



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**Caracterización funcional y molecular del producto
del gen *GEF1* de *Saccharomyces cerevisiae***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A

ANGÉLICA MARÍA LÓPEZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES

Juriquilla, Querétaro, Septiembre del 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular II del Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México, Bajo la asesoría del Dr. Ataúlfo Martínez Torres. Este proyecto se realizó con el apoyo económico de CONACYT 44943Q y 125146, UNAM.PAPIIT IN208-003-2, 228205 y 204806 y UNAM-DGEP.



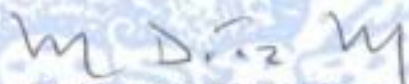
Dr. Antonio Peña Díaz Presente
Presente

Estimado Dr. Peña:

Por este conducto comunico a usted que en la Sesión del Subcomité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas en su pasada reunión No. 202 del día 13 de junio del año en curso, se acordó invitarlo a formar parte del jurado de Examen de Grado de Doctor de la Mtra. en Ciencias Angélica María López Rodríguez con el proyecto: "*Caracterización funcional y molecular del producto del gen GEF1 de saccharomyces cerevisiae*", cuyo tutor es el Dr. Ataúlfo Martínez Torres, asimismo se acordó que este Jurado queda constituido por los siguientes académicos:

Dr.	Antonio Peña Díaz	Presidente
Dr.	Ataúlfo Martínez Torres	Secretario
Dr.	Dr. Alfredo Varela Echavarría	Vocal
Dr.	Rogelio Arellano Ostoa	Vocal
Dr.	Salvador Uribe Carvajal	Vocal
Dr.	Alfonso Cárabez Trejo	Suplente
Dr.	Mauricio Díaz Muñoz	Suplente

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Campus Juriquilla UNAM, Querétaro a 02 de julio de 2007


Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Responsable del Programa de Doctorado

Agradecimientos:

Al Dr. Ataúlfo Martínez Torres. Por ser mi mejor elección, gracias por ser mi amigo y mi tutor.

Al Dr. Ricardo Miledi. Con toda mi admiración, gracias por confiar en mí, dejarme ser parte de su equipo y por su interés en mi presente y mi futuro.

Al Doctor Alfonso Cárabez Trejo. Por ser para mí como un libro abierto que no tuve que leer para aprender. Por despertar mi interés en la ultraestructura, por su confianza y amistad y por dejarme ser parte de su equipo.

A Leanne Coyne y Robert F. Halliwell. Por su amistad y colaboración en este proyecto.

A los Doctores: Roberto Coria y Mauricio Díaz, Rogelio Arellano y Carlos Saldaña. Por su gran interés en este proyecto y por sus valiosos comentarios que contribuyeron a que esta historia cada vez fuera más grande.

A Irma Alicia Martínez Dávila. Por todo el apoyo técnico, por todo su intento de mantener el orden en el laboratorio D15 y por ser mi gran amiga.

A Francisca Sandoval Zapata. Por el apoyo técnico en mi otro laboratorio: el A02, por escucharme, adoptarme y hacerme sentir parte de ese equipo.

A Efrén Ruíz Alcibar y Sergio Maya Noguez. Por todo el apoyo Técnico y por cada momento.

A Carmen Mejía Vázquez. Por su amistad y sus consejos.

A Leonor Casanova y Carmen Vázquez por todo su apoyo en los trámites académicos durante mi estancia en el INB (por ser como mis Hadas Madrinas).

A las unidades de Apoyo del Instituto de Neurobiología: Elsa Nydia Hernández (Microscopía Confocal), Anaid Antaramian (Biología Molecular), A Ma. Lourdes Palma Tirado (Microscopía Electrónica). Gracias por su interés en este trabajo.

A todos los que coincidimos en Querétaro: Alejandra, Abraham, Argel, Ariel, Bere, Carlos, Celina, Chelino, Efrén, Ernesto, Fernando, Flor, Gustavo, Irma, Joel, Lenin, Machuca, Miriam y Ulises. Gracias por hacerme sentir como en casa y por hacer que esta historia además de interesante fuera muy divertida.

A mis Padres: Angélica Rodríguez Roel y Mauro López Santillan y a mis Hermanos: Ramiro, Rosy, Ricardo, Reina, Romelia, Raquel, Rubén, Mauro, Ross, Rey, Rene y Rocio. Por ser todo mi soporte.

A la Familia Arato Peña. Por dejarme ser la hermana mayor.

A los amigos de siempre: Balbina, Carlos, Chuy, Humberto, Iram, Manuel, Mariza, Pepe y Ramón. Por compartir mis sueños y ser parte de mis mejores momentos.

A Ulises. Por mucho.

Dedicatoria

Para mí...
Porque es algo que siempre quise hacer.

INDICE	Página
I. Introducción.	1
1.1 Mecanismos de activación de los CICs.	2
1.2 El gen <i>GEF1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , un miembro de la familia CIC.	2
1.3 Estructura de los CIC.	5
1.3.1 Los canales CIC forman dos poros	5
1.3.2 Las subunidades son antiparalelas	5
1.4 El poro y el filtro de selectividad	7
1.5 Mecanismos de permeación iónica en los CIC.	9
1.6 El dominio citoplásmico. Regulación por unión a ligando.	10
II. Justificación	11
III. Hipótesis.	11
IV. Objetivos.	11
4.1 Objetivo general	11
4.2 Objetivos específicos	11
V. Material y Métodos.	12
5.1 Estrategia general	12
5.2 Material y métodos	14
5.2.1. Levaduras y medios.	14
5.2.2 Biología Molecular.	14
5.2.2.1 Diseño de los iniciadores.	15
5.2.2.2 Amplificación de <i>GEF1</i> por PCR.	15
5.3 Marcaje con SPQ y fluorometría.	16
5.4 Electrofisiología.	16
5.4.1 En ovocitos de <i>X. laevis</i> .	16
5.4.2 En células HEK-293.	17
5.5. Microscopía.	18
5.5.1 Microscopía confocal láser.	18
5.5.2 Microscopía Electrónica.	18
5.5.2.1 Para ultraestructura.	18
5.5.2.2 Para la inmuno-localización.	19
5.6. Consumo de Oxígeno	19
5.7 Marcaje de mitocondias y organelos	20
VI. Resultados.	20
6.1 El fenotipo <i>petite</i> .	20
6.2 Expresión Heteróloga.	21
6.2.1 Análisis funcional en ovocitos de <i>X. laevis</i> .	21
6.2.1 Análisis funcional en células HEK-293.	23
6.3 Efecto de los bloqueadores de canales de cloro sobre las levaduras.	25
6.4 Localización de Gef1p en <i>S. cerevisiae</i> .	28
6.5 Efecto de mutaciones puntuales sobre el fenotipo <i>pet</i> de <i>GEF1</i> .	30
6.5.1 Efecto de las mutantes puntuales sobre el consumo de oxígeno.	33
6.5.2 Análisis de las substituciones en F468.	34
6.5.3 Ultra estructura de las levaduras expresando las mutantes puntuales F468.	35
6.5.4 Ultra estructura de <i>GEF1</i> .	36
VII. Discusión.	36
VIII. Conclusiones.	44
Referencias	45
Lista de Figuras	50
Lista de Tablas	50
Apéndice I Medios de cultivo	51
Apéndice II Oligonucleótidos	52
Apéndice III Mutantes puntuales	53

Abstract

In the yeast *S. cerevisiae* the gene *GEF1* encodes for a protein regarded as a member of the voltage activated Cl⁻ channel family (CIC), a gene family associated with multiple physiological roles including maintenance of osmotic equilibrium, intracellular pH and membrane potential of plasma membranes. *X. laevis* oocytes and HEK-293 cells expressing the gene *GEF1* production of a protein (Gef1p) that conducts Cl⁻, the ion channel remained permanently open and was effectively and reversibly blocked by the Cl⁻ channel blocker, NPPB. Furthermore, the flow of Cl⁻ in the yeast was monitored by the emission of fluorescence by the halide indicator SPQ; in contrast to both a *GEF1* knock-out strain and yeast grown in the presence of NPPB, the wild type quenched the indicator at faster rates. We conclude that *GEF1* is at least partially responsible for the transport of Cl⁻ in the yeast and the channel remains permanently open.

Eleven substitutions in five residues forming the *Scen* site of *CIC* were introduced in Gef1p; some of them did not rescue the *petite* phenotype exhibited by a *GEF1* knock-out strain (S186A, I188N, Y459D, Y459F, Y459V, I467A, I467N and F468N), whereas F468A, A558F and A558Y gave rise to normal colonies. The *petite* phenotype exhibited by *GEF1* mutants showed reduced O₂ consumption, small mitochondria and disrupted organelles. Electron microscopy revealed that the plasma membrane of the mutants develops multiple foldings. Furthermore, the knock-out strain produces highly ordered cylindrical protein-membrane complexes. The nature and origin of these structures is being investigated.

Resumen

El gen *GEFI* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es miembro de la familia de Canales de Cloro Dependientes de Voltaje (CIC), una familia génica relacionada a diversas funciones fisiológicas como el mantenimiento del pH intracelular y del equilibrio osmótico, además de regular el potencial de membranas plasmáticas. La expresión de *GEFI* en ovocitos de *X. laevis* y células HEK-293 indujo la producción de una proteína (Gef1p) que conduce Cl⁻ de manera constitutiva y es inhibida por el bloqueador de canales de Cl⁻, NPPB. Alternativamente, el indicador fluorescente de aniones SPQ evidenció el flujo de Cl⁻ en la levadura; encontrando en la cepa silvestre mayor flujo de iones en comparación a la cepa mutante por delección del gen (*GEFI*) y a la cepa silvestre crecida en presencia de NPPB. Concluyendo que *GEFI* es al menos parcialmente responsable del transporte de Cl⁻ en la levadura, permitiendo el flujo constate de iones.

Se generaron once mutaciones en 5 residuos que forman el sitio de coordinación de Cl⁻ (S_{cen}) de Gef1p. Algunas mutantes (S186A, I188N, Y459D, Y459F, Y459V, I467A, I467N y F468N) no rescataron el fenotipo *petite* generado en la cepa *GEFI* mientras F468A, A558F y A558Y si revirtieron el fenotipo. Las cepas *pet* exhibieron una reducción en el consumo de O₂ y aberraciones en mitocondrias y organelos. Además observaciones al microscopio electrónico revelaron pliegues y/ó invaginaciones en la membrana plasmática de los mutantes, particularmente las levaduras *GEFI* producen estructuras cilíndricas formadas por complejos proteínas-membranas altamente organizados. La naturaleza y origen de estas aun no ha sido esclarecida.

Nomenclatura

2 μ	Origen de replicación del plásmido 2 μ para levaduras
9Ac	Acido 9 antraceno
Ampi ⁺	Gen de resistencia a ampicilina
Å	Angstrom
CIC	Canal de cloro
CMV	Promotor transcripcional de Citomegalovirus
cols.	Colaboradores
CUP	Promotor transcripcional de Metalotioneina inducible por cobre
CuSO ₄	Sulfato de cobre
DMSO	Dimetilsulfato
ECCIC-Fab	Complejo Fab unido al CIC de <i>E. Coli</i>
GEF	Glicerol, etanol, hierro
<i>GEF1</i>	Gen del canal de cloro (CIC) de <i>S. cerevisiae</i>
<i>GEF1</i>	Cepa knock-out de <i>GEF1</i>
Gef1p	Proteína CIC de <i>S. cerevisiae</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
h	Horas
HEK-293	Células de riñón humano
Kan ⁺	Gen de resistencia a kanamicina
M	Molar
min	Minutos
μ M	Micromolar
mM	Milimolar
MQAE	Bromuro de etoxycarbonylmetilo 6-methoxiquinolinio
mV	Milivoltios
nA	NanoAtomos
nm	Nanómetros
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pGAL	Promotor transcripcional inducible por galactosa
pH	Potencial de hidrógeno
RT-PCR	Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa
s	Segundos
SCN	Sulfocianuro
SPQ	6-methoxy-N-(3-sulfopropil)quinolinium

I. Introducción.

Los canales de cloro dependientes de voltaje (CIC) son miembros de una familia de proteínas que pueden encontrarse en una gran cantidad de organismos, desde bacterias hasta humanos. Mientras algunas bacterias como *Escherichia coli* tienen dos CIC, el genoma de otras bacterias como *Helicobacter pylori* carece de ellos, sugiriendo que no son estrictamente necesarios para la vida (Jentsch y cols., 2002; Maduke y cols., 2000). Las nueve isoformas de los CIC humanos (CIC-1-7, CIC-Ka y Kb) están involucradas en diversas funciones fisiológicas. Estos se expresan en la membrana plasmática ó en las membranas intracelulares de algunos organelos. En la membrana plasmática los CIC controlan el potencial en reposo del músculo (CIC-1) y de algunas neuronas (CIC-2); otros transportan NaCl en el riñón (CIC Ka y Kb) y en organelos los CIC participan en procesos de acidificación (CIC-3 - CIC-7) (Jentsch y cols., 2002, 2007). Su importancia es relevante en la práctica médica ya que algunas mutaciones en los CIC provocan miotonías, además de estar asociados a epilepsias, nefropatías y osteopetrosis (Jentsch y cols., 2002; Steward, 2003).

La investigación de los CIC es relativamente reciente. Hace 28 años se evidenció el primer CIC en registros electrofisiológicos de vesículas del órgano eléctrico de *Torpedo marmorata* (White y cols., 1979) y 13 años después se identificó a nivel molecular el primer DNAC que codifica para un CIC (Jentsch y cols., 1990). Por tanto, el papel de estas proteínas en la fisiología y fisiopatología está aún siendo analizado.

Los canales de cloro son proteínas selectivas a aniones que preferentemente conducen Cl^- ; también pueden conducir otros aniones como I^- , Br^- , NO_3^- , SCN^- , aunque con menor eficiencia (Fahlke, 2001). En células animales el transporte de Cl^- a través de estos canales es fisiológicamente relevante, además, en las plantas, los CIC probablemente también transportan NO_3^- (Barbier-Brygoo y cols. 2000). La selectividad iónica puede variar entre las diferentes isoformas y a la vez estar conservada en los miembros de la familia, incluyendo las de origen bacteriano (Maduke y cols., 1999; Accardi y cols., 2004).

1.1 Mecanismos de activación de los CICs.

A pesar de su alto grado de conservación, los miembros de la familia CIC son diversos en sus propiedades funcionales. El CIC-0 es el miembro más estudiado (Chen, 2005). Éste funciona como canal dependiente de voltaje, su “gating” presenta dos componentes, en el primero se observa una rápida apertura y los poros se cierran independientemente de manera individual; el segundo componente es más lento presentando “gating” común y se cierra de manera simultánea en ambos poros. A diferencia de los canales catiónicos dependientes de voltaje (Mackinnon, 2004); en el CIC-0 los iones permeantes pueden inducir la dependencia de voltaje; (Chen, 2005; Pusch y cols., 1995). El canal homólogo CIC-1 de músculo esquelético funciona de manera similar a CIC-0; éstos responden a potenciales de membrana hiperpolarizantes, mientras en CIC-5 la dependencia de voltaje parece inversa respondiendo a condiciones despolarizantes (Lindenthal y cols., 1997, Pusch y cols., 1999).

En contraste, el homólogo procarionta EcCIC no depende del voltaje. Esta proteína trabaja como un antiportador en el cual el flujo de Cl^- está acoplado al flujo de H^+ en la dirección opuesta. La proteína es por tanto capaz de bombear iones en contra de un gradiente; la fuerza conductora es proporcionada por el otro ion (Accardi y cols., 2004). Aunque se han descrito propiedades parecidas a canales en algunos transportadores o viceversa, las proteínas CIC son la primer familia donde canales y transportadores coexisten presentando una estructura muy similar y conservada (Gadsby, 2004).

Estudios recientes revelan que las proteínas eucariotas CIC-4 y CIC-5 se comportan también como cotransportadores, demostrando que la dualidad funcional, tanto como canal como cotransportador, no es exclusiva de procariontas (Picollo y Pusch, 2005; Scheel y cols., 2005).

1.2 El gen *GEF1* de *Saccharomyces cerevisiae*, un miembro de la familia CIC.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, durante el tamizaje en busca de genes implicados en un defecto en la respiración, se identificó un gen perteneciente a la familia de los CIC (ScCIC o Gef1p). Tal búsqueda evidenció dos genes *GEF1* y *GEF2* (Greene y cols., 1993).

GEF1 corresponde a un marco abierto de lectura que codifica para una proteína de 779 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 106 kDa; además se procesa proteolíticamente generando dos polipéptidos, uno de 30 kD y otro de 70 kD que corresponde al canal funcional (Watcher y Schwappach, 2005). La delección de este gen (cepas *GEF1*⁻) reduce el crecimiento de *S. cerevisiae* en fuentes de carbono no fermentables, induciendo el fenotipo *petite* (*pet*) (Greene y cols., 1993). Este fenotipo, a diferencia de las cepas *pet* tradicionales es condicional, ya que se suprime al crecer en un medio con altos niveles de hierro, lo que sugiere que Gef1p está involucrada en el metabolismo de este metal. El hierro juega un papel catalítico en muchas reacciones esenciales de óxido-reducción dentro de la célula, gracias a la capacidad de actuar como Fe (II) y Fe (III) (Dix y cols., 1994).

La vacuola es un sitio importante para almacenar hierro; allí se localiza el producto del gen *GEF2*: Una subunidad de la ATPasa H⁺ vacuolar, requerida para la acidificación. *GEF1* puede ser requerida también para la acidificación vacuolar ya que este proceso dependiente de ATP en membranas de vacuola es estimulado por Cl⁻ (Wada y cols., 1992; Raguzzi y cols., 1988; Nelson y Nelson, 1989; Umemoto y cols., 1990).

Un segundo sitio potencial de acción de Gef1p es la mitocondria; las levaduras *GEF1*⁻ presentan una reducción de aproximadamente 50% en el consumo de oxígeno (Green y cols., 1993). Durante el crecimiento aeróbico, el hierro es un componente del cofactor hemo de los citocromos y del grupo prostético de las proteínas no hemo, permitiendo el paso de los electrones generados por la oxidación de NADH y FADH₂ a través de la cadena transportadora de electrones hasta el aceptor final que es el oxígeno. En las mitocondrias ocurre el paso final de la biosíntesis del hemo, que se requiere para la síntesis de ácidos grasos insaturados y ergosterol, por lo tanto es necesario un eficiente metabolismo de hierro para el crecimiento celular (Rosenfeld y cols., 2003).

Por otra parte, las levaduras tienen canales de hierro de baja y alta afinidad. El cobre es componente clave en el sistema de salida de alta afinidad mediado por la enzima Fet3 oxidasa. El acoplamiento del cobre a la Fet3 oxidasa tiene lugar en las vesículas post Golgi y requiere de la ATPasa de cobre (Ccc2) (Askwith y Kaplan, 1998; Dancis, 1998). Numerosos organelos, incluyendo las vesículas cubiertas de clatrina, endosomas, lisosomas, vesículas sinápticas y membranas del complejo de

Golgi, tienen interiores ácidos. Esta acidificación está mediada por una ATPasa translocadora de protones y hay evidencias de un movimiento paralelo de Cl^- requerido para mantener la electroneutralidad (Wada y cols., 1992).

La homología de *GEF1* a la superfamilia CIC de los canales de Cl^- ha llevado a explorar la posibilidad de que Gef1p juegue un papel junto con Ccc2 en el transporte de cobre para activar la Fet3 oxidasa. El Cl^- parece tener un efecto alostérico para el ensamble de cobre por Fet3 (Davis-Kaplan y cols., 1998) sugiriendo una nueva función de los CIC aparte del transporte iónico. De manera interesante, el fenotipo *pet* también puede ser provocado por la disrupción de una subunidad de la ATPasa H^+ (Gaxiola y cols., 1998). Esto parece indicar que hay una interacción de los canales de Cl^- con la bomba de protones durante la acidificación de algunos organelos.

La importancia de Gef1p en la acidificación fue notoria al comparar las características de crecimiento de cepas normal (*WT*) y mutantes (*GEF1*) a pHs neutros y alcalinos (Gaxiola y cols., 1998; Schwappach y cols., 1998). Éstos indicaron que las cepas mutantes crecen en diversas sales, incluyendo altas concentraciones de MgCl_2 . La tolerancia a las sales también depende del intercambiador Na^+/H^+ que probablemente usa un gradiente de H^+ creado por la ATPasa de H^+ (en conjunto con Gef1p) para secuestrar Na^{2+} en los compartimentos intracelulares (Gaxiola y cols., 1999).

El fenotipo *petite* de las levaduras mutantes de *GEF1* (*GEF1*) es suprimido por la expresión del canal de cloro CIC-0 de *T. marmorata* y por el AtCIC-d de *Arabidopsis thaliana*. (Gaxiola y cols., 1998; Hechenberger y cols., 1996). AtCIC y otros CICs de plantas fueron aislados por homología a los canales CIC-6/-7 de mamíferos (Kida y cols., 2001). Esto sugiere que el CIC de las levaduras podría también funcionar como un canal de Cl^- en la membrana plasmática.

Aún no se ha comprobado que realmente Gef1p actúe a nivel de la membrana plasmática como un canal. Observaciones utilizando Cl^{36} sugieren que la levadura es virtualmente impermeable a este anión (Conway y Downey, 1950; Coury y cols., 1999). Sin embargo, la presencia de marcos abiertos de lectura como *GEF1* y el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ podrían indicar un medio de transporte para Cl^- a través de la membrana plasmática. Con el fin de precisar los dominios involucrados en la función de Gef1p, a continuación se describen algunas propiedades funcionales y

estructurales de la familia de los CICs. Se dará énfasis en la proteína EcCIC, ya cristalizada, y que se conoce con detalle su estructura; ésta se utilizó en este estudio para plantear una serie de experimentos que nos permitieron definir la función de Gef1p.

1.3 Estructura de los CIC.

De manera similar a los canales de potasio, la identificación de la estructura de los CIC se hizo a partir de los homólogos en *E. coli* (EcCIC) y *Salmonella typhimurium* (StCIC) (Maduke y cols., 1999). La primer información estructural en EcCIC se realizó mediante microscopía electrónica (Mindell y cols., 2001), y las primeras estructuras fueron resueltas por técnicas de cristalografía y rayos X (Dutzler y cols., 2002). A la fecha se han resuelto varias estructuras, incluyendo la estructura a 2.5 Å de resolución del complejo EcCIC-Fab (Dutzler y cols., 2002; 2003) y las diferentes estructuras observadas son muy similares.

1.3.1 Los canales CIC forman dos poros.

En la figura 1A y 1B se muestra la estructura de EcCIC (Dutzler y cols., 2002; 2003). EcCIC está formada por dos subunidades, asociadas en dos ejes de simetría perpendiculares a la membrana. Visto desde fuera de la célula (fig. 1A) el canal tendría la forma de un rombo con sus diagonales mayor y menor de 100 y 55 Å respectivamente. Los dos poros del dímero se indican por los iones unidos (fig. 1A). Cada poro se localiza en el centro de una subunidad, a una distancia de 39 Å. La mayor parte de EcCIC está embebida en la bicapa lipídica y solo el amino (N) y el carboxilo (C) terminal sobresalen en el citoplasma (fig. 1B). Con respecto a la estequiometría del poro, la estructura concuerda con los trabajos previamente reportados en CIC-0, en los que se había predicho que los CIC tenían una arquitectura de un doble barril (Miller, 1984).

1.3.2 Las subunidades son antiparalelas.

Cada subunidad está formada de 18 hélices α (A-R) (fig. 1C) (Dutzler y cols., 2002) de longitud variable; la hélice B es muy larga y aproximadamente inclinada 45° hacia la membrana (fig. 1B y 1C); otras son cortas y penetran la membrana sólo parcialmente.

Cada subunidad de EcCIC consta de dos dominios topológicamente relacionados, los cuales atraviesan la membrana en direcciones opuestas formando un arreglo conocido como “estructura antiparalela” (fig. 1C). Los dos dominios, a pesar de su similitud estructural muestran poca homología en su secuencia y forman un pseudo eje de simetría en el centro de la membrana (fig. 1D). Esta asociación capacita a las asas que se forman en el N-terminal (integradas por varias hélices α) a unirse para formar el filtro de selectividad para Cl^- (Dutzler y cols., 2002).

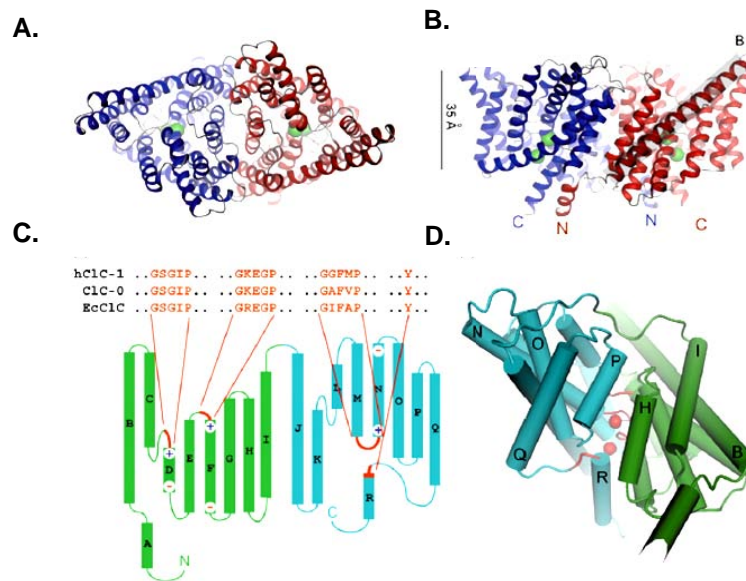


Figura 1. Estructura de EcCIC. **A.** Representación del dímero EcCIC desde el lado extracelular. Las dos subunidades se muestran en azul y rojo; los iones unidos al filtro de selectividad se observan en verde. **B.** Vista desde la membrana. La molécula está rotada 90° con respecto a (A). La línea vertical (35 Å) indica el grosor aproximado de la membrana. La hélice B, está aproximadamente 45° inclinada con respecto a la membrana se muestra con una sombra gris. **C.** Topología de la subunidad EcCIC. Las hélices α se muestran como cilindros (A-R) los dos dominios de la subunidad se muestran en verde y celeste. La ubicación de los residuos del filtro de selectividad están marcados en rojo y su alineamiento con otros CIC muestra su alto grado de conservación. **D.** Vista de la subunidad EcCIC desde la interfase del dímero a través de un pseudo eje de simetría. Los dos Cl^- unidos al filtro de selectividad se representan por esferas rojas, las hélices α por cilindros (Imagen tomada de Dutzler y cols., 2002).

Este tipo de estructura antiparalela también ha sido observado en acuaporinas, una familia de canales selectivos a agua (Murata y cols., 2000). Esta estructura transmembranal es similar para los miembros de la familia CIC (fig. 1C) (Dutzler y cols., 2002).

La principal diferencia entre los canales bacterianos y los CIC eucariotas es la presencia de un largo dominio intracelular en el extremo carboxilo terminal (llamados

dominios CBS) en la mayoría de los CIC eucariotas, y que a la vez está ausente en EcCIC y StCIC (Maduke y cols., 1998; Estevez y cols., 2002).

1.4 El poro y el filtro de selectividad.

El filtro de selectividad contiene algunos sitios de unión iónica; el poro de los CIC está localizado en la interfase entre los dos dominios en el centro de la subunidad triangular del CIC (Dutzler y cols., 2002; 2003) (fig. 1A,D). El poro tiene la forma de un reloj de arena, está conformado por dos vestíbulos acuosos uno intracelular y otro extracelular y una región más estrecha hacia el filtro de selectividad (fig. 2A). El filtro de selectividad es una región de aproximadamente 15 Å en relación al pseudo eje de simetría de la subunidad. Este contiene tres sitios de unión iónica (llamados S_{int} , S_{cen} , S_{ext}), en los que los iones Cl^- se alinean para formar un puente entre los dos vestíbulos del canal (Dutzler y cols., 2003) (fig. 2B y C). Los tres sitios de unión para Cl^- también permiten la unión de Br^- (Dutzler y cols., 2002; 2003).

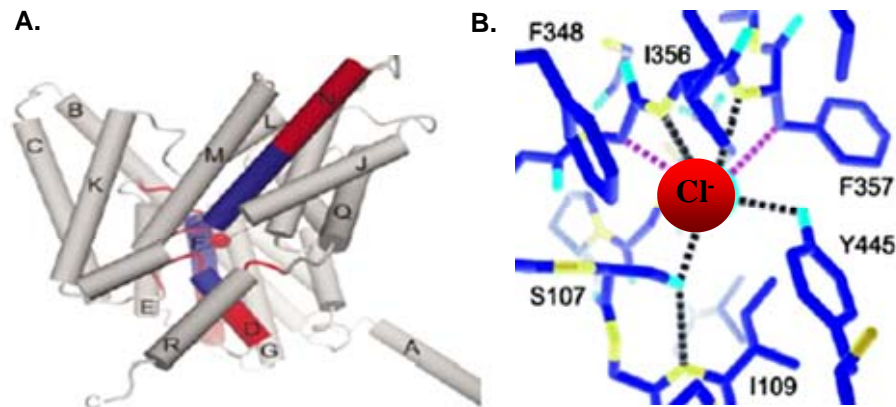


Figura 2. Estructura del poro de los CIC. **A.** Las cargas de las hélices delimitan la selectividad del poro. Las hélices α se representan como cilindros. En azul se muestra el grupo amino (cargados positivamente) y en rojo el grupo carboxilo (cargado negativamente) de las hélices D, F y N. Los residuos del filtro de selectividad son mostrados como lazos rojos rodeando el Cl^- (esfera roja). **B.** Aminoácidos más importantes en la formación del poro implicados en la selectividad aniónica (Imagen tomada de Dutzler y cols., 2002).

Estos tres sitios de unión están formados por residuos aminoacídicos de regiones altamente conservadas hacia el amino terminal de las hélices α : D, F, N y R (fig. 1C y 2A). En este rearrreglo, las cargas positivas al final de cada hélice actúan como dipolos estabilizando el posicionamiento de los iones mediante interacciones electrostáticas.

Dos de los tres sitios de unión están permanentemente ocupados por Cl^- en la estructura de EcCIC (Dutzler y cols., 2003) (fig. 2B). El Cl^- unido a S_{int} está localizado en la interfase entre el vestíbulo acuoso intracelular y el filtro de selectividad. Este ión está parcialmente desolvatado, pero hidratado donde queda expuesto al vestíbulo intracelular. Este Cl^- interactúa con los grupos amida del lazo que precede a la hélice α D y está rodeado de residuos con características hidrofóbicas (fig. 2B).

A una distancia de 6.5 Å del S_{int} hacia el lado extracelular se encuentra el otro sitio de unión para Cl^- , el sitio S_{cen} . En este sitio el Cl^- interactúa con residuos con cargas parcialmente positivas de los grupos amida y carboxilo del filtro de selectividad (fig. 1C y 2B). El Cl^- está coordinado principalmente por los átomos de nitrógeno de los grupos amino de los aminoácidos I356 y F357, por el oxígeno de S107 y Y445. Los átomos de nitrógeno no se incluyen en el puente de hidrógeno con la proteína y están disponibles para la interacción con el ión porque el nitrógeno de la hélice α empieza a exponerse justo en la posición 356, llevando al acoplamiento del átomo de nitrógeno del grupo amina para formar una cavidad a un lado del ión Cl^- (fig. 2B). El lado de la cadena que incluye S107 y Y445 interactúa con el Cl^- del lado opuesto al nitrógeno. El anillo aromático hace del grupo hidroxilo de Y un buen donador de protones y por tanto un excelente ligando del Cl^- . El grupo hidroxilo de S107 es un buen ligando porque cubre el final de la hélice α D. Esto por formar un puente de hidrógeno con el nitrógeno del grupo amina de I109 de manera que el hidroxilo de la serina está polarizado para interactuar de manera más fuerte con Cl^- . Además de los grupos funcionales polares, el ión Cl^- está rodeado por aminoácidos hidrofóbicos.

Es importante notar que el Cl^- no tiene contacto directo con las cargas positivas de lisina ó arginina de manera que el ambiente electrostático favorable surge de un ambiente con cargas parcialmente positivas que pudieran ser importantes para la rápida difusión de los iones (Dutzler y cols., 2002).

Cabe considerar que al contrario de los canales de potasio, los iones en S_{cen} y S_{int} no preservan su coordinación en agua cuando se unen a la proteína y además están parcialmente en contacto hidrofóbico con las residuos alifáticos (Dutzler y cols., 2003) (fig. 2A y 2B)

1.5 Mecanismos de permeación iónica en los ClC.

La estructura y propiedades de unión al Cl^- son similares en las proteínas ClC ya sean canales o transportadores, indicando que la estructura de EcClC es un buen modelo para estudiar los ClC eucariotas (Lobet y cols., 2006). Al mutar el Glutamato 148 en EcClC ó su homólogo en eucariotas, tanto los canales como los transportadores se convierten en conductores óhmicos que permiten el paso de iones Cl^- en ambas direcciones (Dutzler y cols., 2003; Accardi y cols., 2004; Picollo y cols., 2005; Yusef y cols., 2006). Los canales incluyendo esta mutación permanecen abiertos, mientras los transportadores pierden su habilidad para transportar H^+ , lo cual sugiere que este residuo es responsable del “gating” en los canales y participa en el transporte de protones en los transportadores (fig. 3A).

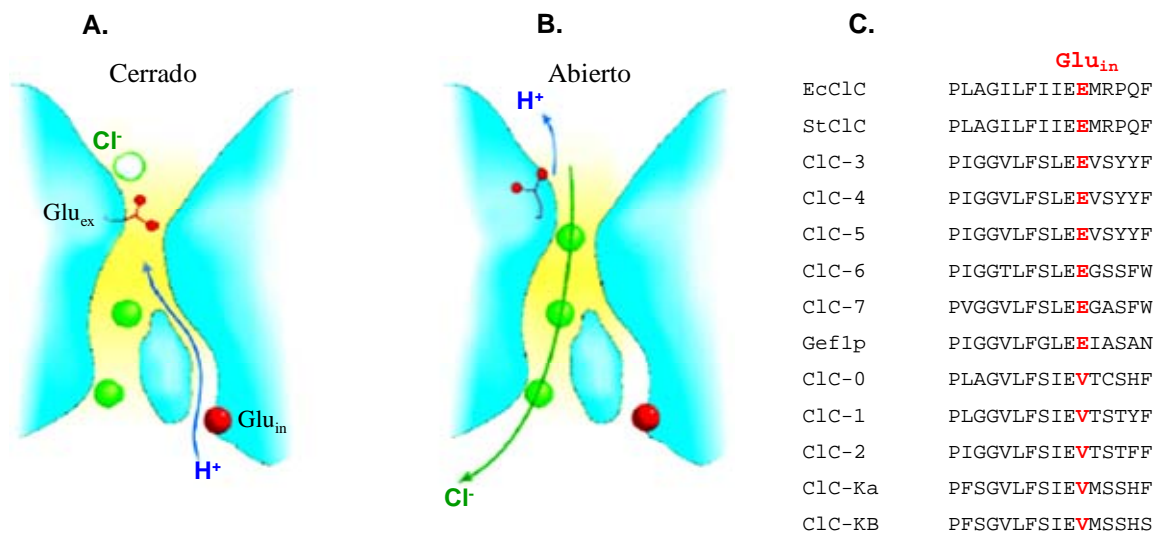


Figura 3. Modelo esquemático para el transporte de cloro en canales y transportadores. Diagrama de una subunidad de ClC mostrando el modelo de transporte. **A.** Estado cerrado, el Glu_{ex} (148) está desprotonado y bloqueando el poro. El Cl^- hipotéticamente se encuentra en el lado externo a Glu_{ex} permitiendo la transferencia intracelular de protones. **B.** Estado abierto, con el Glu_{ex} protonado, este sitio queda expuesto permitiendo el antiporte de Cl^-/H^+ . Los círculos rojos marcan la posición ocupada por Glu_{in} en los transportadores, este segundo Glutamato es siempre valina en los canales (C). (Gadsby y cols., 2004).

En contraste a los canales que tienen una sola compuerta, la cual regula el cierre y la apertura del poro de conducción, los transportadores se propone tienen dos compuertas, una en cada lado del poro, alternando estrictamente la apertura y el cierre previniendo la libre difusión del substrato (fig. 3B) (Gadsby y cols., 2004). Una propiedad que distingue los transportadores y los canales es la presencia de una vía específica para el protón que se acopla al flujo del anión. El glutamato exterior de EcClC (Glu_{ext} ó Glu148) es parte de esta vía; además se ha identificado un

glutamato en la parte intracelular (Glu_{in} ó Glu203) (Accardi y cols., 2005). Este glutamato es altamente conservado en los transportadores, pero está ausente en los canales (fig. 3C). Al mutar este residuo se inhibe el transporte de protones en EcCIC, pero retiene la activación de las corrientes de Cl^- ; esto no sucede con la mutación del Glu_{ext} .

1.6 El dominio citoplásmico. Regulación por unión a ligando.

Todos los miembros eucariotas de la familia CIC incluyen un dominio intracelular soluble hacia el carboxilo terminal seguido al dominio catalítico. La característica común de los dominios solubles es la presencia de dos subdominios conservados de la familia cistation β sintetasa (CBS) conectados por secuencias de unión y seguidos por secuencias de longitud variable hacia el carboxilo terminal. Aunque la función de estos dominios es poco entendida, se sugiere que podrían regular el “gating” común en CIC-0 y CIC-1 (Fong y cols., 1998). La presencia de dominios solubles se ha observado en otros canales y familias de transportadores donde dominios semejantes regulan la respuesta al ligando. Los dominios CBS en algunas cinasas unen nucleótidos y pueden detectar el estado energético de la célula (Scott y cols., 2004). Un mecanismo similar se propone para CIC-1, el cual cambia su probabilidad de apertura en respuesta a la unión de ATP (Bennetts y cols., 2005)

Otro caso de regulación por ligando ha sido reportado para CIC-7. Ostm1, una proteína de membrana de función desconocida forma un complejo con CIC-7, este complejo es requerido para la expresión de CIC-7 en lisosomas sugiriendo que Ostm1 podría funcionar como subunidad accesoria. (Lange y cols., 2006).

En este trabajo proponemos que Gef1p actúa como los miembros de la familia de los CIC, ya sea canal ó transportador de Cl^- , en la membrana plasmática. Además aprovechando que el knock-out de *GEF1* induce el fenotipo *pet*, y éste es revertido al expresar proteínas funcionales; podemos determinar el papel de los aminoácidos propuestos como importantes en la formación del poro en los CIC (Dutzler, 2002) analizando la inducción de este fenotipo.

II. Justificación.

Aunque la función de Gef1p en el transporte de Cl⁻ no ha sido esclarecida; la levadura *S. cerevisiae* ha sido utilizada como modelo para definir la función de algunas proteínas CIC ortólogas analizando su efecto sobre la reversión del fenotipo mutante.

Al evidenciar el transporte de Cl⁻ en la levadura a través de Gef1p, esto podría permitir analizar la relación entre la estructura previamente propuesta para proteínas procariotas (EcCIC y StCIC) y la función de los CIC en un sistema eucariota.

III. Hipótesis.

GEF1 es una proteína que conduce Cl⁻ a través de la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*.

IV. Objetivos.

4.1 Objetivo general.

Caracterizar funcional y molecularmente el producto del gen *GEF1* de *Saccharomyces cerevisiae* y analizar algunos de los residuos aminoacídicos importantes en la conformación del canal.

4.2 Objetivos específicos.

1. Expresar y caracterizar funcionalmente Gef1p en ovocitos de *X. laevis* y células HEK-293.
2. Definir la función y la localización de Gef1p en *S. cerevisiae*.
3. Analizar el efecto de la expresión de algunos mutantes del gen *GEF1* sobre la morfología de cepas *pet* (*GEF1*) de *S. cerevisiae*.

V. Material y Métodos.

5.1 Estrategia general.

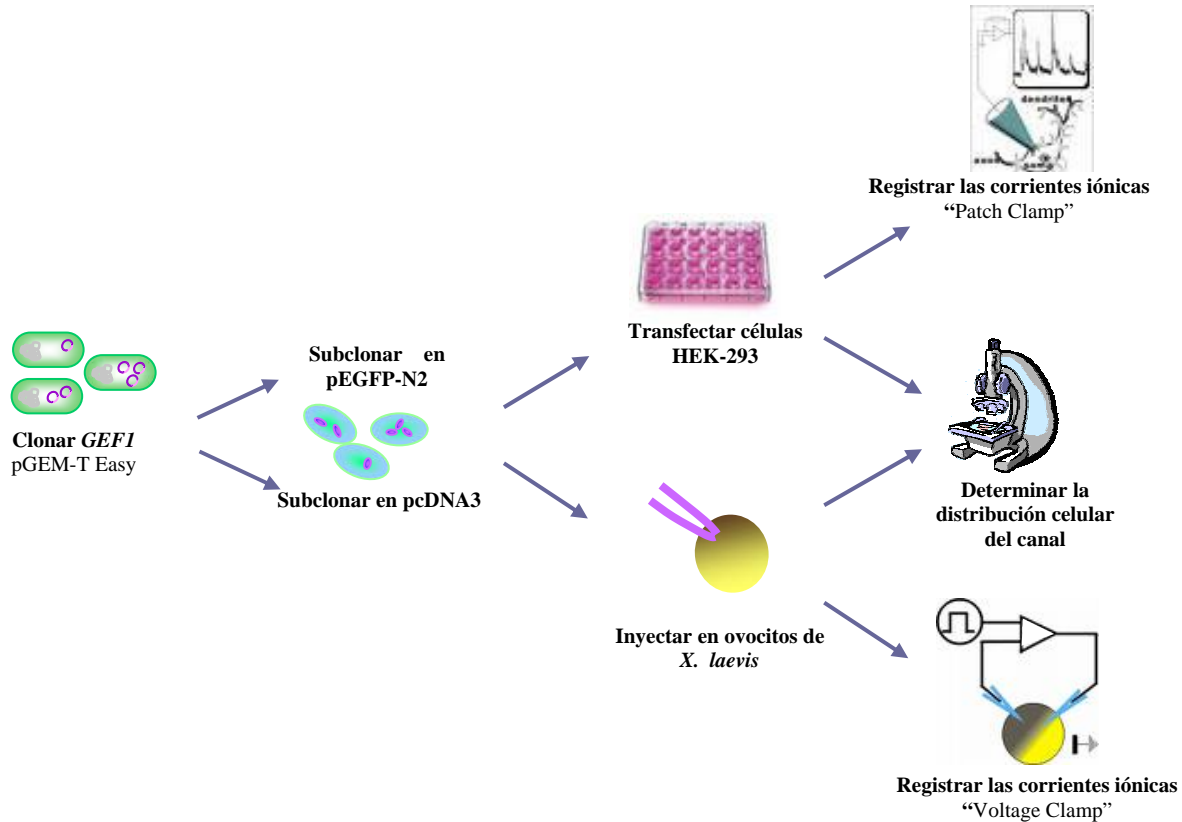


Figura 4. Estrategia para caracterizar funcionalmente Gef1p en sistemas heterólogos. A partir del vector pGEM-T Easy portando *GEF1*, se subclonó en los vectores pEGFP-N2 (para fusionar a GFP) y pcDNA-3. Ambas construcciones fueron introducidas en células HEK-293 y ovocitos de *X. laevis* para analizar las corrientes inducidas por Gef1p además de definir la localización de la fusión *GEF1*-GFP por microscopía de fluorescencia.

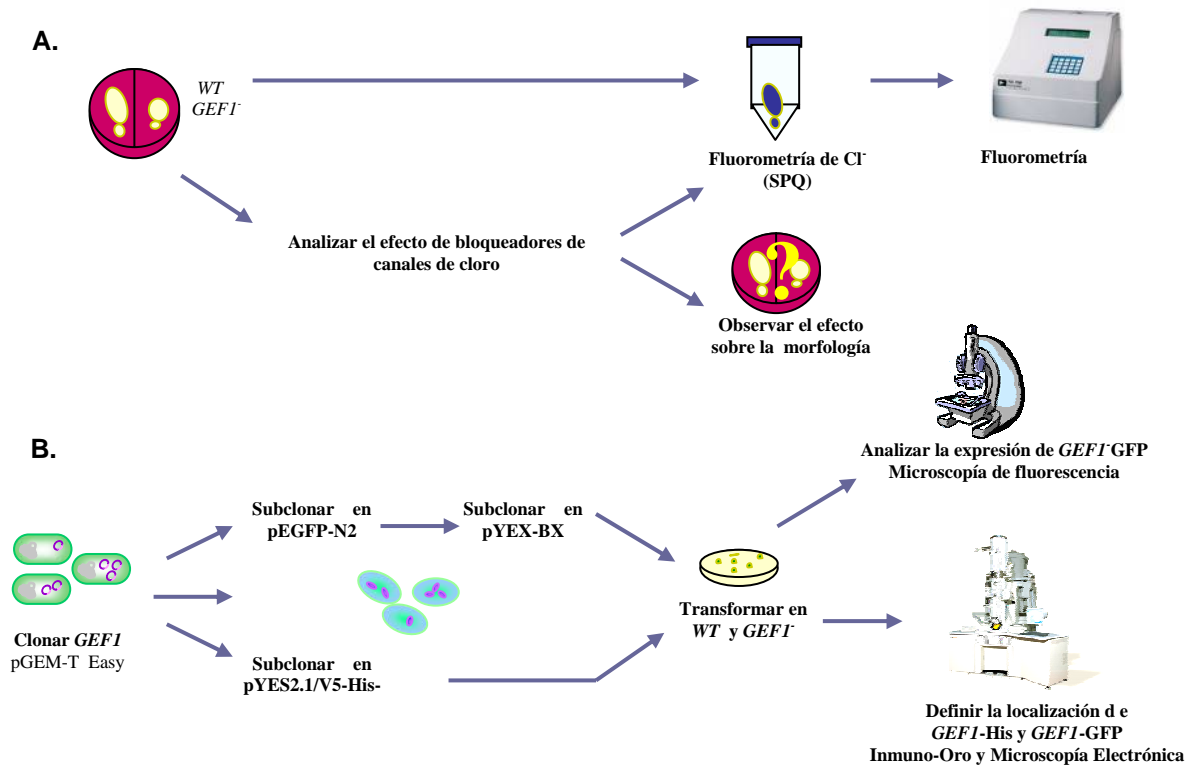


Figura 5. Estrategia para definir la función y la localización de Gef1p. A. Para definir si Gef1p está implicado en el transporte de Cl⁻ se usó el indicador fluorescente (SPQ). Se observaron las diferencias en la fluorescencia en las cepas silvestres (*WT*) y knock-out de *GEF1* (*GEF1⁻*), además se determinó el efecto de algunos bloqueadores de canales de cloro sobre la morfología de las levaduras *WT* y *GEF1⁻*. B. La localización de Gef1p fue definida por la detección inmunocitoquímica de las fusiones *GEF1*-GFP y *GEF1*-his en las levaduras, las cuales fueron observadas por microscopía electrónica.

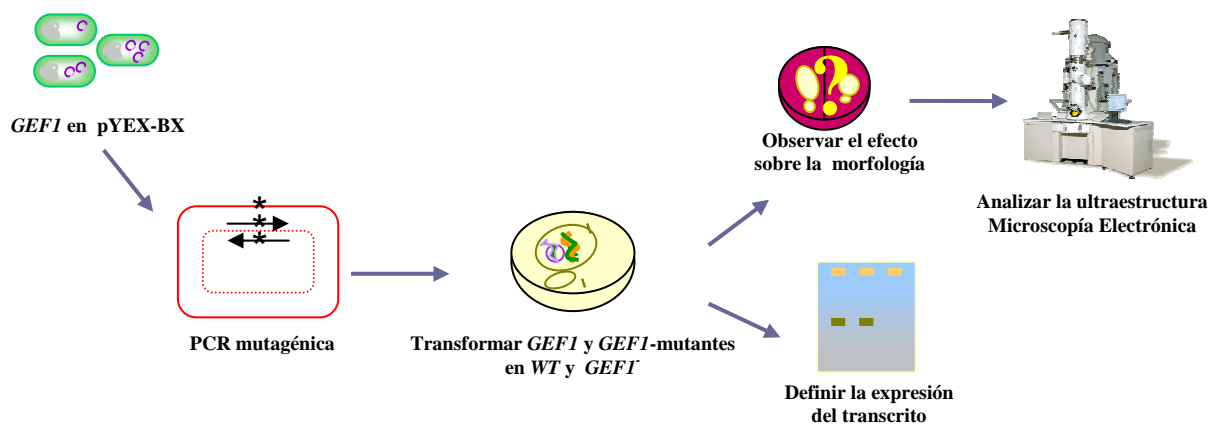


Figura 6. Estrategia para analizar el efecto de la expresión de los mutantes del gen *GEF1* sobre la morfología de cepas *WT* y *pet* (*GEF1⁻*). A partir del vector pYEX-BX portando *GEF1* se sustituyeron los aminoácidos previamente propuestos como importantes para la formación del poro (Dutzler y cols. 2002) y se observó su efecto sobre la morfología de las cepas *WT* y *GEF1⁻* a nivel macroscópico, consumo de O₂ y de ultraestructura por microscopía electrónica.

5.2 Material y métodos.

5.2.1. Levaduras y medios.

Las cepas de las levaduras usadas RGY-30 (*ura3-1; leu 2-3, 112; trp1-1; his3-11, 15*) y RGY-192 (*gef1::HIS3; ura3-1; leu 2-3, 112; trp1-1*) fueron donadas por R. Gaxiola de la Universidad de Connecticut (Gaxiola y cols., 1998,1999). Los medios de cultivo y las manipulaciones genéticas fueron realizados como lo describió Ausubel (1997). Para inducir el fenotipo *pet*, las levaduras se incubaron 3 a 5 días a 30°C en agar YPGE ó en el agar YNB suplementado con glicerol 3%, ferrozina 1mM y 20µg/ml de cada uno de los siguientes aminoácidos histidina, adenina y triptófano. La expresión de Gef1p fue inducida con CuSO₄ 0.5mM en el caso de las levaduras transformadas con el plásmido pYEX-BX (Clontech) o galactosa al 2% en el caso del vector pYES2.1/V5His-Topo (Invitrogen). El efecto del bloqueador de canales de cloro NPPB (ácido 5-nitro-2-3-fenilpropilamino-benzoico) sobre la levadura fue observado 3 a 5 días después de añadidas las diluciones seriales (10⁻³-10⁻⁷M) del fármaco incluido en el agar YPGE. Para sincronizar las células se usó Nocodazol 15µg/ml como describió Burke y cols. (2000).

Las fusiones génicas GEF1-GFP y GEF1His se realizaron en los plásmidos pYEX-BX (Clontech) y pYES2.1/V5His-Topo (Invitrogen), respectivamente, y fueron transformadas en la cepa RGY-30 y RGY-192 usando el método de acetato de litio (Ausubel y cols. 1993). Se corroboró la eficiencia de las transformaciones según su auxotrofia usando medios de cultivo selectivos.

5.2.2 Biología Molecular.

GEF1 fue obtenido por PCR usando dos oligonucleótidos específicos (Prima y Gef1Bam-H1. Apéndice II) y clonado en el plásmido pGEM-T easy (Promega). El gen fue secuenciado completamente para corroborar la identidad usando un secuenciador de DNA automatizado (ABI prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Se realizaron diversos pasos de mutagénesis sitio dirigida para introducir sitios de restricción que permitieron lo siguiente: a) Clonar *GEF1* en el vector pYEX-BX (Clontech) que permite la expresión en levaduras, b) Clonar *GEF1* en el vector pcDNA3 (Invitrogen) que incluye el promotor transcripcional CMV que permitió la transcripción de *GEF1* en ovocitos de *X. laevis* y células HEK-293, C) Fusionar GFP al carboxilo terminal de *GEF1* usando el vector pEGFP-N2 (Clontech) y d) Añadir una

marca de 6 histidinas al carboxilo terminal usando el vector pYESV5-His (Invitrogen). Las mutaciones puntuales en *GEF1* fueron inducidas, usando el estuche Quick Change de Invitrogen y transformadas en la bacteria *E. coli* XL-1 Blue. Todas las mutaciones y fusiones génicas fueron confirmadas por secuenciación en ambos sentidos (Apéndice III). La expresión de *GEF1* y las mutantes puntuales en la cepa RGY-192 fue determinada mediante RT-PCR, usando el estuche SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen) según las indicaciones de la casa comercial; utilizando oligos específicos (gef926 y Gef1BamHI) diseñados sobre la región eliminada de *GEF1* en la cepa RGY-192 (*GEF1*).

5.2.2.1 Diseño de los iniciadores.

Mediante el programa computacional DNAMAN 5.2.9 (<http://www.lynnon.com/>) se diseñaron los iniciadores. Para esto se utilizó como secuencia molde el DNA del gen *GEF1* previamente reportado en el GENBANK (No de acceso: Z23117) tomando en cuenta los siguientes parámetros: fuerza de apareamiento (ΔG), temperatura media de fusión (T_m), formación de estructuras secundarias y formación de "hairpin".

5.2.2.2 Amplificación de *GEF1* por PCR.

La amplificación de *GEF1* y del fragmento para caracterizar los transcritos expresados en la levadura se realizó mediante PCR utilizando los iniciadores antes mencionados. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Techgene de TECHNE.

Tabla 1.- Condiciones de PCR para obtener el gen *GEF1* normal y mutante.

Mezcla de reacción:

Reactivos	Concentración final
Buffer 10 X	1 X
MgCl ₂ 25 mM	1.25 mM
dNTPs 10 mM	0.20 mM
Iniciador 5' 2.5 μM	0.20 μM
Iniciador 3' 2.5 μM	0.20 μM
Taq DNA pol 5 U/μl	0.10 U/μl
DNA 100 ng/μl	6.00 ng/μl
H ₂ O miliQ	cbp 50 μl

Condiciones de amplificación:

	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Hot Start	95°C	1 minuto	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	30
Alineamiento	52°C	1 minuto	
Extensión	72°C	2 minuto	
Extensión	72°C	5 minutos	1

En todas las reacciones de amplificación se utilizó un control negativo, en el que se sustituyó el DNA por agua. Los productos de las amplificaciones se analizaron en un gel de agarosa al 0.8%, utilizando el marcador comercial Ladder o λ *Pst* I (Invitrogen).

5.3 Marcaje con SPQ y fluorimetría.

Las cepas (RGY-30 y RGY-192) fueron cultivadas 3 a 5 días a 30°C en YPGE, sincronizadas en fase M usando Nocodazol 5.0 mM y recolectadas por centrifugación a 7000 rpm durante 5 min. a 4°C. Se diluyeron a 1×10^6 células/ml en YPGE y se marcaron por inmersión en el fluoróforo sensible a cloro SPQ 300 μ M (6-methoxy-N-(3-sulfopropil)-quinolinium) durante 5 min (Biwersi y cols., 1994; Accardi y Miller 2004). Las células se lavaron cinco veces en agua y se resuspendieron en YPGE (sin SPQ) inmediatamente antes de leer en el fluorómetro. La fluorescencia se midió a los 15, 30, 60 y 120 min, usando un fluorómetro VersaFluor (BioRad) a una longitud de excitación y emisión de 317 y 445 nm respectivamente. Los datos se normalizaron comparando con levaduras cultivadas en medio YPGE sin SPQ, y analizaron usando el programa Origin 6.0.

5.4 Electrofisiología.

5.4.1 En ovocitos de *X. laevis*.

Para obtener los ovocitos, se disecaron los ovarios de *X. laevis* y se aislaron los folículos manualmente. Para remover la envoltura celular, los folículos se trataron con colagenasa tipo 1 (Sigma) 0.5 mg/ml por 30 min e incubados a 16°C en medio Barth con gentamicina (0.1mg/ml). Un día después, se inyectaron al núcleo de los ovocitos 14 nL de cualquiera de los plásmidos pcDNA3-*GEF1*, *GEF1*-GFP o pEGFP-N2. Tres días después se registraron las corrientes generadas mediante la técnica de fijación de voltaje con dos micro electrodos (voltage clamp), usando solución Ringer normal (mM: NaCl, 96; KCl, 2, CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; HEPES-NaOH, 5; pH 7.4) a temperatura ambiente y usando microelectrodos llenos con KCl 3 M. Los ovocitos se perfundieron con NPPB 10^{-7} - 10^{-3} M y el potencial de membrana se mantuvo a -60 mV. Para analizar las corrientes activadas por voltaje se aplicaron cambios desde -60 hasta +40 mV, después a -120 mV en pasos de 20mV.

5.4.2 En células HEK-293.

Las células HEK-293 (American Tissue Culture Collection, CRL1573) se cultivaron según Halliwell y cols. (1999), y mantuvieron en medio DMEM modificado (Sigma-Aldrich) suplementado con suero bovino fetal 10% (Herlan SeraLab), L-glutamina 2 M (Sima-Aldrich) y Penicilina/Estreptomicina 100 U/ml (Sigma-Aldich). Las células se cultivaron en placas de cultivo de 35 mm cubiertas con Poli-D-lisina (Fisher Scientific) a una densidad de 10,000 células por placa, un día antes de la transfección. Para la transfección de las células HEK-293 con los vectores (pcDNA3-*GEF1*, *GEF1*-GFP o pEGFP-N2) se utilizó Fugene-6, según las indicaciones de la casa comercial (Roche Diagnostics Corporation). Los registros electrofisiológicos se realizaron 24 a 36 h después de la transfección.

Los registros se obtuvieron a temperatura ambiente (20-23°C) usando la técnica de patch-clamp en célula completa. Los electrodos se prepararon justo antes de usar, aplicando calor a capilares de borosilicato (Harvard Apparatus). Las células se fijaron a -60mV mediante un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments). Las células se perfundieron con una solución extracelular (mM: NaCl, 140; KCl, 5; MgCl₂, 1; CaCl₂ 2; HEPES, 10; D-glucosa, 10; pH 7.4) esta solución se suplementó con tetrodotoxina (200 nM), cloruro de tetra-etil-amonio (5 mM), 4-amino-piridina (2 mM) y CoCl₂ (2 mM) para bloquear cualquier corriente activada por voltaje proveniente de los canales endógenos de sodio, potasio o calcio. Para analizar el efecto de bajo Cl⁻ extracelular el NaCl se reemplazó isotónicamente con (en mM): CsCl o gluconato, 142; MgCl₂, 2; CaCl₂, 1; EGTA, 11; HEPES, 10; Mg-ATP, 2; pH 7.4 (ajustado con KOH). Los bloqueadores NPPB ó ácido niflúmico (NFA) (Fisher Scientific) se aplicaron a las células mediante un tubo en Y (fabricado manualmente). Después se perfundió solución extracelular por gravedad a 2 ml/min para asegurar el lavado de los fármacos del cultivo celular. Las corrientes se registraron en presencia y ausencia de NPPB (300 µM) o NFA (100 µM). La relación corriente voltaje se registró entre -140 a 40 mV (en 400 ms) en ausencia y presencia de NPPB y NFA. Los cambios inducidos en el potencial de membrana se midieron en el máximo, y la respuesta se analizó con el programa GraphPad Prism® (Version 4).

5.5. Microscopía.

5.5.1 Microscopía confocal Láser.

Algunos ovocitos inyectados y células transfectadas con *GEF1*-GFP ó pEGFP-N2 se observaron en el microscopio confocal (Nikon Model E-600), con una longitud de excitación de 488 nm y una emisión de 507 nm. Las imágenes se procesaron con el programa Simple PSI version 4.0.6 By Compyx INC, Image system.

5.5.2 Microscopía Electrónica.

5.5.2.1 Para ultraestructura.

Las células se colectaron de las placas de agar después de una inspección al microscopio óptico; se lavaron dos veces en S-Colidina 0.02M, pH 7.2 para ser incluidas en agar 2% a una temperatura entre 40-60° C y luego hacer bloques de 0.5 a 1 mm³, que se lavaron en solución de Colidina (sacarosa 0.2 M, CaCl₂ 0.001 M en S-Colidina), después se sumergieron en 2% glutaraldehído, 2% acroleína, 50% DMSO, pH 7.4 por 7 h; en seguida se lavaron (sacarosa 0.2M, CaCl₂ 0.001M en S-Colidina) y post-fijaron en OsO₄ 2% en la solución veronal-acetato HCl por 7 h. Se lavaron cinco veces en Cacodilato 0.1M pH 7.4, se incubaron por una hora a temperatura ambiente en ácido tánico disuelto en Cacodilato; se lavaron cinco veces en Cacodilato y cinco veces en S-Colidina 0.2 M pH 7.2. Las muestras se tiñeron con acetato de uranilo 2% en etanol 15% por una hora a temperatura ambiente. Las células se deshidrataron dos veces por 10 min en soluciones porcentuales de etanol (30, 50, 70 y 95%) a 4°C, dos veces en etanol al 100% por 30 min seguidos por dos cambios similares con óxido de propileno. Las muestras se infiltraron toda la noche en una proporción 1:1 óxido de propileno:resina Spurr, mantenidas en un desecador sin vacío. Se sustituyó la mezcla de infiltración por resina Spurr (100%), incubando a temperatura ambiente durante al menos 6 h manteniendo una rotación suave. Las muestras se transfirieron a moldes planos llenos de resina Spurr y se polimerizó durante 36 h a 60°C. Los cortes semifinos se obtuvieron en el microtomo con navaja de vidrio MTX; se tiñeron con azul de toluidina para evaluar la preservación y seleccionar el área a ser examinada al microscopio. Los cortes ultra finos de 70 nm

se obtuvieron obtenidos con una navaja de diamante y se colocaron en rejillas de níquel.

5.5.2.2 Para la inmuno-localización.

Una vez colectadas las levaduras sin transformar y transformadas individualmente con los plásmidos pYEX-BX, pYES2.1/V5-His-Topo y las fusiones *GEF1*-GFP y *GEF1*-his, se hicieron los bloques de agar como ya se describió. Se lavaron en solución de Colidina, seguida de la inmersión en solución de glutaraldehído 3% en 0.1 M de ácido cacodílico pH 7.4 a 4°C por 30 min. Los bloques se deshidrataron con dos cambios de 30, 40, 50 y 70% de etanol incubando 15 min en cada concentración. La infiltración se realizó en resina LR White (Polyscience), durante al menos dos días. Para la inclusión, los bloques se transfirieron a cápsulas BEEM llenas con resina no diluida y no catalizada, que se incubaron a 60°C por 24 h. Los cortes finos y ultra finos se obtuvieron como se describió anteriormente.

Para la inmunocitoquímica, las rejillas se flotaron primero en una cámara húmeda sobre una gota de PBS 0.5 M durante 30 min, y después en PBS-BSA 1% conteniendo Tween 20 0.1%. Después de cada incubación las rejillas se lavaron con PBS-BSA sin detergente. Las rejillas se incubaron toda la noche a 4° C en la cámara húmeda, flotando sobre dos gotas del anticuerpo primario (AntiGFP ó AntiHis) a una dilución 1:100. Después de un extenso lavado con solución PBS-BSA se incubó por una hora a 37°C en el anticuerpo secundario cabra anti-conejo, marcado con partículas de oro de 15 nm, a una dilución 1:250. Después las secciones se contrastaron con citrato y acetato de uranilo según Hayat y cols. (1981), y se observaron en un microscopio electrónico JEOL 1010 a 80 Kv.

5.6. Consumo de Oxígeno.

Las células se cultivaron 3 a 5 días en medio YNB suplementado y arrestadas en la fase M usando Nocodazol 15 µg/ml; se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 g 4°C; una vez recuperado el paquete celular, se resuspendieron en 1/5 del volumen original de agua previamente mantenida a 30°C. Se diluyeron a 1×10^6 células/ml (Burke y cols., 2000) y se midió el consumo de oxígeno con un electrodo tipo-Clark en 3 ml del medio YNB (Hernández-Muñoz, y cols., 1992).

5.7 Marcaje de mitocondrias y organelos.

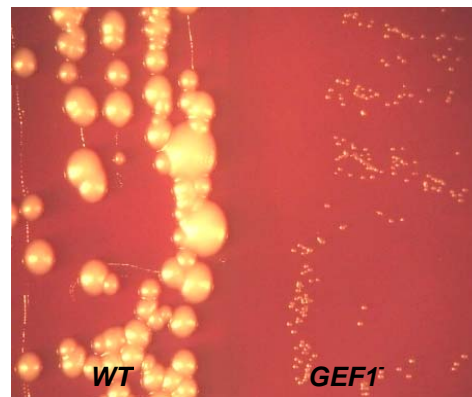
Las levaduras previamente arrestadas en la fase M se marcaron con Brefeldina y MitoTracker Red CmxRos (Molecular Probes) según las indicaciones de la casa comercial. Después se observaron en el microscopio confocal (sección 4.5.1).

VI. Resultados.

6.1 El fenotipo *petite*.

Se analizó el fenotipo de las cepas RGY-30 (*WT*) y RGY-192 (*GEF1*) cultivando las levaduras en el medio YPGE+Ferrozina. Se encontró una visible diferencia en el tamaño de las colonias (fig. 7) corroborando la formación del fenotipo *petite* (*pet*) inducido por la delección del gen *GEF1* en la cepa *GEF1* en ausencia de hierro y fuentes de carbono no fermentables (Greene y cols., 1993).

Figura 7. El fenotipo *pet* es inducido por la delección de *GEF1*. Fenotipo macroscópico de las cepas *WT* y *GEF1* cultivadas 3 a 5 días a 30°C en agar YPGE+Ferrozina.



De la cepa *WT*, se extrajo el DNA genómico, a partir de este se obtuvo el gen *GEF1* mediante PCR, este producto fue clonado en el vector pGEM-T Easy para diversas subclonaciones en vectores de expresión.

5.7 Marcaje de mitocondrias y organelos.

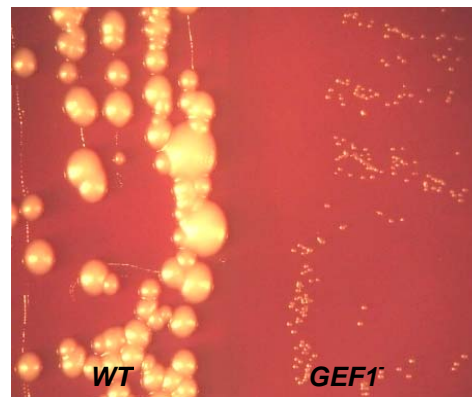
Las levaduras previamente arrestadas en la fase M se marcaron con Brefeldina y MitoTracker Red CmxRos (Molecular Probes) según las indicaciones de la casa comercial. Después se observaron en el microscopio confocal (sección 4.5.1).

VI. Resultados.

6.1 El fenotipo *petite*.

Se analizó el fenotipo de las cepas RGY-30 (*WT*) y RGY-192 (*GEF1*) cultivando las levaduras en el medio YPGE+Ferrozina. Se encontró una visible diferencia en el tamaño de las colonias (fig. 7) corroborando la formación del fenotipo *petite* (*pet*) inducido por la delección del gen *GEF1* en la cepa *GEF1* en ausencia de hierro y fuentes de carbono no fermentables (Greene y cols., 1993).

Figura 7. El fenotipo *pet* es inducido por la delección de *GEF1*. Fenotipo macroscópico de las cepas *WT* y *GEF1* cultivadas 3 a 5 días a 30°C en agar YPGE+Ferrozina.



De la cepa *WT*, se extrajo el DNA genómico, a partir de este se obtuvo el gen *GEF1* mediante PCR, este producto fue clonado en el vector pGEM-T Easy para diversas subclonaciones en vectores de expresión.

6.2 Expresión Heteróloga.

Primero se subclonó en los vectores pcDNA-3 y pEGFP-N2 (fig. 8A y B). Estos vectores portan el promotor CMV (Citomegalovirus) lo que permitió la expresión de las proteínas Gef1p y *GEF1*-GFP en ovocitos de *Xenopus* y células HEK-293.

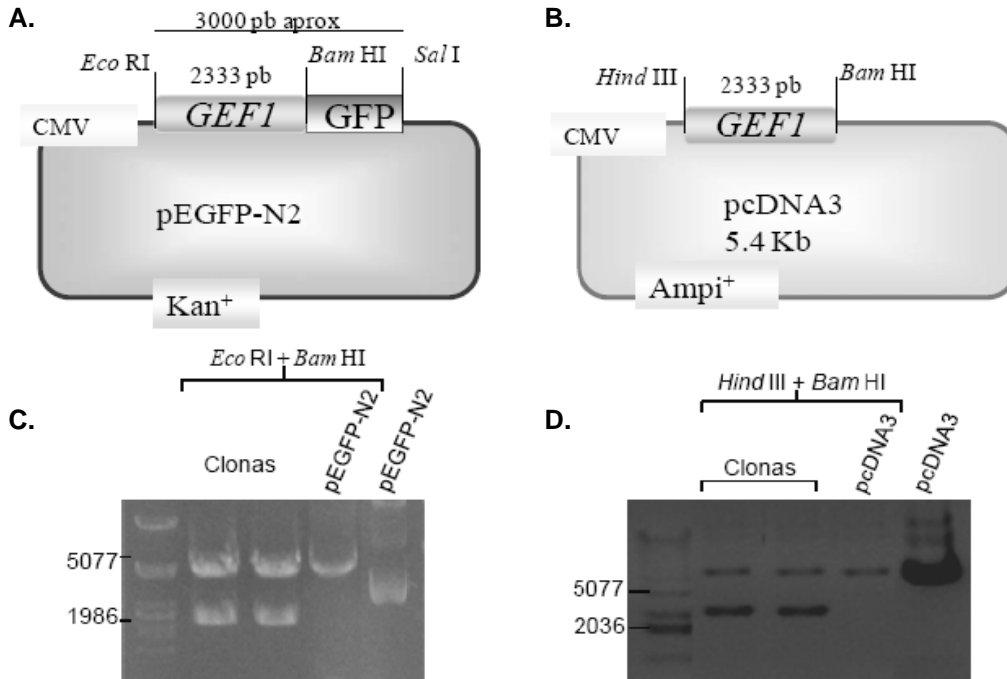


Figura 8. Clonación de *GEF1* en pEGFP-N2 y pcDNA3. **A.** Mapa funcional del vector quimérico pEGFP-N2 -*GEF1*. **B.** Mapa funcional del vector quimérico pcDNA3 expresando *GEF1*. **C y D.** Gel de agarosa mostrando los cortes con enzimas de restricción de los vectores quiméricos; en **C** se observa la liberación del inserto (*GEF1*: 2333 pb) y el vector (pEGFP-N2: 4.7 Kb) con las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI, marcador: λ *Pst* I. **D.** Digestión con *Hind* III y *Bam* HI liberando el inserto (*GEF1*) y el vector (pcDNA3: 5.4 kb), marcador: ladder (Invitrogen). CMV: promotor de citomegalovirus, Kan⁺: gen de resistencia a kanamicina, Amp⁺: gen de resistencia a ampicilina.

6.2.1 Análisis funcional en ovocitos de *X. laevis*.

Se inyectaron los ovocitos con el DNA plasmídico, y después de 3 días se observó al microscopio confocal la expresión de la quimera *GEF1*-GFP. Los ovocitos presentan una muy ligera fluorescencia endógena (fig. 9A). En la figura 9B se observa una amplia expresión de la proteína GFP, proveniente de la inyección de pEGFP-N2, mientras en la figura 9C se observa la expresión de la fusión *GEF1*-GFP preferentemente en las regiones cercanas a la membrana plasmática y hacia el hemisferio animal del ovocito.

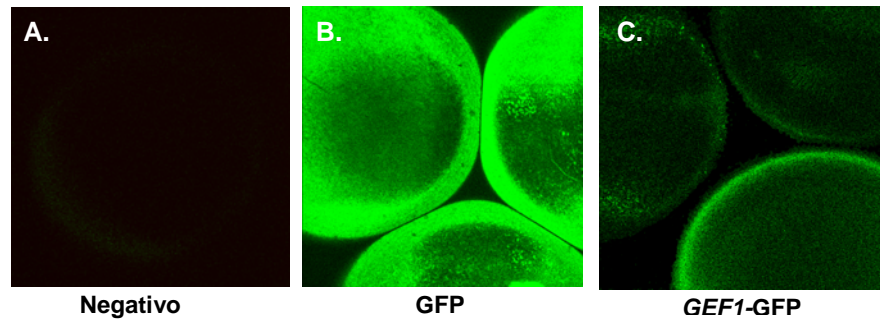


Figura 9. Expresión de la quimera *GEF1*-GFP en ovocitos de *X. laevis*. En **A.** Se observa casi nula la fluorescencia endógena del ovocito, en **B.** la expresión de GFP soluble es uniforme, contrastando con **C.** donde la expresión de *GEF1*-GFP está principalmente en ó cerca de la membrana plasmática.

Mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (Voltage clamp) se registraron las corrientes inducidas por la expresión de Gef1p. El potencial de membrana de los ovocitos inyectados con *GEF1* ó con *GEF1*-GFP se redujo alrededor de -20mV mientras en los ovocitos sin inyectar varió entre -35 a -40mV.

Con el fin de determinar si Gef1p era una proteína activada por voltaje de inicio se aplicó un protocolo en el cual se fijó el potencial a -60 mV después se llevó a +40 para luego disminuir hasta -120mV en decrementos de -20 mV. Este protocolo no generó corrientes inducidas por la expresión de Gef1p al comparar los resultados con los ovocitos control (fig. 10A y 4B; n=10). Aplicando el bloqueador de canales de Cl⁻ NPPB 0.1mM se indujo una despolarización en el potencial de membrana que podría indicar el cierre de un canal constitutivamente abierto (fig. 10B; n=8).

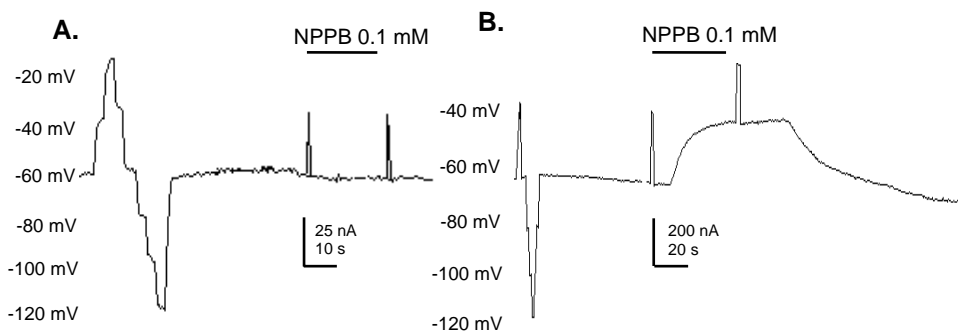


Figura 10. Expresión funcional de Gef1p en ovocitos de *X. laevis*. Registros electrofisiológicos de: **A.** Ovocito control. Sólo se observa el cambio provocado por los diferentes voltajes aplicados y no hay variación al aplicar un bloqueador de canales de cloro (NPPB). **B.** Ovocito inyectado con *GEF1*. Se observa que no hay un flujo de iones al aplicar los cambios en el voltaje pero hay una despolarización de la membrana al aplicar el NPPB que podría indicar el cierre de un canal.

Este efecto no se observó en los ovocitos control inyectados con agua, ni en los no inyectados (fig. 10A). Además este mismo efecto se observó al aplicar el bloqueador de canales de Cl⁻ 9Ac (Dato no mostrado).

Se observaron resultados similares en los ovocitos expresando *GEF1*-GFP, sin embargo, el efecto de la droga permaneció por más tiempo, sugiriendo que la fusión con GFP podría modificar la cinética del canal, o bien aumentar la afinidad por el NPPB (fig. 11).

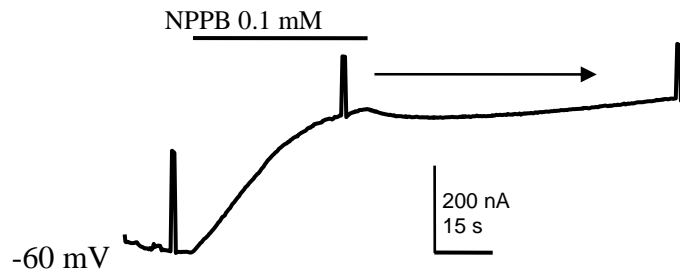


Figura 11. Expresión funcional de *GEF1*-GFP en ovocitos de *X. laevis*. Registro electrofisiológico mostrando el cierre de un canal que permanece abierto. La flecha indica el tiempo en que se prolonga la apertura después de empezar el lavado del NPPB.

6.2.1 Análisis funcional en células HEK-293.

La expresión de Gef1p en ovocitos de *X. laevis* fue el primer indicio de la expresión de esta proteína en membrana plasmática. Sin embargo los ovocitos poseen diversos canales de cloro que a la fecha no han sido del todo caracterizados (Parker y cols., 1988; Weber y cols., 1999) y esto podría confundir la interpretación de nuestros resultados; por lo tanto optamos por expresar *GEF1* en la línea celular HEK-293 considerando que estas células expresan primordialmente canales de K⁺ activados por voltaje (Ávila y cols., 2004). En las figuras 12A y B se muestran imágenes de células HEK-293 transfectadas con GFP y *GEF1*-GFP, observando que la distribución homogénea de GFP contrasta con la expresión de *GEF1*-GFP principalmente concentrada en compartimentos intracelulares y localizada de manera menos clara en membrana plasmática.

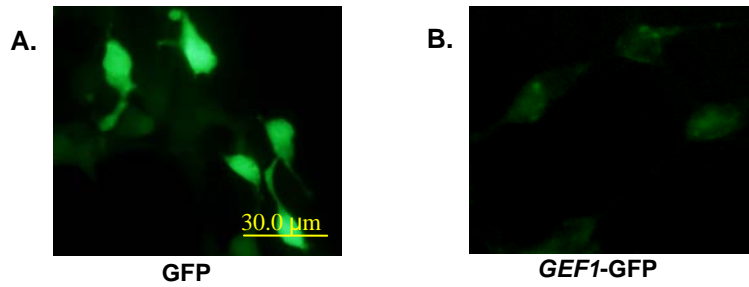


Figura 12. Expresión de la quimera *GEF1*-GFP en las células HEK-293. A. Se observa la expresión ubicua de GFP, en contraste con la de *GEF1*-GFP principalmente en compartimentos intracelulares (B).

Se obtuvieron registros de las células previamente transfectadas mediante la técnica de Patch clamp. Se aplicó un protocolo de diferentes voltajes, semejante al aplicado en los ovocitos (dato no mostrado), encontrando los mismos resultados: no se evidenció ninguna corriente sensible al voltaje.

Sin embargo, fijando las células a -40mV , y usando una solución electrolítica basada en K-gluconato (en lugar de cloro), NPPB redujo el potencial de membrana de las células HEK-293 transfectadas con *GEF1* de $136 \pm 50\text{pA}$ ($n=5$) a $79 \text{p} \pm 26\text{pA}$ (fig. 13A y C), y este efecto no se observó al reemplazar el Cl^- con NaNO_3 [control: $178 \pm 11\text{pA}$ y en NPPB ($30 \mu\text{M}$) = $172 \pm 14 \text{pA}$, $n=5$] (Fig. 13B y C). Además el NPPB no tuvo efecto sobre el potencial de membrana de las células no transfectadas.

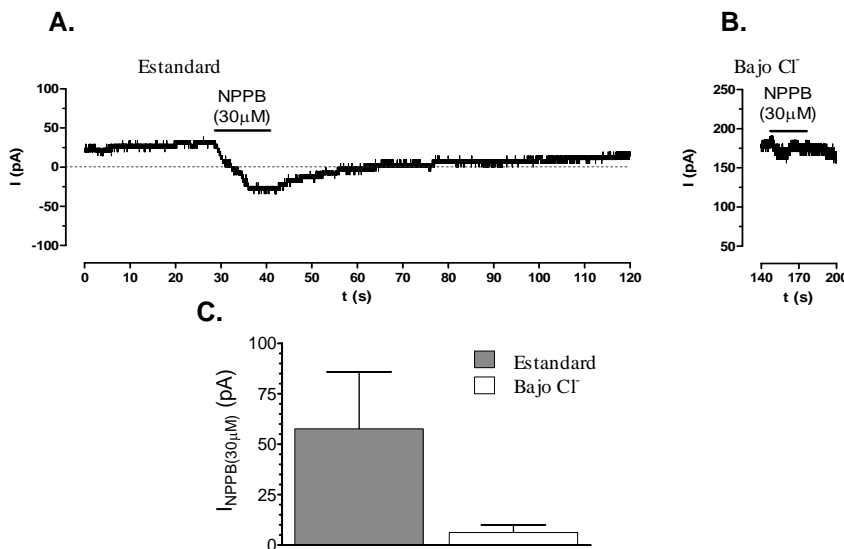


Figura 13. Expresión funcional de *Gef1p* en células HEK-293. A. En registros electrofisiológicos mediante Patch clamp la perfusión de NPPB $30\mu\text{M}$ indujo la hiperpolarización de las células al usar una solución extracelular estándar. B. La corriente bloqueada se redujo al usar una solución extracelular baja en cloro. C. La corriente bloqueada al usar la solución extracelular baja en cloro fue reducida $\sim 80\%$.

Para tratar de definir el ion que atraviesa a través de Gef1p, las células transfectadas se fijaron a -60mV, usando una solución electrolítica basada en CsCl. Se obtuvo la relación corriente voltaje (I-V de -140 a 40mV) en ausencia (-NPPB) y en presencia de dos bloqueadores de canales de cloro: NPPB (+NPPB) (fig 14A) y NFA. La relación fue lineal, mostrando un potencial de inversión de $-9 \pm 16 \text{ mV}$ ($n=3$); NPPB y NFA redujeron el potencial de membrana aproximadamente 80 y 90%, respectivamente, en las células transfectadas con *GEF1* ($n=3$, fig 14B). En contraste, estos bloqueadores no tuvieron efecto sobre las células no transfectadas.

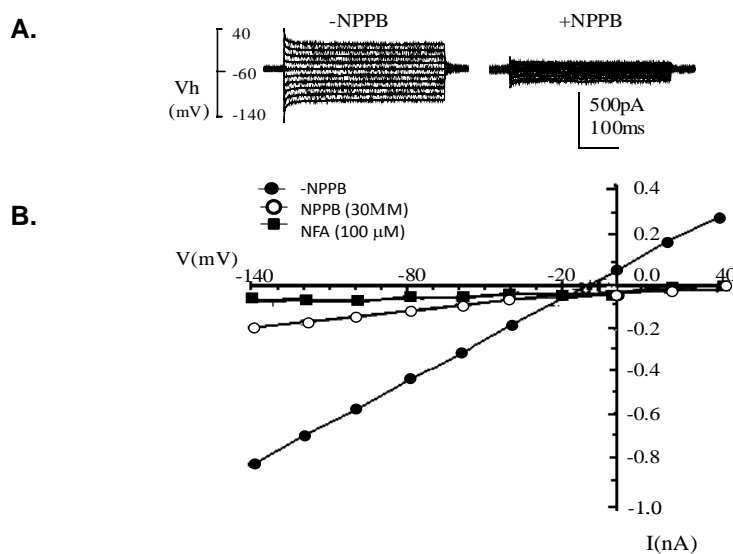


Figura 14. Efecto de NPPB y NFA sobre células HEK-293 expresando *GEF1*. **A.** Corrientes registradas a diferentes voltajes (-140 a 40mV) en células con *GEF1* en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de NPPB 300 μM . **B.** Relación corriente-voltaje en ausencia y presencia de NPPB 30 μM o NFA 100 μM ($n=3$).

6.3 Efecto de los bloqueadores de canales de cloro sobre las levaduras.

Desde 1950 se acepta que la membrana plasmática de la levadura es impermeable a Cl^- (Conway y Downey, 1950). Sin embargo la corriente inducida por la expresión de *GEF1* en ovocitos y células HEK-293 fue un indicio importante que nos llevó a analizar el efecto de los bloqueadores de canales de Cl^- sobre la morfología de las levaduras.

Se hicieron diluciones seriales del bloqueador NPPB en el medio de cultivo YPGE + ferrozina, observando el efecto sobre las levaduras *WT* y *GEF1* (fig 9A y B). Después de 3 a 5 días de incubación a 30° C las placas suplementadas con NPPB 10⁻³ M indujeron un fenotipo similar al observado en *GEF1* sobre la cepa *WT* (fig. 15A); este efecto no se observó a bajas concentraciones (10⁻⁴ a 10⁻⁷M). En la cepa

GEF1⁻ no se observaron alteraciones sobre la morfología (fig 15B).

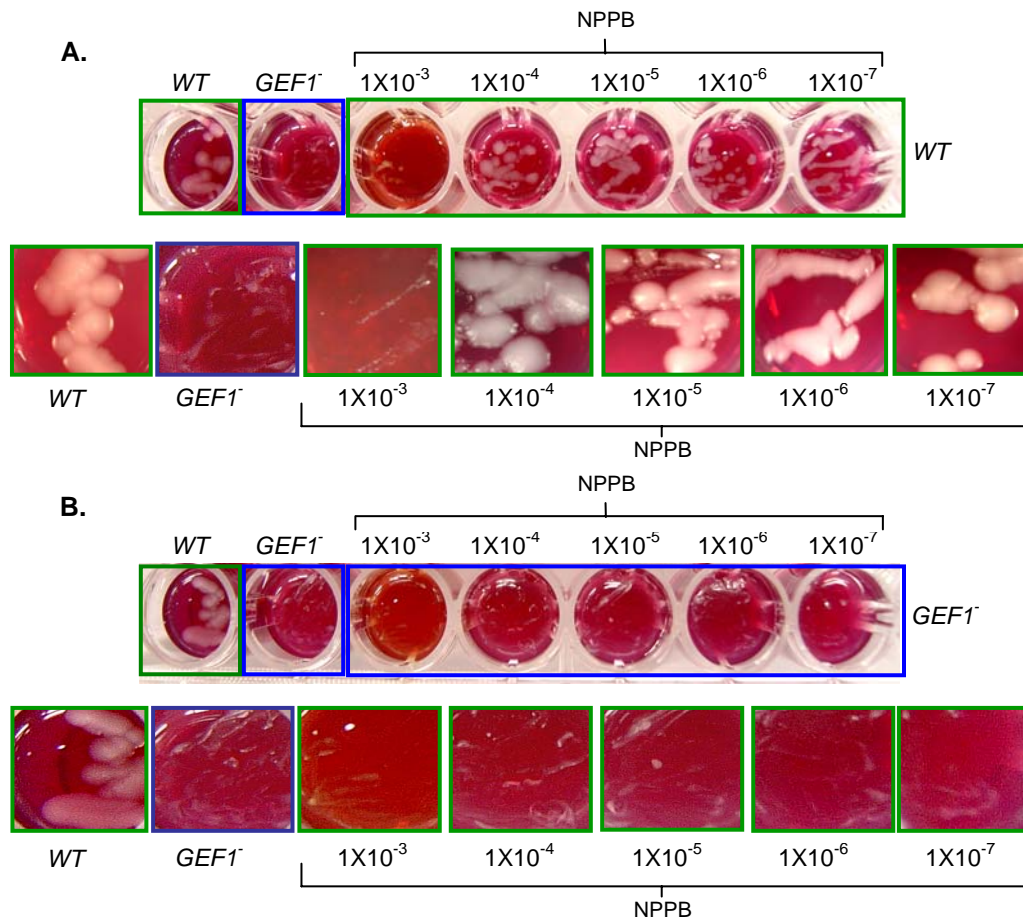


Figura 15. Efecto del NPPB sobre a morfología de las levaduras *WT* y *GEF1*. A y B. Efecto del bloqueador sobre la cepa *WT* y *GEF1* a diferentes concentraciones (10^{-3} a 10^{-7} M). En A. 1×10^{-3} M de NPPB induce la formación de un fenotipo semejante al *petite* en *WT*. B. El NPPB no produce efecto aparente sobre *GEF1* a ninguna concentración.

Se observaron muestras de las levaduras analizadas en la figura 15 al microscopio óptico para comparar el efecto del NPPB (fig. 16B). Este indujo una morfología aberrante en la cepa *WT*, caracterizada por pliegues en la membrana plasmática (fig. 16 B). Sin embargo; este efecto no se observó en las levaduras *GEF1*⁻ (fig. 16C). Es importante considerar que los bloqueadores de aniones no son altamente específicos; por tanto el efecto observado en las levaduras podría resultar de múltiples blancos moleculares (Giles y cols., 2002; Keeling y cols., 1991; Breuer y cols., 1989).

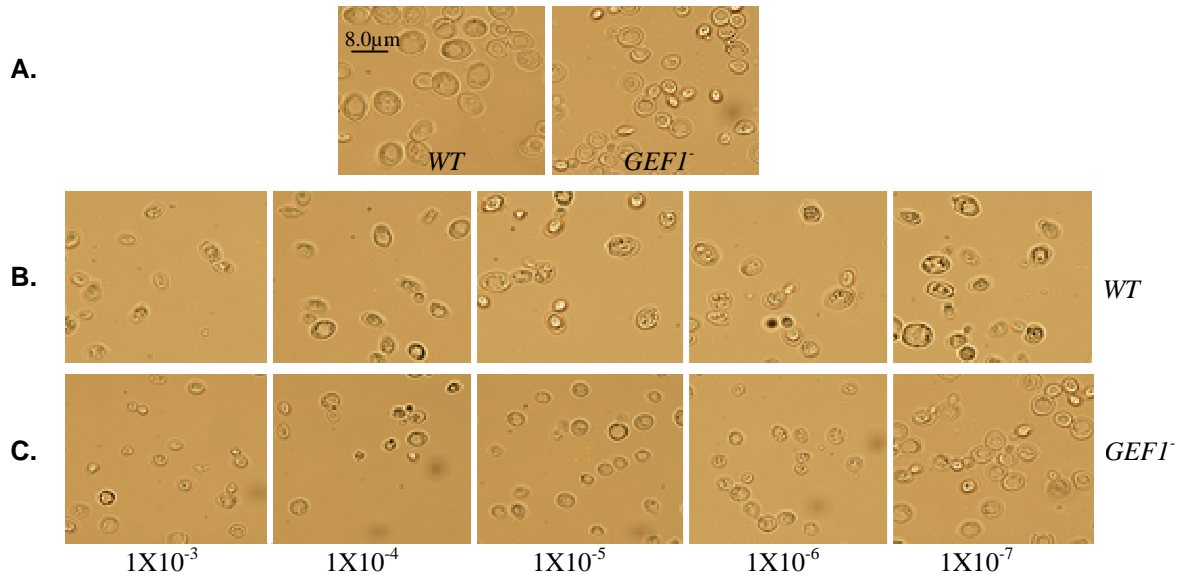


Figura 16. Efecto del NPPB sobre la morfología microscópica de *WT* y NPPB. **A.** Levaduras sin exponer al fármaco. **B.** Levaduras *WT* expuestas a las diferentes concentraciones molares de NPPB, se observan aberraciones morfológicas. **C.** *GEF1* no presenta en apariencia diferencias morfológicas inducidas por NPPB.

Con la finalidad de definir el transporte de Cl^- en la levadura utilizamos el indicador fluorescente (SPQ), que atenúa su fluorescencia al unirse con Cl^- . De esa manera, al exponer las levaduras al SPQ fue posible observar el transporte de Cl^- de manera indirecta midiendo la atenuación a través del tiempo (fig. 17).

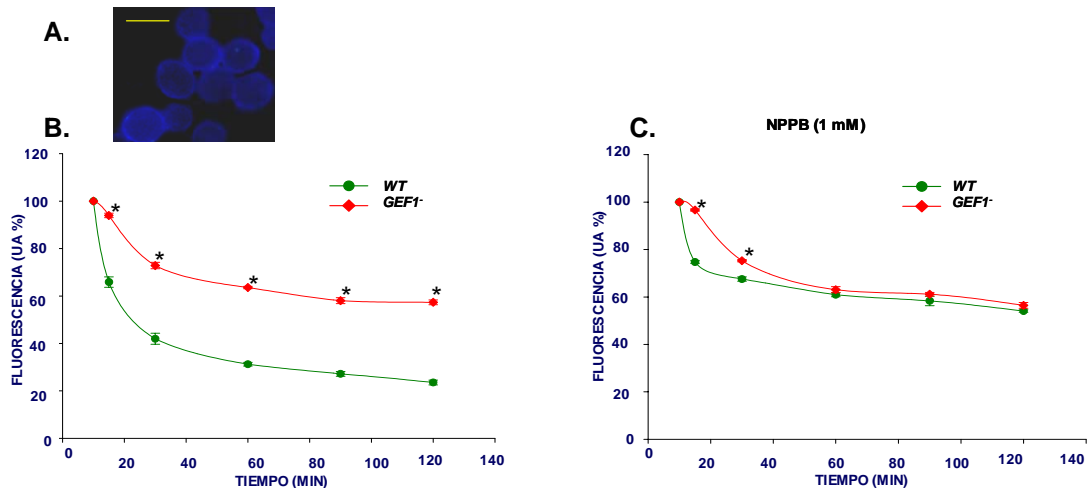


Figura 17. El flujo de Cl^- en *S. cerevisiae* medido mediante SPQ. **A.** Levaduras marcadas con SPQ. **B.** Se observa el porcentaje de disminución de la fluorescencia a diferentes tiempos en *WT* y *GEF1*. **C.** Efecto inducido por NPPB. Barra = $7.0 \mu\text{m}$. *=diferencia significativa (ANOVA one-way), UA=unidades arbitrarias de fluorescencia.

Se observó aproximadamente 50% más atenuación en las levaduras *WT* en relación a *GEF1*⁻ (fig. 17A) como reflejo de un mayor flujo de iones cloro. Al exponer las levaduras *WT* a NPPB 10⁻³ M se encontró una atenuación similar a la observada para *GEF1* (fig. 17B). Estos resultados sugieren que la levadura transporta Cl⁻ desde el medio extracelular y que el flujo es en parte facilitado por Gef1p, que a su vez se bloquea con NPPB.

6.4 Localización de Gef1p en *S. cerevisiae*.

La expresión de Gef1p se analizó por inmuno-detección de la proteína a la proteína verde fluorescente (*GEF1*-GFP) o a seis Histidinas (*GEF1*-His) fusionadas a Gef1p (fig. 18) y definiendo su localización mediante microscopía electrónica. La figura 18 muestra los mapas funcionales y la caracterización con enzimas de restricción de los plásmidos pYEX-*GEF1*-GFP y pYES-*GEF1*-His.

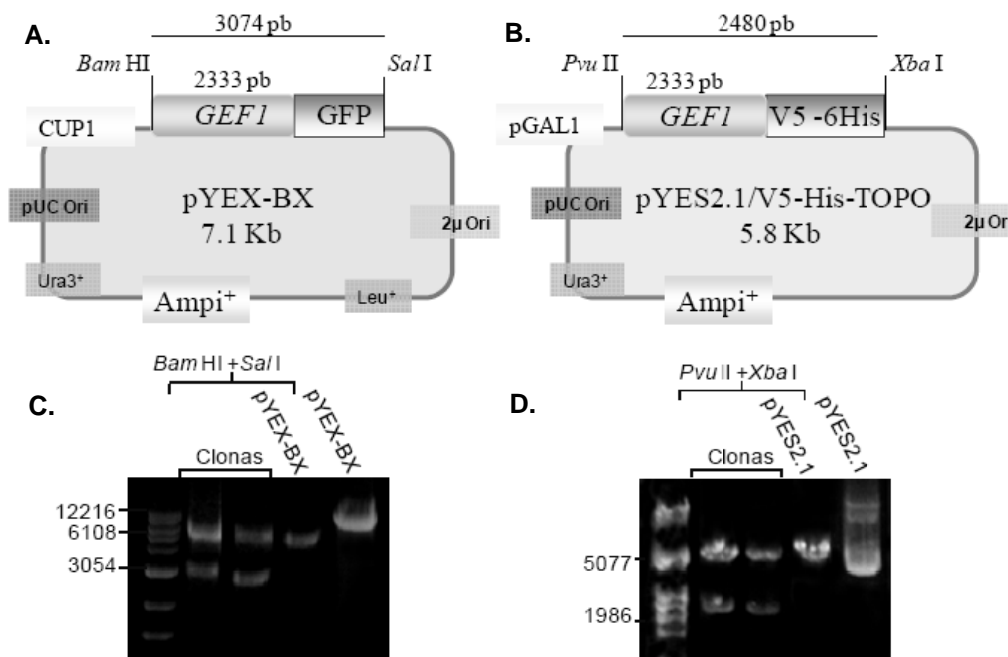


Figura 18. Fusión de *GEF1* con GFP ó His en vectores de expresión para levaduras. A. *GEF1*-GFP y B. *GEF1*-His C. Digestión de la fusión *GEF1*-GFP con *Bam* HI y *Sal* I (vector: 7.1 Kb, inserto: 3074 pb). Marcador: ladder. D. Digestión de la fusión *GEF1*-His con *Pvu* II y *Xba* I (vector: 5.8 Kb, inserto: 2480 pb), marcador: λ *Pst* I. CUP1: promotor de la transcripción activado por cobre, pGAL: promotor de la transcripción activado por galactosa, pUC Ori, origen de replicación bacteriano, 2 μ origen de replicación para levaduras, genes de auxotrofia: Ura⁺ y Leu⁺.

Las dos fusiones se expresaron en la cepa *GEF1*⁻, encontrando que ambas revierten el fenotipo *pet*, sugiriendo que inducen la formación de proteínas

funcionales (fig.19A). Particularmente en el caso de la fusión *GEF1*-GFP se observó su expresión por microscopía de fluorescencia encontrando puntos de expresión intracelular (fig. 19B)

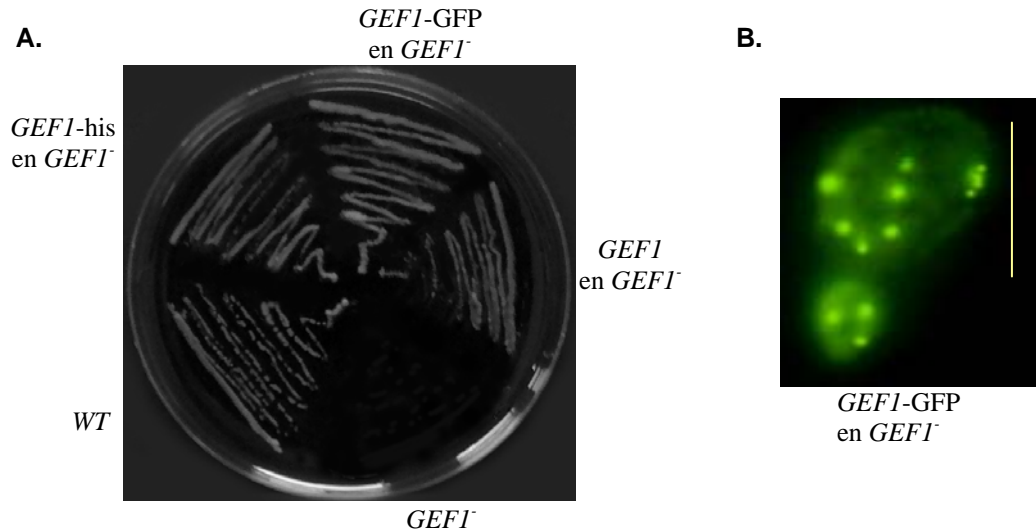


Figura 19. Reversión del fenotipo *pet* por *GEF1*-His y *GEF1*-GFP. A. *GEF1*, *GEF1*-GFP y *GEF1*-His revierten el fenotipo *pet* de *GEF1*⁻ en el medio selectivo con ferrozina. **B.** Se observan puntos fluorescentes de expresión intracelular derivados de *GEF1*-GFP. La barra en B corresponde a 7.0µm.

Después de expresar de manera independiente en la cepa *GEF1*⁻ las diferentes versiones de *GEF1* (His y GFP) se evidenció por microscopía electrónica que Gef1p se localiza en diversos compartimentos intracelulares (fig. 20), confirmando su presencia en la vacuola, retículo endoplásmico y otras vesículas que probablemente correspondan al Golgi. En las levaduras no transformadas no se observó marcaje. De manera adicional, se observó marcaje en la membrana plasmática, sugiriendo con esto que la proteína alcanza esta región de la célula (n=3). La distribución de las partículas de oro fue similar, independientemente de la fusión utilizada.

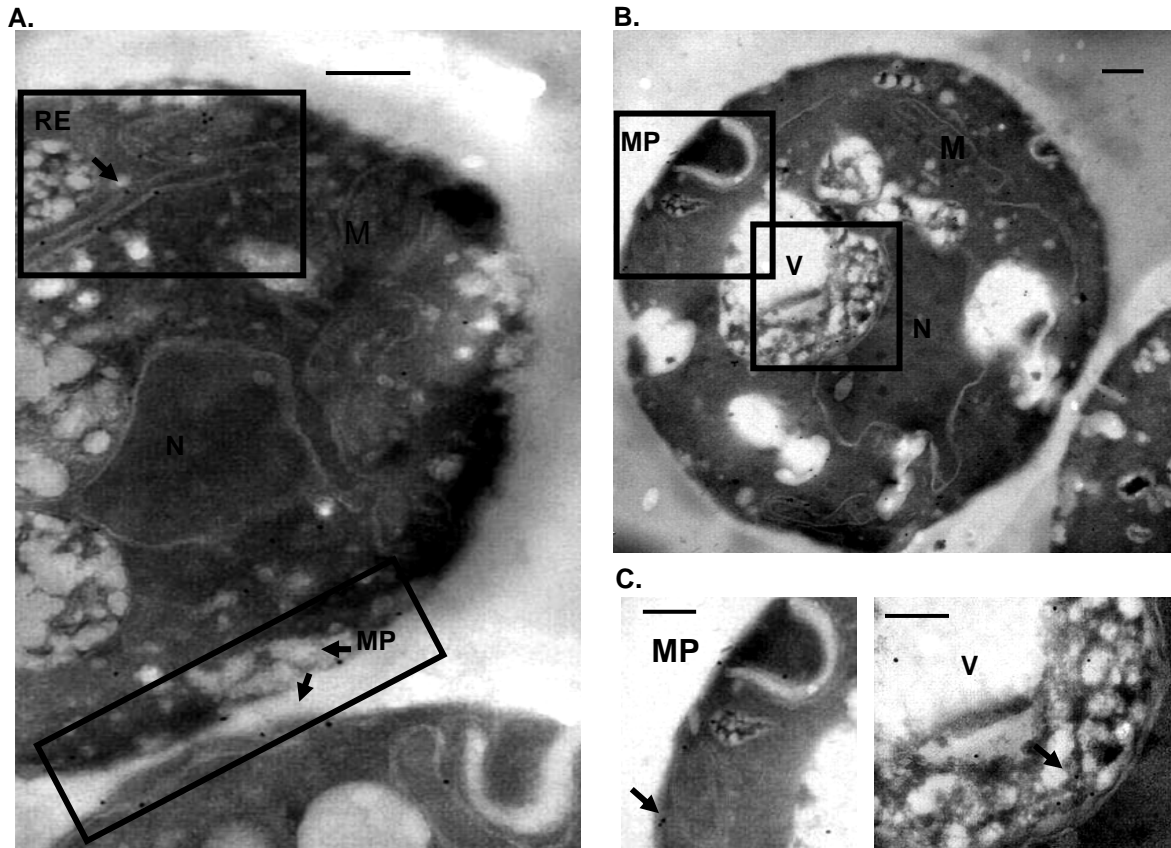


Figura 20. Localización de Gef1p en *S. cerevisiae*. *GEF1-His* se expresa en: **A.** Membrana plasmática (MP), retículo endoplásmico (RE) y vesículas. **B.** Expresión de Gef1p en MP, vacuola y vesículas. **C.** Detalles de las áreas mostradas en B. las flechas indican el inmuno-marcaje positivo. N:núcleo, M:mitochondria, RE:retículo endoplásmico. La barra corresponde a 0.2 μ M.

6.5 Efecto de mutaciones puntuales sobre el fenotipo *pet* de *GEF1*-:

Con la finalidad de continuar explorando la actividad de Gef1p y su similitud con las proteínas CIC se hicieron once substituciones de aminoácidos en las hélices α que forman parte del poro de Gef1p; se mutaron los aminoácidos sugeridos como importantes para la formación del poro en los ensayos de cristalografía de los homólogos procariotas EcCIC y StCIC (Fig.2 y 21) según lo reportado por Dutzler y cols. (2002).

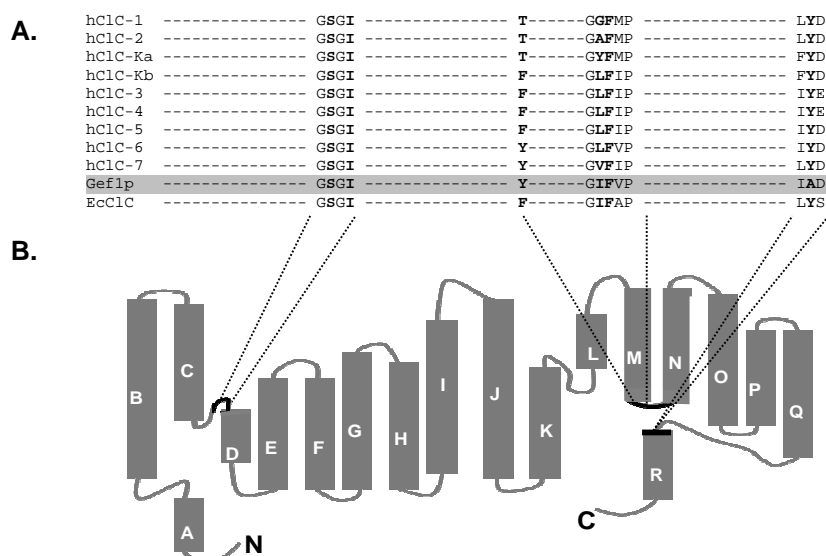


Figura 21. Modelo topológico de las proteínas CIC. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas CIC de humanos, Gef1p y EcC1C, mostrando las regiones de alta homología. Los residuos que forman el filtro de selectividad se muestran en negritas. S109 de EcC1C corresponde a S186 en Gef1p, I109 a I188, Y459 a F348, I356 a I467, F357 a F468 y Y445 a A558. Los números de acceso en el banco de genes son los siguientes: hC1C-1 (Z25884), hC1C-2 (NM_004366), hC1C-3 (NM_001829), hC1C-Ka (NM_001042704), hC1C-Kb (NM_000085), hC1C-4 (NM_001830), hC1C-6 (NM_001286), hC1C-7 (NM_001287), Gef1p (Z23117), EcC1C (NP_752140). En **B** se muestra la topología de un CIC con las 18 hélices α indicadas de la A-R.

Los plásmidos portando las mutaciones en *GEF1* se introdujeron en la cepa *WT* para descartar la posibilidad de algún efecto dominante negativo; además de expresarlo en la cepa cuyo gen *GEF1* fue truncado y que genera el fenotipo *pet*. En la figura 22 se observa que ninguna de las mutantes expresada en la cepa *WT* generó colonias *pet* (3 transformaciones independientes).

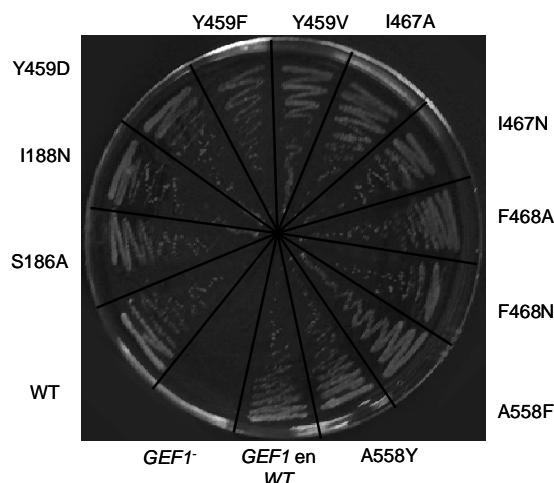


Figura 22. Expresión de las mutantes puntuales en la cepa WT. Las mutaciones puntuales no tienen ningún efecto sobre la morfología de las levaduras *WT*.

Al expresar las mutantes puntuales en la cepa *GEF1*⁻ se observó que las sustituciones S186A, I188N, Y459D, Y459F, Y459V, I467A, I467N y F348N no rescataron el fenotipo *pet* mientras que F348A, A558F y A558Y formaron colonias semejantes a la cepa *WT* (fig. 23A). Para asegurar que *GEF1* mutante se había transcrito de manera correcta se hizo RT-PCR a partir del RNA aislado de cada una de las cepas previamente transformadas con los vectores portando los mutantes puntuales (fig. 23B).

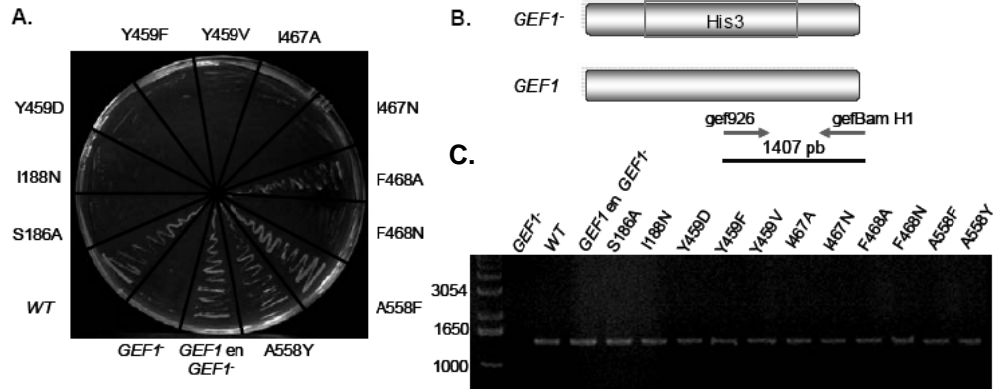


Figura 23. Expresión de las mutantes puntuales en la cepa *pet* (*GEF1*). **A.** Contraste del tamaño de las colonias *WT. GEF1* y las levaduras *GEF1* expresando las mutantes puntuales. El fenotipo *petite* fue rescatado por F468A, A558F y A558Y. **B.** Esquema del producto amplificado por RT-PCR para mostrar la expresión de *GEF1*. Se amplificó un producto de 1407 pb usando un oligo 5' (*gef926*) que se une a la región del gen que fue eliminada en *GEF1*⁻ (donde se insertó el gen His3 para truncar la proteína) y un oligo 3' que se une al codón de paro (*gefBamH1*). **C.** Gel de agarosa mostrando el producto de RT-PCR que revela la expresión de *GEF1* en las levaduras *WT* y mutantes puntuales, excepto en *GEF1*⁻.

Las levaduras se examinaron al microscopio óptico para determinar su tamaño y eliminar la posibilidad de muerte celular en el caso de las cepas *petite*. En la figura 24 se graficó su diámetro, encontrando una correlación entre el tamaño celular y el fenotipo *pet*. El tamaño de las levaduras *WT* y revertidas es ~7.0 μ M mientras el tamaño de las levaduras *pet* es ~4.0 μ M.

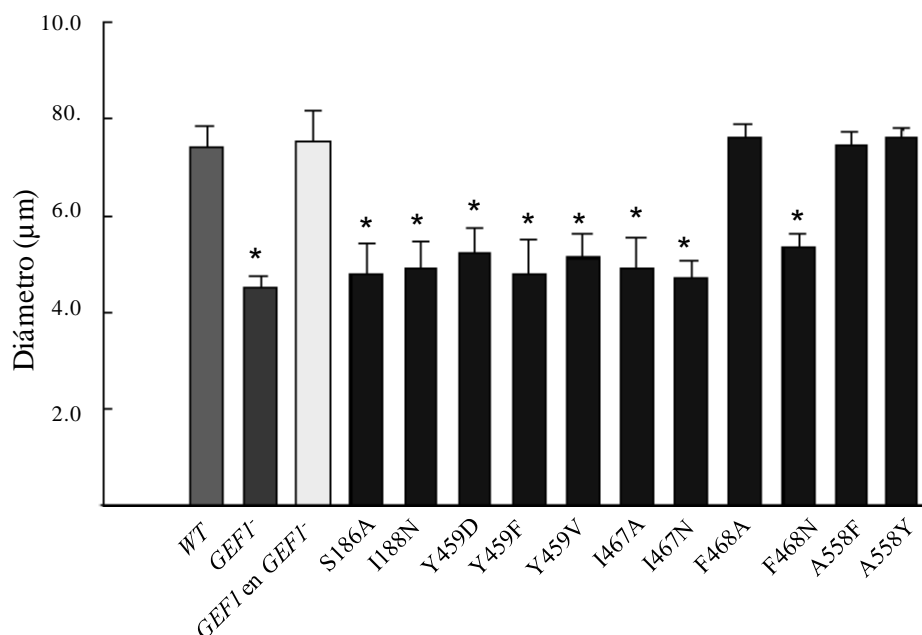


Figura 24. Gráfica del diámetro celular de las levaduras. El efecto macroscópico está en relación con el diámetro celular las levaduras *WT* y revertidas tienen un diámetro de $\sim 7.0 \mu\text{M}$ mientras *GEF1* y no revertidas se mantienen a $\sim 4.0 \mu\text{M}$ ($n=3$). ANOVA One-Way, $p < 0.2$.

6.5.1 Efecto de las mutantes puntuales sobre el consumo de oxígeno.

Con el antecedente de que el knock-out de *GEF1* (*GEF1*⁻) tiene un defecto en la cadena respiratoria (Greene y cols., 1993) procedimos a examinar el consumo de oxígeno para analizar el efecto de cada una de las mutaciones puntuales. En la figura 25 se observa que al comparar las levaduras *WT* contra *GEF1*⁻, esta última consume aproximadamente 50% menos O₂ ($2.62 \text{ se} \pm 0.21$ y $1.39 \text{ se} \pm 0.06$ Nat de Oxígeno respectivamente). Todas las mutantes puntuales que no revirtieron el fenotipo *pet* presentaron también una disminución en el consumo de oxígeno sin mostrar una diferencia significativa con *GEF1*⁻. Las mutantes que revirtieron el fenotipo *pet* (F468A, A558F y A558Y) presentan un consumo de oxígeno normal.

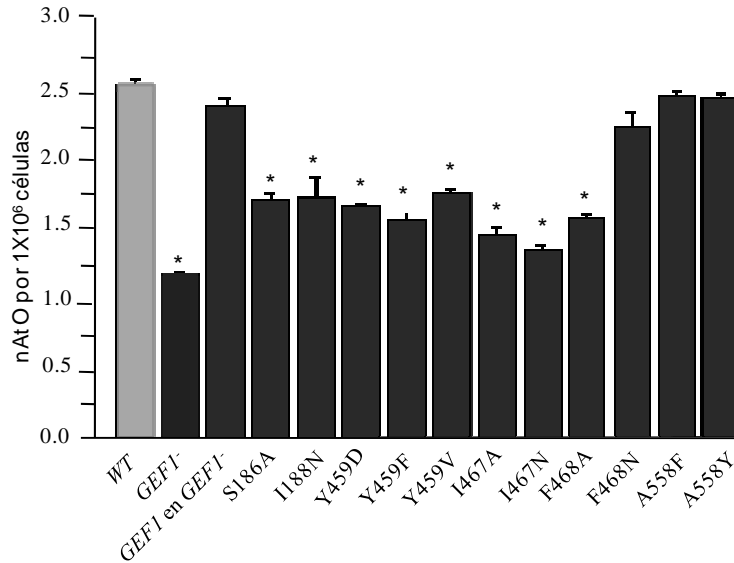


Figura 25. Efecto de las mutantes puntuales sobre el consumo de oxígeno. *GEF1* presenta un consumo de O₂ menor a *WT* y a las cepas revertidas. No existe diferencia significativa entre las levaduras F468A, A558F, A558Y y *WT* (ANOVA One way $p < 0.05$), * indica las diferencias significativas entre *WT* y las cepas *pet*. $n = 6$.

6.5.2 Análisis de las sustituciones en F468.

Durante el análisis del efecto de las mutantes puntuales sobre la reversión del fenotipo *pet* observamos de manera particular que mientras F468A revierte el fenotipo *pet*, F468N no lo hace. Por tanto procedimos a hacer un estudio más detallado de estas mutantes.

Primero con el antecedente de la deficiencia respiratoria de F468N y *GEF1*⁻ analizamos la actividad mitocondrial de estas cepas usando el fluoróforo MitoTracker el cual emite fluorescencia en mitocondrias con respiración activa. La figura 26A compara la morfología de las mitocondrias de F468A y F468N contra *GEF1*⁻ y *WT*. Mientras las levaduras *WT* y F468A (revertida) presentan el típico retículo mitocondrial; en las cepas *pet* (*GEF1*⁻ y F468N) se observan solo algunos puntos de fluorescencia emitidos por el MitoTracker, indicando la baja actividad respiratoria.

Por otra parte usando el fluoróforo Brefeldina se observó que las mutantes *pet* tienen una distribución desorganizada de los organelos (fig. 26B). Considerando estos detalles procedimos a analizar la ultraestructura de estas levaduras mediante microscopía electrónica.

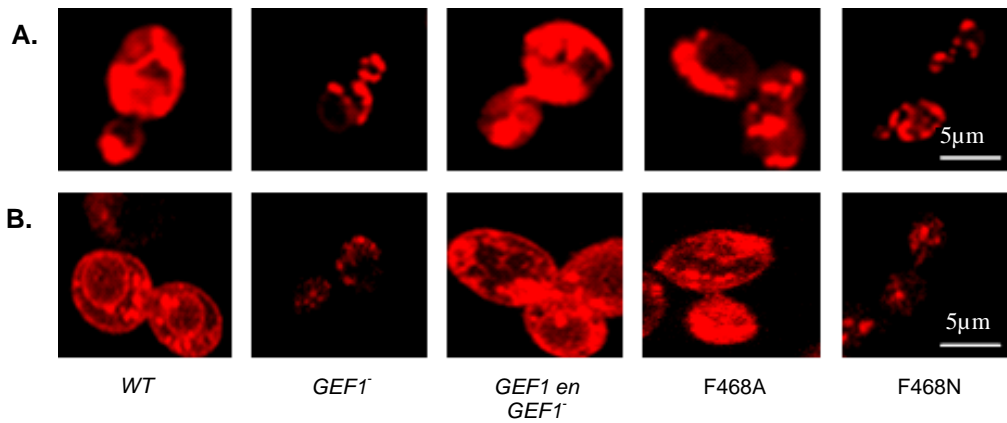


Figura 26. Actividad mitocondrial y distribución de los organelos. **A.** La fragmentación de las mitocondrias fue evidente al usar el marcador fluorescente MitoTracker. **B.** La Brefeldina reveló una desorganización en la distribución de los organelos en las células *pet* (*GEF1* y F468N).

6.5.3 Ultraestructura de las levaduras expresando las mutantes puntuales F468.

Además de la reducción del tamaño de *GEF1*⁻ y F468N, las células presentaron múltiples invaginaciones en la membrana plasmática, una desorganizada distribución de los organelos, y reducción en el tamaño de la vacuola, que parece estar fragmentada y una red mitocondrial desacoplada. En contraste, las levaduras *WT* y F468A mostraron morfología normal aun cuando fueron crecidas en un medio bajo en hierro (YNB suplementado) (fig. 27).

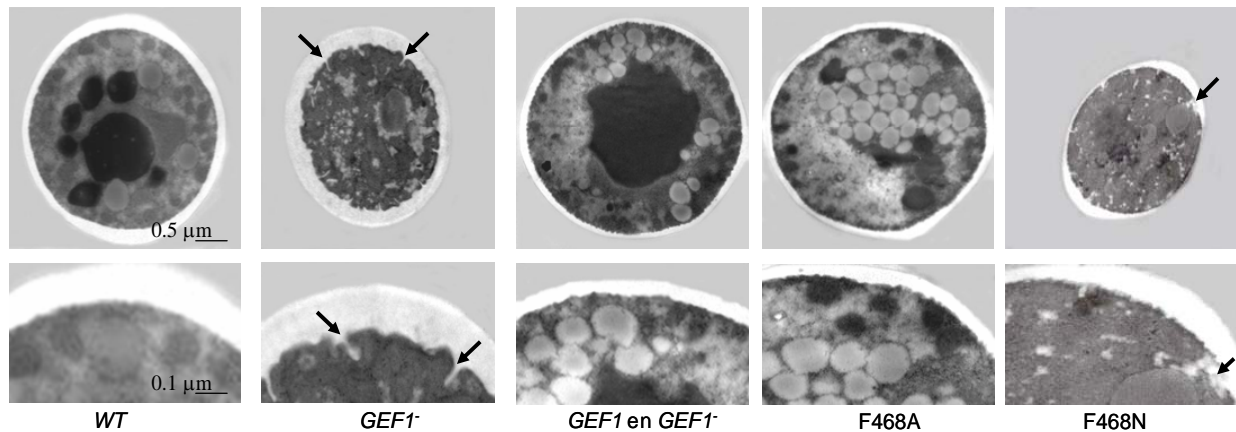


Figura 27. Ultraestructura de las cepas *WT* y *pet*. La cepa *WT* presenta íntegra la membrana plasmática además de una distribución de los organelos normal y semejante a las levaduras revertidas: *GEF1* en *GEF1* y F468A. La levadura *GEF1*⁻ y F468N muestran pliegues en la membrana plasmática (flechas) además de una definición anormal de los organelos.

6.5.4 Ultraestructura de *GEF1*⁻.

El análisis a detalle de la ultraestructura de *GEF1*⁻ reveló la presencia de complejos, formando estructuras cilíndricas asociadas con partículas electrodensas altamente organizadas, que probablemente corresponden a proteínas ensambladas en membranas. La figura 28 muestra un ejemplo de estas estructuras en una célula en división; estas se observaron en preparaciones independientes, pero no en las cepas *WT* ni en las cepas revertidas. De manera interesante, estas estructuras tampoco se observaron en las cepas *pet* expresando la mutante F468N.

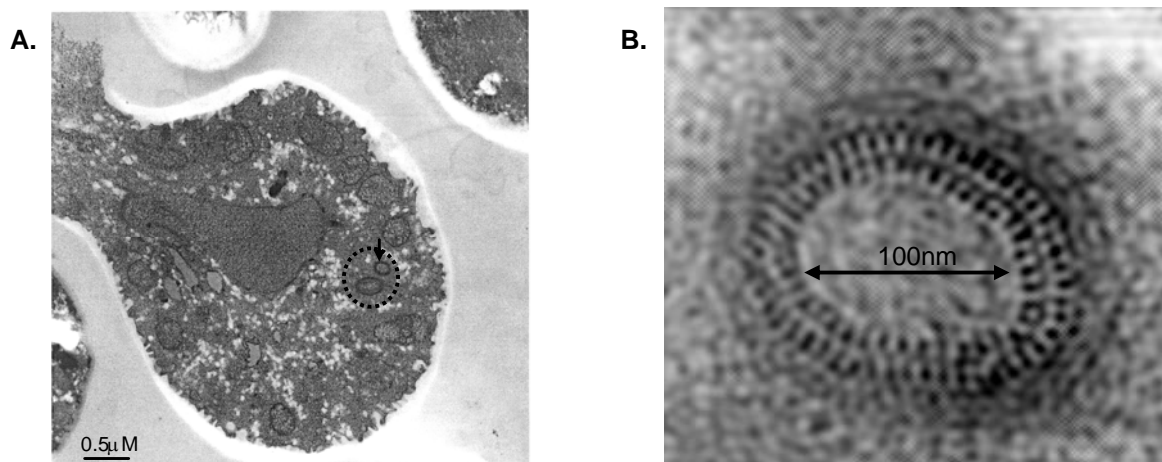


Figura 28. Partículas electrodensas condensadas en membranas intracelulares. A. Levadura knock-out (*GEF1*⁻) en gemación mostrando dos complejos (señalados por el círculo) B. Magnificación de la estructura señalada por la flecha en A.

VII. Discusión.

En el genoma de la levadura *S. cerevisiae* sólo hay tres proteínas conocidas que podrían permitir el transporte de cloro: VDAC es una proteína mitocondrial para transporte de aniones (incluido el Cl⁻) (Colombini y cols., 1996), el cotransportador Na⁺/K⁺/Cl⁻ (YBR235w) (André y Scerens, 1995) y Gef1p. Por tanto, Gef1p sería una de las proteínas potencialmente implicada en el transporte de Cl⁻. Sin embargo, las cepas knock-out (*GEF1*⁻) son capaces de sobrevivir, sugiriendo que no es indispensable para el metabolismo de las levaduras.

A pesar que la evidencia señala que la levadura no transporta Cl⁻ (Conway y Downey, 1950), evidencias indirectas como la reversión del fenotipo *petite* de *GEF1*⁻ al expresar proteínas homólogas (Flis y cols., 2005; Kida y cols., 2001; Miyazaky y cols., 1999; Gaxiola y cols., 1999; Borsani y cols., 1995) y la conducción de Cl⁻ en fracciones microsomales sobreexpresando Gef1p sugieren que esta proteína funciona como un canal de Cl⁻ (Flis y cols., 2002).

Este trabajo muestra evidencias de la actividad de Gef1p en el transporte de Cl⁻ en la levadura así como su expresión en membrana plasmática y organelos; además se estudiaron algunos de los residuos aminoacídicos importantes para su función.

Gef1p es una proteína que conduce Cl⁻.

Hace algunos años se encontró una corriente de Cl⁻ activada por cambios en el voltaje al inyectar en ovocitos de *X. laevis* diversas fracciones de RNAm proveniente del órgano eléctrico de la raya *Torpedo*. Además se observó una reducción en el potencial de membrana de los ovocitos inyectados (Sumikawa y cols., 1984). El gen implicado en esta función después fue clonado y se le llamó CIC-0 (Jentsch y cols., 1990), ahora se sabe que esta proteína pertenece a la misma familia que Gef1p.

Para tratar de definir las propiedades de Gef1p procedimos a inyectar *GEF1* y *GEF1*-GFP en ovocitos de *X. laevis*. De manera interesante la fluorescencia emitida por la quimera *GEF1*-GFP se encontró en regiones cercanas y/o en la membrana plasmática, dando el primer indicio de la expresión de esta proteína en este sitio, la cual sólo había sido evidenciada de manera intracelular (Schwappach y cols., 1998; Gaxiola y cols., 1999).

Por otra parte, al igual que CIC-0 (Sumikawa y cols., 1984), la inyección de *GEF1* en ovocitos indujo una reducción en el potencial de membrana, tal vez debido a la apertura constante y espontánea de un canal. Estos experimentos sugieren la posibilidad de que Gef1p pueda inducir o formar un canal activo en la membrana plasmática.

Mediante registros electrofisiológicos de microsomas enriquecidos con Gef1p incluidos en bicapas lipídicas, Flis y cols. (2002) proponen que Gef1p se asocia al transporte de Cl⁻ de manera dependiente del voltaje, permaneciendo abierto en voltajes que van de -60 a 60mV sugiriendo además que dicha corriente se cierra a voltajes negativos (~ -75mV). Sin embargo, en los ovocitos inyectados tanto con *GEF1* como con *GEF1*-GFP, a pesar de los diferentes protocolos empleados para inducir la activación del canal por voltaje, no se observaron corrientes generadas por cambios en el potencial de membrana (-20 a -120mV) y por tanto los mecanismos de activación aun son desconocidos.

Sin embargo, la adición de bloqueadores de canales de Cl^- a la solución extracelular de los ovocitos inyectados con *GEF1* indujo la despolarización del potencial de membrana, probablemente por provocar el cierre del canal que pudiera estar abierto de manera constitutiva. Tal efecto se observó también en los ovocitos expresando *GEF1*-GFP, aunque en éstos el efecto permaneció por más tiempo después de lavar el bloqueador, sugiriendo que esa fusión modifica la cinética del canal. En los ovocitos no inyectados ó inyectados con agua no se observó este efecto.

La fusión de GFP al carboxilo terminal de proteínas CIC ha sido previamente utilizada, mostrando que para CIC-3 esta fusión no afecta las propiedades biofísicas del canal (Park y cols., 1998; Rossow y cols., 2006) y para CIC-2 la fusión de GFP al amino terminal permitió la reversión del fenotipo mutante (*GEF1*) de *S. cerevisiae* al ser co-expresada con la proteína auxiliar Kha1p (Flis y cols., 2005). Los resultados obtenidos al analizar funcionalmente la quimera *GEF1*-GFP apoyan el hecho de que los miembros de la familia CIC al ser fusionados a GFP pueden presentar cinéticas diferentes.

Con la finalidad de corroborar estos resultados se transfectaron células HEK-293 con *GEF1* y *GEF1*-GFP. De manera similar a los resultados obtenidos en ovocitos se observó un canal abierto de manera constitutiva que se bloquea por NPPB y NFA y reduce la conductancia al usar soluciones extracelulares bajas en Cl^- . Los cambios en el potencial de membrana no inducen ninguna corriente, y la relación I-V de Gef1p sugiere que ni la conductancia ni los efectos de NPPB y NFA presentan dependencia al voltaje. El potencial de inversión de Gef1p ($\sim -9\text{mV}$) es más negativo que el potencial de inversión predicho por la ecuación de Nerst para Cl^- (-2mV), sugiriendo que Gef1p podría permitir la conducción de otros iones además de Cl^- como en otros miembros de la familia CIC (EcCIC, CIC-4 y 5) los cuales ahora se sabe son anti portadores $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ (Picollo y Push 2005, Schell y cols., 2005, Accardi y cols., 2005); aunque sería importante realizar otros estudios para definir claramente las propiedades del canal. Las células no transfectadas fueron insensibles a NPPB y NFA definiendo la importancia de *GEF1* para la expresión del canal de cloro.

Tanto el NPPB como el NFA han sido ampliamente utilizados para la caracterización de canales de cloro de la familia CIC (Huang y cols., 2005; Ernest y

cols., 2005; Suzuki y cols., 2005; Moreland y cols., 2006). De particular interés, Huang y cols (2005) reportaron dos isoformas de CIC-4 en células epiteliales gustativas: La isoforma CIC-4 es semejante a las previamente reportadas, y CIC-4A presenta una delección de 60 aminoácidos hacia el amino terminal. CIC-4 se activa a pH neutro (7.5 a 6.5) mientras CIC4A lo hace a pH ácido (<6.5). Además, la corriente generada se bloquea por NPPB y NFA sólo en CIC4A (Haung y cols., 2005). Haciendo una analogía con Gef1p además de su sensibilidad a estos mismos bloqueadores ésta es proteolíticamente procesada hacia el amino terminal, generando dos fragmentos (30 y 70 kDa) (Wachter y Schwappach, 2005), sugiriendo que la delección del extremo amino terminal podría favorecer la acción de estos fármacos y/o la sensibilidad al pH. Por otra parte, el pH intracelular de *S. cerevisiae* es ~6.5 (Haworth y cols., 1993) lo cual podría favorecer la actividad constitutiva de Gef1p en la levadura. Sería interesante probar esto haciendo más experimentos.

El transporte de Cl⁻ en la levadura.

Una vez que definimos la actividad de Gef1p como una proteína que conduce Cl⁻ de manera constitutiva en sistemas heterólogos, procedimos a analizar su actividad en la levadura. Se asumió que el fenotipo *petite* provocado por la delección de *GEF1* podría inducirse al exponer las levaduras a bloqueadores de canales de cloro como el NPPB, por lo que se probaron diferentes concentraciones del fármaco directamente sobre el medio de cultivo, encontrando que solo la dilución 10⁻³ M indujo un fenotipo similar al *petite* en la cepa *WT*; aunque microscópicamente se pudo observar que todas las diluciones (10⁻³ a 10⁻⁷M) provocaron aberraciones en la morfología celular, manifestada como múltiples pliegues ó malformaciones en la membrana plasmática, a pesar de que las células continuaron dividiéndose, sugiriendo que el fármaco usado no es letal.

Por otra parte, la exposición a NPPB de la cepa *GEF1* no indujo cambios aparentes en la morfología macroscópica ni microscópica, apoyando la idea de que NPPB bloquea la actividad de Gef1p. Este mismo efecto se observó al usar 9Ac (No mostrado).

El flujo de Cl⁻ en los compartimentos intracelulares fue observado por la emisión de fluorescencia de SPQ (Mahlangu y Dix, 2004; Dallwing y cols, 1999). Se observó la atenuación de la misma como una medida del flujo de Cl⁻; se encontró

una mayor atenuación en las cepas *WT* que en *GEF1⁻*, lo que indica un mayor flujo de iones en la primera. Resultados similares se obtuvieron al usar el fluoróforo MQAE (No mostrado). Lo anterior sugiere que aun que el transporte de cloro en la *S. cerevisiae* sea menor en comparación a otros iones y a otros organismos; Gef1p es al menos parcialmente responsable del flujo de Cl⁻ en la levadura, considerando además que el flujo remanente de Cl⁻ puede ser inducido por otros mecanismos de transporte como el cotransportador Na²⁺/K⁺/Cl⁻ (Coury y cols., 1999).

Por otra parte, la exposición de las levaduras a NPPB redujo la atenuación de manera semejante a *GEF1⁻*, apoyando el hallazgo de que éste tiene un efecto bloqueador sobre el transporte de cloro inducido por Gef1p.

Localización de Gef1p en *S. cerevisiae*.

Aunque Gef1p sólo había sido localizada de manera intracelular (Schwappach y cols., 1998; Gaxiola y cols., 1998); la fluorescencia de la quimera *GEF1*-GFP en regiones cercanas a la membrana plasmática, tanto en ovocitos como en células HEK-293, sugirió que esta proteína podría expresarse en membrana plasmática en la levadura. Con la finalidad de definir la localización de Gef1p en la levadura probamos dos quimeras en las que *GEF1* fue fusionado hacia el carboxilo terminal con GFP ó His (*GEF1*-GFP y *GEF1*-His). Dichas fusiones fueron expresadas en la cepa *GEF1⁻* probando que estas proteínas son capaces de revertir el fenotipo *petite* indicando con esto que siguen siendo funcionales.

Estas dos versiones modificadas de Gef1p se utilizaron para determinar su localización por inmuno-oro y microscopía electrónica. Independientemente de la marca usada (GFP o His), Gef1p se localizó en vesículas intracelulares, incluyendo la vacuola (Gaxiola y cols., 1999), mientras que la expresión en Golgi no fue del todo clara, aunque algunas de las vesículas marcadas podrían corresponder a este compartimento (Schwappach y cols., 1998). Esta localización en vesículas es congruente con la hipótesis propuesta en que la vía secretoria requiere Gef1p para transportar el Cl⁻ necesario para suministrar el cobre que activa a la enzima Fet3p, una enzima implicada en la activación de la cadena respiratoria (Davis-Kaplan y cols., 1998). La microscopía electrónica mostró también que Gef1p se localiza en el retículo endoplásmico (Wachter y Schwappach, 2005) y en la membrana plasmática. Aunque nuestros experimentos sugieren que Gef1p es una proteína funcional en

membrana plasmática no podemos descartar la posibilidad de que alcance esta región durante su tráfico en vesículas de secreción.

Importancia de la estructura del poro.

Una vez que se definió que Gef1p está implicada en el transporte de Cl⁻, procedimos a analizar algunos de los residuos sugeridos como importantes para la formación del poro en los CIC (Dutzler y cols., 2002). La expresión de once mutantes puntuales fue corroborada mediante RT-PCR y el impacto de las sustituciones aminoacídicas sobre Gef1p se analizó observando la capacidad de las mutantes puntuales de revertir el fenotipo *pet* de *GEF1*⁻, el consumo de O₂ y la ultraestructura.

Las sustituciones que no rescataron el fenotipo *petite* (S186A, I188N, I467A, I467N y F468N) no tuvieron ningún efecto dominante negativo sobre la cepa *WT*, sugiriendo que el transporte de Cl⁻ provisto por la proteína normal es suficiente para mantener el consumo de O₂, y consecuentemente una actividad respiratoria normal. En contraste ninguna de estas mutantes puntuales indujo la reversión del fenotipo *pet* ni recuperó su actividad respiratoria cuando fue expresada en la cepa *GEF1*⁻. Estas observaciones están de acuerdo con la importancia de estos residuos para coordinar los iones Cl⁻ unidos constitutivamente en el canal, como lo sugieren los estudios de cristalización (Dutzler y cols., 2002).

La sustitución de Y459, un residuo vecino al sitio de unión a Cl⁻ (S_{cen}), no fue tolerada. De manera similar a Gef1p, otros CIC de mamíferos poseen una Y, mientras CIC-1 y 2 poseen una T. El residuo equivalente en *E. coli* es F (F348), y este mismo residuo está presente en dos CIC de mamíferos que rescatan el fenotipo *pet* (CIC-3 y 5, Borsani y cols., 1995, Miyazaky cols., 1999). Sin embargo la sustitución Y459F en Gef1p no revirtió el fenotipo *pet*. De acuerdo al modelo estructural de EcCIC, F348 aparentemente está cercano al sitio de unión del ión Cl⁻ en el sitio S_{cen}, atravesando el poro, su papel en el posicionamiento de los iones constitutivamente unidos al poro no es muy claro; sin embargo en este trabajo sugerimos que es importante para la actividad de la proteína porque al sustituir por D ó por V se indujo la expresión de una proteína disfuncional incapaz de revertir el fenotipo *pet*.

El residuo Y en el motivo altamente conservado L/I Y D/S al final de la hélice R, se propone que coordina la unión del Cl⁻ en el sitio S_{cen} junto con S186 (Dutzler y cols., 2002). Sin embargo, este sitio está ocupado por A en Gef1p. En caso de ser

real la función del residuo Y coordinando el Cl⁻ en S_{cen} en Gef1p no habría un Cl⁻ en S_{cen}, aunque cabe mencionar que los estudios de cristalización de los CIC se hicieron en proteínas cuya conformación estaba en un estado cerrado. Estévez y cols. (2003) reportaron que al sustituir este residuo Y por A (Y578A) en CIC-1 el canal continúa siendo funcional; por lo que existe la posibilidad de que este residuo no ejerza una fuerte influencia en la conformación abierta del canal.

Las sustituciones A558F y A558Y, rescataron el fenotipo *pet* y recuperaron la actividad respiratoria. Considerando que Gef1p funciona como una proteína que permite el flujo constante de Cl⁻ sugerimos que el residuo A558 no es del todo responsable del posicionamiento de Cl⁻ en el sitio S_{cen}.

La evaluación de dos sustituciones en el residuo F468 de la hélice N (F468A y F468N) sugirieron la importancia de mantener un ambiente hidrofóbico para preservar la función de la proteína. Las mutaciones en el residuo homólogo en CIC-1 (F484A) reducen drásticamente la conductancia del canal (Estévez y cols., 2003), de manera consistente con nuestras observaciones. Por otra parte F468N no rescata el fenotipo *pet* ni recupera la actividad respiratoria, sugiriendo el impacto negativo de esta mutación en la función de la proteína.

El impacto de dos mutantes puntuales sobre las levaduras.

Se determinó el impacto de las mutaciones F468A y F468N sobre la morfología de las levaduras. Los fluoróforos MitoTracker (Rubino y cols., 2000) y brefeldina (Hetcherberg y Daum, 1995), mostraron evidencias de una organización irregular tanto de mitocondrias como en las vesículas en el tráfico entre aparato de Golgi y retículo endoplásmico; estas características fueron aparentemente similares entre F468N y *GEF1* mientras F468A parece similar a *WT* y *GEF1* en *GEF1*.

El análisis detallado de la ultraestructura de las mutantes F468N y *GEF1* reveló la presencia de pliegues en la membrana plasmática, disgregación de los organelos y desacople del retículo mitocondrial. Las levaduras con deficiencias respiratorias típicamente reducen el número de citocromos y exhiben mitocondrias pobremente diferenciadas (Torkko y cols., 2001); este efecto fue observado tanto en *GEF1* como en F468N.

De particular interés durante el análisis de la ultra estructura se observó la formación de estructuras aún no definidas que parecen formar complejos proteínas-

membranas en *GEF1*⁻. Estas estructuras sólo se observaron en el knock-out de *GEF1* y no en las cepas transformadas con los mutantes puntuales de *GEF1*, sugiriendo que podría ser generada sólo en la ausencia de Gef1p. Sin embargo sería interesante hacer un análisis más detallado de mutantes *pet* para tratar de dilucidar el origen de estas estructuras.

Los pliegues observados en membrana plasmática se parecen a los observados en cepas mutantes de los genes de la enzima inositol 5-fostatasa: Synaptotajina (SJL1-3) implicada en control de calidad de membrana plasmática y procesos de reciclaje de las proteínas de membrana a los lisosomas; estas mutantes generan “pseudo-compartimentos intracelulares” formadas por las invaginaciones membranales que rodean proteínas citoplásmicas y se presentan en regiones cercanas a la membrana plasmática (Sarivasan y cols., 1997); aunque, estas no parecen ser iguales a las estructuras cilíndricas observadas en *GEF1*⁻, además las mutantes SJL1-3 no desarrollan el fenotipo *pet*.

Por otra parte en un modelo basado en consideraciones termodinámicas para predecir cómo las bombas y canales iónicos regulan el pH, propone varias combinaciones de canales y transportadores iónicos que de acuerdo a sus propiedades funcionales podrían regular las diferencias de pH entre endosomas (~6.0) y lisosomas (~5.0) (Rybak y cols., 1997). Este modelo sugiere que los CICs pueden ser el mecanismo por el cual se regula esta diferencia. En apoyo a esta hipótesis; los CICs 3 y 6 han sido evidenciados en pre-lisosomas (Poet y cols., 2006), el CIC-5 co-localiza con una bomba de protones en endosomas apicales (Gunther y cols., 1998) y la delección de esta proteína reduce la acidificación endosomal (Hara-Chikuma y cols., 2005), además el CIC-7 se ha encontrado en lisosomas y endosomas tardíos (Kornak y cols., 2001; Kasper y cols., 2005)

En el caso de Gef1p la inmunolocalización no reveló con claridad su presencia en los endosomas; sin embargo si Gef1p se localiza en la membrana plasmática existe la posibilidad de que pudiera ser funcional en endosomas. Aunado esto a el hecho de que Gef1p fue localizado en vesículas post-Golgi, un compartimento especializado en el procesamiento de proteínas, sugiere que Gef1p además de su papel en la activación de la enzima Fet3 (que a su vez activa la citocromo c oxidasa) (Davis-Kaplan y cols., 1998), podría influenciar el control de calidad de la membrana plasmática al afectar el balance del reciclaje de proteínas de

membrana, sirviendo en ambos casos como contra-ión para el transporte de otros iones en vesículas acidificadas, actividad que sería favorecida en el caso de que Gef1p realmente actúe como cotransportador Cl^-/H^+ ; sin embargo es necesario hacer otros experimentos para probar esta hipótesis

VIII. Conclusiones.

En los sistemas heterólogos utilizados, tanto ovocitos como células HEK-293; *GEF1* expresa una proteína que conduce Cl^- , formando un canal constitutivamente abierto que se localiza en membrana plasmática, retículo endoplásmico, vacuola y otras vesículas. Aunque en este trabajo no definimos los mecanismos de activación; nuestros datos sugieren que podría tratarse de un antiportador como es el caso de EcCIC, CIC-4 y CIC-5.

Mediante el uso del fluoróforo indicador de aniones (SPQ) definimos que el flujo de Cl^- en la levadura *GEF1* es menor que en la cepa silvestre. Además se determinó la localización de Gef1p mediante inmuno-oro y microscopía electrónica en la membrana plasmática de la levadura.

La delección de *GEF1*, la exposición a bloqueadores de canales de Cl^- , así como la inducción de mutantes disfuncionales provoca la formación de invaginaciones en la membrana plasmática y malformaciones en los organelos de la levadura.

Se hicieron once mutantes para definir algunos aminoácidos importantes en la estructura-función de esta proteína; analizando la capacidad de estos para revertir el fenotipo *pet* inducido por la delección de *GEF1*. Las sustituciones S186A, I188N, Y459D, Y459F, Y459V, I467A, I467N y F348N no rescataron el fenotipo *pet* mientras F348A, A558F y A558Y indujeron la formación de colonias semejantes a la cepa *WT*, estos resultados sugieren la importancia de mantener un ambiente hidrofóbico en el poro del canal.

membrana, sirviendo en ambos casos como contra-ión para el transporte de otros iones en vesículas acidificadas, actividad que sería favorecida en el caso de que Gef1p realmente actúe como cotransportador Cl^-/H^+ ; sin embargo es necesario hacer otros experimentos para probar esta hipótesis

VIII. Conclusiones.

En los sistemas heterólogos utilizados, tanto ovocitos como células HEK-293; *GEF1* expresa una proteína que conduce Cl^- , formando un canal constitutivamente abierto que se localiza en membrana plasmática, retículo endoplásmico, vacuola y otras vesículas. Aunque en este trabajo no definimos los mecanismos de activación; nuestros datos sugieren que podría tratarse de un antiportador como es el caso de EcCIC, CIC-4 y CIC-5.

Mediante el uso del fluoróforo indicador de aniones (SPQ) definimos que el flujo de Cl^- en la levadura *GEF1* es menor que en la cepa silvestre. Además se determinó la localización de Gef1p mediante inmuno-oro y microscopía electrónica en la membrana plasmática de la levadura.

La delección de *GEF1*, la exposición a bloqueadores de canales de Cl^- , así como la inducción de mutantes disfuncionales provoca la formación de invaginaciones en la membrana plasmática y malformaciones en los organelos de la levadura.

Se hicieron once mutantes para definir algunos aminoácidos importantes en la estructura-función de esta proteína; analizando la capacidad de estos para revertir el fenotipo *pet* inducido por la delección de *GEF1*. Las sustituciones S186A, I188N, Y459D, Y459F, Y459V, I467A, I467N y F348N no rescataron el fenotipo *pet* mientras F348A, A558F y A558Y indujeron la formación de colonias semejantes a la cepa *WT*, estos resultados sugieren la importancia de mantener un ambiente hidrofóbico en el poro del canal.

Referencias

1. Accardi A, Miller C. Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl⁻ channels. *Nature*. (2004) 427, 803-7.
2. Accardi A, Walden M, Nguitragool W, Jayaram H, Williams C, Miller C. Separate ion pathways in a Cl⁻/H⁺ exchanger. *J Gen Physiol*. (2005) 126, 563-70.
3. Andre B, Scherens B. The yeast YBR235w gene encodes a homolog of the mammalian electroneutral Na⁽⁺⁾-(K⁽⁺⁾)-Cl⁻ cotransporter family. *Biochem Biophys Res Commun*. (1995) 217, 150-3.
4. Askwith CC, Kaplan J. Site-directed mutagenesis of the yeast multicopper oxidase Fet3p. *J Biol Chem*. (1998) 273, 22415-9.
5. Ausubel F.M, Brent R, Kingston R.E, Moore D.D, Seidman J.G, Smith J.A, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York. Sci. USA 1 (1993) 13.12.1-13.12.3.
6. Ausubel F.M, Brent R, Kingston R.E, Moore D.D, Seidman J.G, Smith J.A and Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, Wiley, New York. Sci. USA 86 (1997) 1434-1438.
7. Avila G, Sandoval A, Felix R. Intramembrane charge movement associated with endogenous K⁺ channel activity in HEK-293 cells. *Cell Mol Neurobiol*. (2004) 24, 317-30.
8. Barbier-Brygoo H, Vinauger M, Colcombet J, Ephritikhine G, Frachisse J, Maurel C. Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochim Biophys Acta*. (2000) 1465, 199-218.
9. Bennetts B, Rychkov GY, Ng HL, Morton CJ, Stapleton D, Parker MW, Cromer BA. Cytoplasmic ATP-sensing domains regulate gating of skeletal muscle ClC-1 chloride channels. *J Biol Chem*. (2005) 280, 32452-8.
10. Biwersi J, Tulk B, Verkman AS. Long-wavelength chloride-sensitive fluorescent indicators. *Anal Biochem*. (1994) 219, 139-43.
11. Borsani G, Rugarli EI, Tagliabue M, Wong C, Ballabio A. Characterization of a human and murine gene (CLCN3) sharing similarities to voltage-gated chloride channels and to a yeast integral membrane protein. *Genomics*. (1995) 27, 131-41
12. Breuer W, Skorecki KL. Inhibition of prostaglandin E2 synthesis by a blocker of epithelial chloride channels. *Biochem Biophys Res Commun*. (1989) 163, 398-405.
13. Burke D, Dawson D, Stearns T. *Methods in Yeast Genetics*. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. CSHL Press. (2000) 147 y 199
14. Chen TY. Structure and function of clc channels. *Annu Rev Physiol*. (2005) 67:809-39.
15. Colombini M, Blachly-Dyson E, Forte M. VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. *Ion Channels*. (1996) 4:169-202.
16. Conway E.J, Downey M. An outer metabolic region of the yeast cell. *Biochem J*. 47 (1950) 347-55.
17. Coury LA, McGeoch JE, Guidotti G, Brodsky JL. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* does not sequester chloride but can express a functional mammalian chloride channel. *FEMS Microbiol Lett*. (1999) 179, 327-32.
18. Dallwig R, Deitmer JW, Backus KH. On the mechanism of GABA-induced currents in cultured rat cortical neurons. *Pflugers Arch*. (1999) 437, 289-97.
19. Dancis A. Genetic analysis of iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Pediatr*. (1998) 132, S24-9.
20. Davis-Kaplan SR, Askwith CC, Bengtzen AC, Radisky D, Kaplan J. Chloride is an allosteric effector of copper assembly for the yeast multicopper oxidase Fet3p: an unexpected role for intracellular chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1998) 95, 13641-5.

21. Dix DR, Bridgham JT, Broderius MA, Byersdorfer CA, Eide DJ. The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* (1994) 269, 26092-9.
22. Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature.* (2002) 415, 287-94.
23. Dutzler R, Campbell EB, MacKinnon R. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science.* (2003) 300, 108-12.
24. Dutzler R. The structural basis of ClC chloride channel function. *Trends Neurosci.* (2004) 27, 315-20
25. Ernest NJ, Weaver AK, Van Duyn LB, Sontheimer HW. Relative contribution of chloride channels and transporters to regulatory volume decrease in human glioma cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* (2005) 288, 1451-60
26. Estevez R, Jentsch TJ. ClC chloride channels: correlating structure with function. *Curr Opin Struct Biol.* (2002) 531-9.
27. Fahlke C. Ion permeation and selectivity in ClC-type chloride channels. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2001) 280, 748-57.
28. Flis K, Bednarczyk P, Hordejuk R, Szewczyk A, Berest V, Dolowy K, Edelman A, Kurlandzka A. The Gef1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is associated with chloride channel activity. *Biochem Biophys Res Commun.* (2002) 294, 1144-50.
29. Flis K, Hinzpeter A, Edelman A, Kurlandzka A. The functioning of mammalian ClC-2 chloride channel in *Saccharomyces cerevisiae* cells requires an increased level of Kha1p. *Biochem J.* (2005) 390, 655-64.
30. Fong P, Rehfeldt A, Jentsch TJ. Determinants of slow gating in ClC-0, the voltage-gated chloride channel of *Torpedo marmorata*. *Am J Physiol.* (1998) 274, C966-73.
31. Gadsby DC. Ion transport: spot the difference. *Nature.* (2004) 427, 795-7.
32. Gaxiola RA, Yuan DS, Klausner RD, Fink GR. The yeast ClC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1998) 95, 4046-50.
33. Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1999) 96, 1480-5.
34. Giles KR, Humphries M, Abell A, Garrill A. The synthesis of NPPB and NPBB by reductive amination and the effects of these compounds on K⁺ channels of the alga *Nitella hookeri*. *Bioorg Med Chem Lett.* (2003) 13, 293-5.
35. Greene JR, Brown NH, DiDomenico BJ, Kaplan J, Eide DJ. The GEF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth. *Mol Gen Genet.* (1993) 241, 542-53.
36. Gunther W, Luchow A, Cluzeaud F, Vandewalle A, Jentsch TJ. ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1998) 95, 8075-80.
37. Halliwell RF, Thomas P, Patten D, James CH, Martinez-Torres A, Miledi R, Smart TG. Subunit-selective modulation of GABAA receptors by the non-steroidal anti-inflammatory agent, mefenamic acid. *Eur J Neurosci.* (1999), 2897-905.
38. Hara-Chikuma M, Wang Y, Guggino SE, Guggino WB, Verkman AS. Impaired acidification in early endosomes of ClC-5 deficient proximal tubule. *Biochem Biophys Res Commun.* (2005) 329, 941-6.
39. Haworth RS, Fliegel L. Intracellular pH in *Schizosaccharomyces pombe*--comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem.* (1993) 124, 131-40.
40. Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy. *Biological Applications*, Vol. 1. 2nd edn. University Park Press, Baltimore, (1981) 301-353.
41. Hechenberger M, Schwappach B, Fischer WN, Frommer WB, Jentsch TJ, Steinmeyer K. A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a ClC gene disruption. *J Biol Chem.* (1996) 271, 33632-8.

42. Hechtberger P, Daum G. Intracellular transport of inositol-containing sphingolipids in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* (1995) 367, 201-4.
43. Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M, Chagoya de Sanchez V. Effects of adenosine administration on the function and membrane composition of liver mitochondria in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Arch Biochem Biophys.* (1992) 294, 160-7.
44. Huang L, Cao J, Wang H, Vo LA, Brand JG. Identification and functional characterization of a voltage-gated chloride channel and its novel splice variant in taste bud cells. *J Biol Chem.* (2005) 280, 36150-7.
45. Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G. Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature.* (1990) 348, 510-4.
46. Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev.* (2002) 82, 503-68.
47. Jentsch TJ. Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: emerging roles of CLC chloride transporters. *J Physiol.* (2007) 578, 633-40.
48. Kasper D, Planells-Cases R, Fuhrmann JC, Scheel O, Zeitz O, Ruether K, Schmitt A, Poet M, Steinfeld R, Schweizer M, Kornak U, Jentsch TJ. Loss of the chloride channel CLC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration. *EMBO J.* (2005) 24, 1079-91.
49. Keeling DJ, Taylor AG, Smith PL. Effects of NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid) on chloride transport in intestinal tissues and the T84 cell line. *Biochim Biophys Acta.* (1991) 1115, 42-8.
50. Kida Y, Uchida S, Miyazaki H, Sasaki S, Marumo F. Localization of mouse CLC-6 and CLC-7 mRNA and their functional complementation of yeast CLC gene mutant. *Histochem Cell Biol.* (2001) 115, 189-94.
51. Kornak U, Kasper D, Bosl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ. Loss of the CLC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell.* (2001) 104, 205-15.
52. Lange PF, Wartosch L, Jentsch TJ, Fuhrmann JC. CLC-7 requires Ostml as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature.* (2006) 440, 220-3.
53. Lindenthal S, Schmieder S, Ehrenfeld J, Wills NK. Cloning and functional expression of a CLC Cl⁻ channel from the renal cell line A6. *Am J Physiol.* (1997) 273, C1176-85.
54. Lobet S, Dutzler R. Ion-binding properties of the CLC chloride selectivity filter. *EMBO J.* (2006) 25, 24-33.
55. MacKinnon R. Nobel Lecture. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction. *Biosci Rep.* (2004) 24, 75-100.
56. Maduke M, Williams C, Miller C. Formation of CLC-0 chloride channels from separated transmembrane and cytoplasmic domains. *Biochemistry.* (1998) 37, 1315-21.
57. Maduke M, Pheasant DJ, Miller C. High-level expression, functional reconstitution, and quaternary structure of a prokaryotic CLC-type chloride channel. *J Gen Physiol.* (1999) 114, 713-22.
58. Maduke M, Miller C, Mindell JA. A decade of CLC chloride channels: structure, mechanism, and many unsettled questions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* (2000) 29:411-38.
59. Mahlangu DA, Dix JA. Halide fluxes in epithelial cells measured with an automated cell plate reader. *Anal Biochem.* (2004) 325, 28-34.
60. Miller C and White MM. Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Proc Natl Acad Sci USA* (1984) 81:2772-2775,.
61. Mindell JA, Maduke M, Miller C, Grigorieff N. Projection structure of a CLC-type chloride channel at 6.5 Å resolution. *Nature.* (2001) 409, 219-23.
62. Miyazaki H, Uchida S, Takei Y, Hirano T, Marumo F, Sasaki S. Molecular cloning of CLC chloride channels in *Oreochromis mossambicus* and their functional complementation of yeast CLC gene mutant. *Biochem Biophys Res Commun.* (1999) 255, 175-81.
63. Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature.* (2000) 407, 599-605.

64. Nelson H, Nelson N. The progenitor of ATP synthases was closely related to the current vacuolar H⁺-ATPase. *FEBS Lett.* (1989) 247, 147-53.
65. Parker I, Miledi R. A calcium-independent chloride current activated by hyperpolarization in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* (1988) 233, 191-9.
66. Picollo A, Pusch M. Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CIC-4 and CIC-5. *Nature.* (2005) 436, 420-3.
67. Poet M, Kornak U, Schweizer M, Zdebik AA, Scheel O, Hoelter S, Wurst W, Schmitt A, Fuhrmann JC, Planells-Cases R, Mole SE, Hubner CA, Jentsch TJ. Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CIC-6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2006) 103, 13854-9.
68. Pusch M, Ludewig U, Rehfeldt A, Jentsch TJ. Gating of the voltage-dependent chloride channel CIC-0 by the permeant anion. *Nature.* (1995) 373, 527-31.
69. Pusch M, Jordt SE, Stein V, Jentsch TJ. Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *J Physiol.* (1999) 515, 341-53.
70. Pusch M, Jentsch TJ. Unique structure and function of chloride transporting CLC proteins. *IEEE Trans Nanobioscience.* (2005) 4(1):49-57.
71. Rubino L, Di Franco A, Russo M. Expression of a plant virus non-structural protein in *Saccharomyces cerevisiae* causes membrane proliferation and altered mitochondrial morphology. *J Gen Virol.* (2000) 8, 279-86.
72. Raguzzi F, Lesuisse E, Crichton RR. Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* (1988) 231, 253-8.
73. Rossow C.F, Duan D, Hatton W.J, Britton F, Hume J.R and Horowitz B. Functional role of amino terminus in CIC-3 chloride channel regulation by phosphorylation and cell volume. *Acta Physiol* (2006) 187, 5–19
74. Rosenfeld E, Beauvoit B. Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* (2003) 20, 1115-44.
75. Rybak IA, Paton JF, Schwaber JS. Modeling neural mechanisms for genesis of respiratory rhythm and pattern. III. Comparison of model performances during afferent nerve stimulation. *J Neurophysiol.* (1997) 77, 2027-39.
76. Scheel O, Zdebik AA, Lourdel S, Jentsch TJ. Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature.* (2005) 436, 424-7.
77. Schwappach B, Stobrawa S, Hechenberger M, Steinmeyer K, Jentsch TJ. Golgi localization and functionally important domains in the NH₂ and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Gef1p. *J Biol Chem.* (1998) 273, 15110-8.
78. Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest.* (2004) 113, 274-84.
79. Srinivasan S, Seaman M, Nemoto Y, Daniell L, Suchy SF, Emr S, De Camilli P, Nussbaum R. Disruption of three phosphatidylinositol-polyphosphate 5-phosphatase genes from *Saccharomyces cerevisiae* results in pleiotropic abnormalities of vacuole morphology, cell shape, and osmohomeostasis. *Eur J Cell Biol.* (1997) 74, 350-60.
80. Steward CG. Neurological aspects of osteopetrosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* (2003) 29, 87-97.
81. Sumikawa K, Parker I, Amano T, Miledi R. Separate fractions of mRNA from Torpedo electric organ induce chloride channels and acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* (1984), 2291-4.
82. Suzuki M, Morita T, Iwamoto T. Diversity of Cl⁻ channels. *Cell Mol Life Sci.* (2006) 63, 12-24.
83. Torkko JM, Koivuranta KT, Miinalainen IJ, Yagi AI, Schmitz W, Kastaniotis AJ, Airene TT, Gurvitz A, Hiltunen KJ. *Candida tropicalis* Etr1p and *Saccharomyces cerevisiae* Ybr026p (Mrf1p), 2-enoyl thioester reductases essential for mitochondrial respiratory competence. *Mol Cell Biol.* (2001) 6243-53.
84. Umemoto N, Yoshihisa T, Hirata R, Anraku Y. Roles of the VMA3 gene product, subunit c of the vacuolar membrane H⁽⁺⁾-ATPase on vacuolar acidification and protein transport. A study

- with VMA3-disrupted mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. (1990) 265, 18447-53.
85. Wada Y, Ohsumi Y, Anraku Y. Chloride transport of yeast vacuolar membrane vesicles: a study of in vitro vacuolar acidification. *Biochim Biophys Acta*. (1992) 1101(3):296-302.
 86. Wachter A, Schwappach B. The yeast CLC chloride channel is proteolytically processed by the furin-like protease Kex2p in the first extracellular loop. *FEBS Lett*. (2005) 579, 1149-53.
 87. Weber W. Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta*. (1999) 1421, 213-33.
 88. White MM AND Miller C. A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*. *J Biol Chem* (1979) 254, 10161–10166.
 89. Yusef YR, Zuniga L, Catalan M, Niemeyer MI, Cid LP, Sepulveda FV. Removal of gating in voltage-dependent ClC-2 chloride channel by point mutations affecting the pore and C-terminus CBS-2 domain. *J Physiol*. (2006) 572, 173-81.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de EcCIC.	6
Figura 2. Estructura del poro de los CIC.	7
Figura 3. Modelo esquemático para el transporte de cloro en canales y transportadores.	9
Figura 4. Estrategia para caracterizar funcionalmente Gef1p en sistemas heterólogos.	12
Figura 5. Estrategia para definir la función y la localización de Gef1p.	13
Figura 6. Estrategia para analizar el efecto de la expresión de los mutantes del gen <i>GEF1</i> sobre la morfología de cepas <i>WT</i> y <i>pet (GEF1)</i> .	13
Figura 7. El fenotipo <i>pet</i> es inducido por la delección de <i>GEF1</i> .	20
Figura 8. Clonación de <i>GEF1</i> en pEGFP-N2 y pCDNA3.	21
Figura 9. Expresión de la quimera <i>GEF1</i> -GFP en ovocitos de <i>X. laevis</i> .	22
Figura 10. Expresión funcional de Gef1p en ovocitos de <i>X. laevis</i> .	22
Figura 11. Expresión funcional de <i>GEF1</i> -GFP en ovocitos de <i>X. laevis</i> .	23
Figura 12. Expresión de la quimera <i>GEF1</i> -GFP en células HEK-293.	24
Figura 13. Expresión funcional de Gef1p en células HEK-293.	24
Figura 14. Efecto de NPPB y NFA sobre células HEK-293 expresando <i>GEF1</i> .	25
Figura 15. Efecto del NPPB sobre a morfología de las levaduras <i>WT</i> y <i>GEF1</i> .	26
Figura 16. Efecto del NPPB sobre la morfología microscópica de <i>WT</i> y NPPB.	27
Figura 17. El flujo de Cl ⁻ en <i>S. cerevisiae</i> medido mediante SPQ.	27
Figura 18. Fusión de <i>GEF1</i> con GFP ó His en vectores de expresión.	28
Figura 19. Reversión del fenotipo <i>pet</i> por <i>GEF1</i> -His y <i>GEF1</i> -GFP.	29
Figura 20. Localización de Gef1p en <i>S. cerevisiae</i> .	30
Figura 21. Topología de las proteínas.	31
Figura 22. Expresión de las mutantes puntuales en la cepa <i>WT</i> .	31
Figura 23. Expresión de las mutantes puntuales en la cepa <i>pet (GEF1)</i> .	32
Figura 24. Gráfica del diámetro celular de las levaduras.	33
Figura 25. Efecto de las mutantes puntuales sobre el consumo de oxígeno.	34
Figura 26. Actividad mitocondrial y distribución de los organelos.	35
Figura 27. Ultra estructura de las cepas <i>WT</i> y <i>pet</i> .	35
Figura 28. Partículas electrodensas condensadas en membranas intracelulares.	36

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla1. Condiciones de PCR para obtener el gen <i>GEF1</i> normal y mutante.	15

Apéndice I

Medios de Cultivo

YPD

1.0%	Extracto de levadura
1.0%	Peptona
2.0%	D-glucosa

YNB s/U-L (Medio selectivo- primer selección)

0.67%	YNB (Yeast Nitrogen Base)
2.0%	D-glucosa
20 mg/ml	Leucina
20 mg/ml	Histidina
20 mg/ml	Adenina
20 mg/ml	Triptófano

YNB s/U-L (Medio selectivo- segunda selección)

0.67%	YNB (Yeast Nitrogen Base)
2%	D-glucosa
20 mg/ml	Histidina
20 mg/ml	Adenina
20 mg/ml	Triptófano

YNB medio suplementado

0.67%	YNB (Yeast Nitrogen Base)
3%	Glicerol
2%	Etanol
0.5mM	CuSO ₄
20 mg/ml	Histidina
20 mg/ml	Adenina
20 mg/ml	Triptófano
1.0mM	Ferrozina

YPGE

2.0%	Peptona
1%	Extracto de levadura
3%	Glicerol
2%	Etanol
1.0M	Ferrozina

LB medio

1.0%	Triptona
0.5%	Extracto de levadura
1.0%	NaCl

Para preparar medio sólido se agregó 2% de BactoAgar.

Apéndice II

Oligonucleótidos.

Oligonucleótido	Secuencia	Descripción
Prima	ATG CCCAACAACCTTATGTGCCAATAAAATCAACCA	Oligo 5' se une sobre el codón de inicio de <i>GEF1</i>
Gef1Bam-H1	GGATCC TATAACCTTACCATTTCGATTAGT	Oligo 3' se une sobre el codón de paro y añade un sitio <i>Bam HI</i>
GCHI5'	CCC AAGCTT CGGATCCGATT ATG CCAACAAC	Oligo 5' se une sobre el codón de inicio de <i>GEF1</i> y añade un sitio <i>Bam HI</i>
GCRI3'	CCGTTA CTAGTGAATTC TATAACGTTACC	Oligo 3' se une sobre el codón de paro y añade un sitio <i>Eco RI</i>
GFP5'-a	GCATCGCCCTCGCCCTCGCC	Oligo3'. Se une a GFP (pEGFP-N2, se une a 780 pb) permite leer la fusión
Gef. 888	TCTGCGAATAGGTTCAACTCC	Se une al nucleótido 888 de <i>GEF1</i>
Gef926	TATTATGTGCGCCCTAGTCGC	Se une al nucleótido 926 de <i>GEF1</i>
SalGFP	GTAAAGCGCG GTCGACT CTAGATCATAATC	Oligo 3'. Añade un sitio <i>Sal I</i> al final de la secuencia de GFP (pGFP-N2)
pYEX-Rv	TTTGCAGCTACCACATT	Oligo 3'. Se une a pYEX-BX, permite leer el producto clonado.
S186A	CCTATGGCTACTGGT GCA GGAAATCTCAGAGATTAA	Oligo 5' mutagénico
S186Aa	TTAATCTCTGAGATTCC TGC ACCAGTAGCCATAGG	Oligo 3' mutagénico
I188N	GGCTACTGGTTTCAGGA AACT CAGAGATTAAGGTATGG	Oligo 5' mutagénico
I188Na	CCATACCTTAATCTCTGA GTT TCCTGAACCACTAGCC	Oligo 3' mutagénico
Y459F	GTTGGTAGTGGTATCA TTT GGCGCCAGAGTTCC	Oligo 5' mutagénico
Y459Fa	GGAACCTCTGGCGCC AAAT GATACCACTACCAAC	Oligo 3' mutagénico
Y459V	TTGTTGGTAGTGGTATCA GTT GGCGCCAGAGTTCTCG	Oligo 5' mutagénico
Y459Va	CAGGAACTCTGGCGCC AACT GATACCACTACCAACAA	Oligo 3' mutagénico
Y459D	GTTGGTAGTGGTATCA GAT GGCGCCAGAGTTCC	Oligo 5' mutagénico
Y459Da	GGAACCTCTGGCGCC ATCT GATACCACTACCAAC	Oligo 3' mutagénico
I467A	AGAGTTCCTGCGCGA GCC TTTGTTCCCTTCAATGGC	Oligo 5' mutagénico
I467Aa	GCCATTGAAGGAACAAA GGC TCCGGCAGGAACTCT	Oligo 3' mutagénico
I467N	AGAGTTCCTGCGCGA AACT TTTGTTCCCTTCAATGGC	Oligo 5' mutagénico
I467Na	GCCATTGAAGGAACAAA GTT TCCGGCAGGAACTCT	Oligo 3' mutagénico
F468A	GTTCTCCCGGAATC GCT GTTCCCTTCAATGGCG	Oligo 5' mutagénico
F468Aa	CGCCATTGAAGGAAC AGC GATTCCGGCAGGAAC	Oligo 3' mutagénico
F468N	GAGTTCCTGCGGAATC AAAT GTTCCCTTCAATGGCGGT	Oligo 5' mutagénico
F468Na	ACCGCCATTGAAGGAAC ATT GATTCCGGCAGGAACTC	Oligo 3' mutagénico
A558F	TCTGGTATTTCTGCGGTATT TTT GATCAAATGATCATGGTTAAT	Oligo 5' mutagénico
A558Fa	ATTAACCATGATCATTTGATC AAA AATACCGCCAGAAATACCAGA	Oligo 3' mutagénico
A558Y	TCTGGTATTTCTGCGGTATT TAT GATCAAATGATCATGGTTAAT	Oligo 5' mutagénico
A558Ya	ATTAACCATGATCATTTGATC ATA AATACCGCCAGAAATACCAGA	Oligo 3' mutagénico

Apéndice III

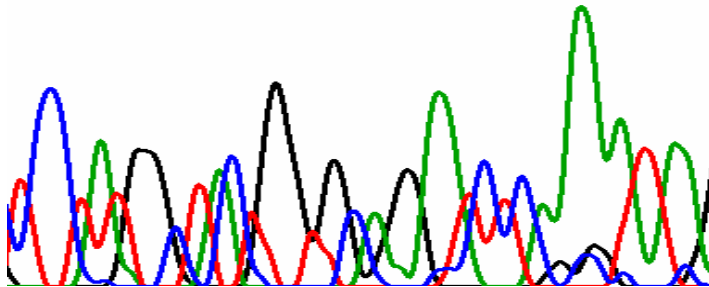
Mutantes puntuales

S186A

>[emb|Z23117.1|SCGEF1](#) S.cerevisiae GEF1 gene Length=4012 Score = 65.9 bits (33), Expect = 5e-09 Identities = 36/37 (97%), Gaps = 0/37 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
S186A      CCTATGGCTACTGGTGCAGGAATCTCAGAGATTAA 35
          |||
GEF1       CCTATGGCTACTGGTTCAGGAATCTCAGAGATTAA 575
```

```
          500      510      520      530
T CCTATGGCTACGGTGCAGGAATACTCTCAGAGATTAA
```

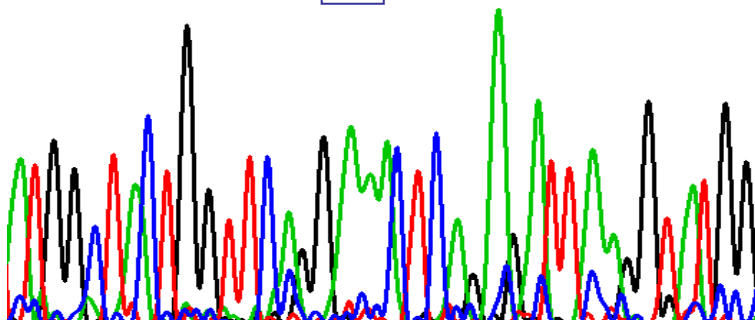


I188N

>[emb|Z23117.1|SCGEF1](#) S.cerevisiae GEF1 gene Length=4012 Score = 65.9 bits (33), Expect = 5e-09 Identities = 36/37 (97%), Gaps = 0/37 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
I188N      GGCTACTGGTTCAGGAACTCAGAGATTAAGGTATGG 37
          |||
GEF1       GGCTACTGGTTCAGGAATCTCAGAGATTAAGGTATGG 1049
```

```
          170      180      190      200
G G C T A C T G G T T C A G G A A C T C A G A C A T T A A G G T A T G G
```

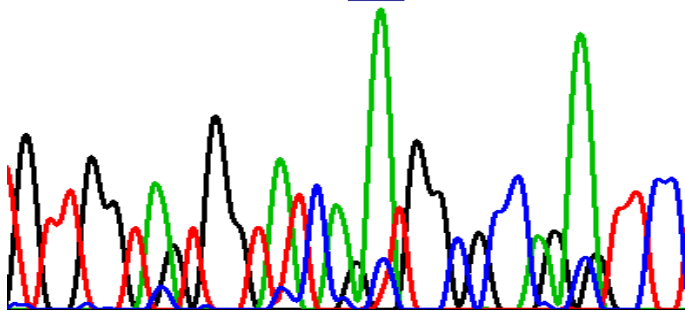


Y459D

>[emb|Z23117.1|SCGEF1](#) S.cerevisiae GEF1 gene Length=4012 Score = 65.9 bits (33), Expect = 5e-09 Identities = 36/37 (97%), Gaps = 0/37 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Y459D      GTTGGTAGTGGTATCAGATGGCGCCAGAGTTCC 33
           |||
GEF1       GTTGGTAGTGGTATCATATGGCGCCAGAGTTCC 1858
```

```
  420 430 440 4!
·G T T G G T A G T G G T A T C A G A T G G C G C C A G A G T T C C ·
```

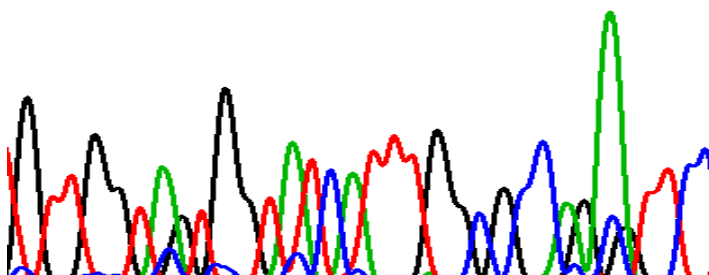


Y459F

>[emb|Z23117.1|SCGEF1](#) S.cerevisiae GEF1 gene Length=4012 Score = 65.9 bits (33), Expect = 5e-09 Identities = 36/37 (97%), Gaps = 0/37 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Y459F      GTTGGTAGTGGTATCATTTGGCGCCAGAGTTCC 33
           |||
GEF1       GTTGGTAGTGGTATCATATGGCGCCAGAGTTCC 1858
```

```
  420 430 440 450
·G T T G G T A G T G G T A T C A T T T G G C G C C A G A G T T C C ·
```



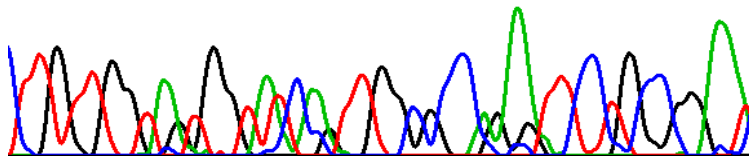
Y459V

>[emb|Z23117.1|SCGEF1](#) S.cerevisiae GEF1 gene Length=4012 Score = 65.9 bits (33), Expect = 5e-09 Identities = 36/37 (97%), Gaps = 0/37 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Y459V          TTGTTGGTAGTGGTATCAGTTGGCGCCAGAGTTCCTG 37
                |||
GEF1           TTGTTGGTAGTGGTATCATATGGCGCCAGAGTTCCTG 1860
                |||
:TTG420TTGGTA430GTT440GGCGCCAG450ANTT461NC461TGCCGGAAT

```



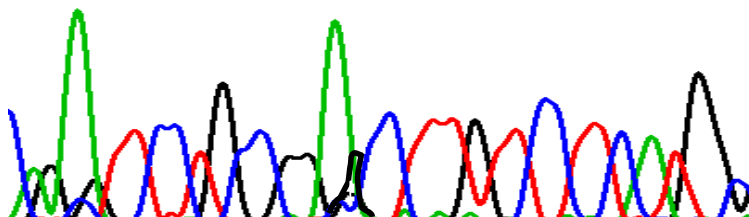
I467A

>[emb|Z23117.1|SCGEF1](#) S.cerevisiae GEF1 gene Length=4012 Score = 65.9 bits (33), Expect = 5e-09 Identities = 36/37 (97%), Gaps = 0/37 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

I467A          AGAGTTCCTGCCGGAGCCTTTGTTTCCTTCAATGGC 35
                |||
GEF1           AGAGTTCCTGCCGGAATCCTTTGTTTCCTTCAATGGC 1885
                |||
:AGAG450TTCCTGCCGGAG460GCCTTT470TGTTCTTCAA470TGGC

```

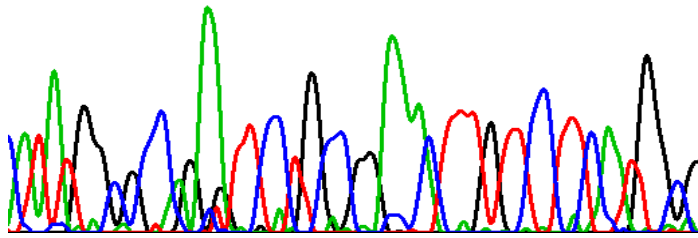


I467N

>[emb|Z23117.1|SCGEF1](#) S.cerevisiae GEF1 gene Length=4012 Score = 65.9 bits (33), Expect = 5e-09 Identities = 36/37 (97%), Gaps = 0/37 (0%) Strand=Plus/Plus

```
I467N      AGAGTTCCTGCCGGAAACTTTTGTTCCTTCAATGGC 35
          |||
GEF1       AGAGTTCCTGCCGGAATCTTTGTTCCTTCAATGGC 1885
          |||

      430      440      450      460      470
: A T A T G G C G C C A G A G T T C C T G C C G G A A A C T T T G T T C C T T C A A T G C C G
```

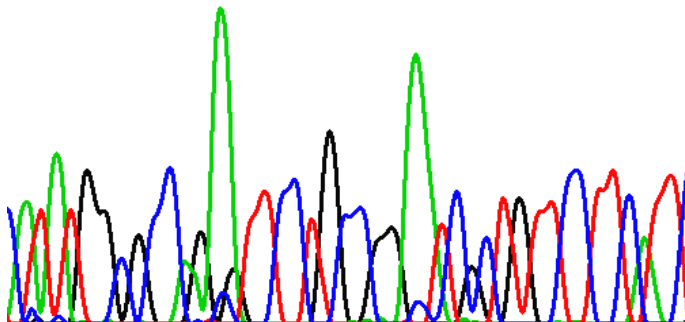


F468A

>[emb|Z23117.1|SCGEF1](#) S.cerevisiae GEF1 gene Length=4012 Score = 50.1 bits (25), Expect = 2e-04 Identities = 31/33 (93%), Gaps = 0/33 (0%) Strand=Plus/Plus

```
F468A      GTTCCTGCCGGAATCGCTGTTCCTTCAATGGCG 33
          |||
GEF1       GTTCCTGCCGGAATCTTTGTTCCTTCAATGGCG 1886
          |||

      440      450      460      470
: A T A T G G C G C C A G A G T T C C T G C C G G A A T C G C T G T T C C T T C A A T C
```

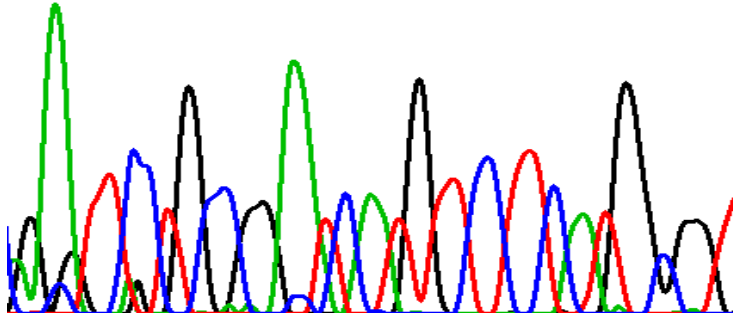


F468N

>[emb|Z23117.1|SCGEF1](#) S.cerevisiae GEF1 gene Length=4012 Score = 65.9 bits (33), Expect = 5e-09 Identities = 36/37 (97%), Gaps = 0/37 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
F468N      GAGTTCCTGCCGGAATCAATGTTTCCTTCAATGGCGGT 37
          |||
GEF1       GAGTTCCTGCCGGAATCTTTGTTTCCTTCAATGGCGGT 1888
```

```
      440      450      460      470
A G A G T T C C T G C C G G A A T C A A T G T T C C T T C A T G G C G G T T
```

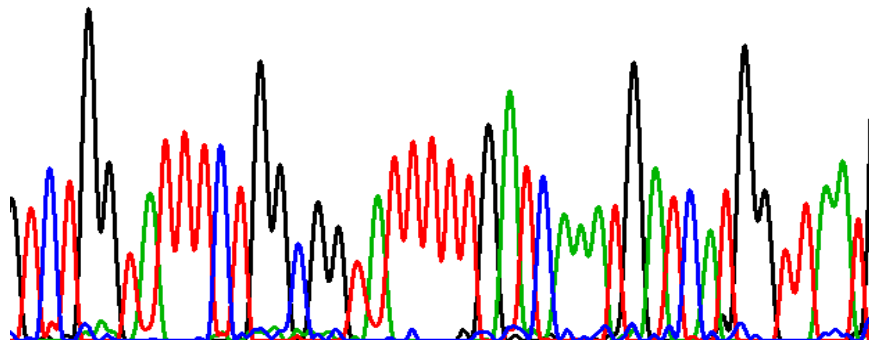


A558F

>[emb|Z23117.1|SCGEF1](#) S.cerevisiae GEF1 gene Length=4012 Score = 65.9 bits (33), Expect = 5e-09 Identities = 36/37 (97%), Gaps = 0/37 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
A558F      TCTGGTATTTCTGGCGGTATTTTGGATCAAATGATCATGGTTAAT 45
          |||
GEF1       TCTGGTATTTCTGGCGGTATTGCTGATCAAATGATCATGGTTAAT 2162
```

```
      240      250      260      270      280
T C T G G T A T T T C T G G C G G T A T T T T T G A T C A A A T G A T C A T G G T T A A T C
```

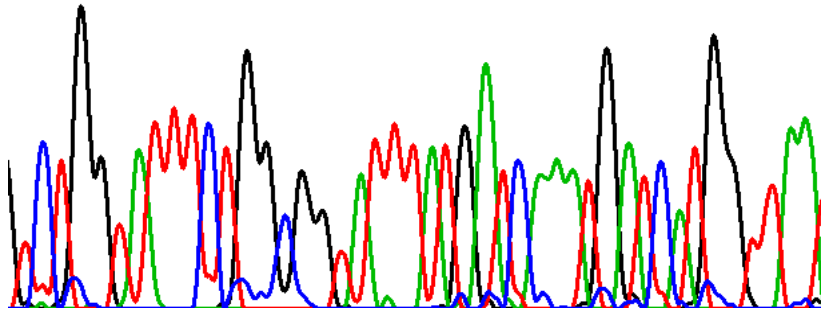


A558Y

>[emb|Z23117.1|SCGEF1](#) S.cerevisiae GEF1 gene Length=4012 Score = 65.9 bits (33), Expect = 5e-09 Identities = 36/37 (97%), Gaps = 0/37 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
A558Y      TCTGGTATTTCTGGCGGTATTTATGATCAAATGATCATGGTTAAT 45
|||||
GEF1      TCTGGTATTTCTGGCGGTATTGCTGATCAAATGATCATGGTTAAT 2162
```

```
      290      300      310      320      330
; TCTG G T A T T T C T G G C G G G T A T T T A T G A T C A A A T G A T C A T G G T T A A T
```



The product of the gene *GEF1* of *Saccharomyces cerevisiae* transports Cl^- across the plasma membrane

Angélica López-Rodríguez¹, Alfonso Cárabaz Trejo¹, Leanne Coyne², Robert F. Halliwell², Ricardo Miledi¹ & Ataúlfo Martínez-Torres¹

¹Instituto de Neurobiología, Departamento de Neurobiología Molecular y Celular, Universidad Nacional Autónoma de México – Campus Juriquilla, Querétaro, México; and ²T.J. Long School of Pharmacy & Health Sciences, University of the Pacific, Stockton, CA, USA

Correspondence: Ataúlfo Martínez-Torres, Instituto de Neurobiología, Departamento de Neurobiología Molecular y Celular, Universidad Nacional Autónoma de México – Campus Juriquilla, Querétaro, México. Tel./fax: +52 442 2381064; email: ataulfo@inb.unam.mx

Received 15 May 2007; accepted 23 May 2007.

DOI:10.1111/j.1567-1364.2007.00279.x

Editor: André Goffeau

Keywords

chloride channel; Cl^- channel family; electron microscopy; patch-clamp; voltage-clamp; *Xenopus* oocyte.

Abstract

Expression of *GEF1* in *Xenopus laevis* oocytes and HEK-293 cells gave rise to a Cl^- channel that remained permanently open and was blocked by nitro-2-(3-phenyl-propylamino) benzoic acid and niflumic acid. NPPB induced *petite*-like colonies, resembling the *GEF1* knock-out. The fluorescent halide indicator SPQ was quenched in a wild-type strain, in contrast to both a *GEF1* knock-out strain and yeast grown in the presence of NPPB. Immunogold and electron microscopy located Gef1p in the plasma membrane, vacuole, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Eleven substitutions in five residues forming the ion channel of *GEF1* were introduced; some of them (S186A, I188N, Y459D, Y459F, Y459V, I467A, I467N and F468N) did not rescue the *pet* phenotype, whereas F468A, A558F and A558Y formed normal colonies. All the *pet* mutants showed reduced O_2 consumption, small mitochondria and mostly disrupted organelles. Finally, electron microscopy revealed that the plasma membrane of the mutants develop multiple foldings and highly ordered cylindrical protein-membrane complexes. All the experiments above suggest that Gef1p transports Cl^- through the plasma membrane and reveal the importance of critical amino acids for the proper function of the protein as suggested by structural models. However, the mechanism of activation of the channel has yet to be defined.

Introduction

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* the gene *GEF1* encodes for a protein regarded as a member of the voltage activated Cl^- channel family (CIC), a gene family associated with multiple physiological roles including maintenance of osmotic equilibrium, intracellular pH and membrane potential of plasma membranes. Deletion mutants of *GEF1* develop an iron-suppressible *petite* phenotype; these cells exhibit reduced mitochondrial respiration growing slowly in nonfermentable carbon sources (Greene *et al.*, 1993). The *pet* phenotype is effectively reverted by expressing some vertebrate CICs, such as the *Torpedo* CIC-0 (Gaxiola *et al.*, 1998), CICN3 (Borsani *et al.*, 1995), OmCIC-3, mCIC-5 (Miyazaki *et al.*, 1999), mCIC6 (Kida *et al.*, 2001), and the *Arabidopsis thaliana* AtCIC-d (Hechenberger *et al.*, 1996). Gef1p is processed by proteolysis in the secretory pathway, giving rise to two polypeptides of 30 and 70 kDa (Wachter &

Schwappach, 2005); the functional significance of this event is still in debate. However, the ion-conducting properties of the protein-channel have not been extensively studied and the available evidence suggests that Gef1p transports Cl^- in intracellular vesicles and the medial Golgi compartment, playing a crucial role in cation homeostasis (Schwappach *et al.*, 1998; Gaxiola *et al.*, 1999; Flis *et al.*, 2002).

Gef1p follows the basic structure of other CICs, forming dimers assembled by two identical subunits containing their own independently-gated pore. Based on the ecCIC structure (Dutzler *et al.*, 2002), each subunit has 18 α -helices that wrap around the ion-permeation pathway, in which two Cl^- ions are permanently bound and coordinated by main chain protein atoms. Three ion-binding sites are formed by amino acid stretches at the N-end of four α -helices: D, F, N and R (Fig. 1). These sites are named S_{ext} , S_{cen} , and S_{int} to reflect their relative locations in the pore, and the permanently bound Cl^- ions are in both S_{cen} and S_{int} , whereas a glutamate

in the F helix blocks the third Cl⁻ binding site when the channel is closed (Dutzler *et al.*, 2003).

There is extensive sequence similarity among Gef1p, ClC-4 and -5; the later two proteins are functional Cl⁻/H⁺ antiporters in endosomes and Golgi (Picollo & Pusch, 2005; Scheel *et al.*, 2005). Primary distribution of ClC-4 and -5 is in the early-late endosome, nevertheless, they both also reach the plasma membrane (Huang *et al.*, 2005; Schmieder *et al.*, 2007). Also, when expressed in heterologous systems, such as frog oocytes and HEK-293 cells, they form functional Cl⁻ channels (Friedrich *et al.*, 1999). Whether the induced currents are a consequence of the normal traffic of the channel-protein or due to the artificial overexpression of the channel in a heterologous system, remains to be determined. Nevertheless, those observations prompted us to examine the potential location and function of Gef1p in the plasma membrane of the yeast and to explore its expression in heterologous systems to determine its ability to transport Cl⁻.

We present here several lines of evidence that indicate that Gef1p reaches the plasma membrane, where it conducts Cl⁻. Firstly, we found that when expressed in *Xenopus laevis* oocytes and HEK-293 cells, Gef1p forms a channel that remains permanently open and is shut by nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB) and niflumic acid (NFA), two Cl⁻ channel blocking agents. Secondly, yeast exposed to NPPB develops a *petite*-like phenotype

and the Cl⁻-influx is reduced to levels comparable to those of a *GEF1* knock-out strain. Thirdly, immunogold labeling and electron microscopy revealed that Gef1p is located in the plasma membrane as well as in intracellular compartments. In addition, to better understand the role of Gef1p we examined how single site mutations in the S_{cen} site change the morphology of the colony, oxygen consumption and organelle distribution of the yeast. Finally, ultrastructural analysis revealed that the *pet* mutant has an altered organelle organization, developing multiple plasma membrane foldings and forming a highly arranged intracellular membrane-protein complex.

Materials and methods

Yeast strains and media

The yeast strains (MATa), RGY-30 (*ura3-1; leu 2-3, 112; trp1-1; his3-11, 15*) and RGY-192 (*gef1::his3-11; ura3-1; leu 2-3, 112; trp1-1*) were donated by R. Gaxiola from the University of Connecticut (Gaxiola *et al.*, 1998, 1999). Standard yeast media and genetic manipulations were as described by Ausubel *et al.* (1997). To induce the *pet* phenotype, yeast was grown for 3–5 days at 30 °C in YPGE or YNB agar supplemented with 3% glycerol, 1 mM Ferrozine and 20 µg mL⁻¹ each of His, Ade and Trp. Expression was induced with 0.5 mM CuSO₄ (pYEX-BX, Clontech) or

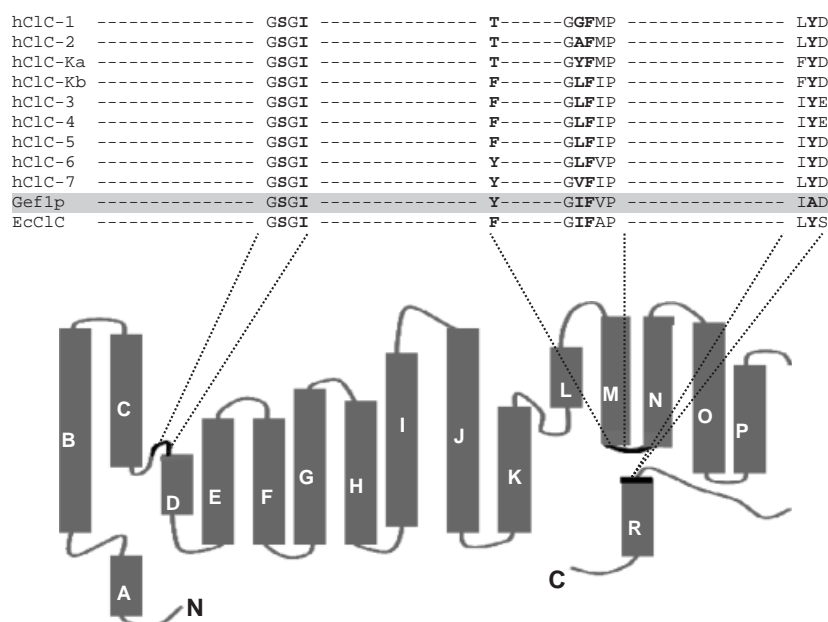


Fig. 1. Sequence alignment and topology of ClCs. Residues forming the selectivity filter in EcClC are in bold letters. Alignment of residues of the D, N and R helices are indicated. The F helix is not included as it does not form part of the S_{cen} site. S109 from EcClC corresponds to S186 in Gef1p, I109–I188, Y459–F348, I356–I467, F357–F468, and Y445–A558. GenBank accession numbers are as follows: hClC-1 (Z25884), hClC-2 (NM_004366), hClC-3 (NM_001829), hClC-Ka (NM_001042704), hClC-Kb (NM_000085), hClC-4 (NM_001830), hClC-6 (NM_001286), hClC-7 (NM_001287), *GEF1* (Z23117), EcClC (NP_752140).

2% galactose (pYES2.1/V5-His-Topo, Invitrogen). The effect on the yeast of the Cl^- channel blocker NPPB was observed 3–5 days after adding serial dilutions (10^{-3} – 10^{-7} M) of the compound on YPGE agar. The gene fusions *GEF1*-GFP and *GEF1*His were derived from the plasmids pYEX-BX (Clontech) and pYES2.1/V5His-Topo (Stratagene), respectively, and transformed in RGY-192 using the lithium acetate method as described by Ausubel *et al.* (1993).

Molecular biology

GEF1 was obtained by PCR-cloning using two specific primers (Prima: 5'ATGCCAACAACTTATGTGCCAATAAA TCAACCA3' and GefBam': 5'GGATCCTATAACCTTACCA TTTCGATTAGT3') and cloned in pGEM-T Easy (Promega); the gene was fully sequenced to corroborate its identity. Then, several steps of site-directed mutagenesis introduced restriction sites that allowed us to: (1) shuttle *GEF1* in the yeast expression vector pYEX-BX (Clontech), (2) introduce *GEF1* in the expression plasmid pcDNA3 (Invitrogen), and thus drive the transcription from the strong CMV promoter-enhancer in mammalian cells and *X. laevis* oocytes, (3) fuse GFP towards the C-terminus of *GEF1* in pEGFP-N2 (Clontech) and (4) remove the translation stop codon and add a 6His tag to the C-terminus after cloning in pYES2.1/V5-His-Topo (Invitrogen). Single site substitutions in *GEF1* (S186A, I188N, Y459D, Y459F, Y459V, I356A, I356N, F468A, F468N, A558F, A558Y) were introduced, using the Quick Change Kit from Invitrogen. The sequence of all mutants was confirmed on both strands using an automated DNA sequencing apparatus (ABI prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Expression of *GEF1* was assessed by means of reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) from RNA isolated from colonies growing on selective media.

Electrophysiology

Xenopus oocytes

Isolation of oocytes and recordings were as described previously by Miledi (1982). Briefly, ovaries from *X. laevis* were dissected and follicles isolated manually. To remove the enveloping cells, the follicles were treated with 0.5 mg mL^{-1} collagenase type 1 (Sigma) for 1 h and then maintained at 16°C in Barth's medium containing gentamicin (0.1 mg mL^{-1}). One day later, 14 nL of plasmid pcDNA3-*GEF1*, *GEF1*-GFP or pEGFP-N2 was injected into the nucleus. Three days later, the two-microelectrode voltage-clamp technique was performed in normal frog Ringer (mM: NaCl, 96; KCl, 2, CaCl_2 , 2; MgCl_2 , 1; HEPES-NaOH, 5; pH 7.4) at room temperature using microelectrodes filled with 3 M KCl. NPPB (10^{-7} – 10^{-3} M) was perfused onto the oocytes, while holding the membrane potential at -60 mV . For induction

of voltage activated currents, the membrane potential was stepped from -60 to $+40 \text{ mV}$ and then to -120 mV in $20 = \text{mV}$ steps.

HEK-293 cells (American Tissue Culture Collection, CRL1573) were cultured as described previously (Halliwell *et al.*, 1999), and maintained in a growth medium that consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine and 100 U mL^{-1} penicillin/streptomycin. HEK-293 cells were seeded into 35-mm cultures dishes coated with Poly-D-lysine at a density of $10\,000 \text{ cells dish}^{-1}$, 1 day before transfection. To transfect HEK-293 cells with the *GEF1* construct, the transfection reagent Fugene-6 was used according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics Corporation). In brief, 3 μL of Fugene reagent was added to 97 μL serum-free DMEM medium. The resulting mixture was added to 1 μg of the plasmid, allowed to stand at ambient room temperature for 15 min, and then added to the cells. Electrophysiological recordings were made 24–36 h after transfection.

Currents were recorded from HEK-293 cells at ambient room temperature (20 – 23°C) using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Patch electrodes were made from borosilicate glass pipettes and fire polished just before use. HEK-293 cells were voltage-clamped at -60 mV using an Axopatch 200B amplifier and headstage (Axon Instruments) and low pass filtered at 10 kHz before digitization and storage on a PC running WINWCP software (University of Strathclyde, UK). HEK-293 cells were perfused with an extracellular solution composed of (in mM): NaCl, 140; KCl, 5; MgCl_2 , 1; CaCl_2 , 2; HEPES, 10; D-Glucose, 10; pH 7.4; this solution was supplemented with tetrodotoxin (200 nM), tetra-ethyl-ammonium chloride (5 mM), 4-aminopyridine (2 mM) and CoCl_2 , (2 mM) to block any possible voltage-activated currents from endogenous sodium, potassium or calcium channels. For the study of the effects of low extra-cellular Cl^- , NaCl was replaced isotonicly with NaNO_3 . The patch pipette resistances ranged from 2 to 5 M Ω , and the patch pipette solution contained (in mM): CsCl or K-gluconate, 142; MgCl_2 , 2; CaCl_2 , 1; EGTA, 11; HEPES, 10; Mg-ATP, 2; pH 7.4. NPPB (Fisher Scientific), or NFA was applied to HEK cells using a Y-tube (fabricated in-house). Fresh bath solution was also perfused (at 2 mL min^{-1}) using a gravity-feed system (manufactured in-house) to ensure there was no build-up of drug solutions in the culture dish. Baseline holding currents were recorded in the absence and presence of NPPB (30 μM) or NFA (100 μM). Holding membrane current-voltage (I–V) relationships were also determined between -140 and 40 mV (over 400 ms) in the absence and presence of NPPB or NFA. Drug-induced changes in membrane current were measured at their peak and these responses are plotted and displayed using GRAPHPAD PRISM[®] (version 4).

SPQ labeling and fluorometry

The cells (RGY-30 and RGY-192) were grown for 3–5 days at 30 °C in YPGE, arrested in M phase with 5 mM nocodazole and harvested by centrifugation for 5 min at 1000 *g* at 4 °C. Cells were diluted to 1×10^6 cells mL⁻¹ in YPGE and loaded by immersion for 5 min in 300 μM of SPQ, a Cl⁻ sensitive fluorophore (Bwersi *et al.*, 1994; Accardi & Miller, 2004). Cells were washed five times in YPGE media (minus SPQ) immediately prior to fluorometry. Fluorescence was measured after 15, 30, 60, 90 and 120 min using a VersaFluor Fluorometer (BioRad) with excitation and emission at 317 and 445 nm, respectively. Data were normalized by comparison with yeast grown in YPGE minus SPQ and plotted using ORIGIN 6.0 software.

Microscopy

Some oocytes and transfected HEK-293 cells expressing *GEF1*-GFP or pEGFP-N2 were observed under a laser confocal microscope (Nikon Model E-600) with an excitation of 488 nm and emission of 507 nm. Images were processed with software SIMPLE PSI version 4.0.6 (Compyx Inc.). The phenotype of yeast was observed using an Olympus BX60 light microscope.

For ultrastructural analysis, cells were collected from the agar plates and washed twice in 0.02 M S-collidine pH 7.2 and blocks from agar plates were made of 0.5–1 mm³ in 2% agar at 40–60 °C, then washed twice in solution (0.2 M sucrose, 0.001 M CaCl₂ in S-collidine) and fixed by immersion in 3% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylic acid buffer, pH 7.4 at 4 °C for 30 min. The blocks were dehydrated with two changes of 30%, 40%, 50%, and 70% aqueous ethanol for 15 min each. Infiltration was carried out in LR White Resin (Polysciences), for at least 2 days. For inclusion, tissue blocks were transferred to BEEM capsules filled with undiluted resin and no catalyst, at 60 °C for 24 h. Semi-thin sections, obtained in an MTX ultra microtome with glass knives, were stained with toluidine blue to evaluate preservation and to select the area to be examined under the microscope. Thin sections of 70 nm obtained with a diamond knife were picked up on 300 mesh formvar-coated nickel grids.

For the immunocytochemistry assay, grids were floated in a humid chamber over a drop of 0.5 M phosphate buffer (PBS) for 30 min, and then floated in 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS containing 0.1% Tween 20. After each incubation, grids were washed twice with PBS-BSA without detergent. Grids were incubated overnight at 4 °C in the humid chamber, floating over two drops of primary antibody at 1 : 100 dilution. After extensive washing with PBS-BSA buffer, they were incubated for 1 h in the humid chamber at 37 °C with goat anti-rabbit Ab 1 : 250, labeled with 15 nm gold particles. Thereafter sections were contrasted with lead citrate and uranyl acetate as described by

Hayat (1981) and observed in a JEOL 1010 electron microscope at 80 kV with a high contrast pole piece at the magnification indicated.

O₂ consumption

The cells were grown for 3–5 days at 30 °C in supplemented YNB media and arrested in M phase by adding 5 mM nocodazole, then collected by centrifugation for 5 min at 1000 *g* at 4 °C, and resuspended in 1/50th the original volume in supplemented YNB media previously set at 30 °C. Cells were diluted to 1×10^6 cells mL⁻¹ and the O₂ consumption rate recorded with a Clark-type oxygen electrode in 3 mL of supplemented YNB medium as reported by Hernandez-Munoz *et al.* (1992).

Staining of mitochondria and organelles

Yeast in M phase were stained with MitoTracker Red CmxRos or brefeldine (Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions, observed under a laser confocal microscope (Nikon Model E-600) excitation 579 nm and emission 599 nm. Images were processed with software SIMPLE PSI version 4.0.6.

Results

Electrophysiology

Injection of GFP or *GEF1*-GFP into oocytes induced the expression of fluorescent proteins that were clearly observed by laser confocal microscopy. Whereas the fluorescence emitted by soluble GFP was observed throughout the oocyte, *GEF1*-GFP was located mainly at or beneath the plasma membrane of the animal hemisphere (Fig. 2a and b). Furthermore, the resting membrane potential of oocytes injected with *GEF1*-GFP or *GEF1* was usually *ca.* -20 mV, contrasting with noninjected oocytes whose resting potential ranged from -35 to -60 mV. Voltage stepping the oocytes from -60 to +40 mV and then to -120 mV did not elicit currents derived from the expressed protein and the currents were not significantly different from those noninjected or of GFP-expressing oocytes (Fig. 2c, *n* = 10). A different situation was observed when oocytes expressing *GEF1* or *GEF1*-GFP were exposed to NPPB. As illustrated in Fig. 2d, 0.1 mM NPPB elicited an outward current accompanied by a decrease in membrane conductance (*n* = 8), presumably due to the blocking of a Cl channel expressed by *GEF1*. Similar results were observed when expressing *GEF1*-GFP; however, the effect of the drug lasted several minutes after the wash-out (not shown), suggesting that the GFP-tagged protein has different channel kinetics or a higher affinity for the NPPB.

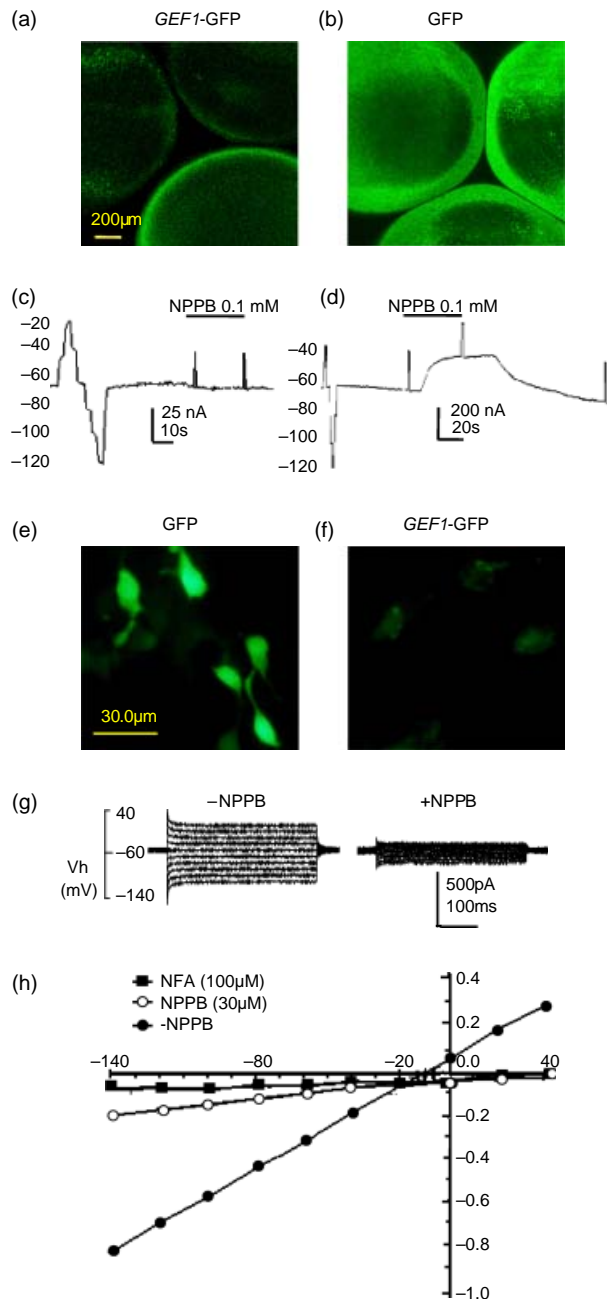


Fig. 2. Electrophysiology in *Xenopus laevis* oocytes and HEK293. (a) Laser confocal fluorescence microscopy of oocytes expressing (a) *GEF1*-GFP and (b) GFP. (c, d) Recordings of oocytes during a voltage-step protocol, followed by application of 0.1 mM NPPB. Notice the change of conductance in oocytes injected with *GEF1* (d). This change was never observed in noninjected oocytes and it was evidenced only when NPPB or other Cl^- channel blockers were perfused on oocytes expressing Gef1p. HEK-293 cells expressing GFP (e) or Gef1p (f). Notice the punctuated distribution of fluorescence in (f). (g) Membrane currents at holding potentials of -140 to 40 mV in HEK-293 cells transfected with *GEF1* in the absence (left) and presence (right) of $30 \mu\text{M}$ NPPB. (h) Membrane current-voltage relationship of *GEF1* transfected HEK-293 cells in the absence and presence of $30 \mu\text{M}$ NPPB or $100 \mu\text{M}$ NFA ($n = 3$).

The expression of *GEF1* in *X. laevis* oocytes gave us the first hint of the presence of *GEF1* in the plasma membrane, but this cell possesses several types of Cl^- channels that may mask the expression of the yeast channel (Parker & Miledi, 1988; Weber, 1999). Therefore, we proceeded to express *GEF1* in HEK-293 cells, a cell line that primarily expresses voltage-activated K^+ conductances (Avila *et al.*, 2004). Images of GFP and *GEF*-GFP transfected cells are shown in Fig. 2e and f. The homogeneous distribution of fluorescence emitted by soluble GFP contrasts with that derived from the fusion *GEF1*-GFP, which is mainly concentrated in intracellular compartments, with some fluorescence reaching the plasma membrane.

In cells voltage-clamped at -40 mV, using a K-glucuronate-based electrode solution, the Cl^- channel blocker, NPPB ($30 \mu\text{M}$) reduced the holding current in HEK-293 cells transfected with *GEF1* from 136 ± 50 pA ($n = 5$) to 79 ± 26 pA. This effect was largely absent when Cl^- was reduced by replacing NaCl with NaNO_3 [control holding current = 178 ± 11 pA, in NPPB ($30 \mu\text{M}$) = 172 ± 14 pA, $n = 5$]. In contrast, NPPB ($30 \mu\text{M}$) had no effect on the holding current in nontransfected cells (data not shown). In cells voltage-clamped at -60 mV, using a CsCl-based electrode solution, the whole cell membrane current-voltage (*I*-*V*) relationship (-140 to 40 mV) was also determined in the absence and presence of NPPB ($30 \mu\text{M}$) and NFA ($100 \mu\text{M}$) (Fig. 2g). The control *I*-*V* relationship was linear with a reversal potential of -9 ± 16 mV ($n = 3$); NPPB ($30 \mu\text{M}$) and NFA ($100 \mu\text{M}$) reduced the currents at all holding potentials by *c.* 80% and 90%, respectively, in *GEF1* transfected cells ($n = 3$, Fig. 2h). In contrast, these chloride channel blockers had no effects on the membrane *I*-*V* in nontransfected HEK-293 cells (data not shown).

Effect of Cl^- channel blockers on yeast

It is well known that the plasma membrane of *S. cerevisiae* is virtually impermeable to Cl^- (Conway & Downey, 1950). However, the Cl^- conductance derived from the expression of *GEF1* in oocytes and HEK-293 cells led us to examine whether NPPB and other Cl^- channel blockers could have an effect on the yeast. This would give indirect evidence for the presence of Gef1p in the plasma membrane.

Serial dilutions of NPPB were dissolved in YPGA agar where a *WT* strain (RGY-30) was propagated. Plates supplemented with 10^{-3} M NPPB induced the formation of *pet*-like colonies 3–5 days after plating (Fig. 3a, $n = 4$), a phenotype similar to that developed by the *GEF1* knock-out strain (Fig. 3a). The *pet*-like phenotype was not observed in yeast grown in the presence of lower NPPB concentrations (10^{-7} – 10^{-4} M). Nevertheless, under the light microscope the yeast presented an aberrant morphology characterized by foldings in the plasma membrane (Fig. 3b). 9AC, another

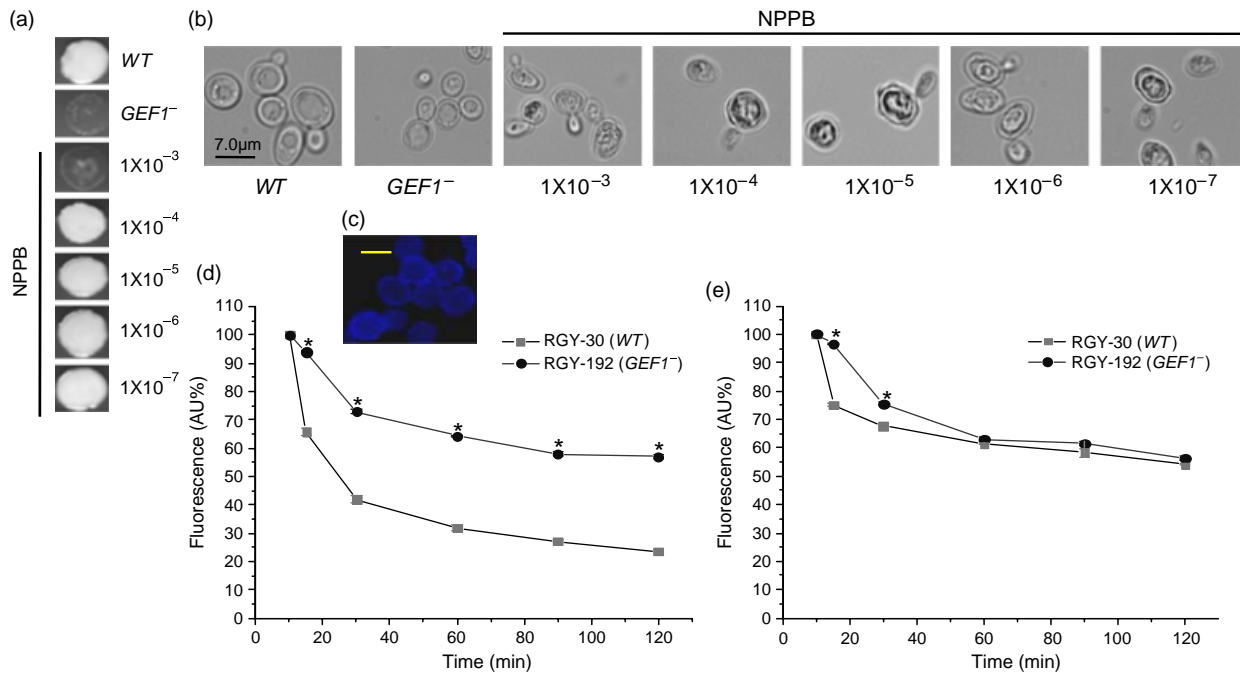


Fig. 3. NPPB induces a *petite*-like phenotype and blocks Cl^- flux. (a) Colonies of *WT* and a *GEF1*⁻ *pet* mutant contrasted with the *pet*-like phenotype induced by 1 mM NPPB. (b) Same samples seen through the light microscope. Bar = 7.0 μm. (c) Sample image of SPQ labeled yeast seen through the fluorescence microscope. (d) Quenching-rate of SPQ labeled yeast. Notice the faster rate of the *WT* strain. (e) Effect of NPPB on *WT* and *GEF1*⁻ strains. Values are the mean ± SE of three independent experiments (one-way ANOVA, $P < 0.02$, medium ± SE). Bar in inset (c) = 7.0 μm.

Cl^- channel blocker, generated a similar *pet* phenotype when the cells were exposed to 10⁻³ M (not shown). It is important to note that anion-channel blockers are not highly specific and the effect on the yeast could be the consequence of their impact on multiple molecular targets (Breuer & Skorecki, 1989; Keeling *et al.*, 1991; Giles *et al.*, 2003).

We then proceeded to examine whether yeast sequesters Cl^- . This was done by comparing the quenching-rate of the anion fluorescent-indicator SPQ in *GEF1* knock-out and *WT* strains as well as in strains exposed to NPPB. Figure 3c shows a sample of SPQ-loaded cells observed under the fluorescence microscope. The fluorescence emitted by the *WT* cells diminished rapidly within the first 15 min and fell to 22% after 120 min, this fast quenching contrasted with the fluorescence of the knock-out strain that dropped only to 60% in the same period of time ($n = 3$), suggesting that the Cl^- transport is severely impaired (Fig. 3d). Following the same procedure, we examined whether NPPB had an effect on the quenching rate of SPQ. Figure 3e shows that wild-type cells exposed to the Cl^- channel blocker reduced the SPQ fluorescence to a level comparable to that of a knock-out strain; in addition, NPPB apparently did not have further effects on the mutant strain ($n = 3$). These results suggest that yeast transport Cl^- from the extracellular medium and the flow is in part facilitated by Gef1p which is blocked by NPPB.

Immunogold and electron microscopy

We examined the expression of Gef1p in the plasma membrane of the yeast by immunolabeling both His- and GFP-tagged versions of *GEF1* and locating the protein under the electron microscope. After expressing independently the tagged channel-proteins in the knock-out strain (RGY-192), electron microscopy revealed that Gef1p was located in several intracellular compartments (Fig. 4), confirming its presence in vacuole, endoplasmic reticulum and other vesicles that probably correspond to the Golgi; no label was detected in nontransformed yeast. In addition, we found a positive immuno-signal in several spots along the plasma membrane, suggesting that the protein is capable of reaching this cell region, too ($n = 3$). Distribution of the gold particles was independent of the tag attached to the protein.

Mutational analysis of the ion-channel

Eleven amino acid substitutions were generated in three of the four α -helices that form the S_{cen} site along the ion-channel (Fig. 1). Plasmids carrying the mutations were introduced in a *WT* strain to assess the possibility of a dominant-negative effect as well as in a strain whose *GEF1* gene was deleted and thus formed *pet* colonies.

None of the mutants expressed in the *WT* strain generated *pet* colonies (three independent transformations). On the

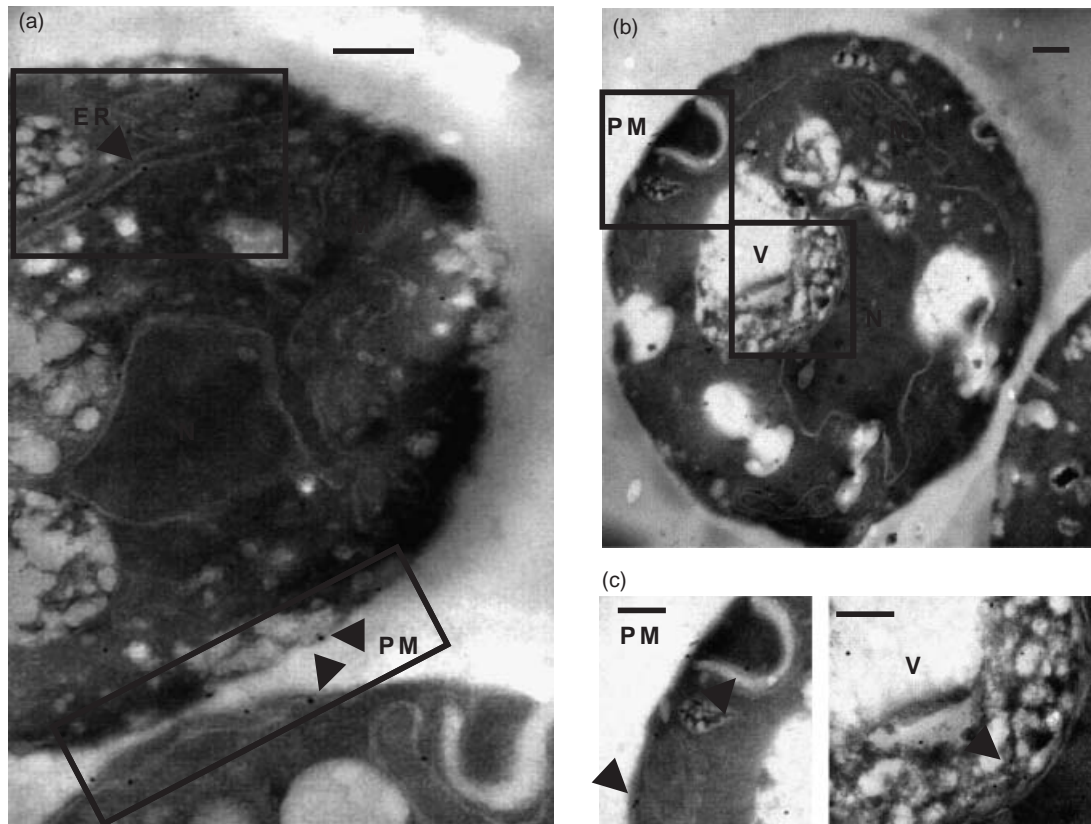


Fig. 4. Immunolabeling and electron microscopy. Expression of the *GEF1*_{His} in the *GEF1*⁻ strain was located in (a) plasma membrane (PM), endoplasmic reticulum (ER). (b) A second yeast showing the same distribution and some labeling in vacuole (V). (c) Detail of areas shown in (b). Arrowheads point to some of the positive immuno signals. N, nucleus; M, mitochondrion; ER, endoplasmic reticulum. Bar = 0.2 μm .

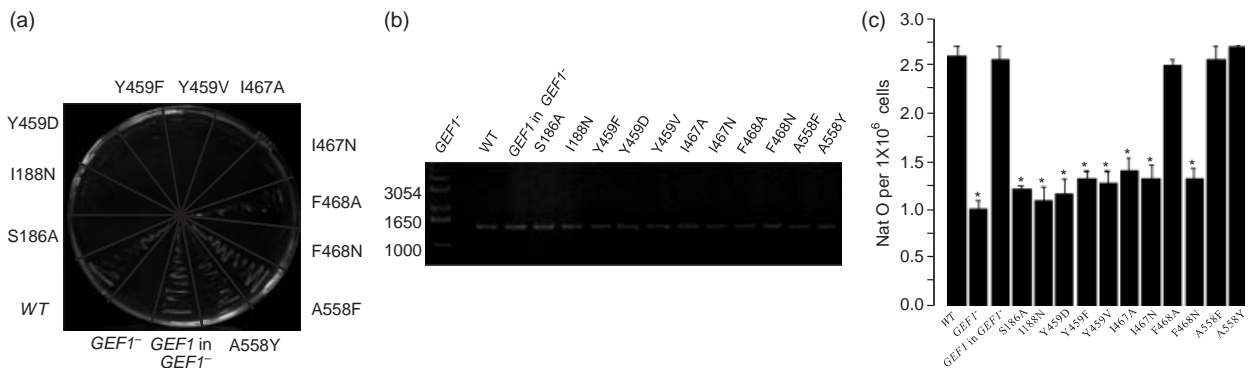


Fig. 5. Expression of single site substituted constructs in a *GEF1*⁻ knock-out yeast strain. (a) Contrast of colony sizes of *WT*, *GEF1*⁻, *GEF1*-complemented and single site substituted versions. The *pet* phenotype was reverted by F468A, A558F and A558Y. (b) RT-PCR from isolated colonies revealed the expression of *GEF1* (arrow) in all but the knock-out strain. (c) Effect of amino acid substitutions on yeast respiration. O_2 consumption rate 10^{-6} cells min^{-1} . *GEF1*⁻ strains have reduced respiration rate in contrast to *WT* and reverted strains. There is no significant difference among F468A, A558F, A558Y and *WT* (One-way ANOVA $P < 0.05$). *Significant differences with the *WT*; these correspond to all the *pet* strains.

other hand, the substitutions S186A, I188N, Y459D, Y459F, Y459V, I467A, I467N and F468N did not rescue the *pet* phenotype, whereas F468A, A558F and A558Y formed colonies normal in appearance (Fig. 5a). RT-PCR was performed from RNA isolated from each yeast colony to

ensure that *GEF1* was properly transcribed (Fig. 5b). Individual samples from each colony were observed under the light microscope to determine whether the cells were actually smaller in diameter and that the smaller colonies were not caused by cell death (not shown).

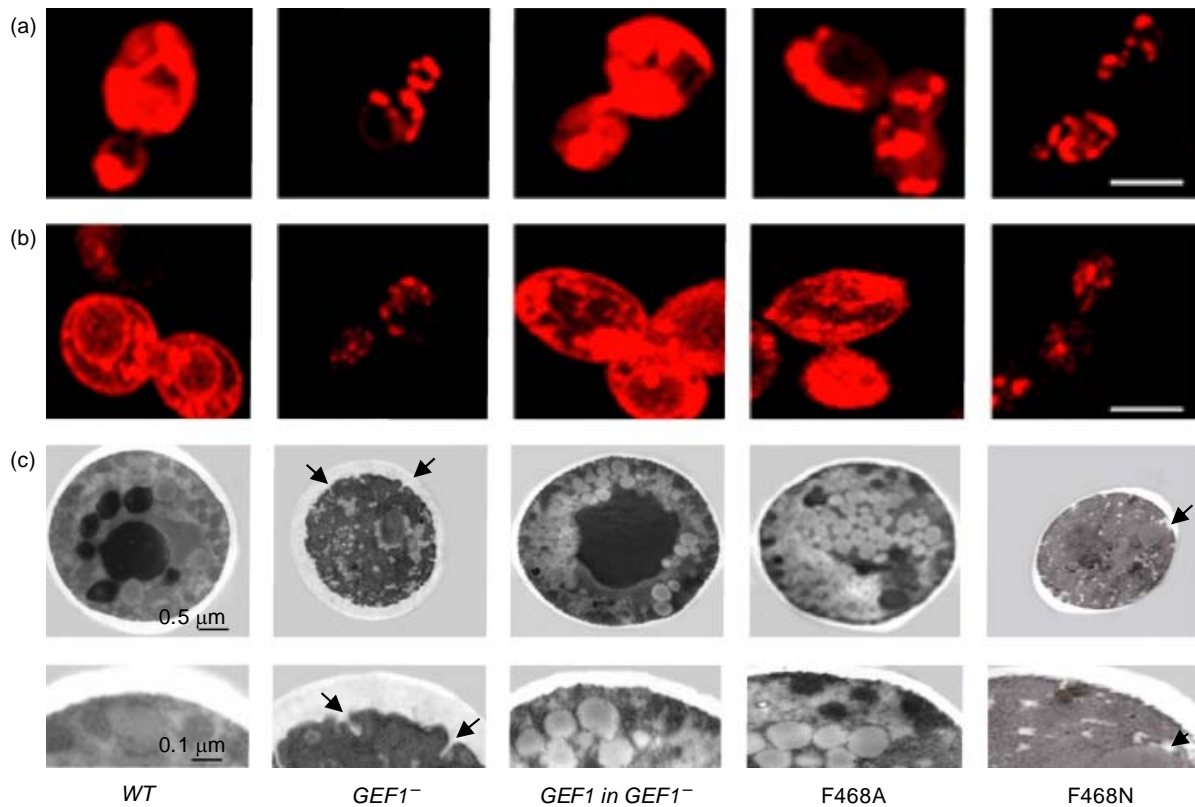


Fig. 6. Mitochondrial activity and organelle distribution. (a) Fragmented mitochondria in *GEF1⁻* and F468N evidenced by staining with the fluorescent label MitoTracker. (b) Brefeldin A showed a disorganized distribution of organelles in *pet* cells (*GEF1⁻* and F468N). (c) Ultrastructure. *WT* strain showed the normal integrity of the plasma membrane and organelle distribution, and is similar in both the reverted strains expressing Gef1p and F468A. The knock-out strain (*GEF1⁻*) and F468N showed foldings in the plasma membrane and the organelles are not well defined. Plasma membrane foldings are indicated by arrows in the *pet* yeast.

We then proceeded to examine whether the respiration rate of the yeast was altered after introduction of each amino acid substitution. When compared the *WT* and *GEF1⁻* strains, the mutant exhibited *c.* 40% less O_2 consumption ($2.62 \text{ se} \pm 0.21$ and $1.12 \text{ se} \pm 0.11$, Nat and O_2 , respectively; Fig. 5c). All the single site mutants that showed a *pet* phenotype had considerably reduced respiration; although they did not behave exactly as the *GEF1⁻* strain, the differences were not statistically significant (ANOVA one-way $P = 0.02$). Mutants that fully reverted the colony phenotype (F468A, A558F and A558Y) had normal oxygen consumption.

A peculiar situation emerged when the substitutions in F468 were analyzed: whereas F468A reverted the *pet* phenotype, F468N did not. Thus, we proceeded to further characterize the cells carrying these mutations. Figure 6a compares the morphology of the mitochondria of F468A and F468N with *GEF1⁻* and *WT* strains. The mitochondria of the *pet* cells were segmented as revealed by the punctated distribution of the MitoTracker fluorescent label, a common sign of low respiratory activity. In contrast, the *WT* and reverted colonies showed the typical mitochondrial tubular

network. Labeling the yeast with fluorescent brefeldine showed that the *pet* mutants have strikingly disorganized organelles (Fig. 6b). Taking these observations into consideration, we then proceeded to detail the ultrastructure of the yeast *pet* mutant.

The impaired growth of *GEF1⁻* and F468N was evidenced by the reduced cell size; in addition, these cells presented multiple plasma membrane foldings, disorganized organelles, reduction in the size of the vacuole, which appears to be fragmented, shrinking of nucleus and disrupted mitochondria (Fig. 6c). In contrast, the *WT* and reverted yeast showed a normal appearance, even though they were grown in low-iron medium.

A detailed inspection of the *GEF1⁻* strain revealed the presence of internal membrane complexes, forming cylindrical structures associated with highly-organized electrodense particles, most probably corresponding to proteins lined up along an internal membrane. Figure 7 shows an example of these structures in a cell in division. They were regularly observed in several independent preparations but they were not detected in *WT* or reverted strains. Interestingly, we did

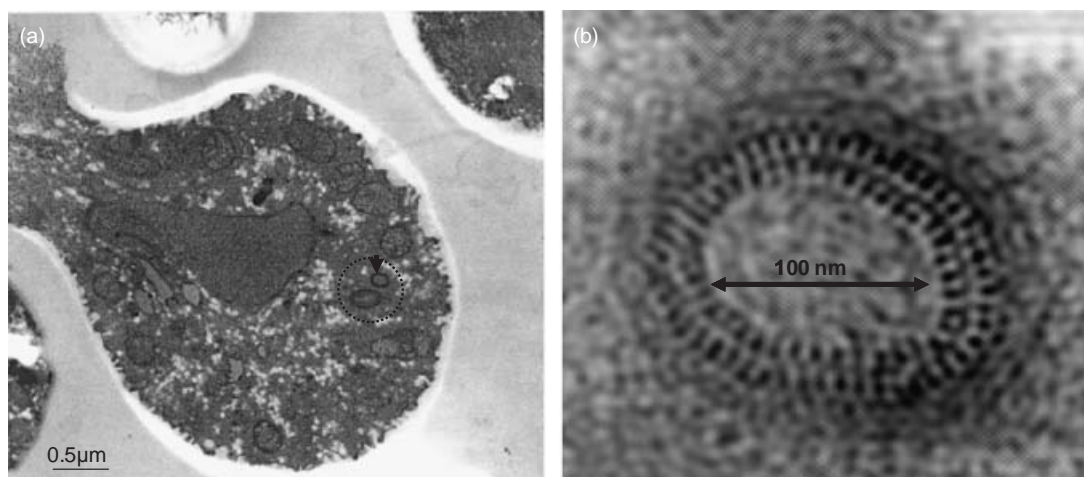


Fig. 7. Electrodense particles lined up along intracellular membranes. (a) Sample image of the protein complex formed in the knock-out strain (arrow) and magnified in (b). The arrow within the circle in (a) points towards two structures, one of them shown in (b).

not observe these structures in the *pet* strain expressing the single site mutant (F468N).

Discussion

The experiments shown in this paper present evidence for the expression of Gef1p in intracellular compartments as well as in the plasma membrane and further support the association of this protein with a Cl^- conductance. In addition, we analyzed the impact on the yeast phenotype of single-site mutations along the ion-pathway of the protein.

Injection of plasmids carrying *GEF1* into oocytes led to low resting membrane potentials and input resistances, due to spontaneous opening of a chloride channel. In a similar fashion, injection of mRNA from the *Torpedo* electric organ leads to low resting membrane potentials (Sumikawa *et al.*, 1984) due to the expression of CIC-0 (Jentsch *et al.*, 1990) a protein of the same family as Gef1p. Expression in oocytes suggested that *GEF1* was inducing, or forming, an active channel in the plasma membrane. However, the activation mechanism of the channel still remains to be identified. Interestingly, addition of Cl^- channel blockers to the bathing solution of *GEF1*-injected oocytes decreased the membrane conductance, probably by shutting the channel. This effect was also found in oocytes expressing *GEF1*-GFP but was not observed in many oocytes that were either noninjected or were injected with water.

Additional evidence of the Cl^- channel nature of *GEF1* was obtained in HEK-293 cells. As in the oocyte, these cells acquired a permanently open channel that was shut by the Cl^- channel blockers NPPB and NFA, and which was reduced by lowering the external Cl^- concentration. Changes in membrane potential did not activate any obvious current. The linear I - V relationship of the Gef1p

channel suggests that conductance is not voltage dependent. Furthermore, the effects of NPPB and NFA at Gef1p did not appear to be voltage-dependent. The reversal potential of Gef1p (*ca.* -9 mV) was slightly more negative than the predicted reversal potential for Cl^- (-2 mV), suggesting that Gef1p may also conduct other ions as suggested for other CIC proteins (Accardi, 2004; Accardi *et al.*, 2005; Picollo & Pusch, 2005; Scheel *et al.*, 2005); further experiments are required to determine the channel properties in detail. The resting membrane currents recorded from non-transfected HEK-293 cells were not altered by NPPB or NFA, suggesting *GEF1* is required for chloride channel expression.

It is believed that the plasma membrane of the yeast is highly impermeable to Cl^- (Conway & Downey, 1950). However, we show here three strong lines of evidence for the flow of this anion across the plasma membrane. First, the flow of Cl^- towards the intracellular compartments of the yeast was monitored by the emission of fluorescence by SPQ. The quenching was time-dependent and the emission of fluorescence was strikingly reduced in the strain that does not express *GEF1*. The use of a second indicator, MQAE, led to similar results (not shown). We can conclude that *GEF1* is at least partially responsible for the transport of Cl^- in the yeast and, considering the remaining flow of Cl^- in the knock-out strain, we suggest the potential presence of other mechanism(s) of transport, such as that of the gene homologous to the $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ transporter (YBR235w protein) (Coury *et al.*, 1999).

Second, although the Cl^- channel blockers bind to many protein-channels and ion transporters of several gene families (Hartzell *et al.*, 2005) they have nevertheless provided an experimental tool that has allowed the characterization of several CICs. After observing the effect of NPPB on oocytes and HEK-293 cells expressing Gef1p, we resolved

to determine whether this compound had a direct effect in the yeast. We predicted that cells growing in the presence of this drug should resemble those strains that do not express Gef1p. Accordingly, colonies exposed to 1 mM NPPB as well as 9AC (not shown) developed a *pet*-like phenotype, and under the light microscope the cells were severely damaged, especially in the plasma membrane which presented numerous foldings. However, exposure of the *GEF1* knock-out strain to the drugs did not induce further changes in appearance. We conclude from these experiments that blocking the Cl^- transport diminishes the cell size, inducing many of the characteristics of the *pet* strains, yet the cells continue dividing and exposure to the channel blockers is not lethal.

Third, tagging *GEF1* at the C-terminus with either 6HIS or GFP produced a channel-protein capable of reverting the *pet* phenotype. In addition, we showed that the GFP-tagged *GEF1* transports Cl^- when expressed in the oocytes and HEK-293 cells. These two modified versions of the channel were used to localize it in the yeast by means of immunogold and electron microscopy. Most of the label was found in intracellular vesicles, including the vacuole (Davis-Kaplan *et al.*, 1998). Resolution of the Golgi compartment was not clearly evidenced in our preparations; nevertheless, some vesicles labeled with gold may indicate the presence of the protein in this compartment, as suggested by Schwappach *et al.* (1998). This observation is also consistent with the assumption that the secretory pathway requires Gef1p to provide the Cl^- necessary to load copper to the oxidase Fet3p, an enzyme involved in high affinity iron uptake (Davis-Kaplan *et al.*, 1995). Detailed electron microscopy images revealed that Gef1p reaches the plasma membrane and is also located in the endoplasmic reticulum, as suggested by others (Wachter & Schwappach, 2005). Although the presence of Gef1p in multiple organelles may suggest and effect induced higher expression of the protein, other evidence suggests that related ion channels (CIC-4 and CIC-5) considered intracellular, in normal conditions also reach the plasma membrane, where they are capable of transporting Cl^- (Huang *et al.*, 2005; Schmieder *et al.*, 2007).

Suppressing the expression of *GEF1* in yeast leads to a nonclassic *pet*-phenotype as the cells continue consuming O_2 , albeit inefficiently. When compared to the *WT* strains the knock-out showed a reduced rate of Cl^- transport between the extracellular medium and the cell. We can assume that this drop in the Cl^- transport is due to the absence of Gef1p, which either transports the anion or affects other mechanisms of transport. At this point we do not know whether Gef1p is activated by changes in the membrane potential or any other stimulus, such as changes in pH (Jordt & Jentsch, 1997). More experiments are needed to decipher the mechanisms of channel gating as well as the role of the Cl^- introduced to the cell by Gef1p.

The impact of the amino acid substitutions in Gef1p was assessed by observing the ability of single site mutants to revert the *GEF1⁻ pet* phenotype, O_2 consumption and cellular ultrastructure. Substitutions that did not rescue the phenotype (S186A, I188N, I467A, I467N and F468N) did not have a dominant-negative effect on the *WT* yeast, suggesting that the Cl^- transport provided by the normal gene suffice to maintain the O_2 consumption and consequently the proper iron-metabolism. In contrast, none of these single site mutants gave rise to normal colonies and the respiratory rate was impaired when expressed in the *GEF1* knock-out strain. These observations agree with the essential role of these residues to coordinate Cl^- ions along the channel (Dutzler *et al.*, 2002).

Substitutions in Y459, a residue in the neighboring Cl^- binding site (S_{cen}), were not tolerated. The mutation Y459F introduced the residue that occupies this position in ecCIC (F348); in addition, F is present in two mammalian CICs that effectively rescue the *pet* phenotype (omCIC-3 and 5. *cf* 1; Borsani *et al.*, 1995; Miyazaki *et al.*, 1999). Similar to *GEF1*, other mammalian CICs possess a Y, whereas others, such as CIC-1 and -2, have a T. According to the structural model of ecCIC, F348 apparently does not coordinate ions passing through the pore. Thus, perturbations in the environment forming this Cl^- binding site dramatically altered the ability of the protein to restore the physiology of the yeast.

The Y residue in the well-conserved motif L/I Y D/S at the N-end of the R-helix is occupied by an A in Gef1p (*cf* 1). We observed that the substitutions A558Y and A558F formed normal colonies and yeast consumed O_2 at a regular rate. The Y residue coordinates Cl^- in the S_{cen} site, and when substituted for A in the mammalian CIC-1, the channels are functional, suggesting the possibility that this residue does not exert a strong influence in the open conformation of the channel (Estevez *et al.*, 2003).

Evaluation of the two substitutions in the residue F468 of the N-helix (F468N and F468A) suggests the importance of the hydrophobic environment to preserve the function of the protein. Mutations in the homologous residue in CIC-1 (F484A) drastically reduce the conductance of the channel (Estevez *et al.*, 2003), consistent with our observations. On the other hand, F468N did not rescue the *pet* phenotype or restore respiration; in addition, *X. laevis* oocytes injected with this construct did not induce the expression of a Cl^- current (not shown), suggesting the impact of the mutation in the coordination of the ion. These two single site mutations were further contrasted to assess other phenotypic changes.

We observed the organelle organization, mitochondrial respiratory rate and colony morphology. These characteristics were apparently similar between F468N and the *GEF1⁻* strain, whereas F468A appeared similar to the wild type.

Detailed analysis of the ultrastructure of the F468N mutants and *GEF1*⁻ revealed the presence of plasma membrane foldings, disaggregation of the organelles and rudimentary mitochondria. Respiratory-deficient yeast typically decreases the number of cytochromes and exhibit poorly differentiated mitochondria (for example, Torkko *et al.*, 2001), this effect was constantly observed in the knock-out and F468N. The plasma membrane foldings resemble those observed in strains carrying deletions of the synaptojanin-like genes *SJL1-3*; however, such mutants do not develop the *pet* phenotype (Srinivasan *et al.*, 1997).

The peculiar membrane-protein structures observed under the electron microscope in the *GEF1*⁻ strain are intriguing. They were observed only in the knock-out mutants and not in *WT*, reverted (F468A) or nonreverted (F468N), suggesting that they are probably generated only in the total absence of Gef1p. Other nonreverted mutants could confirm this assumption. Further ultrastructural studies of other *pet* strains could provide more evidence of the nature and origin of these structures.

Acknowledgements

Project supported by CONACYT 44943Q, UNAM.PAPIIT IN208-003-2, 228205 and 204806. A. L-R. was supported by CONACYT 125146, UNAM-DEGEP, and RLR Foundation 08. Thanks to R. Gaxiola for strains, Image Facility (E.N. Hernandez) and DNA Sequencing Facility (A. Antaramian). E. Ruiz, I.A. Martínez, M.L. Palma are thanked for technical support.

References

- Accardi A & Miller C (2004) Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl⁻ channels. *Nature* **427**: 803–807.
- Accardi A, Walden M, Nguiragool W, Jayaram H, Williams C & Miller C (2005) Separate ion pathways in a Cl⁻/H⁺ exchanger. *J Gen Physiol* **126**: 563–570.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 13.12.1–13.12.3. John Wiley & Sons, New York.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (1997) *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 1434–1438. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, Wiley, New York.
- Avila G, Sandoval A & Felix R (2004) Intramembrane charge movement associated with endogenous K⁺ channel activity in HEK-293 cells. *Cell Mol Neurobiol* **24**: 317–330.
- Bowers J, Tulk B & Verkman AS (1994) Long-wavelength chloride-sensitive fluorescent indicators. *Anal Biochem* **219**: 139–143.
- Borsani G, Rugarli EI, Tagliatalata M, Wong C & Ballabio A (1995) Characterization of a human and murine gene (CLCN3) sharing similarities to voltage-gated chloride channels and to a yeast integral membrane protein. *Genomics* **27**: 131–141.
- Breuer W & Skorecki KL (1989) Inhibition of prostaglandin E₂ synthesis by a blocker of epithelial chloride channels. *Biochem Biophys Res Commun* **163**: 398–405.
- Conway EJ & Downey M (1950) An outer metabolic region of the yeast cell. *Biochem J* **47**: 347–355.
- Coury LA, McGeoch JE, Guidotti G & Brodsky JL (1999) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* does not sequester chloride but can express a functional mammalian chloride channel. *FEMS Microbiol Lett* **179**: 327–332.
- Davis-Kaplan SR, Askwith CC, Bengtzen AC, Radisky D & Kaplan J (1998) Chloride is an allosteric effector of copper assembly for the yeast multicopper oxidase Fet3p: an unexpected role for intracellular chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13641–13645.
- Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT & MacKinnon R (2002) X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**: 287–294.
- Dutzler R, Campbell EB & MacKinnon R (2003) Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science* **300**: 108–112.
- Estevez R, Schroeder BC, Accardi A, Jentsch TJ & Pusch M (2003) Conservation of chloride channel structure revealed by an inhibitor binding site in ClC-1. *Neuron* **38**: 47–59.
- Flis K, Bednarczyk P, Hordejuk R, Szewczyk A, Berest V, Dolowy K., Edelman A. & Kurlandzka A (2002) The Gef1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is associated with chloride channel activity. *Biochem Biophys Res Commun* **294**: 1144–1150.
- Friedrich T, Breiderhoff T & Jentsch TJ (1999) Mutational analysis demonstrates that ClC-4 and ClC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem* **274**: 896–902.
- Gaxiola RA, Yuan DS, Klausner RD & Fink GR (1998) The yeast ClC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4046–4050.
- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL & Fink GR (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1480–1485.
- Giles KR, Humphries M, Abell A & Garrill G (2003) The synthesis of NPPB and NPBB by reductive amination and the effects of these compounds on K⁺ channels of the alga *Nitella hookeri*. *Bioorg Med Chem Lett* **13**: 293–295.
- Greene JR, Brown NH, DiDomenico BJ, Kaplan J & Eide DJ (1993) The GEF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth. *Mol Gen Genet* **241**: 542–553.
- Halliwell RF, Thomas P, Patten D, James CH, Martinez-Torres A, Miledi R & Smart TG (1999) Subunit-selective modulation of GABA_A receptors by the non-steroidal anti-inflammatory agent, mefenamic acid. *European J Neuroscience* **11**: 2897–2905.

- Hartzell C, Putzier I & Arreola J (2005) Calcium-activated chloride channels. *Annu Rev Physiol* **67**: 719–758.
- Hayat MA (1981) *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. Biological Applications, Vol. 1. 2nd edn, pp. 301–353. University Park Press, Baltimore.
- Hechenberger M, Schwappach B, Fischer WN, Frommer WB, Jentsch TJ & Steinmeyer K (1996) A family of putative chloride channels from Arabidopsis and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption. *J Biol Chem* **271**: 33632–33638.
- Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M & Chagoya de Sanchez V (1992) Effects of adenosine administration on the function and membrane composition of liver mitochondria in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Arch Biochem Biophys* **294**: 160–167.
- Huang L, Cao J, Wang H, Vo LA & Brand JG (2005) Identification and functional characterization of a voltage-gated chloride channel and its novel splice variant in taste bud cells. *J Biol Chem* **280**: 36150–36157.
- Jentsch TJ, Steinmeyer K & Schwarz G (1990) Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* **348**: 510–514.
- Jordt SE & Jentsch TJ (1997) Molecular dissection of gating in the CLC-2 chloride channel. *EMBO J* **16**: 1582–1592.
- Keeling DJ, Taylor AG & Smith PL (1991) Effects of NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid) on chloride transport in intestinal tissues and the T84 cell line. *Biochim Biophys Acta* **1115**: 42–48.
- Kida Y, Uchida S, Miyazaki H, Sasaki S & Marumo F (2001) Localization of mouse CLC-6 and CLC-7 mRNA and their functional complementation of yeast CLC gene mutant. *Histochem Cell Biol* **115**: 189–194.
- Miledi R (1982) A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **215**: 491–497.
- Miyazaki H, Uchida S, Takei Y, Hirano T, Marumo F & Sasaki S (1999) Molecular cloning of CLC chloride channels in *Oreochromis mossambicus* and their functional complementation of yeast CLC gene mutant. *Biochem Biophys Res Commun* **255**: 175–181.
- Parker I & Miledi R (1988) A calcium-independent chloride current activated by hyperpolarization in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **233**: 191–199.
- Piccolo A & Pusch M (2005) Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CLC-4 and CLC-5. *Nature* **436**: 420–423.
- Scheel O, Zdebek AA, Lourdel S & Jentsch TJ (2005) Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature* **436**: 424–427.
- Schmieder S, Bogliolo S & Ehrenfeld J (2007) N-glycosylation of the *Xenopus laevis* CLC-5 protein plays a role in cell surface expression, affecting transport activity at the plasma membrane. *J Cell Physiol* **210**: 479–488.
- Schwappach B, Stobrawa S, Hechenberger M, Steinmeyer K & Jentsch TJ (1998) Golgi localization and functionally important domains in the NH2 and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Gef1p. *J Biol Chem* **273**: 15110–15118.
- Srinivasan S, Seaman M, Nemoto Y, Daniell L, Suchy SF, Emr S, De Camilli P & Nussbaum R (1997) Disruption of three phosphatidylinositol-polyphosphate 5-phosphatase genes from *Saccharomyces cerevisiae* results in pleiotropic abnormalities of vacuole morphology, cell shape, and osmohomeostasis. *Eur J Cell Biol* **74**: 350–360.
- Sumikawa K, Parker I, Amano T & Miledi R (1984) Separate fractions of mRNA from Torpedo electric organ induce chloride channels and acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* **3**: 2291–2294.
- Torkko JM, Koivuranta KT, Miinalainen IJ, Yagi AI, Schmitz W, Kastaniotis AJ, Airenne TT, Gurvitz A & Hiltunen KJ (2001) *Candida tropicalis* Etr1p and *Saccharomyces cerevisiae* Ybr026p (Mrf1'p), 2-enoyl thioester reductases essential for mitochondrial respiratory competence. *Mol Cell Biol* **18**: 6243–6253.
- Wachter A & Schwappach B (2005) The yeast CLC chloride channel is proteolytically processed by the furin-like protease Kex2p in the first extracellular loop. *FEBS Lett* **579**: 1149–1153.
- Weber W (1999) Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* **1421**: 213–233.