

CFTR: Más que un canal de cloro

Dr. Luis E. Vega-Briceño

Pediatra Broncopulmonar

Hospital Padre Hurtado

Resumen

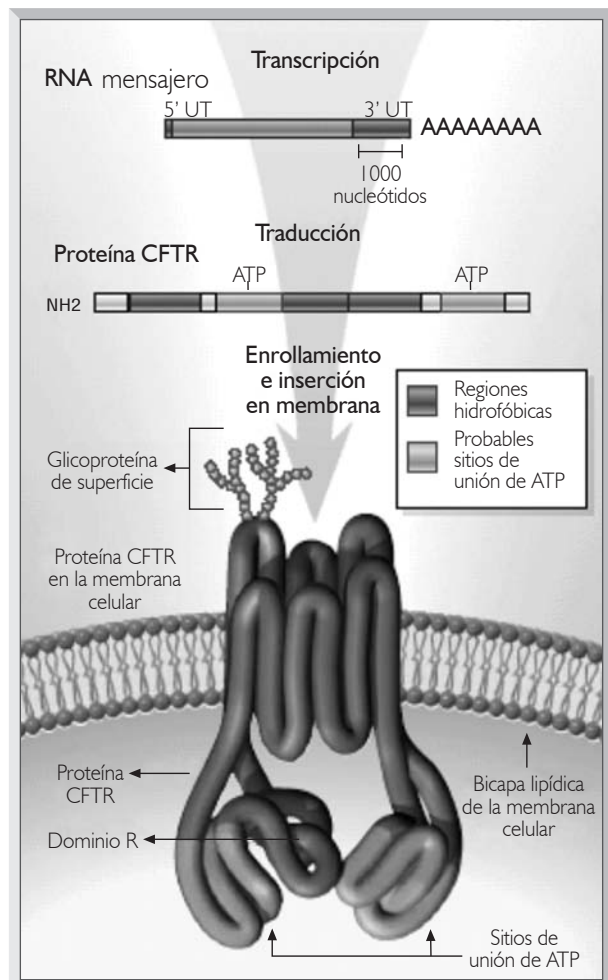
Los avances en torno al conocimiento de la proteína de regulación de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) han permitido entender mejor la fisiopatología de ésta enfermedad y la compleja relación genotipo-fenotipo. Hoy se han reportado más de 1710 mutaciones distintas de ésta proteína; sin embargo, sólo algunas de ellas se asocian a enfermedad respiratoria. Se reconoce que CFTR es responsable de la adecuada secreción y absorción de electrolitos a través del epitelio (no sólo respiratorio); y por ello, la enfermedad se caracteriza por una secreción defectuosa de Cl^- epitelial y una absorción de Na^+ aumentada. Estudios recientes muestran que el CFTR interactúa con otras proteínas a través de los dominios PDZ. El rol de la proteína CFTR en muchas condiciones específicas es motivo de investigación actualmente.

Palabras Claves: CFTR, fibrosis quística, canales de sodio, canales de cloro.

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva letal más frecuente en la raza caucásica. Su evolución crónica, progresiva y compromiso multisistémico presenta grandes variaciones fenotípicas entre individuos afectados. Si bien es cierto que existe un incremento en el número de casos reportados en Chile en la última década, el promedio de supervivencia aún no es ni siquiera la mitad de lo reportado en Estados Unidos o Europa⁽¹⁾. Un avance importante en el entendimiento de la FQ fue sin lugar a dudas la clonación del gen en 1989⁽²⁾. Este gen se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 7 y codifica una proteína de 1480 aminoácidos denominada CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) situada en la porción apical de la membrana de las células epiteliales, que se expresa en las células secretoras, senos paranasales, pulmones, páncreas, hígado y tracto reproductivo (Figura 1).

La proteína CFTR fue descrita inicialmente como un canal de cloro (Cl^-) regulado por AMPc y la proteinquinasa A (PKA). Se reconoce que CFTR es un regulador de otros canales iónicos⁽³⁻⁵⁾ (Figura 2). En células epiteliales normales sin FQ y en células recombinantes que sobreexpresan CFTR, las grandes corrientes de Cl^- , a través de la membrana, son activadas con el incremento en el AMPc intracelular. En registros de canales individuales con la técnica patch-clamp (pinzamiento), se observan corrientes de Cl^- dependientes de CFTR de baja conductancia que no pueden ser detectadas en células epiteliales provenientes de pacientes con FQ. La proteína CFTR se expresa en la porción luminal de las membranas de epitelios secretores y de absorción, y cumple un rol predominante en la secreción de electrolitos activada

Figura 1.- Representación gráfica de la proteína CFTR en la membrana celular



Tomado de Rev Chil Pediatr 2005; 76:464-70.

Correspondencia: Dr. Luis E. Vega-Briceño. Pediatra Broncopulmonar, Hospital Padre Hurtado. Calle Lira 85 6to piso, Santiago centro. Chile. E-mail: levega@puc.cl

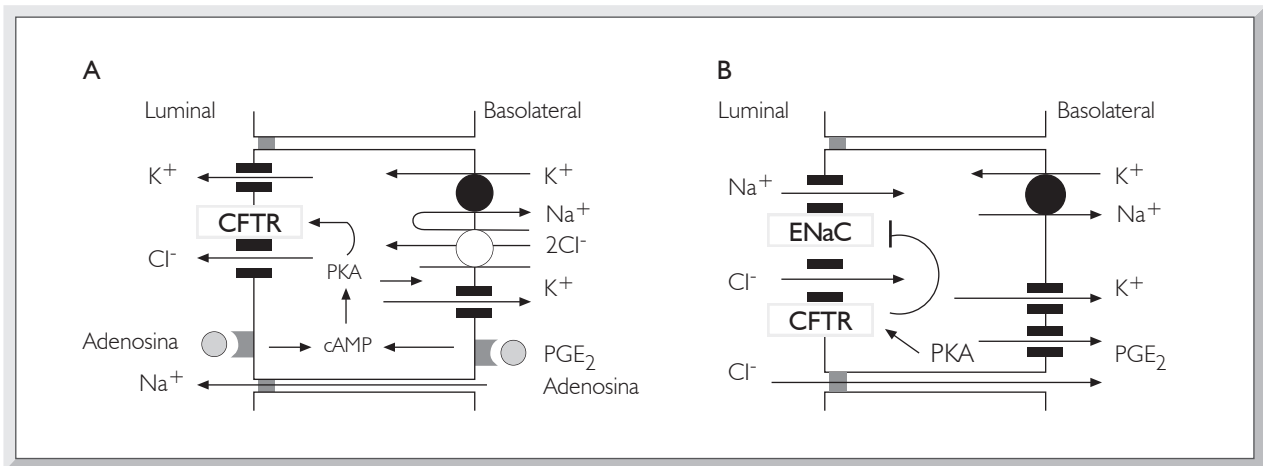


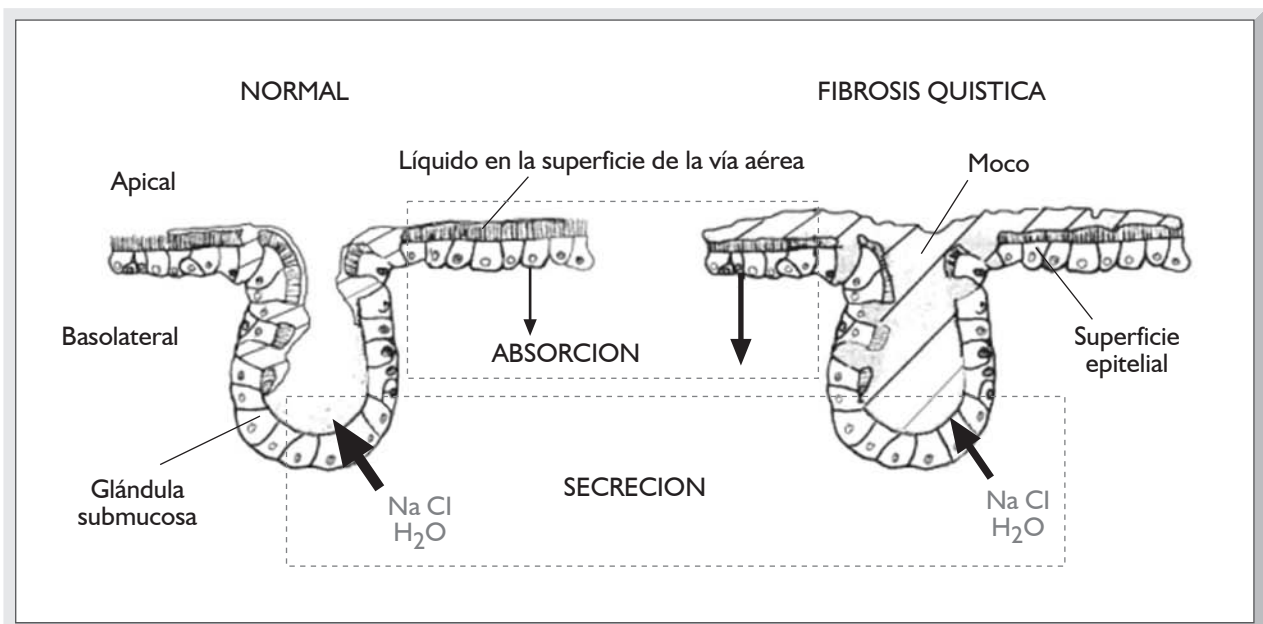
FIGURA 2.- Modelos celulares de secreción de electrolitos y absorción de electrolitos en las vías aéreas y epitelio intestinal. A) En las células secretoras, el Cl^- es captado por el lado basolateral (sangre) por el cotransportador $Na^+-K^+-2Cl^-$. El K^+ se recicla mediante los canales K^+ basolaterales y el Na^+ es bombeado fuera de la célula por la $Na^+-K^+-ATPasa$. El Cl^- abandona la célula a través de los canales Cl^- luminales de CFTR (apical), y el Na^+ es secretado mediante el shunt paracelular. El K^+ también es secretado al lado luminal a través de canales K^+ . Dependiendo del tejido, el $cAMP$ intracelular es aumentado y la secreción es activada por adenosina o prostaglandina E2 (PGE_2). B) En células epiteliales de absorción, el Na^+ es captado por canales Na^+ epiteliales luminales (ENaC). El Cl^- es transportado mediante el shunt basolateral y probablemente a través de los canales Cl^- CFTR. El Na^+ es bombeado fuera de la célula por la $Na^+-K^+-ATPasa$ basolateral, mientras que el Cl^- y K^+ abandonan la célula a través de los canales Cl^- y K^+ , respectivamente. En estas células epiteliales de absorción que coexpresan CFTR y ENaC, la estimulación del CFTR lleva a la inhibición del ENaC.

por AMPc y calcio (Ca^{2+}) intracelular. CFTR constituye la vía de salida luminal para Cl^- , el que ha sido captado por el cotransportador $Na^+-K^+-2Cl^-$ ⁽³⁾. Además de su función secretora, el CFTR también regula la función de electrolitos al controlar la actividad del canal de Na^+ epitelial (ENaC) en células epiteliales de absorción del colon, vías aéreas y conductos sudoríparos (Figura 2). Al contrario del colon y las vías aéreas, en los cuales el CFTR tiene un efecto inhibitorio sobre la activación de ENaC con la activación por PKA, el CFTR es necesario para la activación de ENaC en los conductos sudoríparos⁽⁶⁾.

Secreción defectuosa de Cl^- y absorción de Na^+ aumentada en FQ

La forma de interacción de CFTR con ENaC y otros canales iónicos aún es desconocida y continúa bajo investigación⁽⁷⁾. Dado que los defectos en CFTR llevan a una regulación defectuosa del canal ENaC, la FQ se caracteriza por alteraciones en la secreción y absorción de electrolitos. En relación con la enfermedad pulmonar de riesgo vital en pacientes con FQ, se han descrito dos mecanismos fisiopatológicos importantes: 1) la secreción alterada de Cl^- , la cual se localiza de

Figura 3.- Actividad de la proteína CFTR en la membrana celular del humano



preferencia en las glándulas submucosas y 2) la absorción aumentada de $\text{Na}^{(8)}$ y la consecuente hiperabsorción de electrolitos, la cual ocurre en el epitelio superficial (Figura 3). En las vías aéreas normales, el transporte iónico cambia desde una absorción neta bajo condiciones de reposo a una secreción neta cuando se expone a secretagogos. Sin embargo, las vías aéreas en pacientes con FQ son incapaces de aumentar su transporte secretor con estimulación. Por el contrario, la conductancia de Na^+ epitelial aumentada en membranas apicales, en forma paralela a una permeabilidad paracelular para Cl^- y la elevada permeabilidad al agua no permite gradientes osmóticos transepiteliales mayores, lo que lleva a hiperabsorción en los epitelios FQ⁽⁹⁾. Por lo tanto, la capa de líquido superficial de la vía aérea (ASL) disminuye, las glándulas mucosas ya no son despejadas del mucus y el clearance mucociliar se ve fuertemente alterado en las vías aéreas con FQ. La expresión clínica de la FQ es causada por una gran cantidad de mutaciones distintas que afectan la función del CFTR en diferentes vías^(9,10). El objetivo de muchas nuevas terapias apunta a contrarrestar el efecto deletéreo de estas mutaciones recuperando al menos la actividad parcial del canal Cl^- dependiente de CFTR.

Existe algo que no sea afectado por CFTR?

La FQ se caracteriza por una variedad de síntomas. La razón de ello es explicada por el hecho que todos los tipos de tejidos epiteliales son afectados (Tabla 1). Algunos síntomas y defectos celulares se deben a una regulación defectuosa de otros procesos (diversos) de transporte de membranas y proteínas celulares independientes de CFTR⁽⁷⁾. Hasta ahora,

el mejor ejemplo estudiado es el impacto negativo del CFTR en la conductancia del Na^+ epitelial. La regulación de los canales ENaC por CFTR ha sido estudiada en detalle en tejidos epiteliales del intestino y tráquea, al igual que en células renales. Se ha demostrado que el primer pliegue de unión de nucleótidos funcional (NBF1) es un requisito para la regulación de ENaC por CFTR⁽¹¹⁾. De acuerdo a este concepto, otras interacciones de CFTR también se basan en un NBF1 intacto (Tabla 1). Se han presentado diversas hipótesis sobre la forma en que CFTR podría controlar la actividad de los canales ENaC⁽³⁾. Existen hallazgos que sugieren que el transporte de Cl^- causado por la actividad CFTR, o finalmente, los cambios locales de la concentración de Cl^- en la proximidad inmediata a la membrana plasmática, están causando la inhibición del canal de Na^+ . Dicho mecanismo recuerda la llamada retroalimentación de Na^+ en epitelios que absorben Na^+ , la cual ha sido conocida durante largo tiempo y para la cual los detalles moleculares se encuentra actualmente bajo investigación⁽¹²⁾. En forma alternativa, podría ser la captación celular de Na^+ , la cual está fuertemente unida a la de Cl^- , lo que está causando la inhibición.

Cabe destacar que la inhibición de ENaC por CFTR no está presente en el epitelio de los conductos sudoríparos⁽⁶⁾. Al contrario del colon y vías aéreas, el conducto sudoríparo se dedica exclusivamente a la absorción de electrolitos e incluso requiere el CFTR para la activación de ENaC. Por lo tanto, las conductancias de Cl^- y Na^+ son bajas en la membrana apical del conducto sudoríparo de pacientes con FQ. Esta diferencia esencial entre ambos tipos de epitelios podría reflejar una expresión diferencial de proteínas accesorias necesarias para la interacción CFTR/ENaC. Las respectivas proteínas finalmente interactúan mediante los dominios PDZ.

Tabla 1.- Resumen de las interacciones del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística con otras proteínas transportadoras

Proteína transportadora afectada	Interacción	NBEI requerido
EnaC	Inhibición de EnaC	Si
Intercambiador Na^+/H^+	Inhibición del intercambiador de Na^+/H^+	?
Intercambiador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$	Activación del intercambiador de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$?
Canales Cl^- - ICOR	Activación de ICOR, otorgando sensibilidad a glibenclamida	Si
Canales Cl^- activados por Ca^{2+} y volumen	Activación/inhibición de canales Cl^- activados por Ca^{2+} e inflamación	Si
ROMK2, Kir6.1	Otorga sensibilidad a glibenclamida a ROMK2 y Kir6.1	Si
KLQTI	Activación de KLQTI en ovocitos	Si
AQP3	Activación de AQP3	Si
Canales de empalme de hendiduras	Activación de empalmes de hendiduras	?
Secreción de mucus	Exocitosis y secreción de mucus	?
Transporte de ATP	Liberación de ATP por células epiteliales	Si
Transporte de glutatión	Activación del flujo de glutatión	?

NBF1: dominio de unión a nucleótidos; ENaC: canal Na^+ epitelial; ICOR: canal Cl^- rectificador externo de conductancia intermedia; ROMK2: canal H^+ de nefrona distal de rata; KLQTI: canal N^+ dependiente de voltaje de activación retardada; AQP: canal de agua o aquaporina.

El CFTR se comunica mediante los dominios PDZ

Recientemente algunos investigadores mostraron gran interés en una extensión breve de aminoácidos en el extremo terminal COOH de CFTR. Estos cuatro aminoácidos forman un grupo común para interacción proteica denominada dominio de unión a PDZ⁽¹³⁾. Respecto a esto, había controversia sobre si CFTR funciona como un monómero, formando de esta manera canales de Cl⁻ individuales, o si la unidad conductora está compuesta de dos o incluso más proteínas CFTR⁽¹⁴⁾.

Durante los últimos años se ha obtenido información consistente con el modelo CFTR como canal monomérico. Otras observaciones implican una posible interacción CFTR-CFTR homomérica y la formación de dímeros de proteínas. La hipótesis del dímero fue reforzada recientemente mediante la clonación de la proteína de unión a CFTR multivalente CAP70, una proteína asociada a CFTR de 70 kDa que se expresa principalmente en riñón e intestino delgado. Se observó además que CAP70 se localiza en membranas celulares de células cultivadas de epitelio de vías aéreas⁽¹⁵⁾. La CAP70 contiene cuatro dominios PDZ y podría usar dos de estos dominios, PDZ3 y PDZ4, para unir entre sí las dos proteínas CFTR.

De manera interesante, la dimerización del CFTR por CAP70 no tuvo impacto en la conductancia de canales individuales pero aumentó la probabilidad abierta del canal Cl⁻ dependiente de CFTR y por lo tanto potenció la corriente Cl⁻ de este canal (Figura 4). En consecuencia, el canal CFTR

podría formar dímeros de transición con mayor actividad del canal Cl⁻, lo que representa una novedosa forma de regular la actividad de los transportadores cassette de unión a ATP. Existe escasa evidencia que demuestre si dicha interacción reguladora realmente ocurre en el epitelio en estado natural.

Los estudios futuros tendrán que demostrar además la forma en que CAP70 compite con otras proteínas del dominio PDZ para la unión al terminal COOH de CFTR. La fosfoproteína 50 de unión a ezrina (EBP50) fue la primera proteína informada en unirse al terminal COOH de CFTR⁽¹⁶⁾. La EBP50 está localizada en membranas apicales de células epiteliales de la vía aérea junto con CFTR. Aunque todavía no se entrega una prueba experimental definitiva para la función *in vivo*, la ezrina podría actuar como una proteína de anclaje de quinasa A.

De esta forma, se ha atribuido un rol crucial a estas proteínas del dominio de unión PDZ en la translocación de PKA a la membrana plasmática y en la proximidad inmediata al CFTR (Figura 4). Esta red de proteínas permitiría la activación eficiente de CFTR mediante un aumento en el cAMP intracelular y la fosforilación dependiente de PKA⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Será interesante observar el impacto cuantitativo de estas proteínas en el dominio de unión a PDZ sobre la activación de CFTR dependiente de PKA. Al menos en los ovocitos de *Xenopus*, se observó que la PKA es capaz de activar el CFTR, incluso en ausencia de este dominio de unión a PDZ⁽¹⁹⁾.

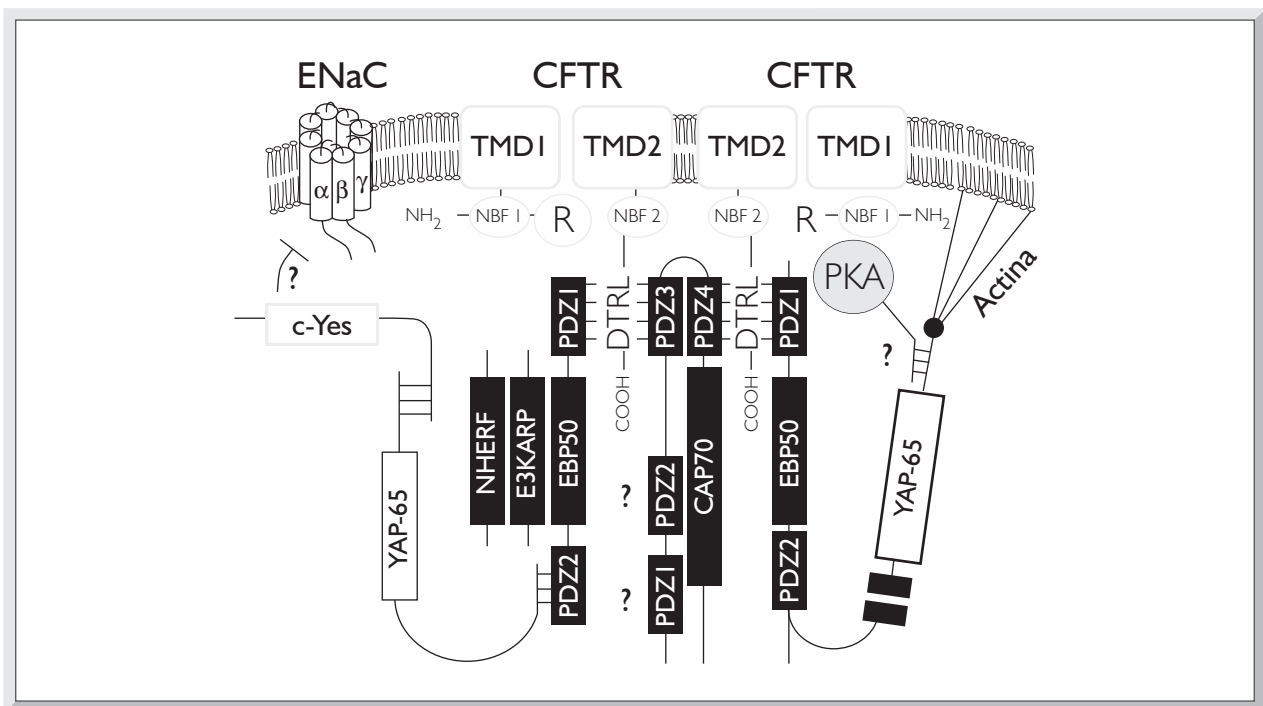


FIGURA 4.- Función postulada de las proteínas del dominio PDZ en regular la actividad CFTR y la participación en la regulación de ENaC dependiente de CFTR. Se muestra el ordenamiento hipotético de CFTR, ENaC y proteínas accesorias del dominio PDZ. Proteínas del dominio PDZ tales como CAP70, factor de regulador de intercambio Na⁺/H⁺ (NHERF), proteína 50 de unión a ezrina (EBP50), o bien la proteína reguladora de quinasa A tipo 3 de intercambio Na⁺/H⁺ (E3KARP) podrían estar involucradas en la regulación de la actividad CFTR mediante la formación de dímeros CFTR-CFTR, anclaje citoesquelético de CFTR o bien fosforilación de CFTR dependiente de la proteinquinasa A (PKA). La interacción con otras proteínas de membrana como el ENaC podría estar mediada por quinasa no de receptores que se unen a estas proteínas del dominio PDZ. NBF: pliegue de unión de nucleótido; YAP: proteína asociada a Yes.

Interacción del CFTR con otros canales iónicos vía dominios PDZ

Se ha observado que otras proteínas PDZ relacionadas con EBP50 se unen a CFTR, por ejemplo el factor regulador de intercambio Na^+/H^+ (NHERF) y la proteína reguladora de quinasa A tipo 3 intercambiadora de Na^+/H^+ . Se ha demostrado que, además de su capacidad para reclutar ezrina y probablemente PKA a la membrana apical, estas proteínas estructurales anclan el CFTR a la membrana apical vía ezrina y la interacción con el citoesqueleto de actina^(8,18). Es interesante observar que algunas proteínas de receptor, como el receptor β_2 -adrenérgico o el receptor P2Y1 purinérgico, también se unen a las proteínas del dominio PDZ. Por lo tanto, estas proteínas portadoras de PDZ representan una familia de proteínas adaptadoras multifuncionales que están potencialmente involucradas en muchos aspectos de la señalización intracelular⁽²⁰⁾.

En este sentido, las proteínas estructurales portadoras de PDZ podrían ofrecer una forma de explicar el modo en que CFTR controla la actividad de otros canales iónicos como el ENaC (Figura 4). Se ha observado que EBP50 interactúa con la proteína asociada a Yes YAP65 que recluta c-Yes a la membrana plasmática apical. La tirosinquinasa no de receptor c-Yes y otras quinasas de la familia Src son conocidas por regular la actividad de canales iónicos⁽²¹⁾.

La regulación del ENaC (y otros canales iónicos) podría ocurrir mediante la fosforilación por dichas quinasas y no de receptores. Sin embargo, en la actualidad no existe evidencia que estos mecanismos reguladores estén presentes en células intactas. La activación de CFTR fue sólo levemente estimulada después de la coexpresión con NHERF y ezrina en ovocitos de *Xenopus*⁽¹⁸⁾. Además, los datos sugieren que el reconocimiento de membranas y la activación de CFTR dependiente de cAMP ocurre en ovocitos de *Xenopus*, incluso con un CFTR truncado en el terminal COOH y no es alterado cuando NHERF1 o NHERF2 (mutados) son coexpresados junto con CFTR y ENaC en ovocitos de *Xenopus*⁽¹⁹⁾.

Un modelo atractivo sería el de agrupaciones de proteínas funcionalmente relacionadas organizadas en microdominios de membrana. Estas agrupaciones incluirían todos los elementos requeridos para el transporte de membranas y transducción de señales, y por lo tanto la regulación e interacción de canales iónicos y receptores. La expresión diferencial de proteínas del dominio PDZ y la unión preferencial a ciertos grupos PDZ podría permitir la posibilidad de regulación diferencial en diversos tipos celulares. Esto podría explicar el tipo distinto de interacción entre CFTR y ENaC en vías aéreas/colon y conductos sudoríparos. En consecuencia, faltan más investigaciones para comprender la contribución de estas proteínas del dominio PDZ a la regulación dependiente de CFTR, especialmente en la célula epitelial en estado natural.

REFERENCIAS

- 1.- Cystic Fibrosis Foundation. Cystic fibrosis Foundation Patient Registry Annual Report 2000. Bethesda: Cystic Fibrosis Foundation, 2001.
- 2.- Rommens J, Iannuzzi M, Kerem B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059-65.
- 3.- Kunzelmann K. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its function in epithelial transport. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999; 137: 1-70.
- 4.- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavics N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-73.
- 5.- Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev* 1999; 79(1 Suppl): S145-66.
- 6.- Reddy MM, Light MJ, Quinton PM. Activation of the epithelial Na^+ channel (ENaC) requires CFTR Cl^- channel function. *Nature* 1999; 402: 301-4.
- 7.- Kunzelmann K, Schreiber R. CFTR, a regulator of channels. *J Membr Biol* 1999; 168: 1-8.
- 8.- Matsui H, Davis CW, Tarran R, Boucher RC. Osmotic water permeabilities of cultured, well-differentiated normal and cystic fibrosis airway epithelia. *J Clin Invest* 2000; 105: 1419-27.
- 9.- Tsui LC, Durie P. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Hosp Pract* 1997; 15: 115-42.
- 10.- Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993; 73: 1251-4.
- 11.- Schreiber R, Hopf A, Mall M, Greger R, Kunzelmann K. The first-nucleotide binding domain of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na^+ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5310-5.
- 12.- Komwatana P, Dinudom A, Young JA, Cook DI. Cytosolic Na^+ controls and epithelial Na^+ channel via the Go guanine nucleotide-binding regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 8107-11.
- 13.- Wang S, Raab RW, Schatz PJ, Guggino WB, Li M. Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett* 1998; 427: 103-8.
- 14.- Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 1999; 79(1 Suppl): S23-45.
- 15.- Wang S, Yue H, Derin RB, Guggino WB, Li M. Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* 2000; 103: 169-79.
- 16.- Short DB, Trotter KW, Reczek D, Kreda SM, Bretscher A, Boucher RC, Stutts MJ, Milgram SL. An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998; 273: 19797-801.
- 17.- Sun F, Hug MJ, Bradbury NA, Frizzell RA. Protein kinase A associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via an interaction with ezrin. *J Biol Chem* 2000; 275: 14360-6.
- 18.- Sun F, Hug MJ, Lewarchik CM, Yun CH, Bradbury NA, Frizzell RA. E3KARP mediates the association of ezrin and protein kinase A with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 29539-46.
- 19.- Kunzelmann K, Schreiber R, Boucherot A. Mechanisms of the inhibition of epithelial Na^+ channels by CFTR and purinergic stimulation. *Kidney Int* 2001; 60: 455-61.
- 20.- Hall RA, Ostedgaard LS, Premont RT, Blitzer JT, Rahman N, Welsh MJ, Lefkowitz RJ. A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na^+/H^+ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 8496-501.
- 21.- Mohler PJ, Kreda SM, Boucher RC, Sudol M, Stutts MJ, Milgram SL. Yes-associated protein 65 localizes p62(c-Yes) to the apical compartment of airway epithelia by association with EBP50. *J Cell Biol* 1999; 147: 879-90.