

**ANALISIS EKSPRESI PROTEIN CFTR PADA MUTASI
MISSENSE *c.965T>C* (*p.Val322Ala* atau V322A)**

***ANALYSIS OF CFTR PROTEIN EXPRESSION
IN *c.965T>C* (*p.Val322Ala* or V322A) MISSENSE MUTATION***



TESIS

**Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat dalam menempuh
Program Pasca Sarjana Magister Ilmu Biomedik**

Konsentrasi Konseling Genetika

**Ariestya Indah Permata Sari
22010111400097**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2014**

TESIS

**ANALISIS EKSPRESI PROTEIN CFTR PADA MUTASI
*MISSENSE c.965T>C (p.Val322Ala atau V322A)***

Disusun oleh
Ariestyia Indah Permata Sari, MD
22010111400097

Telah dipertahankan di depan tim penguji
pada tanggal 28 Februari 2014
dan telah disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Pembimbing,

Farmaditya EP Mundhofir, MD, PhD
NIP. 19810425 200812 1 002

Prof. Sultana MH Faradz, MD, PhD
NIP. 19520202 197901 2 001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Prof. Dr. dr. Tri Nur Kristina, DMM, M.Kes
NIP. 19590527 1986603 2 001

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri, dan bahwa di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi atau lembaga pendidikan lainnya, serta tidak terdapat unsur-unsur yang tergolong Plagiarism sebagaimana yang dimaksud dalam Permendiknas No. 17 tahun 2010. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam penulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Februari 2014

Ariestyia Indah Permata Sari

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkat rahmat-Nya tesis ini dapat diselesaikan dengan baik. Tesis ini dapat terselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari banyak pihak. Saya ingin mengungkapkan rasa terima kasih saya yang terdalem kepada semua orang yang telah membantu dalam penyelesaian tesis ini. Terima kasih banyak kepada guru sekaligus pembimbing saya, Prof. Sultana MH Faradz, MD, PhD untuk bimbingan dan kesabaran beliau selama saya menjalani program master ini, dan juga untuk dukungan, perhatian, dan kepercayaan yang telah beliau berikan kepada saya sehingga saya berkesempatan memperoleh beasiswa *double degree* yang luar biasa dengan Universitas Poitiers, Perancis. Saya juga sangat berterima kasih kepada Farmaditya EP Mundhofir, MD, PhD selaku pembimbing tesis saya, untuk waktu dan bimbingan yang beliau berikan kepada saya dalam penulisan tesis ini.

Pada kesempatan ini saya juga ingin menyampaikan rasa terima kasih saya kepada Pr Gérard Mauco, PU-PH, penanggung jawab kami selama di Poitiers, Perancis, yang telah memberikan saya kesempatan yang baik untuk belajar di Universitas Poitiers sebagai mahasiswa Master 2 dalam Program *Biologie, Santé, Science du Médicament spécialité Recherche et Ingénierie en Biosanté, Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées*, Universitas Poitiers. Saya ucapkan terima kasih kepada Pr Alain Kitzis, PU-PH, karena telah bersedia menerima saya sebagai mahasiswa magang di laboratorium

beliau Laboratorium Genetika Molekuler Penyakit Langka, *Pôle Biologie Santé*, Poitiers.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dr Véronique Ladeveze atas keramahan dalam tim penelitian beliau, atas bimbingan dan kesabaran beliau selama periode magang saya. Terima kasih yang tak terhingga pula kepada Anne Cantereau atas bimbingannya dalam penggunaan mikroskop konfokal, kepada Raed Farhat atas petunjuk dan arahnya selama penelitian dan kepada Marie-Claude Pasquet atas kehangatan dan keramahannya dalam mendukung saya di laboratorium. Saya juga berterima kasih kepada Géraldine Puissesseau, Leila Bellion, dan Konstantin Masliantev untuk keramahan mereka, dan untuk momen-momen yang kami lalui bersama sebagai sesama mahasiswa magang. Terima kasih pula pada para staf dan teknisian di laboratorium *Equipe Emergente Génétique Moléculaire des Maladies Rares* untuk semua dukungan dan keramahannya.

Saya juga ingin mengungkapkan terima kasih saya yang setulus-tulusnya kepada Dr. dr. Tri Indah Winarni atas bimbingan, dukungan dan semangat beliau selama saya menempuh studi di program master ini. Tak lupa saya ucapkan terima kasih pula kepada semua staf *Division of Human Genetics of Center for Biomedical Research (CEBIOR)*, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia untuk asistensi dan bimbingan selama studi saya: Wiwik Lestari, Rita Indriati, Dwi Kustiani, Inthus Apriasa, Lusi Suwarsi, Evi Nurwulan. Terima kasih sedalam-dalamnya juga kepada Dina Ardiana, S. Sos sebagai staf Program Pasca Sarjana Ilmu Biomedik

Konsentrasi Konseling Genetika yang telah banyak meluangkan waktu dan membantu saya dalam mengurus masalah administrasi.

Studi ini dibiayai oleh Beasiswa Unggulan BPKLN Kementerian Pendidikan Nasional, Republik Indonesia. Terima kasih kepada Dr Abe Susanto dan semua staf Beasiswa Unggulan. Terima kasih kepada atase pendidikan dan staf kedutaan Indonesia di Perancis, atas bantuan dalam pengelolaan dan pencairan beasiswa saya sehingga dapat sampai kepada saya dengan cukup tepat waktu selama masa tinggal saya di Perancis.

Tak terkecuali saya ucapkan beribu terima kasih kepada semua sahabat-sahabat saya, mahasiswa-mahasiswa yang termasuk dalam Angkatan ke-6 Program Konseling Genetika ini, Almira Zada, An Nisaa Utami Tihnulat, Donny Nauphar, Gara Samara Brajadenta, Hesty Wahyuningsih, Isna Rahmia Fara, Stefani Harum Sari, Venty Muliana Sari, Ziske Maritska dan Zukhrofi Muzar. Terima kasih untuk segala pengalaman yang kalian bagikan, dukungan, semangat, dan kekuatan yang telah diberikan kepada saya sehingga dapat menyemangati saya dalam penyelesaian studi ini.

Akhirnya, saya sampaikan rasa terima kasih saya yang paling spesial dan terdalam kepada orang tua saya, Herman Supandi dan Dina Nurillah, S. Sos untuk cinta dan dukungan beliau yang tiada akhir kepada saya. Terima kasih pula pada adik saya Faizal Hernawan, SE dan seluruh keluarga saya. Saya pasti akan selalu menginginkan pulang dan rumah, tak peduli ke mana dan sejauh apa saya pergi belajar.

CURRICULUM VITAE

Personal Data

Name : Ariestya Indah Permata Sari
Sex : Female
Nationality : Indonesian
Place & Date of Birth : Jakarta, March 22th 1987
Last Degree : Medical Doctor
Address : Tytyan Indah Blok Z1/7, Bekasi, West Java, Indonesia 17133
Mobile Phone : +62 812 840 20 11
Email : ariestyaindahprmts@gmail.com

Education

1993 – 1999 Elementary School at SDN Harapan Jaya IV Bekasi
1999 – 2002 Junior High School at SLTP Negeri 5 Bekasi
2002 – 2005 High School at SMU Negeri 1 Bekasi
2005 – 2009 Faculty of Medicine, Diponegoro University (Bachelor Degree)
2009 – 2011 Faculty of Medicine, Diponegoro University (Medical Doctor)
2012 – present Post Graduate Program Diponegoro University, Master in Biomedical Science, Majoring in Genetic Counseling (double degree program with Poitiers University, France)

2012 – 2013 Master 2 BSSM – RIB (Biologie Santé, Science du Médicament –
Recherche et Ingénierie en Biosanté), Parcours PNBCM
(Physiologie, Neurosciences, Biologie Cellulaire et Moléculaire),
Poitiers University, France

Training, Seminars and Courses

- 2006 **Stem Cell Seminar: A Human Sparepart Engineering**
Faculty of Medicine Diponegoro University, Semarang, Indonesia
- 2006 **IVF Seminar: Bringing New Hope for A New Life**
Faculty of Medicine Diponegoro University, Semarang, Indonesia
- 2007 **National Paper and Poster Training**
Faculty of Medicine Trisakti University, Jakarta, Indonesia
- 2008 **SPSS Training 2008: Reach Your Professional Analytical Potency**
Faculty of Mathematics and Natural Sciences Diponegoro University,
Semarang, Indonesia
- 2008 **Scientific Fair 2008 Seminar: Nutrition, Behaviour, & Aging**
Faculty of Medicine Diponegoro University, Semarang, Indonesia
- 2008 **The 1st Jakarta Scientific and Journalistic Medical Student's Meeting**
Faculty of Medicine Indonesia University, Jakarta, Indonesia
- 2009 **National Students Science Week XXII**
Brawijaya University, Malang, Indonesia
- 2012 **10th Medical Genetic Course: From Basic to Clinic**

Faculty of Medicine Diponegoro University in collaboration with Department of Human Genetics, Radboud University Nijmegen Medical Center, The Netherland

2012 **Advance of Medical Genetic Course**

Faculty of Medicine Diponegoro University in collaboration with Department of Human Genetics, Radboud University Nijmegen Medical Center, The Netherland

2012 **Workshop on Neurogenetics**

Faculty of Medicine Diponegoro University, Semarang, Indonesia

2012 **Ciliary Dysfunction in Developmental Abnormalities And Diseases Symposium**

Faculty of Medicine Diponegoro University in collaboration with Department of Human Genetics, Radboud University Nijmegen Medical Center, The Netherland

2013 **Gap Junction in Neurodevelopment and Disease Seminar**

UFR Science Fondamentale et Appliquée Poitiers University, France

2013 **From Protein to Pathology: Skin Diseases, Cystic Fibrosis and Diabetes Symposium**

UFR Science Fondamentale et Appliquée Poitiers University, France

2013 **Neuropathologies Symposium**

UFR Science Fondamentale et Appliquée Poitiers University, France

2013 **Pharmacology and Physiopathological Mechanisms of Cancer & Heart Failure Symposium**

UFR Science Fondamentale et Appliquée Poitiers, France

2013 **Disruption of Vesicular Trafficking and Its Impact on Biological Processes Symposium**

UFR Science Fondamentale et Appliquée Poitiers, France

2013 ***Journée Microbiologie Poitevine*** (Poitevine Microbiology Day)

UFR Science Fondamentale et Appliquée Poitiers, France

Experiences

2007 – 2008 Department of Medical Physics, Faculty of Medicine, Diponegoro University, Semarang, Indonesia

Practical laboratory assistant

2011 – 2012 RB Bhakti Sejahtera Clinic, Semarang, Indonesia

GP

2013 Equipe Emergente Génétique Moléculaire des Maladies Rares, Pôle Biologie Santé, Poitiers University, France

Internship master student

DAFTAR ISI

JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
CURRICULUM VITAE	vii
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
GLOSARIUM	xxi
ABSTRAK (BAHASA INDONESIA)	xxiii
ABSTRACT (ENGLISH)	xxiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Pertanyaan Penelitian	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.5 Originalitas Penelitian	4

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Epidemiologi <i>Cystic Fibrosis</i> (CF)	6
2.2 CF vs CFTR-RD: Definisi dan Manifestasi Klinis	7
2.3 Gen <i>CFTR</i> dan protein CFTR	11
2.4 Mutasi-mutasi Gen <i>CFTR</i>	15
2.5 Penelitian Mutasi <i>CFTR</i> dan Perkembangan Strategi Terapeutiknya	17
2.6 Penelusuran Mutasi <i>Missense</i> V322A dengan <i>Software</i>	19
BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP	22
3.1 Kerangka Teori	22
3.2 Kerangka Konsep	23
BAB 4 METODE PENELITIAN	24
4.1 Aspek Penelitian	24
4.1.1 Ruang Lingkup Penelitian	24
4.1.2 Periode dan Tempat Penelitian	24
4.1.3 Desain Penelitian	24
4.2 Sampel	24
4.2.1 Plasmid	25
4.2.2 Bakteri	25
4.2.3 Sel-sel Eukariot	26

4.3	Analisis Ekspresi Protein CFTR pada Mutasi <i>Missense</i> V322A	27
4.3.1	<i>Site-directed Mutagenesis</i>	27
4.3.2	Transformasi Bakteri	29
4.3.3	Ekstraksi DNA Plasmid	31
4.3.4	Sekuensing	33
4.3.5	Kultur Sel	34
4.3.6	Identifikasi Lokasi	37
4.3.7	Western Blot.....	38
4.4	Analisis Data	40
4.5	Definisi Operasional.....	41
4.6	Alur Penelitian	41
4.7	Variabel Penelitian	42
4.8	Etik Penelitian	42
BAB 5 HASIL PENELITIAN		43
5.1	<i>Gel Electrophoresis</i> DNA Plasmid pada <i>Agarose gel 1,5%</i>	43
5.2	Verifikasi Mutasi V322A dengan Sekuensing.....	44
5.3	Identifikasi Lokasi Protein CFTR pada Mutasi V322A.....	45
5.4	Maturasi Protein CFTR pada Mutasi V322A	47
BAB 6 PEMBAHASAN.....		50
6.1	Mutasi <i>c.965T>C</i> (<i>p.Val322Ala</i> atau V322A).....	50

6.2	Ekspresi Protein CFTR V322A: Maturasi dan Identifikasi Lokasi	51
6.3	Residu Asam Amino pada Mutasi V322A dan Klasifikasi Mutasi V322A	52
6.4	Aspek Konseling Genetika	53
6.5	Perbandingan Analisis Ekspresi Protein dengan Prediksi Protein Menggunakan <i>Software</i> Prediksi Efek Mutasi	56
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....		58
7.1	Kesimpulan	58
7.2	Saran	58
RINGKASAN		59
SUMMARY (ENGLISH)		62
DAFTAR PUSTAKA.....		64
LAMPIRAN-LAMPIRAN		70

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Daftar penelitian sebelumnya mengenai mutasi V322A dan metode untuk menganalisis ekspresi protein CFTR	4
Tabel 2 Campuran reaksi PCR untuk <i>site-directed mutagenesis</i>	28
Tabel 3 Campuran reaksi PCR sekuensing untuk 20 tabung	33
Tabel 4 Perhitungan Bayesian untuk keturunan berikutnya.....	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Tes diagnosis pada CF klasik (tipikal).....	9
Gambar 2	Tes diagnosis pada CF atipik	10
Gambar 3	CFTR: Dari gen ke protein	12
Gambar 4	Immunodeteksi CFTR dengan Western blot	15
Gambar 5	Klasifikasi pada mutasi CFTR	17
Gambar 6	Konservasi residu asam amino valin posisi 322 pada berbagai spesies	20
Gambar 7	Modelisasi 3D dari struktur domain MSD 1 pada CFTR WT dan CFTR V322A	21
Gambar 8	Plasmid pTCF-WT	25
Gambar 9	<i>Primer</i> untuk PCR <i>site-directed mutagenesis</i>	29
Gambar 10	Pelat berisi 6 sumuran (<i>6 well plate seeding</i>) untuk transfeksi.....	36
Gambar 11	Keberadaan plasmid pTCF setelah <i>site-directed mutagenesis</i>	43
Gambar 12	Identifikasi produk PCR dari CFTR V322A pada <i>gel electrophoresis</i> untuk persiapan sekuensing	44
Gambar 13	Sekuensing hasil mutagenesis plasmid pTCF.....	45
Gambar 14	Identifikasi lokasi protein CFTR.....	46
Gambar 15	Hasil Western blot dari protein CFTR WT dan mutan	48
Gambar 16	Hasil Western blot protein CFTR (kecerahan dan kontras dinaikkan)	48
Gambar 17	Hasil Western blot protein Na ⁺ K ⁺ /ATPase (kecerahan dinaikkan)	48

Gambar 18 Grafik <i>box-plot</i> dari proporsi protein matur	49
Gambar 19 Letak mutasi V322A pada domain CFTR	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Contoh kalkulasi volume plasmid untuk transfeksi untuk <i>6 well plate</i> <i>seeding</i>	68
Lampiran 2	Contoh kalkulasi sel untuk persiapan transfeksi	69
Lampiran 3	Contoh kalkulasi konsentrasi protein CFTR untuk Western blot	70
Lampiran 4	Protokol persiapan media Luria Bertani (LB)	71
Lampiran 5	Protokol persiapan ampicillin	72
Lampiran 6	Keluaran analisis statistik dengan SPSS.16.....	73

DAFTAR SINGKATAN

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCC7	<i>ATP-Binding Cassette transporters sub-family C, member 7</i>
ATP	<i>Adenosine-5'-TriPhosphate</i>
BCA	<i>Bicinchoninique Acid</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cAMP	<i>Cyclic Adenosine Mono Phosphate</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribo Nucleic Acid</i>
CF	<i>Cystic fibrosis</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
CFTR-RD	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator-related diseases</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTP	<i>Desoxyribonucleotides</i>
DNA	<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney</i>
ICM	<i>Intestinal chloride measurement</i>
IRT	<i>Immunoreactive Trypsinogen</i>
Kb	<i>Kilo basepair</i>
LB	<i>Luria-Bertani</i>
mRNA	<i>messenger Ribo Nucleic Acid</i>
MSD	<i>Membrane Spanning Domain</i>
NBD	<i>Nucleotide Binding Domain</i>
NPD	<i>Nasal potential difference</i>
OD	<i>Optical Density</i>

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI	<i>Pancreatic Insufficiency</i>
PS	<i>Pancreatic Sufficiency</i>
R Domain	<i>Regulator Domain</i>
RNA	<i>Ribo Nucleic Acid</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth with Catabolite repression</i>
WT-CFTR	<i>Wild type CFTR</i>

GLOSARIUM

<i>Immunoreactive Trypsinogen</i>	Tes penapisan CF untuk bayi baru lahir yang dilakukan pada minggu pertama dan diulangi pada minggu ke 3-4 bila hasilnya meningkat.
<i>Intestinal Current Measurement</i>	Teknik yang digunakan untuk merekam tegangan sirkuit pendek transepitelial pada jaringan hasil biopsi rektal.
Lokalisasi protein	Penentuan lokasi dari suatu protein di dalam sel.
Maturasi protein	Proses pematangan suatu protein.
<i>Nasal Potential Difference</i>	Perbedaan potensial hidung, merupakan suatu tes untuk mengukur seberapa baik garam (NaCl) mengalir melewati membran mucus di hidung pada pasien yang dicurigai CF.
PCR	Proses amplifikasi daerah tertentu dari cetakan DNA (<i>template</i>) dengan bantuan enzim DNA polimerase, yang terdiri atas beberapa siklus (biasanya 20 hingga 40 siklus).
<i>Positional cloning</i>	Teknik yang digunakan untuk mengidentifikasi suatu gen atau area spesifik pada genome dengan hanya mengetahui posisinya di genom tanpa

mengetahui fungsinya, disebut juga dengan *reverse genetic*.

Sekuensing

Metode penentuan urutan basa nukleotida DNA.

Site-directed mutagenesis

Metode yang digunakan untuk membuat adanya mutasi secara sengaja pada suatu DNA dengan memanfaatkan reaksi PCR.

Studi lokalisasi protein

Studi tentang penentuan lokasi suatu protein yang terekspresi pada sel. Pada penelitian ini, teknik yang digunakan adalah *immunostaining* yang diamati di bawah mikroskop konfokal.

Studi maturasi protein

Studi tentang derajat maturasi (glikosilasi) dari suatu protein yang terekspresi pada sel. Pada penelitian ini, teknik yang digunakan adalah Western blot.

ANALISIS EKSPRESI PROTEIN CFTR PADA MUTASI *MISSENSE* *c.965T>C (p.Val322Ala atau V322A)*

Ariestya Indah Permata Sari

ABSTRAK

Latar Belakang: *Cystic fibrosis* (CF) atau fibrosis kistik adalah penyakit genetik autosomal resesif langka yang paling sering dijumpai pada populasi Kaukasia. CF dilatarbelakangi oleh mutasi gen *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (*CFTR*). Mutasi *missense* adalah mutasi yang terbanyak ditemukan. Mutasi *missense c.965T>C (p.Val322Ala atau V322A)* merupakan mutasi yang belum diketahui efeknya terhadap protein *CFTR*. Penelusuran prediksi protein dengan software Polyphen-2 dan SWISS Model menunjukkan hasil yang berbeda sehingga analisis ekspresi protein *CFTR V322A* penting dilakukan untuk melihat efek substitusi asam amino tersebut.

Metode: Penelitian eksperimental menggunakan plasmid *CFTR wild type* yang dimutagenesis untuk mendapatkan mutasi *V322A* dan ditransformasi ke bakteri *E. coli* *DH5 α* untuk mendapatkan plasmid dalam jumlah besar. Plasmid ditransfeksi ke dua macam galur sel: sel HeLa dan sel HEK293 agar dapat mengekspresikan protein. Analisis ekspresi protein *CFTR* dilakukan melalui tiga pendekatan: maturasi, identifikasi lokasi, dan tes aktivitas kanal *CFTR*. Studi maturasi protein dilakukan dengan Western blot sedangkan analisis lokalisasi protein dilakukan dengan imunofluoresen yang diamati dengan mikroskop konfokal.

Hasil: Analisis maturasi protein *CFTR* pada mutasi *V322A* menunjukkan derajat glikosilasi yang normal seperti pada protein *CFTR wild type*. Pencitraan fluoresen dari *CFTR V322A* menunjukkan lokalisasi protein yang normal di membran sel. Tes aktivitas kanal *CFTR V322A* yang belum selesai diperkirakan normal.

Kesimpulan: Protein *CFTR* dari mutasi *c.965T>C (p.Val322Ala atau V322A)* merupakan protein yang matur dan berlokasi di membran sel sehingga mutasi tersebut dapat dipertimbangkan sebagai variasi normal dari *CFTR*.

Kata Kunci: *Cystic fibrosis*; gen *CFTR*; kanal *CFTR*

ANALYSIS OF CFTR PROTEIN EXPRESSION IN A MISSENSE MUTATION *c.965T>C (p.Val322Ala or V322A)*

Ariestya Indah Permata Sari

ABSTRACT

Background: *Cystic fibrosis* (CF) is the most frequent rare autosomal recessive genetic disease in Caucasian population due to mutations in the *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (*CFTR*) gene. Among these mutations, missense mutations are the most common. The *c.965T>C (p.Val322Ala or V322A)* missense mutation has an unknown effect to *CFTR* protein. Protein prediction using Polyphen-2 and SWISS Model showed a discrepancy to each other, thus, analysis of V322A *CFTR* protein expression is crucial to study the amino acid substitution effect.

Methods: An experimental study used wild type *CFTR* plasmid which was mutated to obtain V322A mutation and then transformed into *E. coli* DH5 α to yield a large amount of plasmid. Plasmid was transfected into two cell lines: HeLa cells and HEK293 cells in order to express protein. Study of *CFTR* protein expression was conducted in three approaches: maturation, location identification, and *CFTR* channel activity test. Protein maturation analysis was performed by Western blot while localization analysis was conducted by immunofluorescence which was seen under confocal microscope.

Results: Study of *CFTR* protein maturation in V322A mutation showed normal glycosylation degree which is similar to the wild type. Immunofluorescence study revealed that V322A *CFTR* is normally localized on the cell membrane. *CFTR* channel activity test for V322A which is not yet accomplished is supposed to be normal as well.

Conclusion: *CFTR* protein of *c.965T>C (p.Val322Ala or V322A)* mutation is mature and located on the cell membrane, thus this mutation might be considered as normal variant of *CFTR*.

Key words: Cystic fibrosis, *CFTR* gene, *CFTR* channel