



TESIS DOCTORAL

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DEL
CANAL TRPV4 EN EL EPITELIO RESPIRATORIO Y SU
RELACIÓN CON LA FISIOPATOLOGÍA DE LA
FIBROSIS QUÍSTICA”**

MAITE ARNIGES GÓMEZ

BARCELONA, 2006

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL
DEL CANAL TRPV4 EN EL EPITELIO
RESPIRATORIO Y SU RELACIÓN CON LA
FISIOPATOLOGÍA DE LA FIBROSIS QUÍSTICA”**



**Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida
Departament de Ciències Experimentals i de la Salut
Grup de Canalopaties i Fisiologia Molecular**

TESIS DOCTORAL

**Programa de doctorado en *Ciències de la
Salut i la Vida, bienni 2001-2003***

**Memoria presentada por
MAITE ARNIGES GÓMEZ
para optar al grado de Doctor**

**DIRECTORES:
Miguel Ángel Valverde de Castro
Esther Vázquez Gómez**

Barcelona, 2006

Dipòsit legal: B.22392-2007
ISBN: 978-84-690-7818-1



D. Miguel Valverde de Castro, Catedrático de la Universidad Pompeu Fabra, y Dña. Esther Vázquez Gómez, Profesora Lector de la Universidad Pompeu Fabra,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada **“Caracterización molecular y funcional del canal TRPV4 en el epitelio respiratorio y su relación con la fisiopatología de la fibrosis quística”**, presentada por Maite Arniges Gómez, Licenciada en Biología y en Bioquímica por la Universidad de Barcelona, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser juzgada, autorizando su presentación para optar al grado de Doctor por la *Universitat Pompeu Fabra*.

Miguel Angel Valverde de Castro

Esther Vazquez Gómez

Barcelona, 18 de mayo de 2006

*Als meus pares,
a en Jordi i
a la Laia,*

Voldria agrair a tots aquells que durant aquests quatre anys han estat al meu costat compartint i disfrutant aquesta dura experiència. Sense el vostre suport científic, econòmic i/o personal aquesta tesis no haguès estat possible. Per això, moltíssimes gràcies a tots!!!!!!

"La ciencia es maravillosa si uno no tiene que ganarse la vida con ella."

"Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas."

"Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo"

Albert Einstein

Abreviaturas

4 α -PDD: 4 α -forbol 12,13-didecanoato

aa: aminoácido

AA: ácido araquidónico

AEA: anandamida

ANK: anquirina

ASL: *airway surface liquid*

BK_{Ca}: *big conductance Ca²⁺ dependent K⁺*

CaCC: *calcium activated chloride channels*

CFBE: *cystic fibrosis bronquial epithelial*

CFT1: *cystic fibrosis transmembrane clon 1*

CFTR: *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*

citP450: citocromo P450

CPL: capa de líquido periciliar

DTM: dominios transmembrana

ECFP: *enhanced cyan fluorescent protein*

EET: ácidos epoxieicosatrienoicos

EYFP: *enhanced yellow fluorescent protein*

ENaC: *epithelial Na⁺ channel*

ERAD: *ER associated degradation*

ERGIC: *endoplasmic reticulum golgi intermediate compartment*

FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

FQ: Fibrosis Quística

HEK: *human embryonic kidney*

HBE: *human bronquial epithelial*

hIK: *human intermediate conductance*

HTE: *human tracheal epithelial*

IK_{Ca}: *intermediate conductance Ca²⁺ dependent K⁺*

IP: insuficiencia pancreática

NHERF: *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor*

NO: *nitric oxide*

pb: pares de bases

PLA₂: fosfolipasa A2

PMA: forbol 12-miristato, 13-acetato

RACK1: *receptor for activated C-kinase 1*
RE: *retículo endoplasmático*
RT-PCR: *revers transcriptase polimerase chain reaction*
RVD: *regulatory volume decrease*
RVI: *regulatory volume increase*
SA: *stretch-activated*
SOC: *store-operated calcium*
TK: *tirosín quinasas*
TRP: *Transient Receptor Potencial*
TRPV4: *Transient Receptor Potencial Vanilloid 4*
VSOAC: *volume-sensitive organic osmolyte-anion channels*
wt: *wild type*

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	5
1.- REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR	7
1.1.- Principios de la regulación del volumen celular	7
1.1.1.-Procesos reguladores del volumen celular	8
1.1.1.1.-¿Qué es la RVD?	8
1.1.1.2.-¿Qué es la RVI?	9
1.2.- Mecanismos moleculares que participan en la RVD	11
1.2.1.- Los sistemas sensores del volumen celular	11
1.2.2.- Vías de señalización implicadas en la RVD: el papel del Ca^{2+}	13
1.2.2.1.- Fosforilación de proteínas	13
1.2.2.2.- Metabolismo lipídico	14
1.2.2.3.- ATP y receptores purinérgicos	15
1.2.3.1.- El calcio	15
1.2.3.- Mecanismos efectores	16
1.2.3.1.- Cotransportador de K^+ - Cl^-	16
1.2.3.2.- Canales de Cl^-	17
1.2.3.3.- Canales de K^+	17
2.- EL CANAL TRPV4	18
2.1.- La familia de los TRP	18
2.1.1.- Biogénesis de los canales TRP	21
2.1.2.- La subfamilia de los vaniloideos	25
2.1.3.- El canal TRPV4	27
2.1.3.1.- Relación estructura-función del canal TRPV4	28
2.1.3.2.- Activación por ligandos	30
2.1.3.3.- Activación por temperatura	31
2.1.3.4.- Activación por hipotonicidad	32
3.- LA FIBROSIS QUÍSTICA	34
3.1.- Perspectiva histórica de la Fibrosis quística	34
3.2.- CFTR: gen y proteína	35
3.2.1.- Mutaciones en el gen de la CFTR: el caso de la $\Delta 508\text{F}$	36
3.3.- Patogénesis de la Fibrosis quística	37

3.3.1.- Glándulas sudoríparas	38
3.3.2.- Tracto digestivo	38
3.3.3.- Aparato reproductor	39
3.3.4.- Vías respiratorias	39
4.- ANTECEDENTES	46
II. OBJETIVOS	49
1.- General	51
2.- Específicos	51
III. RESULTADOS	53
Capítulo I.- "Swelling-activated Ca²⁺ entry via TRPV4 channel is defective in cystic fibrosis airway epithelia"	55
Capítulo II.- "Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking"	65
Capítulo III.	
1.- Estudio del canal TRPV4 en células HBE y HTE y su relación con el proceso de RVD en estas células	75
1.1.- RVD en células de epitelio respiratorio HBE y HTE	75
1.2.- Variaciones de Ca ²⁺ en respuesta al estímulo hipotónico en las células HBE y HTE	76
1.3.- Expresión funcional del canal TRPV4 en las líneas celulares HTE y HBE	77
1.3.1.- RT-PCR	78
1.3.2.- Medidas de Ca ²⁺ intracelulares	78
2.- Estudio del mecanismo de regulación del canal CFTR sobre el TRPV4 durante la RVD	80
2.1.- Evaluación de la interacción entre el canal CFTR y el TRPV4	80

2.1.1.- Generación de plásmidos	80
2.1.2.- Estudios de colocalización	80
2.1.3.- Estudios de FRET	82
Anexo I.- "TRPV4 channel is involved in the coupling of fluid viscosity changes to epithelial ciliary activity "	83
IV. DISCUSIÓN	92
V. CONCLUSIONES	111
VI. BIBLIOGRAFÍA	115

I

Introducción

1. REGULACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR

1.1 Principios de la regulación del volumen celular

El mantenimiento del volumen celular es fundamental para la viabilidad de las células ya que no sólo define su forma y la osmolalidad intracelular sino que también gobierna otras funciones celulares como por ejemplo el crecimiento, la migración, la diferenciación y la muerte celular, el metabolismo intracelular, el transporte epitelial, la liberación de hormonas y la excitabilidad celular (1;2).

La membrana plasmática se comporta como un osmómetro celular ya que es altamente permeable al agua y poco permeable a otros solutos orgánicos e inorgánicos que actúan de osmolitos celulares. Por ello, un cambio en la osmolaridad extracelular (cambio anisomótico) o un cambio del contenido intracelular (cambio isomótico) produce un flujo vectorial de agua para reestablecer la diferencia de presión osmótica generada a ambos lados de la membrana. Esta difusión que conduce al agua a su punto de equilibrio termodinámico, induce cambios substanciales en el volumen celular frente a los cuales las células animales han desarrollado mecanismos específicos para reestablecer el volumen inicial y no comprometer su función celular (1). Algunos organismos inferiores como las bacterias, las levaduras y las plantas han desarrollado estructuras membranales complejas con paredes extracelulares rígidas que ejercen una presión hidrostática adicional, permitiéndoles resistir diferencias de presión osmótica importantes sin la necesidad de modificar el volumen celular (2). La expresión matemática que define el flujo de agua a través de las membranas celulares queda recogida en el cuadro siguiente:

Cuadro 1: Flujo del agua a través de las membranas celulares frente a perturbaciones osmóticas

El flujo de agua a través de la membrana J_v , depende de la diferencia entre la presión hidrostática ΔP y la presión osmótica $\Delta\pi$ y es directamente proporcional al coeficiente de conductividad hidráulica L_p de la membrana (valor de conductividad al agua específico para cada membrana). Las membranas de las células animales no generan ni mantienen presiones hidrostáticas elevadas así que el componente $\Delta P \rightarrow 0$ y el flujo de agua viene dictado por el componente osmótico $\Delta\pi$, es decir, por la diferencia de concentraciones de los solutos i a uno y otro lado de la membrana ΔC_i .

$$J_v = L_p(\Delta P - \Delta\pi) \quad \Delta\pi = RT\Delta C_i$$

Medio isotónico:

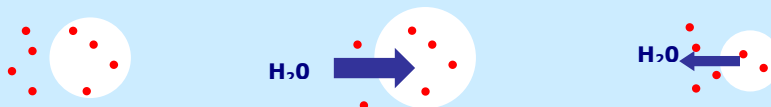
$$C_i = C_e \quad \Delta\pi = 0 \quad J_v = 0$$

Medio hipotónico:

$$C_i > C_e \rightarrow \Delta\pi > 0 \quad J_v < 0$$

Medio hipertónico:

$$C_i < C_e \rightarrow \Delta\pi < 0 \quad J_v > 0$$



En condiciones isotónicas, el mantenimiento del volumen celular constante (*steady state volume*) se consigue gracias al balance entre las vías de flujo pasivas activas en condiciones de reposo y la actividad de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (mecanismo de *pump and leak*) (3), cuyo funcionamiento permite mantener el gradiente electroquímico a través de la membrana necesario para el cotransporte y acumulación de proteínas, azúcares y aminoácidos indispensables para las funciones metabólicas celulares, contrarrestando con la extrusión de iones de Na^+ (ion para el cual la membrana es altamente impermeable) la más elevada presión osmótica existente en el interior celular debida a la acumulación de estos osmolitos orgánicos (2).

En los organismos superiores la mayoría de las células difícilmente se ven expuestas a cambios substanciales en la tonicidad del medio ya que la osmolaridad del plasma está finamente regulada por la función renal (2). No obstante, existen algunas excepciones a esta generalización: 1) las propias células de la médula renal que se exponen a concentraciones cuatro veces superiores a la osmolaridad del plasma, 2) las células sanguíneas (hematíes, leucocitos...) cuando circulan a través del riñón y 3) las células que se encuentran formando parte de algunos revestimientos epiteliales, como p. ej. el epitelio intestinal cuya osmolaridad extracelular se ve aumentada después de una ingesta o diluída por una ingesta excesiva de agua y el epitelio respiratorio, la cara luminal del cual está recubierta por un líquido llamado ASL (*airway surface liquid*; véase apartado II de la introducción) que modifica su tonicidad según las condiciones ambientales: una ventilación fría o seca lo vuelve hipertónico mientras que una ventilación húmeda lo vuelve hipotónico (4). Ante estas situaciones, las células han desarrollado mecanismos que les permiten responder a estas variaciones de volumen y recuperar su estado inicial.

1.1.1. Procesos reguladores del volumen celular: RVD y RVI

1.1.1.1. ¿Qué es la RVD?

Cuando una célula se expone a condiciones externas de hipotonicidad se produce un hinchamiento celular debido al aumento del contenido de agua que ha difundido pasivamente desde el exterior. La estrategia desarrollada por la célula para recuperar el volumen inicial, conocida como RVD (disminución del volumen reguladora o del inglés *regulatory volume decrease*) (fig.1A), se basa en incrementar la permeabilidad de la membrana celular a determinados osmolitos

celulares, activando sistemas de transporte que permiten la pérdida de estos osmolitos lo que reduce transitoriamente la osmolaridad intracelular y consiguientemente facilita el movimiento de salida de agua que les acompaña (1;3;5). En la mayoría de células animales la RVD acontece con la pérdida de KCl a través de la activación paralela de canales de K^+ y canales de Cl^- independientes o bien, en algunos casos, de la activación del cotransportador de K^+-Cl^- tal y como muestra la figura 2 (6).

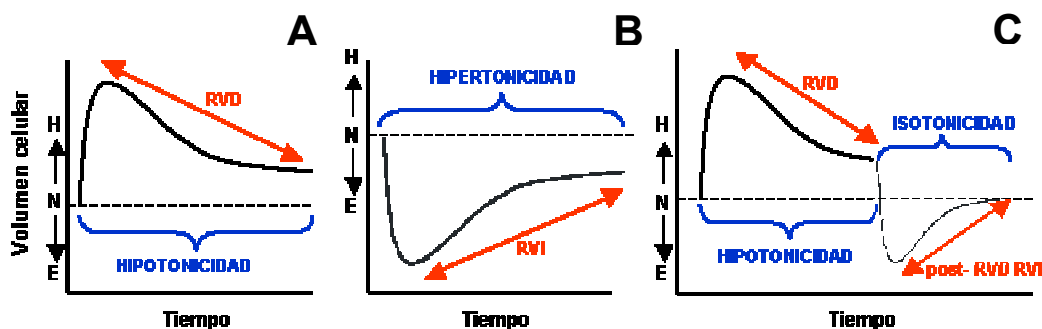


Figura 1. Representación esquemática de las variaciones del volumen celular frente a exposiciones anisotónicas. A) Hinchamiento (H) pasivo (1-2 min) debido al flujo de agua osmótica y posterior recuperación del volumen celular (RVD, 10-30 min) que experimenta una célula en un medio hipotónico. B) Encogimiento (E) y posterior recuperación del volumen celular (RVI) que sucede en condiciones de hipertonicidad. C) El cambio de hipotonicidad a isotonicidad supone un aumento de la osmolaridad extracelular provocando un encogimiento celular debido a la pérdida excesiva de agua que se recupera mediante la activación de mecanismos de captación de osmolitos celulares en un proceso denominado post-RVD RVI. (N, normal; H, hinchamiento; E, encogimiento).

1.1.1.2. ¿Qué es la RVI?

Cuando una célula se expone a condiciones hiperosmóticas se produce una pérdida del contenido intracelular de agua llevando a un encogimiento celular. En este caso, el proceso básico que subyace a la recuperación del volumen inicial conocido como RVI (incremento de volumen regulador, o bien del inglés *regulatory volume increase*) (fig.1B) consiste en la captación de osmolitos inorgánicos del medio externo (5). La acumulación intracelular de sales (principalmente NaCl y KCl) y del agua arrastrada por estos electrolitos se consigue mayoritariamente mediante dos procesos: 1) activando paralelamente los intercambiadores de Na^+/H^+ y de HCO_3^-/Cl^- o bien 2) el cotransportador $Na^+-K^+-2Cl^-$ (figura 2) (2;4). En algunos tipos celulares se ha demostrado funcionalmente la participación de canales de Na^+ cuya activación supondría un mecanismo más rápido y eficiente para regular el volumen ya que la capacidad de transportar iones es de 4-5 órdenes

de magnitud superior respecto los sistemas de transporte activos. No obstante, todavía no se ha podido identificar molecularmente ninguno de ellos (1).

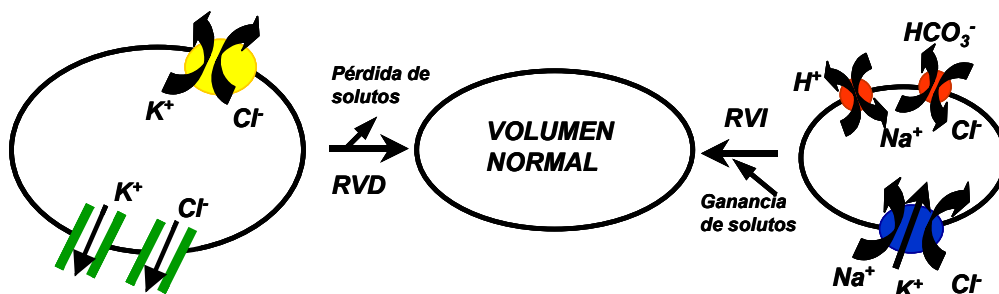


Figura 2. Principales vías de transporte activadas en respuesta a perturbaciones del volumen. La pérdida de solutos (KCl) en la RVD y la ganancia de osmolitos (NaCl ó KCl) en la RVI mediante la activación rápida (minutos) y específica de sistemas de transporte localizados en la membrana plasmática permite a las células animales recuperar su volumen inicial (véase texto para explicación detallada).

Aunque la mayoría de las células animales llevan a cabo la RVD después de un hinchamiento evitando así su destrucción por lisis celular, muchas células son incapaces de desencadenar la RVI cuando se encuentran en condiciones hipertónicas. No obstante, estas mismas células, si después de estar sometidas a estrés hipotónico y recuperar parte de su volumen (proceso de RVD) se pasan a condiciones de isotonicidad (véase fig.1C), experimentan un encogimiento substancial alcanzando un volumen inferior al del estado de reposo del cual se recuperan mediante la activación de los mecanismos explicados para la RVI. El porque en muchos tipos celulares la RVI sólo sucede en el paso de hipotonicidad a isotonicidad y no de isotonicidad a hipertonicidad es completamente desconocido. Este proceso es denominado RVI post-RVD (3;7).

Por lo tanto, la regulación del volumen celular viene determinada en primer lugar por mecanismos de adaptación rápida que implican la pérdida o ganancia de iones osmóticamente activos (Na^+ , K^+ y Cl^-) a través de sistemas de transporte localizados en la membrana cuya activación sucede en segundos o minutos. No obstante, en determinadas situaciones fisiológicas, los osmolitos orgánicos (aminoácidos y derivados, p.ej la taurina; polioles, p.ej el sorbitol; y metilaminas, p.ej la betaína) constituyen un mecanismo de adaptación lenta fundamental para la homeostasis del volumen celular ya que a diferencia de los osmolitos inorgánicos, pueden acumularse intracelularmente alcanzando altas concentraciones (10-

100mM) sin comprometer la función ni la estructura celular (8). Esta respuesta lenta que puede durar horas o días según la duración del estímulo, conlleva la regulación a nivel transcripcional de genes implicados en la síntesis/degradación de estos osmolitos orgánicos o bien de sus transportadores (principalmente sistemas de cotransporte con Na⁺) (1;4;5), aunque no entraré en detalle ya que no este tipo de respuesta no es objeto de mi estudio.

1.2.- Mecanismos moleculares que participan en la RVD

Este proceso de regulación de volumen conceptualmente simple *a priori* (RVD: salida de KCl y recuperación del volumen), resulta ser muy complejo a nivel molecular ya que la diversidad y la variabilidad de mecanismos moleculares implicados es enorme y característica de cada tipo celular (1;9;10). Teóricamente, se pueden definir tres componentes mecánicos que participarían en el proceso de regulación de volumen. Ordenadamente: 1) el sensor del volumen celular, 2) el transductor o la vía de transducción de la señal generada por el sensor y finalmente 3) el mecanismo efector activado que permitiría la recuperación del volumen inicial (3). Este apartado pondrá de manifiesto la gran heterogeneidad descrita de todos estos componentes en diferentes tipos celulares durante la RVD, resaltando aquellos mecanismos más interesantes para el control del volumen en nuestros modelos celulares.

1.2.1.- Los sistemas sensores del volumen celular

¿Cómo sienten y detectan las células variaciones en su tamaño? ¿Qué parámetro mide la célula para poner en marcha su respuesta bioquímica? Las células son capaces de sentir y responder a variaciones de volumen <3% (4). Cambios bioquímicos (en las concentraciones de macromoléculas y en las concentraciones iónicas) o bien cambios mecánicos (en la arquitectura del citoesqueleto y en la tensión de la membrana) han sido propuestos como las señales sentidas por los sistemas sensores responsables de la detección del cambio de volumen celular (1;4), tal y como muestran los siguientes ejemplos.

El hinchamiento celular induce variaciones en el estado de agrupamiento de proteínas citosólicas lo que altera substancialmente sus propiedades bioquímicas y en consecuencia su función, llevando a un aumento o disminución de su actividad. Este **hacinamiento de macromoléculas** (del inglés *macromolecular crowding*)

junto con variaciones de la **fuerza iónica** que se producen concomitantemente y lo modulan, se ha demostrado que regulan la activación del canal de Cl^- VSOAC (*volume-sensitive organic osmolyte-anion channels*) (1) y del cotransportador de K^+ - Cl^- , activación esta última debida a la inhibición de una quinasa citosólica (sensor) que cuando se diluye en respuesta al hinchamiento celular se inactiva y no puede fosforilar el cotransportador, manteniéndolo activo en células de eritrocitos (4).

La **arquitectura del citoesqueleto** también se ve afectada por el hinchamiento celular. Mientras que generalmente los filamentos de actina se despolimerizan en un proceso que es dependiente de Ca^{2+} , los microtúbulos aumentan su estabilidad (2). Esta alteración submembranal del citoesqueleto que acompaña a la remodelación morfológica de la membrana (se pierden las invaginaciones de la membrana provocando una tensión mecánica o estiramiento (9)), se transduce en varios efectos: en algunos casos se ha demostrado que facilita la fusión con la membrana de vesículas portadoras de canales, en otros modifica el estado de interacción de la actina con proteínas adaptadoras o estructurales como la anquirina, la espectrina y la integrina entre otras, que interaccionan directamente con sistemas de transporte localizados en la membrana modulando su actividad, y, finalmente, puede alterar la actividad de diferentes moléculas señalizadoras cambiando su localización intracelular (1;4;10).

El estiramiento de la membrana concomitante con la remodelación del citoesqueleto, produce una **tensión en la membrana** que regula la actividad de los canales activados por estiramiento (*SA, stretch-activated*). Una distensión de la membrana provoca un aumento de la probabilidad de apertura de estos canales sin modificar la conductancia unitaria ni la selectividad. Se han identificado canales SA catiónicos no selectivos (permiten mayoritariamente la entrada de Ca^{2+} y Na^+) y canales SA selectivos de Ca^{2+} , K^+ y Cl^- en varios tipos celulares (2;4).

Por lo tanto, existen muchos candidatos para detectar cambios en el volumen celular: desde canales mecanosensibles a otro tipo de proteínas de membrana, citosólicas o del citoesqueleto que se alteren frente a estos cambios inducidos por el hinchamiento (4). No obstante, a pesar de algunos ejemplos documentados, se desconoce con certeza la naturaleza del sistema sensor responsable de la detección de los cambios de volumen debido, principalmente, al carácter integrador de las vías de señalización activadas durante la RVD cuya interrelación espacial y temporal dificulta la interpretación secuencial de todos los eventos y por lo tanto hace muy difícil identificar el evento inicial que pudiera ser el

responsable de desencadenar la regulación del volumen. Sería razonable pensar que no existe solamente un único sensor, sino que las células presentan un amplio abanico de sensores del volumen que responderían en función de la magnitud y la naturaleza de la perturbación del volumen (1;11).

1.2.2.- Vías de señalización implicadas en la RVD: el papel del Ca^{2+}

¿Qué vías de señalización se ponen en marcha para activar a los mecanismos efectores? La implicación de una vía de señalización en la regulación del volumen celular no es un parámetro fácil de determinar por varios motivos: 1) la afectación de una vía señalizadora en respuesta a un cambio de volumen no siempre está relacionada con la RVD ya que puede no producir correcciones del volumen alterado, 2) la eliminación de una vía de señalización (p.ej con el uso de inhibidores), aunque no parezca ser determinante para el cumplimiento de la RVD, puede estar participando en la regulación pero como actúa paralelamente con otras vías de señalización éstas pueden contrarrestar su defecto y 3) las vías de señalización empleadas en la RVD no pueden generalizarse ya que parecen ser específicas de cada tipo celular (2). A pesar de todo ello, muchos han sido los mecanismos propuestos implicados en la señalización intracelular, algunos de los cuales comentaré brevemente a continuación haciendo especial hincapié en aquellos que son de interés para mi investigación.

1.2.2.1.-Fosforilación de proteínas

Una gran variedad de proteínas quinasas como la PKC, PKA, PI-3 quinasa, FAK, MAP quinasas (JNK, ERK-1, ERK-2, p38 MAP), tirosín quinasas (TK) y otras, se han descrito alteradas durante variaciones en el volumen celular (2;10). Mientras las proteínas MAP quinasa suelen jugar un papel destacado en la activación de los mecanismos efectores de acción lenta, ya que su activación (entre 10-30 min) está relacionada con la regulación de factores de transcripción que modulan la expresión de los genes relacionados con el transporte y el metabolismo de los osmolitos orgánicos, las demás quinasas (PKC, PKA, FAK, TK...) suelen tener un papel clave en la activación de los mecanismos de acción rápida, activando los sistemas de transporte de osmolitos inorgánicos localizados en la membrana (1;12). P. ej. se ha demostrado que todos los miembros de la subfamilia de las src TK son sensibles a cambios anisotónicos, participando en la activación de canales de Cl^-

(VSOAC), canales de K^+ (del tipo BK_{Ca} y K_v ; véase siguiente apartado para nomenclatura) y cotransportadores (KCC) (12). Incluso algún miembro de la familia src ha sido propuesto como parte de un sistema sensor que junto con las integrinas y proteínas G (del tipo *rho*) participaría en la mecanotransducción de la deformación de la membrana en algunos modelos celulares (12).

1.2.2.2.-Metabolismo lipídico

Variaciones en la concentración de determinados lípidos como la fosfatidilcolina (PC), el ácido fosfatídico (AP), los fosfoinositoles ($PI(4,5)P_2$, $PI(3,4,5)P_2$), el diacilglicerol (DAG), el ácido araquidónico (AA) y sus derivados (leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos) también participan en la respuesta celular a cambios osmóticos (1;10). Estos mensajeros lipídicos intervienen en distintos niveles de las cascadas de señalización: sirven de sustratos o cofactores para determinadas enzimas como las fosfolipasas PLA_2 , PLC, PLD y algunas quinasas (PI3-K), enzimas cuya actividad también se ve alterada por hipotonicidad en la mayoría de los sistemas celulares estudiados, o bien, regulan directamente la actividad de varias proteínas como la GTPasa *rho*, la PKC y distintos canales o transportadores (4;10). En el caso del AA, parece ser que en respuesta a un hinchamiento hipotónico se produce un aumento de este derivado lipídico como consecuencia de un aumento de la actividad de la PLA_2 (9). La activación de esta enzima viene regulada en parte por un cambio en su estado de hacinamiento, cuya observación ha sugerido una función mecanosensora de esta enzima, y por aumentos de Ca^{2+} intracelular (1). A diferencia de las otras fosfolipasas, todavía no existe ninguna evidencia que implique la PLA_2 en la RVI. Del metabolismo del AA derivan toda una serie de lípidos cuya implicación en la RVD se ha demostrado en varios modelos celulares, siendo el caso mejor documentado la participación del leucotrieno LTC_4 en la activación de los mecanismos efectores de la RVD en células de tumor ascítico (de canales de K^+ , de Cl^- y de osmolitos orgánicos como la taurina) (9). Además, en varios tipos celulares la inhibición de la $cPLA_2$ impide la RVD (10). No obstante, los efectos de los cambios de volumen en la movilización y metabolización de estos lípidos así como en la actividad de las enzimas que participan en su señalización, son altamente variables para cada tipo celular y por tanto *a priori* impredecibles debido, en parte, a la complejidad de esta red de señalización lipídica (1).

1.2.2.3.- ATP y receptores purinérgicos

En respuesta a diferentes estímulos mecánicos, como sucede con el estiramiento de la membrana inducido por el hinchamiento, varios tipos de células epiteliales liberan ATP al medio extracelular (10;13;14). Este nucleótido (ATP) junto con los derivados resultantes de la acción de las ectonucleasas extracelulares (AMP, ADP), interaccionan con diferentes tipos de receptores purinérgicos presentes de forma ubicua en las membranas de las mismas células epiteliales, desencadenando la activación de vías de señalización que concluyen con la regulación de diferentes tipos de canales, entre ellos canales de Cl^- y K^+ (15). La relación entre este mecanismo de señalización autocrina y la RVD fue demostrada por primera vez en células de hepatocito, en las que la liberación controlada de ATP en respuesta al hinchamiento permitía la activación de los canales de Cl^- responsables de la RVD en estas células a través de su unión a receptores purinérgicos del tipo P_2 (16). A pesar de ser un mecanismo de señalización ampliamente descrito para varios tipos de células epiteliales (p. ej. en diferentes tipos de células de epitelio respiratorio (17-20); véase apartado III de la introducción) todavía no se conoce con certeza la vía a través de la cual las células liberan este ATP al exterior celular (14).

1.2.2.4.- El calcio

En muchos tipos celulares, principalmente epiteliales, la RVD requiere la participación del Ca^{2+} como molécula señalizadora (7). Los aumentos intracelulares de Ca^{2+} , fácilmente detectables con marcadores fluorescentes, pueden deberse a una entrada de Ca^{2+} desde el exterior a través de diferentes tipos de canales permeables para este ión o bien a una liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (31). En los sistemas celulares estudiados existen ejemplos de todo tipo: activación de una vía de entrada (30), activación de la liberación de Ca^{2+} desde un tipo de depósito (10), activación de ambos mecanismos pero de forma secuencial en un proceso denominado CICR (*calcium induced calcium release*) cuando a una entrada de Ca^{2+} desde fuera le sigue la liberación de Ca^{2+} de los depósitos (6;32) o viceversa, una activación de canales de membrana llamados canales SOC (*store-operated calcium*) posterior a la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (33). No obstante, centrándome en el caso que nos ocupa, parece bien establecido que en la mayoría de células epiteliales la RVD es una respuesta dependiente del Ca^{2+} extracelular, es decir, el mecanismo que implica el aumento de Ca^{2+}

intracelular durante el hinchamiento supone la activación de una vía de entrada de Ca^{2+} presente en la membrana ya que la eliminación del Ca^{2+} extracelular bloquea directamente el proceso de recuperación del volumen (1;4;7). Clásicamente, la caracterización electrofisiológica de esta conductancia ha indicado que la vía de entrada de Ca^{2+} en respuesta a estrés hipotónico es a través de canales catiónicos no selectivos activados por estiramiento, cuya corriente es bloqueada por la presencia de Gd^{3+} en el medio externo (7;34). Gracias a la diferencia de potencial negativa existente a través de la membrana en condiciones de reposo, la activación de estos canales favorece la entrada de cationes de Ca^{2+} y Na^+ antes que la salida de K^+ (2), alcanzado una concentración intracelular de Ca^{2+} suficiente para que este catión actúe de molécula señalizadora activando en su vecindad a los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , verdaderos efectores de la RVD (34). A pesar de la clara existencia de este mecanismo de activación en un gran número de células epiteliales (29;30;35), todavía no se ha identificado molecularmente ningún canal catiónico no selectivo activado por estiramiento sensible a cambios osmóticos. No obstante, la identificación molecular del primer canal catiónico no selectivo sensible a cambios osmóticos en células de mamífero hace ahora cinco años (36), ofreció el primer candidato a la regencia de esta conductancia (véase apartado II de la introducción).

1.2.3.- Mecanismos efectores

En condiciones de reposo el gradiente electroquímico de las membranas celulares es favorable a un flujo de salida de los iones K^+ y Cl^- . Por ello, la activación de una vía de K^+ conduce estos iones hacia el exterior produciendo una hiperpolarización de la membrana que a su vez favorece la salida de Cl^- y viceversa, la activación de una conductancia de Cl^- lleva a una despolarización de la membrana que en consecuencia facilita la salida de iones K^+ (1). El mecanismo más efectivo y común para completar la RVD es la activación de ambas conductancias a la vez (9;37). La inhibición de cualquiera de ellas determina la inhibición de la RVD.

1.2.3.1- Cotransportador de K^+ - Cl^-

La liberación electroneutra de KCl a través del simportador de K^+ - Cl^- (KCC) (fig.2) es el mecanismo de transporte activo más frecuentemente

utilizado en sistemas celulares sometidos a hinchamiento isotónico, es decir, debido a cambios en la osmolaridad intracelular (2).

1.2.3.2- Canales de Cl⁻

La activación de una conductancia de Cl⁻ en respuesta al hinchamiento celular se describió por primera vez en la piel de rana en 1961 (38). Desde entonces se han caracterizado electrofisiológicamente muchos sistemas de los que se extrae que la conductancia de Cl⁻ mediada por los canales VSOR (*volume-sensitive outwardly-rectifying*), llamados también VRAC (*volume-regulated anion channels*) o VSOAC (*volume-sensitive organic osmolyte-anion channels*), es el mecanismo más utilizado para mediar la RVD (1;6). Tal y como su nombre indica estos canales aniónicos no son selectivos. Además de Cl⁻ permiten el paso de otros aniones (HCO₃⁻), de moléculas orgánicas (mio-inositol, sorbitol) y aminoácidos neutros (glicina, taurina...) en un gran número de los sistemas estudiados (2;9;39). No obstante, después de muchos esfuerzos para identificar molecularmente un canal asociado a las características biofísicas de esta conductancia VSOAC, todavía no se ha podido presentar con certeza un candidato convincente de entre los muchos ya propuestos: Glicoproteína-P, I_{Cl_{in}}, CIC-2, CIC3, CaCC, BCl y SCl (1). Cabe tener en cuenta la posibilidad de que otros canales no identificados se estén activando a la vez.

1.2.3.3.- Canales de K⁺

En estos últimos años ha habido un gran avance en la identificación molecular de canales de K⁺ que se activan en repuesta al hinchamiento celular. En diferentes tipos celulares se ha demostrado la participación de distintos miembros de varias familias de canales de K⁺: canales dependientes de Ca²⁺ del tipo BK_{Ca} (de alta conductancia), IK_{Ca} (de conductancia intermedia) o SK_{Ca} (de pequeña conductancia), canales dependientes de voltage como el Kv1.3 y el Kv1.5, la proteína I_{SK} y más recientemente canales de K⁺ del tipo K_{2P} como el TREK-1 y el TREK-2 ambos activados por estiramiento, difiriendo notablemente entre todos ellos respecto su conductancia unitaria, mecanismos de apertura y organización molecular (1;4). El por qué cada tipo celular utiliza una proteína u otra se desconoce pero esta alta variabilidad pone de manifiesto la importancia de este mecanismo en la RVD (37).

2. EL CANAL TRPV4

Clásicamente, la entrada de Ca^{2+} en respuesta al hinchamiento celular se ha asociado a canales catiónicos de baja selectividad activados por estiramiento (*stretch-activated (SA) channels*) (34). No obstante, la identificación del primer canal catiónico no selectivo sensible a cambios osmóticos hace ahora cinco años, el canal TRPV4 (36;40;41), presentó una nueva posibilidad para el estudio de las vías de entrada de Ca^{2+} en la RVD.

2.1.- La familia de los TRP

El canal TRPV4 pertenece a la familia de canales TRP (*Transient Receptor Potencial*). El primer miembro en ser identificado y al cual la familia debe su nombre fue el canal TRP de *Drosophila melanogaster*, gracias a la obtención de un mutante cuyos fotoreceptores carecían de una respuesta despolarizante estable frente a un estímulo luminoso, presentando sólo potenciales de despolarización transitoria (*transient receptor potential*) (42;43). Es una de las familias de canales más grandes conocidas, con representantes en especies muy distantes desde las levaduras hasta el género humano (21;23;44;45).

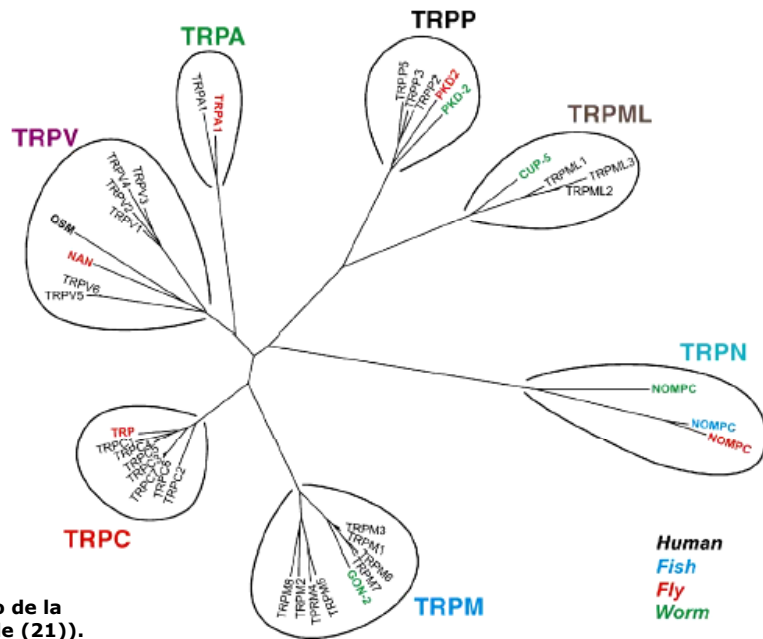


Figura 3. Árbol filogenético de la familia TRP (reproducido de (21)).

Aunque potencialmente existen más de 100 canales candidatos en distintas bases de secuencias de genomas, hasta la fecha se han identificado y estudiado funcionalmente algo más de 30 miembros clasificados en siete subfamilias basándose exclusivamente en su homología de secuencia: TRPC (*canonical*), TRPV (*vanilloid*), TRPM (*melastatin*), TRPP (*polycystin*), TRPA (*ankyrin*) y TRPN (NOMPC) (fig. 3) (21). En todas las subfamilias excepto la TRPN existe algún representante humano. Todos ellos son canales catiónicos que permiten el flujo de entrada de Ca^{2+} y Na^{+} principalmente, aunque según la isoforma, la permeabilidad y la selectividad para cationes mono- o divalentes es variable (los valores de $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ pueden ir de $>100:1$ a $<0.05:1$) (44). El patrón de expresión de estas proteínas es muy amplio, encontrando ejemplos en prácticamente todos los tejidos (21;23;44;45).

Los canales TRP se caracterizan por presentar una estructura de 6 dominios transmembrana (DTM) con un poro delimitado por el loop entre el DTM 5 y 6. Estos dominios transmembrana son las zonas más ampliamente conservadas a lo largo de toda la familia, existiendo una mayor variabilidad en los extremos N- y C-terminal intracelulares donde encontramos diferentes dominios característicos de cada subfamilia (fig. 4) (21;44;45). Por analogía con otros canales de 6 DTM como el canal de K^{+} voltage dependiente *Shaker* o los canales CNG (*cyclic-nucleotide gated*), los canales TRP se ensamblarían en tetrámeros para formar la unidad funcional (23), aunque esta oligomerización sólo ha sido demostrada para algunos miembros de la familia (46-49).

La mayoría de los canales TRP tienen la habilidad de responder a una gran variedad de estímulos de origen muy diverso, tanto físicos (p. ej. el frío, el calor, la distensión de la membrana, el flujo...) como químicos (p. ej. el pH, las ferhormonas, las concentraciones iónicas...) (23;50). Esta capacidad de integrar, amplificar y transducir diferentes estímulos a señales eléctricas los posiciona como candidatos propicios para sentir distintas respuestas celulares (51;52). Fisiológica y celularmente se les ha implicado en una gran variedad de funciones tales como la osmotransducción, la percepción del calor, de la presión, del dolor, del tacto, del gusto, de la audición, la homeostasis del Ca^{2+} y del Mg^{2+} , la angiogénesis, el mantenimiento del tono vascular, el crecimiento, la proliferación y la muerte celular, la detección del flujo laminar... (23;44;45;50;52;53). Seguramente aún quedan muchas otras funciones por descubrir debido a la reciente aparición de la mayoría de los miembros de esta familia (≤ 5 años). Asimismo, existe una amplia diversidad en lo que a mecanismos de activación y regulación de estos canales se

refiere: la depleción de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (lo que hace que se hayan propuesto como canales SOC), la unión de ligandos endógenos (derivados lipídicos) y exógenos, la fusión con la membrana de vesículas intracelulares cargadas de canales TRP, la activación por distintos tipos de PLC, la fosforilación por kinasas (PKC, TK),... son sólo algunos de los mecanismos de activación conocidos (45;50;51;54).

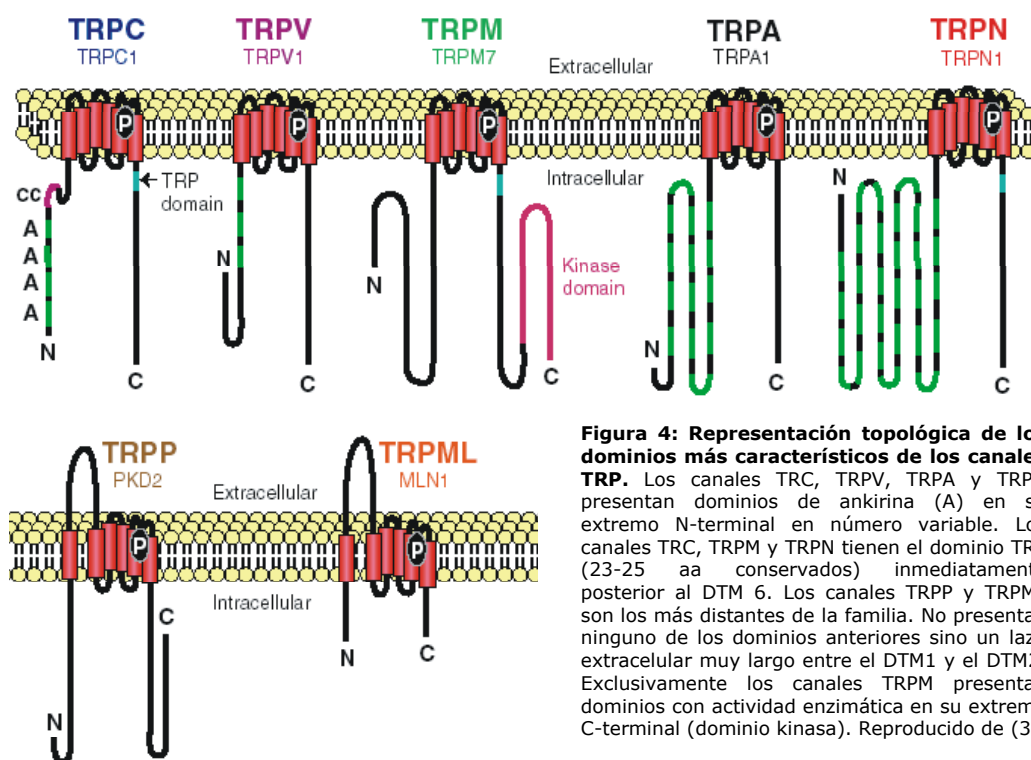


Figura 4: Representación topológica de los dominios más característicos de los canales TRP. Los canales TRC, TRPV, TRPA y TRPN presentan dominios de ankirina (A) en su extremo N-terminal en número variable. Los canales TRC, TRPM y TRPN tienen el dominio TRP (23-25 aa conservados) inmediatamente posterior al DTM 6. Los canales TRPP y TRPML son los más distantes de la familia. No presentan ninguno de los dominios anteriores sino un lazo extracelular muy largo entre el DTM1 y el DTM2. Exclusivamente los canales TRPM presentan dominios con actividad enzimática en su extremo C-terminal (dominio kinasa). Reproducido de (3)

La diversidad de la familia de los TRPs se ve incrementada con la continua descripción de nuevas isoformas (55-59). Para la mayoría de miembros de todas las subfamilias de TRPs se han detectado nuevos mRNAs derivados de *splicings* alternativos (45). La caracterización de estas variantes en algunos casos muestra una afectación de la función del canal, no obstante la mayoría de ellas parecen ser funcionalmente irrelevantes o bien todavía sólo existen en bases de datos genómicos. Para citar algún ejemplo, de las cuatro variantes descritas del canal TRPC1 ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$), sólo la α y la β se expresan eficientemente (60), de las doce variantes identificadas para el canal TRPM3, sólo 3 de ellas la TRPM₁₃₂₅, la TRPM3 α 1

y la TRPM3 α 2 forman canales funcionales, en el primer caso constitutivamente abiertos y en los dos últimos con diferentes selectividades catiónicas ya que difieren en la región que forma el poro (61), y como último ejemplo, tanto el TRPV3 como el TRPP5 tienen descrita una variante que carece de análisis funcional (45).

2.1.- Biogénesis de los canales TRP

La síntesis de una proteína de membrana se inicia en los ribosomas asociados al retículo endoplasmático (RE) donde se facilita la inserción en la membrana lipídica al mismo tiempo que se produce la proteína. Durante este proceso de síntesis e inserción cotranslacional se determina la topología (orientación) de la proteína y se producen modificaciones covalentes que ayudan al plegamiento proteico (como p. ej. las N-glicosilaciones y la formación de puentes disulfuro) (28;62). Aquellas proteínas correctamente formadas en el RE son transportadas en vesículas de membrana a través del compartimento intermedio o ERGIC hacia el Golgi y de los diferentes compartimentos del Golgi hacia la membrana plasmática (62). En el caso de proteínas de membrana multiméricas el ensamblaje puede ocurrir en cualquiera de estos compartimentos de la vía secretora desde el RE hasta la membrana plasmática, y por tanto producirse en paralelo al plegamiento (RE), durante la maduración del estado de glicosilación (Golgi) o una vez alcanzado el destino final de la proteína (membrana plasmática) (63;64).

A lo largo de todo este proceso de maduración, el estado de plegamiento y de oligomerización de las proteínas son comprobados constantemente por los sistemas de control de calidad presentes en su mayoría en el RE aunque otros compartimentos de la vía secretora también participan en este control (fig. 5), asegurando de este modo la fidelidad de la expresión génica a nivel postranslacional (28;62). En estos mecanismos de control participan chaperonas (incluyendo chaperonas clásicas como la BiP (*IgG heavy chain binding protein*), las HSP70 (*70 kDa heat shock proteins*), las lectinas calnexina y calreticulina, y chaperonas citoplasmáticas como la HSC70 (*70Kda chaperone heat shock cognate protein*) así como otras enzimas que facilitan el plegamiento (p. ej. tioloxidoreductasa, sulfilisomerasa,...) (62;65;66). Las proteínas mal plegadas o inadecuadamente ensambladas se asocian permanentemente a estos u otros componentes sensores del estado de plegamiento y oligomerización quedando atrapadas en la vía secretora sin poder alcanzar su destino final (se retienen en el

RE, se recaptan hacia el RE desde otros orgánulos, se degradan en el RE por la vía ERAD (*ER associated degradation*) asociada al proteosoma o bien, se redireccionan desde el Golgi a lisosomas o vacuolas para su degradación, tal y como esquematiza la figura 5).

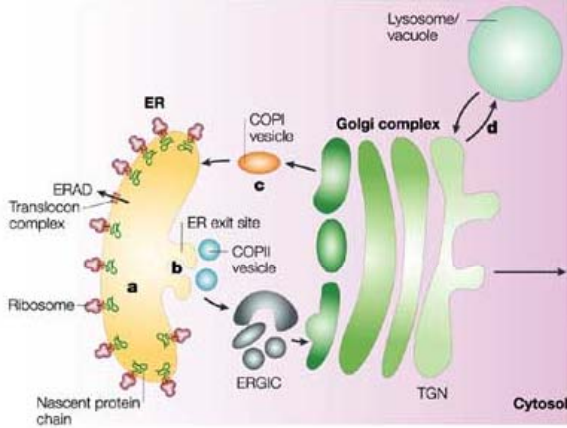


Figura 5. Representación esquemática de los orgánulos de la vía secretora implicados en el control de calidad. Las proteínas mal plegadas o mal ensambladas son retenidas en el RE (a) y en algunos casos, si escapan al ERGIC o al compartimento *cis* del Golgi pueden ser recaptadas por una segunda barrera de mecanismos de control (c) y transportadas de nuevo al RE, desde donde son retrotranslocadas al citosol y degradadas por el proteosoma si no consiguen alcanzar su conformación nativa. El aparato de Golgi no se ha implicado directamente en el plegamiento de proteínas ya que no presenta chaperonas ni otro tipo de proteínas que faciliten el plegamiento aunque en algunos casos parece que puede redirigir proteínas aberrantes a lisosomas o vacuolas para que sean degradadas (d) (reproducido de (28)).

Más de un 90% de las glicoproteínas de membrana son N-glicosiladas. Estos N-glicanos se adicionan en el lumen del RE como unidades de oligosacáridos presintetizadas (fig. 6). Estos azúcares, además de facilitar el plegamiento estabilizando directamente la estructura del péptido nascente, actúan como secuencias de reconocimiento a través de su interacción con diferentes lectinas (la calnexina y calreticulina con un papel central en el plegamiento y la retención de glicoproteínas) o las manosidasas que direccionan las glicoproteínas insalvables a su degradación mediante la vía ERAD (26). Aquellas glicoproteínas que logran superar el sistema calnexina/calreticulina (mecanismo de control de calidad mejor descrito, sensor del estado de plegamiento y oligomerización en el RE) alcanzan el complejo de Golgi donde modifican selectivamente la estructura predefinida de N-glicanos (glicosilación compleja) (62).

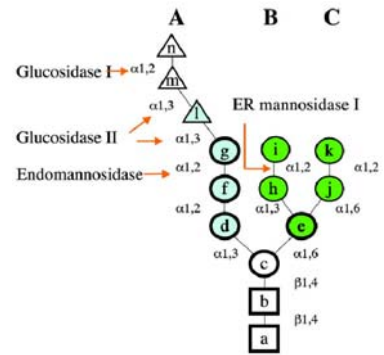


Figura 6. Estructura nuclear del N-oligosacárido. El corazón del azúcar está formado por 14 azúcares: 3 glucosas (triángulos), 9 manosas (círculos) y 2 N-acetilglucosaminas (cuadrados). Se estructura en tres ramas (A, B y C), los puntos de corte de algunas glicosidasas relacionadas con su procesamiento están indicados por las flechas rojas. Los residuos en azul están implicados en la interacción con el sistema calnexina/calreticulina, mientras que los residuos en verde con las manosidasas. Reproducido de (26).

En el caso de los TRPs existe un escaso conocimiento respecto a los mecanismos que gobiernan la síntesis, el plegamiento, la oligomerización y la maduración de estos canales. De todos estos procesos biogénicos, la oligomerización es el más caracterizado (46-49). Como acabo de mencionar en el apartado anterior, por analogía con otros canales con 6 DTM, se propuso que un canal TRP requería del ensamblaje de cuatro subunidades para formar la unidad funcional (23;67). Varios estudios han demostrado no sólo la necesidad de homotetramerizar para rendir canales funcionales (47;48;68), sino que han puesto de manifiesto la posibilidad de formar canales heteroligoméricos (formados por diferentes subunidades de distintos canales TRP) que permitirían la creación de poros con nuevas propiedades biofísicas generando aún una mayor diversidad funcional (47-49;69-72). La oligomerización de los canales TRP de mamífero se ha estudiado principalmente mediante sistemas de expresión *in vitro*, que en algunos casos se complementa con evidencias funcionales en sistemas nativos necesarias para la demostración de la formación de estos canales heterómeros *in vivo*. Por ejemplo, 1) la formación de canales homo- y heteroméricos entre el TRP, el TRPL y el TRP γ de *Drosophila melanogaster* en las células fotorreceptoras del ojo fue la primera observada en un sistema *in vitro* e *in vivo* (70); 2) en sistemas de expresión heterólogos aplicando la técnica de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) se ha demostrado la composición tetramérica de los canales TRPC, así como que el ensamblaje heteromérico se produciría preferentemente entre los miembros que pertenecen a un mismo subgrupo, es decir, entre el TRPC4/5 y los TRPC3/6/7 (48;49), detectándose algunos de estos heterómeros *in vivo* en células del sistema nervioso (71;72).

¿Qué señales gobiernan este ensamblaje? ¿A través de qué dominios interaccionan las diferentes subunidades? Los determinantes estructurales y las normas que rigen este ensamblaje son prácticamente desconocidos. Varios estudios han sugerido la participación del extremo N-terminal en la oligomerización de estos canales TRP: p. ej. en el TRPV5 (73), el mTRP1 β (74), el TRP y TRPL de *Drosophila* (70) y el TRPC1 (60) entre otros. Estructuralmente, en esta región citoplasmática encontramos los dominios de anquirina (ANK) (23). Estos dominios son repeticiones de aproximadamente 33 aminoácidos implicados en la interacción proteína-proteína (25), sugiriéndose *a priori* que su presencia en los canales TRP estaría relacionada con la asociación a otras proteínas del citoesqueleto. No obstante, un par de estudios recientes ponen de manifiesto la importancia de estos dominios en el

proceso de multimerización de proteínas TRP, concretamente del TRPV5 (73) y del TRPV6 (75). La secuencia primaria de un dominio de ANK es variable pero en cambio su estructura secundaria y terciaria está altamente conservada (25). Esta baja homología de secuencia hace difícil predecir el número exacto de dominios de ANK en una proteína dada. Es por ello que diferentes autores han hecho diferentes propuestas: desde 3 hasta 6 dominios de ANK han sido citados tanto en el caso del TRPV4 como del TRPV5 o del TRPV6 (40;75;76). Cada dominio de ANK presenta una estructura terciaria de β -hairpin-hélice-giro-hélice, que junto con los dominios siguientes forma una estructura muy compacta con un centro altamente hidrofóbico (fig. 7) (25). La mutación de un único residuo puede desestabilizar completamente esta estructura tridimensional (77). A pesar de todos los resultados que apuntan a un papel fundamental del extremo N-terminal citosólico en la oligomerización de canales TRP, cabe tener en cuenta que algunos trabajos sugieren también la presencia de dominios de tetramerización en el extremo C-terminal (46;73;78).

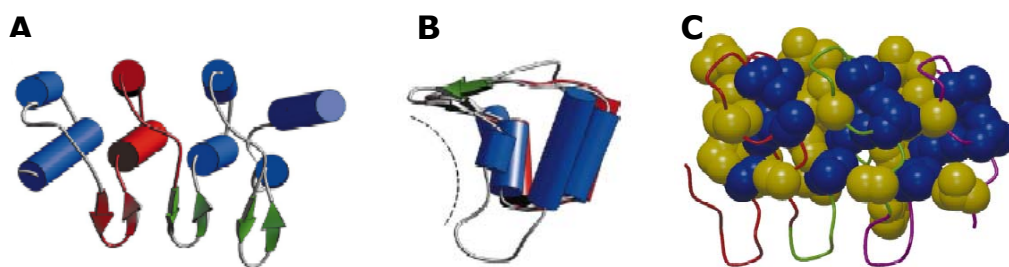


Figura 7. Estructura de los dominios de ankirina. En el panel A y B se muestra la disposición de las hélices- α (cilindros) y los hairpins- β (flechas) en una sucesión de 4 repeticiones de ANK determinada mediante rayos X, proyectada desde la parte superior (panel A) o lateral (B). Un único dominio de ANK (resaltado en rojo) está compuesto por dos hélices- α unidas entre ellas por un *loop* más un hairpin- β . En el panel C vemos el ensamblaje de tres dominios de ANK (las líneas roja, verde y lila marcan el inicio y final de los dominios). Reproducido de (25)

Por otro lado, en referencia a la función de los dominios de ANK, se ha hipotetizado que, en el caso de los TRPN de los que no existe ningún representante humano, las 29 repeticiones de dominios ANK presentes en el extremo N-terminal conservadas en los diferentes miembros descritos se estructurarían formando una vuelta de hélice susceptible a la deformación por estímulos mecánicos, constituyendo la base del mecanismo de apertura o *gating spring* de estos canales mecanosensibles (79).

Muchos canales requieren la participación de chaperonas y/o proteínas de anclaje para su transporte eficiente y localización en la membrana plasmática. No obstante, se conoce muy poco respecto a estos procesos en el caso de los canales TRP. Actualmente, el papel más destacado en este direccionamiento lo tendrían las proteínas de anclaje con dominios de interacción del tipo PDZ (23;77). El caso mejor documentado es la formación de un sofisticado complejo fotoreceptor en *Drosophila* a partir de la proteína de anclaje INAD (contiene 5 dominios PDZ), la cual acompleja todas las proteínas necesarias para una eficiente y rápida transducción de la respuesta al estímulo luminoso localizándolas correctamente en la membrana, entre ellas el TRP y TRPL, ambas con secuencias de reconocimiento a dominios PDZ (80;81). Esta organización en complejos macromoleculares parece ser una característica común a varios miembros de la familia de los TRPs. Para tres canales TRP (el TRPC4, el TRPV5 y el TRPV6), se ha descrito la presencia de estas secuencias de reconocimiento a proteínas con dominios PDZ, y se ha demostrado que su delección o mutación reduce significativamente la expresión y localización en superficie de estos canales (82-84). En el caso del TRPC4 es la interacción con la proteína de anclaje NHERF-1 (82) (homóloga en mamíferos del INAD de *Drosophila* y con 2 dominios PDZ), y en el caso del TRPV5 y TRPV6 la interacción con NHERF-2 y NHERF-4 en células epiteliales de riñón (83;84), la responsable de mediar esta función. Seguramente, la mayoría de canales TRP a través de estos u otros dominios específicos se encuentren ligados a complejos macromoleculares de proteínas que además de controlar su localización, estabilidad y actividad, contribuyan a la especificidad y eficacia en la transducción de la señal (23).

2.1.2.- La subfamilia de los vaniloides

La subfamilia de los vaniloides (TRPV) en mamíferos está constituida por seis miembros divididos en dos grupos según su estructura y función: el grupo que comprende del TRPV1 al TRPV4 y el grupo formado por el TRPV5 y el TRPV6. Mientras que los TRPV1-V4 son canales catiónicos no selectivos (la permeabilidad al Ca^{2+} es moderada: $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ entre ~ 1 y ~ 10), el grupo TRPV5-V6 contiene los canales con una selectividad más alta para el Ca^{2+} de toda la familia de los TRP (21;23;24;85).

Estructuralmente todos ellos se caracterizan por presentar de 3 a 6 dominios de ANK en el extremo N-terminal mientras que el dominio TRP en el extremo C-terminal está muy pobremente conservado considerándolo algunos

autores inexistente (fig. 4) (23). Es la única subfamilia en la que se han realizado algunos estudios de estructura-función (mutacionales) para entender la arquitectura y las propiedades del poro y poder explicar las diferencias de permeabilidad entre los diferentes miembros (86;87).

Los canales TRPV se expresan ampliamente en células sensoriales y no sensoriales donde participan en varias funciones. La activación polimodal alcanza su máxima expresión en los miembros del grupo TRPV1-V4 de esta subfamilia, especialmente en el canal TRPV4 (véase más adelante) (24;88). De entre los diferentes tipos de estímulos, la activación por estímulos mecánicos parece ser una característica presente en la mayoría de miembros de este grupo vaniloide, desde sus representantes en organismos menos evolucionados (*C. elegans* y *D. melanogaster*) a los presentes en organismos superiores (89;90). A nivel de organismo, la percepción del tacto, del oído y del equilibrio, así como a nivel celular, la detección del estiramiento y/o deformación de las membranas celulares (por un cambio en el volumen celular o por cualquier tipo de fuerza), son diferentes tipos de estímulos mecánicos percibidos a través de sistemas mecanorreceptores cuyos componentes eran prácticamente desconocidos hasta la identificación de esta familia (89). De este modo, se ha demostrado que el canal OSM-9 de *C. elegans* (primer miembro de esta subfamilia en ser identificado (91) y homólogo funcional del TRPV4 de mamífero (92)), se localiza en los cilios sensoriales de las neuronas ASH desde donde participa en el comportamiento osmo- y mecanotransductor de estos gusanos, ya que los mutantes para esta proteína no detectan los cambios osmóticos del medio ni perciben la presión por tacto en su nariz (91). Del mismo modo, las proteínas Nan y Ian (los dos miembros vaniloides de *D. melanogaster* identificados recientemente (93;94)) se activan por cambios osmóticos y participan en la respuesta auditiva de estos invertebrados, localizándose en los cilios de las neuronas cordotonaes (23). De entre los miembros en vertebrados, el canal TRPV2 es el primer representante humano que parece funcionar como canal activado por estiramiento (SA) en células de la musculatura vascular (95), y tanto el TRPV4 (primer canal de mamífero identificado sensible a cambios osmóticos) como el TRPV2 (más recientemente) responden al hinchamiento (36;40;95).

Además de esta atribuible función mecanosensora, cuatro miembros de esta subfamilia (TRPV1-V4) se activan por calor, actuando de canales termosensores expresados en diferentes tejidos relacionados con este fin (96). La amplia sensibilidad térmica de estos vaniloides (TRPV2 se activa $T > 53^{\circ}\text{C}$, TRPV1 se activa $T > 43^{\circ}\text{C}$, el TRPV3 se activa $T > 31-39^{\circ}\text{C}$ y el TRPV4 se activa $T > 25-33^{\circ}\text{C}$) junto con

la activación por temperaturas más bajas del TRPM8 (se activa a $T < 25^{\circ}\text{C}$) y del TRPA1 (se activa a $T < 17^{\circ}\text{C}$) (estos seis TRPs constituyen los únicos canales sensibles a variaciones de la temperatura descritos en mamíferos), cubren prácticamente todo el rango de sensaciones térmicas del organismo (24;97). Temperaturas $> 43^{\circ}\text{C}$ y $< 15^{\circ}\text{C}$ no sólo producen una sensación térmica sino que representan un estímulo nocivo que desencadena al mismo tiempo una respuesta dolorosa (97). El TRPV1 es, de momento, el único canal TRP con un papel destacado en la respuesta fisiológica al dolor, activándose por tres estímulos que lo inducen como son: la capsaicina (componente de la guindilla que produce el picor), los protones (acidez) y las altas temperaturas ($> 43^{\circ}\text{C}$) (97).

2.1.3.- El canal TRPV4

El canal TRPV4 fue clonado en paralelo por distintos grupos de investigación en el año 2000 recibiendo diferentes nombres: OTRPC4 (*osmosensitive transient receptor potential channel*) (36), VR-OAC (*vanilloid receptor-related osmotically activated channel*) (40), TRP-12 (41) y VRL-2 (*vanilloid receptor-like 2*) (93). Inicialmente fue descrito como el primer canal catiónico no selectivo sensible a cambios osmóticos identificado en mamíferos y propuesto como un canal osmosensor (36;40;41). No obstante, pronto se observó que esta proteína podía activarse frente a un amplio rango de estímulos físicos y químicos, pasándose a considerar un canal integrador de estímulos capaz de participar en una gran variedad de respuestas fisiológicas y celulares (24;88). Hasta la fecha, se ha demostrado que este canal responde a cambios de temperatura (98-100), a citrato (101), a variaciones del pH (101), a estrés mecánico (102), a ácido araquidónico (AA) y derivados (103), a endocannabinoides (anandamida) (103) y al ligando sintético 4α -PDD (4α -forbol 12,13-didecanoato) (104), a través de diferentes mecanismos que están siendo objeto de estudio y que ponen de manifiesto que el TRPV4 es actualmente el más vivo ejemplo del comportamiento de activación polimodal característico de esta familia de canales TRP (fig. 8) (24). Además, la amplia distribución de la expresión de este canal en distintos tejidos especializados ha sugerido que participaría en varias funciones fisiológicas como: 1) la percepción de la temperatura local y periférica, 2) la mecanotransducción (incluyendo la respuesta de las células endoteliales al flujo o "*shear stress*"), 3) la osmotransducción y 4) el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} (21). Se ha detectado su expresión en: hígado, riñón, vías respiratorias, cerebro, médula,

glándulas sudoríparas, tejido adiposo, corazón, endotelio vascular, piel... (36;40;41;105) (una descripción más específica de su expresión viene dada en los apartados siguientes).

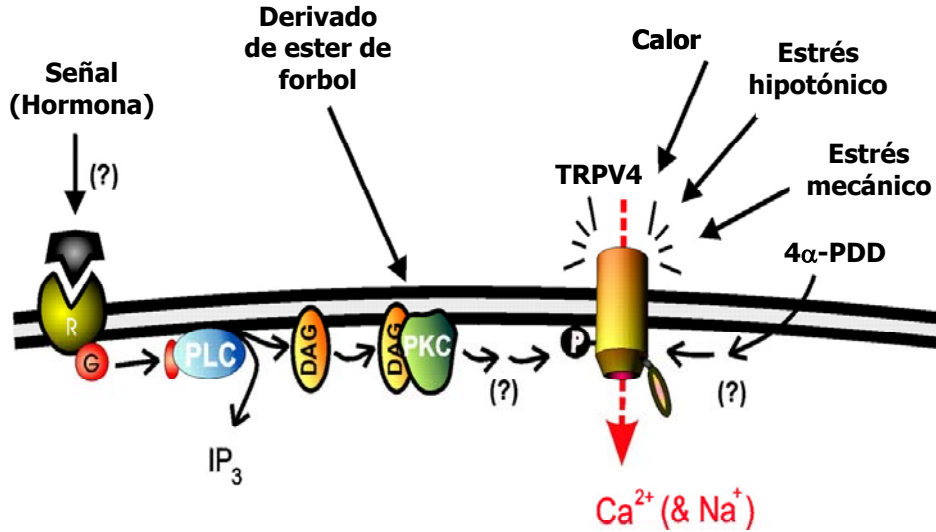


Figura 8. Activación multimodal del canal TRPV4. Modelo molecular de las diferentes vías que convergen en la regulación del canal TRPV4, poniendo de manifiesto su capacidad potencial de integrar y responder a una gran variedad de estímulos. Para descripción detallada de los mecanismos de activación véase texto (reproducido de (24)).

2.1.3.1-. Relación estructura-función del canal TRPV4

El gen del TRPV4 se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 humano (12q24.1) (105), ocupando 15 exones que codifican para una proteína de 871 aa que se organiza estructuralmente tal y como muestra la figura 9.

El TRPV4 forma un poro con un coeficiente de permeabilidad P_{Ca}/P_{Na} de 6.3 ± 0.5 (36) y una secuencia de permeabilidades para cationes monovalentes de $P_K > P_{Cs} > P_{Na} > P_{Li}$ (106). A nivel electrofisiológico, presenta una conductancia unitaria de entrada de aproximadamente 60 pS (a potenciales negativos), y una conductancia unitaria de salida de 90-100 pS (a potenciales positivos) (rectificación de salida) (22). La permeabilidad del canal para el Ca^{2+} viene determinada principalmente por el aspártico Asp682 en la parte carboxilo terminal del poro y por el residuo de metionina Met680 localizado en el centro del supuesto filtro de selectividad

(107). En el extremo N-terminal presenta los característicos dominios de ANK (cuya función era desconocida hasta la realización de este trabajo), varios sitios potenciales de fosforilación (41) y una secuencia muy parecida a las secuencias consenso de reconocimiento a ácido araquidónico (*ARS-like*) que participan en la regulación por este componente lipídico en otros canales TRP (22). Otros residuos que jugarían un papel clave en la regulación de este canal son: 1) la tirosina Y253 cuya mutación afecta la activación por hipotonicidad, 2) el aspártico E797 cuya mutación genera canales abiertos constitutivamente y 3) la fenilalanina F707 cuya mutación altera la regulación del canal por los niveles de Ca^{2+} (22;108) (fig. 6). El canal TRPV4 humano presenta cinco asparaginas susceptibles de ser N-glicosiladas: N201 N207, N651, N784 y N835.

El rojo de rutenio (RR) y cationes trivalentes como el La^{3+} y el Gd^{3+} inhiben el canal, siendo el Gd^{3+} el lantánido con un efecto inhibidor más potente (36).

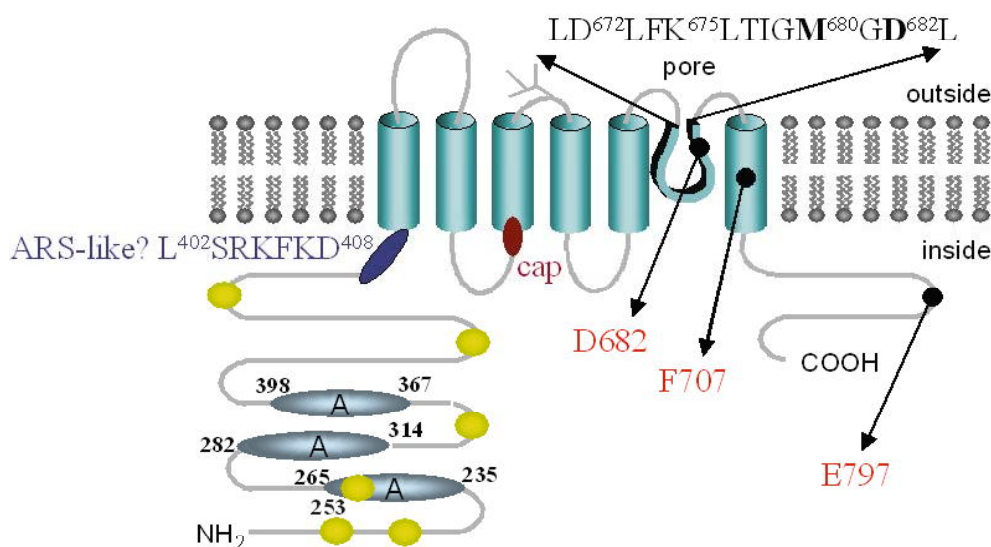


Figura 9. Modelo estructural del canal TRPV4. Los residuos aminoacídicos o las regiones importantes para la funcionalidad del canal están resaltadas en el dibujo. Para una descripción detallada véase texto. Reproducido de (22).

2.1.3.2.- TRPV4: Activación por ligandos

Ligandos sintéticos: 4 α -PDD

El 4 α -forbol 12,13-didecanoato (4 α -PDD) es un activador específico y potente del canal (104). Es un derivado de éster de forbol inactivo cuyo mecanismo de acción implica la interacción directa con el canal en su parte citoplasmática y por tanto requiere la difusión del compuesto al interior celular activando el TRPV4 de forma transitoria (100). El residuo de tirosina T555 situado en el N-terminal del DTM3 parece ser clave en esta activación (109). Aplicaciones sucesivas de 4 α -PDD desensibilizan el canal provocando una disminución de la respuesta. La utilización de este agonista sintético ha permitido disponer de una valiosa herramienta farmacológica para estudiar funcionalmente la proteína tanto en sistemas de expresión heterólogos como en sistemas *in vivo* donde el canal se expresa endógenamente (104). Por ejemplo, ha permitido mostrar que los niveles de Ca²⁺ extra- e intracelulares modulan finamente la apertura del canal (108).

También se ha demostrado que el forbol 12-miristato, 13-acetato (PMA), otro derivado de éster de forbol, activa el canal en este caso mediante la vía de la PKC (110).

Ligandos endógenos: anandamida, AA y derivados

La existencia de activadores sintéticos motivó la búsqueda de ligandos endógenos para el canal TRPV4. Se ha demostrado que la anandamida (AEA, endocanabinoide endógeno) y el ácido araquidónico (AA, lípido endógeno) activan el canal de forma indirecta (103;109). Estas moléculas son metabolizadas intracelularmente por la vía de la citocromo P450, produciendo ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs: 5,6-EET y 8,9-EET) que se unirían directamente al canal, tal y como sugiere la activación del TRPV4 tras la aplicación de EETs en parches de membrana (103).

Fisiológicamente, es conocido que la AEA y los EETs actúan como vasodilatadores ejerciendo su efecto a través de la activación del TRPV1, del BK_{Ca} y otros mecanismos no identificados. Un estudio reciente en cultivos primarios derivados de células aórticas endoteliales normales y de un ratón TRPV4 -/-, demuestra la expresión y regulación del canal TRPV4 por estos ligandos, sugiriendo la participación del TRPV4 en esta respuesta

vascular (111). Además, la detección del TRPV4 en determinadas zonas del hipotálamo (40) sugiere la implicación de este canal en las respuestas psicoactivas a endocannabinoides.

2.1.3.3.- Activación por temperatura

El canal TRPV4 se activa por temperaturas inocuas incluídas dentro del rango fisiológico (de 25°C a 43°C), sugiriendo que a temperatura corporal es un canal constitutivo sensible a pequeñas variaciones de este parámetro (98;100). La temperatura es al mismo tiempo un modulador de la apertura del canal, ya que el nivel de activación por otros estímulos como la hipotonicidad, el 4 α -PDD y el PMA dependen de la temperatura de incubación de las células (102).

Respecto al mecanismo de activación se ha demostrado que cambios en la temperatura no activan el canal en parches de membrana (*inside-out*) a diferencia de lo observado tras la aplicación de 4 α -PDD y EET (100;103), sugiriendo en este caso la producción o activación de un ligando soluble más que la activación directa del canal (100). Se ha demostrado que en la activación por calor también está implicado el residuo de tirosina T555 necesario para la activación por 4 α -PDD, sugiriendo que posiblemente el factor soluble esté estructuralmente relacionado con un derivado de éster de forbol que interaccionaría en esa zona del canal (109).

La función fisiológica del TRPV4 como termoreceptor es apoyada por su expresión en regiones termosensoriales del hipotálamo (98) así como en queratinocitos suprabasales de la piel plantar en ratas (99). Además, el TRPV4 se expresa en el endotelio vascular donde jugaría un papel central en la homeostasis del Ca²⁺ dependiente de temperatura: un aumento de la temperatura corporal favorecería la entrada de Ca²⁺ aumentando la producción de NO (vasodilatador) y viceversa, es decir, el TRPV4 podría mediar la respuesta vascular ante los cambios de temperatura. También podría estar mediando los efectos fisiopatológicos inflamatorios de la fiebre, por ejemplo, cambiando las propiedades de la barrera del endotelio que dependen de la entrada de Ca²⁺ (100). Finalmente, estudios en ratones TRPV4 -/- muestran un comportamiento alterado en la percepción del calor en estos animales (112;113).

2.1.3.4.- Activación por hipotonicidad

El TRPV4 es activado tras el hinchamiento celular, lo que no significa necesariamente que este canal actúe como un osmosensor celular *per se*. En sistemas de expresión heterólogos, el canal responde a variaciones osmóticas muy pequeñas (del 10%) dentro del rango fisiológico (el valor de osmolaridad estándar se considera en aproximadamente 295 mosmol/l). Mientras que la hipotonicidad produce una activación del canal, un aumento en la tonicidad del medio lo inactiva (36;40).

Se ha demostrado la participación de dos vías reguladoras para explicar la activación del canal por hipotonicidad, después de que los siguientes mecanismos fueran descartados: 1) variaciones de la fuerza iónica intracelular (106), 2) proteínas G (106), 3) PKCs o MAP quinasas (110) y 4) la activación del canal por estiramiento de la membrana (36). En primer lugar, el estímulo hipotónico regula el canal a través de la fosforilación del residuo de tirosina Y253 mediante una src quinasa de la subfamilia Lyn (114), siendo éste el primer ejemplo de regulación directa por fosforilación de tirosinas descrito en un miembro de la familia de los TRP. En segundo lugar, en presencia del estímulo hipotónico, tal y como he explicado en la Parte I de la introducción, se activa la PLA₂, aumentando los niveles de AA cuya metabolización a través de la vía del citP450 genera EETs que se unen directamente al canal controlando su abertura (109;111).

La distribución anatómica del TRPV4 concuerda con una posible función osmosensora, regulando la presión osmótica sistémica y la presión hidrostática en diferentes compartimentos del cuerpo. De este modo, el TRPV4 ha sido identificado en células epiteliales de los túbulos renales, en las glándulas sudoríparas, en la *stria vascularis* de la cóclea, en células endoteliales y en estructuras del cerebro implicadas en la osmoregulación como el órgano vascular de la *lamina terminalis* y la región media hipotalámica preóptica (36;40;67;105;115). Varios tipos celulares de las vías respiratorias, sometidos a continuas fluctuaciones osmóticas de la capa de líquido que lo recubre tanto en condiciones normales como patológicas (véase apartado III de la introducción), también expresan el TRPV4 (30;105;116).

Esta característica activación por hinchamiento, posiciona al canal TRPV4 como un candidato ideal para mediar respuestas mecanosensoras aunque se haya demostrado que no es un canal mecanosensible *per se* (36). De igual forma, el TRPV4 no es directamente un osmosensor, pero en ambos casos puede formar parte del elemento transductor y participar en estas respuestas.

Su función mecanotransductora viene defendida en parte por su distribución anatómica. Experimentos de hibridación *in situ* demuestran su expresión en las células mecanotransductoras del oído interno (cóclea), terminales mecanosensores cutáneos como las células de Merkel y en ganglios sensoriales periféricos (36;40;117). Su ya mencionada expresión en el corazón y en células del endotelio vascular sugiere que podría constituir el canal candidato responsable de la entrada de Ca^{2+} inducida por *shear stress* (41;100).

Estudios recientes en modelos animales ponen de manifiesto esta función osmo/mecanotransductora del TRPV4 *in vivo* (118;119). En gusanos *C. elegans* deficientes para el gen *osm-9*, la expresión transgénica del canal TRPV4 en neuronas ASH permite recuperar la osmo- y mecanosensibilidad perdida en estos mutantes *osm-9* (92). En *Drosophila* la disrupción del gen *NAN* resulta en la pérdida completa de la audición (94). Experimentos realizados en ratones *knock out* para el TRPV4 muestran deficiencias en el mantenimiento del equilibrio osmótico de estos animales: ingieren menos agua, tienen una presión osmótica más elevada, los niveles de vasopresina (ADH, hormona antidiurética) están alterados... indicando un defecto en la percepción osmótica del individuo (120;121). Estos ratones *knock out* también presentan desajustadas otras funciones sensoriales: la percepción de la presión (101), la percepción del sonido (122) y la percepción del dolor asociado a un cambio osmótico mediado a través de neuronas nociceptivas aferentes y potenciado durante la inflamación (123-125).

3. LA FIBROSIS QUÍSTICA.

3.1.- Perspectiva histórica de la Fibrosis quística

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en la población caucásica. Aproximadamente 1 de cada 25 individuos es portador de un alelo mutado (1 individuo afectado cada 2500 nacimientos) (126). Fenotípicamente, es una patología muy compleja. La historia de la enfermedad (resumida brevemente en la tabla 1) es buena muestra de ello. Evidencias de un sudor salado en estos individuos, se encuentran recogidas en textos folklóricos que fechan del medievo. No obstante, han tenido que pasar muchos años (hasta principios de los 80) para entender la relación existente entre esta anomalía en la sudoración y las graves alteraciones digestivas y pulmonares descritas por Fanconi por primera vez en el 1936 (127).

Antigüedad-Edad media: textos folklóricos describiendo costumbres supersticiosas, encantamientos, males de ojo... sobre aquellos niños que tenían sudor salado al besarlos
1595: Peter Paaw; primera biopsia documentada describiendo alteraciones pancreáticas y huyendo de las creencias esotéricas de la época
1936: Guido Fanconi-von Grebel hace la primera descripción sintomática detallada de la enfermedad relacionando anomalías digestivas y respiratorias
1938: Dorothy Andersen usa por primera vez el término de Fibrosis Quística del páncreas
1945: S. Farber emplea el término mucoviscidosis para referirse al acúmulo de moco observado en páncreas y pulmón
1946: Dorothy Andersen describe el carácter autosómico recesivo de la enfermedad
1953: Paul di Sant'Agnese redescubre casuísticamente y asocia el concepto de sudor salado a la mucoviscidosis describiendo el primer test de diagnóstico para la enfermedad usado hasta nuestros días
1968: Primer defecto celular asociado a la FQ del páncreas: acúmulo de glicógeno
1970s: Descripción de un gran número de alteraciones en células con FQ, muchas de las cuales han sido irreproducibles y desestimadas
1980s: Paul Quinton, Michael Knowles i Richard Boucher describen un transporte de sal alterado en los epitelios de los órganos afectados como causante de las alteraciones fisiológicas
1989: identificación molecular del gen responsable de la FQ (CFTR)
1990: Primer estudio de complementación del defecto de la CF
1991: Descubrimiento de que la CFTR es un canal de Cl⁻
1991-2006:

- Identificación de la d508F como mutación causante de un 70% de los casos de FQ debido a un mal procesamiento del canal
- Primer ensayo de terapia génica en pacientes con FQ
- Administración de DNasa
- Avances en el entendimiento de la patogénesis de la FQ: CFTR es una proteína reguladora de muchos procesos celulares
- Ensayos clínicos de nuevos tratamientos en progresión
- Aprobación de la administración de tobramicina; antibiótico principal causa en la mejora de la esperanza de vida de estos pacientes

Tabla 1. Perspectiva histórica de la base fisiológica de la Fibrosis Quística.

Ni la esperada identificación molecular del gen responsable de la enfermedad en 1989 (128), aunque ha permitido un gran avance, ha sido suficiente para entender con exactitud la base fisiopatológica de la enfermedad.

3.2.- CFTR: gen y proteína

Mutaciones en el gen de la CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) producen la FQ (126;129). Se encuentra localizado en el cromosoma 7q31.2 humano, ocupando aproximadamente 190000 pares de bases (pb). Contiene 27 exones que se transcriben en un mRNA de 6500 pb que a su vez se traduce a una proteína de 1480 aminoácidos (aa) (128;130). La proteína CFTR pertenece a la superfamilia de transportadores ABC (*ATP Binding Cassette*), pero a diferencia de los otros miembros de esta familia que median un transporte vectorial dependiente de ATP, la CFTR funciona como canal permitiendo el flujo bidireccional de Cl^- y de otros aniones (HCO_3^-) (131).

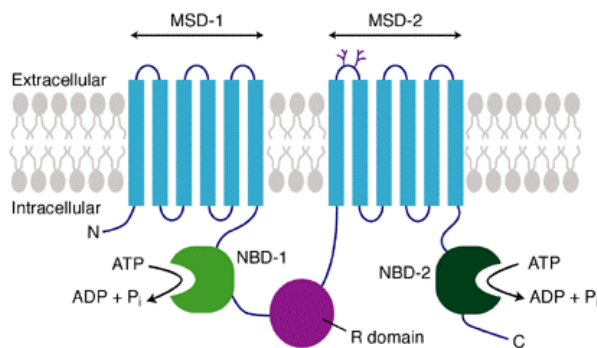


Figura 3. Topología del canal CFTR.

Estructuralmente, la proteína CFTR presenta dos dominios transmembrana (MSD-1 y MSD-2) y dos dominios de unión a nucleótidos (NBD) al igual que los demás miembros de su familia (transportadores ABC). En cambio, es el único miembro que contiene un dominio regulador (R) con múltiples secuencias consenso de fosforilación y que no funciona de transportador sino que actúa como canal, permitiendo el flujo bidireccional de iones Cl^- y de otros aniones de mayor peso molecular.

Su topología, análoga a los transportadores ABC consta de (fig. 3): dos dominios transmembrana (MSD, *membrane spanning domain*) formados cada uno de ellos por 6 segmentos transmembrana que se estructuran delimitando el poro, dos dominios intracelulares de unión a nucleótidos (NBD, *nucleotide binding domain*) que unen ATP y un dominio regulador (R), exclusivo en la familia, que contiene múltiples secuencias consenso de fosforilación para la PKA y la PKC (132). La apertura del canal y la regulación de su actividad implican la fosforilación del dominio R al mismo tiempo que requieren de la unión de ATP en cada uno de los NBD (131). La proteína madura es N-glicosilada en los residuos 894 y 900 presentes en la *loop* extracelular entre los segmentos transmembrana M7 y M8 (133).

La proteína CFTR se localiza en la cara apical de las células epiteliales mediando el transporte hidroelectrolítico en los órganos con tejidos secretores y/o absorbivos en los que se expresa: pulmón, páncreas, hígado, intestino y glándulas

sudoríparas principalmente (134). Tan importante como su función primaria de canal de Cl^- activable por AMPc, es la función reguladora que la proteína CFTR ejerce sobre un gran número de procesos celulares y de transporte iónico (135;136). Por ejemplo, se ha demostrado que regula canales de Na^+ (ENaC) (137), canales de Cl^- (ORCC (20)), canales de K^+ (del tipo Maxi K^+ i hIK (29;30)), el intercambiador de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ (138), el tránsito vesicular (139;140), el pH (141;142), el transporte de ATP (143) y el volumen celular (29;144) (cuya base molecular está siendo objeto principal de investigación (91;135-137;145)). En el caso que me ocupa, parte del trabajo de esta tesis va dirigido a la elucidación de los mecanismos moleculares que participan en la regulación del volumen celular ya que fuimos los primeros en demostrar que el proceso de RVD era dependiente de la CFTR en varios modelos de células epiteliales (29;146;147). Cabe mencionar, que muchos de los mecanismos moleculares de regulación propuestos se basan en la capacidad de la proteína CFTR para formar complejos proteicos de señalización a través de su interacción con proteínas adaptadoras con dominios PDZ, ya que en su extremo C-terminal presenta una secuencia de reconocimiento de estos dominios (137;145;148;149).

3.2.1.- Mutaciones en el gen de la CFTR: el caso de la $\Delta 508\text{F}$

Se han descrito más de 1000 mutaciones situadas a lo largo de toda la región codificante y la región promotora del gen CFTR que pueden clasificarse según varios criterios (véase cuadro 2) (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). La mayoría de mutaciones identificadas son casos raros normalmente asociados a un individuo o familia, exceptuando la mutación $\Delta 508\text{F}$ que representa un 70% de los casos de FQ y 4 mutaciones que se manifiestan con una frecuencia superior al 1% (G542X, N1303K, G551D y W1282X) (150).

La mutación $\Delta 508\text{F}$ (delección de 3pb en el exón 10 que resulta en la pérdida de la fenilalanina de la posición 508) se caracteriza por un mal plegamiento de la proteína quedando ésta retenida en el retículo endoplasmático (RE) (133). No obstante, se ha demostrado que las bajas temperaturas y componentes como el glicerol permiten que una fracción de la proteína mutada escape de los mecanismos de control de calidad del RE y genere canales activables por AMPc en la membrana plasmática (151). La incidencia de esta mutación es variable geográficamente existiendo un gradiente decreciente del noroeste al sudeste europeo, siendo Dinamarca el país con una mayor prevalencia (90%) y Turquía el menor (18%).

Para poder explicar la alta prevalencia de esta mutación se han propuesto varias teorías basadas en dos mecanismos evolutivos: o bien ocurrió un efecto fundador o bien hubo una ventaja selectiva del heterocigoto (152). Se han evaluado los mecanismos moleculares que permitieran explicar la posibilidad de que los individuos heterocigotos fueran más resistentes a la enfermedad del cólera, a las infecciones de *Salmonella Typhi* e incluso a la enterotoxina de *Escherichia Coli* (127), aunque ninguna de estas teorías es ampliamente aceptada.

Cuadro 2. Clasificación de las mutaciones de la CFTR

I-. Según el mecanismo molecular alterado

- 1) **Mutaciones de tipo I** (biosíntesis de la proteína alterada): traducciones sin sentido, *splicings* alternativos aberrantes y *frameshift*. Incluye mutaciones que manifiestan los fenotipos más severos de la enfermedad (p.ej. G542X) así como los más suaves (p.ej. *splicing* aberrante del exón 9) dependiendo de la capacidad que tenga cada mutación de sintetizar proteína con actividad residual.
- 2) **Mutaciones de tipo II** (maduración de la proteína afectada): a este grupo pertenece la mutación $\Delta 508F$. La proteína es sintetizada pero queda retenida en el retículo endoplasmático debido a un defecto en el proceso de maduración sin alcanzar la membrana plasmática.
- 3) **Mutaciones de tipo III** (afectan a la regulación y la obertura del canal): todas las mutaciones de este tipo se encuentran localizadas en los NBDs y se caracterizan porque las proteínas resultantes son procesadas correctamente llegando a la membrana plasmática pero no son funcionales ya que no responden a estímulos activadores como el AMPc (p.ej. G551D).
- 4) **Mutaciones de tipo IV** (afectan a la conductancia del canal): después de un correcto procesamiento hasta la membrana, las corrientes de Cl^- producidas en respuesta a un estímulo son reducidas (p.ej. R117H).
- 5) **Mutaciones de tipo V** (afectan a la estabilidad de la proteína): la delección de aa en el extremo C-terminal reduce el tiempo de vida media de estas proteínas (p.ej. Q1412X), manifestándose un fenotipo severo con la pérdida tan sólo de 70 aminoácidos del extremo C-terminal.

II-. Según las manifestaciones clínicas (ver apartado siguiente)

- 1) **Mutaciones severas:** no hay proteína funcional, $[Cl^-] > 80 \text{ meq/l}$ en el sudor, IP (95%), problemas hepáticos (3-5%), diagnóstico temprano (<1 año), MI (20%), problemas respiratorios graves (clase I, II y III).
- 2) **Mutaciones suaves:** se producen pequeñas cantidades de proteína, $[Cl^-] < 80 \text{ meq/l}$ en el sudor, IP (85%), diagnóstico tardío (>10 años), no MI, problemas respiratorios más suaves (clase IV).

3.3.- Patogénesis de la Fibrosis quística

En un paciente con FQ se producen alteraciones funcionales muy diversas en la mayoría de tejidos con epitelios absorptivos y/o secretores en los que normalmente se expresa la CFTR (153). A pesar de conocer el defecto primario de la enfermedad (la proteína CFTR), está siendo muy difícil determinar los mecanismos a través de los cuales la patología se inicia y progresa a partir de la mutación. En este

apartado, describiré brevemente las manifestaciones clínicas más relevantes de esta enfermedad, extendiéndome en las bases del desarrollo fisiopatológico de la enfermedad pulmonar que se desencadena y es responsable de la mayoría de las muertes en estos pacientes (90% de los casos) (126;153;154).

3.3.1.- Glándulas sudoríparas

Es el órgano secretor responsable de la manifestación clínica más característica de estos pacientes: la producción de un sudor salado con una concentración de sales de 3 a 5 veces superior a un individuo normal, que aunque irrelevante patológicamente, sigue utilizándose como principal herramienta de diagnóstico con el Test de Testson y Cooke (127). La falta de reabsorción de Cl^- y de Na^+ desde el lumen del conducto hacia el interior de las células es la causa de esta anomalía (155).

3.3.2.- Tracto digestivo

En el caso de la insuficiencia pancreática (IP) (presente en un 95% de los casos de FQ), la ausencia funcional de la CFTR en la membrana produce una secreción pancreática de volumen y pH reducido (baja concentración de HCO_3^-) provocando que los proenzimas pancreáticos queden retenidos en los conductos pancreáticos a concentraciones anormalmente elevadas y se activen prematuramente llevando a la destrucción del tejido y fibrosis (127). La importancia de la función secretora de HCO_3^- de la CFTR en la fisiopatología pancreática queda demostrada con la identificación de mutantes de la proteína CFTR que, presentando alterado el transporte de Cl^- pero no el de HCO_3^- , no desarrollan IP (142;156). La IP conlleva a un estado de malnutrición en la mayoría de pacientes y en un pequeño número de casos al desarrollo de diabetes (126).

Tanto los conductos de la vesícula biliar como el intestino, también pueden presentar un acúmulo de moco deshidratado provocando deficiencias hepáticas durante el desarrollo de esta enfermedad (>30% de los pacientes) y, cirrosis hepática (10%) en pacientes en edades avanzadas debido a la infiltración de los ácidos grasos (>90% de los pacientes) (126;154).

Estas alteraciones del aparato digestivo son las responsables de la presencia del *meconium ileum* (tapón de moco espeso, elástico y deshidratado formado por un

acúmulo de proteínas no digeridas que bloquea el intestino delgado) en un 10% de los recién nacidos con FQ (127).

3.3.3.- Aparato reproductor

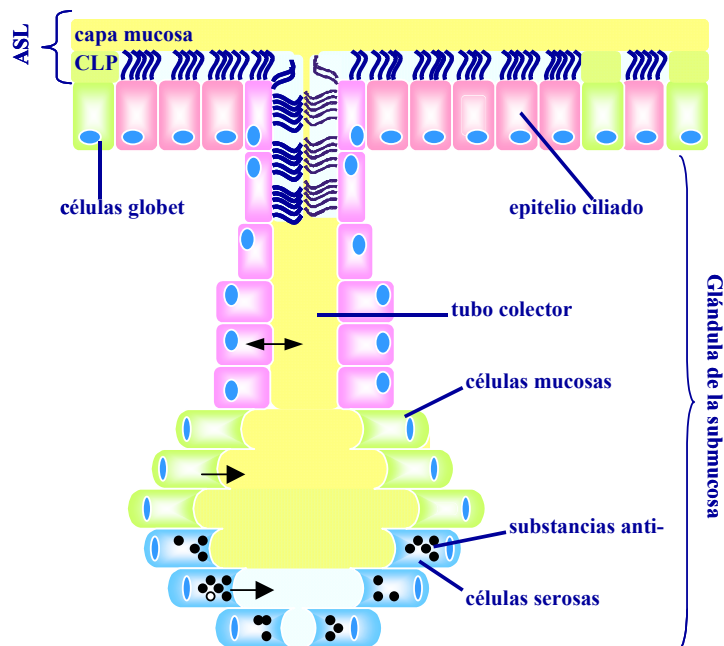
La infertilidad se manifiesta mayoritariamente en el sexo masculino (>90% de los pacientes) con azoospermia, debido a la acumulación de moco y malformación de los vasos deferentes y el conducto epididimal. La función reproductora de las mujeres no suele verse afectada a pesar de que el moco pueda estar deshidratado y dificultar la fertilidad (126).

3.3.4.- Vías respiratorias

La fibrosis quística es una forma genética de la bronquitis crónica (153). Las afectaciones pulmonares (infección pulmonar e inflamación) son la principal causa de morbilidad y mortalidad en estos pacientes.

Tal y como muestra la figura 4, la superficie de las vías respiratorias está delimitada por una monocapa compacta de células ciliadas columnares entre las cuales se intercalan células productoras de moco (*globet cells*). También encontramos invaginaciones del epitelio que derivan en las glándulas de la submucosa formadas por estructuras acinares especializadas en la secreción de moco (células mucosas) y en la secreción de agua, electrolitos

Fig. 4. Tipos celulares de las vías respiratorias superiores.
Para detalles véase texto



y una mezcla de sustancias anti-: antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes (células serosas), estructuras que confluyen en un tubo colector que termina en células ciliadas que se incorporan al epitelio (157).

Una de las funciones más importantes de todas estas células es la de determinar la composición y contribuir al mantenimiento homeostático de la capa de líquido que recubre su superficie: el ASL (*airway surface liquid*) (158). En el ASL distinguimos dos zonas: una capa mucosa de altura variable (7-70 μ m) y una capa de líquido periciliar de altura constante (CLP, 7 μ m) (fig. 4) (153). La capa de moco está compuesta principalmente de mucinas altamente O-glicosiladas secretadas por las células globet y las células mucosas de las glándulas de la submucosa (un 80% del peso molecular de las mucinas son oligosacáridos), cuya elevada diversidad en carbohidratos asegura la interacción y retención de todo tipo de partículas inhaladas durante la respiración (159). La composición de esta capa viscosa no es homogénea ya que parece depender de distintos factores fisiológicamente variables que están siendo objeto de investigación: tipo de mucina secretada, el pH, el estado de hidratación del medio... (160). Por debajo de esta capa mucosa se encuentra la CLP cuyas propiedades vienen determinadas directamente por el transporte de agua y electrolitos de las células epiteliales ciliadas. La baja viscosidad de esta CLP permite el movimiento rápido de los cilios que se bañan en ella produciendo un desplazamiento de la capa mucosa adyacente hacia la parte superior del tracto respiratorio. Este fenómeno, conocido como aclaramiento mucociliar (similar al efecto de una cinta transportadora), constituye el principal mecanismo de defensa innata en el pulmón para mantener la esterilidad de las vías (159). No obstante, debido a que el aclaramiento mucociliar de un agente infeccioso desde la parte más alejada de las vías respiratorias hasta la superficie requiere unas 6h, el ASL contiene sustancias antimicrobianas como las lisosimas, lactoferrinas y defensinas que actúan durante todo este tiempo para evitar su replicación (153). Además, la CLP funciona también como capa lubricante facilitando la expulsión del moco durante el limpiamiento inducido por la tos, proceso independiente de la acción de los cilios (159). En el caso de asentamiento de patógenos en el moco se activa una segunda línea de defensa: los macrófagos que patrullan la CLP liberan toda una serie de citoquinas desencadenando una respuesta inmune adaptativa que implica la llegada de más células inflamatorias (neutrófilos) (159).

En la cara apical de las células epiteliales encontramos mayoritariamente tres canales implicados en la dirección y la razón del transporte iónico: la CFTR, el ENaC (*epithelial Na⁺ channel*) y los CaCC (*calcium activated chloride channels*) (153). La absorción es un proceso gobernado por la captación del Na⁺ a través del canal ENaC mientras que el Cl⁻ es captado via paracelular para mantener la electroneutralidad junto con el agua que osmóticamente acompaña a estos iones (fig. 5A) El gradiente que favorece la entrada de este Na⁺, es mantenido gracias al funcionamiento de la bomba de Na⁺/K⁺-ATPasa localizada en la membrana basolateral (27). La actividad basal del ENaC viene regulada por la CFTR (155) de manera que si se produce un exceso de deshidratación del ASL la CFTR inhibe parcial o totalmente el ENaC, transformando el epitelio en secretor. Este proceso de secreción iónica se rige por la liberación de Cl⁻ al lumen de las vías respiratorias a través del canal CFTR, cuyo gradiente electroquímico favorable a la salida de este ión es mantenido a través del funcionamiento del cotransportador de Na⁺-K⁺-2Cl⁻ en la membrana basolateral. Durante este proceso secretor el Na⁺ se libera al lumen mayoritariamente a través de la vía paracelular junto con el agua osmotica que acompaña a estos iones (fig. 5B) (135). Los CaCC presentes en la cara apical son también canales de Cl⁻ pero con distinta relevancia funcional respecto a la CFTR: mientras la CFTR es la responsable de mantener la tonicidad y la conductancia basal del Cl⁻ en el epitelio, los CaCC sólo se activan frente a determinados estímulos agudos manteniéndose inactivos en condiciones basales (161;162).

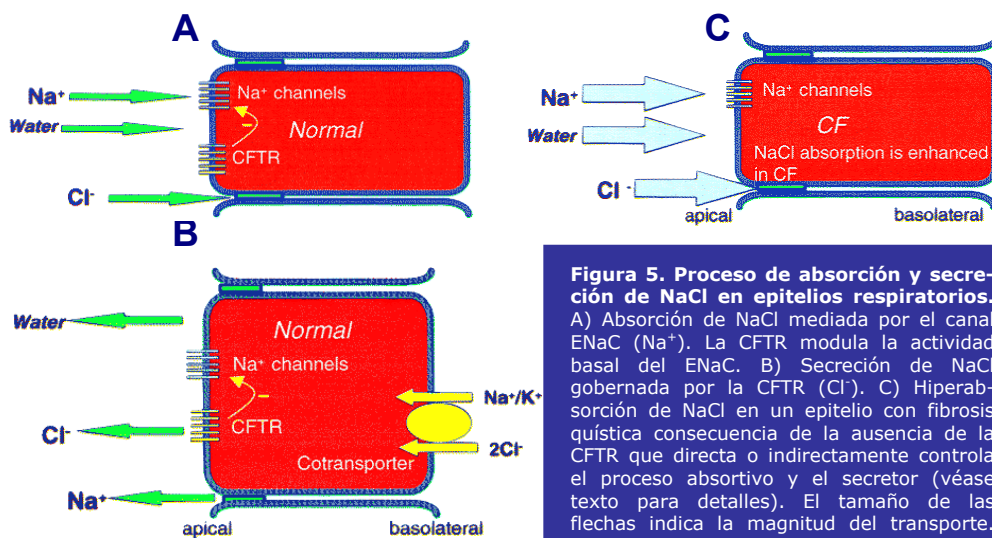


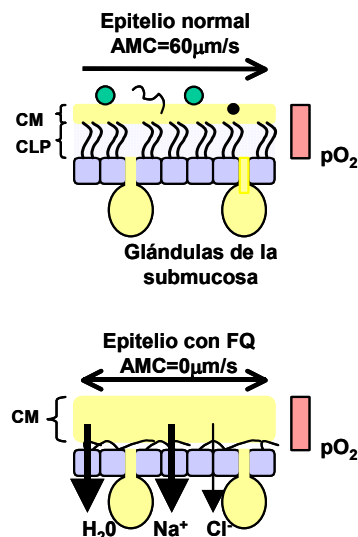
Figura 5. Proceso de absorción y secreción de NaCl en epitelios respiratorios. A) Absorción de NaCl mediada por el canal ENaC (Na⁺). La CFTR modula la actividad basal del ENaC. B) Secreción de NaCl gobernada por la CFTR (Cl⁻). C) Hiperabsorción de NaCl en un epitelio con fibrosis quística consecuencia de la ausencia de la CFTR que directa o indirectamente controla el proceso absorptivo y el secretor (véase texto para detalles). El tamaño de las flechas indica la magnitud del transporte. Figura reproducida de (27).

Por lo tanto, en un individuo con fibrosis quística el defecto primario (la ausencia de la CFTR funcional en la cara apical de las células epiteliales) lleva a un desajuste en el transporte hidroelectrolítico. Por un lado se produce un exceso en la absorción de Na^+ como consecuencia de la falta de inhibición de la CFTR sobre este canal, al mismo tiempo que el epitelio ha perdido la capacidad de secretar debido a la ausencia de la CFTR en la membrana (fig 5C) (27;153).

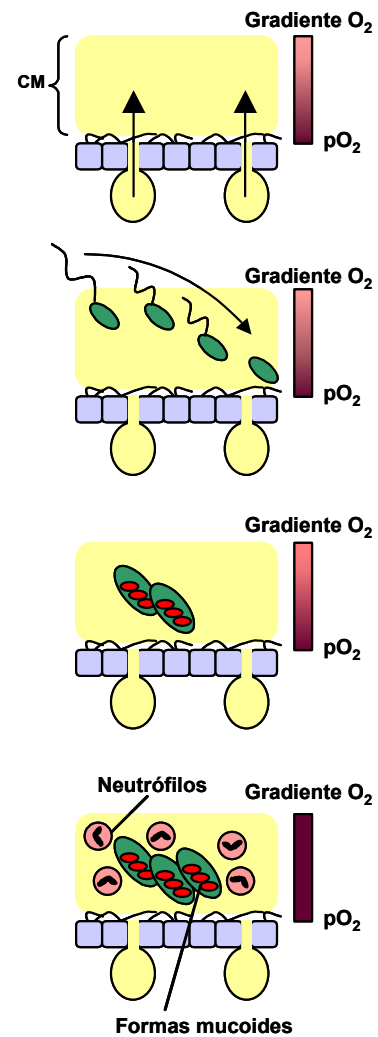
En condiciones normales, el epitelio respiratorio tiene la capacidad de evaluar el volumen del ASL y mantener un balance entre la secreción y la absorción iónica (158). Al igual que sucedía con la RVD, el sensor y los mecanismos moleculares implicados en el control del estado de hidratación del ASL no se conocen con certeza, aunque varias evidencias apuntan a un mecanismo de regulación autocrina a través de vías de señalización purinérgicas altamente compartimentalizadas en la cara apical de estas células epiteliales (fig. 6) (20;158;161;163-165). La liberación de ATP por parte del epitelio en respuesta a determinados estímulos físicos (cambios de volumen) y mecánicos (*shear stress*) parece ser dependiente de la función de la CFTR, llegándose a sugerir que la vía a través de la cual el epitelio libera ATP es el propio canal o alguna vía modulada por él (143;166), aunque ciertamente, no existe ninguna propuesta ampliamente aceptada.

Se han propuesto varias teorías para explicar la base fisiopatológica de las alteraciones observadas en las vías respiratorias de pacientes con FQ (126). La hipótesis actualmente más aceptada defendida ampliamente por el Dr. R. Boucher se basa en un ineficaz aclaramiento mucociliar consecuencia de una regulación defectuosa del volumen del ASL (fig. 7) (167). Las vías respiratorias de pacientes con FQ presentan un transporte iónico alterado debido a la ausencia funcional de la proteína CFTR en la membrana (fig.5C), produciéndose una hiperabsorción de Na^+ a través del canal ENaC (consecuencia de la falta de inhibición que la CFTR ejerce sobre este canal por un mecanismo desconocido (161)) y una secreción basal de Cl^- ausente o reducida (la diferencia de

Figura 7. Teoría del aclaramiento mucociliar alterado (véase texto)



potencial transepitelial pasa a ser de <30mV en individuos normales a >35mV) (126). Este desajuste hidroelectrolítico favorece la deshidratación del ASL isotónico ([NaCl] es aproximadamente de 150 mM) llevando a una depleción del agua de la CLP (167). La capa mucosa, ahora más viscosa y menos elástica ya que al actuar como reservorio de agua de la CLP también está deshidratada, se adhiere a la superficie de las células epiteliales impidiendo el batido ciliar e iniciando el estancamiento del moco que se irá engrosando y solidificando consecuencia de la secreción continua de mucinas por parte de las células goblet. El estancamiento de este moco representa un nido idóneo para el asentamiento de las infecciones bacterianas (principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*) que en un contexto cada vez más anaeróbico acaban desarrollando el fenotipo mucóide, característico de la cronicidad de estos pacientes (168) y del declive progresivo de la función pulmonar (169). Cabe destacar que la depleción de agua del ASL al mismo tiempo compromete la función lubricante de la CLP ya que supone la adherencia de las mucinas de la capa mucosa con los carbohidratos de la superficie de las células epiteliales provocando un "efecto Velcro" que inhibe el limpiamiento inducido por la tos (159).



Por otro lado, hay quienes defienden que la secreción de mucinas de volumen y pH reducido y altamente viscosa debido a la deficiencia de fluido hidroelectrolítico secretado por las células serosas de las glándulas de la submucosa en pacientes con FQ, es la responsable de la deshidratación y hiperviscosidad del ASL (157;170). La aceptación de esta teoría, propuesta por primera vez por Farber en 1945 quien introdujo el término *mucoviscidosis* para denominar la enfermedad, pone de manifiesto un punto actualmente conflictivo para explicar la base del deficiente aclaramiento mucociliar observado en estos pacientes. Hasta ahora se consideraba que el mayor nivel de expresión de la CFTR se producía en las células

serosas de las glándulas de la submucosa y por ello el defecto de la proteína se haría más notorio en la función secretora de estas glándulas (171). No obstante, un trabajo muy reciente demuestra que la CFTR se expresa mayoritariamente en las células epiteliales ciliadas que recubren la mayor parte de la superficie de las vías, considerando que la depleción del volumen del ASL es la base del problema del aclaramiento mucociliar (172). Ninguna de estas dos teorías es excluyente y por lo tanto ambos defectos se estarían produciendo conjuntamente aunque contribuyendo en diferente medida al desequilibrio final de la relación mucinas/volumen del ASL.

La infección y continua colonización bacteriana son el estímulo primario de la inflamación. En pacientes con FQ, cuando el moco es muy espeso, los neutrófilos no pueden penetrar en él, pero continúan liberando elastasa y otros factores que promueven la inflamación y la secreción de más mucinas, iniciándose un círculo vicioso que acaba dañando irreversiblemente el epitelio, produciendo bronquiectasis y finalmente la muerte del paciente por parada respiratoria (127). Esta teoría de la hiperinflamación del epitelio pulmonar está ampliamente aceptada; no obstante, la sucesión en el tiempo con la infección (ya que algunos autores han demostrado que en estos pacientes existe una reacción inflamatoria previa a la infección bacteriana) y los mecanismos que la provocan son todavía motivo de discusión (126).

Otra hipótesis propuesta para explicar la alta susceptibilidad a la infección en epitelios respiratorios se basa en la existencia de receptores celulares para determinados patógenos (especialmente *Pseudomonas aeruginosa* causante de las infecciones crónicas en un 80% de estos pacientes (169)), cuyas propiedades de adhesión estarían modificadas en epitelios respiratorios con FQ. Se ha demostrado que la proteína CFTR actuaría como receptor de superficie de *P. Aeruginosa* y *Salmonella Typhi*, internalizando las bacterias para su destrucción (169;173;174). Del mismo modo, el receptor de superficie GMI ejercería esta función sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus*: en epitelios con FQ la ausencia de la CFTR y la disminución de la forma sializada del receptor GMI (debida a la alteración del pH de las organelas) supondría una reducción en la eficiencia de internalización de estos patógenos favoreciendo su capacidad de colonizar el epitelio (126). Esta función de la proteína CFTR proporciona la base del mecanismo molecular que explicaría la ventaja selectiva de los heterocigotos mencionada anteriormente aunque muy discutida (169).

Finalmente, una teoría muy defendida pero prácticamente desestimada, se basa en la asunción de que el ASL de las vías respiratorias, análogamente al funcionamiento de las glándulas sudoríparas, es hipotónico. Éste sería un requerimiento básico para la activación de las defensinas (antibióticos endógenos presentes en el medio), condición que no se cumpliría en el ASL de pacientes con FQ siendo más susceptibles a infecciones (126). El desarrollo de técnicas y modelos celulares sofisticados ha permitido medir la composición del ASL y dejar desbancada la contribución de esta hipótesis a la patogénesis de la enfermedad (167;175).

Resumiendo, la idea consensuada creciente para explicar la patogénesis de las vías respiratorias es que la pérdida de función de la CFTR (el defecto primario) se refleja en un desequilibrio entre la proporción de mucinas y el volumen del ASL. En los primeros estadios de la patología se produciría una secreción correcta de mucinas pero una deficiencia en la secreción de volumen acuoso, alterando la proporción de mucinas/agua del ASL. Como consecuencia, el aclaramiento mucociliar defectuoso facilitaría las infecciones que a su vez desencadenarían una respuesta inflamatoria exagerada, provocando un aumento en la secreción de mucinas y acentuando el desequilibrio entre las mucinas y el volumen. De este modo, varias de estas teorías estarían contribuyendo (aunque en diferente medida y en diferentes estadios) al desarrollo fisiopatológico de la enfermedad.

Esta descripción fisiopatológica pone de manifiesto: 1) la importancia de la doble función de la proteína CFTR como canal y como regulador de otros procesos de transporte en el desarrollo de la enfermedad, 2) la necesidad de caracterizar todas las alteraciones para poder determinar su contribución al desarrollo fisiopatológico de la enfermedad y, finalmente, 3) la necesidad de desarrollar terapias dirigidas a favorecer la hidratación del ASL para restablecer el aclaramiento mucociliar.

4. ANTECEDENTES

Nuestro grupo de investigación lleva años contribuyendo al estudio de los mecanismos moleculares implicados en la RVD en varios modelos de células epiteliales. Se propuso la Glicoproteína-P como el canal de Cl^- regulado por aumentos del volumen celular, aunque posteriormente se comprobó que era un regulador del desconocido y aun elusivo canal de Cl^- (176;177). También se demostró que su actividad era regulada por la PKC (178;179). No obstante, el descubrimiento más interesante sobre el que se basa el desarrollo de esta tesis, fue la demostración de que en varios modelos de células epiteliales con fibrosis quística se perdía la capacidad de recuperar el volumen celular en condiciones de hipotonicidad. Tanto las criptas intestinales derivadas de un ratón *knock out* para la CFTR (147), como las células epiteliales traqueales derivadas de un paciente con FQ (fig. 8A) (29), eran incapaces de desarrollar una efectiva RVD. En ambos casos, esta RVD desajustada era debida a la falta de activación de una conductancia de K^+ que proporcionara la vía de salida para este ión (29;147). La reintroducción del gen CFTR en las células epiteliales traqueales con FQ permitía recuperar la capacidad de regular el volumen y la activación de la conductancia de K^+ (fig. 8B-D) (147).

Como he comentado anteriormente, la mayor parte de las células epiteliales median esta respuesta a través de la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (6;7). Este ha sido también el caso de nuestros modelos de líneas celulares de epitelio respiratorio humano. La caracterización electrofisiológica de células epiteliales bronquiales permitió demostrar que el canal BK_{Ca} ó Maxi-K^+ (de alta conductancia) es el canal de K^+ responsable de mediar la RVD (30), mientras que en células epiteliales traqueales la activación del canal IK_{Ca} ó KCNN4 (de conductancia intermedia) media dicha regulación (29). En ambas líneas celulares la RVD era dependiente del Ca^{2+} extracelular (29;30). Además, en las células de epitelio respiratorio bronquial, esta respuesta reguladora de volumen era inhibida por Gd^{3+} (fig. 8E) (30). El conjunto de estos resultados, junto con la observación de que la presencia de un ionóforo de Ca^{2+} en el medio extracelular (ionomicina) en células epiteliales respiratorias con fibrosis quística permitía recuperar la RVD (resultados no publicados), sugirió que la falta de activación de estos canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} podría ser debida a una pérdida de la señal de Ca^{2+} . Sobre esta hipótesis se asentaron las bases para el desarrollo de este trabajo, con el objetivo último de identificar y caracterizar molecular y funcionalmente la vía de entrada de Ca^{2+} en nuestros modelos celulares así como investigar el mecanismo

que subyace a la falta de activación de los canales de K^+ en células con fibrosis quística.

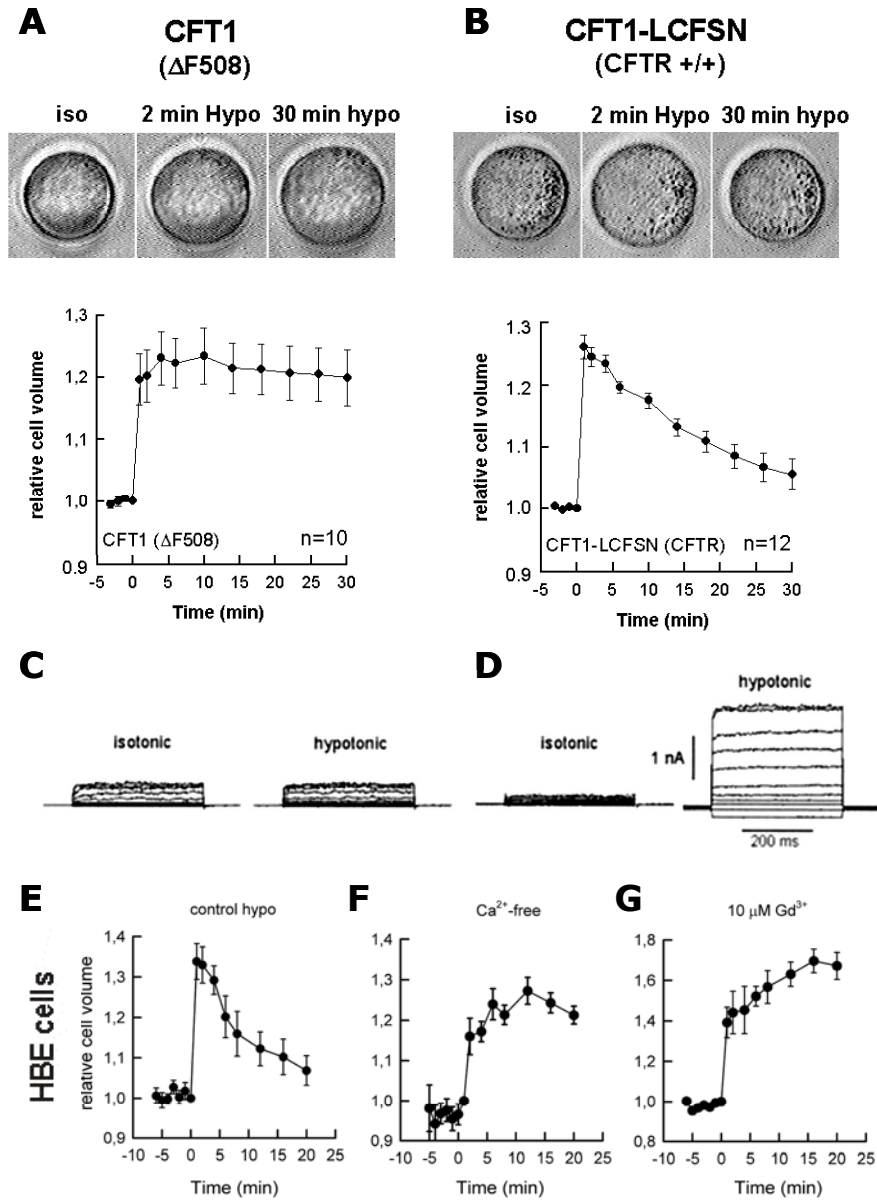


Figura 8. Caracterización de la RVD en células epiteliales respiratorias humanas. Micrografías de las medidas morfométricas del volumen celular mostrando que las células epiteliales traqueales con FQ (CFT1) son incapaces de recuperar el volumen tras la aplicación de un estímulo hipotónico ($t=0$ min) (A). Las células LCSFN-CFT1 (transfectadas establemente con el gen CFTR), restablecen la RVD alcanzando prácticamente el volumen inicial tras 30 min de exposición a hipotonicidad. La falta de activación de las corrientes de K^+ observada durante la aplicación del estímulo hipotónico en las células CFT1 (C), se restituye en las células LCSFN-CFT1 (D). (E) RVD en células epiteliales bronquiales humanas. La recuperación del volumen presentada por estas células es dependiente del Ca^{2+} extracelular (F) y es inhibible por Gd^{3+} (G). Reproducido de (29;30).

II

Objetivos

1.-General

Estudiar molecular y funcionalmente el canal TRPV4 en células del epitelio respiratorio humano con el fin de averiguar su papel en la osmoregulación celular, su posible relación con la patología de la fibrosis quística así como identificar nuevos aspectos relacionados con el procesamiento del canal.

2.-Específicos

1-. Demostrar la participación del canal TRPV4 como la vía de entrada de Ca^{2+} en respuesta a hipotonicidad en células de epitelio respiratorio humano.

2-. Evaluar si la RVD desajustada en células epiteliales respiratorias derivadas de pacientes con Fibrosis quística es debida a un defecto en la regulación de la vía de entrada de Ca^{2+} que participa en este proceso.

3-. Clonar y caracterizar molecularmente el canal TRPV4 humano a partir de células epiteliales respiratorias humanas para determinar:

- a) la identificación de nuevas variantes de *splicing* y su caracterización funcional
- b) aspectos relacionados con la biogénesis del canal

III

Resultados

Capítulo I

"Swelling-activated Ca^{2+} entry via TRPV4 channel is defective in cystic fibrosis airway epithelia"

Maite Arniges, Esther Vázquez, José M. Fernández-Fernández
and Miguel A. Valverde

J Biol Chem. 2004 Dec 24; 279(52):54062-8

Copyright © 2004 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

En este trabajo se caracteriza funcionalmente el canal TRPV4 en varios modelos de células epiteliales respiratorias mostrando, por primera vez, la participación de este canal en la función osmoreguladora a nivel celular. Mediante la combinación de técnicas de biología celular, de biología molecular y de electrofisiología, se demuestra que la entrada de Ca^{2+} en respuesta a un hinchamiento hipotónico se produce a través del canal TRPV4 y es necesaria para la activación de los mecanismos efectores, permitiendo una eficiente recuperación del volumen o RVD. Por su parte, las células epiteliales respiratorias con fenotipo de fibrosis quística no son capaces de reducir su volumen en un medio hipotónico a causa de una regulación alterada del canal TRPV4 que impide su activación y en consecuencia la activación de los mecanismos efectores de la RVD, indicando, al mismo tiempo, que la regulación del canal TRPV4 por el estímulo hipotónico es dependiente de la CFTR.

Swelling-activated Ca²⁺ entry via TRPV4 channel is defective in cystic fibrosis airway epithelia.

Maite Arniges, Esther Vázquez, José M. Fernández-Fernández and Miguel A. Valverde*.

Laboratori de Fisiologia Mol·lecular, Unitat de Senyalització Cel·lular, Universitat Pompeu Fabra, C/ Dr. Aiguader 80, Barcelona 08003, Spain.

Running Title: Swelling-dependent Ca²⁺ entry via TRPV4 in airway epithelia

***Corresponding author:**

Prof. Miguel A. Valverde
Laboratori de Fisiologia Mol·lecular
Unitat de Senyalització Cel·lular
Universitat Pompeu Fabra
C/ Dr. Aiguader 80
Barcelona 08003
Spain
Phone: 34 93 542 2832
Fax: 34 93 542 2802
Email: miguel.valverde@upf.edu

SUMMARY

The vertebrate transient receptor potential cationic channel TRPV4 has been proposed as an osmo- and mechanosensor channel. Studies using knock-out animal models have further emphasized the relevance of the TRPV4 channel in the maintenance of the internal osmotic equilibrium and mechanosensation. However, at the cellular level there is still one important question to answer: Does the TRPV4 channel generate the Ca^{2+} signal in those cells undergoing a Ca^{2+} -dependent regulatory volume decrease (RVD) response? RVD in human airway epithelia requires the generation of a Ca^{2+} signal to activate Ca^{2+} -dependent K^+ channels. The RVD response is lost in airway epithelia affected with cystic fibrosis (CF), a disease caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channel. We have previously shown that the defective RVD in CF epithelia is linked to the lack of swelling-dependent activation of Ca^{2+} -dependent K^+ channels. In the present study we show the expression of TRPV4 in normal human airway epithelia where it functions as the Ca^{2+} entry pathway that triggers the RVD response following hypotonic stress, as demonstrated by TRPV4 antisense experiments. However, cell swelling failed to trigger Ca^{2+} entry via TRPV4 channels in CF airway epithelia, although the channel's response to a specific synthetic activator, 4 α -phorbol 12,13-didecanoate (4 α -PDD), was maintained. Furthermore, RVD was recovered in CF airway epithelia treated with 4 α -PDD. Altogether, these results suggest that defective RVD in CF airway epithelia might be due to the absence of a TRPV4-mediated Ca^{2+} signal and the subsequent activation of Ca^{2+} -dependent K^+ channels.

INTRODUCTION

The TRPV4 channel, a member of the transient receptor potential (TRP¹) family of channels, was first identified as a non selective cation channel rapidly activated under hypotonic conditions when expressed heterologously (1-3). Subsequent studies have shown that TRPV4 channels possess multiple activation and regulatory sites that allow them to integrate distinct physical and chemical stimuli from the environment, offering a wide range of possible physiological roles (4). TRPV channels can also respond to mechanical stress (5-7) heat (8, 9), acidic pH (6), endogenous ligands (10) and synthetic agonists such as 4 α -phorbol 12,13-didecanoate (4 α -PDD) (11).

Although many studies have implied the involvement of TRPV4 channel in osmosensation (7, 12), the role of this channel in the regulatory volume decrease (RVD) response triggered in many cells under hypotonic conditions has not been evaluated. Exposure of cells to hypotonic solutions results in cell swelling followed, in most cases, by a RVD response that returns the cells to their original size. This process involves the activation of ionic pathways which permit the passive loss of electrolytes (typically via K⁺ and Cl⁻ channels) and osmotically obliged water (13). In several cell types, entry of extracellular Ca²⁺ and subsequent activation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels is required for an effective RVD (14, 15). The recent molecular and functional characterization of the TRPV4 channel has suggested its participation in the generation of this Ca²⁺ signal and the triggering of RVD, although this hypothesis needs to be tested.

Human airway epithelia show a typical Ca²⁺-dependent RVD under hypotonic conditions (16) but this RVD response is lost in cystic fibrosis (CF) airways (17). The cellular defect associated with the impaired RVD in CF epithelia is mainly linked to the dysfunction of volume-sensitive K⁺ channels (17-20), although defective swelling-

¹ Abbreviations: 4 α -PDD, 4 α -phorbol 12,13-didecanoate; AA, arachidonic acid; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; TRP, transient receptor potential; RVD, regulatory volume decrease

activated Cl^- channels has also been reported (21). It has been proposed that the dysfunction of K^+ channels required for the RVD response might be related to the lack of a Ca^{2+} signal in CF epithelia, at least in airway and small intestine epithelia (17-19).

In this study, we have evaluated the contribution of the TRPV4 channel to the RVD response in normal and CF airway epithelia, and in doing so, we have achieved two specific goals. Firstly, we have demonstrated that the TRPV4 channel is the only pathway mediating the swelling-activated Ca^{2+} entry required to achieve a full RVD in human tracheal epithelial cells. Secondly, we have shown that the impaired RVD response in CF airway epithelia is due to a misregulation of TRPV4 suggesting that hypotonic activation of TRPV4 channels is CFTR-dependent.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cells. The cystic fibrosis tracheal epithelial cell line CFT1 was obtained from a CF $\Delta\text{F508}/\Delta\text{F508}$ patient and the reverted non-CF cell line CFT1-LCFSN was generated by stable transfection of CFT1 cells with wild-type CFTR (22). Both cell lines were grown in Ham's F12 medium (GIBCO) as previously described (17). The cystic fibrosis bronchial epithelial cell line CFBE was also obtained from a CF $\Delta\text{F508}/\Delta\text{F508}$ patient. CFBE cells were grown in Modified Eagle's medium with Earle's salts (GIBCO), 10% fetal bovine serum (GIBCO), and 1% gentamycin (Sigma). The three cell lines were cultured in fibronectin-coated falsks (16). Cells were seeded onto plastic dishes or glass coverslips and used for experiments within 2-3 days.

Cytosolic Ca^{2+} measurements. Cells were incubated in isotonic bath solution containing $2\mu\text{M}$ fura-2 AM (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) for 30 min at room temperature. The cells were then washed thoroughly before initiating the

experiment. Video microscopic measurements of $[Ca^{2+}]_i$ were obtained using an Olympus IX70 inverted microscope (Hamburg, Germany) with a 40x oil-immersion objective (Olympus, Hamburg, Germany). A Polychrome IV monochromator (Till Photonics, Martinsried, Germany) supplied the excitation light (340 nm and 380 nm), which was directed towards the cells in the field of view by a 505DR dichromatic mirror (Omega Optical, Brattleboro, U.S.A.). Fluorescence images were collected by a digital CCD camera (Hamamatsu Photonics, Japan), following their passage through a 535DF emission filter (Omega Optical, Brattleboro, U.S.A.), using the AquaCosmos software programme (Hamamatsu Photonics, Japan). 340/380 nm ratio images were computed every 5 seconds. The isotonic bathing solution contained (mM): 2.5 KCl, 140 NaCl, 1.2 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 5 glucose, 10 Hepes (310 mOsmol/L, pH 7.35). The hypotonic bathing solution (220 mOsmol/L, pH=7.35) was prepared by omitting 50 mM NaCl from the isotonic solution and adjusting the osmolality with D-mannitol where necessary. Ca²⁺-free extracellular solutions were obtained by replacing CaCl₂ with MgCl₂. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich except iberiotoxin (Alomone Laboratoires, Israel).

Volume measurements: morphometric analysis. Cell volume experiments were carried out at room temperature. Cells were seeded on glass coverslips and were placed in a recording chamber after 3-4 hours. The cells were subsequently washed with isotonic solution. Well-defined single round cells were selected and digital images acquired using Aquacosmos software (Hamamatsu, France). The individual cell volume was calculated as described previously (23, 24) and presented as the ratio of volume at time t divided to that measured at time $t=0$.

Electrophysiological recordings. Ionic currents were measured at room temperature using the whole-cell recording mode of the patch-clamp technique (25) through a D-6100 Darmstadt amplifier (List Medical, Germany). The pClamp8 software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) was used for pulse generation, data acquisition and subsequent analysis. Whole-cell cationic currents were recorded using borosilicate glass electrodes (2-4 M Ω) filled with a solution containing (in mM): 120 NMDGCl, 1 MgCl₂, 1 EGTA, 30 HEPES, 4 ATP and 0.1 GTP (290 mosmoles/l, pH 7.25). Bath solution contained (in mM): 125 NaCl, 1.5 MgCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES, pH 7.36, and 305 mosmoles/l (adjusted with D-mannitol). Cells were held at 0 mV and ramps from -140 mV to +100 mV with a duration of 200 ms were applied at a frequency of 0.2 Hz. Ramp data were acquired at 10 KHz and low-pass filtered at 1 kHz.

Whole-cell K⁺ (Maxi K⁺ and hIK) currents were measured as described previously (16, 16, 17). Pipette solution contained (in mM): 140 KCl, 2 MgCl₂, 0.15 CaCl₂, 0.5 EGTA and 10 HEPES (290 mosmoles/l, pH 7.25; the intracellular free Ca²⁺ concentration was 50 nM as calculated using EqCal from Biosoft (Cambridge, U.K.). The isotonic bathing solution contained (in mM): 100 NaCl, 5 KCl, 1.2 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 5 glucose, 10 HEPES and 90 D-mannitol (305 mosmoles/l, pH 7.35). The hypotonic bathing solution (osmolality, 215 mosmoles/l) was prepared by omitting D-mannitol from the isotonic solution. Ca²⁺-free bath solutions, containing 0 Ca²⁺, 1.5 mM MgCl₂ and 1 mM EGTA, were also used in several experiments. Cells were clamped at -80 mV and pulsed for 400 ms from -100 mV to +100 mV in 20 mV steps.

RNA extraction and RT-PCR. RNA extraction and RT-PCR were performed as described previously (16). In brief, RNA was isolated from CFT1-LCFSN, CFT1 and CFBE cells using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany), according to

the manufacturer's instructions. Total RNA (1-2 µg) was reverse-transcribed to cDNA. GAPDH was used as a positive control, and negative controls (absence of the oligodT primer or MMLV-RT) were also performed. We used the following primer pair for PCR amplification of TRPV4: forward, 5'-CCTCTTCCCCGACAGCAAC-3', and reverse, 5'-CCCCAGTGAAGAGCGTAATG-3', as described previously (16), which gives a 500 bp product (nt 1154-1653, Genebank NM 021625 –isoform a-) and a 319 product in case of isoform b (nt 1154-1473, Genebank Accession # NM 147204). The amplicons were confirmed by direct sequencing.

Cloning of human TRPV4 (hTRPV4) and transient expression in HEK-293 cells.

Total RNA was extracted from human tracheal epithelial CFT1-LCFSN cells using the Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The full-length TRPV4 cDNA was amplified by a RT-PCR-based protocol (OneStep RT-PCR kit, Qiagen) using the following profile: 1h at 50°C, 15 min at 90°, 45 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C and 3 min 30 sec plus 1sec/cycle at 68°C ending with 10 min at 68°C. The primers used were: forward, 5'-AAGCATGGCGGATTCCAGCGAAG-3' (nt 86-108), and reverse, 5'-CTAGAGCGGGGCGTCATCAGTC-3' (nt 2684-2705). The fully sequenced TRPV4 cDNA, corresponded to the Genebank Accession # NM 021625 (isoform a) containing a synonymous single nucleotide polymorphism in position 761 (dbSNP reference number rs3825394). The cDNA was inserted into the eukaryotic pcDNA-3 expression vector and transfected into HEK-293 cells, grown as previously described (26), using a linear polyethylenimine (PEI) derivative (polycation ExGen500, Fermentas MBI). Cells were seeded in 35 mm dishes at 80% confluency and transfected

with 3 μg of the construct, together with the reporter pEGFPN1 at a 10:1 ratio or with pEGFPN1 alone (control).

Fig 1 Suggested location

Antisense oligonucleotides. CFT1-LCFSN cells were seeded in 12 mm wells at 80% confluency and were exposed to 1 μM of TRPV4 antisense morpholino oligonucleotide with a sequence 5'- GCCTTCGCTGGAATCCGCCAT-3' which hybridizes to the first 21 nucleotides (90-110 bp) of both isoform a (GenBank NM_021625) and isoform b (GenBank NM_147204) of the human TRPV4 or to 1 μM of β -globin antisense morpholino oligonucleotide with a sequence 5'- CCTCTTACCTCAgTTACAATTTATA-3' as negative control (Gene Tools, Corvallis, Oregon) plus 100 ng of pEGFP plasmid (ClonTech Laboratories) diluted into 25 μl serum-free medium. Cells were transfected by a Lipofectamine Plus (Invitrogen) procedure following the manufacturer's instructions. 24h after transfection, cells were trypsinized and seeded for performing experiments within 1-2 days.

Western Blot. 88 μg of total protein was obtained from CFT1-LCFSN cells harvested 96 hrs after transfection with TRPV4/ β -globin antisense (6 μM). The protein was separated on a polyacrylamide gel (8%) and electrotransferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Total protein from HEK293 cells transfected with TRPV4 and LCFSN cells was used as a positive control and total protein from untransfected HEK293 as a negative control. The nitrocellulose membrane was incubated in blocking buffer (5% nonfat dry milk in TTBS (100mM Tris- HCl, pH7.5; 150mM NaCl, 0.1% Tween 20)) for 1h at room temperature, followed by incubation overnight at 4°C in blocking buffer containing TRPV4 antibody (1:500 dilution). This antibody was raised against a synthetic peptide representing the C-

terminal sequence of human TRPV4 (CDGHQQGYPRKWRTDDAPL) and then subjected to affinity purification with the peptide antigen. The membranes were washed with blocking buffer to remove the non-specific binding and incubated with horseradish peroxidase-conjugated donkey antirabbit IgG (Amersham Biosciences, UK) at a dilution of 1:2000 in blocking buffer for 1h at room temperature. Nitrocellulose membranes were incubated with an enhanced chemiluminescence reagent (SuperSignal West Femto, Chemiluminescent Substrate, from Pierce, Rockford, IL USA) and films (Amersham Biosciences, UK) were exposed to the membrane.

Statistics. Results are expressed as *means* \pm *S.E.M.* of *n* observations. Student's t-test was performed to examine statistical significance. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Swelling-activated Ca^{2+} entry in normal and CF human tracheal epithelial cells.

CFT1 tracheal epithelial cells, derived from a $\Delta\text{F508}/\Delta\text{F508}$ patient, show a typical CF ion transport phenotype, including impaired RVD, while the CFT1-LCFSN cells, obtained by stable transfection of CFT1 cells with wild-type CFTR, show both cAMP-dependent ion secretion and RVD (17). The RVD response in the recovered tracheal cells (CFT1-LCFSN), as well as in normal human bronchial cells (HBE), relies on the activation of Ca^{2+} -dependent K^+ channels following the influx of Ca^{2+} (16, 17). Therefore, we evaluated whether CF airway epithelial cells might possess a defect in the activation of swelling-dependent Ca^{2+} entry. Using the Ca^{2+} -sensitive fura-2 dye, we observed that CFT1-LCFSN cells triggered a significant Ca^{2+} signal in response to a 30% hypotonic shock (Fig. 1A) while CFT1 cells showed negligibly low changes (Fig. 1B). Removal of extracellular Ca^{2+} or addition of Gd^{3+} abolished the Ca^{2+} response of CFT1-LCFSN cells to hypotonic stress (results not shown). The molecular nature of the Ca^{2+} entry pathway was subsequently investigated.

Fig 2 Suggested location

Functional expression of TRPV4 channel in airway tracheal epithelial cells.

A possible candidate to mediate Ca^{2+} entry in response to cell swelling is the TRPV4 channel (4). Therefore, we evaluated the expression and function of TRPV4 channels and their contribution to RVD in normal and CF airway epithelial cells. Expression of TRPV4 channel in human normal (CFT1-LCFSN cells) and CF tracheal epithelial cells (CFT1) was analyzed by RT-PCR. Fig. 1C shows the amplification of two specific

bands corresponding to TRPV4 isoform a (500 bp) and isoform b (319 bp) in CFT1-LCSFN and CFT1 cells.

The activity of the TRPV4 channel was evaluated using a synthetic activator, 4 α -phorbol 12,13-didecanoate (4 α -PDD), specific for the TRPV4 channel (11). The intracellular Ca²⁺ signals induced by 1 μ M 4 α -PDD in the non cystic fibrosis tracheal cell line CFT1-LCSFN (Fig. 2A; mean peak 340/380 ratio increase: 0.16 \pm 0.02; n=13) and the cystic fibrosis CFT1 cell line (Fig. 2B; mean increase 0.10 \pm 0.06; n=30) were not statistically significant. The response to 4 α -PDD in both cell lines was abolished in the absence of extracellular Ca²⁺ (Fig. 2 C-D) or in the presence of 100 μ M Gd³⁺ (Fig. 2 E-F), a blocker of TRPV4 channels (1). The activity of TRPV4 was also evaluated electrophysiologically. Application of 1 μ M 4 α -PDD induced typical TRPV4 cationic currents that rectified inwardly when pipettes were loaded with impermeant cation-containing solutions (Fig. 2G-H). Taken together, our data support the presence of TRPV4 in both human normal and CF tracheal epithelial cells, although its activation by cell swelling appears only in non-CF cells. Defective activation of TRPV4 in CF cells under hypotonic conditions might explain the impaired Ca²⁺-dependent RVD observed in different CF epithelia (17, 19). This hypothesis relies on the assumption that TRPV4 channels are essential in providing the Ca²⁺ entry pathway to trigger the RVD response in airway epithelia. Therefore, we next investigated the role of TRPV4 in the RVD response in CFT1-LCSFN.

Fig 3 Suggested location

TRPV4 channel activity is required for RVD in tracheal epithelial cells. Many reports have demonstrated the activation of TRPV4 channels following cell swelling under hypotonic conditions (for a review see (4)). However, none have shown that the

activation of TRPV4 channels provides the actual Ca^{2+} signal needed to trigger the RVD response. To test this hypothesis, we incubated CFT1-LCSFN cells with TRPV4 antisense oligonucleotides. We also used a control antisense oligonucleotide directed against an unrelated protein, β -globin. As illustrated in Fig. 3E, TRPV4 antisense specifically reduced TRPV4 protein expression levels when compared to control β -globin antisense (α -tubulin expression was unaltered, results not shown). Next, the hypotonic-induced activity of Ca^{2+} -dependent KCNN4 potassium channels, needed for the RVD response (17), and the RVD itself were evaluated. Swelling-dependent activation of KCNN4 currents, which only occurs in the presence of extracellular Ca^{2+} (results not shown), was prevented in TRPV4 antisense treated cells (Fig. 3A), but preserved in CFT1-LCSFN cells treated with control antisense (Fig. 3B). Morphometric cell volume analysis showed that anti-TRPV4 oligonucleotides inhibited the RVD response (Fig. 3C) in CFT1-LCSFN cells. Cells incubated with control oligonucleotides maintained the RVD response, recovering to nearly 100% of their original volume after 25 min (Fig. 3D). The fact that both activation of Ca^{2+} -dependent K^+ channels and RVD are prevented in those cells incubated with TRPV4 antisense oligonucleotide provides the first direct piece of evidence relating the activity of TRPV4 with the RVD response.

Human CF bronchial epithelial cells also show defective Ca^{2+} -dependent RVD.

Human bronchial epithelial cells also show an RVD that depends on the entry of Ca^{2+} and the activation of Maxi K^+ channels (KCNMA1) (16). However, no data exist on the RVD response in human CF bronchial epithelial cells. The presence of the two TRPV4 isoforms (a and b) in a human CF bronchial epithelial cell line (CFBE) obtained from a patient homozygous for the ΔF508 mutation was determined by RT-PCR (Fig. 4A). CFBE cells exposed to 30% hypotonicity, like human CF tracheal cells (CFT1) (17),

were unable to regulate their volume and remained swollen during the 20 min exposure to hypotonic solution (Fig. 4B). Similarly to CF tracheal cells (CFT1), CFBE cells did not respond with a significant increase in intracellular Ca^{2+} when exposed to hypotonic solutions (Fig. 4C) but did respond to $1\mu\text{M}$ $4\alpha\text{-PDD}$ (Fig. 4D). The response to $4\alpha\text{-PDD}$ was absent when cells were incubated in Ca^{2+} -free solutions or in the presence of $100\ \mu\text{M}$ Gd^{3+} (results not shown). As mentioned above, RVD in normal human bronchial epithelial cells (HBE) requires the activation of Maxi K^+ channels (16). Maxi K^+ currents in CFBE, identified by their inhibition by $100\ \text{nM}$ iberiotoxin (results not shown), failed to respond to hypotonic conditions (Fig. 4E). Current density at $-100\ \text{mV}$ was $37.7\pm 4.19\ \text{pA/pF}$ ($n=13$) under isotonic conditions and $39.3\pm 4.9\ \text{pA/pF}$ ($n=8$) under hypotonic conditions. Altogether, these results suggest that both human CF tracheal and bronchial cells lack an effective RVD due to a deficient Ca^{2+} influx via the TRPV4 channel and the subsequent activation of Ca^{2+} -dependent K^+ channels.

Fig 4 Suggested location

Activation of TRPV4 by $4\alpha\text{-PDD}$ restores RVD in CF airways cells. The possibility to revert the defective RVD in human CF airway cells using the TRPV4 activator $4\alpha\text{-PDD}$ was evaluated next. CFT1 and CFBE cells underwent a significant RVD when exposed to hypotonic conditions in the presence of $1\ \mu\text{M}$ $4\alpha\text{-PDD}$ (Fig. 5A and D). While CF tracheal cells required the presence of $4\alpha\text{-PDD}$ throughout the whole hypotonic stimulus for an effective RVD, CF bronchial cells rapidly down regulate their volume immediately after the addition of $4\alpha\text{-PDD}$. The difference in the time course of the RVD response in the presence of $4\alpha\text{-PDD}$ is probably related to the amount of Ca^{2+} entering the cell following the activation of TRPV4 channels by $4\alpha\text{-PDD}$ in each cell line. The Ca^{2+} signal generated in response to $4\alpha\text{-PDD}$ is larger in CFBE cells (Fig. 4D)

than in CFT1 cells (Fig. 2A). Such a difference can be explained by the fact that CFBE cells express approximately 15 times more TRPV4 transcripts than CFT1 cells, when compared by real-time RT-PCR (results not shown).

The RVD induced by 4 α -PDD in both CF cell lines depended on the presence of extracellular Ca²⁺ and was prevented by 100 μ M Gd³⁺ (Fig. 5 B and E). The final step in the process of RVD involves the activation of Ca²⁺-dependent K⁺ channel of intermediate conductance (hIK or KCNN4) in CFT1 cells (17) or Ca²⁺-dependent Maxi K⁺ channels (KCNMA1) in the case of bronchial cells (16). The participation of these K⁺ channels in the 4 α -PDD-induced RVD was demonstrated by exposing CFT1 cells and CFBE cells to 4 α -PDD in the presence of 100 nM clotrimazole, an inhibitor of hIK channels (Fig. 5C), or 100 nM iberiotoxin an inhibitor of Maxi K⁺ channels (Fig. 5F), respectively. Under these conditions the 4 α -PDD-induced RVD was abolished.

Fig 5 Suggested location

DISCUSSION

Cell volume regulation following hypotonic swelling is typically mediated by the loss of cytosolic Cl⁻ and K⁺, via the coordinated activation of Cl⁻ and K⁺ channels (13). In several cell types, the RVD response is associated with the generation of an intracellular Ca²⁺ signal (14). Cell swelling triggers Ca²⁺ entry which, in turn, activates Ca²⁺-dependent K⁺ channels. The molecular identity of the ion transport pathways involved in the RVD response is just starting to emerge. While the identity of the swelling-activated Cl⁻ channel is still elusive (27-30), several K⁺ channels associated with cell volume control have been identified depending on the cell type: 1) voltage-gated K⁺ channels (24, 31-33), 2) background two-pore forming K⁺ channels (34, 35) and Ca²⁺-dependent K⁺ channels. Recently, the identification of the TRPV4 channel (1-3) as a

vertebrate osmosensor channel mediating Ca^{2+} entry in response to hypotonic cell swelling has widened our knowledge of the ion transport pathways associated with the cell volume control.

TRPV4 channel belongs to the family of mammalian transient receptor potential nonselective cation channels (36). This channel also responds to other stimuli, including moderate heat, phorbol esters and arachidonic acid (AA) metabolites (see Introduction for references). TRPV4 activation by cell swelling requires the previous activation of PLA_2 and the release of polyunsaturated fatty acids (typically AA) (26). However, no formal association between the activity of TRPV4 channel and the RVD response has been shown so far. In the present study we have demonstrated that TRPV4 activity is necessary for RVD in human tracheal epithelium. Human airway epithelial cell lines show Ca^{2+} -dependent RVD (16, 17) and express TRPV4, as detected by RT-PCR ((16) and this study). Antisense-induced decreased expression of TRPV4 in human tracheal CFT1-LCFSN cells resulted in the absence of Ca^{2+} -dependent activation of KCNN4 K^+ channel and subsequent impairment of the RVD response. This is, to the best of our knowledge, the first study demonstrating the role of TRPV4 channels in the Ca^{2+} -dependent RVD response.

Ion transport processes, including those involved in RVD, are typically affected in cystic fibrosis epithelia (37). RVD in human CF tracheal (17) and bronchial cells (this study) is impaired because of deficient swelling-mediated activation of Ca^{2+} -dependent K^+ channels. We have now found that the TRPV4-mediated Ca^{2+} signal generated in response to hypotonic cell swelling is absent in CF airways epithelial cells. However, the interaction between the CFTR Cl^- channel, the product of the CF gene (38), and the TRPV4 channel is unknown at present. The CFTR protein, in addition to its function as a Cl^- channel, is able to modulate other ion transport proteins (37). The

mechanisms by which CFTR exerts these ion transport regulatory functions are not well characterized yet, but typically involve changes in protein expression or post-translational regulation (37, 39). We can exclude differences in TRPV4 expression between normal and CF tracheal cells as the cause of impaired Ca^{2+} entry under hypotonic conditions. Transcripts of TRPV4 were found in both CF cells (CFT1) and normal (recovered, CFT1-LCFSN cells; see Fig. 1). Quantitative PCR analysis of CFT1 and CFT1-LCFSN cells also revealed no significant difference in the expression levels of TRPV4 (results not shown). Moreover, measurements of intracellular Ca^{2+} as well as cationic currents in response to 4α -PDD showed no major differences between normal and CF airways. The rationale of this observation, i.e., the dissection of swelling- and 4α -PDD-dependent activation of TRPV4 channel in CF epithelia, is supported by previous work showing that the molecular requirements for 4α -PDD- and swelling-dependent activation of TRPV4 are different (26).

A putatively important element in the CFTR-dependent hypotonic activation of TRPV4 channels is PLA_2 . PLA_2 is required for cell swelling-dependent activation of TRPV4 (26). Cell swelling activates phospholipase A_2 , releasing AA (40) which is metabolized by cytochrome P450 epoxygenase to 5'-6'-epoxyeicosatrienoic acid, a direct activator of TRPV4 (26). Alterations in both PLA_2 activity and AA levels have been reported in CF cells, although not every report agrees on the direction of the changes. While several reports suggested an increase in the PLA_2 -AA pathway in CF cells bearing the most typical ΔF508 mutation (41, 42), others reported the contrary (43) or no changes at all (44). Nevertheless, it seems that the PLA_2 might be the subject of CFTR-dependent regulation. Therefore, it will be interesting to test whether swelling-dependent activation of PLA_2 is defective in CF tissues, thereby, explaining the lack of TRPV4 activation by cell swelling.

In summary, TRPV4 activation by hypotonic stress emerges as a key process in the control of cell volume in human airway epithelial cells and it is impaired in CF airway epithelial cells, leading to defective RVD response ((17) and this study). Misregulation of TRPV4 channels may be relevant to the pathophysiology of CF in different ways. It might contribute to the increased Na^+ absorption described in CF airway epithelia (45). Na^+ absorption is reduced by stimuli causing cytosolic Ca^{2+} increases (46, 47). Therefore, a defective TRPV4 channel might result in a reduced mechanically-induced Ca^{2+} signal and increased amiloride-sensitive Na^+ absorption.

Acknowledgments We thank J. Yankaskas and D. Gruenert for providing the cell lines used in this study, Y. Tor for technical assistance and A. Currid for proof reading the manuscript. This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, Fondo de Investigación Sanitaria (Red HERACLES) and Generalitat de Catalunya to M.A.V.; J.M.F-F is a Ramón y Cajal Fellow.

Reference List

1. Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G. & Plant, T. D. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 695-702.
2. Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., Hudspeth, A. J., Friedman, J. M. & Heller, S. (2000) *Cell* **103**, 525-535.
3. Wissenbach, U., Boddling, M., Freichel, M. & Flockerzi, V. (2000) *FEBS Lett.* **485**, 127-134.
4. Nilius, B., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G. & Voets, T. (2004) *Am. J. Physiol Cell Physiol* **286**, C195-C205.
5. Gao, X., Wu, L. & O'Neil, R. G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 27129-27137.
6. Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K. & Imai, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 22664-22668.
7. Liedtke, W., Tobin, D. M., Bargmann, C. I. & Friedman, J. M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100 Suppl 2**, 14531-14536.
8. Guler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M. & Caterina, M. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 6408-6414.
9. Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S. H., Benham, C. D., Droogmans, G. & Nilius, B. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 47044-47051.
10. Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T. & Nilius, B. (2003) *Nature* **424**, 434-438.

11. Watanabe, H., Davis, J. B., Smart, D., Jerman, J. C., Smith, G. D., Hayes, P., Vriens, J., Cairns, W., Wissenbach, U., Prenen, J. *et al.* (2002) *J Biol. Chem.* **277**, 13569-13577.
12. Mizuno, A., Matsumoto, N., Imai, M. & Suzuki, M. (2003) *Am. J. Physiol Cell Physiol* **285**, C96-101.
13. Hoffmann, E. K. & Dunham, P. B. (1995) *Int. Rev. Cytol.* **161**, 173-262.
14. McCarty, N. A. & O'Neil, R. G. Calcium signalling in cell volume regulation. *Physiol.Rev.* 72, 1037-1061. 1992.
15. Pasantes-Morales, H. & Morales-Mulia S. (2000) *Nephron* **86**, 414-427.
16. Fernandez-Fernandez, J. M., Nobles, M., Currid, A., Vazquez, E. & Valverde, M. A. (2002) *Am. J Physiol Cell Physiol* **283**, C1705-C1714.
17. Vazquez, E., Nobles, M. & Valverde, M. A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 5329-5334.
18. Valverde, M. A., O'Brien, J. A., Sepulveda, F. V., Ratcliff, R. A., Evans, M. J. & Colledge, W. H. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9038-9041.
19. Valverde, M. A., Vazquez, E., Munoz, F. J., Nobles, M., Delaney, S. J., Wainwright, B. J., Colledge, W. H. & Sheppard, D. N. (2000) *Cell Physiol Biochem* **10**, 321-328.
20. Belfodil, R., Barriere, H., Rubera, I., Tauc, M., Poujeol, C., Bidet, M. & Poujeol, P. (2003) *Am. J. Physiol Renal Physiol* **284**, F812-F828.

21. Barriere, H., Belfodil, R., Rubera, I., Tauc, M., Poujeol, C., Bidet, M. & Poujeol, P. (2003) *Am. J. Physiol Renal Physiol* **284**, F796-F811.
22. Yankaskas, J. R., Conrad, M., Kovai, D., Lazarowsky, E., Paradiso, A. M., Rinehart, C. A., Sarkadi, B., Schlegel, R. & Boucher, R. C. (1993) *Am. J. Physiol.* **264**, C1219-C1230.
23. Bond, T. D., Ambikapathy, S., Mohammad, S. & Valverde, M. A. (1998) *J. Physiol.* **511**, 45-54.
24. Lock, H. & Valverde, M. A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 34849-34852.
25. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, J. (1981) *Pflugers Arch.* **391**, 85-100.
26. Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Droogmans, G., Voets, T. & Nilius, B. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 396-401.
27. Strange, K. (1998) *J. Gen. Physiol* **111**, 617-622.
28. Clapham, D. E. (1998) *J. Gen. Physiol* **111**, 623-624.
29. Valverde, M. A. (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 509-516.
30. Sardini, A., Amey, J. S., Weylandt, K. H., Nobles, M., Valverde, M. A. & Higgins, C. F. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1618**, 153-162.
31. Deutsch, C. & Chen, L. Q. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 10036-10040.
32. Felipe, A., Snyders, D. J., Deal, K. K. & Tamkun, M. M. (1993) *Am. J Physiol* **265**, C1230-C1238.

33. Busch, A. E., Varnum, M., Adelman, J. P. & North, R. A. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 804-810.
34. Lesage, F. & Lazdunski, M. (2000) *Am. J. Physiol Renal Physiol* **279**, F793-F801.
35. Niemeyer, M. I., Cid, L. P., Barros, L. F. & Sepulveda, F. V. (2001) *J Biol. Chem.* **276**, 43166-43174.
36. Clapham, D. E. (2003) *Nature* **426**, 517-524.
37. Schwiebert, E. M., Benos, D. J., Egan, M., Stutts, M. J. & Guggino, W. B. (1999) *Physiol. Rev.* **79**, S145-S166.
38. Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rofmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. *et al.* (1989) *Science* **245**, 1066-1073.
39. Kunzelmann, K. (2001) *News Physiol Sci.* **16**, 167-170.
40. Basavappa, S., Pedersen, S. F., Jorgensen, N. K., Ellory, J. C. & Hoffmann, E. K. (1998) *J. Neurophysiol.* **79**, 1441-1449.
41. Berguerand, M., Klapisz, E., Thomas, G., Humbert, L., Jouniaux, A. M., Olivier, J. L., Bereziat, G. & Masliah, J. (1997) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **17**, 481-490.
42. Freedman, S. D., Blanco, P. G., Zaman, M. M., Shea, J. C., Ollero, M., Hopper, I. K., Weed, D. A., Gelrud, A., Regan, M. M., Laposata, M. *et al.* (2004) *N. Engl. J. Med.* **350**, 560-569.
43. Carlstedt-Duke, J., Bronnegard, M. & Strandvik, B. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**, 9202-9206.

44. Porcelli, A. M., Ghelli, A., Mastrocola, T. & Rugolo, M. (1999) *Cell Mol. Life Sci.* **56**, 167-173.
45. Boucher, R. C., Stutts, M. J., Knowles, M. R., Cantley, L. & Gatzky, J. T. (1986) *J. Clin. Invest.* **78**, 1245-1253.
46. Graham, A., Steel, D. M., Alton, E. W. & Geddes, D. M. (1992) *J. Physiol* **453**, 475-491.
47. Mall, M., Wissner, A., Gonska, T., Calenborn, D., Kuehr, J., Brandis, M. & Kunzelmann, K. (2000) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**, 755-761.

Figure 1. Cytosolic Ca²⁺ measurements in response to hypotonic stress in human tracheal epithelial cells. (A) Cytosolic Ca²⁺ response of CFT1-LCSFN cells (n=10) and CFT1 (B) cells (n=28) to hypotonicity. Hypotonic solution was perfused during the time indicated by the bar. (C) RT-PCR analysis of TRPV4 transcripts in CFT1-LCSFN and CFT1 cells.

Figure 2. Functional expression of TRPV4 in tracheal epithelial cells. (A) Increase in cytosolic Ca²⁺ after incubation with 1 μM 4α-PDD in CFT1-LCSFN (n=13) and (B) CFT1 cells (n=30). Effect of extracellular Ca²⁺ and 100 μM Gd³⁺ on the 4α-PDD response of CFT1-LCSFN (C, n=17; E, n=20) and CFT1 cells (D, n=36; F, n=47). Solutions were added at the time marked by the bar. Current/voltage relationships of cationic currents recorded in CFT1-LCSFN cells (G) and CFT1 cells (H) under control conditions (○) and following exposure to 4α-PDD (1 μM) (●). n=4 for all conditions.

Figure 3. Effects of antisense-induced knockdown of TRPV4 on hIK and RVD in LCSFN cells. (A) Western blot showing levels of protein expression in CFT1-LCSFN cells incubated with hTRPV4 or β-globin antisense oligonucleotides. HEK293 cells transfected with TRPV4 were used as positive control. Untreated HEK-293 and CFT1-LCSFN cells were used as negative and positive controls, respectively (A, right panel). Current/voltage relationships of hIK currents obtained from CFT1-LCSFN cells incubated with TRPV4-antisense/EGFP-expressing plasmids (B, n=10-12) or β-globin-antisense/EGFP-expressing plasmids (C, n=7-9), under isotonic conditions (○) and 5 minutes after exposure to a 30% hypotonic solution (●). (D) Relative volume measurements in LCSFN cells incubated with the TRPV4 antisense (peak value 1.31±0.02, recovering value 1.25±0.02; n=7; p=0.89) or with β-globin antisense (E)

used as a control (peak value 1.32 ± 0.03 , recovering value 1.06 ± 0.04 ; $n=11$, $p:<0.0001$). Hypotonic solution was added at time $t=0$.

Figure 4. TRPV4 expression and hypotonic-induced responses in CFBE cells. (A) TRPV4 mRNA expression in CFBE cells analyzed by RT-PCR. (B) Relative volume measurements under hypotonic conditions. Hypotonic solution was added at time $t=0$ and perfused for 20 min ($n=13$). (C) Cytosolic Ca^{2+} measurements in response to hypotonicity ($n=13$) and (D) $1\mu M$ 4α -PDD ($n=9$). Solutions were added at the time marked by the bar. (E) Representative whole-cell Maxi K^+ currents recorded from a CFBE cell under isotonic conditions (ISO) and 5 minutes after exposure to a 30% hypotonic solution (HYPO).

Figure 5. Relative volume measurements in response to 4α -PDD in cystic fibrosis airway epithelial cells. (A) Cell volume changes in CFT1 cells exposed to hypotonic conditions in the absence (\square , $n=12$) or presence of $1\mu M$ 4α -PDD (\bullet , $n=13$). (B) Cell volume changes in CFT1 cells exposed to hypotonic solutions containing $1\mu M$ 4α -PDD in the absence of extracellular Ca^{2+} (\bullet , $n=12$) or in the presence of 100 mM Gd^{3+} (\triangle , $n=9$). (C) Cell volume changes in CFT1 cells exposed to $1\mu M$ 4α -PDD and 100 nM clotrimazole ($n=12$). (D) Cell volume changes in CFBE cells exposed to $1\mu M$ 4α -PDD ($n=9$). (E) Cell volume changes in CFBE cells exposed to hypotonic solutions containing $1\mu M$ 4α -PDD in the absence of extracellular Ca^{2+} (\bullet , $n=10$) or in the presence of 100 mM Gd^{3+} (\triangle , $n=6$). (F) Cell volume changes in CFBE cells exposed to $1\mu M$ 4α -PDD and 100 nM iberiotoxin ($n=7$).

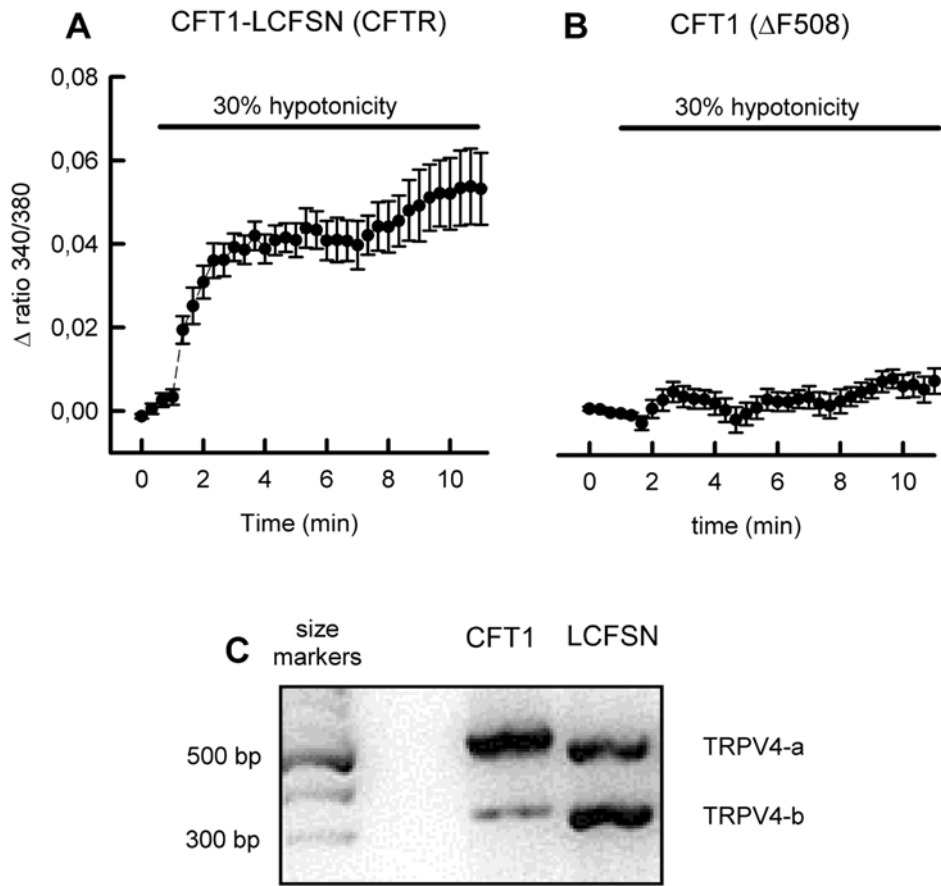


Fig 1

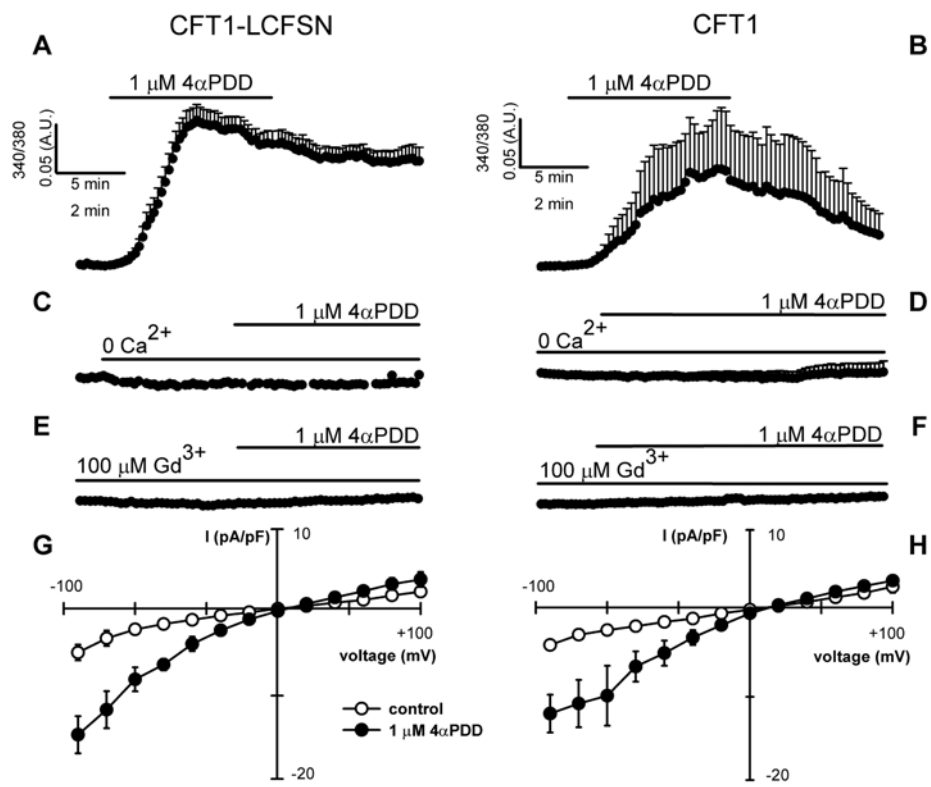


Fig 2

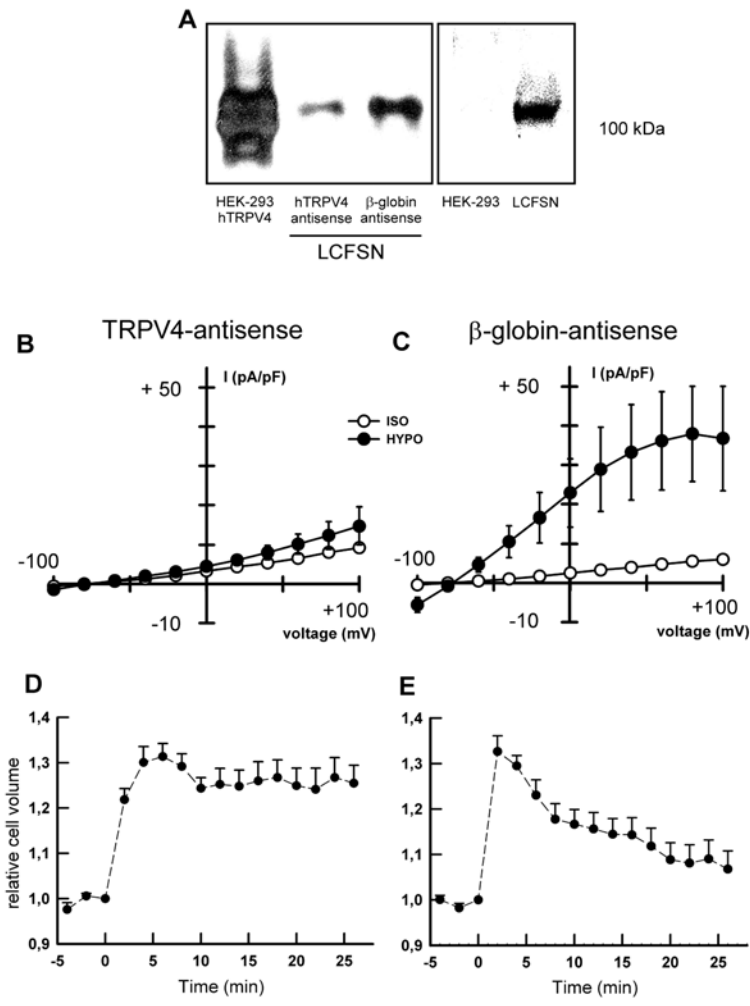


Fig 3.

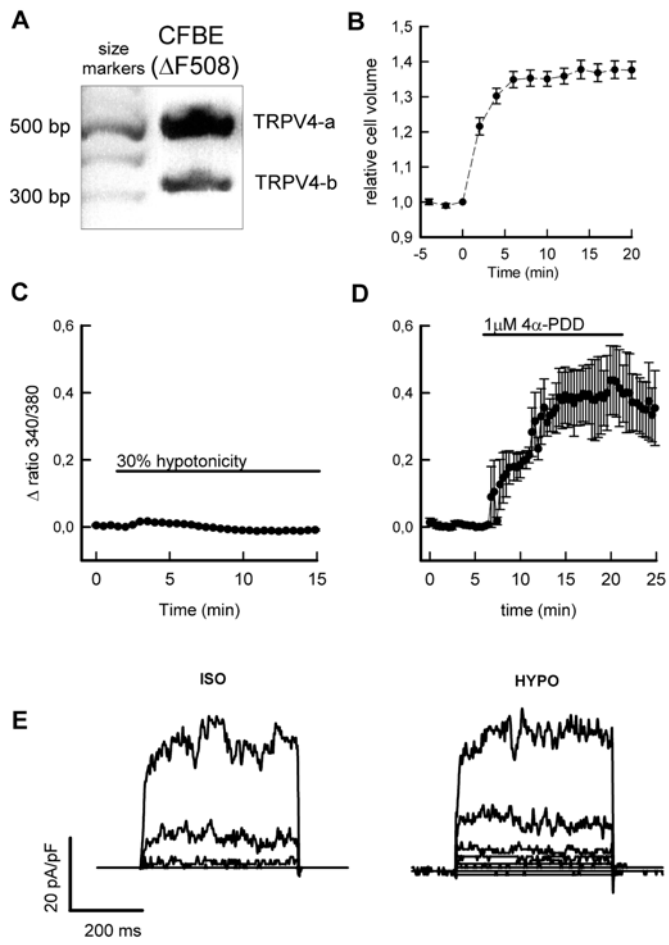
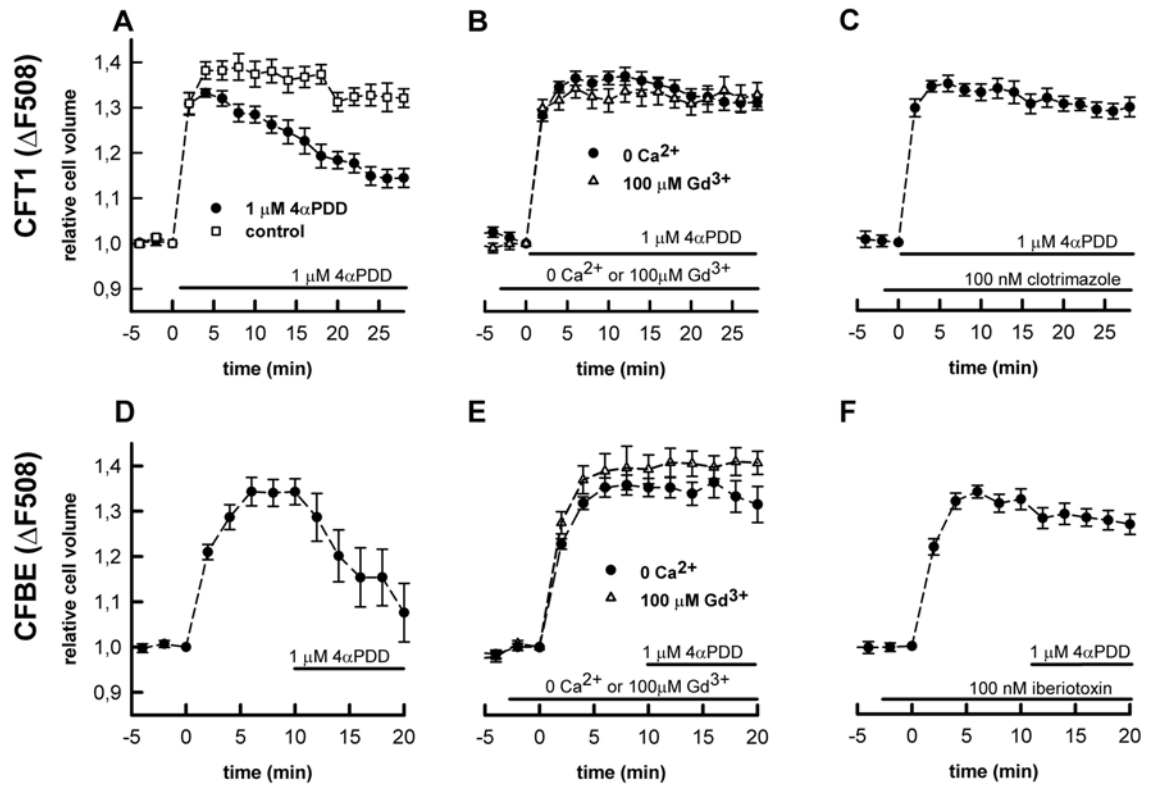


Fig 4.

Fig 5.



Capítulo II

"Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking"

Maite Arniges, José M. Fernández-Fernández,
Nadine Albrecht, Michael Schaefer and Miguel A. Valverde

J Biol Chem. 2006 Jan 20; 281(3):1580-6.

En este trabajo, la identificación y caracterización de nuevas variantes del canal TRPV4 permite demostrar que los dominios de ANK son determinantes moleculares claves en el proceso de oligomerización de estos canales así como profundizar en otros aspectos biogénicos de estas proteínas tan escasamente conocidos.

Concretamente, se describe el aislamiento de cinco variantes de *splicing* del canal en células de epitelio respiratorio humano, dos de las cuales ya eran conocidas (TRPV4-A y TRPV4-B), nombrando a las tres restantes TRPV4-C (Δ 237-284), TRPV4-D (Δ 27-61) y TRPV4-E (Δ 237-284 y Δ 384-444) respectivamente. El uso de varias aproximaciones experimentales (immunolocalización, FRET, coimmunoprecipitación, perfil de glicosilación y análisis funcional) genera dos perfiles biogénicos distintos que clasifican a estas variantes en dos grupos: mientras unas son correctamente procesadas (oligomerizadas en el RE, son N-glicosiladas de forma compleja en el Golgi y transportadas a la membrana plasmática formando canales funcionales, TRPV4-A y TRPV4-D, grupo I), otras quedan acumuladas en el RE debido a su imposibilidad de oligomerizar (TRPV4-B, TRPV4-C y TRPV4-E, grupo II), coincidiendo en este último caso, con la pérdida total o parcial de dominios de ANK en estas variantes.

Copyright © 2006 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

HUMAN TRPV4 CHANNEL SPLICE VARIANTS REVEALED A KEY ROLE OF ANKYRIN DOMAINS IN MULTIMERIZATION AND TRAFFICKING.¹

Maite Arniges^{*}, José M. Fernández-Fernández^{*}, Nadine Albrecht[†], Michael Schaefer[†] and Miguel A. Valverde^{*‡}.

^{*}Grup de Canalopaties, Unitat de Senyalització Cel·lular, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain, and [†]Institut für Pharmakologie, Campus Benjamin Franklin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Running Title: TRPV4 splice variants with altered oligomerization

[‡]Corresponding author: Prof. Miguel A. Valverde, Grup de Canalopaties, Unitat de Senyalització Cel·lular, Universitat Pompeu Fabra, C/ Dr. Aiguader 80, Barcelona 08003 Spain, Phone: 34 93 542 2832, Fax: 34 93 542 2802, Email: miguel.valverde@upf.edu

The TRPV4 cation channel exhibits a topology consisting of six predicted transmembrane domains (TM) with a putative pore-loop between TM5 and TM6 and intracellular N- and C-tails, the former containing at least three ankyrin domains. Functional TRP channels are supposed to result following the assembly of four subunits. However, the rules governing subunit assembly and the protein domains implied in this process are only starting to emerge. The ankyrin, TM and the C-tail domains have been identified as important determinants of the oligomerization process.

We now describe the maturation and oligomerization of five splice variants of the TRPV4 channel. The already known TRPV4-A and TRPV4-B (Δ 384-444) variants and the new TRPV4-C (Δ 237-284), TRPV4-D (Δ 27-61) and TRPV4-E (Δ 237-284 and Δ 384-444) variants. All alternative spliced variants involved deletions in the cytoplasmic N-terminal region, affecting (except for TRPV4-D) the ankyrin domains. Subcellular localization, fluorescence resonance energy transfer, co-immunoprecipitation, glycosilation

profile and functional analysis of these variants permitted us to group them into two classes: group I (TRPV4-A and TRPV4-D) and group II (TRPV4-B, TRPV4-C and TRPV4-E). Group I, unlike group II variants, were correctly processed, homo- and heteromultimerized in the endoplasmic reticulum, and were targeted to the plasma membrane where they responded to typical TRPV4 stimuli. Our results suggest that: 1) TRPV4 biogenesis involves core glycosilation and oligomerization in the ER followed by transfer to the Golgi apparatus for subsequent maturation; 2) ankyrin domains are necessary for oligomerization of TRPV4, and 3) lack of TRPV4 oligomerization determines its accumulation in the ER.

The non-selective cation channel TRPV4 is a member of the transient receptor potential (TRP²) family of channels (1). TRPV4 shows multiple modes of activation and regulatory sites, enabling it to respond to various stimuli, including osmotic cell swelling (2-5), mechanical stress (6-8), heat (9), acidic pH (7), endogenous ligands (10), high viscous solutions (11) and synthetic agonists such as 4 α -phorbol 12,13-didecanoate (4 α -PDD) (12). TRPV4

mRNA is expressed in a broad range of tissues (13) although functional tests have only been carried out in a few: endothelial (14), epithelial (5, 11, 15), smooth muscle (16), keratinocytes (17) and DRG neurons (18). An alternative splice variant lacking the seventh exon has also been cloned from human aortic endothelial cells (19), although this variant was not further investigated due to its unresponsiveness to hypotonic stimuli.

The general topology of a TRP subunit consist of six predicted transmembrane domains (TM) with a putative pore-loop between TM5 and TM6 and intracellular N- and C-terminal regions of variable length, the former containing multiple ankyrin (ANK) repeats in the TRPC, TRPA, TRPN and TRPV subfamilies (1). ANK repeats are modular protein-interaction domains, each composed by ≈ 33 aminoacids with a highly conserved secondary structure of helix-turn-helix that determines its interaction properties (20). Functional TRP channels are supposed to result following the assembly of four TRP subunits. Although multimerization has been already demonstrated for various members of the TRP family (including TRPV4) (21-25), the tetrameric structure has only been proposed for a few TRP channels (26-28).

The rules governing subunit assembly and the protein domains implied in this oligomerization process are just starting to emerge (29, 30). Several studies suggest the participation of the cytosolic N-terminal region in the assembly of homo- or heteromultimeric TRP channels (23, 31, 32), and two recent papers narrowed down the role of the ANK domains in the oligomerization process of TRPV5 and TRPV6 channels (24, 33). On the other hand, transmembrane domains (25) and the cytoplasmic C-terminus (34) have also been identified as important

determinants of the oligomerization process of TRPV channels.

In this study we characterized the oligomerization, maturation, localization and ion channel function of five splice variants of the TRPV4 channel. Variants lacking part of the ANK domains did not oligomerize, were retained in the ER and did not produce functional channels at the plasma membrane.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cloning and mutagenesis of human TRPV4

TRPV4 splice variants were cloned from the human tracheal epithelial cell line CFT1-LCFSN using the RT-PCR protocol previously described (5). cDNAs were sequenced and subcloned into the pcDNA3.1, pcDNA3-FLAG, pcDNA3-YFP and pcDNA3-CFP vectors (Invitrogen). For the generation of the C-terminal fusion proteins and mutagenesis of the RXR motifs we used the Quick-Change Mutagenesis Kit (Stratagene). The first arginine of each of the four RXR domains (R₁₂₂WR; R₂₆₉GR; R₈₁₆LR and R₈₁₉DR) in TRPV4 channels was mutated to alanine using the following primers: forward primers 5'-

CTCCAGTGACAACAAGGCGTGGA
GGAAGAAGATCATAG-3', 5'-
ATGTCCACGCCAGGCCGCTGGG
CGTTCTTCCAGC-3', 5'-
TTCTCGCATAACCGTGGGCGCCCTC
CGCAGGGATCGCT-3', 5'-
TGGGCCGCTCCGCGCGGATCGC
TGGTCCT-3' and the corresponding
reverse primers.

Cell culture and transient transfection

CFT1-LCFSN human traqueal epithelial cells, HEK-293 and Hela cells were grown as previously described (5, 11). FRET was carried out on HEK-293 cells transfected with 0.4 μ g of CFP-tagged TRPV4 channel isoform and 1.6

µg of YFP-tagged subunit using Fugene 6 transfection reagent (Roche). For coimmunoprecipitation experiments HEK-293 cells were grown in 60 mm dishes and transfected with 2 µg of FLAG- and 2µg of YFP-tagged plasmids. Immunofluorescence, glycosylation and functional studies were carried out on HeLa cells transfected with ExGen500 (Fermentas MBI). 3 µg of the TRPV4 constructs and 7 equivalents of polyethylenimine, together with the transfection reporter pEGFP-N1 (for functional studies) at a 10:1 ratio, were added to each 35 mm dish.

Confocal microscopy

Cells transiently transfected with pcDNA3.1 or pcDNA-YFP constructs were probed with a polyclonal affinity-purified anti-human TRPV4 (1:1000) (5, 11), mouse anti-calnexin and GM130 (1:50 and 1:1000, respectively; BD Biosciences), and α -ERGIC-53 (1:1000) monoclonal antibodies (a gift from R. Hermosilla, Charité - Universitätsmedizin Berlin). Alexa Fluor 595 goat anti-rabbit or Alexa 633 goat anti-mouse ((Molecular Probes, 1:3000 and 1:1000, respectively) were used as secondary antibodies. Digital images were taken and analysed using a Leica TCS SP or a Carl Zeiss LSM 510-META confocal microscopes as previously described (25).

Deglycosylation with PNGase F and Endo H

Total protein was extracted from HeLa cells 24h after transfection. Cells were lysed in a buffer containing (mM): 150 NaCl, 5 EDTA, 1% NP-40, 1 sodium orthovanadate, 1 phenylmethyl sulfonylfluoride, 0.05% aprotinin and 1 DTT (1 h at 4°C). The lysis buffer was supplemented with a Complete Mini protease inhibitor cocktail (1:7 vol/vol; Roche). The nuclear fraction was pelleted by centrifugation at 12,000 rpm

for 15 min. 20 µg of total protein were digested with 2 µl of EndoH or PNGaseF (New England Biolabs) for 1.5 h at 37°C following the manufacturers instructions. Proteins were subjected to SDS-PAGE (8%) and subsequently electroblotted onto nitrocellulose membranes. Incubation with anti-human TRPV4 antibody (1:500) for 1 h at room temperature was followed by incubation for 1 h at room temperature with the horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences, UK) at a dilution of 1:2000. Detection was done with a SuperSignal West chemiluminescent substrate (Pierce).

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) and Coimmunoprecipitation

FRET measurements were carried out in a monochromator-equipped digital video imaging system (TILL-Photonics, Germany) attached to an inverted epifluorescence microscope (Axiovert 100, Carl Zeiss). Experiments were performed in a HEPES-buffered solution containing (mM): 138 NaCl, 6 KCl, 1 HEPES, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 5.5 glucose, 2 mg/ml BSA and 10 HEPES, pH 7.4. Single-cell FRET efficiencies were obtained after monitoring the increase in the CFP (FRET-donor) fluorescence emission during selective YFP (FRET-acceptor) photobleaching (25, 35). FRET efficiency is expressed as the mean±S.E.M of a set of 6-15 experiments with more than 6 cells/experiment.

Coimmunoprecipitation experiments were carried out following the protocol described previously (25) using anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma) for immunoprecipitation and anti-FLAG M2 or 1:1000 polyclonal rabbit anti-GFP (Clontech) antibodies for immunodetection.

Cytosolic Ca²⁺ measurements

Changes in the intracellular Ca^{2+} concentration were measured in cells loaded with 5 μM fura 2-AM (Molecular Probes), incubated for 30 min at 37°C followed by deesterification for 15 min at room temperature. The ratio of emitted fluorescence (510 nm) following alternating excitation at 340 nm and 380 nm was obtained as previously described (15). The isotonic bathing solution contained (mM): 2.5 KCl, 140 NaCl, 1.2 CaCl_2 , 0.5 MgCl_2 , 5 glucose, 10 Hepes (310 mOsmol/L, pH=7.35). The hypotonic bathing solution (220 mOsmol/L, pH=7.35) was prepared by omitting 50 mM NaCl from the isotonic Hank's solution and osmolality adjusted with D-mannitol when necessary. Results are expressed as *means* \pm *S.E.M.* of *n* observations.

Electrophysiological recordings.

Single-channel currents were recorded from HEK-293 transfected cells at different voltage (ranging from -100 mV to +100 mV) in the inside-out patch-clamp mode (36). The pClamp8 software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) was used for pulse generation, data acquisition through an Axon Digidata A/D interface and subsequent analysis. Borosilicate glass patch pipettes had 5-10 $\text{M}\Omega$ resistance and were filled with a solution containing (mM): 125 NaCl, 1.5 MgCl_2 , 1 EGTA and 10 HEPES (300 mosmoles/l, pH 7.35). The bath solution was (mM) 130 CsCl, 1 MgCl_2 , 1 Na_2ATP , 0.034 CaCl_2 , 5 EGTA, 10 HEPES (310 mosmoles/L, pH 7.25). Currents were acquired at 5 KHz and low-pass filtered at 1 kHz. Experiments were performed at room temperature (22-26°C). Channel activity of both TRPV4-A and TRPV-D isoforms was assessed as the NPo (number of channels \times single channel open probability) from 15 s continuous

recordings before and after the addition of 4 α PDD.

RESULTS

Cloning of TRPV4 variants from human airway epithelial cells

RT-PCR-based cloning process identified 5 variants of the TRPV4 channel in human tracheal epithelial cells. Two of the cloned cDNAs corresponded to the already described TRPV4 isoform A (full length cDNA; GenBank No. NM_021625) and TRPV4 isoform B (lacking exon number 7, No. NM_147204; Δ 384-444 aa). Variant B was originally described as an isoform lacking exon 6 (No. AB073669), although subsequent analysis of the genomic structure of the *TRPV4* gene identified a further 5' non-coding exon 1, therefore renumbering the TRPV4 exons. We also identified three new splice variants, named TRPV4-C, TRPV4-D and TRPV4-E variants (Fig. 1A), affecting the cytoplasmic N-terminal region. TRPV4-C lacks exon 5 (No. DQ59644; Δ 237-284 aa), TRPV4-D presents a short deletion inside exon 2 (No. DQ59645; Δ 27-61 aa), and TRPV4-E (No. DQ59646; Δ 237-284 and Δ 384-444 aa) is produced by a double alternative splicing lacking exon 5 and exon 7. Splicing sites for TRPV4-D variant are given by two canonical dinucleotides, GT and AG for donor and acceptor sites, respectively. All variants cloned contained the synonymous single nucleotide polymorphism in position 761 (dbSNP reference number rs3825394). Transcripts for these five variants have been also amplified from the human bronchial epithelial cell line HBE (results not shown).

Functional measurements of the human TRPV4 variants

TRPV4-A channel responds to a wide variety of stimuli (13). In order to functionally evaluate TRPV4 variants

we transiently transfected HeLa cells and measured intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in response to three different well-known activators of TRPV4 (Fig. 1). As a negative control, HeLa cells were transfected with the backbone plasmid (Fig. 1B-D). 30% Hypotonicity, $1\mu\text{M}$ $4\alpha\text{PDD}$ and $10\mu\text{M}$ arachidonic acid (AA) induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ for TRPV4-A (■) and TRPV4-D channels (■) (Fig. 1E-G) while no response was observed for TRPV4-B (▲), TRPV4-C (▲) and TRPV4-E (▲) transfected cells (Fig. 1H-J). No apparent differences in the Ca^{2+} response were seen between TRPV4-A and TRPV4-D variants.

Excised inside-out electrophysiological analysis of TRPV4-A and TRPV4-D expressing HEK-293 cells (Fig. 2) showed spontaneous single channel activity (NPO, measured at +100 mV), which was equally increased by the application of $1\mu\text{M}$ $4\alpha\text{PDD}$ (from 0.049 ± 0.02 to 0.91 ± 0.05 ; $n = 17$ in TRPV4-A transfected cells, and from 0.05 ± 0.039 to 0.91 ± 0.08 ; $n = 9$ in TRPV4-D transfected cells). No differences in inward and outward single-channel slope conductances were also observed between TRPV4-A (50.6 ± 9.3 pS ($n=7$) and 86.1 ± 9.4 pS ($n=17$)) and TRPV4-D isoforms (47.4 ± 9.9 pS ($n=5$) and 86.4 ± 5.1 pS ($n=9$)). Single-channel events did not appear in HEK-293 control cells transfected with pEGFP only, either in the absence or the presence of $4\alpha\text{PDD}$ ($n = 10$).

Expression and subcellular localization of TRPV4 channel variants

Immunolocalization of TRPV4 variants was carried out on transiently transfected HeLa cells with an antibody raised against TRPV4 (5, 11). Figure 3A shows that TRPV4-A and TRPV4-D proteins displayed a robust cell surface expression while TRPV4-B, TRPV4-C

and TRPV4-E proteins showed a reticular intracellular immunostaining, indicative of retention in the ER.

To determine whether B, C and E variants were trapped in the ER, we analyzed their glycosylation profile and carried out colocalization studies with calnexin (an ER resident protein) in transfected HeLa cells. Total cell protein was treated with EndoH to remove N-linked high mannose glycosylations (indicative of ER forms) or PNGaseF to remove both high mannose and complex glycosylation (indicative of post-ER forms). TRPV4-A was used as a control. As shown in Fig. 3B, three immunoreactive protein bands with apparent molecular masses of 96, 100 and 110 kDa were detected for TRPV4-A (and TRPV4-D, results not shown) in untreated samples. The 96 kDa band represents the non-glycosylated form of the TRPV4-A. The 100 kDa band but not the 110 kDa band was sensitive to endoH and both bands were sensitive to PNGaseF. Thus the 100 kDa band represents the high mannose and the 110 kDa band the complex glycosylated form. An identical glycosylation pattern was observed for TRPV4-D isoform (results not shown). An identical glycosylation pattern and EndoH/PNGaseF sensitivity was observed for the TRPV4-D isoform (results not shown). In contrast, the TRPV4-B, -C and -E variants gave rise to two immunoreactive bands migrating at 91 and 96 kDa, 92 and 97 kDa and 86 and 90 kDa, respectively. The upper band disappeared upon treatment with EndoH or PNGaseF (Fig. 3B) indicating the presence of high-mannose glycosylation, but a lack of further maturation. O-glycosylation of TRPV4-A can be excluded since PNGaseF treatment produces a unique band with an apparent molecular weight corresponding to the predicted size of the non-glycosylated protein. Taken together, the data suggest that B, C and

E variants are retained in the ER while TRPV4-A and TRPV4-D are fully processed and reach the plasma membrane where they produce functional channels. Confirmation of ER retention for B, C and E variants was obtained by colocalization studies. All three variants overlap with the ER resident chaperone calnexin (Fig. 3C). No colocalization of TRPV4-B variant with the ER/Golgi intermediate compartment (ERGIC) or the Golgi markers, α ERGIC-53 and GM130, respectively, was detected (Fig 4A). Identical results were obtained with TRPV4-C and E (not shown).

Homomerization of TRPV4 variants

Functional TRP channel complexes require the tetrameric assembly of pore-forming subunits (30). Therefore, quality control mechanisms must be met to ensure the correct quaternary structure. Several compartments, including ER and the Golgi, have been identified as sites for oligomerization (37, 38). Thus, we next checked the multimerization of the TRPV4 variants. For this purpose, we evaluated the proximity of CFP- and YFP- tagged TRPV4 variants, as an indication of subunit assembly by fluorescent resonance energy transfer (FRET) technique (25). The relative CFP and YFP fluorescence intensities were determined for every single cell to ensure comparable levels of TRPV4 expression and to adjust an 1.5- to 3-fold molar ratio between acceptor (YFP) and donor (CFP)-labeled subunits. Figure 5 shows FRET efficiencies obtained in HEK-293 cells transiently co-transfected with expression plasmids encoding CFP- or YFP-fused TRPV4 isoforms. TRPV4-A and TRPV4-D variants displayed a higher FRET efficiency (17.5 ± 0.94 and 18.32 ± 1.07 , respectively) compared to TRPV4-B, TRPV4-C and TRPV4-D (around 5%). FRET results indicate that

only TRPV4-A and TRPV4-D efficiently assemble into homomeric channel complexes.

In order to check whether TRPV4 channels oligomerize in the ER we carried out FRET analysis of HeLa cells transfected with CFP- and YFP-fused TRPV4-A variant and treated for 10 hours after transfection with the intracellular transport inhibitor brefeldin A ($0.5 \mu\text{g/l}$), that prevents the transport from the ER to the Golgi (39). FRET efficiencies (measured 14 h after transfection) for homomeric TRPV4A were not statistically different between solvent-treated and brefeldin A-treated cells ($24.1\pm 1.3\%$ and $19.4\pm 3.3\%$, respectively; $n=3$; $P>0.05$). This result suggests that assembly of TRPV4 occurs primarily in the ER and that ER sequestration of TRPV4-B, C and E variants is related to their inability to oligomerize in the ER.

One possible mechanism explaining the intracellular sequestration of channel subunits involves the participation of bi-arginine (RXR) retention motifs, which are hidden under the tetrameric structure but when exposed in non-assembled channel subunits determine their intracellular retention (40). TRPV4 protein contains 4 RXR motifs, two on the N-terminal ($R_{122}WR$ and $R_{269}GR$) and two on the C-terminal ($R_{816}LR$ and $R_{819}DR$) intracellular tails. Expression of TRPV4-B variants containing alanine mutations in the first arginine of either of the four RXR motifs did not modify the localization of TRPV4-B (data not shown). Likewise, a TRPV4-B construct in which all four RXR motifs were modified by alanine mutations was still retained in the ER and did not migrate to the ERGIC or Golgi (Fig. 4B).

Heteromerization of TRPV4 variants

Heteromeric assembly of TRP channels can produce a change in the intracellular localization and/or modify the function of the new assembled protein (33, 41,

42). To test whether TRPV4-A could rescue TRPV4-B, TRPV4-C and TRPV4-E isoforms retained in the ER, we co-expressed TRPV4-A-YFP and CFP-fused variants in HEK-293 cells and visualized the subcellular distribution by confocal laser microscopy. As shown in Fig. 6A plasma membrane overlapping was only observed in cells expressing TRPV4-A and TRPV4-D (with almost identical localization) while partial overlap in intracellular compartments was detected for all the combinations of TRPV4 variants. It is also worth noting the apparent lack of redistribution to the plasma membrane of the intracellular variants (B, C and E) following coexpression with the YFP-tagged TRPV4-A isoform. TRPV4-B, TRPV4-C and TRPV4-E proteins failed to reach the plasma membrane even if coexpressed with excess amounts of targeting-competent TRPV4-A-YFP. Heteromerization of TRPV4 variants was also tested by FRET and coimmunoprecipitation analysis. Using TRPV4-A-YFP as the FRET-acceptor and CFP-fused TRPV4-B-E variants as donors, a high FRET efficiency of 21.7 ± 3.5 could only be demonstrated for the heteromeric channel formation between TRPV4-A and TRPV4-D subunits. By contrast, FRET efficiencies remained low for TRPV4-A coexpressed with TRPV4-B, TRPV4-C or TRPV4-E (Fig. 6B). Heteromeric TRP proteins may modify the response of resulting channel compared to the homomeric channel, a possibility we also evaluated. Measurements of $[Ca^{2+}]_i$ in cells expressing heteromultimeric TRPV4-A/TRPV4-D channels did not differ from the homomultimeric TRPV4-A and TRPV4-D channels (Fig. 1E-G) probed with 30% hypotonicity, $1\mu\text{M}$ $4\alpha\text{PDD}$ and $10\mu\text{M}$ AA. Coimmunoprecipitation experiments confirmed the FRET data. From all the combinations tested with the TRPV4-A-

FLAG-tagged protein coexpressed with TRPV4-YFP isoforms in HEK-293 cells, we were able to coimmunoprecipitate only the TRPV4-D variant (top panel, Fig. 6C). Lysate probed with anti-YFP antibody (middle panel Fig. 6C), to check the expression of the transfected YFP-variants, and the immunoprecipitates with anti-FLAG antibody (lower panel Fig. 6C), proving the recovery of the FLAG protein, are also shown. No FRET or coimmunoprecipitation between TRPV4-B, -C and -E variants was detected (results not shown).

DISCUSSION

Our study of oligomerization, localization and channel activity of human TRPV4 splice variants has allowed us to identify the N-terminal ANK repeats as key molecular determinants of subunit assembly and subsequent processing of the assembled channel. Using a combined approach of several independent methods we have described five TRPV4 variants (TRPV4-A-E) cloned from human airway epithelial cells, three of which were described for the first time (TRPV4-C-E). We have grouped them into two classes: group I (including TRPV4-A and TRPV4-D) and group II (including TRPV4-B, TRPV4-C and TRPV4-E). Group I variants are correctly processed and targeted to the plasma membrane where they form functional channels with similar electrophysiological properties. Variants from group II, which are lacking parts of the ANK domains are unable to oligomerize and retained intracellularly, in the ER.

Misfolded channel proteins and/or oligomerization-deficient subunits can be identified and intracellularly retained by quality control mechanisms in the ER (37, 43). Therefore, is particularly important to identify the structural domains involved in the oligomerization

process. In the case of TRP channels, identification of the assembly pathway is starting to emerge (30). The N-tail of TRP channels, as it occurs for voltage-gated K⁺ channels (33), has also been identified as a possible multimerization domain (23-25, 31-33). In the case of TRPV5 and TRPV6 a key oligomerization domain has been narrowed down to the N-terminal ANK domains (24, 33). C-tails and transmembrane domains have also been suggested to participate in the oligomerization and/or stabilization of assembled TRP channels (33, 34), including TRPV4 (25).

Our study of TRPV4-B,C,E splice variants (missing part of the ANK domains) by *in vivo* FRET and coimmunoprecipitation methods has allowed us to show for the first time three important traits of TRPV4 biogenesis:

- 1) Glycosylation of TRPV4 channel involves ER-to-Golgi transport with the corresponding change in the N-linked oligosaccharides from the high mannose type characteristic of the ER to the complex type characteristic of the Golgi apparatus, without apparent O-glycosylation.
- 2) TRPV4-A subunits oligomerize in the ER (no significant differences in FRET efficiency were seen in the absence or presence of brefeldin A, an inhibitor of ER-to-Golgi transport)
- 3) Impaired subunit assembly of type II variants is due to the lack of N-terminal ANK domains and causes protein retention in the ER. Although we propose that ER retention of TRPV-B, -C and E variants is directly related to their inability to oligomerize we cannot unequivocally discard

that such retention is due to protein misfolding.

Subunit misfolding is a cause of inefficient ion channel assembly, but folding events of ion channel subunits also occur after subunit assembly, i.e., subunits oligomerize even if their folding is not complete (37, 44). A possible mechanism for ER retention of unoligomerized subunits involves exposure of a retention signal sequence (RXR), that otherwise is shielded in completely assembled channels (40, 45). RXR motifs play a role in monitoring the assembly of multimeric proteins and TRPV4 presents four RXR motifs, two in each intracellular tails. However, mutation of all RXR motifs did not modify the intracellular distribution of type II variants, similarly to what have been reported for other membrane proteins (46). The implication of other ER-transport signals (47, 48) in the retention of type II TRPV4 variants is a mechanism that remains to be addressed.

Intriguingly, an early study on truncated rat TRPV4 lacking the three ANK domains reported a delayed response to hypotonicity (3). At present, we can not explain how these truncated proteins, that according to our results should not oligomerize, can produce functional channels. Certainly, the original observation by Liedtke and cols. (3) should be reevaluated in view of our results and those of others demonstrating impaired function of TRPV4 (49) and TRPV6 (24) channels with deleted ANK domains.

Ion channel functional diversity is greatly enlarged by both the presence of splice variants and heteromerization of different pore-forming and regulatory subunits. Alternative splicing is a major contributor to protein diversity (50). Within the TRP family of ion channels several splice variants have been identified, some of them resulting in lack of responses to typical stimuli,

others modifying the pore properties and those exerting dominant negative effects (42, 51-54). Group II TRPV4 splice variants have been identified in two, unrelated, human airway epithelial cell lines (CFT1-LCFSN and HBE). Considering the relevance of TRPV4 channels in epithelial physiology (5, 11, 55), it may be conceivable that a change in the expressed ratio of group I to

group II variants, favoring the later would modify normal epithelial functioning. Splicing can be regulated by several stressing stimuli (56) including pH, osmotic and temperature shocks, all of them being also activating stimuli of the TRPV4. Therefore, it will be interesting to test whether such stimuli modify the expressed ratio of TRPV4 group I to group II variants.

REFERENCE LIST

1. Montell, C. (2005) *Sci. STKE*. **2005**, re3.
2. Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G. & Plant, T. D. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 695-702.
3. Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., Hudspeth, A. J., Friedman, J. M. & Heller, S. (2000) *Cell* **103**, 525-535.
4. Wissenbach, U., Bodding, M., Freichel, M. & Flockerzi, V. (2000) *FEBS Lett.* **485**, 127-134.
5. Arniges, M., Vazquez, E., Fernandez-Fernandez, J. M. & Valverde, M. A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 54062-54068.
6. Gao, X., Wu, L. & O'Neil, R. G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 27129-27137.
7. Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K. & Imai, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 22664-22668.
8. Liedtke, W., Tobin, D. M., Bargmann, C. I. & Friedman, J. M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100 Suppl 2**, 14531-14536.
9. Guler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M. & Caterina, M. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 6408-6414.
10. Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T. & Nilius, B. (2003) *Nature* **424**, 434-438.
11. Andrade, Y. N., Fernandes, J., Vazquez, E., Fernandez-Fernandez, J. M., Arniges, M., Sanchez, T. M., Villalon, M. & Valverde, M. A. (2005) *J. Cell Biol.* **168**, 869-874.
12. Watanabe, H., Davis, J. B., Smart, D., Jerman, J. C., Smith, G. D., Hayes, P., Vriens, J., Cairns, W., Wissenbach, U., Prenen, J. *et al.* (2002) *J Biol. Chem.* **277**, 13569-13577.
13. Nilius, B., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G. & Voets, T. (2004) *Am. J. Physiol Cell Physiol* **286**, C195-C205.

14. Vriens, J., Owsianik, G., Fisslthaler, B., Suzuki, M., Janssens, A., Voets, T., Morisseau, C., Hammock, B. D., Fleming, I., Busse, R. *et al.* (2005) *Circ. Res.*
15. Fernandez-Fernandez, J. M., Nobles, M., Currid, A., Vazquez, E. & Valverde, M. A. (2002) *Am. J Physiol Cell Physiol* **283**, C1705-C1714.
16. Jia, Y., Wang, X., Varty, L., Rizzo, C. A., Yang, R., Correll, C. C., Phelps, P. T., Egan, R. W. & Hey, J. A. (2004) *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **287**, L272-L278.
17. Chung, M. K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M. & Caterina, M. J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 21569-21575.
18. Alessandri-Haber, N., Yeh, J. J., Boyd, A. E., Parada, C. A., Chen, X., Reichling, D. B. & Levine, J. D. (2003) *Neuron* **39**, 497-511.
19. Xu, F., Satoh, E. & Iijima, T. (2003) *Br. J. Pharmacol.* **140**, 413-421.
20. Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C. & Peng, Z. Y. (2004) *Protein Sci.* **13**, 1435-1448.
21. Gillo, B., Chorna, I., Cohen, H., Cook, B., Manistersky, I., Chorev, M., Arnon, A., Pollock, J. A., Selinger, Z. & Minke, B. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 14146-14151.
22. Niemeyer, B. A., Suzuki, E., Scott, K., Jalink, K. & Zuker, C. S. (1996) *Cell* **85**, 651-659.
23. Xu, X. Z., Li, H. S., Guggino, W. B. & Montell, C. (1997) *Cell* **89**, 1155-1164.
24. Erler, I., Hirnet, D., Wissenbach, U., Flockerzi, V. & Niemeyer, B. A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 34456-34463.
25. Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G. & Schaefer, M. (2005) *J. Cell Sci.* **118**, 917-928.
26. Kedei, N., Szabo, T., Lile, J. D., Treanor, J. J., Olah, Z., Iadarola, M. J. & Blumberg, P. M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 28613-28619.
27. Jahnel, R., Dreger, M., Gillen, C., Bender, O., Kurreck, J. & Hucho, F. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 5489-5496.
28. Hoenderop, J. G., Nilius, B. & Bindels, R. J. (2003) *Pflugers Arch.* **446**, 304-308.
29. Niemeyer, B. A. (2005) *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **371**, 285-294.
30. Schaefer, M. (2005) *Pflugers Arch.* **451**, 35-42
31. Balzer, M., Lintschinger, B. & Groschner, K. (1999) *Cardiovasc. Res.* **42**, 543-549.

32. Engelke, M., Friedrich, O., Budde, P., Schafer, C., Niemann, U., Zitt, C., Jungling, E., Rocks, O., Luckhoff, A. & Frey, J. (2002) *FEBS Lett.* **523**, 193-199.
33. Chang, Q., Gyftogianni, E., van de Graaf, S. F., Hoefs, S., Weidema, F. A., Bindels, R. J. & Hoenderop, J. G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 54304-54311.
34. Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sanchez, E., Fernandez-Ballester, G. & Ferrer-Montiel, A. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 5307-5314.
35. Amiri, H., Schultz, G. & Schaefer, M. (2003) *Cell Calcium* **33**, 463-470.
36. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, J. (1981) *Pflugers Arch.* **391**, 85-100.
37. Green, W. N. & Millar, N. S. (1995) *Trends Neurosci.* **18**, 280-287.
38. Hurlley, S. M. & Helenius, A. (1989) *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 277-307.
39. Klausner, R. D., Donaldson, J. G. & Lippincott-Schwartz, J. (1992) *J. Cell Biol.* **116**, 1071-1080.
40. Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1999) *Neuron* **22**, 537-548.
41. Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. & Clapham, D. E. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 39014-39019.
42. Wang, C., Hu, H. Z., Colton, C. K., Wood, J. D. & Zhu, M. X. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 37423-37430.
43. Schulein, R. (2004) *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* **151**, 45-91.
44. Schulteis, C. T., Nagaya, N. & Papazian, D. M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 26210-26217.
45. Hermosilla, R. & Schulein, R. (2001) *Mol. Pharmacol.* **60**, 1031-1039.
46. Jaskolski, F., Normand, E., Mulle, C. & Coussen, F. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 22968-22976.
47. Ellgaard, L., Molinari, M. & Helenius, A. (1999) *Science* **286**, 1882-1888.
48. Ma, D. & Jan, L. Y. (2002) *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**, 287-292.
49. Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S. H., Benham, C. D., Droogmans, G. & Nilius, B. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 47044-47051.
50. Black, D. L. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 291-336.
51. Mery, L., Magnino, F., Schmidt, K., Krause, K. H. & Dufour, J. F. (2001) *FEBS Lett.* **487**, 377-383.

52. Walker, R. L., Hume, J. R. & Horowitz, B. (2001) *Am. J. Physiol Cell Physiol* **280**, C1184-C1192.
53. Schumacher, M. A., Moff, I., Sudanagunta, S. P. & Levine, J. D. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 2756-2762.
54. Oberwinkler, J., Lis, A., Giehl, K. M., Flockerzi, V. & Philipp, S. E. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 22540-22548.
55. Cohen, D. M. (2005) *Pflugers Arch.* **451**, 168-175
56. Stamm, S. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2409-2416.

FOOTNOTES

¹We thank E. Vázquez, Y. Andrade and J. Fernandes for valuable discussions; Y. Tor for technical support; I. Uribesalgo and G. Cantero for their help at some stages of this work. This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Technology (grant number SAF2003-1240), red HERACLES (FIS) and Generalitat de Catalunya (SGR05-266). J.M F-F is a Ramon y Cajal Fellow

² Abbreviations: 4 α -PDD, 4 α -phorbol 12,13-didecanoate; ANK, ankyrin domain; AA, arachidonic acid; ERGIC, ER/Golgi intermediate compartment; FRET, fluorescence resonance energy transfer; TRP, transient receptor potential; TM, transmembrane domains

Database AcN: TRPV4-C variant (No. DQ59644), TRPV4-D variant (No. DQ59645), and TRPV4-E variant (No. DQ59646).

LEGENDS

Figure 1. Identification and function of TRPV4 variants in human airway epithelial cells.

A, Schematic diagram showing the intracellular N-terminal region of human TRPV4 channel (aa 1-471). Exons and the corresponding aa lost in each TRPV4 isoform are indicated by numbers. **B-J**, Functional analysis of TRPV4 variants. Fura-2 ratios obtained in control Hela cells transfected with the empty vector pEGFP-C1 (**B-D**), TRPV4-A and D (**E-G**), TRPV4-B, C and E (**H-J**) and stimulated with 30% hypotonic solution, 1 μ M 4 α PDD or 10 μ M AA. Traces are means \pm SEM of 10-20 cells measured in 3-4 independent experiments.

Figure 2. TRPV-A and TRPV4-D isoforms produce functional channels with similar properties when expressed in HEK-293 cells.

A, Current traces obtained from TRPV4-A- and TRPV4-D-expressing HEK293 cells at the indicated voltages in the presence of 1 μ M 4 α PDD. Dashed lines indicate the zero current level. **B**, i-V relationship of 4 α PDD-activated TRPV4-A (*open circle*) and TRPV4-D (*closed circle*) channels in inside-out patches.

Figure 3. Expression and subcellular localization of TRPV4 variants.

A, Immunolocalization of TRPV4 isoforms in transiently transfected Hela cells. Confocal microscopy images obtained after immunostaining with a polyclonal anti-human TRPV4 antibody. **B**, Glycosylation analysis of TRPV4 variants. Total protein (20 μ g) from transiently transfected Hela cells was isolated and treated with EndoH

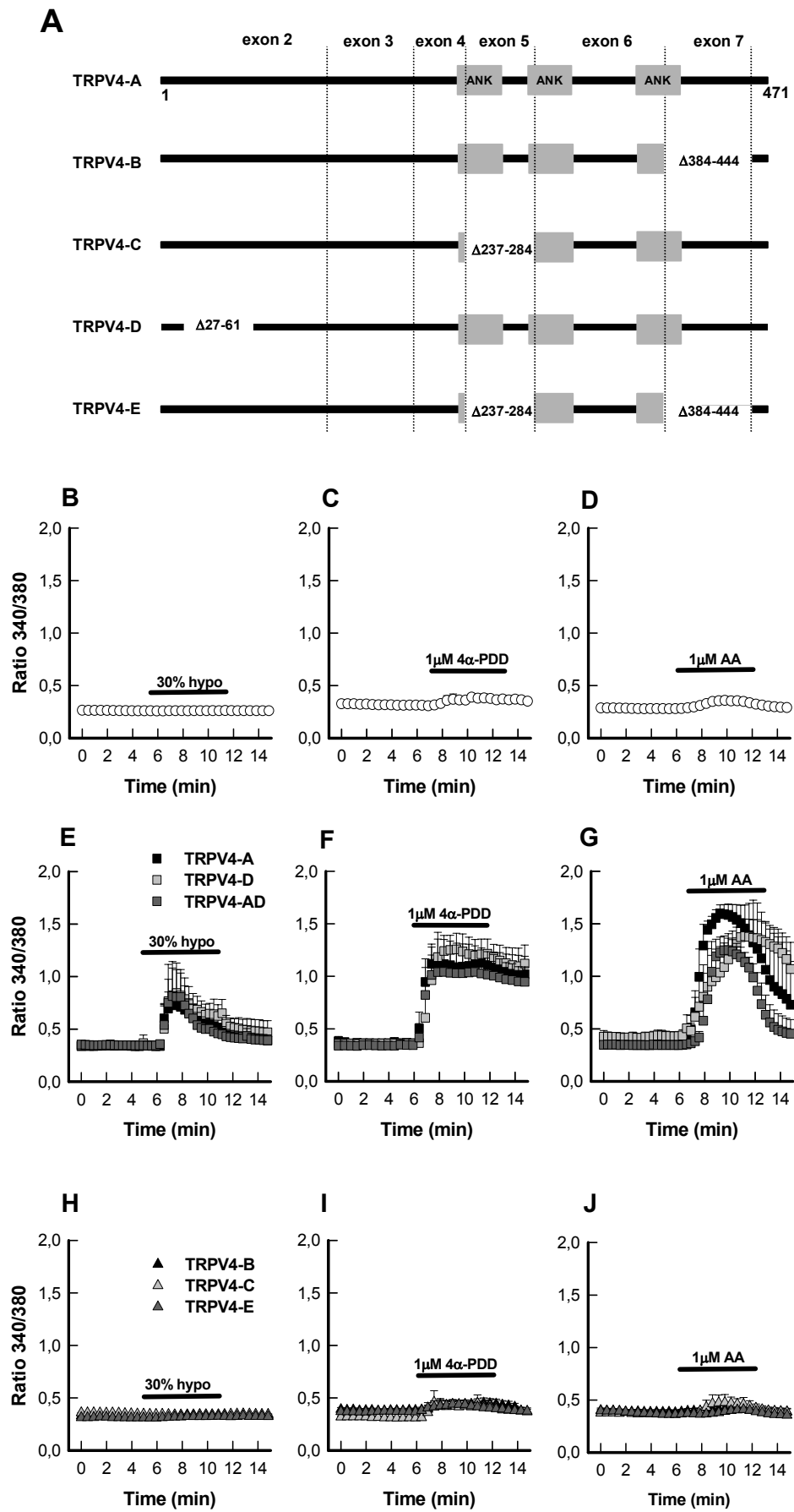
(EH) or PNGaseF (PF) or untreated (-). **C**, Colocalization of TRPV4-B, TRPV4-C and TRPV4-E variants (left panels, green) expressed in HeLa cells with the ER marker calnexin (middle panels, red). Merged images (right panels) show extensive colocalization of TRPV4 type II variants and the ER marker.

Figure 4. Lack of TRPV4-B colocalization to ERGIC or Golgi. **A**, TRPV4-YFP fluorescence detection in transfected HeLa cells (green), co-stained with ERGIC and Golgi markers ERGIC-53 and GM130 (in red) and channel overlay. **B**, Fluorescence detection of RXR-mutated TRPV4-YFP (green channel) and counterstaining with ERGIC and Golgi markers (red channel). Absence of colocalization is apparent in merged images (right panels) obtained from both wild-type and mutant TRPV4-B.

Figure 5. Homomerization of TRPV4 variants. FRET efficiencies determined between identical CFP- and YFP-fused TRPV4 variants (A-E) transiently cotransfected in HEK-293 cells. High FRET efficiencies corresponding to homomultimer formation could only be demonstrated for TRPV4-A and TRPV4-D variants.

Figure 6. Heteromerization of TRPV4 variants. **A**, Different combinations of TRPV4 channels tagged with YFP (TRPV4-A) or CFP (TRPV4-B-E) were coexpressed in HEK-293 cells and imaged by confocal microscopy. Colocalization at the plasma membrane only exists for the coexpressed TRPV4-A-YFP and TRPV4-D-CFP subunits. **B**, FRET efficiencies determined between different TRPV4 variants showed heterooligomerization only for A and D proteins (n=6). **C** Coimmunoprecipitation of coexpressed TRPV4 channels subunits. Plasmids encoding TRPV4 channels C-terminally tagged with FLAG or YFP were cotransfected in HEK-293 cells. TRPV4 isoforms in the membrane lysates (middle panel) and co-immunoprecipitated subunits (upper panel) were detected by immunoblotting (IB) with α -GFP antibodies. The lower panel shows the recovery of immunoprecipitated TRPV4-A-FLAG.

Fig1



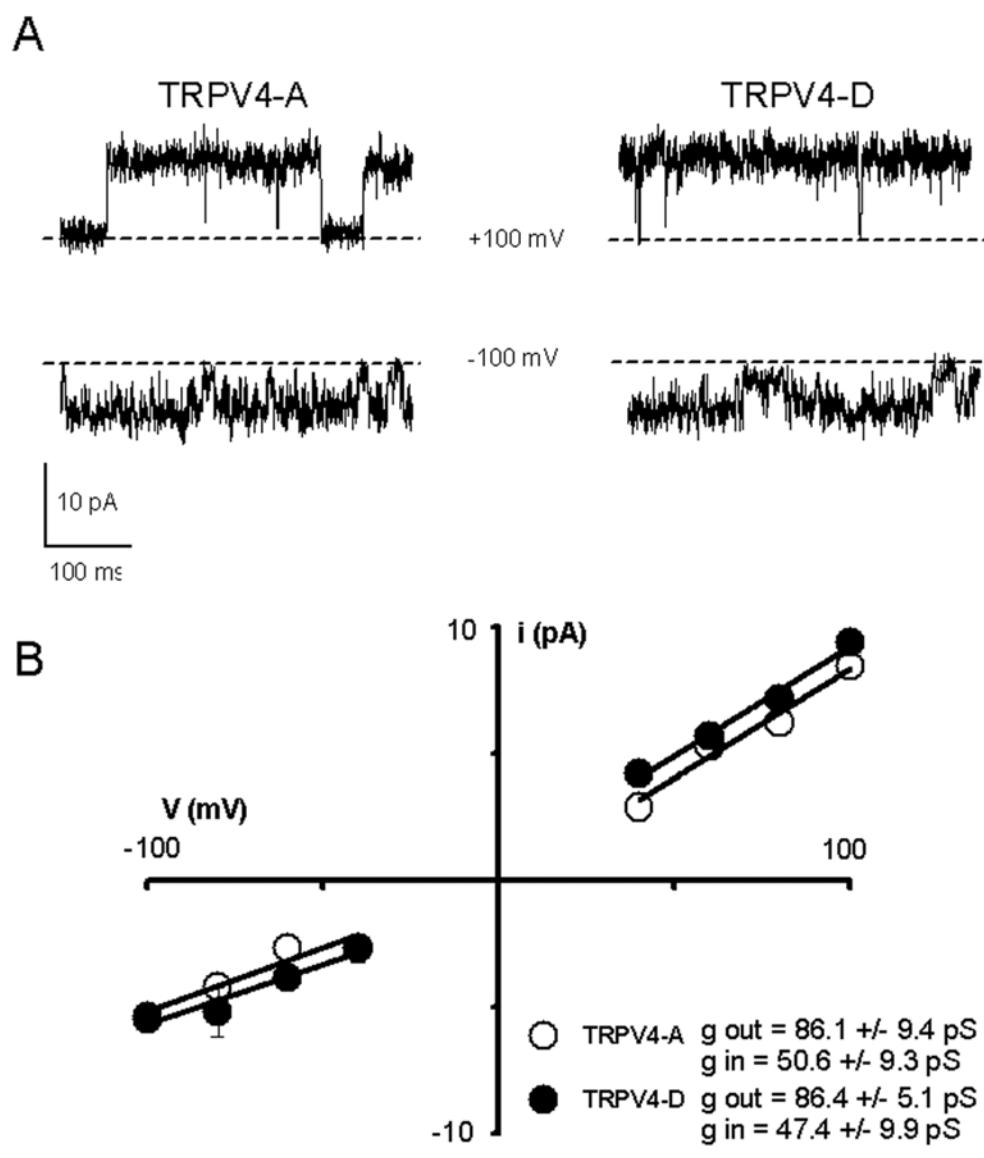


Fig 2

Fig 3

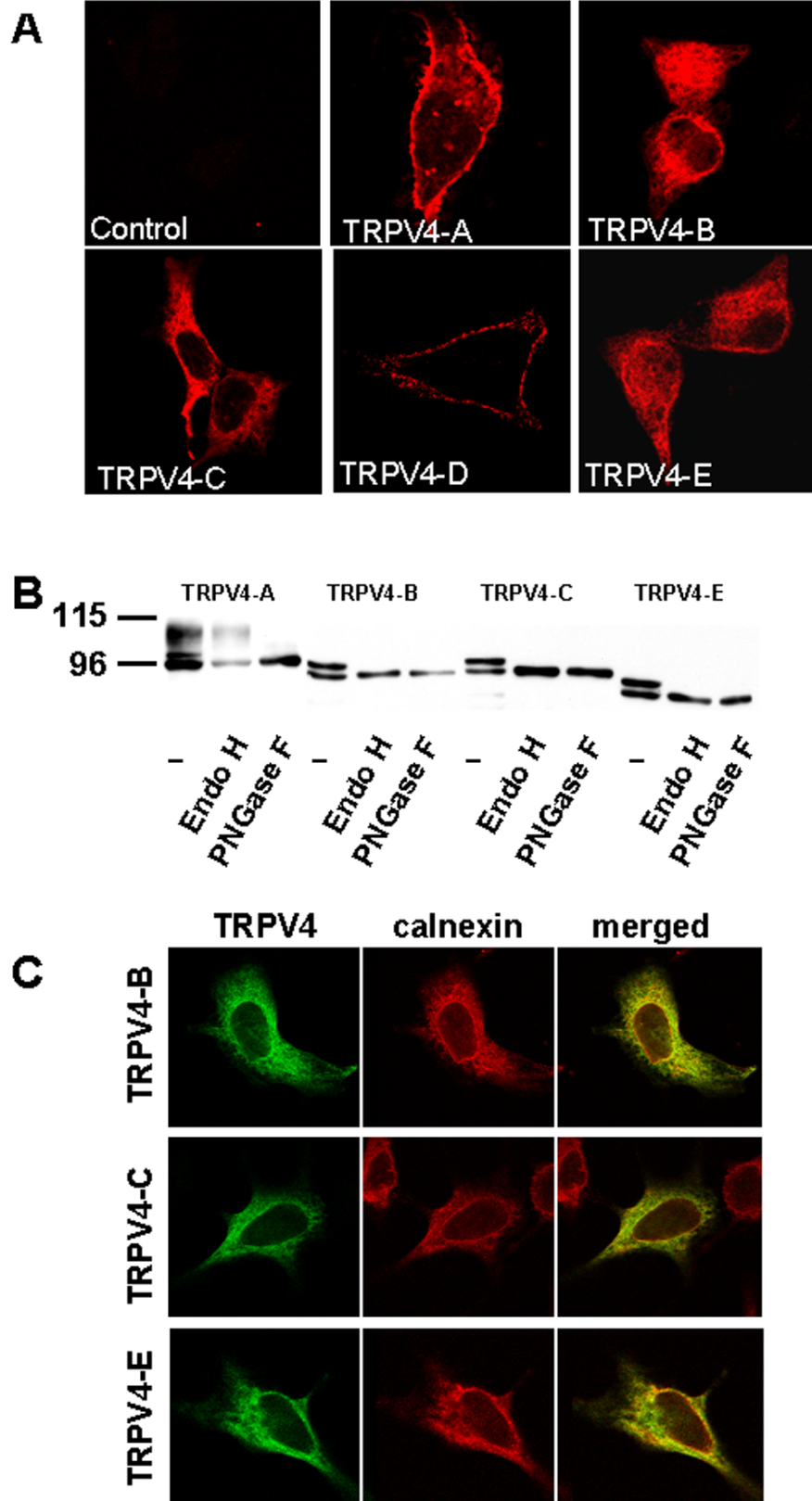


Fig 4

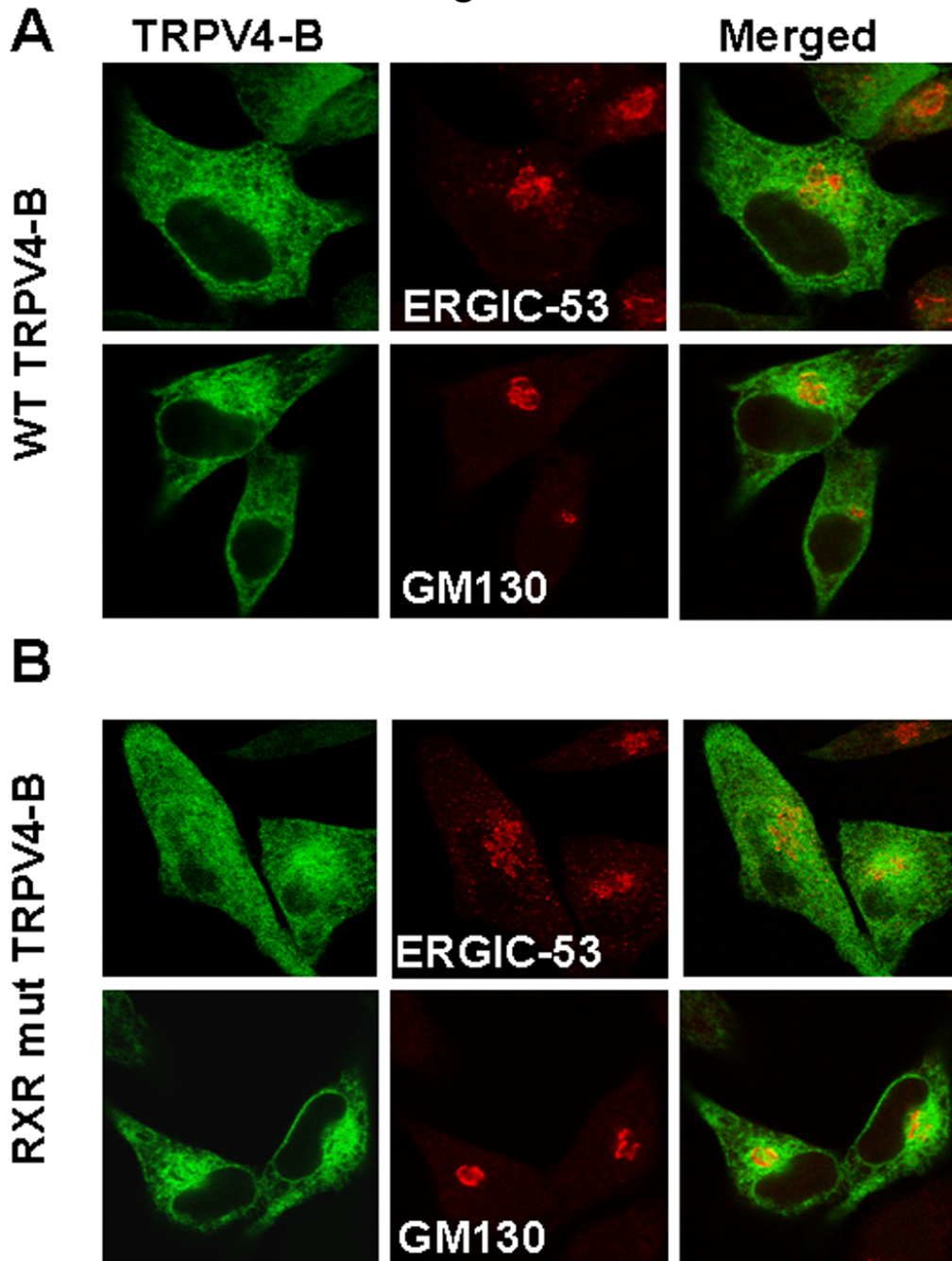
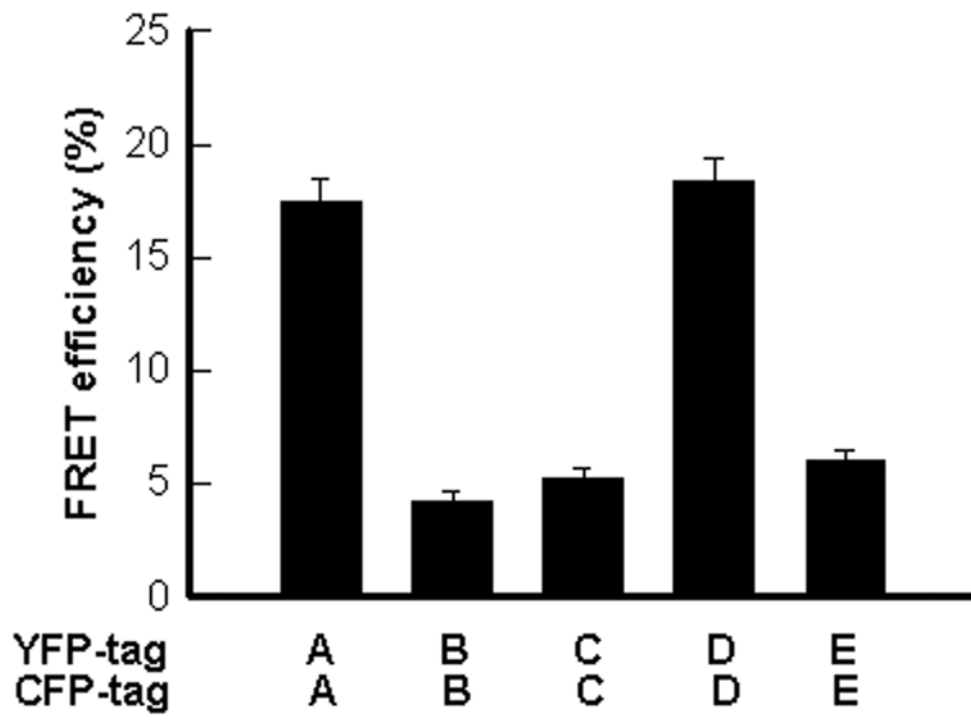


Fig 5



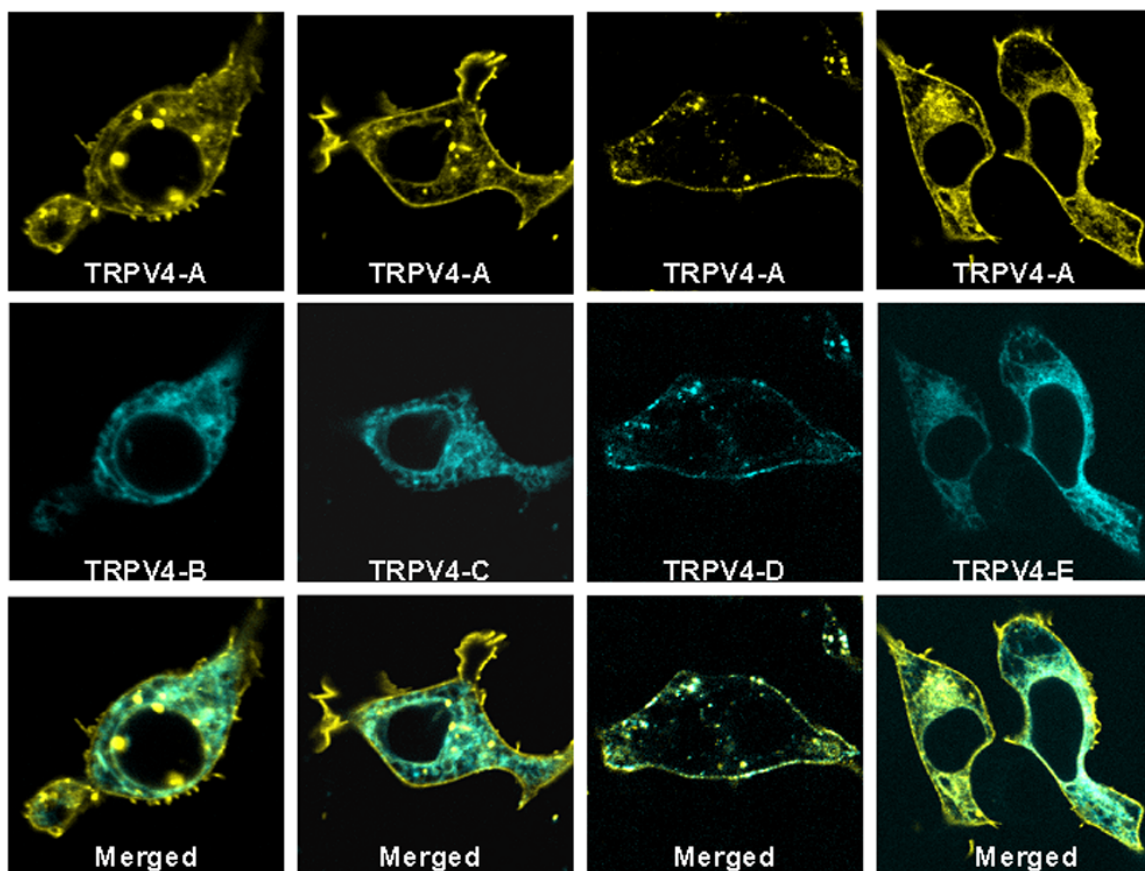
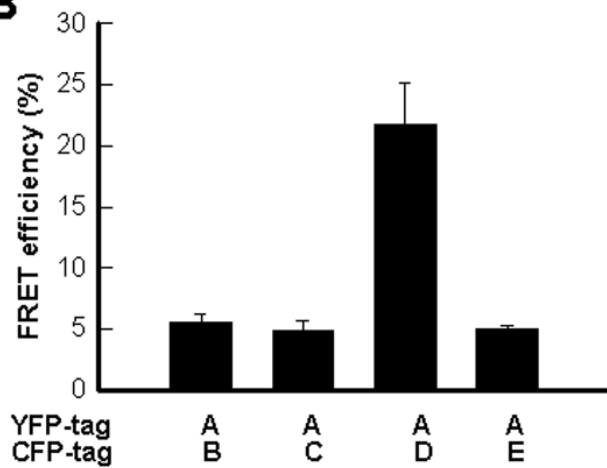
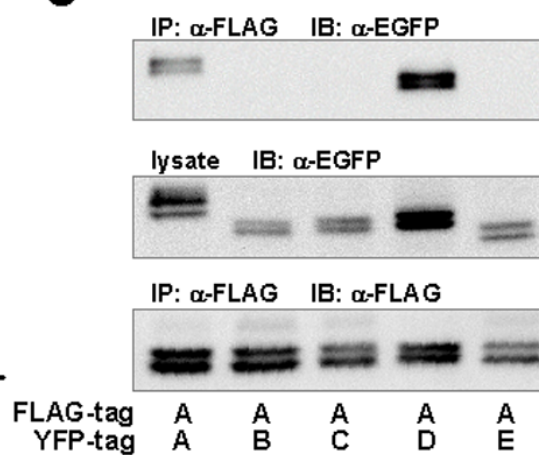
A**B****C**

Figure 6

Capítulo III

1.- ESTUDIO DEL CANAL TRPV4 EN CÉLULAS HBE Y HTE Y SU RELACIÓN CON EL PROCESO DE RVD EN ESTAS CÉLULAS

El estudio de funciones homeostáticas en modelos celulares ha permitido descifrar muchos de los mecanismos moleculares implicados en dichas funciones, aunque, a veces, proporciona resultados que poco tienen que ver con la respuesta del tejido nativo. Por esta razón, se decidió repetir un abordaje experimental similar al descrito en el trabajo anterior (Arniges y cols. 2004) en otras líneas celulares humanas de epitelio respiratorio. Concretamente los resultados que se presentan a continuación hacen referencia a las células epiteliales humanas HBE y HTE. Las células HBE derivan del epitelio respiratorio bronquial de un individuo sano expresando niveles normales de la proteína CFTR (+/+) (180), mientras que la línea celular HTE, derivada del epitelio respiratorio traqueal, presenta el fenotipo característico de fibrosis quística con niveles indetectables de la proteína CFTR (-/-) (181).

1.1.- RVD en células de epitelio respiratorio HBE y HTE

Para evaluar la RVD en estas dos líneas celulares de las vías respiratorias se realizaron medidas morfométricas durante la incubación en un medio hipotónico al 28%. Tal y como muestra la figura 1, la aplicación de hipotonicidad en células de epitelio respiratorio HBE (CFTR +/+) (fig. 1A) induce un aumento rápido del volumen celular (1-2 min) que se recupera fácilmente en unos 20 min. No obstante, las células epiteliales HTE (CFTR -/-) no son capaces de recuperar el volumen inicial y permanecen hinchadas durante la aplicación del cambio osmótico (fig. 1B). Estos resultados, en acorde con los resultados presentados en el trabajo anterior y en otros trabajos publicados antecesores de esta tesis, ponen de manifiesto que la RVD es un proceso dependiente de la CFTR en células epiteliales respiratorias.

La RVD acontece tras la activación de canales de K^+ y de Cl^- presentes en la membrana plasmática, como se ha explicado detalladamente en la introducción. En las células HTE (CFTR -/-), tanto la incubación con ionomicina (fig. 1C), un ionóforo para el Ca^{2+} , como la incubación con valinomicina (fig. 1D), un ionóforo para el K^+ ,

permiten recuperar el volumen. Estos resultados muestran que, facilitando una vía de entrada para el Ca^{2+} o bien una vía de salida para el K^+ las células HTE (CFTR -/-) pueden reajustar su volumen, indicando que la deficiente RVD en estas células es debida a una falta de activación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y sugiriendo que el posible defecto resida en la regulación por Ca^{2+} de estos canales.

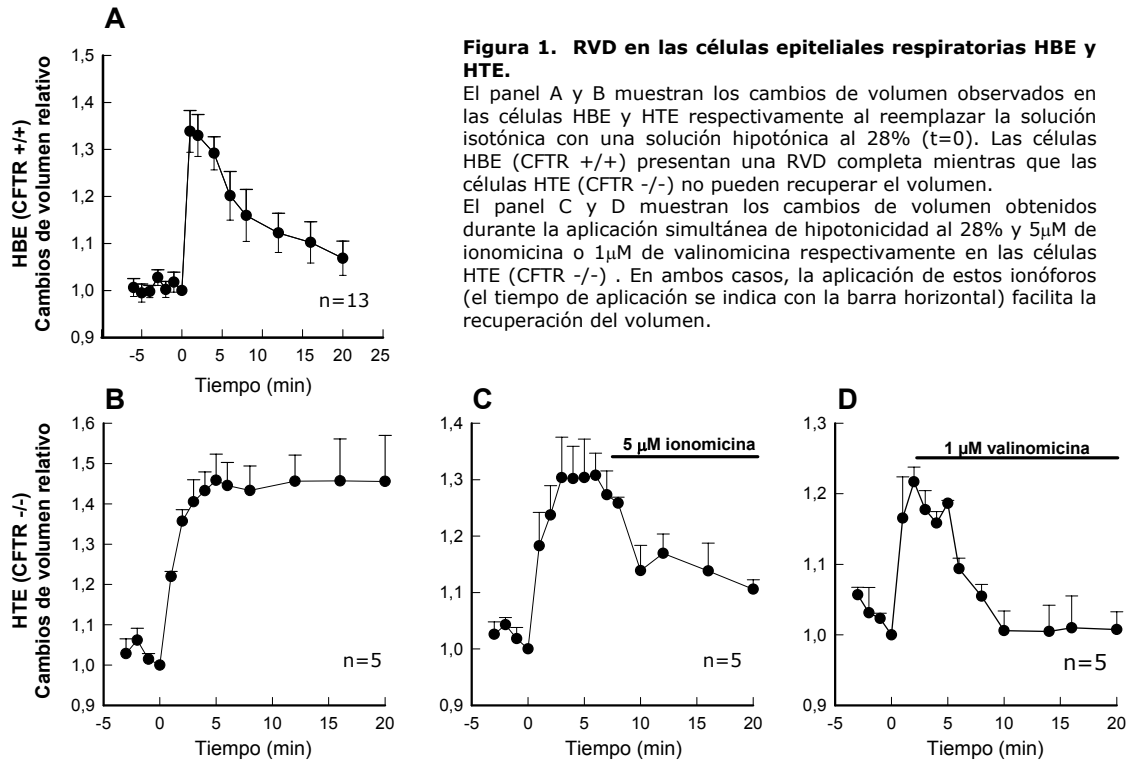


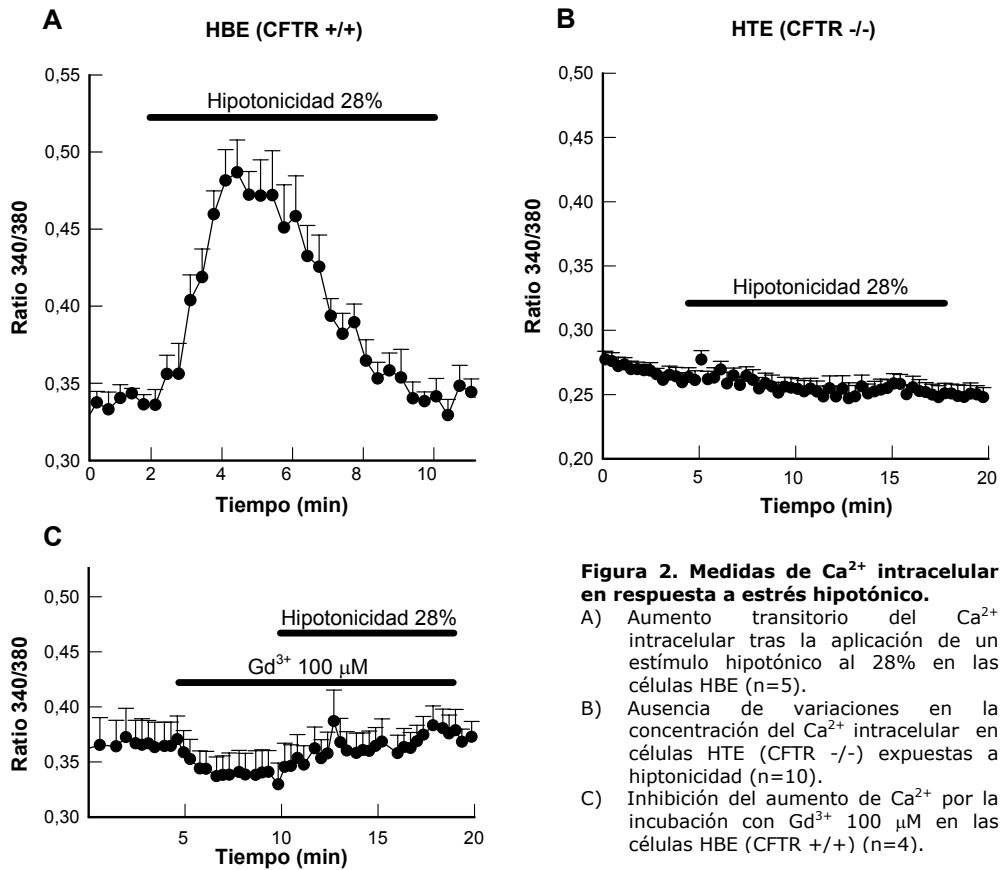
Figura 1. RVD en las células epiteliales respiratorias HBE y HTE.

El panel A y B muestran los cambios de volumen observados en las células HBE y HTE respectivamente al reemplazar la solución isotónica con una solución hipotónica al 28% (t=0). Las células HBE (CFTR +/+) presentan una RVD completa mientras que las células HTE (CFTR -/-) no pueden recuperar el volumen. El panel C y D muestran los cambios de volumen obtenidos durante la aplicación simultánea de hipotonicidad al 28% y 5μM de ionomicina o 1μM de valinomicina respectivamente en las células HTE (CFTR -/-) . En ambos casos, la aplicación de estos ionóforos (el tiempo de aplicación se indica con la barra horizontal) facilita la recuperación del volumen.

1.2.- Variaciones de Ca^{2+} en respuesta al estímulo hipotónico en las células HBE y HTE

Para determinar el comportamiento del Ca^{2+} en respuesta a hipotonicidad se realizaron medidas de las variaciones intracelulares de Ca^{2+} con marcadores fluorescentes del tipo Fura-2. En la figura 2A puede observarse cómo las células HBE (CFTR +/+) experimentan un aumento transitorio del Ca^{2+} intracelular en respuesta a un estímulo hipotónico, aumento que desaparece cuando se retira el Ca^{2+} del medio extracelular o en presencia de Gd^{3+} en el medio (fig. 2C). Estos resultados implican la participación de una vía de entrada de Ca^{2+} sensible a Gd^{3+} en respuesta a hipotonicidad. En cambio, en el caso de las HTE (CFTR -/-), la

incubación en un medio hipotónico no induce variaciones en las concentraciones del Ca^{2+} intracelular (fig. 2B), indicando que la vía de entrada de Ca^{2+} en respuesta a hipotonicidad no se activa en las células HTE (CFTR -/-), tal y como sucedía con las células traqueales CFT1 ($\Delta 508\text{F}/\Delta 508\text{F}$) o las bronquiales CFBE ($\Delta 508\text{F}/\Delta 508\text{F}$), asociando esta deficiencia en la vía de entrada de Ca^{2+} activada por el hinchamiento celular a la falta de regulación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} .



1.3.- Expresión funcional del canal TRPV4 en las líneas celulares HTE y HBE

La expresión funcional del canal TRPV4, nuestro principal candidato para mediar la entrada de Ca^{2+} en respuesta al estímulo hipotónico, también fue caracterizada en las líneas celulares HBE (CFTR +/+) y HTE (CFTR -/-).

1.3.1.- RT-PCR

Por RT-PCR, utilizando el mismo protocolo descrito en Arniges y col. 2004, se demostró la expresión del canal en estas líneas celulares. Tal y como muestra la figura 3, el amplificado en ambas líneas celulares rendía una banda específica mayoritaria de 500 pb correspondiente con el canal TRPV4-A (*full-length*, NP_067638) y una banda de intensidad menor de 320 pb correspondiente con la variante TRPV4-B (NP_671737).

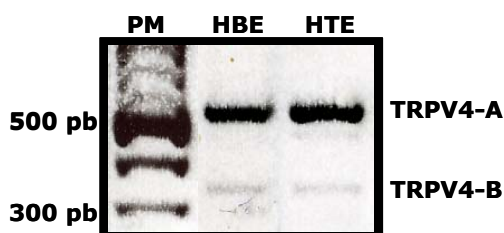


Figura 3. Expresión del canal TRPV4 en células de epitelio respiratorio humano. Tanto las células HBE (CFTR +/+) como las células HTE (CFTR -/-) expresan el canal TRPV4.

1.3.2.- Medidas de Ca^{2+} intracelulares

Para determinar que el TRPV4 expresado en estas células era funcional, se analizaron las variaciones de Ca^{2+} intracelular tras la utilización del agonista sintético 4α -PDD (104).

Como puede verse en la figura 4A, la incubación con 4α -PDD 1μ M en las células HBE (CFTR +/+) induce un aumento del $[Ca^{2+}]_i$. La eliminación del Ca^{2+} del medio bloquea este aumento (fig. 4C), indicando que la movilización de Ca^{2+} observada en presencia de 4α -PDD es debida a la entrada del Ca^{2+} extracelular. En este gráfico, el reestablecimiento de la solución isotónica (Ca^{2+} 1.2 mM) produce un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ sugiriendo que algunos canales TRPV4 permanecen activos durante el lavado. Además, el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ se bloquea completamente con la adición de Gd^{3+} como muestra la figura 4E.

En el caso de las células HTE (CFTR -/-), el patrón de respuesta observado durante la aplicación del agonista es el mismo: se produce un aumento del $[Ca^{2+}]_i$, aunque de menor magnitud (fig. 4B) que es dependiente del Ca^{2+} extracelular (fig. 4D) e inhibible por Gd^{3+} (fig. 4F).

Por lo tanto, en ambos casos queda demostrado que el canal TRPV4 se expresa funcionalmente, en las células HBE (CFTR +/+) y en las células HTE (CFTR -/-). La diferencia residiría en la regulación defectuosa de este canal por hipotonicidad, aunque específicamente no se haya demostrado en estas células.

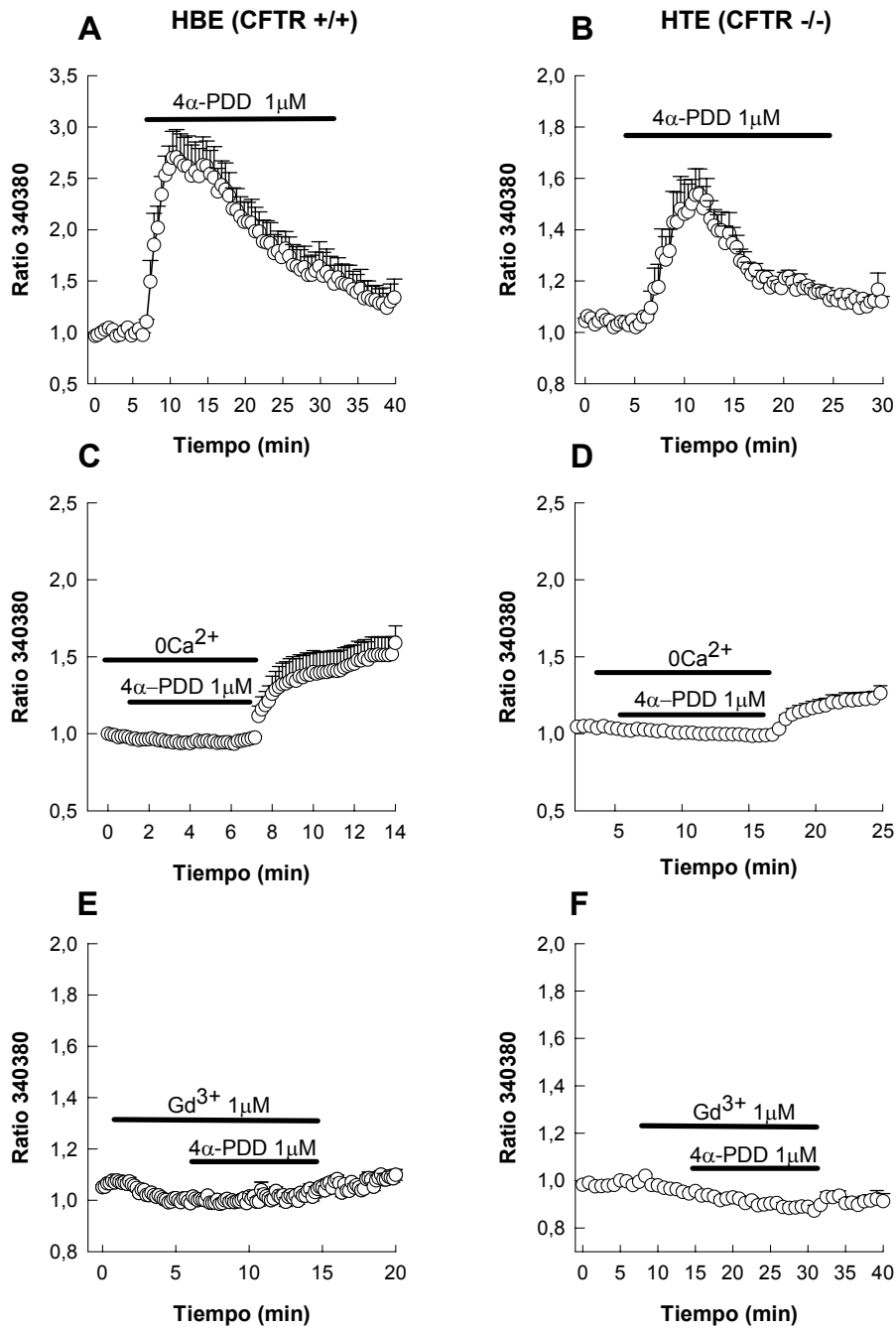


Figura 4. Expresión funcional del canal TRPV4 en células HBE y HTE. La incubación con 4 α -PDD 1 μ M (durante el tiempo indicado por la barra horizontal), produjo un aumento del [Ca²⁺]_i en las dos líneas estudiadas (panel A, células HBE (CFTR +/+) (n=8) y panel B, células HTE (CFTR -/-) (n=10). Panel C y D muestran una inhibición de la respuesta en las células HBE (n=8) y HTE (n=15) respectivamente cuando se elimina el Ca²⁺ del medio extracelular. En el panel E (n=7) y F (n=7) vemos que la adición de Gd³⁺ 100 μ M bloquea el aumento del [Ca²⁺]_i en ambas líneas celulares.

2.- ESTUDIO DEL MECANISMO DE REGULACIÓN DEL CANAL CFTR SOBRE EL TRPV4 DURANTE LA RVD

Tras demostrar que la RVD es un proceso celular dependiente de la proteína CFTR la cual ejerce un papel regulador sobre el canal TRPV4 durante la activación por hipotonicidad, se decidió investigar el mecanismo molecular responsable de dicha regulación.

2.1.- Evaluación de la interacción entre el canal CFTR y el TRPV4

La función reguladora de la proteína CFTR sobre un gran número de mecanismos de transporte iónicos está ampliamente documentada en la literatura (136;145;182). Después de descartar la regulación de los niveles de síntesis del canal TRPV4 (Arniges y col. 2004), quisimos evaluar la posibilidad de que la regulación de la actividad del TRPV4 tuviera lugar a través de la interacción entre el canal CFTR y el TRPV4.

2.1.1.- Generación de plásmidos

Primeramente, se generaron las proteínas de fusión necesarias para el estudio de una interacción directa entre ambos canales. El cDNA de las proteínas CFTR wt (*wild type*) y CFTR Δ 508F fue subclonado en los vectores pECFP-C1 y pEYFP-C1 (derivados del vector original de Clontech pEGFP-C1, generados en el laboratorio del Dr. Schaefer, Berlín) mediante una estrategia simple de digestión doble con las enzimas de restricción AgeI y KpnI. De este proceso de subclonaje se obtuvieron los siguientes plásmidos que rendían una proteína de fusión con el marcador fluorescente en el extremo N-terminal: pECFP-CFTR-wt, pECFP-CFTR- Δ 508F, pYCFP-CFTR-wt y pYCFP-CFTR- Δ 508F.

2.1.2.- Estudios de colocalización

Para confirmar la correcta obtención de estos constructos y en consecuencia el correcto procesamiento de la proteína fusionada, se transfectaron las células HEK 293 con los plásmidos anteriores y se observó la expresión de la proteína con la ayuda de un microscopio confocal. Mientras que la proteína CFTR-wt se localiza claramente en la membrana (fig. 5A), la proteína CFTR- Δ 508F presenta un marcaje

intracelular típico de retención en el RE (fig. 5B), tal y como se había descrito anteriormente para esta mutación (133).

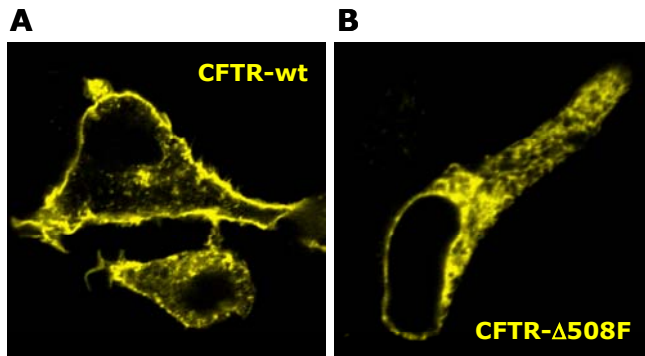


Figura 5. Localización intracelular de la proteína CFTR-wt y CFTR-Δ508F. Las células Hek 293 se transfectaron con 2μg de plásmido (Fugene) y tras 24h de expresión se observaron con la ayuda de un microscopio confocal. La proteína CFTR-wt se localiza claramente en la membrana plasmática (A); en cambio la proteína con la mutación Δ508F (B) presenta un patrón de distribución intracelular característico del RE.

El requerimiento básico para que dos proteínas puedan interactuar directamente es que se localicen muy próximas en el espacio. Por ello, antes de realizar las medidas de FRET entre la CFTR y el TRPV4, se hicieron estudios de colocalización entre ambas proteínas utilizando de nuevo las células HEK293 como sistema de expresión. Como vemos en la figura 6A, la cotransfección de la proteína CFTR-wt y el TRPV4 muestra una clara colocalización (ambas proteínas son expresadas y localizadas en la membrana plasmática). No obstante, la coexpresión con la proteína mutada CFTR-Δ508F presenta un patrón de distribución intracelular que no se solapa con la localización periférica de membrana del canal TRPV4 (fig.6B).

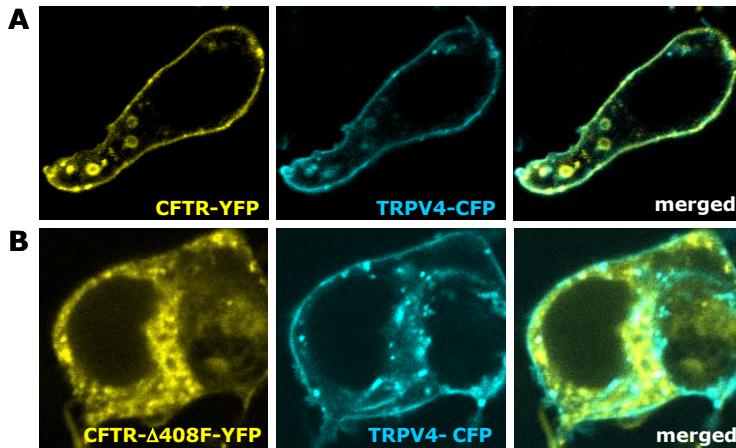


Figura 6. Colocalización entre el TRPV4 y la CFTR. En el panel A vemos que tanto la proteína CFTR como el canal TRPV4 se expresan en la membrana plasmática. En cambio, en el panel B la coexpresión de ambas proteínas en células Hek 293 muestra una falta de colocalización entre la CFTR-Δ508F y el TRPV4.

2.1.3.- Estudios de FRET.

Medir la eficiencia de FRET nos permite demostrar con exactitud si dos proteínas interaccionan, ya que la transferencia de energía entre los cromóforos se produce solamente si se encuentran a una distancia muy próxima entre 10-100 Å. Tras realizar varios experimentos de FRET (siguiendo el mismo protocolo descrito en Arniges y col. 2005) utilizando la proteína CFTR fusionada con el marcador CFP en el N-terminal y la proteína TRPV4 fusionada con el YFP en el C-terminal se obtuvo una eficiencia de 2.6 ± 0.5 (n=7 experimentos, con más de 4 células por experimento), indicando una falta de proximidad entre estas moléculas imposibilitando la interacción directa. Una mala orientación entre el cromóforo donador (CFP) y el cromóforo aceptor (YFP) (a su vez impredecible), puede inducir errores en la distancia estimada de hasta un 20%. Por ello, realizamos las mismas medidas de FRET pero variando la localización del aceptor en la proteína, es decir, cotransfectando con el plásmido del TRPV4 fusionado con la YFP en el extremo N-terminal. Aún siendo este el caso, las eficiencias de FRET obtenidas no mejoraron: 2.2 ± 1.4 (n=4 experimentos).

Anexo I

"TRPV4 channel is involved in the coupling of fluid viscosity changes to epithelial ciliary activity"

Andrade, Y.N.; Fernandes, J.; Vázquez, E.; Fernández-Fernández, J.M.;
Arniges, M.; Sánchez, T.M.; Villalon, M.; Valverde, M.A.

J Cell Biol. 2005 Mar 14; 168(6):869-74

Mi participación en este trabajo, aunque no figure dentro de los objetivos principales de esta tesis, ha permitido establecer el papel del canal TRPV4 en la compleja regulación del batido ciliar profundizando en algunos conceptos relacionados con la estimulación mecánica. Los resultados obtenidos indican que el canal TRPV4 participa en la regulación de la actividad ciliar epitelial en respuesta a cambios en la viscosidad del medio. Aunque mi contribución experimental en dicho trabajo no ha tenido el mismo protagonismo que en los trabajos anteriores he considerado oportuno la inclusión de este trabajo en la tesis. Concretamente, realicé el clonaje del canal TRPV4, parte de las transfecciones y la inmunolocalización del canal TRPV4 en células Hela

.

Published online 7 March 2005. doi: 10.1083/jcb.200409070

© The Rockefeller University Press,

TRPV4 channel is involved in the coupling of fluid viscosity changes to epithelial ciliary activity

Yaniré N. Andrade,^{1,2} Jacqueline Fernandes,¹ Esther Vázquez,¹ José M. Fernández-Fernández,¹ Maite Arniges,¹ Trinidad M. Sánchez,² Manuel Villalón,² and Miguel A. Valverde¹

¹Grup de Fisiologia Cel·lular i Molecular, Unitat de Senyalització Cel·lular, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona 08003, Spain

²Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

Autoregulation of the ciliary beat frequency (CBF) has been proposed as the mechanism used by epithelial ciliated cells to maintain the CBF and prevent the collapse of mucociliary transport under conditions of varying mucus viscosity. Despite the relevance of this regulatory response to the pathophysiology of airways and reproductive tract, the underlying cellular and molecular aspects remain unknown. Hamster oviductal ciliated cells express the transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) channel, which is activated by increased viscous load involving a phospholipase A₂-dependent pathway.

TRPV4-transfected HeLa cells also increased their cationic currents in response to high viscous load. This mechanical activation is prevented in native ciliated cells loaded with a TRPV4 antibody. Application of the TRPV4 synthetic ligand 4 α -phorbol 12,13-didecanoate increased cationic currents, intracellular Ca²⁺, and the CBF in the absence of a viscous load. Therefore, TRPV4 emerges as a candidate to participate in the coupling of fluid viscosity changes to the generation of the Ca²⁺ signal required for the autoregulation of CBF.

Introduction

Epithelial ciliated cells are responsible for the mechanical clearance of mucus and trapped substances from the airways and the transport of gametes and embryos through the oviduct (Halbert et al., 1976; Afzelius, 1995; Knowles and Boucher, 2002). A primary determinant of mucociliary transport is the ciliary beat frequency (CBF), which is regulated by a variety of chemical and mechanical stimuli (Satir and Sleight, 1990). Ciliated epithelia are exposed to physiological changes in mucus viscosity (Rutllant et al., 2002). Despite these variations in fluid viscosity, mucociliary transport efficiency is preserved. Johnson et al. (1991) have shown that ciliated cells are able to maintain relatively constant their CBF over a range of viscosities and proposed that this autoregulatory response of the CBF aimed to prevent the collapse of mucus transport under high viscous loads.

Several intracellular signals have been proposed to mediate the changes of CBF in response to different stimuli: cAMP, cGMP, nitric oxide, and Ca²⁺ (Jain et al., 1993; Geary et al., 1995; Wyatt et al., 1998; Evans and Sanderson, 1999). Among

them, the role of Ca²⁺ in the control of CBF is particularly interesting as it has been associated with the ciliary response to mechanical stimuli. Mechanically stimulated ciliated cells increase intracellular Ca²⁺ and CBF (Lansley and Sanderson, 1999), a response that is lost in the absence of extracellular Ca²⁺ (Sanderson and Dirksen, 1986). The hypothesis that mechanical stimulation might be physiologically initiated by changes in mucus viscosity has been present for quite a while (Spungin and Silberberg, 1984), but the cellular mechanism linking the viscous load exerted by the presence of mucus to the control of CBF awaits to be resolved. In the present work, we aimed to elucidate the mechanism that couples mechanical stimulation (viscous load) to ciliary activity, a process that has been suggested to involve Ca²⁺ entry and subsequent activation of cilia (Spungin and Silberberg, 1984).

Over the past few years great advances have been made on the molecular characterization of the Ca²⁺ entry pathways activated in response to different stimuli, and a new class of calcium-permeable cationic channels, the transient receptor potential (TRP) superfamily, has emerged (Clapham, 2003). The vertebrate TRPV4 channel has been proposed as an osmo- and mechanosensitive channel (Liedtke et al., 2000, 2003; Strotmann et al., 2000; Wissenbach et al., 2000; Nilius et al., 2001; Arniges et al., 2004). Here, we report the role of TRPV4 and phospholipase A₂ (PLA₂) in the generation of the Ca²⁺

Correspondence to M.A. Valverde: miguel.valverde@upf.edu

Abbreviations used in this paper: 4 α PDD, 4 α -phorbol 12,13-didecanoate; AACOCF₃, arachidonyl trifluoromethyl ketone; CBF, ciliary beat frequency; NMDG, N-methyl-D-glucamine; pBPB, 4-bromophenacyl bromide; PLA₂, phospholipase A₂; TRPV4, transient receptor potential vanilloid 4.

signal required to maintain CBF in hamster oviductal ciliated cells under conditions of mechanical stress induced by high viscous load, thereby preventing the collapse of the mucus transport.

Results and discussion

High viscosity-induced Ca^{2+} -dependent autoregulation of the CBF in oviductal ciliated cells

Exposure of primary cultures of hamster oviductal ciliated cells to increased viscous loading reduced the CBF, reaching a new stable value within the first 10 min (Fig. 1 a). The CBF dropped $\sim 35\%$ within the range of 2–37 cP (2–15% dextran solutions), but no further decrease was observed at higher viscosities in the range of 37–200 cP (15–30% dextran solutions; Fig. 1 b). These results indicate that mucus transporting ciliated cells are capable of maintaining their CBF in high viscosity conditions and suggest the presence of an autoregulatory mechanism that allows ciliated epithelia to adjust their CBF to varying viscous loads without collapsing mucus transport. The signal coupling changes in mechanical load (fluid viscosity) to the autoregulation of CBF is still unknown, although early works pointed to the influx of Ca^{2+} into the cells as a probable candidate (Johnson et al., 1991). We tested the Ca^{2+} hypothesis by measuring CBF in ciliated cells exposed to either 5% (4.8 cP) or 20% dextran solutions (73 cP, viscosity value within the range where autoregulation of the CBF occurred) in the absence of extracellular Ca^{2+} or in the presence of $100 \mu\text{M}$ Gd^{3+} , a blocker of mechanosensitive cation channels (Yang and Sachs, 1989). Fig. 1 c shows that neither the absence of extracellular Ca^{2+} or the presence of Gd^{3+} modified the CBF at low viscosity conditions but determined a marked reduction of the CBF at high viscous loads (73 cP; Fig. 1 d). These results suggested that the autoregulation of CBF at high viscous loads required the entry of Ca^{2+} into the ciliated cell, a process that apparently does not play a crucial role in the establishment of the steady-state CBF at lower viscosities.

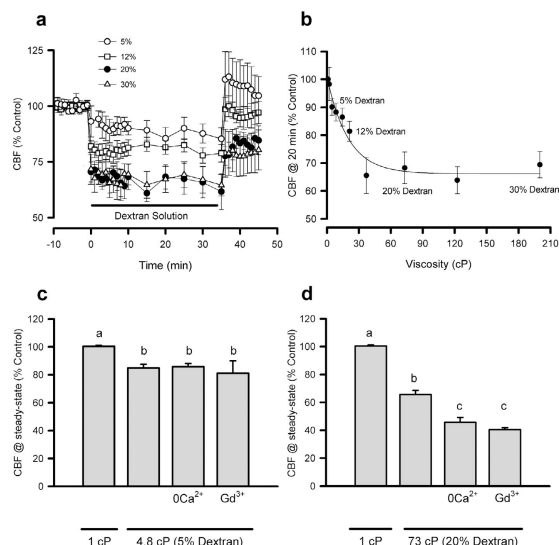
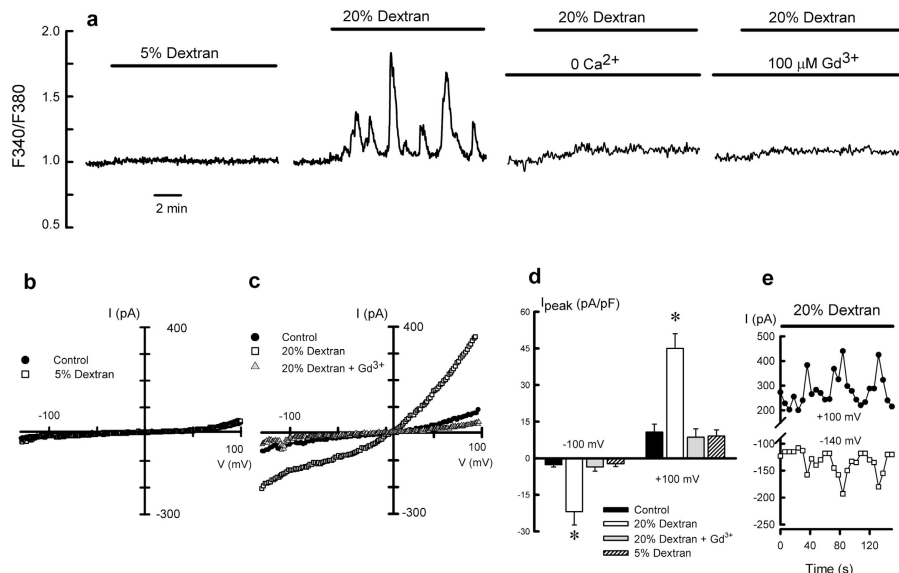


Figure 1. **Effect of viscous loading on CBF.** (a) Time course of CBF changes in hamster oviduct ciliated cells exposed to 5% (4.8 cP), 12% (21.5 cP), 20% (73 cP), and 30% (200 cP) dextran solutions. (b) Effect of viscous load on the CBF recorded after 20-min exposure to increased viscosity. CBF recorded at steady-state conditions (15–25 min) after exposure to 4.8 (c) or 73 cP (d) in the absence of extracellular Ca^{2+} or in the presence of $100 \mu\text{M}$ Gd^{3+} . Results are the mean \pm SEM of 5–10 separate cultures. Significant differences ($P < 0.05$) between groups are marked with different letters.

To further investigate the relationship between mechanical stimulation and intracellular Ca^{2+} , we monitored changes in cytosolic Ca^{2+} in response to low (5% dextran) and high (20% dextran) viscous loads, the latter triggering the CBF autoregulatory response. Fig. 2 a shows the ratiometric fura-2 fluorescence obtained in primary cultures of single oviductal ciliated cells. Exposure to 5% dextran solution did not modify the intracellular Ca^{2+} levels (Fig. 2 a), whereas 20% dextran solution (73 cP) triggered an oscillatory Ca^{2+} response in ciliated cells, which was prevented in the absence of extracellular Ca^{2+} or in the presence of $100 \mu\text{M}$ Gd^{3+} . Interestingly, the Ca^{2+} oscillations

Figure 2. Dextran-activated calcium entry pathway.

(a) Cytosolic Ca^{2+} signal obtained in hamster oviductal ciliated cells exposed to 5 or 20% dextran and the effect of extracellular Ca^{2+} removal and $100 \mu\text{M}$ Gd^{3+} on the 20% dextran-induced Ca^{2+} signal. Traces are representative of five to six experiments under each condition. (b and c) Whole-cell cationic currents recorded in oviductal ciliated cells dialyzed with CsCl-containing pipette solution under control (1 cP) and 5% dextran (4.8 cP) (b) and 20% dextran solution alone (73 cP) or containing $100 \mu\text{M}$ Gd^{3+} (c). (d) Average current density measured at -100 mV and $+100$ mV under the following conditions: control ($n = 27$), 20% dextran ($n = 15$); 20% dextran + Gd^{3+} ($n = 10$); and 5% dextran ($n = 11$). *, $P < 0.05$, compared with control. (e) Oscillatory pattern of the cationic current obtained in a single cell exposed to 20% dextran.



tory pattern emerged at the viscosity values that trigger the autoregulatory process (>30 cP; unpublished data).

Activation of a cationic current by high viscous load

The TRPV4 channel has been implicated in the cellular response to different mechanical stimuli (Liedtke et al., 2003; Suzuki et al., 2003); therefore, constituting a possible candidate to mediate Ca^{2+} entry in oviductal ciliated cells subjected to a high viscous load. Characterization of the putative TRPV4 cationic currents in response to increases in viscous load was evaluated in freshly dissociated single ciliated cells using the whole-cell patch-clamp technique. Exposure of a ciliated cell to a 5% dextran solution (4.8 cP) failed to activate a cationic current (Fig. 2 b), whereas exposure to a 20% dextran solution (73 cP) activated a large, outwardly rectifying current (Fig. 2 c), which was blocked by Gd^{3+} (100 μM). Mean normalized peak current responses to 5 and 20% dextran solutions are shown in Fig. 2 d. The TRPV4-like current generated in response to 20% dextran often presented an oscillatory pattern (Fig. 2 e) resembling the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations shown in Fig. 2 a.

Functional TRPV4 channels in oviductal ciliated cells were also evaluated using a synthetic activator of TRPV4, 4 α -phorbol 12,13-didecanoate (4 α PDD; Watanabe et al., 2002), in the absence of viscous load (1 cP). Intracellular Ca^{2+} in ciliated cells increased in response to 4 α PDD (Fig. 3 a), and, occasionally, showed an oscillatory pattern (not depicted). This response was prevented in the absence of extracellular Ca^{2+} (Fig. 3 a, middle) or in the presence of Gd^{3+} (Fig. 3 a, right), a blocker of nonselective cation channels. A whole-cell current with characteristics similar to that obtained with 20% dextran solutions was recorded when ciliated cells were exposed to 1 μM 4 α PDD (Fig. 3, b and c). Analysis of the reversal potential of the currents activated by 20% dextran solutions (-4.7 ± 2.4 mV; $n = 15$) and 4 α PDD (-5.5 ± 2.4 mV; $n = 6$) are not statistically different but showed a right shift compared with con-

trol currents (-12 ± 1.3 mV; $n = 21$) as previously described (Watanabe et al., 2002). Addition of 4 α PDD also resulted in the increase of the CBF (Fig. 3 d) in the absence of mechanical stimuli (1 cP), thus adding support to the hypothesis linking the activity of TRPV4 channels to the control of CBF at high viscous loads. Changes in flow superfusion (1–15 ml/min) in the absence of dextran did not activate cationic currents, whereas exposure to 20% dextran solutions activated them either in the absence of fluid flow or under continuous perfusion at 1–3 ml/min. Therefore, it appears that high viscous load by itself is the main trigger of the response, although we cannot completely discard a shear stress component in the response elicited by high dextran solutions.

Molecular identification of the dextran-induced cationic currents

All the functional data shown point to a TRPV4-like channel as the mediator in the increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ required for the CBF autoregulatory response. Molecular identification of TRPV4 in hamster oviductal ciliated cells was investigated by single-cell RT-PCR and Western blot. Hamster TRPV4 has not yet been cloned, so we used primers directed against a region of the TRPV4 sequence highly conserved across species. Fig. 4 a shows single amplicons of ~ 500 bp obtained from two hamster oviductal ciliated cells. Subsequent sequencing of the bands confirmed the expression of TRPV4 in the ciliated cells. Fig. 4 b shows a Western blot obtained with an antibody generated against a COOH-terminal epitope of the human TRPV4 protein. The antibody identified a double band of the expected size in human TRPV4-transfected HEK cells and a single band in hamster oviductal cells.

Next, we functionally tested the blocking capability of the TRPV4 antibody on oviductal cells to confirm that a TRPV4-like channel is at the core of the ciliated cells' response to high viscous loads. Intracellular dialysis of hamster oviductal ciliated cells with the TRPV4 antibody prevented the activation of cationic currents under high viscous

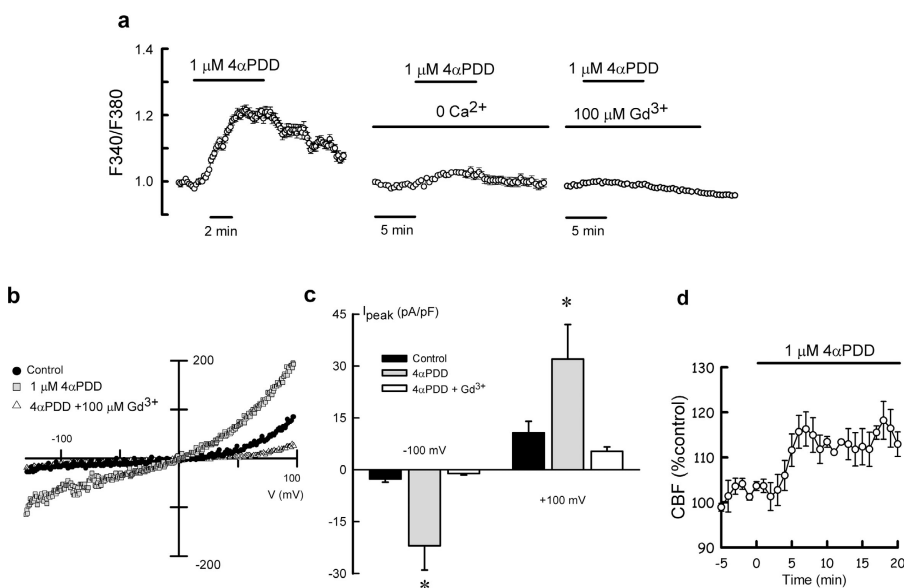


Figure 3. Effect of the TRPV4 activator 4 α PDD on cytosolic calcium, cationic currents, and CBF. (a, left) Cytosolic Ca^{2+} response of ciliated oviductal cells to 4 α PDD (1 μM). Effect of removal of extracellular Ca^{2+} (middle) and 100 μM Gd^{3+} (right) on the 4 α PDD response. Traces are means \pm SEM obtained from 6–16 cells per culture (repeated on at least three cultures). (b) Whole-cell cationic currents recorded in an oviductal ciliated cell dialyzed with CsCl-containing pipette solution under control conditions, after application of 1 μM 4 α PDD, and after application of 1 μM 4 α PDD + 100 μM Gd^{3+} . (c) Average current density measured at -100 mV and $+100$ mV under the following conditions: control ($n = 15$), 1 μM 4 α PDD ($n = 6$), and 4 α PDD + 100 μM Gd^{3+} ($n = 3$). *, $P < 0.05$, compared with control. (d) Time course of CBF response to 1 μM 4 α PDD ($n = 6$).

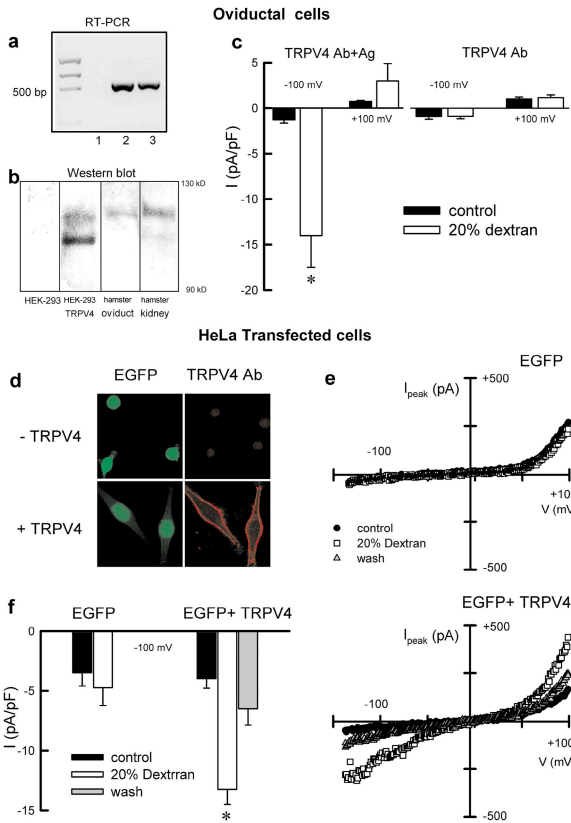


Figure 4. Molecular identification of dextran-activated cationic currents. (a) Detection of TRPV4 in two oviductal ciliated cells (lanes 2 and 3) by RT-PCR. (lane 1) Negative control where the cDNA was omitted. (b) Western blot showing bands at the predicted molecular mass for TRPV4 (~100 kD) in hamster oviduct and kidney. Untreated HEK-293 and HEK-293 cells transfected with the human TRPV4 (isoform a) were used as negative and positive controls, respectively. (c) Mean current density recorded in oviduct ciliated cells dialyzed with NMDG-Cl solutions containing either 3.2 $\mu\text{g/ml}$ (dilution 1:500) of TRPV4 antibody preabsorbed with a 10-fold excess of antigen (left; $n = 5$) or TRPV4 antibody alone (right; $n = 6$). Cells were superfused with 20% dextran solutions 10 min after the establishment of the whole-cell configuration. (d) Confocal images of HeLa cells transfected with EGFP (top) or EGFP+TRPV4 (bottom). EGFP fluorescence signal (green) and TRPV4 signal (red) are shown. (e) Whole-cell cationic currents recorded in HeLa cells with CsCl-containing pipette solution under control (1 cP), 20% dextran solution (73 cP), and washout. (f) Average current density measured at -100 mV in HeLa cells transfected with EGFP ($n = 9$) or EGFP+TRPV4 ($n = 11$). *, $P < 0.05$, compared with control.

load conditions (Fig. 4 c, right). The specificity of the inhibitory effect of the TRPV4 antibody was demonstrated by repeating the experiments with antigen-preabsorbed TRPV4 antibody. Under these conditions, normal activation of TRPV4-like currents were observed in response to 20% dextran solutions (Fig. 4 c, left).

The activation of TRPV4 by dextran was also tested in a heterologous expression system. Immunolocalization of TRPV4 to the plasma membrane was confirmed in transiently cotransfected (EGFP+hTRPV4; Fig. 4 d, bottom) but not in EGFP-transfected HeLa cells (Fig. 4 d, top). Exposure to 20% dextran solutions activated cationic currents only in EGFP+TRPV4-transfected cells (Fig. 4 e). Mean normalized currents obtained from EGFP- and EGFP+TRPV4-transfected HeLa cells are shown in Fig. 4 f.

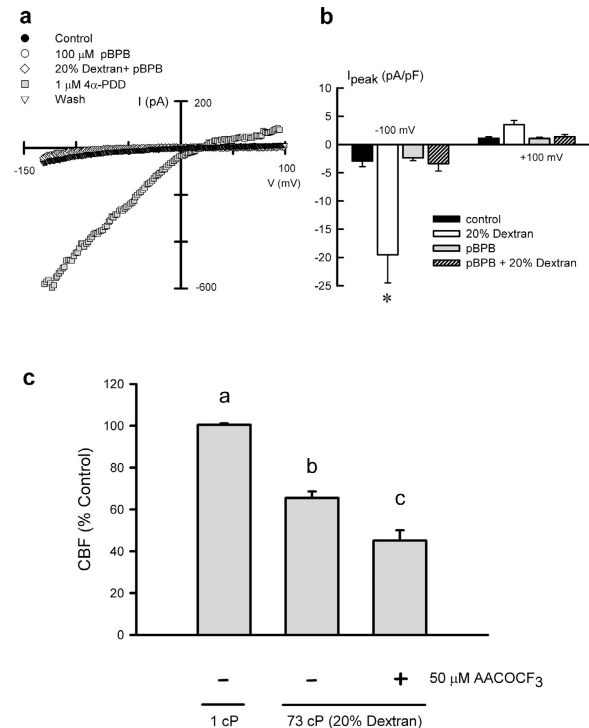


Figure 5. PLA₂-dependent activation of TRPV4 under high viscous conditions. (a) Whole-cell currents recorded in a cell dialyzed with NMDG-Cl solutions and bathed consecutively in control solutions, 100 μM pBPB, 20% dextran + pBPB, and 1 μM 4 α -PDD. Basal current levels recovered after washout. (b) Average current density measured at -100 mV and $+100$ mV with NMDG-Cl-containing pipette solutions and Ca^{2+} -free bathing solution under the following conditions: control ($n = 16$), 20% dextran ($n = 16$), pBPB ($n = 12$), and pBPB + 20% dextran ($n = 12$). *, $P < 0.05$, compared with control. (c) CBF recorded at steady-state conditions (15–25 min) under control (1 cP) and 20% dextran solutions (73 cP) in the absence or presence of 50 μM AACOCF₃. Results are the mean \pm SEM of 5–10 separate cultures. Significant differences ($P < 0.05$) between groups are marked with different letters.

Involvement of PLA₂ in the autoregulation of the CBF

Cell swelling-dependent activation of TRPV4 requires the PLA₂-mediated release of arachidonic acid (Vriens et al., 2004), suggesting that the TRPV4 channel is not an osmosensor per se, but a key element in the transduction of osmotic changes into Ca^{2+} signals. Both cell swelling and mechanical stress activate PLA₂ and the formation of arachidonic acid (Lehtonen and Kinnunen, 1995; Pedersen et al., 2000). Therefore, we evaluated whether or not activation of the TRPV4-like current by 20% dextran solutions might also depend on the activity of PLA₂ (Fig. 5). Currents were recorded with *N*-methyl-D-glucamine (NMDG) intracellular solutions, favoring the presence of inward currents. Incubation of single ciliated cells with the PLA₂ inhibitor 4-bromophenacyl bromide (pBPB; 100 μM) prevented the activation of TRPV4-like currents under high viscosity conditions (Fig. 5, a and b) but did not affect current activation by 4 α -PDD (Fig. 5 a). These results are in accordance with previous observations reporting that swelling- and 4 α -PDD-induced activation of TRPV4 use distinct pathways (Arniges et al., 2004; Vriens et al., 2004). Moreover, inhibition of PLA₂ activity with arachidonyl trifluoromethyl ketone

(AACOCF₃; 50 μ M) also prevented the cilia autoregulatory response. In the presence of AACOCF₃, the CBF in response to 20% dextran solutions (73 cP) dropped to 44% of the basal value (Fig. 5 c), similar to the CBF reduction observed in the absence of Ca²⁺ or in the presence of Gd³⁺ (Fig. 1 d).

In conclusion, our findings offer a first insight into the molecular basis of the mechanotransduction process required for the maintenance of CBF in high viscosity conditions. Mechanical stimulation of ciliated cells, physiologically achieved by changes in mucus viscosity, activates a TRPV4-like channel that elevates intracellular Ca²⁺. Channel opening requires the activity of PLA₂ and occurs at high viscous loads; therefore, adapting cilia activity to a wide range of viscosities. Our results propose TRPV4 as a new target to consider in order to develop treatments for pathologies with altered mucociliary transport, including infertility and chronic respiratory diseases (Clarke, 1989; Afzelius, 1995).

Materials and methods

Chemicals and solutions

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich except dextran T-500 (500,000 D; Amersham Biosciences), fura-2AM (Molecular Probes), and AACOCF₃ (Calbiochem). Bathing solutions used for CBF and intracellular Ca²⁺ measurements contained 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 10 mM Hepes, pH 7.4, and 300 mosmol/Kg. Ca²⁺-free solutions were obtained replacing Ca²⁺ by Mg²⁺ and adding 5 mM EGTA. The viscosity of the bathing solution, a measure of the internal friction of a fluid (defined as the ratio = shear stress/shear rate), was increased by adding dextran without altering the solution's osmolality. 30% dextran solutions required a reduction of NaCl concentration (which did not affect CBF; Johnson et al., 1991) to maintain osmolality constant at 300 mosmol/Kg. Viscosity was measured using a cone-and-plate viscometer, and all the solutions used in this study behaved as Newtonian fluids (Johnson et al., 1991). After the exchange of the bathing solution by dextran solutions, the perfusion was stopped and the recordings were initiated. Alternatively, dextran solutions were superfused at a continuous flow rate of 1–3 ml/min.

Primary cultures of Golden Hamster oviductal ciliated cells

Primary cultures were obtained and maintained as described previously (Hermoso et al., 2001) and single cells were isolated by enzymatic treatment of oviductal samples using a method previously described (Lock and Valverde, 2000). Primary cultures were used when a monolayer of ciliated cells showed spontaneous ciliary activity (5–7 d) and single cell preparations were used within 48 h. Animals were maintained and experiments performed according to the guidelines issued by the Institutional Ethics Committees of the Institut Municipal d'Investigació Mèdica (Universitat Pompeu Fabra) and the Pontificia Universidad Católica de Chile.

Measurement of CBF and intracellular Ca²⁺

CBF was recorded using a microphotodensitometric technique (Hermoso et al., 2001). Hamster oviductal ciliated cells in culture beat spontaneously at 12.4 \pm 0.9 Hz (mean \pm SEM; n = 24). CBF data are expressed as a percentage of basal CBF at 1 cP (mean \pm SEM). Cytosolic Ca²⁺ was determined at 30–37°C in cells loaded with 5 μ M fura-2AM using a spectrofluorometric (Hermoso et al., 2001) or ratio-imaging technique (Fernández-Fernández et al., 2002). Cytosolic Ca²⁺ increases are presented as the ratio of emitted fluorescence (510 nm) after excitation at 340 and 380 nm relative to baseline.

Electrophysiology

Ionic currents were recorded in the whole-cell patch-clamp mode (Fernández-Fernández et al., 2002). Patch pipettes were filled with a solution containing 140 mM NMDG-Cl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10 mM Hepes, 4 mM ATP, and 0.1 mM GTP, or 20 mM CsCl, 100 mM CsAcetate, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 10 mM Hepes, 4 mM ATP, and 0.1 mM GTP (300 mosmol/l, pH 7.3). Cells were held at 0 mV and ramps from –140 mV to +100 mV (400 ms) were applied at a frequency of 0.2 Hz. Ramp

data were acquired at 2 kHz and low-pass filtered at 1 kHz. Experiments were performed at RT (22–26°C).

Single-cell RT-PCR and transient expression of TRPV4

Single-cell RT-PCR experiments were conducted as described previously, with slight modifications (Roudbaraki et al., 1999). In brief, after whole-cell recordings in single oviductal ciliated cells, the cell contents were aspirated under visual control. The pipette content (~8 μ l) was ejected into an Eppendorf microtube with RNase inhibitor (20 U), and kept at –80°C until processed. Subsequently, one-step RT-PCR (QIAGEN) was performed using primers specific for a region of TRPV4 (GenBank/EMBL/DBJ accession no. 263523) highly conserved among vertebrates (from exon 7 to 12, nucleotides 1382–1918). Cloning of TRPV4 from human tracheal epithelial cells and transient expression in HEK-293 and HeLa cells were performed as described by Arniges et al. (2004).

Immunodetection

Proteins from human TRPV4-transfected HEK-293 cells and hamster oviduct membranes were detected by Western blot technique using an affinity-purified polyclonal anti-human TRPV4 antibody (COOH-terminal residues CDGHQQGYPRKWRDAPL; dilution 1:500). Bands were visualized with HRP donkey anti-rabbit IgG (1:2,000) and chemiluminescence reagent (Supersignal West Femto; Pierce Chemical Co.). Confocal immunofluorescence using a TCS SP microscope (oil 40 \times , 1.25 NA; Leica) and software (Leica) were performed in HeLa-transfected cells. Cells were fixed and permeabilized as described previously (Bahamonde et al., 2003). Cells were incubated with the TRPV4 antibody (1:3,000) and secondary Alexa 594 goat anti-rabbit (1:1,000).

Statistics

Data are expressed as the mean \pm SEM. *t* test or ANOVA were performed with the SigmaPlot 5 or STATISTICA 6.0 programs. CBF data were analyzed after arcsin transformation. Tukey's test was used for post hoc comparison of means. The criterion for a significant difference was a final value of P < 0.05.

We thank A. Currid for proofreading the manuscript.

This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2003-1240), Fondo de Investigación Sanitaria (Red HERACLES), and Generalitat de Catalunya (2002SGR-109) to M.A. Valverde and from the Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT-1040804) to M. Villalón. J.M. Fernández-Fernández is a Ramón y Cajal Fellow.

Submitted: 13 September 2004

Accepted: 8 February 2005

References

- Afzelius, B.A. 1995. Role of cilia in human health. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 32: 95–97.
- Arniges, M., E. Vazquez, J.M. Fernández-Fernández, and M.A. Valverde. 2004. Swelling-activated Ca²⁺-entry via TRPV4 channel is defective in cystic fibrosis airway epithelia. *J. Biol. Chem.* 279:54062–54068.
- Bahamonde, M.I., J.M. Fernández-Fernández, F.X. Guix, E. Vazquez, and M.A. Valverde. 2003. Plasma membrane voltage-dependent anion channel mediates antiestrogen-activated Maxi Cl[–] currents in C1300 neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 278:33284–33289.
- Clapham, D.E. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 426:517–524.
- Clarke, S.W. 1989. Rationale of airway clearance. *Eur. Respir. J. Suppl.* 7:599s–603s.
- Evans, J.H., and M.J. Sanderson. 1999. Intracellular calcium oscillations regulate ciliary beat frequency of airway epithelial cells. *Cell Calcium*. 26: 103–110.
- Fernández-Fernández, J.M., M. Nobles, A. Currid, E. Vazquez, and M.A. Valverde. 2002. Maxi K⁺ channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283:C1705–C1714.
- Geary, C.A., C.W. Davis, A.M. Paradiso, and R.C. Boucher. 1995. Role of CNP in human airways: cGMP-mediated stimulation of ciliary beat frequency. *Am. J. Physiol.* 268:L1021–L1028.
- Halbert, S.A., P.Y. Tam, and R.J. Blandau. 1976. Egg transport in the rabbit oviduct: the roles of cilia and muscle. *Science*. 191:1052–1053.
- Hermoso, M., N. Barrera, B. Morales, S. Perez, and M. Villalón. 2001. Platelet activating factor increases ciliary activity in the hamster oviduct through

- epithelial production of prostaglandin E2. *Pflugers Arch.* 442:336–345.
- Jain, B., I. Rubinstein, R.A. Robbins, K.L. Leise, and J.H. Sisson. 1993. Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191:83–88.
- Johnson, N.T., M. Villalon, F.H. Royce, R. Hard, and P. Verdugo. 1991. Autoregulation of beat frequency in respiratory ciliated cells. Demonstration by viscous loading. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144:1091–1094.
- Knowles, M.R., and R.C. Boucher. 2002. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* 109:571–577.
- Lansley, A.B., and M.J. Sanderson. 1999. Regulation of airway ciliary activity by Ca^{2+} : simultaneous measurement of beat frequency and intracellular Ca^{2+} . *Biophys. J.* 77:629–638.
- Lehtonen, J.Y., and P.K. Kinnunen. 1995. Phospholipase A2 as a mechanosensor. *Biophys. J.* 68:1888–1894.
- Liedtke, W., Y. Choe, M.A. Marti-Renom, A.M. Bell, C.S. Denis, A. Sali, A.J. Hudspeth, J.M. Friedman, and S. Heller. 2000. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell.* 103:525–535.
- Liedtke, W., D.M. Tobin, C.I. Bargmann, and J.M. Friedman. 2003. Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:14531–14536.
- Lock, H., and M.A. Valverde. 2000. Contribution of the Isk (MinK) potassium channel subunit to regulatory volume decrease in murine tracheal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 275:34849–34852.
- Nilius, B., J. Prenen, U. Wissenbach, M. Boddling, and G. Droogmans. 2001. Differential activation of the volume-sensitive cation channel TRP12 (OTRPC4) and volume-regulated anion currents in HEK-293 cells. *Pflugers Arch.* 443:227–233.
- Pedersen, S., I.H. Lambert, S.M. Thoroed, and E.K. Hoffmann. 2000. Hypotonic cell swelling induces translocation of the alpha isoform of cytosolic phospholipase A2 but not the gamma isoform in Ehrlich ascites tumor cells. *Eur. J. Biochem.* 267:5531–5539.
- Roudbaraki, M., A. Lorsignol, L. Langouche, G. Callewaert, H. Vankelecom, and C. Denef. 1999. Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone detected through intracellular Ca^{2+} responses in immature rat pituitary constitute a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lactosomatotroph lineage. *Endocrinology.* 140:4874–4885.
- Rutllant, J., M. Lopez-Bejar, P. Santolaria, J. Yaniz, and F. Lopez-Gatius. 2002. Rheological and ultrastructural properties of bovine vaginal fluid obtained at oestrus. *J. Anat.* 201:53–60.
- Sanderson, M.J., and E.R. Dirksen. 1986. Mechanosensitivity of cultured ciliated cells from the mammalian respiratory tract: implications for the regulation of mucociliary transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:7302–7306.
- Satir, P., and M.A. Sleight. 1990. The physiology of cilia and mucociliary interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 52:137–155.
- Spungin, B., and A. Silberberg. 1984. Stimulation of mucus secretion, ciliary activity, and transport in frog palate epithelium. *Am. J. Physiol.* 247:C299–C308.
- Strotmann, R., C. Harteneck, K. Nunnenmacher, G. Schultz, and T.D. Plant. 2000. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat. Cell Biol.* 2:695–702.
- Suzuki, M., A. Mizuno, K. Kodaira, and M. Imai. 2003. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J. Biol. Chem.* 278:22664–22668.
- Vriens, J., H. Watanabe, A. Janssens, G. Droogmans, T. Voets, and B. Nilius. 2004. Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:396–401.
- Watanabe, H., J.B. Davis, D. Smart, J.C. Jerman, G.D. Smith, P. Hayes, J. Vriens, W. Cairns, U. Wissenbach, J. Prenen, et al. 2002. Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J. Biol. Chem.* 277:13569–13577.
- Wissenbach, U., M. Boddling, M. Freichel, and V. Flockerzi. 2000. Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett.* 485:127–134.
- Wyatt, T.A., J.R. Spurzem, K. May, and J.H. Sisson. 1998. Regulation of ciliary beat frequency by both PKA and PKG in bovine airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 275:L827–L835.
- Yang, X.C., and F. Sachs. 1989. Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science.* 243:1068–1071.

IV

Discusión

En este trabajo de tesis doctoral se ha abordado el estudio funcional y molecular del canal TRPV4 en células epiteliales demostrando su participación en procesos celulares inducidos/modulados por estímulos físicos tales como la RVD y la regulación de la frecuencia del batido ciliar junto con otros aspectos más estructurales como la importancia de los dominios de ANK en la oligomerización de estos canales gracias a la identificación y caracterización de nuevas variantes de *splicing alternativo*. A pesar de que estos resultados hayan sido discutidos en sus publicaciones correspondientes, en este apartado se rediscutirán ampliamente algunos de los aspectos más relevantes integrando los diferentes resultados obtenidos con el fin de mostrar nuevas propuestas para el avance de estos estudios.

1.- La RVD y el TRPV4

La habilidad de las células para regular el volumen cuando se ven sometidas a condiciones de anisotonicidad es fundamental para mantener sus funciones e integridad celular (1;2). En un ambiente hipotónico, las células experimentan un aumento de volumen pasivo debido a la entrada de agua osmótica, del que se recuperan mediante el proceso conocido como RVD que implica la activación coordinada de canales de K^+ y de Cl^- , permitiendo la salida de estos osmolitos inorgánicos y a su vez retornando agua al medio extracelular (5;6). Estudios previos de nuestro grupo de investigación mostraron por primera vez que las células epiteliales intestinales o respiratorias con fibrosis quística perdían esta capacidad de regular el volumen estando sometidas a condiciones de hipotonicidad, manteniéndose hinchadas debido a una falta de activación de los canales de K^+ (29;147). Esta defectuosa regulación de la conductancia de K^+ necesaria para la RVD ha vuelto a ser demostrada recientemente por otro grupo de investigación en células derivadas del conducto biliar con fibrosis quística (144).

Aunque los mecanismos de señalización e identidades moleculares que participan en este proceso de RVD son muy variables según el tipo celular (1;2;4;10), la participación del Ca^{2+} en respuesta a un hinchamiento hipotónico es un aspecto característico de la mayoría de las células epiteliales (6;7). Nuestros estudios realizados en varios modelos de células epiteliales, entre ellos células respiratorias, no sólo han demostrado la participación de esta molécula señalizadora en el proceso de RVD (29;30) sino que han sugerido la implicación de una vía de entrada de Ca^{2+} activada por hinchamiento y sensible a Gd^{3+} (30)

responsable de activar a los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , efectores últimos de la RVD en estas células epiteliales respiratorias (29;30). Tras la identificación del canal TRPV4 decidimos evaluar su contribución en el proceso de RVD en nuestros modelos celulares, ya que su activación frente a cambios osmóticos en sistemas de expresión heterólogos y su patrón de distribución tisular sugerían un papel destacado como osmosensor (36;40;41).

Este trabajo asocia por primera vez el canal TRPV4 con una función osmoreguladora a nivel celular, demostrando que la entrada de Ca^{2+} que desencadena la RVD en células epiteliales respiratorias se produce a través de este canal. Tras detectar funcionalmente el TRPV4 en células de epitelio respiratorio traqueal, la utilización de oligonucleótidos antisentido contra el mismo canal muestra una completa inhibición del proceso de recuperación del volumen así como de la activación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} del tipo hIK, efectores últimos del proceso de RVD en estas células (29), descartando la participación de otros canales sensibles a cambios osmóticos descritos recientemente cuya contribución no fue considerada en ese momento, como el TRPV2 (95) y el TRPM3 (183). Posterior a la publicación de nuestro trabajo, Becker y col. (184) también han demostrado una implicación funcional del canal TRPV4 en la RVD utilizando como modelo líneas celulares derivadas de queratinocitos donde el canal TRPV4 se expresa abundantemente (99).

Por otro lado, el estudio molecular y funcional del canal TRPV4 en células epiteliales respiratorias deficientes para el gen de la CFTR ha puesto de manifiesto que existe una regulación defectuosa del TRPV4 frente al estímulo hipotónico en estas células: se pierde el aumento intracelular de Ca^{2+} característico del estímulo hipotónico, y en consecuencia no se activan los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y la RVD es incompleta, tanto en las células traqueales LCSFN-CFT1 (CFTR $\Delta 508F/\Delta 508F$) y HTE (CFTR $-/-$) como en las células bronquiales CFBE (CFTR $\Delta 508F/\Delta 508F$). No obstante, en estas mismas células, la activación del canal TRPV4 con el agonista 4α -PDD (104) recupera la capacidad de regular el volumen.

A pesar de los numerosos ejemplos existentes de la función reguladora que la proteína CFTR ejerce sobre varios sistemas de transporte iónico (134;136;145;185), esta es la primera descripción en que la proteína CFTR modula la actividad de una conductancia de Ca^{2+} . ¿A través de qué mecanismo se produce esta regulación? Tal y como refleja el trabajo, la regulación a nivel de síntesis de la

proteína quedaría descartada por varios motivos: tanto los niveles de transcritos del TRPV4 detectados por RT-PCR cuantitativa, como los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ y los valores de la densidad de corriente catiónica obtenidos con el agonista sintético 4 α -PDD (104) son equivalentes en células epiteliales normales y en células con fibrosis quística. Por lo tanto, lo más probable sería una regulación de la actividad de la proteína. En este caso, una posibilidad a considerar sería la regulación por interacción directa de la proteína CFTR con el canal TRPV4. No obstante, estudios preeliminares de FRET y coimmunoprecipitación no apoyan esta hipótesis. No se obtuvo una eficiencia de FRET significativa que pusiera de manifiesto la íntima proximidad de estas moléculas, aunque mediante microscopía confocal la colocalización de ambas proteínas fuera perfecta ya que ambas eran dirigidas a la membrana plasmática.

La mayoría de los mecanismos moleculares propuestos para explicar la regulación de otras proteínas de membrana por CFTR son mecanismos de interacción indirecta basados en la formación de complejos macroproteicos (135;137;145;149). La proteína CFTR es capaz de interactuar con proteínas adaptadoras a través de su extremo C-terminal, donde presenta una secuencia de reconocimiento de dominios PDZ (-DTRL) (91;149;186;187). La interacción de canales con proteínas adaptadoras puede influir en su función de diferentes maneras: 1) modulando directamente su actividad (188-190) 2) modificando su localización intracelular (148;191) o bien, 3) facilitando la formación de complejos proteicos de señalización intracelular (192-194). Se ha demostrado la interacción directa de la proteína CFTR con las proteínas adaptadoras NHERF (NHERF-1 y NHERF-2, ambas con dos dominios PDZ) (195) a través del extremo C-terminal de la CFTR (186;190) y que esta interacción es la responsable de mediar procesos tan diversos como: la distribución apical del canal CFTR (148;187;191), la aproximación de la proteína PKA para activar el canal CFTR por fosforilación (192), la interacción con el receptor β -adrenérgico (193), la regulación parcial de la actividad del ENaC (137), la regulación del canal ROMK en células epiteliales del riñón (194) y la regulación del intercambiador de bicarbonato SLC26 (196), entre otros. Además, estas proteínas adaptadoras, NHERF-1 y NHERF-2, pueden oligomerizar con ellas mismas y entre ellas, facilitando la formación de complejos macroproteicos donde tendrían cabida un mayor número de proteínas (197;198).

Al mismo tiempo, tras analizar la secuencia del canal TRPV4, he observado que en el extremo C-terminal presenta una serie de aminoácidos muy similares a la secuencia consenso de unión a dominios PDZ establecida para la proteína NHERF

(D/E-T/S-X-L) (<http://icb.med.cornell.edu/services/pdz/start>), concretamente la secuencia D-A-P-L (PDZ-like). Considerando que una de las interacciones caracterizadas de la proteína NHERF-1 es con la proteína PLC β 1 cuya secuencia de reconocimiento en C-terminal es la serie de aminoácidos D-T-P-L (199), la interacción de NHERF con TRPV4 es muy probable aunque difiera en el aminoácido de la posición -2 (A). Aún habiéndose caracterizado con gran detalle las propiedades de interacción de las proteínas adaptadora NHERF (200), un número creciente de evidencias sugiere que estas proteínas pueden unirse a secuencias divergentes de la establecida como consenso e incluso a dominios de ANK (201). Por todo ello, no podemos excluir la interacción del canal TRPV4 con ninguna de estas proteínas ya sea a través de sus dominios de ANK en el extremo N-terminal o a través de la secuencia PDZ-like de su extremo C-terminal. Recientemente se ha demostrado que otros miembros de la familia de canales TRP interaccionan con proteínas NHERF (202), regulando así su localización celular y su actividad. Por ejemplo, la base molecular de la regulación de los canales TRPC4 y TRPC5 por la PLC β vendría determinada por la formación de un complejo proteico en el que las proteínas NHERF acoplarían la PLC β al canal (199).

Se ha descrito la participación de dos vías de señalización en la activación del canal TRPV4 por hipotonicidad, indicando que más que un osmosensor *per se*, el canal TRPV4 formaría parte de un sistema transductor del estímulo anisotónico en el que actuaría de efector. Uno de estos mecanismos de activación implica la fosforilación del canal en la posición Y253 mediante una src TK con la que estaría interaccionando físicamente a través del dominio SH2 (114). El otro, supone la participación de la vía de la PLA₂. Concretamente, el AA producido por esta enzima sería metabolizado por la citP450 generando EETs, que activarían directamente el canal (103). La participación de estas dos proteínas señalizadoras en el proceso de RVD ha sido demostrada con anterioridad en varios modelos celulares (12).

¿Cómo podrían relacionarse todas estas proteínas? Otra proteína adaptadora a tener en consideración es la proteína RACK1 (*receptor for activated C-kinase 1*), proteína de anclaje con dominios de interacción del tipo WD (repeticiones de estos aminoácidos) (203). En células epiteliales respiratorias se ha descrito y caracterizado la interacción de RACK1 con NHERF (204), demostrándose que la regulación de la CFTR por la PLC ϵ viene determinada por la formación del complejo PLC ϵ -RACK1-NHERF-CFTR (205). Además, esta proteína adaptadora RACK1 también interacciona con tirosina quinasas del tipo src (203;206;207) así como con diferentes tipos de integrinas (203;208;209). Las integrinas, a su vez,

han sido propuestas como moléculas osmo/mecanosensoras (210), función relacionada con la vía de la src tirosin kinasa. Por ejemplo, la formación de adhesiones focales, proceso en el que participan las integrinas, supone la activación de la src TK correctamente localizada gracias a su interacción con RACK1 (211). Por su parte, el canal TRPV4 también se ha coimmunoprecipitado con la src TK (114), interacción que requiere el dominio SH2 de la src intacto y a través del cual se ha descrito que interacciona con RACK1 (206). Más importante aún, se ha demostrado la activación del TRPV4 en la respuesta al dolor inducida por hipotonicidad y la mediación de las integrinas a través de la vía de la src en dicho proceso (124). Al mismo tiempo, se ha demostrado que la RACK1 puede ser sustrato de la src TK, siendo el primer miembro de su familia susceptible a este tipo de fosforilación (206;207). Esta fosforilación podría jugar un papel clave en la activación de señales divergentes hacia otras vías, por ejemplo, aumentando la afinidad de RACK1 para otras proteínas del complejo (206). Finalmente, mencionar que se ha demostrado la interacción de otro miembro de las src TK (c-Yes) con la proteína NHERF-1 en células epiteliales respiratorias bronquiales, interacción que facilitaría la aproximación de esta molécula reguladora a diferentes proteínas (CFTR y otros transportadores) y/o vías de transducción de señales localizadas en la parte apical de estas células favoreciendo cambios en el transporte iónico así como en la organización del citoesqueleto (212).

Por otro lado, quiero destacar que, aún no habiéndose evaluado su interacción, la PLA₂ es una proteína candidata a interactuar con RACK1 ya que presenta el dominio C2 a través del cual RACK1 interacciona con muchas otras proteínas (203). La PLA₂ se asocia a la membrana donde cataliza el metabolismo de lípidos generando AA que es metabolizado por otras enzimas en reacciones siguientes (213). Recientemente se le ha otorgado una función dentro de la mecanotransducción. La activación de la PLA₂ es necesaria para la activación del TRPV4 en respuesta a un choque hipotónico (109) y a estrés mecánico (Anexo 1; Andrade y col. 2005). Además, en el modelo celular de RVD propuesto para las células de tumor ascítico se ha sugerido que en la activación de la PLA₂ estaría implicada una TK (9).

El conjunto de estos resultados pueden integrarse en un modelo de interacción indirecta entre el canal TRPV4 y la CFTR determinado por la formación de un macrocomplejo proteico de señalización en el que habría implicados diferentes tipos de proteínas (proteínas de anclaje o adaptadoras (NHERF, RACK1), proteínas señalizadoras (src TK, PLA₂), proteínas integrales de membrana asociadas

al citoesqueleto (integrina) y los canales en cuestión), tal y como se muestra en la figura 1.

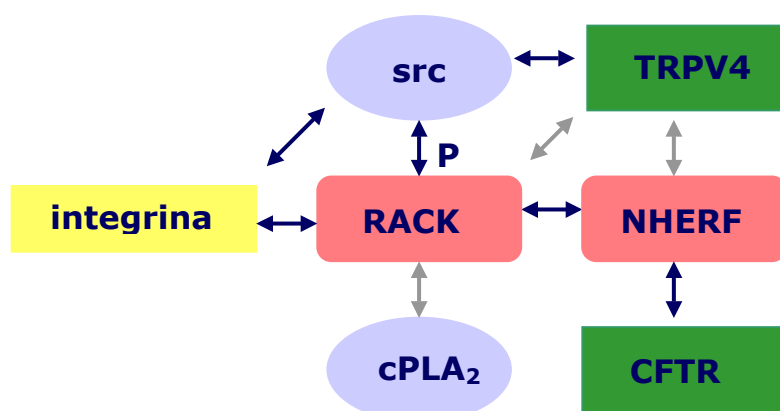


Figura 1. Modelo teórico de interacción propuesto para la regulación del canal TRPV4 por hipotonicidad. En verde se muestra los canales iónicos, en rosa las proteínas adaptadoras o de anclaje, en azul las proteínas señalizadoras y en amarillo la integrina, proteína asociada al citoesqueleto. Las flechas azules indican interacciones ya demostradas por otros autores, mientras que las flechas en gris muestran posibles interacciones a determinar.

Este complejo podría funcionar del siguiente modo: en un medio hipotónico el aumento del volumen celular sería detectado por la integrina asociada al citoesqueleto (cambio estructural) que se transmitiría a la src TK correctamente posicionada gracias a su interacción con la proteína adaptadora RACK1. Esta activación de la src TK produciría al mismo tiempo la fosforilación de RACK1 (pudiendo modificar sus preferencias de unión con otras proteínas), el TRPV4 y la cPLA₂, correctamente posicionadas gracias a su interacción con las proteínas adaptadoras. La fosforilación del residuo Y253 del canal TRPV4 podría aumentar la susceptibilidad del canal o bien ser un requisito previo para la activación del TRPV4 por los EETs, moléculas que se estarían produciendo paralelamente a través del aumento de actividad de la cPLA₂ localizada en la membrana plasmática que podría irse estabilizando por pequeños aumentos locales y progresivos de Ca²⁺ a través del TRPV4. El AA producido por la cPLA₂ sería metabolizado por la citP450 de las mitocondrias residentes cerca de la membrana y los EETs activarían el TRPV4 correctamente posicionado en la membrana.

¿Qué papel jugaría la CFTR en todo este complejo? Nuestros resultados demuestran que sin la CFTR se pierde la regulación del canal TRPV4 por hipotonicidad y consecuentemente la activación del canal de K⁺ y la RVD. Los dos

modelos celulares con fibrosis quística que hemos utilizado en el trabajo (CFT1 y CFBE) presentan la mutación $\Delta F508$ que, como he explicado en la introducción, se caracteriza por un mal plegamiento de la proteína quedando ésta retenida en el RE (133). Por su parte, las células HTE no expresan la proteína CFTR (181). De este modo, en ambos casos se produce una ausencia de la proteína CFTR en la membrana plasmática, sugiriendo que la proteína CFTR ejercería su regulación a través de la interacción con las proteínas adaptadoras NHERF, facilitando la correcta localización intracelular de todas las proteínas agrupándolas en la vecindad de la membrana plasmática apical y, por tanto, jugaría un papel central en la estructuración del complejo y la polarización de la señal. Las células con fibrosis quística habrían perdido la capacidad para formar este complejo, debido a la retención de la proteína CFTR en el RE. De acuerdo con este papel de regulador estructural, un trabajo anterior realizado en nuestro grupo muestra que la capacidad de regular el volumen de las criptas intestinales de ratones con fibrosis quística depende únicamente de la mera presencia de la proteína CFTR en la membrana aunque ésta no sea funcional (146). De este modo, la mutación G551D que implica la pérdida de función como canal de Cl^- pero mantienen el correcto procesamiento de la proteína llegando ésta a la membrana plasmática, permite que las criptas intestinales derivadas de estos ratones G551D/G551D mantengan la capacidad de regular el volumen (146), a diferencia de lo que sucede en las criptas intestinales derivadas de ratones CFTR $-/-$ (147) y de ratones $\Delta F508/\Delta F508$ (146).

Alternativamente a la formación de este complejo de interacción indirecta, la dependencia de la CFTR de la activación del canal TRPV4 por hipotonicidad podría implicar la participación de receptores de nucleótidos. En este sentido, se ha demostrado que la proteína CFTR potencia la liberación de ATP inducida por hipotonicidad en células de epitelio respiratorio humano (143). Tal y como se ha descrito por diferentes autores (163;165;214;215), el ATP liberado puede actuar en las células epiteliales como agonista autocrino o paracrino de receptores purinérgicos o de adenosina (tras su conversión local por ATPasas a adenosina), los cuales parecen desempeñar un papel clave en la respuesta RVD mediante su acoplamiento a diferentes vías de señalización intracelular (143;214;216;217), incluyendo aquellas capaces de modular la actividad del canal TRPV4 como la cPLA2 (103), la PKC (102) y la src TK (114).

La RVD y la patología de la Fibrosis quística

Aún siendo reconocida como una enfermedad monogénica, la fibrosis quística es una patología fenotípicamente muy compleja explicado, en parte, por el gran número de alteraciones celulares observadas en estos pacientes (153;182;218). La descripción molecular de estas alteraciones permite avanzar en el entendimiento de las bases fisiopatológicas y proponer nuevas terapias de actuación dirigidas a atenuar los síntomas causados por esta enfermedad progresiva. ¿Podría tener alguna relevancia la incapacidad de regular el volumen en el desarrollo de la enfermedad? Estudios anteriores realizados por nuestro grupo en ratones transgénicos sugieren que existe una correlación entre la capacidad de regular el volumen y la severidad de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Primeramente, cabe mencionar que los ratones con fibrosis quística no presentan problemas pulmonares siendo las alteraciones intestinales de mayor gravedad y responsables de su muerte (219-221). Por un lado, el estudio de la RVD en células epiteliales pulmonares derivadas de ratones con FQ ha demostrado que, a diferencia de lo que hemos observado en nuestros modelos celulares humanos con fibrosis quística, estas células regulan el volumen normalmente en condiciones hipotónicas, regulación que es a su vez independiente del Ca^{2+} extracelular (resultados no publicados). Por otro lado, hemos observado que las criptas intestinales de los ratones $\Delta 508\text{F}/\Delta 508\text{F}$, los cuales presentan una elevada tendencia al bloqueo intestinal y una reducida esperanza de vida (220), son incapaces de regular el volumen, mientras que las criptas intestinales de los ratones $\text{G}551\text{D}/\text{G}551\text{D}$, los cuales presentan una menor tendencia al bloqueo intestinal y una mayor esperanza de vida (219), regulan el volumen en condiciones de hipotonicidad (146;147) (similar diferencia en la incidencia de esta afectación intestinal se observa entre los pacientes humanos que presentan estas dos mutaciones (222)).

Ambos ejemplos apuntan a una correlación entre la capacidad de regular el volumen y el grado de afectación del órgano en el que se encuentran estas células aunque por el momento no se puede establecer una incuestionable relación de causalidad.

La deshidratación del ASL de la superficie del epitelio respiratorio (debida a la hiperabsorción del Na^+ y la falta de secreción de Cl^-) provoca un aumento de la viscosidad de esta capa y en consecuencia una reducción del batido ciliar y un

aclaramiento mucociliar defectuoso. Esta alteración es considerada actualmente la base fisiopatológica principal de la enfermedad, causante de las infecciones crónicas pulmonares responsables del 95% de las muertes de estos pacientes. También sugiere el diseño racional de nuevas terapias encaminadas a la hidratación de la capa de ASL para restablecer el aclaramiento mucociliar (153;159;167;218). ¿De qué modo podría contribuir o empeorar la falta de RVD al desarrollo de este escenario? *A priori*, es una pregunta difícil de responder. No obstante, se puede especular que el hecho de que las células de estos pacientes padezcan una hiperabsorción de Na^+ y una falta de secreción de Cl^- suponga una acumulación excesiva de iones intracelulares y en consecuencia facilite un hinchamiento isosmótico frente al que la célula sabemos es incapaz de responder, acumulando un exceso de agua en el interior celular. Al mismo tiempo, teniendo en cuenta que determinadas condiciones ambientales modifican la tonicidad del ASL (p.ej. en situaciones de elevada humedad se produce un ASL hipotónico), la deshidratación del ASL también se podría favorecer por un hinchamiento hipotónico. Aunque estas consideraciones no hayan sido demostradas en modelos experimentales, teóricamente, es probable que la ausencia de RVD favorecería la deshidratación del epitelio por una falta de la devolución del agua al medio extracelular agravando el escenario fisiopatológico de la enfermedad. Además, un estado de hinchamiento continuado de estas células las haría más susceptibles a la lisis y el epitelio se degeneraría más rápidamente, acusando las infecciones recurrentes y el estado inflamatorio al que se encuentran sometidas las vías respiratorias (153).

En los trabajos presentados en esta tesis, la demostración de que la activación específica del canal TRPV4 por el 4α -PDD induce, por un lado, la secreción hidroelectrolítica en células con fibrosis quística permitiendo la recuperación del volumen inicial y por otro, el aumento de la frecuencia del batido ciliar en epitelio ciliado, me permite proponer a este canal como posible diana terapéutica en la patología de la fibrosis quística. La administración de un fármaco específico activador del TRPV4 facilitaría 1) la hidratación del ASL tras estimular la secreción de las células epiteliales y 2) el aclaramiento mucociliar gracias a la activación de los cilios. La activación del canal TRPV4 a su vez, podría facilitar la hidratación del ASL a través de una posible inhibición del canal ENaC, tal y como sucede tras aumentar el Ca^{2+} intracelular (223;224). Existe un claro ejemplo *in vivo* de la relación existente entre el estado de hidratación del ASL y el aclaramiento mucociliar: los valores de transporte del ASL más elevados se han observado en muestras de pacientes con pseudohipoaldosteronismo en los que, contrariamente a

lo que sucede en la fibrosis quística, la falta de absorción de Na^+ a través del ENaC en el epitelio respiratorio produce un ASL hiperhidratado que no compromete ni la frecuencia del batido ciliar ni la defensa innata (158). Además, acaba de publicarse un ensayo clínico demostrando que la inhalación de una solución salina hipertónica produce una aceleración del aclaramiento mucociliar y mejora la función pulmonar en pacientes con fibrosis quística gracias a la hidratación del ASL de las vías respiratorias (225).

Variantes del TRPV4 en epitelio respiratorio

La caracterización del canal TRPV4 en el epitelio respiratorio ha resultado también en la identificación de cinco variantes que, a excepción de la variante completa o TRPV4-A (NM_021625), presentan delección total o parcialmente algún exon en el extremo N-terminal: TRPV4-B ($\Delta 384-444$, exón 7; NM_147204), TRPV4-C ($\Delta 237-284$, exón 5), TRPV4-D ($\Delta 27-61$, delección parcial exón 1), y TRPV4-E ($\Delta 237-284$ y $\Delta 384-444$, exón 5 y 7), eliminando parte de sus dominios de ANK a excepción de la variante TRPV4-D. Las tres variantes identificadas *de novo* fueron incorporadas en la base de datos del PubMed con los siguientes números de acceso: DQ59644 para el TRPV4-C, DQ59645 para el TRPV4-D y DQ59646 para el TRPV4-E. A pesar de que inicialmente el estudio funcional de estas proteínas demostró una falta de actividad de las variantes TRPV4-B, TRPV4-C y TRPV4-E, y que el TRPV4-D se comportaba del mismo modo que el canal completo TRPV4-A, el estudio molecular detallado de estas variantes ha permitido describir por primera vez aspectos importantes relacionados con la biogénesis de este canal: 1) la glicosilación del TRPV4 inmaduro se inicia en el RE donde se le añade un azúcar rico en manosas que no es modificado de forma compleja hasta que alcanza el aparato de Golgi, tal y como se muestra con los patrones de deglicosilación y de inmunolocalización de las diferentes variantes; 2) la oligomerización del TRPV4 sucede en el RE ya que no se ve afectada por la aplicación de brefeldina A, un inhibidor del transporte desde el RE al aparato de Golgi y 3) los dominios de ANK son determinantes estructurales implicados en el proceso de oligomerización, ya que las variantes TRPV4-B, TRPV4-C y TRPV4-E, con pérdida parcial de dominios de ANK, quedan retenidas en el RE sin oligomerizar eficientemente.

Al mismo tiempo, el conjunto de estos resultados ha permitido clasificar las variantes identificadas en dos grupos claramente diferenciados: el grupo I (incluyendo el TRPV4-A y el TRPV4-D) cuyas proteínas homo- y heteroligomerizan

eficientemente en el RE, son glicosiladas de forma compleja en el aparato de Golgi y dirigidas a la membrana plasmática donde forman canales funcionales que responden a los estímulos típicos descritos para el TRPV4 (hipotonicidad, 4α -PDD y ácido araquidónico), y el grupo II (incluyendo el TRPV4-B, TRPV4-C y TRPV4-E) cuyas proteínas son retenidas intracelularmente en el RE manteniendo el patrón de glicosilación simple correspondiente con el azúcar rico en manosas, sin oligomerizar eficientemente ni formar canales funcionales, demostrando que el canal TRPV4 está sujeto a mecanismos de control de calidad del RE donde sólo aquellos canales correctamente ensamblados continúan su camino por la vía secretora y por lo tanto, el ensamblaje de las subunidades es esencial para dirigir el complejo del canal TRPV4 y su actividad en la membrana plasmática.

El estudio de las variantes del grupo I (TRPV4-A y TRPV4-D) revela que la zona delecionada en la variante D ($\Delta 27-61$), localizada intracelularmente al inicio de la proteína en el extremo N-terminal anterior a los dominios de ANK, no constituye ningún dominio estructural importante para el procesamiento y el funcionamiento del canal ya que ambas variantes forman canales homo- y heteroméricos funcionales que responden con el mismo patrón de activación tanto en el análisis de las variaciones de Ca^{2+} intracelular como en el análisis electrofisiológico. En concordancia con estos resultados, cuando miramos el alineamiento de secuencia del extremo N-terminal entre los miembros de la familia de los TRPV (fig. 2), esta región delecionada está muy pobremente conservada, sugiriendo que esta zona no debiera ser relevante funcionalmente.

El análisis de las variantes del grupo II, muestra claramente la participación de los dominios de ANK en el ensamblaje del canal TRPV4 ya que la deleción parcial de estos dominios supone la retención intracelular de las subunidades mal oligomerizadas. Esta situación explica a nivel molecular por qué se pierde la respuesta característica del TRPV4 al 4α -PDD y al calor cuando se delecionan los dominios de ANK (100), y resta importancia a la posibilidad que se había considerado inicialmente que implicaba la presencia de residuos localizados en estos dominios importantes para la activación del canal por dichos estímulos (aunque no la excluye pero sería una causa secundaria). Del mismo modo, se ha descrito una isoforma del canal TRPV1 que debido a la deleción del extremo N-terminal pierde los dominios de ANK y no rinde canales funcionales (226), de manera que, análogamente a nuestros resultados, podría indicar una falta de oligomerización de esta variante.

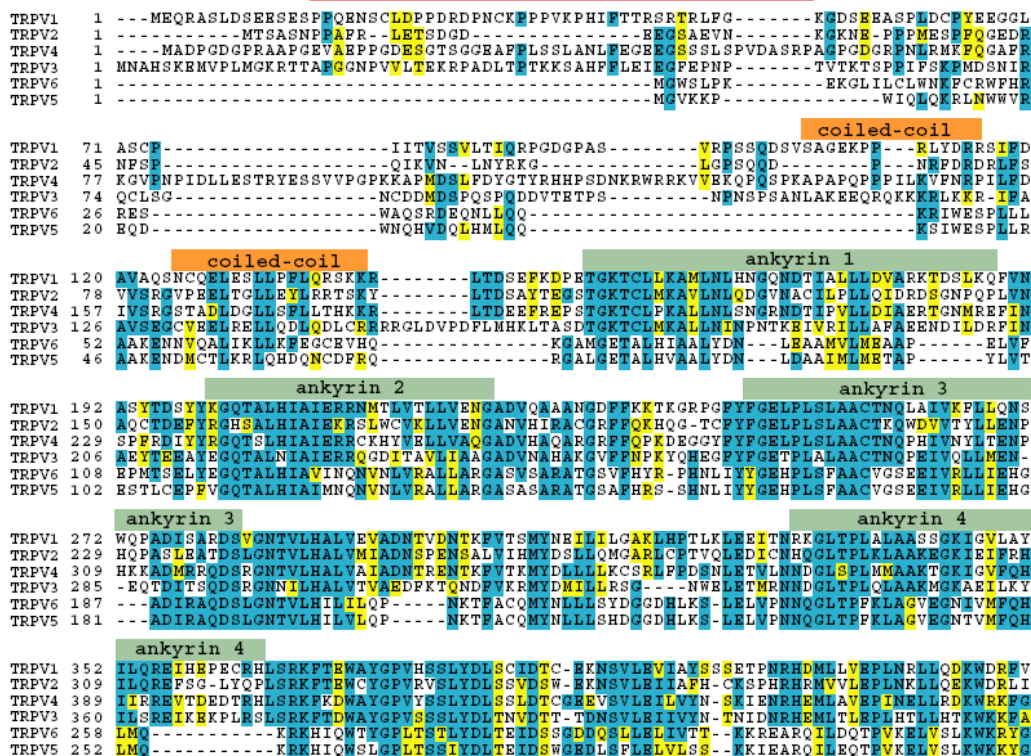


Figura 2. Alineamiento del extremo N-terminal entre los miembros de la familia de los TRPV. Las secuencias idénticas están marcadas en azul, mientras que los residuos conservados en amarillo. Nótese que la zona delineada en rojo correspondiente con la delección en el TRPV4-D está muy pobremente conservada entre los diferentes miembros, mientras que las regiones que constituyen los dominios de ANK se mantienen ricamente conservadas entre los diferentes miembros.

Además, la participación de los dominios de ANK en la multimerización de los canales también podría explicar porqué en algunos miembros de los TRP, como en el caso del TRPC2 (56), del TRPC3 (227) y del TRP/TRPL de *Drosophila* (228) entre otros, las variantes descritas formadas únicamente por dominios que incluyen el extremo N-terminal (excluyendo total o parcialmente los DTM) ejercerían una función inhibitoria sobre el canal completo, ya que podrían permitir la oligomerización secuestrando las variantes completas pero no formarían poros funcionales debido a la ausencia de los DTM. Finalmente, nuestros resultados han permitido modificar la hipótesis inicialmente propuesta por el grupo que clonó el canal, que sugerían que la respuesta a la hipotonicidad se mantenía al deleccionar el extremo N-terminal del canal (40).

La participación de los dominios de ANK en el proceso de oligomerización de proteínas multiméricas es una función demostrada recientemente en una proteína de membrana dimérica del cloroplasto (229). Particularmente, nuestros resultados constituyen la segunda evidencia de que, en la familia de los TRPs, los dominios de ANK además de poder tener otras funciones de interacción con proteínas del citoesqueleto, tal y como se ha postulado desde sus inicios aunque no se haya demostrado para ningún miembro de la familia, participan en esta función de oligomerización y estructuración del canal (un año antes de la publicación de nuestro trabajo se demostró por primera vez la implicación de los dominios de ANK en la oligomerización del canal TRPV6, siendo el tercer dominio de ANK crítico para este proceso de ensamblaje (75)). No obstante, la participación de estos dominios en la oligomerización del canal TRPV4 no excluye que otras partes de la proteína puedan estar más directa o indirectamente relacionadas en el desarrollo de este proceso, tal y como se ha sugerido para el canal TRPV5 (73), en el que la oligomerización dependería de señales de ensamblaje presentes en el extremo N- y C-terminal intracelulares (desde el aa 64-77 (incorporando algún residuo del primer dominio de ANK) y desde el aa 596-601 respectivamente) aunque la región N-terminal jugaría un papel más destacado en el proceso de oligomerización. También para el canal TRPV1, además de demostrarse la importancia del extremo N-terminal en la formación de canales funcionales (226), se ha identificado un dominio de tetramerización en el extremo C-terminal (78) y subrayado la importancia de los DTM en este proceso (46).

Muchas variantes de *splicing* identificadas en varios miembros de los canales TRP parecen ejercer un efecto dominante negativo sobre el canal completo reduciendo la localización del canal en la membrana y sus niveles de activación (57). No obstante nuestros resultados no parecen indicar un efecto de este tipo ya que por un lado los experimentos de colocalización entre las variantes del grupo I y II (aunque no cuantificados) demuestran que se mantiene el patrón de expresión respectivo de cada variante, y por otro lado se produce una falta de coimmunoprecipitación entre estas variantes. Además, el análisis de las variaciones de Ca^{2+} intracelular en células cotransfectadas con el TRPV4-A y el TRPV4-B son de la misma magnitud que expresando el canal TRPV4-A individualmente (resultados sin publicar). De este modo, podemos decir que los valores de FRET próximos al 5% obtenidos para la combinación del TRPV4-A y las proteínas del grupo II (el FRET es una medida simple pero muy sensible de la distancia existente entre dos

proteínas), serían indicativos de una interacción lábil entre las subunidades debido a una oligomerización defectuosa, a una distancia insuficiente para asegurar la estabilidad del complejo y retención de las variantes del grupo I cuyas subunidades preferencialmente se ensamblarían entre ellas formando complejos estables que seguirían su camino hacia la membrana plasmática. Esta interacción poco estable entre las subunidades del grupo II no permitiría el ensamblamiento eficiente de los monómeros.

El TRPV4 humano presenta cinco sitios potenciales de N-glicosilación: N201, N207, N651, N784 y N835 obtenidos del análisis de su secuencia a través del servidor www.expasy.org/prosite. El patrón de bandas observado en nuestros geles para las diferentes variantes del canal sugiere, por un lado, que sólo uno de estos puntos es N-glicosilado ya que en todas las variantes aparece una doble banda en la parte inferior del gel muy bien definida con una separación media estimada de 4kDa (el aumento de peso teórico calculado tras la adición de un N-glicano es aproximadamente de 3 kDa (26)), correspondiendo por tanto la forma no glicosilada con la banda inferior y la N-glicosilada con la banda superior por adición de un azúcar rico en manosas susceptible al tratamiento con EndoH. Por otro lado, las variantes oligomerizadas que salen del retículo (TRPV4-A y el TRPV4-D), són glicosiladas de forma compleja en el Golgi. En este caso, el patrón de deglicosilación observado descarta la presencia de O-glicosilaciones ya que ambas proteínas quedan completamente desnudas tras el tratamiento con PNGasa F. Acaba de publicarse el primer trabajo que hace referencia exclusivamente al estudio de la glicosilación del canal TRPV4 corroborando estas dos observaciones: demuestra que el canal TRPV4 se glicosila en la Asn651 localizada en la región del *loop* del poro y excluye las O-glicosilaciones para este canal (230).

La N-glicosilación puede ejercer diferentes efectos en la biogénesis de las proteínas de membrana. El trabajo aquí presentado, pone de manifiesto que la oligomerización del canal TRPV4 es independiente de la maduración de las N-glicosilaciones (no requiere la adición de azúcares complejos en el Golgi) al igual que se ha demostrado para su análogo estructural, el canal Shaker, cuya tetramerización, además de tener lugar en el RE (231), es independiente de la N-glicosilación de los residuos de Asn259 y Asn263 (232;233). La independencia total de la oligomerización del canal Shaker del proceso de N-glicosilación parece acontecer también en el caso del TRPV4, ya que se acaba de demostrar que la

mutación del residuo Asn651 del TRPV4 rinde un mayor número de canales funcionales en la superficie celular debido a la afectación del tránsito del canal (230), efecto que también acontece en el canal Shaker tras mutar los dos residuos que son N-glicosilados, la Asn259 y la Asn 263 (233).

El compartimento intermedio o ERGIC, al igual que el RE pero a diferencia del Golgi, contiene chaperonas y otras proteínas que facilitan el plegamiento (p.ej. la calreticulina, la glutatión transferasa y la glicosidasa II) constituyendo una segunda barrera de mecanismos de control de calidad para las glicoproteínas que siguen la vía secretora (28). Mediante experimentos de colocalización con marcadores específicos de la proteína ERGIC-53 (proteína que define la localización de este compartimento) quisimos determinar si las variantes del grupo II quedaban estrictamente retenidas en el ER o, alternativamente, todas o algunas de ellas podían ser transportadas más allá del RE y alcanzar el ERGIC, tal y como se ha demostrado para distintos mutantes del receptor de vasopresina V₂ que són retenidos en diferentes compartimentos de la vía secretora temprana en función del estado de plegamiento que comporte la mutación (234) y para la proteína G tsO45 del virus de la estomatitis vesicular (235). No obstante, en nuestro caso, la falta de colocalización entre el característico patrón punteado y próximo al *cis*-Golgi (correspondiente con el complejo de membranas vesículo-tubulares extendidas en la periferia de la célula y próximas al *cis*-Golgi del ERGIC) y la expresión de las variantes B, C y E, demuestra que ninguna de las variantes no oligomerizadas alcanza este compartimento, excluyendo su participación en la retención de estas proteínas.

¿A través de qué mecanismo se retienen las variantes del grupo II en el RE? En el RE y en los siguientes compartimentos de la vía secretora operan varios sistemas de control para asegurar la fidelidad y la funcionalidad de las proteínas durante la vida celular (66). A pesar de que clásicamente se ha postulado que las proteínas de membrana abandonan el RE por defecto una vez alcanzan su conformación nativa, en los últimos años se han identificando un número creciente de señales de retención, recaptación y exportación reguladas, a su vez, por varios factores (fosforilación, proteínas adaptadoras..), poniendo de manifiesto la selectividad y complejidad de este proceso secretor (236-239). Estas señales de retención y recaptación hacia el RE son importantes no sólo para las proteínas destinadas a funcionar en ese orgánulo, sino porque representan un nuevo sistema

de control de calidad en la vía secretora evitando la liberación de proteínas inmaduras que no alcanzan su correcto estado de plegamiento u oligomerización (62;240). Este trabajo evalúa la participación de los dominios RXR (donde la X=cualquier aminoácido) que, tal y como se demostró por primera vez en los canales de K⁺ sensibles a ATP (K_{ATP}) (241), actúan de señales de retención características en proteínas de membranas multiméricas (62;242). Un mal ensamblaje de las subunidades provoca que estas señales citoplasmáticas queden expuestas siendo reconocidas por proteínas adaptadoras y retenidas en el RE hasta que una correcta oligomerización permita enmascarar estos dominios (62;242). En algunos casos las subunidades libres o complejos parciales inmaduros escapan al ERGIC desde donde son recaptadas hacia el RE mediante el transporte retrógrado de vesículas cubiertas de COPI implicadas en el reconocimiento de estas señales (243) (aunque sabemos que este no es nuestro caso ya que hemos demostrado que ninguna de las variantes alcanza el compartimento intermedio). El análisis de la secuencia primaria del canal TRPV4 reveló la presencia de 4 de estos dominios de arginina en la región citoplasmática, dos en la zona N-terminal (¹²²RWR, ²⁶⁹RGR) y dos en la zona C-terminal (⁸¹⁶RLR, ⁸¹⁹RDR). No obstante, el estudio del patrón de distribución intracelular para cada una de las variantes del grupo II tras mutar individual o colectivamente los 4 dominios RXR descartó la participación de estas señales como mecanismo de retención subyacente a la acumulación de estas proteínas en el RE ya que ninguna de las variantes (TRPV4-B, TRPV4-C y TRPV4-E) en ninguno de los casos analizados modificaron su localización, no llegando ni siquiera a alcanzar el compartimento intermedio o el *cis*-Golgi. Estos resultados indican que otros mecanismos o señales estarían implicados en la retención de estas proteínas en el RE. Por un lado, la típica señal de retención del RE del tipo KDEL (28) quedaría excluida ya que no está presente en nuestra proteína. En cambio, cabe mencionar que el sistema calnexina/calreticulina al mismo tiempo que actúa de chaperona facilitando el plegamiento de glicoproteínas en el RE (reconoce los grupos N-glicanos adicionados en este orgánulo), representa uno de los principales mecanismos de control de calidad en el RE responsable de identificar aquellas glicoproteínas mal plegadas o no oligomerizadas y enviarlas a su degradación a través del proteosoma (26;28). Por ello, una vez descartada la participación de los dominios RXR en la retención del TRPV4-B, TRPV4-C y TRPV4-E y habiendo demostrado que 1) estas variantes mal ensambladas no llegan más allá del RE, 2) colocalizan perfectamente con la calnexina y 3) que el canal TRPV4 es N-glicosilado, me parece interesante sugerir que debiera evaluarse la participación de

este sistema tanto en referencia al procesamiento y maduración del canal TRPV4, como en cuanto a mecanismo de control responsable de la retención de las variantes del grupo II se refiere.

Aquellas proteínas que oligomerizan en el RE deben alcanzar su conformación nativa (es decir, su estructura cuaternaria) antes de abandonar este orgánulo (64). Por ello, aunque claramente las variantes del grupo II quedan retenidas en el RE sin oligomerizar eficientemente, no podemos descartar por completo que un plegamiento parcialmente defectuoso sea en parte responsable de esta falta de oligomerización. No obstante, es muy difícil de determinar qué acontece primero ya que no existe un orden establecido entre estos dos procesos biogénicos que son característicos para cada proteína y que además en muchos casos se producen concomitantemente (63;64).

V

Conclusiones

1.- Las células epiteliales humanas de origen bronquial HBE y CFBE, y de origen traqueal CFT1, LCSFN-CFT1 y HTE, expresan funcionalmente el canal TRPV4, demostrado por RT-PCR y análisis funcional tras la aplicación del agonista sintético 4 α -PDD.

2.- La inhibición de la expresión del canal TRPV4 con el uso de oligonucleótidos antisentido en células epiteliales traqueales ha permitido demostrar, por primera vez, la participación del canal TRPV4 en el proceso de RVD. En esta función homeostática celular, el canal TRPV4 constituye la vía de entrada de Ca²⁺ responsable de activar los canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺, efectores del proceso de recuperación de volumen.

3.- Las células epiteliales respiratorias humanas con fenotipo FQ (CFBE, CFT1 y HTE) no regulan el volumen en condiciones de hipotonicidad, indicando que el proceso de RVD es dependiente de la proteína CFTR.

4.- La pérdida de la señal de Ca²⁺ y por lo tanto, la falta activación del canal TRPV4 en condiciones de hipotonicidad es la causa responsable de la falta de RVD en las células con FQ.

5.- La aplicación del agonista 4 α -PDD recupera la RVD en células epiteliales respiratorias con FQ.

6.- El epitelio respiratorio expresa como mínimo cinco variantes de *splicing* del canal TRPV4, tres de las cuales han sido identificadas por primera vez: el TRPV4-A (*full-length*), TRPV4-B (Δ 384-444), TRPV4-C (Δ 237-284), TRPV4-D (Δ 27-61) y TRPV4-E (Δ 237-284 y Δ 384-444).

7.- La caracterización molecular y funcional de estas variantes ha permitido demostrar que las repeticiones de ANK presentes en el extremo N-terminal de la proteína son dominios claves en la tetramerización del canal. Las variantes TRPV4-B, TRPV4-C y TRPV4-E, cuyas deleciones suponen la pérdida parcial de estos dominios, son retenidas intracelularmente en el RE por algún mecanismo de control de calidad debido a un ensamblaje defectuoso de las subunidades, independiente de los dominios RXR.

8-. El canal TRPV4 es N-glicosilado y oligomeriza en el RE. Una vez correctamente ensamblado es transportado hacia el Golgi donde se produce la maduración del N-oligosacárido. Las O-glicosilaciones quedan excluidas en el procesamiento de este canal.

9. En base a todas estas observaciones y al hecho de que el TRPV4 también juega un papel clave en el control del batido ciliar, se propone esta molécula como una posible diana terapéutica para facilitar la recuperación del aclaramiento mucociliar defectuoso presente en pacientes con FQ.

VI Bibliografía

1. Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinne-Saffran, E., Kinne, R. K. (2003) Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 148, 1-80
2. Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., Haussinger, D. (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 78, 247-306
3. Hallows, R. H., Knauf, P. A. (1995) Principles of cell volume regulation. In **Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation** (Kevin Strange, ed) pp. 3-29, Boca Raton : CRC Press.
4. Hoffmann, E. K., Dunham, P. B. (1995) Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int.Rev.Cytol.* 161, 173-262
5. Strange, K. (2004) Cellular volume homeostasis. *Adv.Physiol Educ.* 28, 155-159
6. Okada, Y., Maeno, E., Shimizu, T., Dezaki, K., Wang, J., Morishima, S. (2001) Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J.Physiol* 532, 3-16
7. McCarty, N. A., O'Neil, R. G. (1992) Calcium signaling in cell volume regulation. *Physiol Rev.* 72, 1037-1061
8. Waldegger, S., Steuer, S., Risler, T., Heidland, A., Capasso, G., Massry, S., Lang, F. (1998) Mechanisms and clinical significance of cell volume regulation. *Nephrol.Dial.Transplant.* 13, 867-874
9. Hoffmann, E. K. (2000) Intracellular signalling involved in volume regulatory decrease. *Cell Physiol Biochem.* 10, 273-288
10. Jakab, M., Furst, J., Gschwentner, M., Botta, G., Garavaglia, M. L., Bazzini, C., Rodighiero, S., Meyer, G., Eichmueller, S., Woll, E., Chwatal, S., Ritter, M., Paulmichl, M. (2002) Mechanisms sensing and modulating signals arising from cell swelling. *Cell Physiol Biochem.* 12, 235-258
11. MacLeod, R. J. (1994) How an epithelial cell swells is a determinant of the signaling pathways that activate RVD. In **Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation** (Kevin Strange, ed) pp. 191-200.
12. Cohen, D. M. (2005) SRC family kinases in cell volume regulation. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 288, C483-C493
13. Leipziger, J. (2003) Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 284, F419-F432
14. Novak, I. (2003) ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol Sci.* 18, 12-17

-
15. Bucheimer, R. E., Linden, J. (2004) Purinergic regulation of epithelial transport. *J.Physiol* 555, 311-321
 16. Wang, Y., Roman, R., Lidofsky, S. D., Fitz, J. G. (1996) Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 12020-12025
 17. Dubyak, G. R. (2003) Knock-out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia. *Mol.Pharmacol.* 63, 773-776
 18. Ito, Y., Son, M., Sato, S., Ishikawa, T., Kondo, M., Nakayama, S., Shimokata, K., Kume, H. (2004) ATP release triggered by activation of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human airway Calu-3 cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 30, 388-395
 19. Hwang, T. H., Schwiebert, E. M., Guggino, W. B. (1996) Apical and basolateral ATP stimulates tracheal epithelial chloride secretion via multiple purinergic receptors. *Am.J.Physiol* 270, C1611-C1623
 20. Schwiebert, E. M., Egan, M. E., Hwang, T. H., Fulmer, S. B., Allen, S. S., Cutting, G. R., Guggino, W. B. (1995) CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81, 1063-1073
 21. Pedersen, S. F., Owsianik, G., Nilius, B. (2005) TRP channels: an overview. *Cell Calcium* 38, 233-252
 22. Nilius, B., Watanabe, H., Vriens, J. (2003) The TRPV4 channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour. *Pflugers Arch.* 446, 298-303
 23. Montell, C. (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Sci.STKE.* 2005, re3
 24. O'Neil, R. G., Brown, R. C. (2003) The vanilloid receptor family of calcium-permeable channels: molecular integrators of microenvironmental stimuli. *News Physiol Sci.* 18, 226-231
 25. Sedgwick, S. G., Smerdon, S. J. (1999) The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem.Sci.* 24, 311-316
 26. Helenius, A., Aebi, M. (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu.Rev.Biochem.* 73, 1019-1049
 27. Guggino, W. B. (1999) Cystic fibrosis and the salt controversy. *Cell* 96, 607-610
 28. Ellgaard, L., Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4, 181-191
 29. Vazquez, E., Nobles, M., Valverde, M. A. (2001) Defective regulatory volume decrease in human cystic fibrosis tracheal cells because of altered regulation of intermediate conductance Ca²⁺-dependent potassium channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 5329-5334

30. Fernandez-Fernandez, J. M., Nobles, M., Currid, A., Vazquez, E., Valverde, M. A. (2002) Maxi K⁺ channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 283, C1705-C1714
31. Missiaen, L., Robberecht, W., van den, B. L., Callewaert, G., Parys, J. B., Wuytack, F., Raeymaekers, L., Nilius, B., Eggermont, J., De Smedt, H. (2000) Abnormal intracellular ca⁽²⁺⁾homeostasis and disease. *Cell Calcium* 28, 1-21
32. Urbach, V., Leguen, I., O'Kelly, I., Harvey, B. J. (1999) Mechanosensitive calcium entry and mobilization in renal A6 cells. *J.Membr.Biol.* 168, 29-37
33. Elliott, A. C. (2001) Recent developments in non-excitabile cell calcium entry. *Cell Calcium* 30, 73-93
34. Christensen, O. (1987) Mediation of cell volume regulation by Ca²⁺ influx through stretch-activated channels. *Nature* 330, 66-68
35. Hoyer, J., Distler, A., Haase, W., Gogelein, H. (1994) Ca²⁺ influx through stretch-activated cation channels activates maxi K⁺ channels in porcine endocardial endothelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 2367-2371
36. Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G., Plant, T. D. (2000) OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat.Cell Biol.* 2, 695-702
37. Wehner, F. (1998) Cell volume-regulated cation channels. *Contrib.Nephrol.* 123, 8-20
38. MACROBBIE, E. A., USSING, H. H. (1961) Osmotic behaviour of the epithelial cells of frog skin. *Acta Physiol Scand.* 53, 348-365
39. Nilius, B., Eggermont, J., Voets, T., Droogmans, G. (1996) Volume-activated Cl⁻ channels. *Gen.Pharmacol.* 27, 1131-1140
40. Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., Hudspeth, A. J., Friedman, J. M., Heller, S. (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103, 525-535
41. Wissenbach, U., Boddling, M., Freichel, M., Flockerzi, V. (2000) Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett.* 485, 127-134
42. Cosens, D. J., Manning, A. (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224, 285-287
43. Montell, C., Rubin, G. M. (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2, 1313-1323
44. Huang, C. L. (2004) The transient receptor potential superfamily of ion channels. *J.Am.Soc.Nephrol.* 15, 1690-1699

-
45. Ramsey, I. S., Delling, M., Clapham, D. E. (2006) An introduction to trp channels. *Annu.Rev.Physiol* 68, 619-647
46. Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G., Schaefer, M. (2005) Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J.Cell Sci.* 118, 917-928
47. Hoenderop, J. G., Voets, T., Hoefs, S., Weidema, F., Prenen, J., Nilius, B., Bindels, R. J. (2003) Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J.* 22, 776-785
48. Amiri, H., Schultz, G., Schaefer, M. (2003) FRET-based analysis of TRPC subunit stoichiometry. *Cell Calcium* 33, 463-470
49. Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., Gudermann, T. (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 7461-7466
50. Minke, B., Cook, B. (2002) TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev.* 82, 429-472
51. Clapham, D. E. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-524
52. Voets, T., Nilius, B. (2003) TRPs make sense. *J.Membr.Biol.* 192, 1-8
53. Yao, X., Garland, C. J. (2005) Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels. *Circ.Res.* 97, 853-863
54. Bezzerides, V. J., Ramsey, I. S., Kotecha, S., Greka, A., Clapham, D. E. (2004) Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat.Cell Biol.* 6, 709-720
55. Walker, R. L., Hume, J. R., Horowitz, B. (2001) Differential expression and alternative splicing of TRP channel genes in smooth muscles. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 280, C1184-C1192
56. Chu, X., Tong, Q., Wozney, J., Zhang, W., Cheung, J. Y., Conrad, K., Mazack, V., Stahl, R., Barber, D. L., Miller, B. A. (2005) Identification of an N-terminal TRPC2 splice variant which inhibits calcium influx. *Cell Calcium* 37, 173-182
57. Wang, C., Hu, H. Z., Colton, C. K., Wood, J. D., Zhu, M. X. (2004) An alternative splicing product of the murine trpv1 gene dominant negatively modulates the activity of TRPV1 channels. *J.Biol.Chem.* 279, 37423-37430
58. Yang, M., Gupta, A., Shlykov, S. G., Corrigan, R., Tsujimoto, S., Sanborn, B. M. (2002) Multiple Trp isoforms implicated in capacitative calcium entry are expressed in human pregnant myometrium and myometrial cells. *Biol.Reprod.* 67, 988-994
59. Mery, L., Magnino, F., Schmidt, K., Krause, K. H., Dufour, J. F. (2001) Alternative splice variants of hTrp4 differentially interact with the C-terminal portion of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *FEBS Lett.* 487, 377-383

-
60. Sakura, H., Ashcroft, F. M. (1997) Identification of four *trp1* gene variants murine pancreatic beta-cells. *Diabetologia* 40, 528-532
61. Oberwinkler, J., Lis, A., Giehl, K. M., Flockerzi, V., Philipp, S. E. (2005) Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J.Biol.Chem.*
62. Schulein, R. (2004) The early stages of the intracellular transport of membrane proteins: clinical and pharmacological implications. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 151, 45-91
63. Green, W. N., Millar, N. S. (1995) Ion-channel assembly. *Trends Neurosci.* 18, 280-287
64. Reddy, P. S., Corley, R. B. (1998) Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *Bioessays* 20, 546-554
65. Hirsch, C., Jarosch, E., Sommer, T., Wolf, D. H. (2004) Endoplasmic reticulum-associated protein degradation: one model fits all? *Biochim.Biophys.Acta* 1695, 215-223
66. Ellgaard, L., Molinari, M., Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286, 1882-1888
67. Clapham, D. E., Runnels, L. W., Strubing, C. (2001) The TRP ion channel family. *Nat.Rev.Neurosci.* 2, 387-396
68. Kedei, N., Szabo, T., Lile, J. D., Treanor, J. J., Olah, Z., Iadarola, M. J., Blumberg, P. M. (2001) Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J.Biol.Chem.* 276, 28613-28619
69. Goel, M., Sinkins, W. G., Schilling, W. P. (2002) Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J.Biol.Chem.* 277, 48303-48310
70. Xu, X. Z., Li, H. S., Guggino, W. B., Montell, C. (1997) Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell* 89, 1155-1164
71. Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Clapham, D. E. (2003) Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J.Biol.Chem.* 278, 39014-39019
72. Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Clapham, D. E. (2001) TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29, 645-655
73. Chang, Q., Gyftogianni, E., van de Graaf, S. F., Hoefs, S., Weidema, F. A., Bindels, R. J., Hoenderop, J. G. (2004) Molecular determinants in TRPV5 channel assembly. *J.Biol.Chem.* 279, 54304-54311
74. Engelke, M., Friedrich, O., Budde, P., Schafer, C., Niemann, U., Zitt, C., Jungling, E., Rocks, O., Luckhoff, A., Frey, J. (2002) Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1beta. *FEBS Lett.* 523, 193-199

-
75. Erler, I., Hirnet, D., Wissenbach, U., Flockerzi, V., Niemeyer, B. A. (2004) Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J.Biol.Chem.* 279, 34456-34463
76. Peng, J. B., Chen, X. Z., Berger, U. V., Weremowicz, S., Morton, C. C., Vassilev, P. M., Brown, E. M., Hediger, M. A. (2000) Human calcium transport protein CaT1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 278, 326-332
77. Niemeyer, B. A. (2005) Structure-function analysis of TRPV channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*
78. Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sanchez, E., Fernandez-Ballester, G., Ferrer-Montiel, A. (2004) Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J.Neurosci.* 24, 5307-5314
79. Howard, J., Bechstet, S. (2004) Hypothesis: a helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors. *Curr.Biol.* 14, R224-R226
80. Tsunoda, S., Sierralta, J., Sun, Y., Bodner, R., Suzuki, E., Becker, A., Socolich, M., Zuker, C. S. (1997) A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature* 388, 243-249
81. Tsunoda, S., Zuker, C. S. (1999) The organization of INAD-signaling complexes by a multivalent PDZ domain protein in Drosophila photoreceptor cells ensures sensitivity and speed of signaling. *Cell Calcium* 26, 165-171
82. Mery, L., Strauss, B., Dufour, J. F., Krause, K. H., Hoth, M. (2002) The PDZ-interacting domain of TRPC4 controls its localization and surface expression in HEK293 cells. *J.Cell Sci.* 115, 3497-3508
83. van de Graaf, S. F., Hoenderop, J. G., van der Kemp, A. W., Gisler, S. M., Bindels, R. J. (2006) Interaction of the epithelial Ca(2+) channels TRPV5 and TRPV6 with the intestine- and kidney-enriched PDZ protein NHERF4. *Pflugers Arch.*
84. Palmada, M., Poppendieck, S., Embark, H. M., van de Graaf, S. F., Boehmer, C., Bindels, R. J., Lang, F. (2005) Requirement of PDZ domains for the stimulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 by the NHE regulating factor NHERF2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *Cell Physiol Biochem.* 15, 175-182
85. Hoenderop, J. G., Nilius, B., Bindels, R. J. (2003) Epithelial calcium channels: from identification to function and regulation. *Pflugers Arch.* 446, 304-308
86. Voets, T., Janssens, A., Droogmans, G., Nilius, B. (2004) Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel. *J.Biol.Chem.* 279, 15223-15230
87. Voets, T., Nilius, B. (2003) The pore of TRP channels: trivial or neglected? *Cell Calcium* 33, 299-302

-
88. Nilius, B., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T. (2004) TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 286, C195-C205
89. Mutai, H., Heller, S. (2003) Vertebrate and invertebrate TRPV-like mechanoreceptors. *Cell Calcium* 33, 471-478
90. O'Neil, R. G., Heller, S. (2005) The mechanosensitive nature of TRPV channels. *Pflugers Arch.*
91. Wang, S., Li, M. (2001) Molecular studies of CFTR interacting proteins. *Pflugers Arch.* 443 Suppl 1, S62-S64
92. Liedtke, W., Tobin, D. M., Bargmann, C. I., Friedman, J. M. (2003) Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 Suppl 2, 14531-14536
93. Gong, Z., Son, W., Chung, Y. D., Kim, J., Shin, D. W., McClung, C. A., Lee, Y., Lee, H. W., Chang, D. J., Kaang, B. K., Cho, H., Oh, U., Hirsh, J., Kernan, M. J., Kim, C. (2004) Two interdependent TRPV channel subunits, inactive and Nanchung, mediate hearing in *Drosophila*. *J.Neurosci.* 24, 9059-9066
94. Kim, J., Chung, Y. D., Park, D. Y., Choi, S., Shin, D. W., Soh, H., Lee, H. W., Son, W., Yim, J., Park, C. S., Kernan, M. J., Kim, C. (2003) A TRPV family ion channel required for hearing in *Drosophila*. *Nature* 424, 81-84
95. Muraki, K., Iwata, Y., Katanosaka, Y., Ito, T., Ohya, S., Shigekawa, M., Imaizumi, Y. (2003) TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ.Res.* 93, 829-838
96. Benham, C. D., Gunthorpe, M. J., Davis, J. B. (2003) TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium* 33, 479-487
97. Tominaga, M., Caterina, M. J. (2004) Thermosensation and pain. *J.Neurobiol.* 61, 3-12
98. Guler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., Caterina, M. (2002) Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J.Neurosci.* 22, 6408-6414
99. Chung, M. K., Lee, H., Caterina, M. J. (2003) Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *J.Biol.Chem.* 278, 32037-32046
100. Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S. H., Benham, C. D., Droogmans, G., Nilius, B. (2002) Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 277, 47044-47051
101. Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K., Imai, M. (2003) Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J.Biol.Chem.* 278, 22664-22668
102. Gao, X., Wu, L., O'Neil, R. G. (2003) Temperature-modulated diversity of TRPV4 channel gating: activation by physical stresses and phorbol ester derivatives

through protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J.Biol.Chem.* 278, 27129-27137

103. Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Nilius, B. (2003) Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 424, 434-438

104. Watanabe, H., Davis, J. B., Smart, D., Jerman, J. C., Smith, G. D., Hayes, P., Vriens, J., Cairns, W., Wissenbach, U., Prenen, J., Flockerzi, V., Droogmans, G., Benham, C. D., Nilius, B. (2002) Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J.Biol.Chem.* 277, 13569-13577

105. Delany, N. S., Hurle, M., Facer, P., Alnadaf, T., Plumpton, C., Kinghorn, I., See, C. G., Costigan, M., Anand, P., Woolf, C. J., Crowther, D., Sanseau, P., Tate, S. N. (2001) Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiol Genomics* 4, 165-174

106. Nilius, B., Prenen, J., Wissenbach, U., Bodding, M., Droogmans, G. (2001) Differential activation of the volume-sensitive cation channel TRP12 (OTRPC4) and volume-regulated anion currents in HEK-293 cells. *Pflugers Arch.* 443, 227-233

107. Voets, T., Prenen, J., Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Wissenbach, U., Bodding, M., Droogmans, G., Nilius, B. (2002) Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *J.Biol.Chem.* 277, 33704-33710

108. Watanabe, H., Vriens, J., Janssens, A., Wondergem, R., Droogmans, G., Nilius, B. (2003) Modulation of TRPV4 gating by intra- and extracellular Ca²⁺. *Cell Calcium* 33, 489-495

109. Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Droogmans, G., Voets, T., Nilius, B. (2004) Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 396-401

110. Xu, F., Satoh, E., Iijima, T. (2003) Protein kinase C-mediated Ca²⁺ entry in HEK 293 cells transiently expressing human TRPV4. *Br.J.Pharmacol.* 140, 413-421

111. Vriens, J., Owsianik, G., Fisslthaler, B., Suzuki, M., Janssens, A., Voets, T., Morisseau, C., Hammock, B. D., Fleming, I., Busse, R., Nilius, B. (2005) Modulation of the Ca²⁺ permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. *Circ.Res.* 97, 908-915

112. Todaka, H., Taniguchi, J., Satoh, J., Mizuno, A., Suzuki, M. (2004) Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *J.Biol.Chem.* 279, 35133-35138

113. Lee, H., Iida, T., Mizuno, A., Suzuki, M., Caterina, M. J. (2005) Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J.Neurosci.* 25, 1304-1310

114. Xu, H., Zhao, H., Tian, W., Yoshida, K., Roullet, J. B., Cohen, D. M. (2003) Regulation of a transient receptor potential (TRP) channel by tyrosine phosphorylation. SRC family kinase-dependent tyrosine phosphorylation of TRPV4

- on TYR-253 mediates its response to hypotonic stress. *J.Biol.Chem.* 278, 11520-11527
115. Cohen, D. M. (2005) TRPV4 and the mammalian kidney. *Pflugers Arch.* 451, 168-175
116. Jia, Y., Wang, X., Varty, L., Rizzo, C. A., Yang, R., Correll, C. C., Phelps, P. T., Egan, R. W., Hey, J. A. (2004) Functional TRPV4 channels are expressed in human airway smooth muscle cells. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 287, L272-L278
117. Suzuki, M., Watanabe, Y., Oyama, Y., Mizuno, A., Kusano, E., Hirao, A., Ookawara, S. (2003) Localization of mechanosensitive channel TRPV4 in mouse skin. *Neurosci.Lett.* 353, 189-192
118. Liedtke, W. B. (2005) TRPV4 plays an evolutionary conserved role in the transduction of osmotic and mechanical stimuli in live animals. *J.Physiol*
119. Liedtke, W. (2005) TRPV4 as osmosensor: a transgenic approach. *Pflugers Arch.*
120. Liedtke, W., Friedman, J. M. (2003) Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 13698-13703
121. Mizuno, A., Matsumoto, N., Imai, M., Suzuki, M. (2003) Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 285, C96-101
122. Tabuchi, K., Suzuki, M., Mizuno, A., Hara, A. (2005) Hearing impairment in TRPV4 knockout mice. *Neurosci.Lett.* 382, 304-308
123. Alessandri-Haber, N., Yeh, J. J., Boyd, A. E., Parada, C. A., Chen, X., Reichling, D. B., Levine, J. D. (2003) Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron* 39, 497-511
124. Alessandri-Haber, N., Dina, O. A., Yeh, J. J., Parada, C. A., Reichling, D. B., Levine, J. D. (2004) Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *J.Neurosci.* 24, 4444-4452
125. Alessandri-Haber, N., Joseph, E., Dina, O. A., Liedtke, W., Levine, J. D. (2005) TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator. *Pain* 118, 70-79
126. Ratjen, F., Doring, G. (2003) Cystic fibrosis. *Lancet* 361, 681-689
127. Quinton, P. M. (1999) Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev.* 79, S3-S22
128. Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L., . (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1073

129. Collins, F. S. (1992) Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256, 774-779
130. Welsh, M. J., Tsui, L. C., Boat, T. F., Beaudet, A. L. (2006) Cystic Fibrosis. In *In Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (C Scriver, AL Beaudet, WE Sly, and Valle, eds) pp. 3799-3876
131. Hanrahan, J. W., Wioland, M. A. (2004) Revisiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 1, 17-21
132. Sheppard, D. N., Welsh, M. J. (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev.* 79, S23-S45
133. Cheng, S. H., Gregory, R. J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D. W., White, G. A., O'Riordan, C. R., Smith, A. E. (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63, 827-834
134. Kunzelmann, K. (1999) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its function in epithelial transport. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 137, 1-70
135. Kunzelmann, K. (2001) CFTR: interacting with everything? *News Physiol Sci.* 16, 167-170
136. Kunzelmann, K., Schreiber, R. (1999) CFTR, a regulator of channels. *J.Membr.Biol.* 168, 1-8
137. Schreiber, R., Boucherot, A., Murle, B., Sun, J., Kunzelmann, K. (2004) Control of epithelial ion transport by Cl⁻ and PDZ proteins. *J.Membr.Biol.* 199, 85-98
138. Wheat, V. J., Shumaker, H., Burnham, C., Shull, G. E., Yankaskas, J. R., Soleimani, M. (2000) CFTR induces the expression of DRA along with Cl⁻/HCO₃⁻ exchange activity in tracheal epithelial cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 279, C62-C71
139. Bradbury, N. A., Jilling, T., Berta, G., Sorscher, E. J., Bridges, R. J., Kirk, K. L. (1992) Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. *Science* 256, 530-532
140. Bertrand, C. A., Frizzell, R. A. (2003) The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 285, C1-18
141. Coakley, R. D., Grubb, B. R., Paradiso, A. M., Gatzky, J. T., Johnson, L. G., Kreda, S. M., O'Neal, W. K., Boucher, R. C. (2003) Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 16083-16088
142. Coakley, R. D., Boucher, R. C. (2001) Regulation and functional significance of airway surface liquid pH. *JOP.* 2, 294-300

-
143. Braunstein, G. M., Roman, R. M., Clancy, J. P., Kudlow, B. A., Taylor, A. L., Shylonsky, V. G., Jovov, B., Peter, K., Jilling, T., Ismailov, I. I., Benos, D. J., Schwiebert, L. M., Fitz, J. G., Schwiebert, E. M. (2001) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *J.Biol.Chem.* 276, 6621-6630
144. Cho, W. K., Siegrist, V. J., Zinzow, W. (2004) Impaired regulatory volume decrease in freshly isolated cholangiocytes from cystic fibrosis mice: implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator effect on potassium conductance. *J.Biol.Chem.* 279, 14610-14618
145. Guggino, W. B., Banks-Schlegel, S. P. (2004) Macromolecular interactions and ion transport in cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 170, 815-820
146. Valverde, M. A., Vazquez, E., Munoz, F. J., Nobles, M., Delaney, S. J., Wainwright, B. J., Colledge, W. H., Sheppard, D. N. (2000) Murine CFTR channel and its role in regulatory volume decrease of small intestine crypts. *Cell Physiol Biochem.* 10, 321-328
147. Valverde, M. A., O'Brien, J. A., Sepulveda, F. V., Ratcliff, R. A., Evans, M. J., Colledge, W. H. (1995) Impaired cell volume regulation in intestinal crypt epithelia of cystic fibrosis mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 9038-9041
148. Moyer, B. D., Denton, J., Karlson, K. H., Reynolds, D., Wang, S., Mickle, J. E., Milewski, M., Cutting, G. R., Guggino, W. B., Li, M., Stanton, B. A. (1999) A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J.Clin.Invest* 104, 1353-1361
149. Guggino, W. B. (2004) The cystic fibrosis transmembrane regulator forms macromolecular complexes with PDZ domain scaffold proteins. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 1, 28-32
150. Rowntree, R. K., Harris, A. (2003) The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann.Hum.Genet.* 67, 471-485
151. Denning, G. M., Anderson, M. P., Amara, J. F., Marshall, J., Smith, A. E., Welsh, M. J. (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 358, 761-764
152. Morral, N., Bertranpetit, J., Estivill, X., Nunes, V., Casals, T., Gimenez, J., Reis, A., Varon-Mateeva, R., Macek, M., Jr., Kalaydjieva, L., . (1994) The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat.Genet.* 7, 169-175
153. Boucher, R. C. (2002) An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 54, 1359-1371
154. Turcios, N. L. (2005) Cystic fibrosis: an overview. *J.Clin.Gastroenterol.* 39, 307-317

155. Reddy, M. M., Light, M. J., Quinton, P. M. (1999) Activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) requires CFTR Cl⁻ channel function. *Nature* 402, 301-304
156. Choi, J. Y., Muallem, D., Kiselyov, K., Lee, M. G., Thomas, P. J., Muallem, S. (2001) Aberrant CFTR-dependent. *Nature* 410, 94-97
157. Wine, J. J., Joo, N. S. (2004) Submucosal glands and airway defense. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 1, 47-53
158. Tarran, R. (2004) Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 1, 42-46
159. Knowles, M. R., Boucher, R. C. (2002) Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J.Clin.Invest* 109, 571-577
160. Thornton, D. J., Sheehan, J. K. (2004) From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 1, 54-61
161. Huang, P., Gilmore, E., Kultgen, P., Barnes, P., Milgram, S., Stutts, M. J. (2004) Local regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator and epithelial sodium channel in airway epithelium. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 1, 33-37
162. Tarran, R., Loewen, M. E., Paradiso, A. M., Olsen, J. C., Gray, M. A., Argent, B. E., Boucher, R. C., Gabriel, S. E. (2002) Regulation of murine airway surface liquid volume by CFTR and Ca²⁺-activated Cl⁻ conductances. *J.Gen.Physiol* 120, 407-418
163. Walsh, D. E., Harvey, B. J., Urbach, V. (2000) CFTR regulation of intracellular calcium in normal and cystic fibrosis human airway epithelia. *J.Membr.Biol.* 177, 209-219
164. Lazarowski, E. R., Tarran, R., Grubb, B. R., van Heusden, C. A., Okada, S., Boucher, R. C. (2004) Nucleotide release provides a mechanism for airway surface liquid homeostasis. *J.Biol.Chem.* 279, 36855-36864
165. Huang, P., Lazarowski, E. R., Tarran, R., Milgram, S. L., Boucher, R. C., Stutts, M. J. (2001) Compartmentalized autocrine signaling to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at the apical membrane of airway epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 14120-14125
166. Reisin, I. L., Prat, A. G., Abraham, E. H., Amara, J. F., Gregory, R. J., Ausiello, D. A., Cantiello, H. F. (1994) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J.Biol.Chem.* 269, 20584-20591
167. Matsui, H., Grubb, B. R., Tarran, R., Randell, S. H., Gatzky, J. T., Davis, C. W., Boucher, R. C. (1998) Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95, 1005-1015
168. Boucher, R. C. (2004) Relationship of airway epithelial ion transport to chronic bronchitis. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 1, 66-70

169. Pier, G. B. (2000) Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 8822-8828
170. Song, Y., Salinas, D., Nielson, D. W., Verkman, A. S. (2005) Hyperacidity of secreted fluid from submucosal glands in early cystic fibrosis. *Am.J.Physiol Cell Physiol*
171. Engelhardt, J. F., Zepeda, M., Cohn, J. A., Yankaskas, J. R., Wilson, J. M. (1994) Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J.Clin.Invest* 93, 737-749
172. Kreda, S. M., Mall, M., Mengos, A., Rochelle, L., Yankaskas, J., Riordan, J. R., Boucher, R. C. (2005) Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia. *Mol.Biol.Cell* 16, 2154-2167
173. Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T. S. (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, 12088-12093
174. Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T., Meluleni, G., Mueschenborn, S. S., Banting, G., Ratcliff, R., Evans, M. J., Colledge, W. H. (1998) *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393, 79-82
175. Roomans, G. M., Kozlova, I., Nilsson, H., Vanthanouvong, V., Button, B., Tarran, R. (2004) Measurements of airway surface liquid height and mucus transport by fluorescence microscopy, and of ion composition by X-ray microanalysis. *J.Cyst.Fibros.* 3 Suppl 2, 135-139
176. Valverde, M. A., Diaz, M., Sepulveda, F. V., Gill, D. R., Hyde, S. C., Higgins, C. F. (1992) Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 355, 830-833
177. Valverde, M. A., Bond, T. D., Hardy, S. P., Taylor, J. C., Higgins, C. F., Altamirano, J., Alvarez-Leefmans, F. J. (1996) The multidrug resistance P-glycoprotein modulates cell regulatory volume decrease. *EMBO J.* 15, 4460-4468
178. Hardy, S. P., Goodfellow, H. R., Valverde, M. A., Gill, D. R., Sepulveda, V., Higgins, C. F. (1995) Protein kinase C-mediated phosphorylation of the human multidrug resistance P-glycoprotein regulates cell volume-activated chloride channels. *EMBO J.* 14, 68-75
179. Bond, T. D., Valverde, M. A., Higgins, C. F. (1998) Protein kinase C phosphorylation disengages human and mouse-1a P-glycoproteins from influencing the rate of activation of swelling-activated chloride currents. *J.Physiol* 508 (Pt 2), 333-340
180. Cozens, A. L., Yezzi, M. J., Kunzelmann, K., Ohrui, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W. E., Widdicombe, J. H., Gruenert, D. C. (1994) CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 10, 38-47

181. Haws, C., Krouse, M. E., Xia, Y., Gruenert, D. C., Wine, J. J. (1992) CFTR channels in immortalized human airway cells. *Am.J.Physiol* 263, L692-L707
182. Mehta, A. (2005) CFTR: more than just a chloride channel. *Pediatr.Pulmonol.* 39, 292-298
183. Grimm, C., Kraft, R., Sauerbruch, S., Schultz, G., Harteneck, C. (2003) Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J.Biol.Chem.* 278, 21493-21501
184. Becker, D., Blase, C., Bereiter-Hahn, J., Jendrach, M. (2005) TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation. *J.Cell Sci.* 118, 2435-2440
185. Li, C., Naren, A. P. (2005) Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacol.Ther.* 108, 208-223
186. Wang, S., Raab, R. W., Schatz, P. J., Guggino, W. B., Li, M. (1998) Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett.* 427, 103-108
187. Cheng, J., Moyer, B. D., Milewski, M., Loffing, J., Ikeda, M., Mickle, J. E., Cutting, G. R., Li, M., Stanton, B. A., Guggino, W. B. (2002) A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. *J.Biol.Chem.* 277, 3520-3529
188. Wang, S., Yue, H., Derin, R. B., Guggino, W. B., Li, M. (2000) Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* 103, 169-179
189. Raghuram, V., Mak, D. D., Foskett, J. K. (2001) Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 1300-1305
190. Li, J., Dai, Z., Jana, D., Callaway, D. J., Bu, Z. (2005) Ezrin controls the macromolecular complexes formed between an adapter protein Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J.Biol.Chem.*
191. Moyer, B. D., Duhaime, M., Shaw, C., Denton, J., Reynolds, D., Karlson, K. H., Pfeiffer, J., Wang, S., Mickle, J. E., Milewski, M., Cutting, G. R., Guggino, W. B., Li, M., Stanton, B. A. (2000) The PDZ-interacting domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is required for functional expression in the apical plasma membrane. *J.Biol.Chem.* 275, 27069-27074
192. Sun, F., Hug, M. J., Lewarchik, C. M., Yun, C. H., Bradbury, N. A., Frizzell, R. A. (2000) E3KARP mediates the association of ezrin and protein kinase A with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway cells. *J.Biol.Chem.* 275, 29539-29546

193. Hall, R. A., Ostedgaard, L. S., Premont, R. T., Blitzer, J. T., Rahman, N., Welsh, M. J., Lefkowitz, R. J. (1998) A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 8496-8501
194. Yoo, D., Flagg, T. P., Olsen, O., Raghuram, V., Foskett, J. K., Welling, P. A. (2004) Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J.Biol.Chem.* 279, 6863-6873
195. Voltz, J. W., Weinman, E. J., Shenolikar, S. (2001) Expanding the role of NHERF, a PDZ-domain containing protein adapter, to growth regulation. *Oncogene* 20, 6309-6314
196. Gray, M. A. (2004) Bicarbonate secretion: it takes two to tango. *Nat.Cell Biol.* 6, 292-294
197. Lau, A. G., Hall, R. A. (2001) Oligomerization of NHERF-1 and NHERF-2 PDZ domains: differential regulation by association with receptor carboxyl-termini and by phosphorylation. *Biochemistry* 40, 8572-8580
198. Fouassier, L., Yun, C. C., Fitz, J. G., Doctor, R. B. (2000) Evidence for ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) self-association through PDZ-PDZ interactions. *J.Biol.Chem.* 275, 25039-25045
199. Tang, Y., Tang, J., Chen, Z., Trost, C., Flockerzi, V., Li, M., Ramesh, V., Zhu, M. X. (2000) Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF. *J.Biol.Chem.* 275, 37559-37564
200. Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M., Cantley, L. C. (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275, 73-77
201. Beuming, T., Skrabanek, L., Niv, M. Y., Mukherjee, P., Weinstein, H. (2005) PDZBase: a protein-protein interaction database for PDZ-domains. *Bioinformatics.* 21, 827-828
202. Lee-Kwon, W., Wade, J. B., Zhang, Z., Pallone, T. L., Weinman, E. J. (2005) Expression of TRPC4 channel protein that interacts with NHERF-2 in rat descending vasa recta. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 288, C942-C949
203. McCahill, A., Warwicker, J., Bolger, G. B., Houslay, M. D., Yarwood, S. J. (2002) The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol.Pharmacol.* 62, 1261-1273
204. Liedtke, C. M., Raghuram, V., Yun, C. C., Wang, X. (2004) Role of a PDZ1 domain of NHERF1 in the binding of airway epithelial RACK1 to NHERF1. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 286, C1037-C1044
205. Liedtke, C. M., Yun, C. H., Kyle, N., Wang, D. (2002) Protein kinase C epsilon-dependent regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator involves binding to

a receptor for activated C kinase (RACK1) and RACK1 binding to Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor. *J.Biol.Chem.* 277, 22925-22933

206. Chang, B. Y., Chiang, M., Cartwright, C. A. (2001) The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1. *J.Biol.Chem.* 276, 20346-20356

207. Chang, B. Y., Harte, R. A., Cartwright, C. A. (2002) RACK1: a novel substrate for the Src protein-tyrosine kinase. *Oncogene* 21, 7619-7629

208. Besson, A., Wilson, T. L., Yong, V. W. (2002) The anchoring protein RACK1 links protein kinase Cepsilon to integrin beta chains. Requirements for adhesion and motility. *J.Biol.Chem.* 277, 22073-22084

209. Liliental, J., Chang, D. D. (1998) Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit. *J.Biol.Chem.* 273, 2379-2383

210. Geiger, B., Bershadsky, A. (2002) Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell* 110, 139-142

211. Cox, E. A., Bennin, D., Doan, A. T., O'Toole, T., Huttenlocher, A. (2003) RACK1 regulates integrin-mediated adhesion, protrusion, and chemotactic cell migration via its Src-binding site. *Mol.Biol.Cell* 14, 658-669

212. Mohler, P. J., Kreda, S. M., Boucher, R. C., Sudol, M., Stutts, M. J., Milgram, S. L. (1999) Yes-associated protein 65 localizes p62(c-Yes) to the apical compartment of airway epithelia by association with EBP50. *J.Cell Biol.* 147, 879-890

213. Hirabayashi, T., Shimizu, T. (2000) Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2). *Biochim.Biophys.Acta* 1488, 124-138

214. Braunstein, G. M., Zsembery, A., Tucker, T. A., Schwiebert, E. M. (2004) Purinergic signaling underlies CFTR control of human airway epithelial cell volume. *J.Cyst.Fibros.* 3, 99-117

215. Schwiebert, E. M., Zsembery, A. (2003) Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1615, 7-32

216. Lazarowski, E. R., Boucher, R. C., Harden, T. K. (1994) Calcium-dependent release of arachidonic acid in response to purinergic receptor activation in airway epithelium. *Am.J.Physiol* 266, C406-C415

217. Cobb, B. R., Ruiz, F., King, C. M., Fortenberry, J., Greer, H., Kovacs, T., Sorscher, E. J., Clancy, J. P. (2002) A(2) adenosine receptors regulate CFTR through PKA and PLA(2). *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 282, L12-L25

218. Boucher, R. C. (2004) New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur.Respir.J.* 23, 146-158

219. Delaney, S. J., Alton, E. W., Smith, S. N., Lunn, D. P., Farley, R., Lovelock, P. K., Thomson, S. A., Hume, D. A., Lamb, D., Porteous, D. J., Dorin, J. R.,

- Wainwright, B. J. (1996) Cystic fibrosis mice carrying the missense mutation G551D replicate human genotype-phenotype correlations. *EMBO J.* 15, 955-963
220. Colledge, W. H., Abella, B. S., Southern, K. W., Ratcliff, R., Jiang, C., Cheng, S. H., MacVinish, L. J., Anderson, J. R., Cuthbert, A. W., Evans, M. J. (1995) Generation and characterization of a delta F508 cystic fibrosis mouse model. *Nat.Genet.* 10, 445-452
221. Snouwaert, J. N., Brigman, K. K., Latour, A. M., Malouf, N. N., Boucher, R. C., Smithies, O., Koller, B. H. (1992) An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* 257, 1083-1088
222. Hamosh, A., King, T. M., Rosenstein, B. J., Corey, M., Levison, H., Durie, P., Tsui, L. C., McIntosh, I., Keston, M., Brock, D. J., . (1992) Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation Gly-Asp at codon 551 and the delta F508 mutation are clinically indistinguishable from delta F508 homozygotes, except for decreased risk of meconium ileus. *Am.J.Hum.Genet.* 51, 245-250
223. Mall, M., Wissner, A., Gonska, T., Calenborn, D., Kuehr, J., Brandis, M., Kunzelmann, K. (2000) Inhibition of amiloride-sensitive epithelial Na(+) absorption by extracellular nucleotides in human normal and cystic fibrosis airways. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 23, 755-761
224. Graham, A., Steel, D. M., Alton, E. W., Geddes, D. M. (1992) Second-messenger regulation of sodium transport in mammalian airway epithelia. *J.Physiol* 453, 475-491
225. Donaldson, S. H., Bennett, W. D., Zeman, K. L., Knowles, M. R., Tarran, R., Boucher, R. C. (2006) Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline. *N.Engl.J.Med.* 354, 241-250
226. Schumacher, M. A., Moff, I., Sudanagunta, S. P., Levine, J. D. (2000) Molecular cloning of an N-terminal splice variant of the capsaicin receptor. Loss of N-terminal domain suggests functional divergence among capsaicin receptor subtypes. *J.Biol.Chem.* 275, 2756-2762
227. Balzer, M., Lintschinger, B., Groschner, K. (1999) Evidence for a role of Trp proteins in the oxidative stress-induced membrane conductances of porcine aortic endothelial cells. *Cardiovasc.Res.* 42, 543-549
228. Xu, X. Z., Chien, F., Butler, A., Salkoff, L., Montell, C. (2000) TRPgamma, a drosophila TRP-related subunit, forms a regulated cation channel with TRPL. *Neuron* 26, 647-657
229. Jonas-Straube, E., Hutin, C., Hoffman, N. E., Schunemann, D. (2001) Functional analysis of the protein-interacting domains of chloroplast SRP43. *J.Biol.Chem.* 276, 24654-24660
230. Xu, H., Fu, Y., Tian, W., Cohen, D. M. (2006) Glycosylation of the osmosensitive transient receptor potential channel TRPV4 on Asn-651 influences membrane trafficking. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 290, F1103-F1109

231. Nagaya, N., Papazian, D. M. (1997) Potassium channel alpha and beta subunits assemble in the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 272, 3022-3027
232. de Souza, N. F., Simon, S. M. (2002) Glycosylation affects the rate of traffic of the Shaker potassium channel through the secretory pathway. *Biochemistry* 41, 11351-11361
233. Khanna, R., Myers, M. P., Laine, M., Papazian, D. M. (2001) Glycosylation increases potassium channel stability and surface expression in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* 276, 34028-34034
234. Hermosilla, R., Oueslati, M., Donalies, U., Schonenberger, E., Krause, E., Oksche, A., Rosenthal, W., Schulein, R. (2004) Disease-causing V(2) vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway. *Traffic.* 5, 993-1005
235. Hammond, C., Helenius, A. (1994) Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J.Cell Biol.* 126, 41-52
236. Muniz, M., Morsomme, P., Riezman, H. (2001) Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell* 104, 313-320
237. Zhou, J., Shin, H. G., Yi, J., Shen, W., Williams, C. P., Murray, K. T. (2002) Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circ.Res.* 91, 540-546
238. Ma, D., Jan, L. Y. (2002) ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr.Opin.Neurobiol.* 12, 287-292
239. Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y. F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (2001) Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 291, 316-319
240. Vashist, S., Kim, W., Belden, W. J., Spear, E. D., Barlowe, C., Ng, D. T. (2001) Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding. *J.Cell Biol.* 155, 355-368
241. Zerangue, N., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (2000) An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 3591-3595
242. Michelsen, K., Yuan, H., Schwappach, B. (2005) Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Rep.* 6, 717-722
243. Nufer, O., Hauri, H. P. (2003) ER export: call 14-3-3. *Curr.Biol.* 13, R391-R393