



Departamento de Genética Humana, Tel: (351) 217 519 380 / Fax: (351) 217 526 410

Proposta de Trabalho para uma Tese de Mestrado 2019/20

Novas vias envolvidas na regulação do transporte epitelial de cloreto

Local de trabalho: Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde (INSA) Doutor Ricardo Jorge, Lisboa

Orientadores: Doutores Paulo Matos (BioISI/INSA), Carlos M. Farinha (BioISI/FCUL) e Peter Jordan (BioISI/INSA)

Contacto: (paulo.matos@insa.min-saude.pt)

O transporte epitelial de cloreto é importante na regulação da homeostase eletrolítica e efetuado por canais como a CFTR, cuja mutação causa a doença genética Fibrose Quística (FQ). A mutação mais frequente em FQ, a F508del-CFTR, produz uma proteína mutante de conformação alterada que é maioritariamente retida no retículo endoplasmático e degradada proteoliticamente. Apenas uma pequena fração desta proteína chega a membrana plasmática onde apresenta uma eficácia de transporte de cloreto muito reduzida. Embora tenham já sido identificados fármacos que “resgatam” conformacionalmente a F508del-CFTR, aumentando a fração que chega à membrana plasmática, os benefícios da sua administração a doentes portadores da F508del-CFTR foram muito moderados. Uma das razões, desta ineficácia é a instabilidade da F508del-CFTR que chega à membrana por meio do resgate farmacológico. Ao contrário da CFTR selvagem a proteína resgatada é rapidamente internalizada e degradada, não sendo reciclada de novo para a superfície.

Resultados recentes do laboratório de acolhimento evidenciaram certos mecanismos celulares que poderão regular positivamente a estabilidade da F508del-CFTR resgatada na membrana plasmática. O objetivo principal deste projeto de Mestrado é de validar o efeito de 10 novas proteínas candidatas que foram recentemente identificadas pelo grupo através de uma abordagem proteómica.

Para isso, o(a) candidato(a) irá primeiro cultivar células epiteliais brônquicas humanas e otimizar a supressão da expressão endógena das 10 proteínas alvo pela técnica de interferência de RNA. Neste sentido, o candidato irá aplicar técnicas de transfeção celular, RT-PCR e Western blot. De seguida, o(a) candidato(a) irá investigar o efeito da supressão de cada uma destas proteínas nos níveis membranares de CFTR, recorrendo à técnica de microscopia confocal de fluorescência. Os efeitos mais promissores serão ainda confirmados pelas técnicas de biotilação de proteínas da superfície celular e ensaios funcionais de atividade de transporte iónico, mediado pela CFTR.

Os resultados irão contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos de estabilização membranar da F508del-CFTR e desta forma contribuir para desenvolver novas abordagens terapêuticas.

Bibliografia:

1: Matos AM, Gomes-Duarte A, Faria M, Barros P, Jordan P, Amaral MD, Matos P. Prolonged co-treatment with HGF sustains epithelial integrity and improves pharmacological rescue of Phe508del-CFTR. *Sci Rep.* 2018 Aug 29;8(1):13026. doi: 10.1038/s41598-018-31514-2.

2: Canato S, Santos JD, Carvalho AS, Aloria K, Amaral MD, Matthiesen R, Falcao AO, Farinha CM. Proteomic interaction profiling reveals KIFC1 as a factor involved in early targeting of F508del-CFTR to degradation. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Dec;75(24):4495-4509. doi: 10.1007/s00018-018-2896-7.

3: Farinha CM, Swiatecka-Urban A, Brautigan DL, Jordan P. Regulatory Crosstalk by Protein Kinases on CFTR Trafficking and Activity. *Front Chem.* 2016 Jan 20;4:1. doi: 10.3389/fchem.2016.00001. eCollection 2016. Review.

4: Farinha CM, Matos P. Repairing the basic defect in cystic fibrosis – one approach is not enough. *FEBS J.* 2016 Jan;283(2):246-64. doi: 10.1111/febs.13531.