

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



**ANALISIS DE ESTRUCTURA-FUNCION DEL
CO-TRANSPORTADOR DE Na⁺/ACIDO ASCORBICO SVCT2:
MECANISMO DE TRANSPORTE Y ASPECTOS REGULATORIOS.**

Tesis doctoral presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción,
como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas,
área Biología Celular y Molecular

Por

Alejandro Samuel Godoy Sánchez

2004

5.- RESUMEN

Hasta el momento se han identificado dos sistemas que median el transporte de vitamina C en células de mamíferos. La forma oxidada de esta vitamina (ácido deshidroascórbico) ingresa a la célula por los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs), en tanto que la forma reducida (ácido ascórbico) lo hace a través de una familia de proteínas denominadas SVCTs, de los cuales se han descrito dos miembros hasta el momento, SVCT1 y SVCT2. Estos últimos transportadores se caracterizan por ser activados por sodio, electrogénicos y altamente selectivos para L-ascorbato. Estudios preliminares de caracterización funcional de SVCT1 y SVCT2, clonados y expresados en ovocitos de *X. laevis*, han producido resultados contradictorios respecto de los parámetros cinéticos asociados al transporte de ácido ascórbico. Por otro lado, no se han caracterizado las propiedades funcionales de los SVCTs expresados endógenamente y en forma aislada, debido a que la mayoría de las células parecen expresar ambas isoformas simultáneamente.

En esta tesis, caracterizamos la expresión de SVCTs en un modelo de células de melanoma humano (SK-MEL), y desarrollamos un completo análisis cinético y de estructura-función del transportador de Na^+ /ácido ascórbico SVCT2 expresado en estas células. Los estudios de inmunodetección, RT-PCR y secuenciación permitieron confirmar la presencia de la isoforma SVCT2 en este modelo celular, y ausencia de expresión de SVCT1. Los estudios cinéticos demostraron la existencia de un sistema de transporte de ácido ascórbico que presentó una K_m de $17 \pm 3 \mu\text{M}$. La dependencia de la dosis para la activación por sodio demostró una relación sigmoideal entre la velocidad de

captación de ascorbato y la concentración de sodio, con un coeficiente de Hill de 1,9 y un Na_{50} de 35 mM. Estos resultados fueron compatibles con una estequiometría de transporte Na^+ :ácido ascórbico de 2:1, estimada a partir de ensayos de transporte en paralelo de $^{22}Na^+$ y $[1-^{14}C]$ ácido ascórbico. La K_m de transporte para ácido ascórbico fue afectada por la concentración de sodio en el medio extracelular, observándose una disminución de más de 100 veces el valor de la K_m cuando el sodio aumentó de 5 a 135 mM, sin afectar la V_{max} de transporte. A la inversa, el ácido ascórbico modificó la cooperatividad para el sodio con un comportamiento de tipo bimodal, observándose un aumento progresivo en el grado de cooperatividad a concentraciones crecientes de ácido ascórbico entre 5 y 100 μM , y posteriormente, una pérdida abrupta de la cooperatividad a concentraciones de ácido ascórbico igual o superiores a 200 μM . Este efecto recíproco de ambos sustratos sugiere una secuencia de unión al transportador del tipo sodio:ácido ascórbico:sodio. La función de SVCT2 requiere la presencia de cationes bivalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) en el medio extracelular. El mecanismo de acción de estos cationes involucra la estabilización de una conformación activa del transportador, que muestra un aumento en la velocidad máxima de transporte, sin afectar la K_m asociada al transporte de ácido ascórbico, ni el efecto del activador sodio (nH y Na_{50}). Estos resultados permiten concluir que SVCT2 es un transportador de alta afinidad, es activado por sodio en forma cooperativa, requiere Ca^{2+} o Mg^{2+} para su función, transporta Na^+ y ácido ascórbico con una estequiometría 2:1 (Na^+ :ácido ascórbico), y el ciclo de transporte se caracteriza por un orden de unión de los sustratos del tipo Na^+ :ácido ascórbico: Na^+ .

Variaciones en el pH extracelular afectaron la función de SVCT2 tanto a pH ácido como a pH básico, observándose una caída en la velocidad de transporte y una pérdida de

la cooperatividad para el sodio (nH), sin afectar la K_m de transporte. Dietilpirocarbonato, un reactivo que a pH 6 muestra especificidad por residuos de histidina, afecta la función de SVCT2 en forma similar al efecto del pH, con pérdida de cooperatividad y una caída en la velocidad de transporte, sin afectar la K_m de transporte, y sin que se observe un efecto protector del sustrato. Por otro lado, el análisis de la cinética de inhibición en función de la concentración de dietilpirocarbonato sugiere que al menos dos residuos de histidina pudieran estar participando en la pérdida de la cooperatividad por el sodio y la caída en la actividad del transportador como producto de la modificación. En conjunto con la información previa de la caracterización de las propiedades funcionales de SVCT2, los resultados de modificación química con dietilpirocarbonato sugieren que ambas funciones, cooperatividad y actividad, serían propiedades determinadas por motivos estructurales que son diferenciables desde el punto de vista de su accesibilidad a modificadores químicos.

