



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Mención Biología Celular y Molecular



**Determinantes estructurales en la vía de translocación de
sustratos del co-transportador de sodio-ascorbato
SVCT1.**

HENNY MARIANNE HAENSGEN SAEZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2013

Profesor Guía: Dr. Juan Carlos Vera Cárcamo
Dpto. de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

RESUMEN

La forma predominante de la vitamina C en el plasma es el ácido ascórbico, el cual es transportado al interior de las células por cotransportadores de Na^+ -ascorbato denominados SVCTs. SVCT1 ha sido clonado molecularmente y caracterizado funcionalmente, caracterizándose por presentar una K_m aparente de transporte de ácido ascórbico en el rango de 100-150 μM y ser activado cooperativamente por Na^+ . Recientemente hemos construido un modelo 3D de SVCT1 que propone un modelo de plegamiento conteniendo 14 segmentos transmembrana (STM) agrupados en un canal central, constituido por 6 STM (1, 2, 3, 8, 9 y 10) que contienen el poro de transporte y también los sitios de unión para Na^+ y ácido ascórbico el cual estaría rodeado por 4 STM accesorios (4, 5, 11 y 12). Además, el modelo propone un dominio compuerta, el cual está formado por los STM 6, 7, 13 y 14, los cuales se encuentran en directa interacción con la membrana celular pero no se les ha asignado un papel importante en determinar las características funcionales de SVCT1.

A raíz que actualmente no existe información que permita relacionar la estructura de SVCT1 con su función, hemos realizado un análisis de secuencia entre SVCT1 y proteínas ortólogas y parólogas con el fin de encontrar residuos aminoacídicos que pudieran resultar importantes para su función. De especial interés es encontrar residuos aminoacídicos que participen en la unión de los sustratos y que definan su función para poder definir posibles blancos terapéuticos a futuro. En base a esto, se propuso como hipótesis de trabajo que los STM 1, 2, 4, 8, 10 y 11 forman parte del poro en el cotransportador de Na^+ -ascorbato SCVT1. En este contexto, propusimos que los residuos aminoacídicos H51 en STM 1, S80 en STM 2, I170 y G171 en STM 4, V321, L322 y

S335 en STM 8, T375, G378, S379, S381 y S382 en STM 10 y T417 y A418 en STM 11 son elementos estructurales importantes en el dominio de unión de sustratos en SVCT1, y por lo mismo su reemplazo no conservado a través de mutagénesis sitio-dirigida tendrá efectos deletéreos en la función del transportador de ácido ascórbico SVCT1.

En esta tesis se desarrolló un estudio de mutagénesis detallado con el objetivo de establecer la relación estructura-función y las propiedades regulatorias del dominio central, además de algunos residuos aminoácidos localizados en el dominio compuerta y en lazos exofaciales.

Cada una de las proteínas mutantes generadas fue expresada como una proteína de fusión con la proteína fluorescente verde (GFP) en células HEK-293. La localización subcelular se analizó por microscopía confocal utilizando cortes ópticos sucesivos a lo largo del eje z de la célula y corroborada por estudios de coexpresión con GLUT1 fusionado a la proteína fluorescente roja (DsRed) como marcador de membrana celular.

Además, se realizaron ensayos de transporte de ácido ascórbico marcado radiactivamente para determinar el efecto de las mutaciones sobre las propiedades cinéticas del transporte de ácido ascórbico (K_m y V_{max}) y sobre el efecto cooperativo del Na^+ . Estos experimentos revelaron que el total de las mutaciones realizadas en STM pertenecientes al canal central (poro y hélices accesorias) sufrió cambios que incluyen la retención intracelular, cambios en las constantes cinéticas e incluso la pérdida total en la capacidad de transportar ácido ascórbico. Como era esperable, las mutaciones en las hélices compuerta o en lazos exofaciales no afectaron drásticamente la función y localización del transportador, con algunas excepciones donde se vieron principalmente alteraciones en el efecto cooperativo del Na^+ .

Los resultados de esta tesis permiten concluir que el modelo propuesto en nuestro laboratorio para SVCT1 es bastante acertivo en términos de la identificación de residuos claves para la función del transportador. Además, nuestros resultados dan cuenta de lo complejo que es el estudio de proteínas transportadoras, pues mutaciones puntuales en residuos aminoacídicos alejados al sitio de unión de sustratos propuesto también comprometen la dinámica del ciclo de transporte, probablemente a través de interacciones de largo alcance entre diferentes dominios estructurales-funcionales del transportador formados por la asociación de distintos STM.

