



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
DIRECCIÓN DE POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS  
ESENCIALES EN LA VÍA DE MIGRACIÓN DE SUSTRATO  
DEL TRANSPORTADOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO SVCT2.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular.

**PAMELA LORENA MENDOZA MUÑOZ.**

**CONCEPCIÓN – CHILE**

**2017**

Profesores Guía Dra. Coralia Isabel Rivas Rocco  
Dr. Juan Carlos Vera Cárcamo  
Departamento de Fisiopatología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## RESUMEN.

SVCT2 es un transportador de ácido ascórbico (AA) que funciona a favor de un gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$ , transportando  $\text{Na}^+$  y AA simultáneamente, en orden de unión  $\text{Na}^+:\text{AA}:\text{Na}^+$  y una estequiometría de transporte de 2:1. El análisis de su secuencia permite clasificarlo en la superfamilia de nucleobases/cationes tipo 2 (NAT/NCS-2). La disponibilidad de la estructura cristalina de un miembro de esta superfamilia, el transportador UraA de *E. coli*, nos permitió construir un modelo 3D *in silico* para SVCT2. El modelo consta de 14 segmentos transmembrana (STM) unidos por lazos ricos en residuos hidrofílicos, con sus extremos N- y C-terminal orientados hacia la cara citoplasmática de la célula y dos hebras  $\beta$  entre STM 3 y 10 que interaccionan entre sí y que formarían parte del bolsillo de unión a sustrato. En estudios previos de acoplamiento molecular y de mutagénesis sitio-dirigida en SVCT2, se identifican residuos que formarían parte del sitio de unión de AA, distribuidos en distintas zonas de SVCT2.

En este trabajo, analizamos la importancia estructural o funcional de los segmentos STM 3 y 10, los cuales en transportadores homólogos se han descrito como componentes fundamentales para la actividad. Para ello, realizamos un barrido de alanina en los dominios STM 3 y 10, cada mutante se expresó en células HEK-293T y se analizó su distribución subcelular por microscopía de fluorescencia. Los niveles de expresión de proteína y la habilidad funcional de cada mutante se determinaron mediante Western blot y ensayos de captación de AA, respectivamente. El 72% de los residuos mutados y que generaron proteínas expresadas a nivel de membrana plasmática,

evidenciaron una disminución o pérdida total de la función de transporte y segregaron sobre una misma cara en cada hélice, lo que es consistente con el concepto que las hélices 3 y 10 conforman parte de la superficie del poro central de transporte. Además, los residuos: Phe165, Ala167, Ala169 y Phe170 (STM 3) y Ser438, Ser441, Pro443, Ile450 y Thr451 (STM 10) son esenciales para la función, sugiriendo que ellos forman parte del sitio de unión a AA. Por otro lado, mutaciones simples y múltiples realizadas sobre los residuos que forman el segmento de hoja beta entre ambos STM, conducen a una pérdida total de la función de transporte, sugiriendo que esta estructura es fundamental para modular la correcta función de SVCT2. En su conjunto, los resultados proporcionan pruebas convincentes que validan el modelo 3D propuesto para la estructura de SVCT2, e identifican a los STM 3 y 10, como elementos estructurales fundamentales para la función de transporte, y a los residuos clave situados en el canal central que participan en la vía de migración de sustrato.