ARTICULO DE REVISION

Arch. Biol. Med. Exp. *23:* 277-284 (1990)
Printed in Chile

Fisiopatología de la fibrosis quística

Pathophysiology of Cystic Fibrosis

DANIEL WOLFF[1] and ANDRES STUTZIN[2],

[1]Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y
[2]Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina
Universidad de Chile.

Cystic Fibrosis (CF) is the most common lethal genetic autosomic disease in Caucasians. The disease expresses itself in airway and other epithelial cells as a defective chloride ion absorption and secretion. At least, an abnormal cAMP-dependent regulation of an apically located chloride channel has been proposed as the underlying molecular defect. The gene responsible for CF has been identified and predicted to encode a membrane protein termed cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). The functional role of the predicted protein remains unclear, although strong evidence suggest that it is directly or indirectly involved in regulation of the apical chloride permeability in epithelial cells. This review discusses the fundamental issues currently being investigated in CF.

INTRODUCCIÓN

La Fibrosis Quística (FQ) constituye la patología genética letal más común entre la población de origen caucásico, con una incidencia de 1 caso por cada 2.000 nacidos vivos en EE.UU. y 1 caso en 4.500 en Chile.

Este cuadro fue descrito como una entidad clínica independiente en 1938 (Andersen, 1938) y se caracteriza por un conjunto de manifestaciones multisistémicas que afectan en forma heterogénea a las glándulas exocrinas y epitelios secretores y reabsortivos en general.

El compromiso de los epitelios mucosos, que secretan grandes cantidades de glicoproteínas, es el que origina las complicaciones más graves en la FQ. En las glándulas túbulo-acinares del páncreas, el aumento en la viscosidad de las secreciones determina la obstrucción ductal y secundariamente atrofia de las células acinares. En las vías respiratorias, la disfunción en el transporte de electrolitos conduce a la producción de una secreción espesa. La mejor fluidez de la capa de mucus altera el mecanismo de barrido mucociliar originando obstrucciones e infecciones secundarias. En las glándulas sudoríparas se ha demostrado que los ductos reabsorben menos sal desde las secreciones de los ductos espirales, lo que produce un sudor con un elevado contenido de electrolitos (Na^+ y Cl^-), característica que constituye la base para el diagnóstico de laboratorio (Gibson y Cooke, 1959).

En busca de las bases fisiológicas de la enfermedad

Las primeras evidencias de que la alteración básica de la enfermedad residía en alteraciones relacionadas con el transporte de iones, provinieron de estudios (Knowles, *et al.*, 1981), en los que se encontró que la diferencia de potencial transepitelial en las vías respiratorias estaba aumentada en pacientes con FQ. Un avance importante hacia la determinación de las bases moleculares de la enfermedad la proporcionaron los trabajos de Quinton (1983) en ductos de glándulas sudoríparas perfundidos. Quinton encontró que perfundiendo los ductos con NaCl 150 mM simétrico, el potencial a través de la membrana apical era muy negativo (−77 mV) en la cara luminal en células con FQ comparado con el de células normales (−7 mV). Por otra parte, al perfundir los ductos en Na_2SO_4 el potencial apical se hacía igualmente negativo en las glándulas control como en las

FQ. Posteriormente, Widdicombe *et al.* (1985) observaron una disminución de la permeabilidad de la membrana apical al Cl^- en monocapas de células en cultivo de epitelio traqueal provenientes de pacientes con FQ.

Estos resultados fueron atribuidos a una impermeabilidad al Cl^- y no a un aumento a la permeabilidad al Na^+, como se había sugerido previamente.

El desarrollo de métodos electrofisiológicos que permiten el registro de las corrientes a través de los canales individuales tales como la técnica de "patch-clamp" o registro de zona (Hamill *et al.*, 1981) y la reconstitución de canales en bicapas lipídicas planas (Miller *et al.*, 1976), produjo un gran impulso en la investigación de los mecanismos de transporte iónico en células epiteliales. Estos estudios han demostrado que en los epitelios secretores existe una segregación de canales, transportadores y bombas iónicas entre las membranas apical y basolateral.

El modelo, actualmente aceptado para el transporte de cloruro en las células de epitelios secretores como el respiratorio, es el siguiente: el Cl^- ingresa a través de la membrana basolateral vía cotransportadores electroneutros junto a Na^+ y K^+ ($Na^+/K^+/2Cl^-$). Estos cotransportadores utilizan la energía de la gradiente electroquímica del Na^+ para acumular Cl^- por sobre su potencial de equilibrio. Posteriormente, el Cl^- abandona pasivamente la célula a través de Canales selectivos a Cl^- localizados en la membrana apical (Fig. 1). La gradiente de Na^+ que impulsa la acumulación de Cl^- es mantenida por la actividad de bombas de Na^+ ($Na^+ - K^+$ – ATPasas) ubicadas en la membrana basolateral. La membrana basolateral contiene, además, canales selectivos a K^+, activados por Ca^{+2} que reciclan este ion.

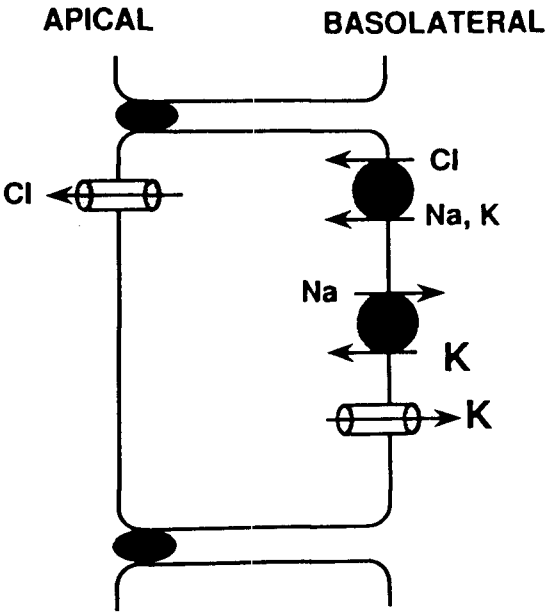
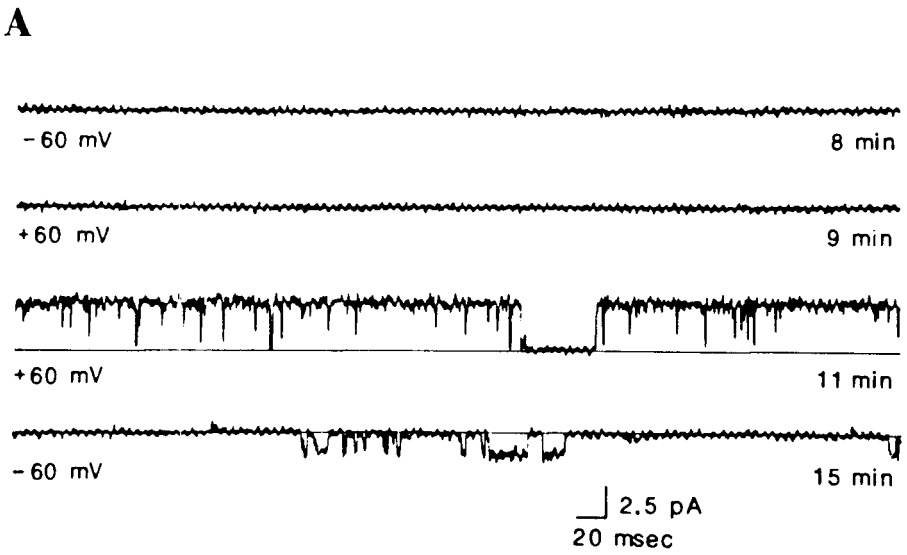


Fig. 1: La figura 1 muestra un modelo que describe diferentes sistemas de transporte presentes en células epiteliales secretoras. En la membrana basolateral se encuentran cotransportadores de $Cl^-/Na^+/K^+$, bombas de Na^+-K^+ y canales selectivos a K^+, activados por Ca^{2+}. En la membrana apical se encuentran canales selectivos a Cl^-. El Cl^- entra a la célula por los cotransportadores acumulándose en el interior. La bomba de Na^+-K^+ mantiene la gradiente electroquímica de estos iones, expulsando Na^+ y reacumulando K^+. Cuando los canales de Cl^- son activados por la acción de hormonas o neurotransmisores, el Cl^- sale por ellos, haciéndose el lumen electronegativo respecto de la célula y el espacio intersticial. Al mismo tiempo se activan canales de K^+ basolaterales. Esto hace que los iones Na^+ difundan por la vía paracelular a través de las uniones estrechas al lumen. El resultado neto es el transporte transcelular de NaCl y agua.

Canales de Cl^- de la membrana apical de epitelios secretores

La identificación y caracterización de los canales de Cl^- de las membranas apicales ha sido posible gracias a diversas técnicas como estudios electrofisiológicos en epitelios montados en cámaras de Ussing (Boucher *et al.*, 1981), medición de flujos isotópicos en células epiteliales en cultivo (Wolff *et al.*, 1989) y recientemente el uso de la técnica de "patch-clamp", que ha permitido examinar directamente las corrientes a través de canales individuales en cultivos primarios de epitelios secretores como tráquea y páncreas (Shoemaker *et al.*, 1986; Welsh, 1986; Maruyama y Petersen, 1982).

Welsh (1986) y Shoemaker *et al.* (1986) han demostrado la presencia de un canal aniónico fuertemente rectificante en soluciones simétricas de Cl^- y poco dependiente del potencial eléctrico (Figs. 2A y 2B), con una conductancia de 50 pS a 0 mV. Este canal se activa con potenciales despolarizantes y tiene una selectividad aniónica



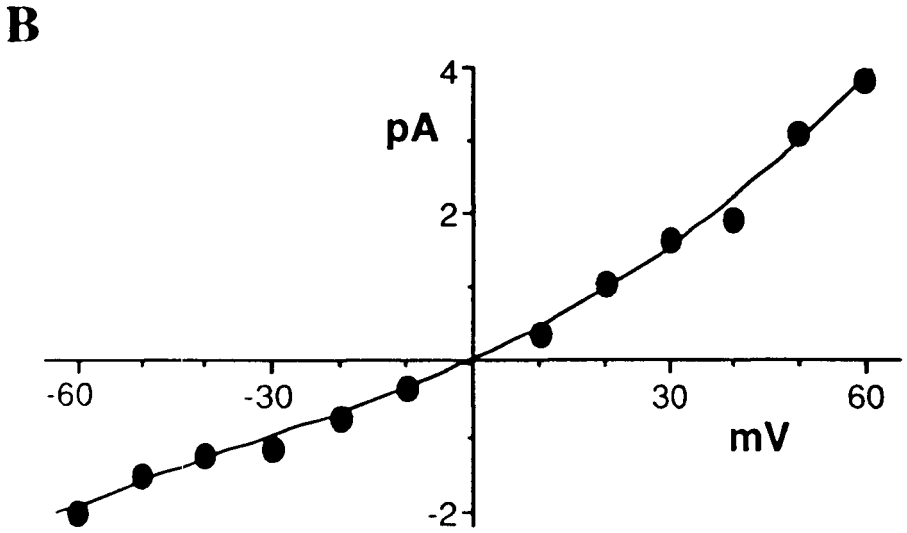


Figura 2A: Registro de la corriente obtenido con la técnica del "patch-clamp" a través de un canal de Cl^- de epitelio traqueal humano. El trazo superior muestra que el canal no se activa a potenciales hiperpolarizantes (−60 mV). A potenciales despolarizantes (+ 60 mV), el canal se activa luego de algunos minutos. El trazo inferior muestra que una vez activado el canal puede permanecer en este estado aún a potenciales hiperpolarizantes. (Tomado de Schoumacher *et al.*, 1987, con autorización).

Figura 2B: Relación corriente-potencial característica de un canal apical de 50 pS de conductancia, de epitelio traqueal humano. Los datos fueron obtenidos en un parche de membrana invertido ("inside-out"), en solución de NaCl 140 mM simétrico. Se puede observar que la relación es curvilínea, de modo que las corrientes hacia adentro (flujo de Cl^- desde el citoplasma hacia el exterior) son más pequeñas que las corrientes hacia afuera a los mismos valores absolutos de potencial.

cuya secuencia es $SCN^- > I^- > Cl^- = Br^- > F^-$. Este canal es bloqueado por análogos de ácidos carboxílicos como ácido antraceno-9-carboxílico (9-AC) y difenilamino-2-carboxilato (DPC).

En estudios previos, en parches de membrana que habían sido retirados de la célula ("excised-patch") se observaba frecuentemente que los canales permanecían inactivos hasta que la membrana se despolarizaba a

potenciales entre +80 y +140 mV (Li *et al.*, 1988). En contraste, cuando se hacían registros de corrientes totales de Cl^- en la célula completa ("whole-cell currents"), la despolarización no parecía activar canales de Cl^-. Por el contrario, la cinética en estado estable y no estable indica que la corriente de Cl^- fluye por canales que se abren por hiperpolarización y se cierran por despolarización.

Respecto de la regulación del canal de Cl^-, existen diversas evidencias que su activación en estos epitelios se realiza a través de una regulación β-adrenérgica. En estudios hechos en epitelios intactos y en cultivos de glándula sudorípara se demostró que agonistas β-adrenérgicos como el isoproterenol aumentaban la conductancia al Cl^- (Sato y Sato, 1984). Posteriormente, Widdicombe (1986) encontró una alteración en la respuesta β-adrenérgica en células en cultivo de epitelio respiratorio con FQ. Estos hallazgos han sido corroborados con la técnica de "patch-clamp" en la configuración ligado a célula ("cell-atached"), demostrándose que las catecolaminas activan canales de Cl^- de la membrana apical (Frizzell *et al.*, 1986).

La presencia de regulación β-adrenérgica implica que en la membrana basolateral existen receptores a los que se ligan catecolaminas o agonistas de ellas. El ligamen del neurotransmisor induce la interacción del receptor con una proteína G que activa una adenilato ciclasa. Esta enzima cataliza la formación de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), nucleótido que actúa como mensajero intracelular secundario. En diversas células los efectos biológicos del cAMP resultan de la activación por este nucleótido de una proteína quinasa A (PQA).

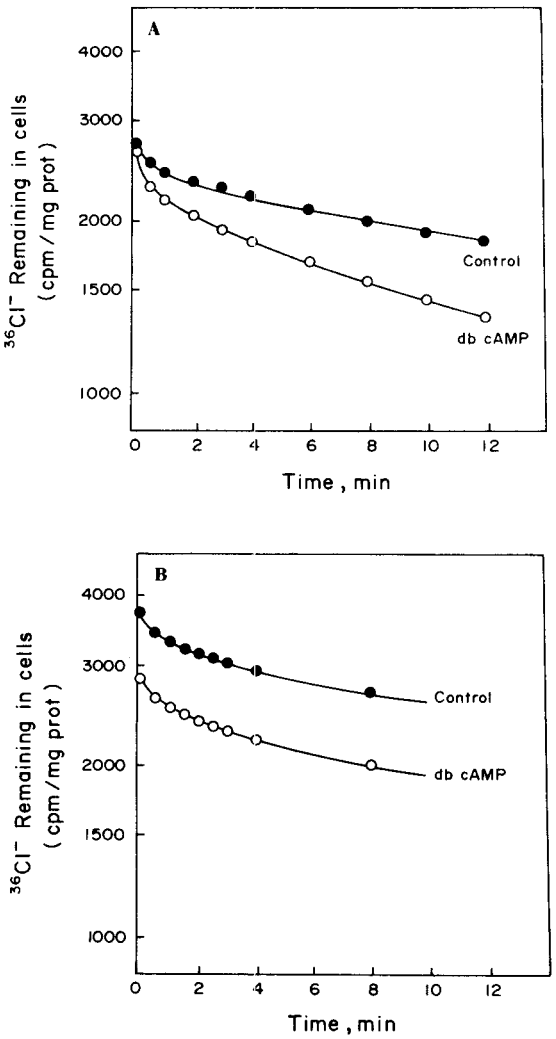


Fig. 3: Curso temporal de la salida de $^{36}Cl^-$ en células epiteliales en cultivo, en un medio con gluconato en ausencia de cloruro y en presencia de db-cAMP. La Figura 3A muestra la salida de $^{36}Cl^-$ en células normales y la 3B, la salida de $^{36}Cl^-$ en células FQ. Puede apreciarse que el db-cAMP estimula la salida de Cl^- en las normales pero no en las FQ. (Tomado de Wolff *et al.*, 1989, con autorización).

Alteración de los canales de Cl^- en la fibrosis quística

Las mediciones del flujo conductivo de salida de Cl^- usando $^{36}Cl^-$ en células de epitelio respiratorio en cultivo de líneas normales y con FQ mostraron que el aumento ya sea con dibutiril-cAMP (db-cAMP) o toxina del cólera no estimulaba el flujo de salida de Cl^-. Estos resultados indican una alteración en un sitio distal a la generación de cAMP en la cascada de reacciones que conducen a la activación de los canales de Cl^- en las células con FQ (Wolff *et al.*, 1989).

Cuando se estudiaron los canales de Cl^- en células de vías respiratorias en cultivo primario (Frizzell *et al.*, 1986) con la técnica del "patch-clamp" se observó que en la configuración de registro en la célula ("cell-attached"), agonistas β-adrenérgicos estimulaban la actividad de canales de Cl^-

en células normales, pero no en las FQ. El mismo resultado se obtenía si se agregaba al medio db-cAMP.

En estudios posteriores realizados por los grupos de Frizzell (Shoumacher *et al.*, 1987) y Welsh (Li *et al.*, 1988) se localizó el defecto en la membrana apical, exponiendo la superficie citoplasmática de parches de membrana retirados de la célula a la subunidad catalítica de la PQA. La activación por la subunidad catalítica se observó en parches de células epiteliales normales pero no en aquellos provenientes de células FQ, a pesar de que se demostró la presencia de canales de Cl^- en tales parches por activación con potenciales despolarizantes. (Fig. 4). Estos estudios demostraron que la alteración en las células FQ es distal a la indución de la activación de la PQA por el cAMP. Es probable que el mismo canal de Cl^- o una proteína reguladora asociada a éste deba ser fosforilada para activar el canal. En el caso de las células FQ esta proteína podría estar alterada.

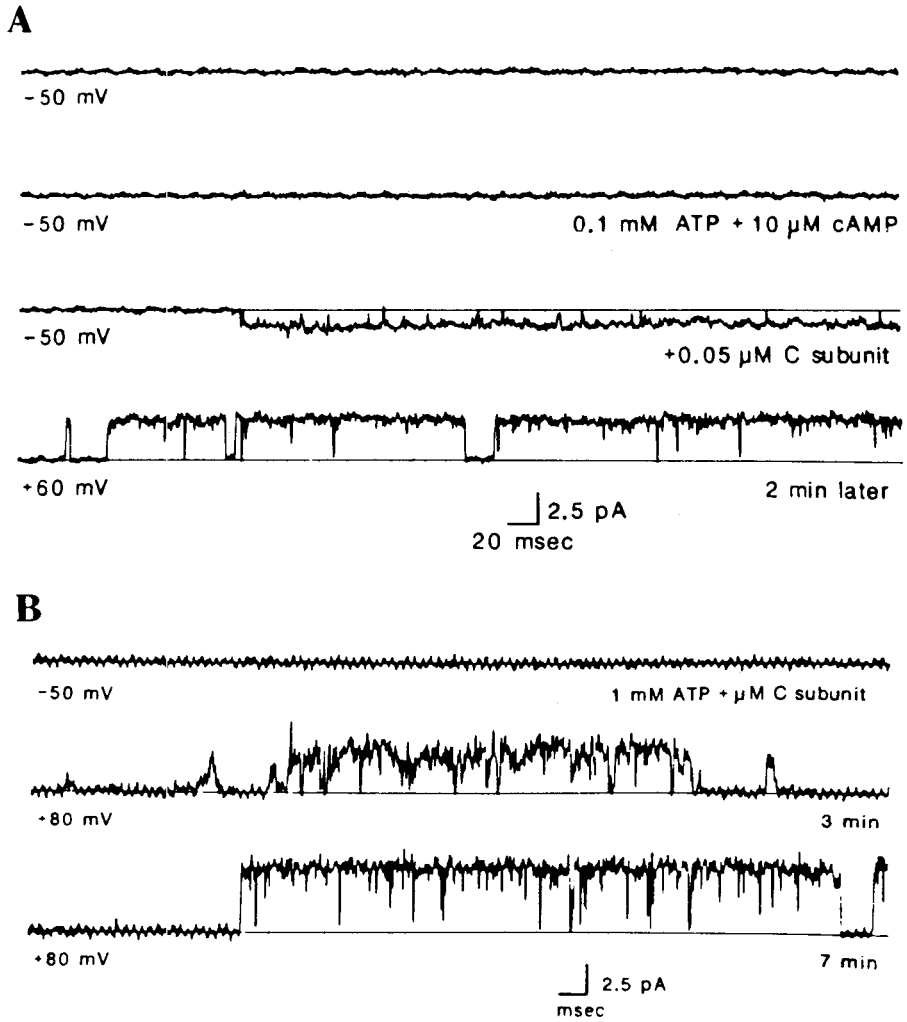


Fig. 4: Acción de la subunidad catalítica de la PQA en la activación de canales de Cl^- en un parche de membrana de epitelio respiratorio.

Figura 4A: Curso temporal de la activación de un canal de Cl^- de epitelio normal. El canal permanece cerrado a potenciales hiperpolarizantes (–50 mV), pero se activa al agregar la subunidad catalítica de la PQA, en presencia de ATP 0.1 mM y cAMP 10 μM.

Figura 4B: En esta figura se muestra cómo un canal de Cl^- epitelial con FQ, no es posible activarlo al agregar la subunidad catalítica de la PQA. La presencia del canal en el parche se comprobó activándolo a potenciales despolarizantes (+80 mV). (Tomado de Schoumacher *et al.*, 1987, con autorización).

Se ha demostrado que la proteína quinasa C (PQC) también puede regular la actividad de canales iónicos en diversas células, como, por ejemplo, músculo liso vascular (Saigusa y Kokubun, 1988). En estudios realizados en epitelios de vías respiratorias se ha observado que la PQC actúa de una manera compleja sobre la secreción del Cl^- en epitelios de vías respiratorias, ya sea estimulando o inhibiendo según el estado fisiológico de las células (Hwang *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1989). Experimentos realizados utilizando la técnica de "patch-clamp" en parches de membrana aislados muestran un efecto dual de la PQC: a concentraciones bajas de Ca^{+2} (10 nM) en presencia de ATP, fosfatidilserina y dioctanoil glicerol, un éster de forbol, activa canales de Cl^- que alternan entre estados abierto y cerrado. En contraste, a concentraciones de Ca^{+2} elevadas (> 10 μM), la PQC inactiva canales de Cl^- e incluso previene su activación por la despolarización de la membrana (Li *et al.*, 1989).

En el caso de las células con FQ los canales de Cl^- no pueden ser activados por PQC ni PQA a bajas concentraciones de Ca^{+2}.

Estos hallazgos sugieren que ambas enzimas, PQA y PQC, regulan la activación de los canales de Cl^- en el mismo sitio de fosforilación. De acuerdo a un modelo presentado por Li *et al.* (1989), el Ca^{+2}, a concentraciones altas, podría afectar la conformación de la proteína-canal generando sitios accesibles a la PQC y cuya fosforilación induce la inactivación del canal. Otra posibilidad es que estos efectos sean causados por isoenzimas que fosforilan dos sitios diferentes, siendo la inactivante dependiente de Ca^{+2}, y la activante independiente de este ion.

Otros estudios realizados en células transformadas de páncreas humano, derivadas de una paciente con FQ, demuestran también la existencia de un canal aniónico, pero que se activa normalmente en respuesta a cambios en la tensión de la membrana ("stretch-activated") (Eguiguren *et al.*, 1990) y que podría corresponder al canal responsable de las corrientes osmóticamente inducidas en epitelio respiratorio (Welsh, 1989).

En busca de las bases genéticas de la enfermedad

Desde comienzos de la década de los ochenta se inicia la búsqueda sistemática del gen responsable de la FQ, abocándose a esta tarea un número importante de laboratorios. Como resultado de extensos análisis poblacionales es posible demostrar la hipótesis que la FQ se debe a una mutación o mutaciones en un gen único (Danks *et al.*, 1984; Romeo *et al.*, 1985). Prontamente fue posible demostrar un ligamiento entre FQ y un marcador, entonces no asignado, PON, el determinante genético para la actividad de la paraoxonasa sérica (Eidberg *et al.*, 1985).

Con el uso de marcadores del DNA definidos y mediante RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) (Botstein *et al.*, 1980) se descubrió un ligamiento entre FQ y D7S15, un marcador de DNA aleatoriamente aislado (Tsui *et al.*, 1985). Un paso fundamental fue dado al localizar este marcador del DNA al cromosoma 7 (Knowlton *et al.*, 1985). El establecimiento definitivo del gen de la FQ en el brazo q, banda 31, del cromosoma 7 quedó demostrado por el análisis de ligamiento de varios marcadores previamente conocidos y asignados a este cromosoma (White *et al.*, 1985; Wainwright *et al.*, 1985; Buchwald *et al.*, 1986).

La identificación de marcadores flanqueadores íntimamente ligados al gen FQ (MET y D7S8) hizo posible el uso de novedosas técnicas de clonamiento para identificar al gen de la FQ. En un esfuerzo colaborativo los grupos de Tsui, Collins y Riordan identifican el gen de la FQ (Riordan *et al.*, 1989; Kerem *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989). El gen comprende 250.000 pares de bases y aproximadamente el 70% de los casos de FQ se debe a una mutación que consiste en la deleción de tres nucleótidos que codifican para una fenilalanina en la posición 508 (F508) (Riordan *et al.*, 1989). El 30% de los casos restantes se debe a lo menos a 35 mutaciones diferentes, que incluyen, entre otras, la introducción de un codon de terminación en el exon 13 del gen en la posición 821 de la secuencia aminoacídica, lo cual predice un producto severamente

truncado y no funcional (White *et al.*, 1990).

Con el clonamiento del gen fue posible predecir la estructura de la proteína codificada, denominada CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), y cuya secuencia consta de 1.480 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 168.000 daltons. La característica fundamental de la proteína putativa es la presencia de dos segmentos repetidos, cada uno de los cuales contiene dominios capaces de atravesar la membrana varias veces y secuencias de consenso capaces de ligar ATP (NBF) (Fig. 5). Estas características son similares a la P-glicoproteína responsable de la resistencia a drogas (multidrug resistance protein, MDR), con la cual el CFTR posee una homología de un 60%. Estas características sugieren que el CFTR puede estar involucrado en el transporte de moléculas (iones) a través de la membrana y podría ser miembro de la superfamilia de proteínas de transporte que ligan ATP (Hyde *et al.*, 1990).

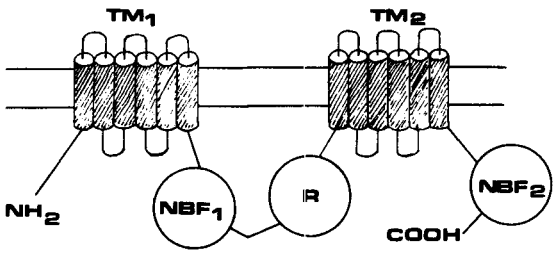


Fig. 5: Modelo esquemático del producto del gen de la FQ basado en el análisis de su secuencia. TM_1 y TM_2 corresponden a los segmentos de transmembrana, NBF_1 y NBF_2 a los dominios que unen nucleótidos y R al dominio único que posee los sitios de fosforilación. La mutación F508, responsable del 68% de los casos, ocurre en el dominio NBF_1. Las mutaciones que afectan los segmentos de transmembrana han sido descritas en el segmento TM_1.

A pesar de los enormes avances en la biología molecular del gen, la identificación del producto del CFTR ha sido hasta hoy esquiva. Tampoco ha sido fácil demostrar la función de la proteína codificada por el CFTR, aun cuando los resultados indican que muy probablemente está involucrada en el transporte de iones a través de la membrana plasmática.

Perspectivas terapéuticas.

La sobrevida de los pacientes afectados por la FQ ha aumentado en forma importante, debido especialmente a los adelantos experimentados en el desarrollo de nuevos antibióticos y a las técnicas generales de soporte.

Las perspectivas terapéuticas específicas futuras están basadas en la posibilidad de realizar maniobras de reemplazo o complementación genética en estos pacientes. Algunos reportes preliminares indican la factibilidad de expresar el CFTR en sistemas bacterianos e infectar mediante partículas retrovirales células epiteliales defectuosas, corrigiéndose el defecto (Drumm *et al.*, 1990; Gregory *et al.*, 1990). Tal aproximación no sólo es factible para la FQ, sino que para otras enfermedades genéticas. Aunque promisorios, estos estudios preliminares requieren de avances en el entendimiento de la función del CFTR y de la tecnología asociada para la transferencia genética a escala terapéutica.

REFERENCIAS

ANDERSEN, D. (1938) Cystic Fibrosis of the Pancreas an its relation to celiac disease. A clinical and pathological study. *Am. J. Dis. Child. 56:* 344-399.

BOUCHER, R.C.; STUTTS, M.J.; GATZY, J.T. (1981) Regional differences in bioelectric properties and ion flow in excised canine airways. *J. Appl. Physiol. 51:* 706-714.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment lenght polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet. 32:* 314-331.

BUCHWALD, M.; ZSIGA, M.; MARKIEWICZ, D. *et al.*, (1986) Linkage of cystic fibrosis to the proalfa2 (1) collagen gene, COL1A2, on chromosome 7. *Cytogenet. Cell. Genet. 41:* 234-239.

DANKS, D.M.; PHELAN, P.D.; CHAPMAN, C. (1984) Retraction: no evidence for more than one locus in cystic fibrosis. *Am. J. Hum. Genet. 36:* 1398-1402.

DRUMM, M.L.; POPE, H.A.; CLIFF, W.H.; ROMMENS, J.M.; MARVIN, S.A.; TSUI, L.-C.; COLLINS, F.S.; FRIZZELL, R.A.; WILSON, J.M. (1990) Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus mediated gene transport. *Cell. 62:* 1227-1233.

EGUIGUREN, A.L.; HIDALGO, J.; CAVIEDES, R.; STUTZIN, A. (1990) A stretch-activated (SA) anion selective channel in immortalized human pancreatic CF cells. *Pediatric Pulmonology* (Supp. 5) 214a.

EIDBERG, H.; SCHMIEGELOW, K.; TSUI, L.-C.; BUCHWALD, M., *et al.*, (1985) Cystic fibrosis, linkage with PON. *Cytogenet. Cell. Genet. 40:* 623.

FRIZZELL, R.A.; RECHKEMMER, G.; SHOEMAKER, R.L. (1986) Altered regulation of airway epithelial cell chloride channels in cystic fibrosis. *Science 233:* 558-560.

GIBSON, L.; COOKE, R. (1959) A test for concentration of electrolites in Cystic Fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine iontophoresis. *Pediatrics 23:* 545-552.

GREGORY, R.J.; CHENG, H.S.; RICH, D.P.; MARSHALL, J.; PAUL, S.; HEIR, K.; OSTEDGAARD, L.; KLINGER, K.W.; WELSH, M.J.; SMITH, A.E. (1990) Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature 347:* 382-386.

HAMILL, O.P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B.; SIGWORTH, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch. 391:* 85-100.

HWANG, T.; LU, L.; ZEITLIN, P.L.; GRUENERT, D.C.; HUGANIR, R.; GUGGINO, W.B. (1989) Cl^- channels in CF: lack of activation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science 244:* 1351-1353.

HYDE, S.C.; EMSLEY, P. *et al.,* (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance protein and bacterial transport. *Nature 346:* 362-365.

KEREM, B.-S.; ROMMENS, J.M.; BUCHANAN, J.A.; MARKIEWICZ, D.; COX, T.K.; CHAKRAVARTI, A.; BUCHWALD, M.; TSIU, L.-C. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science 245:* 1073-1080.

KNOWLES, M.R.; GATZY, J.T.; BOUCHER, R.C. (1981) Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J. Clin. Invest. 71:* 1410-1417.

KNOWLTON, R.G.; COHEN-HAGUENAUER, O.; NGUYEN, V.C.; FREZAL, J.; BROWN, V.; BARKER, D.; BRAMAN, J.C.; SCHUMM, J.W.; TSUI, L.-C., BUCHWALD, M.; DONIS-KELLER, H. (1985) A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature 318:* 380-382.

LI, M.; McCANN, J.D.; LIEDTKE, C.M.; NAIRN, A.C.; GREENGARD, P.; WELSH, M. (1988) Cyclic AMP-dependent protein kinase opens chloride channels in normal but not in cystic fibrosis airway epithelium. *Nature 331:* 358-360.

LI, M.; McCANN, J.D.; ANDERSON, M.P.; CLANCY, J.P.; LIEDTKE, C.M.; NAIRN, A.C.; GREENGARD, P.; WELSH, M.J. (1989) Regulation of chloride channels by protein kinase C in normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Science 244:* 1353-1356.

MARUYAMA, Y. and PETERSEN, O.H. (1982) Single-channel currents in isolated patches of plasma membranes from basal surface of pancreatic acini. *Nature 299:* 159-161.

McCANN, J.D. and WELSH, M.J. (1990) Regulation of Cl^- and K^+ channel in airway epithelium. *Annu. Rev. Physiol. 52:* 115-1135.

McCANN, J.D.; LI, M.; WELSH, M.J. (1989) Identification and regulation of whole-cell chloride currents in airway epithelium. *J. Gen. Physiol. 94:* 1015-1036.

MING, L.; McCANN, J.D.; ANDERSON, M.P.; CLANCY, J.P.; LIEDKE, C.M.; NAIRN, A.C.; GREENGARD, P.; WELSH, M.J. (1989) Regulation of chloride channels by protein kinase C in normal and cystic fibrosis epithelia. *Science 244:* 1353-1356.

QUINTON, P.M. (1984) Missing Cl^- conductance in cystic fibrosis. *Am. J. Physiol. 251:* C649-C652.

RIORDAN, J.R.; ROMMENS, J.M.; KEREM, B.S.; ALON, N.; ROZMAHEL, R.; GRZELCZAK, Z.; ZIELINSKI, J.; LOK, S.; PLAVSIC, N.; CHOU, J.-L.; DRUMM, M.L.; IANNUZZI, M.C.; COLLINS, F.S.; TSUI, L.-C. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science 245:* 1066-1073.

ROMEO, G.; BIANCO, M.; DEVOTO, M.; MENOZZI, P.; MASTELLA, G.; GIUNTA, A.M.; MICALIZZI, C.; ANTONELLI, M.; BATTISTINI, A.; SANTAMARIA, F.; CASTELLO, D.; MARIANELLI, A.; MARCHI, A.G.; MANCA, A.; MAINO, A. (1985) Incidence in Italy, genetic heterogeneity, and segregation analysis of cystic fibrosis. *Am. J. Hum. Genet. 37:* 338-349.

ROMMENS, J.M.; IANNUZZI, M.C.; KEREM, B.S.; DRUMM, M.L.; MELMER, G.; DEAN, M.; ROZMAHEL, R.; COLE, J.L.; KENNEDY, D.; HIDAKA, N.; ZSIGA, M.; BUCHWALD, M.; RIORDAN, J.R.; TSUI, L.-C.; COLLINS, F.S. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science 245:* 1059-1065.

SAIGUSA, A.; KOKUBUN, S. (1988) Protein kinase C may regulate resting anion conductance in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm. 155:* 882-889.

SATO, K. and SATO, F. (1984) Defective beta adrenergic response of cystic fibrosis sweat glands in vivo and in vitro. *J. Clin. Invest. 73:* 1763-1771.

SHOEMAKER, R.L.; FRIZZELL, R.A.; DWYER, T.M.; FARLEY, J.M. (1986) Single chloride channel currents from canine tracheal epithelial cells. *Biochem Biophys. Acta 858:* 235-242.

SHOUMACHER, R.A.; SHOEMAKER, R.L.; HALM, D. R.; TALLANT, E.A.; WALLACE, R.W.; FRIZZELL, R.A. (1987) Phosphorylation fails to activate chloride channels from cystic fibrosis airway cells. *Nature 330:* 752-754.

TSIU, L.-C.; ZSIGA, M.; KENNEDY, D.; PLAVSIC, N.; MARKIEWICZ, D.; BUCHWALD, M. (1985) Cystic fibrosis: progress in mapping the disease locus using polymorphic DNA markers. I. *Cytogenet. Cell. Genet. 29:* 299-301.

WAINWRIGHT, B.J.; SCAMBLER, P.J.; SCHMIDTKE, J.; WATSON, E.A.; LAW, H.-Y.; FARRAL, M.; COOKE, H.J.; EIBERG, H.; WILLIAMSON, R. (1985) Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature 318:* 384-385.

WELSH, M.J. (1986) An apical-membrane chloride channel in human tracheal epithelium. *Science 232:* 1648-1650.

WIDDICOMBE, J.H.; WELSH, M.J.; FINKBEINER, W.E. (1985) Cystic fibrosis decreases the apical membrane chloride permeability of monolayers cultured from cells of tracheal epithelium. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 82:* 6167-6171.

WIDDICOMBE, J.H. (1986) Cystic fibrosis and beta-adrenergic response of airway epithelial cell cultures. *Am. J. Physiol. 251:* R818-R822.

WHITE, R.; WOODWARD, S.; LEPPERT, M.; O'CONNELL, P.; NAKAMURA, Y.; HOFF, M.; HERBST, J.; LALOUEL, J.-M.; DEAN, M.; VANDE WOUDE, G. (1985) A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature 318:* 382-384.

WHITE, M.B.; AMOS, J.; HSU, J.M.C.; GERRARD, B.; FINN, P.; DEAN, M. (1990) A frame-shift mutation in the cystic fibrosis gene. *Nature 344:* 665-667.

WOLFF, D.; CANESSA, M.; ROMERO, J.; KRUEGER, L. (1989) Immortalized cystic fibrosis airway retain a defective cAMP-stimulated Cl^- channel. *J. Gen. Physiol. 94:* 30a.