoptisi, que és present en tots els pacients. La severitat de la malaltia d'un d'aquests pacients fins i tot va dur al trasplantament pulmonar. En canvi, no veiem diferències en els pacients amb la mutació c.580-1G>T quan han estat comparats amb els CTLs positius. Ambdós grups de pacients presenten un fenotip greu de la malaltia.

Les mutacions c.580-1G>A i c.3718-1G>A no han estat avaluades de forma estadística perquè no disposem d'un número suficient de pacients. A la unitat només s'ha caracteritzat un pacient heterozigot compost per la mutació c.3718-1G>A, i va ser èxitus a les 24 h de vida.

Taula 12.- Paràmetres clínics

Dades clíniques	2657+5G>A/CF (n=11)	Valor P	p.Phe508del/p.Phe508del (n=45)	c.580-1G>T/CF (n=3)
Edat de diagnòstic - anys (mitjana ± DE)	21,0 ± 8,1	p<0,001**	3,5 ± 4,5	5,6 ± 1,1
Edat actual - anys (mitjana ± DE)	36,8 ± 7,0	p<0,001**	23,8 ± 5,3	22,6 ± 3,5
Test de la suor - mmol/l (mitjana ± DE)	103,4 ± 23,3	0,260	112,5 ± 20,3	102,3 ± 4,0
FVC - mitjana % predit (mitjana ± DE)	84,2 ± 32,1	0,047*	61,4 ± 23,9	53,2 ± 4,7
FEV1 - mitjana % predit (mitjana ± DE)	82,5 ± 31,4	0,005*	48,1 ± 23,0	32,8 ± 5,2
Alteracions pulmonars (Hemoptisi)	100% (11/11)	0,001**	46,7% (21/45)	-----

° Test de t de student amb dues cues i variàncies diferents. °° Test exacte de Fisher amb dues cues.

* Diferències estadísticament significatives (p<0,050). **FEV1**: volum espirat màxim en el primer segon d'aspiració forçada (% del valor predit); **FVC**: capacitat vital forçada (% del valor predit).

DISCUSSIÓ

La qPCR ha evolucionat de ser una tècnica laboriosa, llarga, qualitativa i *low-throughput* a ser automatitzable, ràpida, quantitativa i *high-throughput*. La seva simplicitat conceptual i tècnica (Higuchi, Dollinger et al. 1992; Higuchi, Fockler et al. 1993; Wittwer, Herrmann et al. 1997), juntament amb la seva rapidesa, sensibilitat i especificitat, l'han convertit en una tècnica essencial per a la detecció i quantificació d'àcids nucleics en una gran varietat de mostres (Bustin 2000). Tanmateix, errors en el disseny i en la metodologia o una anàlisi de dades inapropiada poden produir resultats inconsistents, irrelevants i, fins i tot, falsos (Bustin 2009).

Això no obstant, la seva sensibilitat ha estat una característica clau en l'avaluació de la seva utilitat en la quantificació de transcrits *CFTR*. Un objectiu complex, tenint en compte que l'expressió de *CFTR* és baixa i depenent de teixit (Trezise and Buchwald 1991; Tizzano, Silver et al. 1994) i que la mostra d'epiteli nasal, malgrat accessible, també és limitada.

1.- PARÀMETRES RELLEVANTS EN L'ANÀLISI DE TRANSCRITS

Per obtenir una quantificació el més precisa possible s'han de tenir en compte diferents variables, com són la quantitat de mostra inicial, l'extracció d'RNA, la seva integritat, l'eficiència de la síntesi de cDNA, i comptar amb un o més gens de referència òptims per a la normalització de les dades (Derveaux, Vandesompele et al. 2009).

La degradació de l'RNA és produïda per factors aliens al manipulador i es tradueix en una major variabilitat dels resultats. En conseqüència, és un paràmetre a controlar per tal de minimitzar el seu efecte en la quantificació de l'expressió (Bustin and Nolan 2004). Fleige i Pfaffl (2006) recomanen un RIN > 5 com a mesura de bona qualitat de l'RNA total i un RIN > 8 com a mesura de qualitat excel·lent per a aplicacions *downstream* (Fleige and Pfaffl 2006). Per la dificultat d'aconseguir un número gran de mostres i la degradació inherent a l'obtenció de mostres humanes, s'han inclòs en l'estudi d'expressió les mostres amb un RIN ≥ 5 , en concordança amb Fleige i Pfaffl (2006). A més, l'obtenció d'aquest valor permetrà la comparació de mostres i avaluar la repetitivitat dels experiments per poder comparar-los entre si i classificar la significació dels resultats (Muller, Hordt et al. 2004; Imbeaud, Graudens et al. 2005). Cal destacar que l'interval de RIN en cada un dels grups emprats en l'estudi és molt similar. Recentment, s'han presentat dos algorismes per a la correcció de l'expressió en mostres d'RNA degradades (Port, Schmelz et al. 2007; Ho-Pun-Cheung, Bascoul-Mollevi et al. 2009), que permetrien un interval més ampli i, per tant, l'ús d'un major número de mostres.

D'altra banda, l'estratègia de normalització permetrà reduir parcialment la influència negativa de la qualitat de l'RNA (Vandesompele, De Preter et al. 2002),

perquè la integritat d'aquest queda reflectida principalment als Cqs (Fleige and Pfaffl 2006).

La transcripció inversa (RT) és la reacció duta a terme per a l'obtenció de la còpia de DNA complementari de l'mRNA (cDNA) i ha de ser un reflex fidel de la quantitat inicial emprada, esdevenint un punt crític per a una quantificació acurada i sensible (Stahlberg, Hakansson et al. 2004; Stahlberg, Kubista et al. 2004). Malgrat ha estat demostrat que l'RT és el pas que introdueix una major variabilitat en la determinació de l'expressió gènica, és altament reproduïble quan s'empra el mateix protocol experimental. Per tal d'obtenir una quantificació precisa s'ha dut a terme un procés d'optimització de diferents kits en el que s'han descartat aquells dels quals la reacció era incompleta (pàgina 112). L'elecció d'un kit per a l'obtenció del major rendiment en les mostres emprades en aquest treball no implica que els kits descartats no siguin adients en altres contextos.

La repetitivitat de la tècnica, és a dir, l'anàlisi de les rèpliques d'una mostra en les mateixes condicions experimentals, és la mesura de la precisió i robustesa d'un assaig. Els triplicats usats en aquest treball han permès el càlcul del coeficient de variació (C.V.) intraplaca per avaluar aquest paràmetre. En cap cas els valors obtinguts (4,7-8,5%) han estat fora l'interval establert per altres autors (10-20%) (Pfaffl 2001). D'altra banda, la reproductibilitat implica l'estudi de la precisió analítica de l'RT-qPCR a llarg termini, és a dir, la variació dels resultats d'una mateixa mostra en diferents experiments o laboratoris. En aquest cas, l'anàlisi d'una mateixa mostra (calibradora) en tots els experiments s'ha utilitzat per al càlcul del C.V. (14-26%), que ha estat en l'interval establert per Pfaffl i col·l. (15-30%) per a tots els assaig emprats, amb l'excepció de l'assaig per a la mutació c.3718-1G>A (58%). El càlcul d'aquests valors ha estat realitzat amb els Cqs, però recentment s'ha establert que estan sotmesos a variabilitat entre experiments i seria més adient l'obtenció dels C.V. dels valors una vegada normalitzats. En tot cas, únicament un assaig ha quedat fora l'interval, i la variabilitat entre experiments ha estat posteriorment eliminada en el procés de normalització emprat pel programa qBase^{Plus}, que usa la mostra calibradora per establir un factor de correcció.

L'ús de l'algoritme matemàtic $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak and Schmittgen 2001) per a la normalització de dades assumeix eficiències òptimes i equivalents per a tots els assaigs utilitzats en els experiments d'RT-qPCR, però petites diferències poden esbiaixar els resultats. Aquest problema pot ser solventat amb la correcció de les dades per a l'eficiència de l'assaig emprat. L'estudi de l'eficiència de la reacció dóna una indicació ràpida, senzilla i reproduïble de la sensibilitat dels assaigs usats i de la seva consistència.

L'eficiència és específica de cada assaig i pot variar de mostra a mostra per influència d'inhibidors de les reaccions d'RT i PCR i per les pròpies variacions en l'RNA. Per tal d'evitar els factors de variabilitat inherents a l'RT, es va retrotranscriure un *pool* de tots els CTLs negatius, en lloc de realitzar l'RT de cada mostra per separat.

Les corbes estàndard són el mètode més senzill, transparent i informatiu per determinar les eficiències d'amplificació dels gens. En general, es recomana fer una corba de sis punts i una dilució 1:10 per incloure el màxim nombre de logaritmes possible. Una dilució 1:10 implica 3,32 cicles de distància entre un punt i el següent en una corba on l'eficiència és 2. Quan l'eficiència no és 2, la diferència entre dos punts correlatius correspon a la pendent observada. Atès el baix nivell d'expressió de *CFTR*, l'ús d'una dilució 1:10 implica que el tercer punt de la corba és fora de l'interval de quantificació de la tècnica i per tant l'estimació de l'eficiència no serà acurada. Les corbes estàndard emprades en aquest treball han estat dilucions seriades (1:5) en quatre punts que inclouen l'interval complet de l'expressió de *CFTR* en un grup de CTLs negatius. En altres tipus d'estudis, com la determinació de dosi gènica, una dilució 1:2 és suficient per a la realització de les corbes estàndard. Un cicle és el que diferencia una dosi gènica $2n$ (normal) d'una dosi gènica n (deleció) ó $3n$ (duplicació) i és el que s'obté entre els punts d'aquestes corbes .

La normalització és el procés que controla les variacions tècniques de l'RT-qPCR (qualitat i quantitat d'mRNA i cDNA) i permet la comparació dels nivells d'expressió en les diferents mostres. L'ús dels gens de referència és el mètode més comú i l'estratègia més adient (Huggett, Dheda et al. 2005). Les característiques que defineixen els gens de referència són una expressió estable, que no siguin regulats i que no estiguin influenciats per les condicions biològiques i experimentals. Tanmateix, hi ha evidències que tots els gens estan, en certa mesura, regulats, reforçant la idea que no existeix cap gen de referència universal amb expressió constant en qualsevol situació biològica i/o experimental. Per tant, cada un d'ells ha de ser experimentalment validat pels teixits, tipus cel·lulars i dissenys experimentals emprats (Gutierrez, Mauriat et al. 2008). El nombre de gens de referència òptim també haurà de ser determinat experimentalment. Treballs previs aconsellen realitzar un estudi inicial amb deu gens de diferents vies i nivells d'expressió en deu mostres representatives de cada teixit o grup en estudi, i tres gens o més es considera l'adient per a la normalització (Vandesompele, De Preter et al. 2002; Andersen, Jensen et al. 2004; Willems, Mateizel et al. 2006; Bustin, Benes et al. 2009). En la pràctica, però, s'ha de trobar un compromís entre els gens de referència a utilitzar i les mostres de les que es disposa. Diferents *softwares* han estat desenvolupats per a l'anàlisi de l'estabilitat dels gens de referència: geNorm (Vandesompele, De Preter et al. 2002), Normfinder (Andersen, Jensen et al. 2004) o Bestkeeper (Pfaffl, Tichopad et al. 2004). Aquest programes permeten l'avaluació de

l'estabilitat d'un gen sense tenir cap referència.

La seqüència que s'ha seguit en aquest treball ha estat, en primer lloc, una avaluació teòrica dels nivells d'expressió de diferents gens per minimitzar les diferències amb el gen diana i posteriorment una validació experimental. La diferència de diversos ordres de magnitud dels Cqs respecte a *CFTR* i als altres tres gens de referència avaluats ha estat la causa per la qual s'ha descartat *B2M* com a gen de referència en aquest estudi. Dels tres gens restants (*GUSB*, *HPRT1* i *PMCA4*), les tres aproximacions emprades (Normfinder, geNorm i test de Kruskal-Wallis) confirmen que els gens *GUSB* i *PMCA4* tenen una expressió estable en els grups analitzats i les condicions experimentals emprades. Malgrat no poder calcular un factor de normalització (NF) amb tres o més gens (Vandesompele, De Preter et al. 2002; Andersen, Jensen et al. 2004; Willems, Mateizel et al. 2006; Bustin, Benes et al. 2009), creiem que l'ús d'aquests dos gens ha donat lloc a un NF robust per a la normalització acurada de les dades. En el cas d'*HPRT1*, l'avaluació ha mostrat resultats contradictoris, per tant s'ha decidit prescindir-ne. Ambdós fets demostren la idoneïtat de l'aproximació emprada en aquest treball.

Totes les consideracions i criteris esmentats han suposat un gran esforç inicial en aquest treball. Tanmateix, valorem aquesta optimització de l'RT-qPCR com absolutament necessària per a la validació i interpretació de les dades. Actualment, no existeix un consens per a la realització i interpretació de la qPCR, però les guies MIQE publicades l'any 2009 suggereixen quina hauria de ser la informació mínima amb la qual caldria acompanyar les dades obtingudes per qPCR. Tot i la limitació que suposa el tipus de mostra i la baixa expressió de *CFTR*, els experiments de RT-qPCR s'han desenvolupat seguint aquestes recomanacions. En aquest treball s'aporten el 80% de les dades essencials proposades per aquestes guies i el 60% de les dades assenyalades com recomanables (Annex 2), havent començat la posada a punt de la tècnica l'any 2006.

2.- ESTUDI D'EXPRESSIÓ DE *CFTR*

El desenvolupament de tècniques de reseqüenciació i genotipació *high-throughput* representa una oportunitat sense precedents per identificar variants associades a malalties comuns i rares. L'ús d'aproximacions computacionals permet la prioritització en l'estudi d'aquestes per la dificultat que suposa la seva caracterització funcional. El principal problema dels estudis desenvolupats *in silico* és el grau d'incertesa en la predicció de les alteracions de l'*splicing*. Malgrat aquest fet, una combinació d'algoritmes com la que aplica l'Alamut™ és l'alternativa adient per identificar mutacions amb un potencial efecte sobre l'*splicing* (Houdayer, Dehainault et

al. 2008). Considerant les mostres disponibles, s'han avaluat de forma teòrica diferents mutacions (vint-i-quatre mutacions *missense*, tres *nonsense* i vuit d'*splicing*).

Les mutacions *missense* i *nonsense*, que aglutinen més del 50% de mutacions *CFTR*, han estat majoritàriament associades a alteracions estructurals o relacionades amb l'activitat reguladora de la proteïna, anul·lant o reduint la seva activitat. Tot i això, com s'ha esmentat prèviament, hi ha moltes mutacions sense un efecte clar sobre la proteïna que donen lloc a alteracions en el procés d'*splicing* per modificacions als SRE (Cartegni, Chew et al. 2002), per la creació de llocs consens d'*splicing* a l'interior de l'exó (Li, Park et al. 1995; Richard and Beckmann 1995) o per canvis en l'últim nucleòtid de l'exó. Aquests mecanismes que afecten l'*splicing* són comuns a *CFTR*, atès que aproximadament un quart de canvis sinònims a l'exó 9 i 12 donen lloc a defectes en aquest procés (Pagani, Stuani et al. 2003; Pagani, Raponi et al. 2005). L'estudi de l'mRNA dels pacients constitueix una bona eina per a la identificació i definició del paper biològic d'aquest tipus de mutacions i pot ajudar a entendre l'associació entre el genotip i el fenotip. Diverses mutacions *missense* i *nonsense* estudiades presenten alteracions als SRE (Taula 7), però la valoració *in silico* no ha estat conclouent, perquè no tots els algorismes han estat capaços de detectar-ne l'efecte. L'avaluació a nivell d'mRNA de les mutacions estudiades no ha detectat cap transcrit alternatiu, per tant no han pogut ser avaluades a nivell quantitatiu en aquest treball.

L'efecte més destacable s'ha observat en tres mutacions d'*splicing* (c.580-1G>T, c.2657+5G>A i c.3718-1G>A) que afecten de forma directa els elements consens (5'ss i 3'ss) (Figura 18 i Taula 7). Tots els algorismes han estat capaços de detectar-ne l'efecte, perquè els llocs conservats són predits de forma més acurada que els elements SRE. L'anàlisi qualitativa de l'mRNA de les tres mutacions d'*splicing* revela la presència de transcrits alternatius en pacients però no en individus control. Tal i com ha estat predit pels programes *in silico*, es produeix la pèrdua d'un exó per l'abolició d'un lloc consens d'*splicing*. En les tres mutacions s'ha observat únicament un transcrit alternatiu, però altres autors han descrit mutacions d'*splicing* en les que s'han detectat fins a cinc transcrits alternatius. Aquest és el cas de la mutació c.1392-1G>A (Ramalho, Beck et al. 2003), que emprava múltiples llocs d'*splicing* alternatiu per donar lloc a diferents transcrits. En aquest treball, però, s'ha assumit que l'efecte es produïa a l'exó en el que es troba la mutació, per tant l'anàlisi s'ha centrat en aquesta regió. L'estudi de fragments més amplis permetria sobrepassar aquesta limitació i alhora comprovar si intervenen altres factors en la determinació dels diferents *splicings* alternatius.

Les dades d'expressió i funció de *CFTR* han estat, majoritàriament, generades en sistemes d'expressió heteròloga (minigens híbrids) o línies cel·lulars, per la limitació del número de mutacions que poden ser estudiades *ex vivo* donada la manca de pacients. Sens dubte, és un bon ajut per tal de donar solidesa a les conclusions comptar

amb individus homozigots per les mutacions en estudi. Malauradament, la gran heterogeneïtat molecular fa que aquests pacients siguin molt escassos, amb l'excepció de la mutació p.Phe508del i alguna altra especialment freqüent, com p.Trp1282X a la població jueva Ashkenazi (Shoshani, Augarten et al. 1992). A falta de pacients homozigots per les mutacions en estudi i com a alternativa a l'ús de minigens híbrids, la quantificació dels transcrits de *CFTR* s'ha realitzat en quatre grups de mostres que poden ser comparades dos a dos. Els grups CTLs negatius (wt/wt) i portadors (CF/wt) difereixen únicament en l'al·lel mutat, per tant les diferències observades entre ambdós podrien ser atribuïdes a la mutació en estudi. Amb l'objectiu de tenir més referències, s'ha inclòs un grup de CTLs positius homozigots per la mutació p.Phe508del, que si bé no és la segona mutació en tots els pacients estudiats, sí que està present en la majoria d'ells. La comparació de cada grup de pacients amb el grup de CTLs positius permet correlacionar les diferències observades amb l'al·lel de la mutació en estudi. Cal destacar que el número d'individus estudiats en cada un dels grups i mutacions, malgrat no ser molt alt, és superior al de molts altres estudis. En la majoria d'aquests es parteix d'un únic cas índex i es desenvolupa l'estudi en minigens (Aznarez, Zielenski et al. 2007; Ramalho, Lewandowska et al. 2009; Costantino, Claut et al. 2010; Faa, Coiana et al. 2010). Aquest ha estat el cas de la mutació c.3718-1G>A, per a la qual només disposem d'un individu portador. Però s'ha procedit a l'anàlisi quantitativa per així abastar l'extrem 5' (c.580-1G>T), l'extrem 3' (c.3718-1G>A) i la regió central del gen (c.2657+5G>A).

Les dades d'expressió en els dos grups de CTLs no han mostrat diferències significatives quan han estat avaluades amb els assaigs per a les mutacions c.2657+5G>A i c.3718-1G>A, però sí per a la mutació c.580-1G>T ($p=0,041$). Aquesta petita significació estadística, però, és probablement deguda a la dispersió de les dades (Figura 33) i no a la mediana d'expressió. Cal destacar que en ambdós grups CTLs s'observa una gran variabilitat inherent als propis individus, que es correlacionaria amb les observacions de Willems i col·l. (2008), que evidencien que la variabilitat biològica pot ser major que la variabilitat experimental (Willems, Leyns et al. 2008). Ha estat demostrat que la variació dels patrons d'expressió cèl·lula a cèl·lula és gran, fins i tot en cultius homogenis (Maheshri and O'Shea 2007), per tant la variació entre individus és esperable. L'anàlisi d'aquests patrons d'expressió en cèl·lules individuals denota que la complexitat biològica és un reflex tant de la variabilitat genètica com de factors estocàstics de les reaccions bioquímiques (Raser and O'Shea 2005).

Conscients d'aquesta dada i per tal de reduir al mínim possible l'efecte de qualsevol variant, s'ha establert un grup de CTLs negatius homogeni. La caracterització molecular n'ha estat essencial. L'estudi de *CFTR* a la població general ha evidenciat que determinats canvis d'aminoàcids són relativament freqüents. De fet, algunes mutacions *missense* han estat descrites en població general (Bombieri, Giorgi et al. 2000).

S'han descartat tots aquells individus que presentaven variacions de seqüència que modifiquen l'*splicing*, produeixen un canvi d'aminoàcid o tenen un efecte desconegut. Per exemple, han estat descartats els individus amb mutacions d'efecte conegut com p.Gly576Ala aïllada o en *cis* amb p.Arg668Cys. Pagani i col·l. van descriure la pèrdua de l'exó 12 en aproximadament un 12% de transcrits quan la mutació es troba aïllada, que s'accentua amb p.Arg668Cys (80%) (Pagani, Stuani et al. 2003). Així mateix, s'han exclòs dues mutacions que no havien estat descrites abans, de les que es desconeix la seva expressió fenotípica (p.Ser50Cys i c.490-15C>T).

D'altra banda, s'han descrit cSNPs sinònims i no-sinònims del gen *CFTR* presents en pacients i controls amb freqüències similars, per tant no s'ha plantejat la seva exclusió (Cuppens, Teng et al. 1994). No obstant, els resultats de l'RT-qPCR a la regió de l'exó 14b (c.2657+5G>A) ens van portar a reconsiderar el cSNP c.2562T>G (p.=) pel seu potencial efecte i per la possible interferència en el disseny del nostre experiment. La seva rellevància es discutirà més endavant.

Els al·lels p.Phe508del produeixen transcrits que donen lloc a proteïna no funcional. Tot i que les diferències no han estat significatives, en la nostra aproximació s'observa una disminució de transcrits en CTLs positius. La pèrdua pot ser atribuïda a la sensibilitat de la tècnica en concordança amb l'esmentat per Ramalho i col·l. (2002), que estimen que els portadors de la mutació tenen un 87% de transcrits (n=30). En aquest mateix article, s'observa una pèrdua de l'exó 9 en transcrits p.Phe508del, la degradació dels quals pot influir en la quantificació. La pèrdua de l'exó 9 és inversament proporcional a la longitud de polipirimidines en l'intró 8 [c.1210-12T(5-9)] i directament proporcional al número de repeticions TG [c.1210-12(TG)_n] en la mateixa regió. En l'estudi que es presenta, la pèrdua de l'exó 9 podria afectar la quantificació dels transcrits normals de *CFTR* emprant els assaigs per a les mutacions c.2657+5G>A i c.3718-1G>A (0,60% i 0,62%), perquè es troben a 3' de l'exó 9, però no en l'assaig per a la mutació 580-1G>T (0,84%), a la regió 5', i podria contribuir a les diferències observades en l'expressió (Ramalho, Beck et al. 2002). La pèrdua d'aquest exó no és l'única que podria repercutir en aquestes diferències. El gen *CFTR* comprèn 27 exons constitutius, però una porció (3, 4, 9, 12, 14a, 16, 17b i 22) presenta *splicings* aberrants (Bienvenu, Adjiman et al. 1997), a més de nombrosos SNPs de rellevància funcional desconeguda que no poden ser descartats.

Contràriament al que es podria esperar per la seva posició intrònica (+5), l'anàlisi comparativa dels nivells d'expressió a les diferents mutacions (Figura 38) evidencia un menor número de transcrits normals tant en els pacients com en els portadors de la mutació c.2657+5G>A. Per tal de trobar una explicació, s'han avaluat diferents factors clínics i moleculars. Des del punt de vista molecular, postulem que pot ser rellevant el

cSNP c.2562T>G (p.=). D'altra banda, a la taula de correlació genotip-fenotip (Taula 12) les dades clíniques suggereixen un fenotip de la malaltia més lleu, on destaca l'edat de diagnòstic i actual dels pacients, però també la presència de complicacions pulmonars com l'hemoptisi, que denota un empitjorament al llarg del temps.

La mutació c.2657+5G>A va ser reportada per primera vegada l'any 1990 per Highsmith i col.l. (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/) i posteriorment analitzada en dos pacients consanguinis que eren homozigots per la mutació (Highsmith, Burch et al. 1997). En aquest mateix estudi es va determinar, per tècniques semiquantitatives, que la mutació produïa un 4% de transcrits normals (2% cada al·lel). Les tècniques semiquantitatives, però, es caracteritzen per una alta variabilitat intra i inter-assaig. Per tal de reduir l'impacte d'ambdós paràmetres i obtenir una mesura més acurada de l'expressió, en aquest treball s'ha emprat l'RT-qPCR, una tècnica quantitativa (Kubista, Andrade et al. 2006).

El cSNP c.2562T>G (p.=) produeix l'alteració de diferents elements ESE i com a conseqüència la pèrdua de l'exó 14a sense alterar la pauta de lectura (Steiner, Truninger et al. 2004). Postulem que la manca de l'exó 14a influeix en dues vessants diferents la quantificació dels transcrits de la mutació c.2657+5G>A al nostre experiment. En primer lloc, interfereix amb l'assaig dissenyat per a la quantificació (Figura 15), perquè l'encebador directe és complementari en aquesta zona. Aquesta interferència no tindria major transcendència si no fos perquè, d'altra banda, les dades de freqüència del cSNP en els grups CTLs (26% i 14%, respectivament) i de pacients (50%) i portadors (60%) han estat estadísticament significatives ($p=0,012$), per tant la seva localització en *cis* podria produir un efecte sinèrgic, tal i com succeeix amb les mutacions *missense* p.Gly576Ala i p.Arg668Cys (Pagani, Stuani et al. 2003). Anteriorment, Steiner i col.l. (2004) van implicar aquest mateix cSNP en la pèrdua de l'exó 9 tant en individus sans com en pacients i van observar que la freqüència en aquests dos grups també era estadísticament significativa. Considerant l'efecte del cSNP i la seva freqüència en pacients i portadors, postulem que la reducció de transcrits normals al nostre experiment seria deguda a un efecte sinèrgic per la presència en *cis* del cSNP c.2562T>G (p.=). En qualsevol cas, el disseny del nostre experiment permet quantificar els transcrits *wt* que en definitiva seran els funcionals. L'elecció dels transcrits normals a l'hora de quantificar no s'ha fonamentat únicament en la capacitat d'aquests de produir proteïna funcional, sinó també en el fet que dues de les tres mutacions estudiades (c.580-1G>T i c.2657+5G>A) produeixen PTCs que determinen la ràpida degradació dels transcrits aberrants pel mecanisme de NMD. Per tant, la quantificació d'aquests seria esbiaixada.

Al llarg del temps, han estat diferents les estratègies emprades per l'estudi de *CFTR*. Tal i com s'ha mencionat prèviament, l'estudi de l'expressió en sistemes heteròlegs (minigens híbrids) està al capdevant (Nissim-Rafinia, Chiba-Falek et al. 2000; Aznarez,

Chan et al. 2003; Pagani, Stuani et al. 2003; Dujardin, Commandeur et al. 2011). Aquest sistema permet l'estudi dels efectes que tenen mutacions en zones determinades del gen i mimetitzar-los *in vitro* (Baralle and Baralle 2005). L'ús d'aquest sistema permetria l'estudi d'ambdós canvis de seqüència (c.2657+5G>A i c.2562T>G) per si mateixos o en conjunt, tal i com van realitzar Pagani i col·l. (2003) amb les mutacions *missense* prèviament esmentades, perquè és possible l'anàlisi de regions exòniques i intròniques complexes. A destacar que l'ús d'aquesta aproximació ha permès determinar l'efecte de canvis sinònims en l'*splicing* tant a *CFTR* (Faa, Coiana et al. 2010) com a altres gens (Boulling, Le Gac et al. 2010) i l'estudi de mutacions d'efecte desconegut identificades en un únic individu (Ramalho, Lewandowska et al. 2009). Tanmateix, altres estratègies *ex vivo*, com les emprades per Sanz i col·l. (2009) i Ramalho i col·l. (2002), també han determinat el número de transcrits produïts per una mutació en heterozigosi amb p.Phe580del, discriminant el transcrit *CFTR*-p.Phe508 per la pèrdua dels tres parells de bases. La quantificació d'aquesta segona mutació ha de ser del 50% (Ramalho, Beck et al. 2002; Sanz, von Kanel et al. 2010). Totes dues metodologies, però, assumeixen que ambdós al·lels es transcriuen de manera equitativa (50%). Nissim-Rafinia i col·l. van quantificar únicament els transcrits aberrants precisament perquè la contribució relativa de cada un dels al·lels és desconeguda (Nissim-Rafinia, Aviram et al. 2004). En el cas de l'estratègia plantejada per Ramalho i col·l. (2002) es considera la pèrdua de l'exó 9, com s'ha esmentat prèviament .

Són d'especial rellevància pel seu potencial en l'estudi de les mutacions *CFTR* els avenços en els cultius d'interfase aire-líquid (ALI), que permeten el cultiu primari de cèl·lules d'EN i d'epiteli pulmonar de pacients en forma d'epiteli pseudoestratificat, mimetitzant les condicions fisiològiques d'aquests (Gruenert, Willems et al. 2004; Fulcher, Gabriel et al. 2005). En el context clínic, la disponibilitat d'aquests cultius permetria la correlació de les dades de quantificació de transcrits amb la quantitat mínima de proteïna necessària per prevenir la simptomatologia FQ o reduir-ne els efectes. Diversos han estat els articles que han intentat establir aquesta quantitat mínima de *CFTR*, però els resultats encara no han estat conclouents. S'han estimat nivells de transcrits i proteïnes que varien entre el 5% i el 25% (Ramalho, Beck et al. 2002; Amaral 2005; Zhang, Button et al. 2009).

Diferents molècules, com el vanadat de sodi, l'àcid valproic o el butirat de sodi, han estat capaces d'incrementar els nivells de transcrits normals i de proteïnes en gens com *CFTR* i *SMN2*, emfatitzant la necessitat de desenvolupar aproximacions terapèutiques per a la correcció dels processos d'*splicing* aberrants (Andreassi, Jarecki et al. 2001; Nissim-Rafinia, Aviram et al. 2004). Els resultats presentats per Nissim-Rafinia i col·l. evidencien de forma directa que l'augment de transcrits normals pot restituir la funció proteica. Considerant ambdós fets i la disponibilitat de cultius ALI, l'aproximació emprada en aquest treball seria adient per a l'avaluació de noves

estratègies terapèutiques, ja que permetria la quantificació de transcrits pre i post tractament, així com l'estudi de les dosis necessàries per a la correcció de l'*splicing*.

Cap dels mètodes esmentats és capaç d'oferir una informació completa i acurada del procés d'*splicing* i els diferents elements que hi intervenen, però sí que ofereixen dades complementàries per poder arribar a entendre de la manera més precisa possible el que passa en condicions fisiològiques.

El present treball ha estat el primer a descriure l'efecte a nivell qualitatiu i quantitatiu de les mutacions c.580-1G>T i c.3718-1G>A, per tant no ha estat possible comparar les dades amb les d'altres estudis. Tot i que la disponibilitat de mostres ha estat baixa, els resultats obtinguts indiquen una disminució significativa de transcrits normals en pacients i portadors en concordança amb la gravetat del seu fenotip. Cal esmentar que en la nostra casuística únicament s'ha identificat un pacient heterozigot compost c.3718-1G>A / N1303K, èxitus a les 24 h de vida, i que en la literatura hi ha descrits només tres individus portadors (Audrezet, Mercier et al. 1993).

La correlació entre la severitat de la malaltia i els nivells de transcrits normals és indirectament proporcional. La mutació c.2657+5G>A està generalment associada a un fenotip FQ lleu caracteritzat per suficiència pancreàtica, una edat tardana de diagnòstic i una millor funció pulmonar que es deteriora de manera progressiva (Dugueperoux and De Braekeleer 2005; Salvatore, Buzzetti et al. 2011). Aquest fenotip està en concordança amb els pacients del nostre estudi (Taula 12). Entre les dades clíniques recollides, presenten diferències significatives amb el grup de CTLs positius l'edat actual dels pacients ($p < 0,001$) i les complicacions pulmonars, en particular l'hemoptisi ($p = 0,001$). L'hemoptisi està associada a un deteriorament de la funció pulmonar (Flume, Yankaskas et al. 2005), el que indicaria un agreujament de la malaltia al llarg del temps que es reflectiria en un nivell menor de transcrits observats, tal i com indiquen les dades presentades, i es correlacionaria amb els treballs de Chiba-Falek i col·l. (1998 a i b). Els autors citats van estudiar una cohort de deu pacients FQ heterozigots compostos per la mutació d'*splicing* c.3717+10kbC>T, caracteritzada per un fenotip lleu (Dugueperoux and De Braekeleer 2005), i malgrat no veure diferències significatives en els transcrits depenent de l'edat van observar una disminució en el número de transcrits al llarg del temps que correlacionava amb canvis en la funció pulmonar.

D'altra banda, cal assenyalar que l'edat dels pacients portadors de la mutació c.2657+5G>A és deu anys superior al grup de CTLs positius, dada que també ha estat estadísticament significativa. McKone i col·l. (2006) van estimar que els pacients amb mutacions de classe I-III (CTLs positius) tenen un risc relatiu de mortalitat de 2,25 a una edat mitjana de 24,2 anys, mentre que l'edat mitjana dels pacients portadors

de mutacions de classe IV-V (c.2657+5G>A) és de 37,6 anys. Aquest fet limitaria la possibilitat d'estudi dels pacients amb mutacions de classe I-III a edats més avançades i establir la mateixa tendència que s'ha observat en aquest i altres estudis (Chiba-Falek, Kerem et al. 1998). Com a alternativa, Duguepereoux i De Braekeleer (2005) van estudiar una cohort de pacients amb mitjanes d'edat iguals per tal d'establir una correlació genotip-fenotip acurada. En aquest cas, el fenotip dels pacients portadors de la mutació c.2657+5G>A és moderadament més lleu que els homozigots per la mutació p.Phe508del. L'ús d'aquesta aproximació en el nostre cas, però, reduiria molt significativament el número de mostres en l'estudi i per tant la validesa del mateix.

Malgrat introduir les dades clíniques disponibles de tots els pacients de la Unitat de Fibrosi Quística de l'Hospital Vall d'Hebron, només tres pacients heterozigots compostos per la mutació c.580-1G>T han pogut incloure's, i per tant no s'ha realitzat la comparació estadística. Ara bé, la tendència dels diferents paràmetres és molt similar al grup de CTL positius i per tant el seu fenotip és greu.

Per avaluar la proteïna produïda per les mutacions c.580-1G>T, c.2657+5G>A i c.3718-1G>A s'ha emprat la immunofluorescència i s'ha comparat amb els CTLs positius (p.PheF08del/p.Phe508del) i CTLs negatius (wt/wt). Està ben establert que la proteïna CFTR-p.Phe508del té un plegament incorrecte i és degradada pràcticament en la seva totalitat, sent la seva localització principalment en l'RE (Kopito 1999; Penque, Mendes et al. 2000). Diferents autors han evidenciat la falta de concordança entre la quantificació de transcrits i de proteïna (Gygi, Rochon et al. 1999), i CFTR-p.Phe508del és un clar exemple de què el nivell de transcrits és fonamental però no conclouent perquè no necessàriament es correlaciona amb la proteïna a membrana i/o la seva activitat.

Les diferències en distribució del senyal fluorescent en pacients i controls han estat evidents en les mostres analitzades. Les dades aportades indiquen una localització citoplasmàtica del senyal fluorescent en els tres grups de pacients i, per tant, una disminució de proteïna a la membrana. La tècnica emprada no ha permès quantificar la proteïna funcional en cap dels casos, però és indicativa de la disminució de proteïna i es correlacionaria *a grosso modo* amb el menor nivell de transcrits observat. En aquest context, la quantitat de proteïna a membrana sembla equiparable en els tres grups. Per tal d'avaluar de forma més exacta la relació entre el número de transcrits i la proteïna a membrana s'hauria de considerar l'ús de línies cel·lulars o cultius primaris de cèl·lules d'EN.

Aquest treball ha estat el primer a aportar dades sobre el possible efecte sinèrgic de la mutació c.2657+5G>A amb el cSNP c.2562T>G (p.=). Aquest al·lel complex, a més, dóna lloc a un PTC que afavoreix la degradació dels transcrits aberrants. D'altra banda, l'anàlisi de la proteïna a membrana no ha presentat diferències en distribució del senyal

fluorescent en els grups de pacients estudiats. Considerant ambdós fets, postulem que la mutació c.2657+5G>A té un inici de simptomatologia tardà i una major expectativa de vida, però la complexitat molecular determina complicacions pulmonars greus que es correlacionarien amb la quantitat reduïda de transcrits normals observats.

En resum, en aquest treball s'ha desenvolupat un mètode per a la quantificació de transcrits *CFTR* que és aplicable a totes aquelles mutacions que alteren l'eficiència de l'*splicing* tant en la fibrosi quística com a en altres malalties genètiques. A més, és una tècnica complementària a considerar per a l'avaluació de noves estratègies terapèutiques correctores de l'*splicing* aberrant.

CONCLUSIONS

- L'EN és una mostra accessible que ha permès la caracterització dels tipus cel·lulars, l'anàlisi de l'expressió del gen *CFTR* i la localització de la proteïna.
- L'anàlisi genòmica ha permès la identificació de mutacions i SNPs, i ha estat fonamental per la formació dels grups d'estudi i l'estimació de freqüències.
- L'ús de diferents aproximacions computacionals, tot i tenir limitacions, permet la priorització en l'estudi de mutacions *missense*, *nonsense* i d'*splicing* davant la dificultat que suposa la seva caracterització funcional.
- L'anàlisi qualitativa ha corroborat la predicció *in silico* per l'estimació tant de la presència de transcrits aberrants en mutacions d'*splicing* com la seva absència en els altres tipus de mutacions analitzades (*missense*, *nonsense*).
- La recent publicació de directrius per als estudis de RT-qPCR redunda en la necessitat de controlar les diferents variables en cada tipus d'experiment. El seu seguiment en aquest treball ha estat clau per evidenciar que la RT-qPCR és una tècnica sensible i reproducible en l'anàlisi de gens amb nivell baix d'expressió.
- L'avaluació de gens de referència per a l'anàlisi quantitativa ha permès la identificació de dos gens, *GUSB* i *PMCA4*, adients per a la normalització de l'expressió de *CFTR*.
- L'anàlisi de mostres humanes ha evidenciat una gran variabilitat biològica inherent. Malgrat aquesta variabilitat, el disseny experimental amb els quatre grups proposats posa de manifest les variacions en l'eficiència del procés d'*splicing* i aporta una quantificació més real que els models *in vitro*.
- L'anàlisi quantitativa per a la mutació c.2657+5G>A ha portat a la identificació d'un nou al·lel complex. Postulem que l'efecte de la mutació c.2657+5G>A en l'eficiència de l'*splicing* es veu agreujat pel cSNP c.2562T>G (p.=) a l'exó 14a, el qual altera la unió amb diferents factors de transcripció. Un efecte sinèrgic prèviament descrit en altres mutacions *CFTR*.
- La manca de proteïna CFTR a la membrana correlaciona amb els nivells de transcrits a les mutacions de classe I i V, però no a les mutacions de classe II
- L'anàlisi quantitativa de transcrits ha mostrat una correlació amb el fenotip d'individus portadors de mutacions d'*splicing*, i en conseqüència pot ser útil com a paràmetre complementari per a l'avaluació de teràpies moleculars dirigides a la correcció d'*splicings* aberrants.

REFERÈNCIES

1.- BIBLIOGRAFIA

- Accurso, F. J. (1997). "Early pulmonary disease in cystic fibrosis." *Curr Opin Pulm Med* **3**(6): 400-3.
- Aleksandrov, A. A., L. A. Aleksandrov, et al. (2007). "CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel." *Pflugers Arch* **453**(5): 693-702.
- Aleksandrov, L., A. A. Aleksandrov, et al. (2002). "The First Nucleotide Binding Domain of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is a Site of Stable Nucleotide Interaction, whereas the Second Is a Site of Rapid Turnover." *J Biol Chem* **277**(18): 15419-25.
- Alonso, M. J., D. Heine-Suner, et al. (2007). "Spectrum of mutations in the CFTR gene in cystic fibrosis patients of Spanish ancestry." *Ann Hum Genet* **71**(Pt 2): 194-201.
- Alt, F. W., V. Enea, et al. (1980). "Activity of multiple light chain genes in murine myeloma cells producing a single, functional light chain." *Cell* **21**(1): 1-12.
- Allo, M., V. Buggiano, et al. (2009). "Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing." *Nat Struct Mol Biol* **16**(7): 717-24.
- Amaral, M. D. (2004). "CFTR and chaperones: processing and degradation." *J Mol Neurosci* **23**(1-2): 41-8.
- Amaral, M. D. (2005). "Processing of CFTR: traversing the cellular maze--how much CFTR needs to go through to avoid cystic fibrosis?" *Pediatr Pulmonol* **39**(6): 479-91.
- Amaral, M. D. and K. Kunzelmann (2007). "Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis." *Trends Pharmacol Sci* **28**(7): 334-41.
- Ameen, N., M. Silvis, et al. (2007). "Endocytic trafficking of CFTR in health and disease." *J Cyst Fibros* **6**(1): 1-14.
- Andersen, C. L., J. L. Jensen, et al. (2004). "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets." *Cancer Res* **64**(15): 5245-50.
- Andersen, D. H. (1938). "Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study." *American Journal of Diseases of Children* (56): 344-399.
- Anderson, M. P., R. J. Gregory, et al. (1991). "Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity." *Science* **253**(5016): 202-5.
- Andreassi, C., J. Jarecki, et al. (2001). "Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients." *Hum Mol Genet* **10**(24): 2841-9.
- Anguiano, A., R. D. Oates, et al. (1992). "Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis." *Jama* **267**(13): 1794-7.
- Anon (2007). "2006 annual data report to the centers directors. Bethesda, MD. Cystic Fibrosis Foundation Patients Registry."
- Applied-Biosystems (2001). "ABI Prism Bulletin #2."
- Aris, R. M., P. A. Merkel, et al. (2005). "Guide to bone health and disease in cystic fibrosis." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(3): 1888-96.
- Ars, E., E. Serra, et al. (2000). "Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1." *Hum Mol Genet* **9**(2): 237-47.

- Audrezet, M. P., B. Mercier, et al. (1993). "Identification of 12 novel mutations in the CFTR gene." *Hum Mol Genet* **2**(1): 51-4.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G. and Struhl, k. (1987). "Current protocols in molecular biology."
- Aznarez, I., E. M. Chan, et al. (2003). "Characterization of disease-associated mutations affecting an exonic splicing enhancer and two cryptic splice sites in exon 13 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene." *Hum Mol Genet* **12**(16): 2031-40.
- Aznarez, I., J. Zielenski, et al. (2007). "Exon skipping through the creation of a putative exonic splicing silencer as a consequence of the cystic fibrosis mutation R553X." *J Med Genet* **44**(5): 341-6.
- Baralle, D. and M. Baralle (2005). "Splicing in action: assessing disease causing sequence changes." *J Med Genet* **42**(10): 737-48.
- Basso, C., P. Vergani, et al. (2003). "Prolonged nonhydrolytic interaction of nucleotide with CFTR's NH2-terminal nucleotide binding domain and its role in channel gating." *J Gen Physiol* **122**(3): 333-48.
- Berger, A. L., M. Ikuma, et al. (2005). "Normal gating of CFTR requires ATP binding to both nucleotide-binding domains and hydrolysis at the second nucleotide-binding domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(2): 455-60.
- Berget, S. M. (1995). "Exon recognition in vertebrate splicing." *J Biol Chem* **270**(6): 2411-4.
- Bienvenu, T., M. Adjiman, et al. (1997). "Molecular diagnosis of congenital bilateral absence of the vas deferens: analyses of the CFTR gene in 64 French patients." *Ann Genet* **40**(1): 5-9.
- Black, D. L. (2003). "Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing." *Annu Rev Biochem* **72**: 291-336.
- Blackledge, N. P., C. J. Ott, et al. (2009). "An insulator element 3' to the CFTR gene binds CTCF and reveals an active chromatin hub in primary cells." *Nucleic Acids Res* **37**(4): 1086-94.
- Blencowe, B. J. (2000). "Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases." *Trends Biochem Sci* **25**(3): 106-10.
- Blencowe, B. J. (2006). "Alternative splicing: new insights from global analyses." *Cell* **126**(1): 37-47.
- Bombieri, C., S. Giorgi, et al. (2000). "A new approach for identifying non-pathogenic mutations. An analysis of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in normal individuals." *Hum Genet* **106**(2): 172-8.
- Boucher, R. C. (2004). "New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease." *Eur Respir J* **23**(1): 146-58.
- Boulling, A., G. Le Gac, et al. (2010). "The c.1275A>G putative chronic pancreatitis-associated synonymous polymorphism in the glycoprotein 2 (GP2) gene decreases exon 9 inclusion." *Mol Genet Metab* **99**(3): 319-24.
- Boutz, P. L., G. Chawla, et al. (2007). "MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development." *Genes Dev* **21**(1): 71-84.
- Burgel, P. R., D. Montani, et al. (2007). "A morphometric study of mucins and small airway plugging in cystic fibrosis." *Thorax* **62**(2): 153-61.
- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *J Mol Endocrinol* **25**(2): 169-93.

- Bustin, S. A. (2009). "Why the need for qPCR publication guidelines?--The case for MIQE." Methods **50**(4): 217-26.
- Bustin, S. A., V. Benes, et al. (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." Clin Chem **55**(4): 611-22.
- Bustin, S. A. and T. Nolan (2004). "Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction." J Biomol Tech **15**(3): 155-66.
- Button, B., M. Picher, et al. (2007). "Differential effects of cyclic and constant stress on ATP release and mucociliary transport by human airway epithelia." J Physiol **580**(Pt. 2): 577-92.
- Caceres, J. F. and A. R. Kornblihtt (2002). "Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease." Trends Genet **18**(4): 186-93.
- Cai, Z., T. S. Scott-Ward, et al. (2003). "Voltage-dependent gating of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel." J Gen Physiol **122**(5): 605-20.
- Calcagno, A. M., K. J. Chewning, et al. (2006). "Plasma membrane calcium ATPase (PMCA4): a housekeeper for RT-PCR relative quantification of polytopic membrane proteins." BMC Mol Biol **7**: 29.
- Caplen, N. J., E. W. Alton, et al. (1995). "Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." Nat Med **1**(1): 39-46.
- Cartegni, L., S. L. Chew, et al. (2002). "Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing." Nat Rev Genet **3**(4): 285-98.
- Cartegni, L., J. Wang, et al. (2003). "ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers." Nucleic Acids Res **31**(13): 3568-71.
- Castellani, C., H. Cuppens, et al. (2008). "Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice." J Cyst Fibros **7**(3): 179-96.
- Clunes, M. T. and R. C. Boucher (2007). "Cystic Fibrosis: The Mechanisms of Pathogenesis of an Inherited Lung Disorder." Drug Discov Today Dis Mech **4**(2): 63-72.
- Collaco, J. M. and G. R. Cutting (2008). "Update on gene modifiers in cystic fibrosis." Curr Opin Pulm Med **14**(6): 559-66.
- Cooper, T. A. and W. Mattox (1997). "The regulation of splice-site selection, and its role in human disease." Am J Hum Genet **61**(2): 259-66.
- Costantino, L., L. Claut, et al. (2010). "A novel donor splice site characterized by CFTR mRNA analysis induces a new pseudo-exon in CF patients." J Cyst Fibros **9**(6): 411-8.
- Cuppens, H., H. Teng, et al. (1994). "CFTR haplotype backgrounds on normal and mutant CFTR genes." Hum Mol Genet **3**(4): 607-14.
- Cutting, G. R. (2005). "Modifier genetics: cystic fibrosis." Annu Rev Genomics Hum Genet **6**: 237-60.
- Chan, H. C., Q. X. Shi, et al. (2006). "Critical role of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm." Mol Cell Endocrinol **250**(1-2): 106-13.
- Chen, T. Y. and T. C. Hwang (2008). "CLC-0 and CFTR: chloride channels evolved from transporters." Physiol Rev **88**(2): 351-87.
- Cheung, J. C., P. Kim Chiaw, et al. (2008). "Molecular basis for the ATPase activity of CFTR." Arch Biochem Biophys **476**(1): 95-100.

- Chiba-Falek, O., E. Kerem, et al. (1998). "The molecular basis of disease variability among cystic fibrosis patients carrying the 3849+10 kb C->T mutation." Genomics **53**(3): 276-83.
- Chiba-Falek, O., R. B. Parad, et al. (1999). "Variable levels of normal RNA in different fetal organs carrying a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splicing mutation." Am J Respir Crit Care Med **159**(6): 1998-2002.
- Davis, P. B. (2006). "Cystic fibrosis since 1938." Am J Respir Crit Care Med **173**(5): 475-82.
- de Kok, J. B., R. W. Roelofs, et al. (2005). "Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes." Lab Invest **85**(1): 154-9.
- Denning, C. R., S. C. Sommers, et al. (1968). "Infertility in male patients with cystic fibrosis." Pediatrics **41**(1): 7-17.
- Dequeker, E., M. Stuhmann, et al. (2009). "Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations." Eur J Hum Genet **17**(1): 51-65.
- Derveaux, S., J. Vandesompele, et al. (2009). "How to do successful gene expression analysis using real-time PCR." Methods **50**(4): 227-30.
- Di Sant'Agnese, P. A., R. C. Darling, et al. (1953). "Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease." Pediatrics **12**(5): 549-63.
- Dugueperoux, I. and M. De Braekeleer (2005). "The CFTR 3849+10kbC->T and 2789+5G->A alleles are associated with a mild CF phenotype." Eur Respir J **25**(3): 468-73.
- Dujardin, G., D. Commandeur, et al. (2011). "Splicing defects in the CFTR gene: Minigene analysis of two mutations, 1811+1G>C and 1898+3A>G." J Cyst Fibros.
- Early, P., J. Rogers, et al. (1980). "Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways." Cell **20**(2): 313-9.
- Ellsworth, R. E., D. C. Jamison, et al. (2000). "Comparative genomic sequence analysis of the human and mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(3): 1172-7.
- Faa, V., A. Coiana, et al. (2010). "A synonymous mutation in the CFTR gene causes aberrant splicing in an Italian patient affected by a mild form of cystic fibrosis." J Mol Diagn **12**(3): 380-3.
- Fairbrother, W. G. and L. A. Chasin (2000). "Human genomic sequences that inhibit splicing." Mol Cell Biol **20**(18): 6816-25.
- Fairbrother, W. G., R. F. Yeh, et al. (2002). "Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes." Science **297**(5583): 1007-13.
- Farinha, C. M. and M. D. Amaral (2005). "Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin." Mol Cell Biol **25**(12): 5242-52.
- Farinha, C. M., P. Nogueira, et al. (2002). "The human DnaJ homologue (Hdj)-1/heat-shock protein (Hsp) 40 co-chaperone is required for the in vivo stabilization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by Hsp70." Biochem J **366**(Pt 3): 797-806.
- Fleige, S. and M. W. Pfaffl (2006). "RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance." Mol Aspects Med **27**(2-3): 126-39.

- Flume, P. A., B. P. O'Sullivan, et al. (2007). "Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health." Am J Respir Crit Care Med **176**(10): 957-69.
- Flume, P. A., J. R. Yankaskas, et al. (2005). "Massive hemoptysis in cystic fibrosis." Chest **128**(2): 729-38.
- Forch, P., L. Merendino, et al. (2003). "U2 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) auxiliary factor of 65 kDa, U2AF65, can promote U1 snRNP recruitment to 5' splice sites." Biochem J **372**(Pt 1): 235-40.
- Fox-Walsh, K. L., Y. Dou, et al. (2005). "The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16176-81.
- Fulcher, M. L., S. Gabriel, et al. (2005). "Well-differentiated human airway epithelial cell cultures." Methods Mol Med **107**: 183-206.
- Gadsby, D. C., P. Vergani, et al. (2006). "The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis." Nature **440**(7083): 477-83.
- Garcia-Blanco, M. A., A. P. Baraniak, et al. (2004). "Alternative splicing in disease and therapy." Nat Biotechnol **22**(5): 535-46.
- Gene, G. G., A. Llobet, et al. (2008). "N-terminal CFTR missense variants severely affect the behavior of the CFTR chloride channel." Hum Mutat **29**(5): 738-49.
- Gibson, L. E. and R. E. Cooke (1959). "A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis." Pediatrics **23**(3): 545-9.
- Goddard, C. A., R. Ratcliff, et al. (1997). "A second dose of a CFTR cDNA-liposome complex is as effective as the first dose in restoring cAMP-dependent chloride secretion to null CF mice trachea." Gene Ther **4**(11): 1231-6.
- Graveley, B. R. (2000). "Sorting out the complexity of SR protein functions." Rna **6**(9): 1197-211.
- Graveley, B. R. (2001). "Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world." Trends Genet **17**(2): 100-7.
- Gruenert, D. C., M. Willems, et al. (2004). "Established cell lines used in cystic fibrosis research." J Cyst Fibros **3 Suppl 2**: 191-6.
- Gunderson, K. L. and R. R. Kopito (1995). "Conformational states of CFTR associated with channel gating: the role ATP binding and hydrolysis." Cell **82**(2): 231-9.
- Gutierrez, L., M. Mauriat, et al. (2008). "Towards a systematic validation of references in real-time rt-PCR." Plant Cell **20**(7): 1734-5.
- Gygi, S. P., Y. Rochon, et al. (1999). "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." Mol Cell Biol **19**(3): 1720-30.
- Haardt, M., M. Benharouga, et al. (1999). "C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation." J Biol Chem **274**(31): 21873-7.
- Haggie, P. M. and A. S. Verkman (2008). "Monomeric CFTR in plasma membranes in live cells revealed by single molecule fluorescence imaging." J Biol Chem **283**(35): 23510-3.
- Hall, S. L. and R. A. Padgett (1994). "Conserved sequences in a class of rare eukaryotic nuclear introns with non-consensus splice sites." J Mol Biol **239**(3): 357-65.
- Hellems, J., G. Mortier, et al. (2007). "qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data." Genome Biol **8**(2): R19.
- Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." Annu Rev Cell

- Biol **8**: 67-113.
- Highsmith, W. E., Jr., L. H. Burch, et al. (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**(4): 332-8.
- Higuchi, R., G. Dollinger, et al. (1992). "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." Biotechnology (N Y) **10**(4): 413-7.
- Higuchi, R., C. Fockler, et al. (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y) **11**(9): 1026-30.
- Hirawat, S., E. M. Welch, et al. (2007). "Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers." J Clin Pharmacol **47**(4): 430-44.
- Ho-Pun-Cheung, A., C. Bascoul-Mollevi, et al. (2009). "Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction: description of a RIN-based algorithm for accurate data normalization." BMC Mol Biol **10**: 31.
- Houdayer, C., C. Dehainault, et al. (2008). "Evaluation of in silico splice tools for decision-making in molecular diagnosis." Hum Mutat **29**(7): 975-82.
- Howell, L. D., R. Borchardt, et al. (2000). "ATP hydrolysis by a CFTR domain: pharmacology and effects of G551D mutation." Biochem Biophys Res Commun **271**(2): 518-25.
- Hsiao, L. L., F. Dangond, et al. (2001). "A compendium of gene expression in normal human tissues." Physiol Genomics **7**(2): 97-104.
- Huggett, J., K. Dheda, et al. (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." Genes Immun **6**(4): 279-84.
- Imbeaud, S., E. Graudens, et al. (2005). "Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces." Nucleic Acids Res **33**(6): e56.
- Kerem, B., J. M. Rommens, et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis." Science **245**(4922): 1073-80.
- Knowles, M. R. and R. C. Boucher (2002). "Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways." J Clin Invest **109**(5): 571-7.
- Knowles, M. R., M. J. Stutts, et al. (1983). "Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium." Science **221**(4615): 1067-70.
- Koch, C., M. Rainisio, et al. (2001). "Presence of cystic fibrosis-related diabetes mellitus is tightly linked to poor lung function in patients with cystic fibrosis: data from the European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis." Pediatr Pulmonol **32**(5): 343-50.
- Konstan, M. W. (2008). "Ibuprofen therapy for cystic fibrosis lung disease: revisited." Curr Opin Pulm Med **14**(6): 567-73.
- Kopelman, H., P. Durie, et al. (1985). "Pancreatic fluid secretion and protein hyperconcentration in cystic fibrosis." N Engl J Med **312**(6): 329-34.
- Kopito, R. R. (1999). "Biosynthesis and degradation of CFTR." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S167-73.
- Kornblihtt, A. R. (2007). "Coupling transcription and alternative splicing." Adv Exp Med Biol **623**: 175-89.
- Kornblihtt, A. R., I. E. Schor, et al. (2009). "When chromatin meets splicing." Nat Struct Mol Biol **16**(9): 902-3.
- Kreindler, J. L. (2010). "Cystic fibrosis: exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies." Pharmacol Ther **125**(2): 219-29.

- Kubista, M., J. M. Andrade, et al. (2006). "The real-time polymerase chain reaction." Mol Aspects Med **27**(2-3): 95-125.
- Lazarowski, E. R., R. Tarran, et al. (2004). "Nucleotide release provides a mechanism for airway surface liquid homeostasis." J Biol Chem **279**(35): 36855-64.
- Lerman, L. S. and K. Silverstein (1987). "Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis." Methods Enzymol **155**: 482-501.
- Lewandowska, M. A., F. F. Costa, et al. (2010). "Multiple mechanisms influence regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene promoter." Am J Respir Cell Mol Biol **43**(3): 334-41.
- Li, X., W. J. Park, et al. (1995). "Effect on splicing of a silent FGFR2 mutation in Crouzon syndrome." Nat Genet **9**(3): 232-3.
- Linton, K. J. and C. F. Higgins (2007). "Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control." Pflugers Arch **453**(5): 555-67.
- Lipman, D. J. and W. R. Pearson (1985). "Rapid and sensitive protein similarity searches." Science **227**(4693): 1435-41.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Locher, K. P., A. T. Lee, et al. (2002). "The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism." Science **296**(5570): 1091-8.
- Lukacs, G. L., G. Segal, et al. (1997). "Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation." Biochem J **328** (Pt 2): 353-61.
- MacLusky, I. B., R. Gold, et al. (1989). "Long-term effects of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis colonized with *Pseudomonas aeruginosa*." Pediatr Pulmonol **7**(1): 42-8.
- Maheshri, N. and E. K. O'Shea (2007). "Living with noisy genes: how cells function reliably with inherent variability in gene expression." Annu Rev Biophys Biomol Struct **36**: 413-34.
- Makeyev, E. V., J. Zhang, et al. (2007). "The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing." Mol Cell **27**(3): 435-48.
- Marshall, B. C., S. M. Butler, et al. (2005). "Epidemiology of cystic fibrosis-related diabetes." J Pediatr **146**(5): 681-7.
- Martinez-Contreras, R., P. Cloutier, et al. (2007). "hnRNP proteins and splicing control." Adv Exp Med Biol **623**: 123-47.
- Matsui, H., B. R. Grubb, et al. (1998). "Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease." Cell **95**(7): 1005-15.
- Matsui, H., V. E. Wagner, et al. (2006). "A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18131-6.
- McCarthy, V. A. and A. Harris (2005). "The CFTR gene and regulation of its expression." Pediatr Pulmonol **40**(1): 1-8.
- McPhail, G. L., J. D. Acton, et al. (2008). "Improvements in lung function outcomes in children with cystic fibrosis are associated with better nutrition, fewer chronic *pseudomonas aeruginosa* infections, and dornase alfa use." J Pediatr

- 153(6):** 752-7.
- Milla, C. E., J. Billings, et al. (2005). "Diabetes is associated with dramatically decreased survival in female but not male subjects with cystic fibrosis." Diabetes Care **28(9)**: 2141-4.
- Mitomo, K., U. Griesenbach, et al. (2010). "Toward gene therapy for cystic fibrosis using a lentivirus pseudotyped with Sendai virus envelopes." Mol Ther **18(6)**: 1173-82.
- Moody, J. E. and P. J. Thomas (2005). "Nucleotide binding domain interactions during the mechanochemical reaction cycle of ATP-binding cassette transporters." J Bioenerg Biomembr **37(6)**: 475-9.
- Moss, R. B., C. Milla, et al. (2007). "Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial." Hum Gene Ther **18(8)**: 726-32.
- Mount, S. M. (1982). "A catalogue of splice junction sequences." Nucleic Acids Res **10(2)**: 459-72.
- Muller, M. C., T. Horst, et al. (2004). "Standardization of preanalytical factors for minimal residual disease analysis in chronic myelogenous leukemia." Acta Haematol **112(1-2)**: 30-3.
- Ng, P. C. and S. Henikoff (2002). "Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>." Genome Res **12(3)**: 436-46.
- Nissim-Rafinia, M., M. Aviram, et al. (2004). "Restoration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function by splicing modulation." EMBO Rep **5(11)**: 1071-7.
- Nissim-Rafinia, M., O. Chiba-Falek, et al. (2000). "Cellular and viral splicing factors can modify the splicing pattern of CFTR transcripts carrying splicing mutations." Hum Mol Genet **9(12)**: 1771-8.
- O'Sullivan, B. P. and S. D. Freedman (2009). "Cystic fibrosis." Lancet **373(9678)**: 1891-904.
- Okada, S. F., R. A. Nicholas, et al. (2006). "Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia." J Biol Chem **281(32)**: 22992-3002.
- Oppenheimer, E. A., A. L. Case, et al. (1970). "Cervical mucus in cystic fibrosis: a possible cause of infertility." Am J Obstet Gynecol **108(4)**: 673-4.
- Orenstein, D. M., G. B. Winnie, et al. (2002). "Cystic fibrosis: a 2002 update." J Pediatr **140(2)**: 156-64.
- Orita, M., Y. Suzuki, et al. (1989). "Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction." Genomics **5(4)**: 874-9.
- Ostedgaard, L. S., O. Balduresson, et al. (2001). "Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by its R domain." J Biol Chem **276(11)**: 7689-92.
- Ott, C. J., N. P. Blackledge, et al. (2009). "Intronic enhancers coordinate epithelial-specific looping of the active CFTR locus." Proc Natl Acad Sci U S A **106(47)**: 19934-9.
- Ott, C. J., N. P. Blackledge, et al. (2009). "Novel regulatory mechanisms for the CFTR gene." Biochem Soc Trans **37(Pt 4)**: 843-8.
- Ott, C. J., M. Suszko, et al. (2009). "A complex intronic enhancer regulates expression of the CFTR gene by direct interaction with the promoter." J Cell Mol Med

- 13**(4): 680-92.
- Pagani, F. and F. E. Baralle (2004). "Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers." *Nat Rev Genet* **5**(5): 389-96.
- Pagani, F., E. Buratti, et al. (2002). "A new type of mutation causes a splicing defect in ATM." *Nat Genet* **30**(4): 426-9.
- Pagani, F., M. Raponi, et al. (2005). "Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(18): 6368-72.
- Pagani, F., C. Stuani, et al. (2003). "New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12." *Hum Mol Genet* **12**(10): 1111-20.
- Pan, Q., O. Shai, et al. (2008). "Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing." *Nat Genet* **40**(12): 1413-5.
- Pandit, S., D. Wang, et al. (2008). "Functional integration of transcriptional and RNA processing machineries." *Curr Opin Cell Biol* **20**(3): 260-5.
- Park, J. W., K. Parisky, et al. (2004). "Identification of alternative splicing regulators by RNA interference in Drosophila." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(45): 15974-9.
- Parker, R., P. G. Siliciano, et al. (1987). "Recognition of the TACTAAC box during mRNA splicing in yeast involves base pairing to the U2-like snRNA." *Cell* **49**(2): 229-39.
- Penque, D., F. Mendes, et al. (2000). "Cystic fibrosis F508del patients have apically localized CFTR in a reduced number of airway cells." *Lab Invest* **80**(6): 857-68.
- Pettigrew, C. A. and M. A. Brown (2008). "Pre-mRNA splicing aberrations and cancer." *Front Biosci* **13**: 1090-105.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Pfaffl, M. W., A. Tichopad, et al. (2004). "Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations." *Biotechnol Lett* **26**(6): 509-15.
- Picher, M., L. H. Burch, et al. (2004). "Metabolism of P2 receptor agonists in human airways: implications for mucociliary clearance and cystic fibrosis." *J Biol Chem* **279**(19): 20234-41.
- Pier, G. B., M. Grout, et al. (1998). "Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells." *Nature* **393**(6680): 79-82.
- Pier, G. B., M. Grout, et al. (1997). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of Pseudomonas aeruginosa from the lung." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(22): 12088-93.
- Pleiss, J. A., G. B. Whitworth, et al. (2007). "Rapid, transcript-specific changes in splicing in response to environmental stress." *Mol Cell* **27**(6): 928-37.
- Port, M., H. U. Schmelz, et al. (2007). "Correcting false gene expression measurements from degraded RNA using RTQ-PCR." *Diagn Mol Pathol* **16**(1): 38-49.
- Qu, B. H., E. H. Strickland, et al. (1997). "Localization and suppression of a kinetic defect in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator folding." *J Biol Chem* **272**(25): 15739-44.
- Quinton, P. M. (1983). "Chloride impermeability in cystic fibrosis." *Nature* **301**(5899): 421-2.
- Quinton, P. M. (2007). "Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland." *Physiology*

- (Bethesda) **22**: 212-25.
- Quinton, P. M. (2007). "Too much salt, too little soda: cystic fibrosis." Sheng Li Xue Bao **59**(4): 397-415.
- Radonic, A., S. Thulke, et al. (2004). "Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR." Biochem Biophys Res Commun **313**(4): 856-62.
- Ramalho, A. S., S. Beck, et al. (2002). "Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis." Am J Respir Cell Mol Biol **27**(5): 619-27.
- Ramalho, A. S., S. Beck, et al. (2003). "Transcript analysis of the cystic fibrosis splicing mutation 1525-1G>A shows use of multiple alternative splicing sites and suggests a putative role of exonic splicing enhancers." J Med Genet **40**(7): e88.
- Ramalho, A. S., M. A. Lewandowska, et al. (2009). "Deletion of CFTR translation start site reveals functional isoforms of the protein in CF patients." Cell Physiol Biochem **24**(5-6): 335-46.
- Ramensky, V., P. Bork, et al. (2002). "Human non-synonymous SNPs: server and survey. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>." Nucleic Acids Res **30**(17): 3894-900.
- Ramsey, B. W., S. J. Astley, 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**(1): 145-51.
- Ramsey, B. W., M. S. Pepe, et al. (1999). "Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group." N Engl J Med **340**(1): 23-30.
- Raser, J. M. and E. K. O'Shea (2005). "Noise in gene expression: origins, consequences, and control." Science **309**(5743): 2010-3.
- Raviv, U., S. Giasson, et al. (2003). "Lubrication by charged polymers." Nature **425**(6954): 163-5.
- Reddy, M. M. and P. M. Quinton (2003). "Control of dynamic CFTR selectivity by glutamate and ATP in epithelial cells." Nature **423**(6941): 756-60.
- Reese, M. G., F. H. Eeckman, et al. (1997). "Improved splice site detection in Genie." J Comput Biol **4**(3): 311-23.
- Reyes, C. L., A. Ward, et al. (2006). "The structures of MsbA: Insight into ABC transporter-mediated multidrug efflux." FEBS Lett **580**(4): 1042-8.
- Richard, I. and J. S. Beckmann (1995). "How neutral are synonymous codon mutations?" Nat Genet **10**(3): 259.
- Riordan, J. R., J. M. Rommens, et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." Science **245**(4922): 1066-73.
- Rogers, J., P. Early, et al. (1980). "Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain." Cell **20**(2): 303-12.
- Romey, M. C., C. Guittard, et al. (1999). "Complex allele [-102T>A+S549R(T>G)] is associated with milder forms of cystic fibrosis than allele S549R(T>G) alone." Hum Genet **105**(1-2): 145-50.
- Rommens, J. M., M. C. Iannuzzi, et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping." Science **245**(4922): 1059-65.
- Rosenberg, M. F., A. B. Kamis, et al. (2004). "Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)." J Biol Chem

279(37): 39051-7.

- Rosenecker, J., I. Eichler, et al. (1995). "Genetic determination of diabetes mellitus in patients with cystic fibrosis. Multicenter Cystic Fibrosis Study Group." J Pediatr **127**(3): 441-3.
- Rosenfeld, M., B. W. Ramsey, et al. (2003). "Pseudomonas acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management." Curr Opin Pulm Med **9**(6): 492-7.
- Salvatore, D., R. Buzzetti, et al. (2011). "An overview of international literature from cystic fibrosis registries. Part 3. Disease incidence, genotype/phenotype correlation, microbiology, pregnancy, clinical complications, lung transplantation, and miscellaneous." J Cyst Fibros **10**(2): 71-85.
- Sambrook, J. a. R., D. (2000). "Molecular Cloning: A laboratory manual."
- Sanchez, L. (2008). "Sex-determining mechanisms in insects." Int J Dev Biol **52**(7): 837-56.
- Sanz, J., T. von Kanel, et al. (2010). "The CFTR frameshift mutation 3905insT and its effect at transcript and protein level." Eur J Hum Genet **18**(2): 212-7.
- Schroeder, A., O. Mueller, et al. (2006). "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements." BMC Mol Biol **7**: 3.
- Schwartz, S., E. Meshorer, et al. (2009). "Chromatin organization marks exon-intron structure." Nat Struct Mol Biol **16**(9): 990-5.
- Seibert, F. S., Y. Jia, et al. (1997). "Disease-associated mutations in cytoplasmic loops 1 and 2 of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impede processing or opening of the channel." Biochemistry **36**(39): 11966-74.
- Sheppard, D. N. and M. J. Welsh (1999). "Structure and function of the CFTR chloride channel." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S23-45.
- Shoshani, T., A. Augarten, et al. (1992). "Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Ashkenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease." Am J Hum Genet **50**(1): 222-8.
- Smith, C. W. and J. Valcarcel (2000). "Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control." Trends Biochem Sci **25**(8): 381-8.
- Smith, D. J., C. C. Query, et al. (2008). "Nought may endure but mutability": spliceosome dynamics and the regulation of splicing." Mol Cell **30**(6): 657-66.
- Smith, P. J., C. Zhang, et al. (2006). "An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers." Hum Mol Genet **15**(16): 2490-508.
- Stahlberg, A., J. Hakansson, et al. (2004). "Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification." Clin Chem **50**(3): 509-15.
- Stahlberg, A., M. Kubista, et al. (2004). "Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis." Clin Chem **50**(9): 1678-80.
- Steiner, B., K. Truninger, et al. (2004). "The role of common single-nucleotide polymorphisms on exon 9 and exon 12 skipping in nonmutated CFTR alleles." Hum Mutat **24**(2): 120-9.
- Stutts, M. J., C. M. Canessa, et al. (1995). "CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels." Science **269**(5225): 847-50.
- Tarran, R., B. Button, et al. (2006). "Regulation of normal and cystic fibrosis airway surface liquid volume by phasic shear stress." Annu Rev Physiol **68**: 543-61.
- Tarran, R., B. R. Grubb, et al. (2001). "The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and

- composition." *J Gen Physiol* **118**(2): 223-36.
- Tarran, R., L. Trout, et al. (2006). "Soluble mediators, not cilia, determine airway surface liquid volume in normal and cystic fibrosis superficial airway epithelia." *J Gen Physiol* **127**(5): 591-604.
- Teraoka, S. N., M. Telatar, et al. (1999). "Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences." *Am J Hum Genet* **64**(6): 1617-31.
- Tizzano, E. F., D. Chitayat, et al. (1993). "Cell-specific localization of CFTR mRNA shows developmentally regulated expression in human fetal tissues." *Hum Mol Genet* **2**(3): 219-24.
- Tizzano, E. F., M. M. Silver, et al. (1994). "Differential cellular expression of cystic fibrosis transmembrane regulator in human reproductive tissues. Clues for the infertility in patients with cystic fibrosis." *Am J Pathol* **144**(5): 906-14.
- Treize, A. E. and M. Buchwald (1991). "In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." *Nature* **353**(6343): 434-7.
- Treize, A. E., J. A. Chambers, et al. (1993). "Expression of the cystic fibrosis gene in human foetal tissues." *Hum Mol Genet* **2**(3): 213-8.
- Tsui, L. C., M. Buchwald, et al. (1985). "Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker." *Science* **230**(4729): 1054-7.
- Valcarcel, J., R. Singh, et al. (1993). "The protein Sex-lethal antagonizes the splicing factor U2AF to regulate alternative splicing of transformer pre-mRNA." *Nature* **362**(6416): 171-5.
- Vandesompele, J., K. De Preter, et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome Biol* **3**(7): RESEARCH0034.
- Vankeerberghen, A., H. Cuppens, et al. (2002). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions." *J Cyst Fibros* **1**(1): 13-29.
- Vergani, P., C. Basso, et al. (2005). "Control of the CFTR channel's gates." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 5): 1003-7.
- Vergani, P., S. W. Lockless, et al. (2005). "CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains." *Nature* **433**(7028): 876-80.
- Vergani, P., A. C. Nairn, et al. (2003). "On the mechanism of MgATP-dependent gating of CFTR Cl⁻ channels." *J Gen Physiol* **121**(1): 17-36.
- Walters, R. W., T. Grunst, et al. (1999). "Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia." *J Biol Chem* **274**(15): 10219-26.
- Wang, E. T., R. Sandberg, et al. (2008). "Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes." *Nature* **456**(7221): 470-6.
- Wang, J., P. J. Smith, et al. (2005). "Distribution of SR protein exonic splicing enhancer motifs in human protein-coding genes." *Nucleic Acids Res* **33**(16): 5053-62.
- Wang, X., J. Venable, et al. (2006). "Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis." *Cell* **127**(4): 803-15.
- Wang, X. F., C. X. Zhou, et al. (2003). "Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm." *Nat Cell Biol* **5**(10): 902-6.
- Wang, Z. and C. B. Burge (2008). "Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code." *Rna* **14**(5): 802-13.
- Wang, Z., M. E. Rolish, et al. (2004). "Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers." *Cell* **119**(6): 831-45.

- Ward, A. J. and T. A. Cooper (2009). "The pathobiology of splicing." *J Pathol* **220**(2): 152-63.
- Ward, C. L., S. Omura, et al. (1995). "Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway." *Cell* **83**(1): 121-7.
- Watt, W. C., E. R. Lazarowski, et al. (1998). "Cystic fibrosis transmembrane regulator-independent release of ATP. Its implications for the regulation of P2Y2 receptors in airway epithelia." *J Biol Chem* **273**(22): 14053-8.
- Welsh MJ, R. B., Accurso FJ, Cutting GR. (2001). *Cystic Fibrosis*. New York, McGraw-Hill.
- White, N. L., C. F. Higgins, et al. (1998). "Tissue-specific in vivo transcription start sites of the human and murine cystic fibrosis genes." *Hum Mol Genet* **7**(3): 363-9.
- WHO/ICF(M)A/ECFTN (2002). "Classification of cystic fibrosis and related disorders." *J Cyst Fibros* **1**(1): 5-8.
- Wilschanski, M., M. Corey, et al. (1996). "Diversity of reproductive tract abnormalities in men with cystic fibrosis." *Jama* **276**(8): 607-8.
- Wilschanski, M. and P. R. Durie (2007). "Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene." *Gut* **56**(8): 1153-63.
- Willems, E., L. Leyns, et al. (2008). "Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates." *Anal Biochem* **379**(1): 127-9.
- Willems, E., I. Mateizel, et al. (2006). "Selection of reference genes in mouse embryos and in differentiating human and mouse ES cells." *Int J Dev Biol* **50**(7): 627-35.
- Wittwer, C. T., M. G. Herrmann, et al. (1997). "Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification." *Biotechniques* **22**(1): 130-1, 134-8.
- Yu, Y., P. A. Maroney, et al. (2008). "Dynamic regulation of alternative splicing by silencers that modulate 5' splice site competition." *Cell* **135**(7): 1224-36.
- Zegarra-Moran, O., M. Monteverde, et al. (2007). "Functional analysis of mutations in the putative binding site for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiators. Interaction between activation and inhibition." *J Biol Chem* **282**(12): 9098-104.
- Zhang, C., W. H. Li, et al. (2008). "RNA landscape of evolution for optimal exon and intron discrimination." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(15): 5797-802.
- Zhang, L., B. Button, et al. (2009). "CFTR delivery to 25% of surface epithelial cells restores normal rates of mucus transport to human cystic fibrosis airway epithelium." *PLoS Biol* **7**(7): e1000155.
- Zhong, X., J. R. Liu, et al. (2006). "A profile of alternative RNA splicing and transcript variation of CACNA1H, a human T-channel gene candidate for idiopathic generalized epilepsies." *Hum Mol Genet* **15**(9): 1497-512.
- Zielenski, J. (2000). "Genotype and phenotype in cystic fibrosis." *Respiration* **67**(2): 117-33.
- Zielenski, J., R. Rozmahel, et al. (1991). "Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene." *Genomics* **10**(1): 214-28.
- Zielenski, J. and L. C. Tsui (1995). "Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations." *Annu Rev Genet* **29**: 777-807.
- Zuo, P. and T. Maniatis (1996). "The splicing factor U2AF35 mediates critical protein-protein interactions in constitutive and enhancer-dependent splicing." *Genes Dev* **10**(11): 1356-68.

2.- PÀGINES WEB

CF Mutation database: www.genet.sickkids.on.ca/cftr/

The Cystic Fibrosis Foundation: www.cff.org

GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

Splice Site Prediction By Neural Network: www.fruitfly.org

ESEfinder: <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>

Rescue Ese: <http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>

Alamut™: www.interactive-biosoftware.com/alamut.html

SIFT: <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>

PolyPhen: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>

Primer 3: <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3>

FinchTV: www.geospiza.com/finchtv/

qBase^{Plus}: <http://www.biogazelle.com/products/qbaseplus>

NormFinder: <http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>

Applied Biosystems: www.appliedbiosystems.com

ANNEX

ANNEX 1

Nomenclatura de mutacions *CFTR*

NOMENCLATURA HGVS		NOMENCLATURA CFMDB	
CANVI	PROTEÏNA	LEGACY NAME	EXÓ /INTRÓ
c.-8G>C		125G/C	Promotor
c.273+1G>A		405+1G>A	i.3
c.490-15C>T		622-15C>T	i.4
c.580-1G>T		712-1G>T	i.5
c.744-31TTGA(5-7)		TTGA repeats	i.6a
c.1117-17C>T		1249-17C>T	i.7
c.1117-31A>G		1249-31A>G	i.7
c.1210-12(T)3-9		5T (Poly-T tract variation)	i.8
c.1393-61A>G		1525-61A>G	i.9
c.1766+152A>T		1898+152A>T	i.12
c.2657+5G>A		2789+5G>A	i.14b
c.3368-56G>A		3500-65G>A	i.17b
c.3368-140A>G		3500-140A>G	i.17b
c.3469-65C>A		3601-65C>A	i.18
c.3718-1G>A		3850-1G>A	i.19
c.3873+69A>C		4005+69A>C	l.20
c.148C>G	p.Ser50Cys	S50C	e.2
c.221G>A	p.Arg74Gln	R74Q	e.3
c.350G>A	p.Arg117His	R117H	e.4
c.601G>A	p.Val201Met	V201M	e.6a
c.613C>T	p.Pro205Ser	P205S	e.6a
c.617T>G	p.Leu206Trp	L206W	e.6a
c.695T>A	p.Val232Asp	V232D	e.6a
c.772A>G	p.Arg258Gly	R258G	e.6b
c.890G>A	p.Arg297Gln	R297Q	e.7
c.1196C>A	p.Ala399Asp	A399D	e.8
c.1327G>T	p.Asp443Tyr	D443Y	e.9
c.1364C>A	p.Ala455Glu	A455E	e.9
c.1408A>G	p.Met470Val	M470V	e.10
c.1519_1521delATC	p.Ile507del	I507del	e.10
c.1521_1523delCTT	p.Phe508del	F508del	e.10
c.1584G>A	p.=	1716G>A	e.10
c.1624G>T	p.Gly542X	G542X	e.11
c.1652G>A	p.Gly551Asp	G551D	e.11
c.1727G>C	p.Gly576Ala	G576A	e.12
c.1759T>A	p.Phe587Ile	F587I	e.12
c.1826A>G	p.His609Arg	H609R	e.13

c.2002C>T	p.Arg668Cys	R668C	e.13
c.2128A>T	p.Lys710X	K710X	e.13
c.2506G>T	p.Asp836Tyr	D836Y	e.14a
c.2562T>G	p.=	T854T	e.14a
c.2668C>T	p.Gln890X	Q890X	e.15
c.2726G>A	p.Ser909Ile	c.2858G>A	e.15
c.2900T>C	p.Leu967Ser	L967S	e.15
c.2930C>T	p.Ser977Phe	S977F	e.16
c.2991G>C	p.Leu997Phe	L997F	e.17a
c.3454G>C	p.Asp1152His	D1152H	e.18
c.3705T>G	p.Ser1235Arg	S1235R	e.19
c.3808G>T	p.Asp1270Tyr	D1270Y	e.20
c.3846G>A	p.Trp1282X	W1282X	e.20
c.3909C>G	p.Asn1303Lys	N1303K	e.21
c.4056G>T	p.Gln1352His	Q1352H	e.22
c.4389G>C	p.=	4521G/A	e.24

MIQE checklist

ITEM TO CHECK	IMPORTANCE	CHECKLIST
EXPERIMENTAL DESIGN		
Definition of experimental and control groups	E	Pacients i controls (pàg. 64)
Number within each group	E	Caracterització de mostres (pàg.114)
Assay carried out by core lab or investigator's lab?	D	Laboratori de recerca
Acknowledgement of authors' contributions	D	No requerit
SAMPLE		
Description	E	Tipus cel·lulars (pàg. 59)
Volume/mass of sample processed	D	5x10 ⁶ HEK293; 20 mg PN; No determinat per EN
Microdissection or macrodissection	E	No requerit
Processing procedure	E	Material i mètodes (pàg. 59)
If frozen - how and how quickly?	E	EN; HEK293 (pàg 59); PN informació no disponible
If fixed - with what, how quickly?	E	No requerit
Sample storage conditions and duration (especially for FFPE samples)	E	-20 °C fins extracció d'àcids nucleics
NUCLEIC ACID EXTRACTION		
Procedure and/or instrumentation	E	Extracció d'RNA
Name of kit and details of any modifications	E	Absolutely RNA Miniprep; Sense modificacions (pàg. 76)
Source of additional reagents used	D	RNAlater (pàg. 76)
Details of DNase or RNase treatment	E	Protocol d'extracció d'RNA (pàg. 76)
Contamination assessment (DNA or RNA)	E	Gels d'agarosa (pàg. 78) / ràtio 260/280 nm
Nucleic acid quantification	E	Quantificació d'àcids nucleics (pàg. 78)
Instrument and method	E	NanoDrop -100
Purity (A260/A280)	D	1,8-2,0 per DNA; 1,8-2,1 per RNA
Yield	D	≥ 50 ng/μl
RNA integrity method/instrument	E	Agilent Bioanalyzer 2100 (Electroferograma; pàg. 78)
RIN/RQI or Cq of 3' and 5' transcripts	E	RIN
Electrophoresis traces	D	No especificat
Inhibition testing (Cq dilutions, spike or other)	E	Dilució seriada de Cq
REVERSE TRANSCRIPTION		
Complete reaction conditions	E	Transcripció inversa (pàg. 79)
Amount of RNA and reaction volume	E	1μg de HEK293 i PN; 500ng d'EN (pàg. 79)
Priming oligonucleotide (if using GSP) and concentration	E	Encebadors a l'atzar (10x)
Reverse transcriptase and concentration	E	Multiscribe reverse transcriptase (50 U/μl)

Temperature and time	E	120' a 37 °C (pàg. 79)
Manufacturer of reagents and catalogue numbers	D	High-Capacity cDNA Reverse Transcription
Cqs with and without RT	D*	No especificat
Storage conditions of cDNA	D	-20 °C
qPCR TARGET INFORMATION		
If multiplex, efficiency and LOD of each assay.	E	Validació de gens de referència (pàg. 115); Estudi de l'expressió de <i>CFTR</i> (pàg. 119)
Sequence accession number	E	Taula 5 i 6 (pàg. 80)
Location of amplicon	D	Informació disponible per cada assaig en www.appliedbiosystems.com . No especificat
Amplicon length	E	
<i>In silico</i> specificity screen (BLAST, etc)	E	
Pseudogenes, retropseudogenes or other homologs?	D	
Sequence alignment	D	
Secondary structure analysis of amplicon	D	
Location of each primer by exon or intron (if applicable)	E	
What splice variants are targeted?	E	
qPCR OLIGONUCLEOTIDES		
Primer sequences	E	Només per els assaigs específics de c.2756+5G>A I c.580-1G>T. Figura 15 (pàg. 81)
RTPimerDB Identification Number	D	No especificat
Probe sequences	D**	Només per els assaigs específics de c.2756+5G>A I c.580-1G>T. Figura 15 (pàg. 81)
Location and identity of any modifications	E	No especificat
Manufacturer of oligonucleotides	D	Applied Biosystems
Purification method	D	No especificat
qPCR PROTOCOL		
Complete reaction conditions	E	RT-qPCR (pàg. 82)
Reaction volume and amount of cDNA/DNA	E	1 µl en 20 µl totals (pàg. 82)
Primer, (probe), Mg++ and dNTP concentrations	E	No especificat
Polymerase identity and concentration	E	No especificat
Buffer/kit identity and manufacturer	E	Universal master mix no UNG; Applied Biosystems (pàg. 82)
Exact chemical constitution of the buffer	D	No especificat
Additives (SYBR Green I, DMSO, etc.)	E	Sense additius
Manufacturer of plates/tubes and catalog number	D	Applied Biosystems (pàg. 82)
Complete thermocycling parameters	E	Condicions universals d'Applied Biosystems (pàg. 82)
Reaction setup (manual/robotic)	D	Manual
Manufacturer of qPCR instrument	E	Applied Biosystems (pàg. 82)

qPCR VALIDATION		
Evidence of optimisation (from gradients)	D	<i>CFTR</i> : quantificació de transcrits (pàg. 115)
Specificity (gel, sequence, melt, or digest)	E	No especificat
For SYBR Green I, Cq of the NTC	E	No requerit
Standard curves with slope and y-intercept	E	Interval i eficiència (pàg. 115)
PCR efficiency calculated from slope	E	
Confidence interval for PCR efficiency or standard error	D	No especificat
r ² of standard curve	E	No especificat
Linear dynamic range	E	Intèrval i eficiència (pàg. 115)
Cq variation at lower limit	E	No especificat
Confidence intervals throughout range	D	No especificat
Evidence for limit of detection	E	No especificat
If multiplex, efficiency and LOD of each assay.	E	Estudi de l'expressió de <i>CFTR</i> (pàg. 119)
DATA ANALYSIS		
qPCR analysis program (source, version)	E	Estudi de l'expressió de (pàg. 83)
Cq method determination	E	RT-qPCR (pàg. 82)
Outlier identification and disposition	E	No especificat
Results of NTCs	E	No especificats
Justification of number and choice of reference genes	E	Avaluació dels gens de referència (pàg. 85)
Description of normalisation method	E	Estudi de l'expressió (pàg. 83); Figura 16 (pàg. 84)
Number and concordance of biological replicates	D	RT-qPCR (pàg. 82)
Number and stage (RT or qPCR) of technical replicates	E	Transcripció inversa (pàg. 71); RTq-PCR (pàg. 82)
Repeatability (intra-assay variation)	E	Estudi de l'expressió de <i>CFTR</i> (pàg. 119)
Reproducibility (inter-assay variation, %CV)	D	Estudi de l'expressió de <i>CFTR</i> (pàg. 119)
Power analysis	D	No especificat
Statistical methods for result significance	E	Anàlisi estadística (pàg. 83)
Software (source, version)	E	Avaluació de gens de referència (pàg. 85)
Cq or raw data submission using RDML	D	No especificat

E: Informació essencial que ha de ser sotmesa; **D:** Informació recomanable que ha de ser sotmesa si es troba disponible. *: L'avaluació de l'absència de DNA (assaig no RT) és essencial en la primera extracció d'RNA. Una vegada ha estat validada la mostra l'inclusió d'aquest control és desitjable però no essencial. **: Sotmetre la seqüència de les sondes d'hidrolisi és altament recomanable però com no totes les cases comercials la proporcionen no pot ser considerat un requisit essencial.

Article:**“The p.Arg258Gly mutation in intracellular loop 2 of CFTR is associated with CFTR-related disorders”**

Masvidal, L., Giménez, J., Ramos, M.D., Domingo, C., Farré, A., Bassas, L., Casals, T.
2009. Genetic testing and biomarkers; 13(6):765-8

Tal i com s’ha esmentat al llarg d’aquest treball, l’efecte de les mutacions *missense* és en gran mesura desconegut. Aquest desconeixement dificulta l’assessorament genètic. Per tant, és un repte important determinar la seva expressió clínica, atesa la dificultat dels estudis funcionals i el gran percentatge de mutacions *missense*..

L’anàlisi *in silico* de la mutació p.Arg258Gly va suggerir que l’activitat de la proteïna estava alterada (Taula 8). Basant-nos en la literatura publicada on vam trobar l’estudi funcional que evidencia l’alteració de la biosíntesi de la proteïna causada per aquesta mutació (Seibert, Jia et al. 1997) i en les dades de la nostra casuística hem postulat l’expressió fenotípica d’aquesta mutació.

The p.Arg258Gly Mutation in Intracellular Loop 2 of CFTR is Associated with *CFTR*-Related Disorders

Laia Masvidal,¹ Javier Giménez,² María D. Ramos,² Christian Domingo,³ Antoni Farré,⁴
Lluís Bassas,⁵ and Teresa Casals¹

Missense mutations account for approximately 50% of the mutations described in the *CFTR* gene. However, their proportion is higher in *CFTR*-related disorders (*CFTR*-RD) than in cystic fibrosis (CF), suggesting a different mutational spectrum. The uncertainty surrounding many of these mutations prevents suitable genetic counseling. Thus, it is crucial to determine whether a missense mutation has clinical expression, and if it does, to then define the associated phenotype. Herein we have assessed the phenotype associated with the p.Arg258Gly (R258G) mutation, checking our cohorts of patients (CF and *CFTR*-RD) and control subjects (CF carriers, fertile males, and general population). We also performed *in silico* predictive studies on the possible consequences of this mutation at the protein level. Lastly, we exhaustively reviewed the literature on this mutation. To date, R258G has only been found in six patients: a French congenital bilateral absence of vas deferens patient, reported in 1995 and five unrelated subjects from our cohort of non-CF patients, described here. Based on these findings, we postulate that R258G is primarily a *CFTR*-RD-associated mutation.

Introduction

CYSTIC FIBROSIS (CF; OMIM 219700) is a multisystemic disorder presenting a variable phenotypic expression. It is characterized by compromised lung function, the extent of which is dictated by chronic pulmonary infections, and also typically affects digestive and male reproductive tissues. Mutations in the *CFTR* (*ABCC7*; OMIM 602421) result in null or reduced protein levels leading to defective transport of chloride ion and water across the apical membrane in epithelial cells, with ensuing dehydration. Consequently, high chloride concentration in sweat has become the gold standard for CF diagnosis. In the 1990s, *CFTR* mutations (see Cystic Fibrosis Mutation Database [CFMD]: <http://genet.sickkids.on.ca/cftr/>) were found associated with other pathologies, classified as *CFTR*-related disorders (*CFTR*-RD), which chiefly comprise congenital bilateral absence of vas deferens (CBAVD), chronic pancreatitis (CP), and bronchiectasis (Br) (Castellani *et al.*, 2008).

Thus, a crucial issue for genetic counseling is to first determine whether a given missense mutation has clinical expression, and if it does, to then define the associated phenotype(s).

The mutation p.Arg258Gly (R258G) is a missense mutation located in intracellular loop 2 (ICL2) of *CFTR*. It was first reported in a CBAVD patient (Mercier *et al.*, 1995). Functional studies on this mutation later revealed that it disrupts biosynthesis of the protein (Seibert *et al.*, 1997). However, low levels of protein can lead to either the CF or *CFTR*-RD phenotype. Herein we have checked cohorts of our CF patients and control subjects for this mutation and surveyed the literature to determine the phenotype associated with the R258G mutation.

Materials and Methods

Subjects

Since the identification of the *CFTR* gene, we have performed mutational analysis in patients with different disorders, CF, CBAVD, CP, and Br (Casals *et al.*, 2000, 2004a, 2004b; Alonso *et al.*, 2007) as well as in different control groups (Bombieri *et al.*, 2000; Larriba *et al.*, 2005).

Retrospective data on our CF patients ($n = 1000$), *CFTR*-RD patients ($n = 700$), fertile males ($n = 87$), and general population ($n = 130$) were checked to identify individuals bearing the R258G mutation. Moreover, we also screened a group of

¹Medical and Molecular Genetics Center and ²Center for Molecular Genetics Diagnosis, Fundació IDIBELL, Barcelona, Spain.

³Pulmonary Service, Corporació Parc Taulí, Sabadell, Spain.

⁴Department of Gastroenterology, Hospital de la Sta. Creu i S. Pau, Barcelona, Spain.

⁵Department of Andrology, Fundació Puigvert, Barcelona, Spain.

TABLE 1. CLINICAL AND MOLECULAR FINDINGS FOR THE SIX PATIENTS KNOWN TO BEAR THE R258G MUTATION

Patient	Sex/age	Reason for testing	Other features	Genotype	R258G-associated haplotype (T)n-8CA-17bTA
1	M/28	CBAVD	PS, no LD	R258G/S945L	7T-16-30
2	M/42	CBAVD	PS, no LD	R258G/5T-11TG, V562I	7T-16-30
3	M/32	CUAVD + dysplSV	PS, rhinitis nonsmoker	R258G/Y1092X	7T-16-30
4	M/62	CP	PS, no LD fertile, smoker	R258G/-	7T-16-30
5	F/67	Br	PS, fertile nonsmoker asthma	R258G, G576A, R668C/-	7T-16-7 ^b
6 ^a	M/nd	CBAVD	nd	R258G/F508del	nd

(T)n, IVS8-6(T)n; 8CA, IVS8CA repeat; 17bTA, IVS17bTA repeat.

^aFirst patient ever reported (Mercier *et al.*, 1995).

^bHaplotype currently associated with the complex allele [G576A, R668C].

M, male; F, female; CBAVD, congenital bilateral absence of vas deferens; CUAVD, congenital unilateral absence of vas deferens; dysplSV, contralateral dysplasia of seminal vesicle; CP, chronic pancreatitis; Br, bronchiectasis; PS, pancreatic sufficiency; LD, lung disease; nd, not documented.

CF carriers ($n = 107$), following the updated recommendations for CF (Dequeker *et al.*, 2009).

Methods

Our group routinely performs direct mutational analysis for common *CFTR* mutations as well as genetic scanning (single strand conformation polymorphism/heteroduplex [SSCP/HD], denaturing gradient gel electrophoresis [DGGE], denaturing high performance liquid chromatography [DHPLC], multiplex ligation-dependent probe amplification [MLPA]) and direct sequencing of the gene. For the present study, we detected R258G in a cohort of CF carriers via direct sequencing (ABI3130XL; Applied Biosystems, Foster City, CA) of exon 6b.

In addition, we evaluated the possible consequences of R258G at the protein level using the SIFT and Polyphen programs (Ng and Henikoff, 2002; Ramensky *et al.*, 2002). Finally, we reviewed the literature on the missense mutations in *CFTR* ICL2.

Results

Molecular and clinical findings

Since 1989 we have identified over 240 *CFTR* mutations in the Spanish population, 59% of which are missense mutations. We found R258G in five unrelated adult patients (Table 1), which accounts for 0.7% (5 out of 700) of our *CFTR*-RD cohort.

These five patients were tested for *CFTR* because they presented different *CFTR*-RD pathologies (three obstructive azoospermia, one alcoholic CP, and one Br). The three patients with obstructive azoospermia were compound heterozygous for two *CFTR* mutations (Table 1). In two of these patients transrectal ultrasonography and clinical features confirmed CBAVD. The third patient showed congenital unilateral absence of vas deferens and contralateral dysplasia of the seminal vesicle with obstruction of the distal segment leading to an asymmetrical bilateral obstruction. Further, analysis of this patient's semen revealed low fluid volume

(0.5 mL) and $\text{pH} < 7$. Unexpectedly, the Br patient presented the mutation in *cis* with the known complex allele [G576A, R668C]. This novel triple mutant was correctly determined after the analysis of her offspring, underscoring the importance of confirming the genotype whenever possible. Thus, the CP patient and the Br patient carry only one *CFTR* mutant allele each.

Analysis of intragenic polymorphic repeat markers [IVS8-6(T)n—IVS8CA—IVS17bTA] showed that R258G was associated with the same 7T-16-30 haplotype in all patients, except for the patient with complex allele (Table 1). No other specific associated variants were found.

Approaches used to predict the pathological consequences of R258G

We assessed the potential clinical expression of R258G based on four premises. First, we did not detect the mutation in any of the normal alleles that we studied (107 CF carriers and the two other control groups: fertile males and general population). Second, the arginine residue at this position is conserved across different species (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Xenopus laevis*, *Squalus acanthias*, *Ovis aries*, *Bos taurus*, and *Oryctolagus cuniculus*) (Larkin *et al.*, 2007). Third, substitution of arginine by glycine causes loss of a polar residue. In fact, the two programs we used in our study predicted that this substitution at codon 258 is likely to damage the protein (SIFT score of 0.00; median sequence conservation 3.32; and Polyphen: PSIC score difference 2.43). Lastly, having reviewed the literature, we determined that to date, R258G has only been found in six patients: the CBAVD patient reported by Mercier *et al.* (1995) and the five patients that we have reported here.

Details of missense mutations in the *CFTR* ICL2

The ICL2 comprises 65 amino acid residues joining transmembrane segments 4 and 5 in the N-terminal half of the *CFTR* protein (Riordan *et al.*, 1989). Interestingly, 75% of these residues are highly conserved across species (Larkin *et al.*, 2007). To date, 17 missense mutations have been reported in

TABLE 2. THE 65 RESIDUES COMPRISING THE SECOND INTRACELLULAR LOOP OF THE CFTR PROTEIN AND THE 17 MISSENSE MUTATIONS REPORTED

242	Arg	Met	Met	Met	Lys	Tyr	Arg	Asp	Gln	Arg	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser
		▲					▲								
257	Glu	Arg	Leu	Val	Ile	Thr	Ser	Glu	Met	Ile	Glu	Asn	Ile	Gln	Ser
		▲							■						
272	Val	Lys	Ala	Tyr	Cys	Trp	Glu	Glu	Ala	Met	Glu	Lys	Met	Ile	Glu
						■		*		▲				■	
287	Asn	Leu	Arg	Gln	Thr	Glu	Leu	Lys	Leu	Thr	Arg	Lys	Ala	Ala	
	■					■	■			•	▲		*		
301	Tyr	Val	Arg	Tyr	Phe	Asn	Ser								
	*				■		▲								

▲CFTR-related disorder-associated mutations: M244K, R248T, R258G, M281T, R297W, and S307N.

■CF-causing mutations: M265R, W277R, I285F, N287Y, E292K, L293M, and F305V.

*Mutations without or unknown clinical consequences: E279D, A299T, and Y301C.

•The R297Q mutation identified in CF and CFTR-related disorders.

CF, cystic fibrosis.

ICL2 (Table 2) (CFMD): 41% of which have been described in CF patients or carriers and 35% in CFTR-RD patients. Exceptionally, the R297Q mutation is associated with different phenotypes, CF, and CFTR-RD (Castellani *et al.*, 2008). The remaining 3 mutations have been described in asymptomatic or unknown phenotypes (CFMD) and fall into the “uncertain consequence” group (Castellani *et al.*, 2008). In addition, 11 of the 16 residues mutated are conserved across the eight species compared. Interestingly, the two mutations described in asymptomatic individuals (E279D and A299T) are among the nonconserved residues (Met265, Glu279, Asn287, Ala299, and Phe305) (Table 2).

Further, functional analysis of three missense mutations in ICL2 revealed that mutant proteins and wild-type CFTR behave differently. Thus, biosynthesis disruption has been determined in Gly258 (R258G) (Seibert *et al.*, 1997) and endocytic rate enhancement in Tyr287 (N287Y) (Silvis *et al.*, 2003); contrariwise, Gln297 (R297Q) has not shown any significant changes (Seibert *et al.*, 1997).

Discussion

The proportion of CFTR missense mutations has increased above 50% with the analysis of CFTR-RD patients, indicating a different mutational spectrum between CF and CFTR-RD phenotypes. The potential damage of missense mutations is often difficult to determine, and the pathological consequences of most of these remain unknown. Moreover, the sweat test has proven inconclusive for several CFTR mutations. These uncertainties prevent genetic counseling for patients and their families.

Upon reviewing the literature, we found publications highlighting the important role of CFTR ICLs. Xie *et al.* (1995) studied a mutant protein with 19 deleted amino acids (Met265 to Lys283) in ICL2. They observed differences in biogenesis and in conductance distribution between this mutant and

wild-type CFTR. Seibert *et al.* (1997) analyzed nine missense mutations located in ICL1 and ICL2. Of these, four showed immature protein, including R258G. Another two of these mutants, in ICL1, produced lower channel activity than that of wild-type CFTR. A later study by Silvis *et al.* (2003) revealed that N287Y mutation enhances protein degradation, indicating that the membrane stability of protein can also be affected by mutations in ICLs.

More recently, the three-dimensional structure of ABC transporters has been found to show conserved motifs in ICLs that bind to specific regions in the nucleotide-binding (NB) domains (Dawson *et al.*, 2007). Serohijos *et al.* (2008) have identified interactions between NBD1 and ICL4 residues and have provided evidence that such interactions only occur when the protein is in mature native form. The relevance of these binding events is supported by the disease-associated missense mutations identified in ICL4 (L1065P, R1066C, and F1052V) by Cotten *et al.* (1996). A symmetric interaction between NBD2 and ICL2 could be expected, although this requires further analysis (Serohijos *et al.*, 2008). Overall, these studies emphasize the significance of ICLs in the biogenesis, folding, and function of CFTR.

In this work we have employed various approaches to support the possible clinical expression of the R258G missense mutation. ICL2 is highly conserved across species, and the majority of missense mutations in this loop (>80%) have been associated with different disorders. R258G is a nonconservative substitution leading to the loss of a polar residue; both software packages (Ng and Henikoff, 2002; Ramensky *et al.*, 2002) that we used predicted that this loss would damage the protein. Further, the absence of this mutation in normal alleles is indirect evidence of its pathological effect. In addition, analysis of the R258G mutant protein has revealed defects in the maturation process (Seibert *et al.*, 1997).

Nevertheless, whether R258G causes CF and/or is a CFTR-RD–associated mutation remains to be determined.

Interestingly, the mutation has already been found in six unrelated patients (one in Mercier *et al.*, 1995 and five in this work), none of which meets the criteria for CF diagnosis (four infertile males, by CBAVD or an equivalent bilateral obstructive azoospermia, and two patients referred by CP and Br, respectively). Moreover, R258G has been found in the same associated haplotype in at least four patients, suggesting a common origin.

Based on these findings, we postulate that R258G is a relatively common mutation mainly associated with CFTR-RD. Considering the Spanish ancestry of Hispanic populations, as well as the molecular heterogeneity in southern Europe, we are confident that our study will facilitate the genetic counseling of many patients and their families. Lastly, the multi-approach methodology employed in this study should prove a useful model for other disorders.

Acknowledgments

This work was supported by grants from ISCIII FIS/FEDER PI080041 and Fundación Sira Carrasco (Spain).

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Alonso MJ, Heine-Suner D, Calvo M, *et al.* (2007) Spectrum of mutations in the CFTR gene in cystic fibrosis patients of Spanish ancestry. *Ann Hum Genet* 71:194–201.
- Bombieri C, Giorgi S, Carles S, *et al.* (2000) A new approach for identifying non-pathogenic mutations. An analysis of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in normal individuals. *Hum Genet* 106:172–178.
- Casals T, Aparisi L, Martinez-Costa C, *et al.* (2004a) Different CFTR mutational spectrum in alcoholic and idiopathic chronic pancreatitis? *Pancreas* 28:374–379.
- Casals T, Bassas L, Egozcue S, *et al.* (2000) Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod* 15:1476–1483.
- Casals T, De-Gracia J, Gallego M, *et al.* (2004b) Bronchiectasis in adult patients: an expression of heterozygosity for CFTR gene mutations? *Clin Genet* 65:490–495.
- Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr., *et al.* (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 7:179–196.
- Cotten JF, Ostedgaard LS, Carson MR, *et al.* (1996) Effect of cystic fibrosis-associated mutations in the fourth intracellular loop of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 271:21279–21284.
- Dawson RJ, Hollenstein K, Locher KP (2007) Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. *Mol Microbiol* 65:250–257.
- Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, *et al.* (2009) Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders—updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 17:51–65.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948.
- Larriba S, Bonache S, Sarquella J, *et al.* (2005) Molecular evaluation of CFTR sequence variants in male infertility of testicular origin. *Int J Androl* 28:284–290.
- Mercier B, Verlingue C, Lissens W, *et al.* (1995) Is congenital bilateral absence of vas deferens a primary form of cystic fibrosis? Analyses of the CFTR gene in 67 patients. *Am J Hum Genet* 56:272–277.
- Ng PC, Henikoff S (2002) Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Res* 12:436–446. <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>.
- Ramensky V, Bork P, Sunyaev S (2002) Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 30:3894–3900. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066–1073.
- Seibert FS, Jia Y, Mathews CJ, *et al.* (1997) Disease-associated mutations in cytoplasmic loops 1 and 2 of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impede processing or opening of the channel. *Biochemistry* 36:11966–11974.
- Serohijos AW, Hegedus T, Aleksandrov AA, *et al.* (2008) Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3256–3261.
- Silvis MR, Picciano JA, Bertrand C, *et al.* (2003) A mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator generates a novel internalization sequence and enhances endocytic rates. *J Biol Chem* 278:11554–11560.
- Xie J, Drumm ML, Ma J, *et al.* (1995) Intracellular loop between transmembrane segments IV and V of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in regulation of chloride channel conductance state. *J Biol Chem* 270:28084–28091.

Address correspondence to:

Teresa Casals, Ph.D.
 Medical and Molecular Genetics Center
 Fundació IDIBELL
 C/Gran Via km 2,7
 Barcelona 08907
 Spain

E-mail: tcasals@idibell.cat

Article:**“CFTR rearrangements in Spanish cystic fibrosis patients: first new duplication (35kb) characterised in the Mediterranean countries”.**

Ramos, M.D., Masvidal, L., Giménez, J., Bieth, E., Seia, M., des Georges, M., Armengol, L.,

Casals, T. 2010

Annals of Human Genetics; 74(5):463-9

La qPCR té múltiples aplicacions tant en recerca com en diagnòstic. El desenvolupament i l'ús de la qPCR i altres noves tècniques quantitatives (MLPA, CGH,...) han permés la identificació de grans reordenaments que amb tècniques de criatge convencional no són detectables. Actualment, la CFMDB recull un 4% de reordenaments en el total de mutacions *CFTR*.

Amb motiu de l'optimització de la RT-qPCR, es va posar a punt l'anàlisi de la dosi gènica (qPCR) per a la detecció de reordenaments en pacients amb un o cap al·lel caracteritzat i es va establir una estratègia cost eficient per a la seva caracterització. A banda d'altres reordenaments a la nostra població, aquest treball presenta la caracterització de la primera duplicació mediterrània.

Short Communication

doi: 10.1111/j.1469-1809.2010.00591.x

CFTR Rearrangements in Spanish Cystic Fibrosis Patients: First New Duplication (35kb) Characterised in the Mediterranean CountriesMaría D. Ramos¹, Laia Masvidal², Javier Giménez¹, Eric Bieth³, Manuela Seia⁴, Marie des Georges⁵, Lluís Armengol⁶ and Teresa Casals^{1,2*}¹Molecular Diagnosis Center – IDIBELL, Barcelona, Spain²Medical and Molecular Genetics Center – IDIBELL, Barcelona, Spain³Service de Génétique Médicale, Hôpital Purpan, Toulouse, France⁴Molecular Laboratory, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore, Milan, Italy⁵CHU de Montpellier, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Montpellier, France⁶Quantitative Genomic Medicine Laboratories, SL, Barcelona, Spain**Summary**

Developments in quantitative PCR technologies have greatly improved our ability to detect large genome rearrangements. In particular oligonucleotide-based array comparative genomic hybridisation has become a useful tool for appropriate and rapid detection of breakpoints. In this work, we have analysed 80 samples (42 unknown CF alleles) applying three quantitative technologies (MLPA, qPCR and array-CGH) to detect recurrent as well as novel large rearrangements in the Spanish CF population. Three deletions and one duplication have been identified in five alleles (12%). Interestingly, we provide the comprehensive characterisation of the first duplication in our CF cohort. The new CFTRdupProm-3 mutation spans 35.7 kb involving the 5'-end of the CFTR gene. Additionally, the RNA analysis has revealed a cryptic sequence with a premature termination codon leading to a disrupted protein. This duplication has been identified in five unrelated families from Spain, France and Italy with all patients showing the same associated haplotype, which is further evidence for its likely common Mediterranean origin. Overall, considering this and other previous studies, CFTR rearrangements account for 1.3% of the Spanish CF alleles.

Keywords: cystic fibrosis, CFTR, genomic rearrangements, CFTR duplication, Mediterranean origin

Introduction

Cystic fibrosis (CF; OMIM 219700) is a multi-systemic disorder (Welsh et al., 2001) produced by mutations in the CF transmembrane conductance regulator gene (CFTR, ABCC7; OMIM 602421) (Kerem et al., 1989). Besides the large number of previously known point mutations, the development of new quantitative technologies has led to the recent identification of large rearrangements (Cystic Fibrosis Mutation Database, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cfr/>).

In our current CF strategy, DNA samples are analysed in successive steps: 1) First we use a commercial kit for common mutations. 2) Secondly we perform microsatellite analysis (IVS8CA, IVS17bTA) to determine those haplotypes associated with another common mutation or large rearrangement previously identified in Spanish patients and/or to detect loss of heterozygosity (LOH). 3) Finally, we carry out CFTR gene scanning for samples still uncharacterised by single strand conformation polymorphism and denaturing gradient gel electrophoresis techniques, followed by sequencing of abnormal patterns. Using this strategy our overall detection rate reaches 96% (Alonso et al., 2007). To date, three large deletions have been detected by LOH (Morrall et al., 1993; Dork et al., 2000; Alonso et al., 2007) and another four in a previous collaborative work (Ferec et al., 2006). The aim of this study is to apply quantitative technologies [multiplex

*Corresponding author: Teresa Casals, Ph.D., Medical and Molecular Genetics Center, Institut d'Investigació Biomèdica Bellvitge (IDIBELL), Hospital Durán i Reynals, C/ Gran Via km 2,7, 08907 Barcelona, Spain. Tel: +34 93 260 74 25; Fax: +34 93 260 74 14; E-mail: tcasals@idibell.cat

ligation-dependent probe amplification (MLPA), quantitative real-time PCR (qPCR) and high resolution array comparative genomic hybridisation (array-CGH)] to detect large rearrangements and to determine the most cost-effective strategy. We also describe the comprehensive characterisation of a new large duplication.

Material and Methods

Patients and Families

DNA samples of eighty Spanish patients (50 CF and 30 *CFTR*-related disorders associated) with at least one CF unknown allele (n = 42) and not previously analysed for *CFTR* large rearrangements were included in this study. Six normal samples and six CF samples with known deletions were used as controls. Segregation analysis was performed to corroborate the genotypes.

Once the new duplication was characterised three other families (two French and one Italian) suspected of having the same rearrangement were also analysed.

All patients and/or their parents gave their informed consent.

Nomenclature of *CFTR* Mutations

We have used the CF Mutation Database (CFMDB) nomenclature with the A of the ATG translation start codon numbered +133 (GenBank NM_00492.3) in agreement with the recommendations of a recent consensus (Castellani et al., 2008). Likewise, we have indicated the Human Genome Variation Society (HGVS) nomenclature in Table 1.

Detection of Large Rearrangements

All samples were analysed by SALSA MLPA kit P091 *CFTR* (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands) to detect copy-number variations. The abnormal patterns were corroborated by an alternative method; direct analysis was performed for *CFTR*dele2,3 and *CFTR*dele22_24 (Dork et al., 2000; Chevalier-Porst et al., 2005); whereas qPCR was applied for the other two mutations, *CFTR*50kdel and the new duplication.

Briefly, we carried out the qPCR using SYBR[®] Green fluorescent dye. DNA samples (2.5 ng/ μ l) were analysed in triplicate for *CFTR* (exons 1, 2, 3, 4, 6a, 7, 8, 9, 10, 11, 17a, 18, 19) and β 2-microglobulin (*B2M*; GenBank AC000058; NC_000015.8) was used as a reference gene. The experiments were performed on an ABI 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primer Express Software was used to design the primers (Table S1 Supporting Information).

Table 1 Large rearrangements identified in the Spanish CF population

CFMD nomenclature	HGVS nomenclature	Size	CF alleles (%) ^b	Report
133-6186_IVS3 + 507dup35741	c.1-6186_c.273 + 507dup35741	35.7 Kb	2 (0.10)	this study
IVS1-5817_IVS3 + 10124del21081ins14	c.54-5817_c.273 + 10124del21081ins14	21.0 Kb	3 (0.15) ^c	Dork 2000
IVS16-2634_IVS18 + 1508del8600	c.2989-2634_c.3468 + 1508del8600	8.6 Kb	3 (0.15)	Ferec 2006
(<i>CFTR</i> dele19) ^a	<i>no available DNA for further studies</i>	-	2 (0.10)	Alonso 2007
IVS19-24_IVS20 + 601del781	c.3718-24_c.3873 + 601del781	781 bp	4 (0.20)	Ferec 2006
4344_Stop + 486del585msTTG	c.4212_c.4443 + 486del585msTTG	582 bp	1 (0.05)	Ferec 2006
IVS21-3890_Stop + 3143del9454ins5	c.3964-3890_c.4443 + 3143del9454insTAACT	8.8 Kb	2 (0.10)	Ferec 2006
(<i>CFTR</i> 50kdel)	<i>collaborative study in progress</i>	~50 Kb	9 (0.45)	Morral 1993

CFMD, Cystic Fibrosis Mutation Database; HGVS, Human Genome Variation Society.

^a, the deletion of exon 19 has been inferred from the direct analysis of the R1162X mutation. An apparent homozygous pattern of the CF patients was not corroborated in the segregation study. The R1162X was only detected in the maternal allele. Paternity was confirmed and the reported *CFTR*dele19 mutation has been discarded.

^b, percentages have been estimated on our total CF cohort (2,000 alleles)

^c, two patients: one homozygous and one heterozygous, both with Eastern European ancestry

Characterisation of the Duplication by Array-CGH

A custom-designed 44,000-oligonucleotide array (qGenomics, Quantitative Genomic Medicine Laboratories SL, Barcelona, Spain) in a 4×44K microarray slide format (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was used. Probes were designed to cover 1Mb of genomic sequence around the *CFTR* gene. Protocols were performed following Agilent's recommendations, with minor modifications.

After the junction fragment was delimited, two primer pairs were designed; a) I3forward1 5'-CTCAATGGGCTCAGCAA-AAT-3' and dupreverse1 5'-TTCCAGGTCCGTGTCCTTAC-3'; b) E3forward2 5'-GGGATAGAGAGCTGGCTTCA-3' and dupreverse2 5'-CACCCATTTCATGGAAGAGT-3'. Subsequent sequencing of both PCR products was carried out (ABI3130XL Genetic analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA) to determine the breakpoints.

Finally, we designed a duplex PCR for the direct detection of the duplication. A primer pair, I3dupforward3 5'-CGGGTGGCAATTTACAATCT-3' and dupreverse2 5'-CACCCATTTCATGGAAGAGT-3', was designed to amplify a 528 bp product comprising the breakpoint and a second primer pair was designed to amplify a 378 bp fragment comprising the *CFTR* exon 2 (I2D2 5'-GACCAAATCAAGTGAATATCTG-3' and I2R2 5'-GGTCTCAAGCAATCCTCTCA-3').

Additionally, we analysed some intragenic sequence repeats: IVS6a(GATT)_n, IVS8(CA)_n, IVS8(TG)_n, IVS8(T)_n, IVS17b(TA)_n and the polymorphism 1540A>G (M470V) to determine the haplotype associated with the new duplication.

RNA Analysis

Nasal epithelial cells of a CF parent bearing the new duplication were obtained for RNA analysis. RNA extraction and cDNA synthesis were carried out using standard protocols (Absolutely RNA miniprep kit, Stratagene Agilent Technologies, Waldbronn, Germany; High capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Two PCRs were developed to determine the cDNA sequence. The same forward primer in exon 3 was used in both PCRs (E3D2 5'-AGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTC-3'). The reverse primers were located in exon 1 (E1R3 5'-GAAAAAAGTTTGGAGACAACGCT-3' and exon 2 (E2R2: 5'-CAGATAGATTGTGACGAGAATCAAC-3'), respectively.

Results

All six known deletions used as positive controls were detected by MLPA analysis. In addition, four abnormal MLPA profiles were observed in five out of 42 alleles (12%) indicating three deletions and one duplication. Two patterns suggesting deletions already identified in our patients, *CFTR*dele2,3 and *CFTR*dele22_24, were corroborated by specific PCR analysis (data not shown). The third pattern suggesting the

*CFTR*50kdel complex deletion was confirmed by qPCR (data not shown). Only one patient showed the deletion in each case. Two of them with classic CF disease were heterozygous for the F508del mutation. The *CFTR*dele22_24 / 5T-12TG genotype was identified in an adult patient with bronchiectasis, who also showed a positive sweat test.

Furthermore, two CF samples showed a duplicated region at the 5'-end, extending from the promoter region to exon 3 (*CFTR*dupProm-3). The duplication of exons 1, 2 and 3 was corroborated by qPCR (Supporting Information Fig. S1), its size being estimated to be above 28 kb. The family studies showed evidence of paternal origin of the duplication in one, and maternal origin in the other.

Thus, in addition to other recurrent large deletions reported in our population (Morral et al., 1993; Dork et al., 2000; Ferec et al., 2006), we have characterised the first Spanish *CFTR* duplication. Overall, seven large deletions and one duplication have been identified in our total CF cohort (n = 1,000) accounting for 1.3% (Table 1; Table S2 Supporting Information). The *CFTR*50kdel mutation has been confirmed as the most frequent (0.5%).

Characterisation of the *CFTR*dupProm-3

Parents and the CF child of one Spanish family were analysed using array-CGH technology. The profiles of the CF child and his father showed evidence of a duplicated region (range 116901221–116936880) at the 5'-end of the *CFTR* gene spanning over 35 kb, from beyond the promoter region to intron 3 (Fig. 1A). The breakpoints of the duplication were determined by two independent PCRs of the junction fragment and the PCR products, 6,103 bp and 824 bp respectively, were bidirectionally sequenced (Fig. 1B/C). The breakpoints were identified at 6 kb upstream of the ATG translational initiation codon, without affecting other genes, and at 500 bp downstream of intron 3. The *CFTR*dupProm-3 mutation spanned 35,741 bp (133–6186_IVS3 + 507dup35741bp). Two independent sequences confirmed the direct orientation of this tandem duplication. The lack of high homology in the sequences surrounding the breakpoints, as well as the AGT microhomology observed (Fig. 1C) suggested a non-homologous end-joining (NHEJ) recombination event.

*CFTR*dupProm-3 RNA Analysis

The hypothetical tandem sequence of exons 1–3 would produce a 273 bp in-frame elongated cDNA. No PCR product was observed using primers from exon 3 to exon 1 (data not shown). In contrast, a cDNA fragment of 325 bp was observed with a primer set from exon 3 to exon 2 (Fig. 2A). Sequencing of this product showed an inserted sequence of

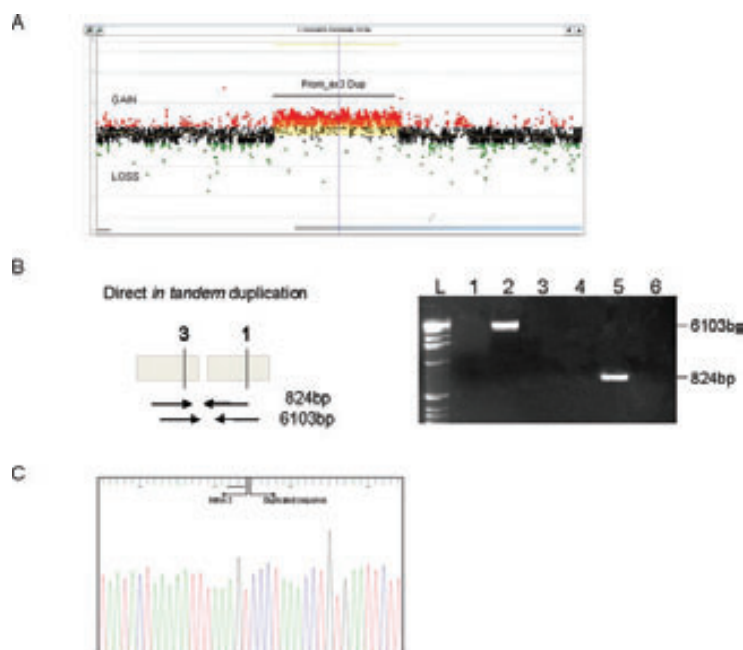


Figure 1 The array-CGH strategy
 A) Array-CGH showing the duplicated region.
 B) Scheme with the primer sets position (left) and the corresponding PCR products on a 1.5% agarose gel (right). L, ladder; lanes 1 and 4, normal samples; lanes 2 and 5, samples with the duplication; lanes 3 and 6, no DNA template.
 C) Sequence of the junction fragment showing an AGT microhomology

118 bp between exon 3 and exon 2, instead of exon 1 (Fig. 2B) which disrupted the *CFTR* gene and contained a TGA premature termination codon (PTC). The cryptic sequence was mapped in genomic DNA at 1782 bp from the breakpoint and showed acceptor and donor splice sites responsible for its transcription (Fig. 2C).

Candidate CF Families

Using semiquantitative fluorescent multiplex PCR (des Georges et al., 2008) two French families, from Montpellier and Toulouse respectively, showed an abnormal pattern at the 5'-end of the *CFTR* gene. The same MLPA profile had also been found in an Italian family (Paracchini et al., 2008). All five families were analysed together. Size and sequencing of the duplex PCR products (Fig. 3) confirmed the *CFTR*dupProm-3 mutation in all of them. Patients were compound heterozygous with F508del ($n = 4$) and 4016insT

($n = 1$) mutations in *trans*. There was evidence for paternal origin of the duplication in three families. One French family made reference to a Catalonian origin (North Eastern Spain).

The duplication was found associated with the *IVS6aGATT.7-IVS8CA.16-IVS8TG.11-IVS8T.7-470V-IVS17bTA.31* haplotype.

Four patients presented a classical form of the disease, having been diagnosed between 2 months and 4 years of age, two of them by neonatal screening programs. The fifth patient was diagnosed at 13 years old by recurrent pancreatitis and a positive sweat test (80 mmol/L).

Discussion

CFTR rearrangements account for around 2% of CF alleles (Lerer et al., 1999; Niel et al., 2004; Bombieri et al., 2005; Schrijver et al., 2008). Nevertheless, an estimate of their frequency in the Spanish CF population had not yet been made.

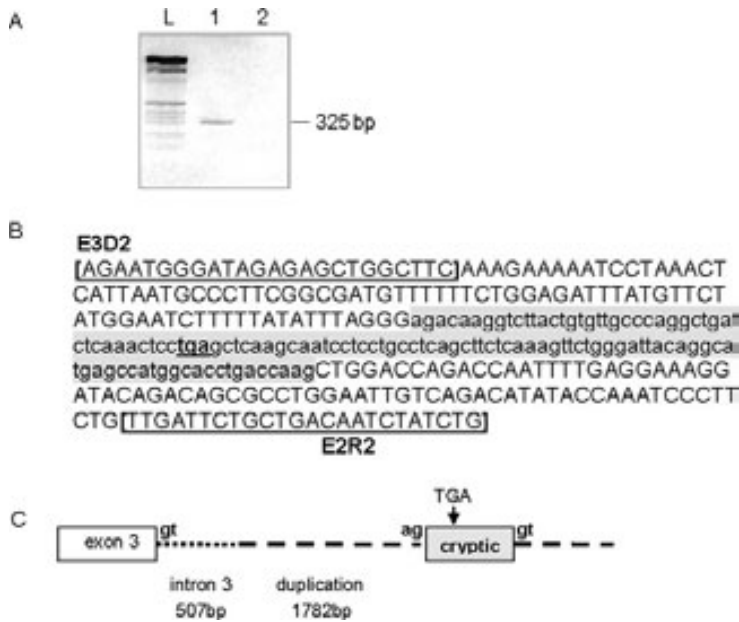


Figure 2 Analysis of the cDNA and genomic structure

A) *CFTR*dupProm-3 cDNA analysis. The 325 bp PCR product obtained using primers E3D2 and E2R2 on a 1.5% agarose gel. L, ladder; 1, CF parent with the duplication; 2, no DNA template.

B) Sequencing of the 325 bp fragment; primers E3D2 and E2R2 in brackets. Identification of a non-*CFTR* inserted sequence (grey) between exons 3 and 2, with a TGA premature termination codon.

C) Genomic DNA scheme showing the breakpoint and acceptor and donor splice sites responsible for the 118 bp inserted sequence (grey) between exons 3 and 2.

In this study, we have applied three different quantitative technologies and we have defined our strategy for analysing rearrangements. All abnormal MLPA profiles were corroborated by an alternative method. In general, direct analysis is available for recurrent rearrangements; alternatively, qPCR was carried out. In addition, to map the extent of the new duplication, we have used array-CGH technology which provides both high-resolution and sensitivity to characterise copy-number variations (del Gaudio et al., 2008; Derwinska et al., 2009). Array-CGH has accurately defined a duplicated region in our samples, facilitating the detection of breakpoints in a previously undefined region comprising the *CFTR* 5'-end. Consequently, array-CGH has been shown to be suitable for the comprehensive and quick characterisation of this new duplication comprising 35.7 kb. In addition, cDNA sequencing revealed a non-*CFTR* inserted fragment with a PTC preventing the synthesis of any functional protein.

The NHEJ mechanism is the major tool for recombination repair of double strand breaks (Zhang et al., 2009) and it is very likely to be the mechanism underlying this duplication.

The 5'-end of the *CFTR* gene is considered a hotspot region. So far, six deletions and this duplication have been reported involving exons 1, 2 and 3 (Cystic Fibrosis Mutation Database). Among these, the large deletion *CFTR*dele2,3(21kb) has been found to be the most common in Eastern Europe (6%; Dork et al., 2000). In the present study, the *CFTR*dupProm-3 mutation was identified in five unrelated patients from three different countries (Spain, France and Italy); all showed the same associated haplotype, which strongly suggest a common origin. Although we cannot rule out other undetected duplications it must be taken into account that, despite the increasing number of *CFTR* rearrangement studies, the same duplication has only been found in three Mediterranean countries. Because of this, we cannot

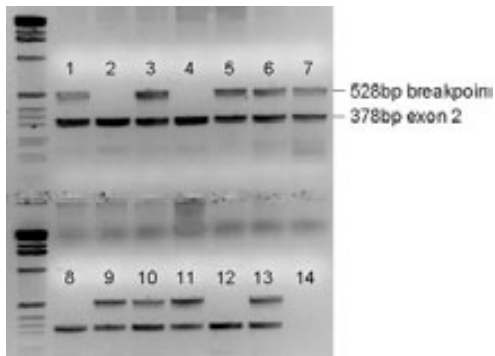


Figure 3 CFTR.dupProm-3 direct analysis by duplex PCR. PCR products on 1.5% agarose gel. Samples: father, mother and CF patient of family 1 (1–3); family 2 (4–6); the CF patient of family 3 (7); family 4 (8–10); family 5 (11–13); no DNA template (14).

reject the tempting hypothesis that CFTR.dupProm-3 might be the most common *CFTR* duplication in the Mediterranean area. Obviously, our hypothesis needs to be corroborated. For this reason, we encourage other teams to detect the duplication using the specific duplex PCR assay. The analysis of as yet uncharacterised CF alleles will confirm whether this duplication is confined to Mediterranean populations and what its impact will be on genetic counseling. Similarly, our rearrangement data could contribute to the improvement of the detection rate in those populations with Spanish ancestry.

In this study we have applied different quantitative technologies to determine the strategy to be implemented in our CF population, limiting array-CGH analysis to novel and complex rearrangements. Furthermore, we provide an update of all the rearrangements identified in Spanish CF patients. In our CF cohort, large rearrangements account for 1.3% of CF alleles. Interestingly, we have characterised the most common *CFTR* duplication in the Mediterranean populations so far.

Acknowledgements

This work was supported by grants from ISCiii FIS/FEDER PI080041 and Fundació Sira Carrasco (Spain). We thank the Associació Catalana de Fibrosi Quística for its continuous support.

References

Alonso, M. J., Heine-Suner, D., Calvo, M., Rosell, J., Gimenez, J., Ramos, M. D., Telleria, J. J., Palacio, A., Estivill, X. & Casals, T. (2007) Spectrum of mutations in the *CFTR* gene in cystic fibrosis patients of Spanish ancestry. *Ann Hum Genet* **71**, 194–201.

Bombieri, C., Bonizzato, A., Castellani, C., Assael, B. M. & Pignatti, P. F. (2005) Frequency of large *CFTR* gene rearrangements in Italian CF patients. *Eur J Hum Genet* **13**, 687–689.

Castellani, C., Cuppens, H., Macek, M., Jr., Cassiman, J. J., Kerem, E., Durie, P., Tullis, E., Assael, B. M., Bombieri, C., Brown, A., Casals, T., Claustres, M., Cutting, G. R., Dequeker, E., Dodge, J., Doull, I., Farrell, P., Ferec, C., Girodon, E., Johannesson, M., Kerem, B., Knowles, M., Munck, A., Pignatti, P. F., Radojkovic, D., Rizzotti, P., Schwarz, M., Stuhmann, M., Tzetis, M., Zielinski, J. & Elborn, J. S. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibro* **7**, 179–196.

Chevalier-Porst, F., Souche, G. & Bozon, D. (2005) Identification and characterization of three large deletions and a deletion/polymorphism in the *CFTR* gene. *Hum Mutat* **25**, 504.

Cystic Fibrosis Mutation Database, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>

del Gaudio, D., Yang, Y., Boggs, B. A., Schmitt, E. S., Lee, J. A., Sahoo, T., Pham, H. T., Wiszniewska, J., Chinault, A. C., Beaudet, A. L. & Eng, C. M. (2008) Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy: enhanced detection of dystrophin gene rearrangements by oligonucleotide array-comparative genomic hybridization. *Hum Mutat* **29**, 1100–1107.

Derwinska, K., Smyk, M., Cooper, M. L., Bader, P., Cheung, S. W. & Stankiewicz, P. (2009) *PTCH1* duplication in a family with microcephaly and mild developmental delay. *Eur J Hum Genet* **17**, 267–271.

des Georges, M., Guittard, C., Templin, C., Altieri, J. P., de Carvalho, C., Ramsay, M. & Claustres, M. (2008) WGA allows the molecular characterization of a novel large *CFTR* rearrangement in a black South African cystic fibrosis patient. *J Mol Diagn* **10**, 544–548.

Dork, T., Macek, M., Jr., Mekus, F., Tummeler, B., Tzountzouris, J., Casals, T., Krebsova, A., Koudova, M., Sakmaryova, I., Macek, M., Sr., Vavrova, V., Zemkova, D., Ginter, E., Petrova, N. V., Ivashchenko, T., Baranov, V., Witt, M., Pogorzelski, A., Bal, J., Zekanowsky, C., Wagner, K., Stuhmann, M., Bauer, I., Seydewitz, H. H., Neumann, T. & Jakubiczka, S. (2000) Characterization of a novel 21-kb deletion, *CFTR*del2,3(21 kb), in the *CFTR* gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet* **106**, 259–268.

Ferec, C., Casals, T., Chuzhanova, N., Macek, M., Jr., Bienvu, T., Holubova, A., King, C., McDevitt, T., Castellani, C., Farrell, P. M., Sheridan, M., Pantaleo, S. J., Loumi, O., Messaoud, T., Cuppens, H., Torricelli, F., Cutting, G. R., Williamson, R., Ramos, M. J., Pignatti, P. F., Raguene, O., Cooper, D. N., Audrezet, M. P. & Chen, J. M. (2006) Gross genomic rearrangements involving deletions in the *CFTR* gene: characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanisms. *Eur J Hum Genet* **14**, 567–576.

Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M. & Tsui, L. C. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**, 1073–1080.

Lerer, I., Laufer-Cahana, A., Rivlin, J. R., Augarten, A. & Abelevich, D. (1999) A large deletion mutation in the *CFTR* gene (3120 + 1Kbdel8.6Kb): a founder mutation in the Palestinian Arabs. Mutation in brief no. 231. Online. *Hum Mutat* **13**, 337.

Morral, N., Nunes, V., Casals, T., Cobos, N., Asensio, O., Dapena, J. & Estivill, X. (1993) Uniparental inheritance of microsatellite

- alleles of the cystic fibrosis gene (*CFTR*): identification of a 50 kilobase deletion. *Hum Mol Genet* **2**, 677–681.
- Niel, F., Martin, J., Dastot-Le Moal, F., Costes, B., Boissier, B., Delattre, V., Goossens, M. & Girodon, E. (2004) Rapid detection of *CFTR* gene rearrangements impacts on genetic counselling in cystic fibrosis. *J Med Gene* **41**, e118.
- Paracchini, V., Seia, M., Coviello, D., Porcaro, L., Costantino, L., Capasso, P., Degiorgio, D., Padoan, R., Corbetta, C., Claut, L., Costantini, D. & Colombo, C. (2008) Molecular and clinical features associated with *CFTR* gene rearrangements in Italian population: identification of a new duplication and recurrent deletions. *Clin Genet* **73**, 346–352.
- Schrijver, I., Rappahahn, K., Pique, L., Kharrazi, M. & Wong, L. J. (2008) Multiplex ligation-dependent probe amplification identification of whole exon and single nucleotide deletions in the *CFTR* gene of Hispanic individuals with cystic fibrosis. *J Mol Diagn* **10**, 368–375.
- Welsh, M. J., Ramsey, B. W., Accurso, F. & Cutting, G. R. (2001) Cystic Fibrosis; in: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. & Valle, D. (eds): *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York, vol III, pp. 5121–5188.
- Zhang, F., Gu, W., Hurler, M. E. & Lupski, J. R. (2009) Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **10**, 451–481.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

Table S1 Primer pairs for *CFTR* and *B2M* genes used in the quantitative real-time PCR assays.

Table S2 Rearrangements chronology in the Spanish CF population.

Figure S1 Quantitative analysis showing the *CFTR* duplication

A) MLPA analysis of a CF patient. Ratios of around 1.4 indicate a copy-number rise including the promoter and exons 1–3.

B) Profiles of exons 1–4 from qPCR analysis. CF sample bearing the duplication of exons 1–3; A, normal sample; B, *CFTR*dele2,3 control; C, calibrator. All samples showed normal exon 4 ratios

As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organised for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

Received: 21 October 2009

Accepted: 19 March 2010

AGRAÏMENTS

Hi ha tants moments. Moments que simplement passen. Moments que passen a càmera lenta. Moments en que desitjaries tenir un comandament per rebobinar o passar endavant ràpidament.

Pausar. Parar.

Llavors hi ha aquells moments que desitjaries reviure cada dia, aquells que no pots creure que els has viscut.

I els hem viscut tots

En primer lloc, els agraïments han de ser per a les persones que més els mereixen, perquè sense elles, res de l'aconseguit hagués estat possible. Qualsevol paraula és insuficient per expressar la meua gratitud però ho intentaré amb aquest petit paràgraf. A l'Àvia per totes les nits de pensió, menjar i riure. Per tots els moments que sense fer soroll has estat i estaràs aquí. Al Dídac, que malgrat se't veu poc i a vegades sembla que no hi siguis, sempre sabrem on trobar-te. Al Yayo, ja fa tretze anys que ens vas deixar, però aquesta tesi també és per tu, per transmetre'ns la teva il·lusió perquè anéssim a la universitat. Mira fins a on hem arribat!!! I a les dues persones més important, el nom de les quals mereixeria estar en aquesta tesi com a co-autors perquè han estat en els bons i els mals moments, han escoltat sense entendre moltes vegades de que parlava i m'han animat en tot moment a seguir endavant. Tot això és gràcies a vosaltres. Moltíssimes gràcies Mama!!! Moltíssimes gràcies Papa!!!

Fa vuit anys, en l'últim de carrera, vaig conèixer el Jorge i la Cristina al departament de biologia de la facultat de Medicina de la UAB. En només dos mesos em van introduir a la recerca, camí que mai abans m'havia plantejat, i em van ensenyar el que era ser becari i viure en un laboratori, però el més important és que sempre que vaig necessitar la seva ajuda i consell hi van ser fins a trobar el meu lloc. Fa anys que no ens veiem però espero que els nostres camins puguin tornar-se a trobar molt aviat En aquest paràgraf no vull oblidar-me de l'Esther, perquè en els més de sis anys que fa que ens coneixem m'has ensenyat el que significa la recerca i la seva duresa per poder arribar a l'excel·lència que tú representes. Espero algun dia poder arribar a aconseguir la meitat del que tú has aconseguit amb el teu esforç, perseverància i amor per la ciència que transmits en cada una de les teves paraules. Moltes gràcies per la teva amistat i per totes les nits de cinema i llargues xerrades de camí cap a casa.

A la Tere, gràcies per l'oportunitat de començar el camí de la recerca. Gràcies per quatre anys de viatge que en ocasions ha estat més planer que en altres, però que m'ha ensenyat a treballar i pensar. Gràcies Loli i Javi per la vostra infinita paciència per ensenyarme a fer PCRs, DGGes, SSCPs. Una vegada i una altra em vas dedicar tot el temps necessari perquè tot sortís bé, malgrat mai vaig aconseguir saber quan el Javi em prenia el pèl. Moltes gràcies als tres.

Uff, hi ha tanta gent al departament de genètica a la qual haig d'agrair no només aquesta tesi sino també totes les experiències viscudes en aquest cinc anys dins i fora del laboratori. En vint-i-sis anys de vida mai havia aconseguit trobar el meu lloc però gràcies a vosaltres l'he trobat en cada conversa, en cada dinar, en cada sopar, en cada activitat extralaboral, en cada moment que he passat amb vosaltres. Per tot això i més moltes gràcies a tots. Intentaré citar-vos a tots, però no sé si ara mateix tindré paraules per cada un de vosaltres. Si no estan aquí espero poder-vos-les transmetre de viva veu. I com em van ensenyar a classe de mates l'ordre no altera el producte.

Javi, todos tenemos defectos y el tuyo es ser madridista, pero eres el mejor madridista que he conocido nunca y seguro que también una de las mejores personas. Gracias por estar ahí, gracias por todas las tardes de freakismo, gracias por todas las conversaciones de baloncesto. Gracias por todo, con más gente como tu todo iría muchísimo mejor. Anna, moltes gràcies per deixar-me compartir amb vosaltres moltes estones. Moltes gràcies a la Mireia i la Lau perquè formeu el millor duo que podria tenir el racó del bieeeeeen!!!! Perquè mai us falta un somriure per ningú. Moltes gràcies a la Montse Rabbits. Moltes gràcies a tot el laboratori de X-Ald sou tots genials però quan us ajunteu encara sou millors. Gràcies Jone, Jorge, Juanjo, Montse, Laia, Nathalie, Cris. Moltes gràcies a l'Itziar, al Sergio, a l'Antonia, a la Marta, a la Ruth, a la Mariona. Moltes gràcies Rut, Sandra, Raquel i Eva. Vosaltres va ser les primeres en compartir amb mi el món de genètica i em va ajudar a donar els primers passos en el laboratori. Txell, moltes gràcies per obrir-me les portes a casa teva, a la teva botiga i a poder compartir nits de poker, partits de bàsquet, viatges a Elche.... Moltes gràcies a l'Eva Serrano. *Querida compi de piso, muchas gracias por compartir conmigo la experiencia de irme por primera vez de casa. Muchas gracias por aguantarme todos estos meses sin rechistar y gracias a Miquel por lo bien que nos cuida cuando viene a verte los fines de semana. Miguel, muchas gracias por todos tus consejos y enseñanzas, por querer llevar la contraria siempre a todo el mundo a la hora de comer, especialmente a Javi, pero sobre todo muchas gracias por darme de desayunar, comer, merendar y cenar, por pasar horas y horas delante del ordenador conmigo desesperada a tu lado para hacer que la maquetación de esta tesis este lista. Sin ti no lo habría conseguido. Muchas gracias a Raquel, por aguantarme sin necesidad ninguna. Laura, muchas gracias por los viajes tan maravillosos que hemos hecho y todas las aventuras que hemos vivido. Argentina nos espera!!!* Clara, gràcies per no callar mai. Per cert, encara no m'has convidat a sopar a casa teva. Gràcies a tots els investigadors que sempre us preocupeu de tots els becaris, gràcies per ajudar-me quan ho he necessitat. Gràcies Sara, Mercé, Virginia, Edu, Julián, Contxi, Josep. Gràcies al departament de genètica per deixar-me espai. Vull agrair també a tota aquella gent que m'he creuat pels passadissos aquests quatre anys i que sempre ha tingut un somriure i un què tal?, Cóm va?. Ara mateix no tinc la capacitat de anomenar-vos a tots perquè segur que em deixaria a algú, però moltes gràcies

Moltes gràcies a la Laura Ruano i al Dr Antoni Álvarez. Sense vosaltres aquesta tesi no s'hagués pogut dur a terme. *Laura y Sara muchas gracias por todas la mañanas que hemos esperado la llegada de pacientes hablando de todo y de nada. Muchas gracias por compartir vuestros filipinos y vuestro espacio.*

Al començament d'aquesta tesi se'm va acudir marxar de vacances solitàries a Andalusia i mai hauria imaginat que aquest seria el començament d'una nova manera de viure el bàsquet. En aquest temps he tingut el plaer de conèixer a molta gent, però tu vas ser la primera i mereixes ser la primera. Meri, malgrat t'escanyaria en moltes ocasions, milions de gràcies per ser com ets, per no callar mai i defensar sempre el que penses, per estar aquí sempre que t'he necessitat i per ensenyar-me que no s'ha de canviar mai qui ets depenent de qui et trobes. Moltes gràcies també a l'Esther, la Marta, la Janet, el Juanfra, l'Ana, el Germán, l'Elena, la Irene, el Víctor, l'Arnau, l'Igor i la Rosa. Gràcies per compartir viatges, victòries, derrotes i el més important l'amistat que he trobat en vosaltres tot aquest temps, perquè el bàsquet només ha estat l'excusa. Gràcies per haver estat el meu millor equip. SeMPRe PeNYA!!!!. Una menció molt especial, al Jordi, la Marga i tots els seus companys de viatge, la Penya Ribas, perquè mai us ha faltat un somriure sempre que us hem donat la tabarra, perquè sempre heu tingut paraules d'ànim, guanyem de 20, io?. Mai oblidar tampoc a tots aquells que han compartit la passió pel bàsquet en altres ciutats i que sempre han tingut paraules d'interès per meva tesi. *Muchas gracias Pili por todos tus mensajes y llamadas desde Vitoria, por tus ánimos y palabras. Has tenido el privilegio de ser, después de mis padres, la primera en saber que esta tesis ya estaba depositada.*

Gràcies a tota la gent del laboratori d'oncologia de St Joan de Déu per la paciència i comprensió que heu tingut amb mi aquest últim any (Patricia, Eva, Cinzia, Ángel, Carla i Carmen). Gemma, un milió de gràcies per les tardes que hem compartit. Gràcies per totes les correccions que han fet que aquesta tesi sigui el que és ara, per les hores que li has dedicat sense cap obligació, sempre tenies la paraula adient quan més falta em feia. Tampoc oblidar-me de les infermeres i auxiliars de la vuitena que m'han convidat a berenar i m'han acollit moltes tardes que ja estava *agobiada* d'escriure. Gràcies a totes.

Per fi he arribat al final. Pensava que la tesi era la part més difícil d'escriure, però després d'aquestes línies, sé que estava molt equivocada. Espero que aquestes paraules aconseguixi'n reflectir en un 10% la meva gratitud a tots vosaltres i a tots aquells que segur he oblidat anomenar però que també ho mereixen.

