

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE
AMINOÁCIDOS QUE FORMAN PARTE DEL BOLSILLO ENDOFACIAL DE UNIÓN A
ÁCIDO ASCÓBBICO EN EL TRANSPORTADOR SVCT2.**

Tesis de Magister presentada a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Magister en Bioquímica y Bioinformática

Por

Marcell Alejandra Gatica Miranda

2009

5. RESUMEN

La forma reducida de la vitamina C, el ácido ascórbico, es transportada al interior celular por la familia de cotransportadores de sodio-ascorbato SVCT, con 2 isoformas, SVCT1 y SVCT2, los que pertenecen a la superfamilia de facilitadores principales (MFS), la que cuenta con más de 1000 miembros. Solamente tres transportadores de esta familia han sido cristalizados a alta resolución, la lactosa permeasa (LacY), el transportador de glicerol-3-fosfato (GlpT) y el transportador de multidroga (EmrD). Aunque los transportadores pertenecientes a la MFS poseen un bajo porcentaje de identidad a nivel de estructura primaria (< 14%), las proteínas hasta ahora cristalizadas muestran un modelo de plegamiento 3D extraordinariamente similar, lo que ha llevado a la propuesta de que todos los miembros de esta familia poseerían un plegamiento 3D común con una disposición espacial similar de sus segmentos transmembrana. Otro aspecto común a esta familia de transportadores es que el mecanismo de transporte se caracteriza por la exposición alternante del sitio de unión del sustrato entre dos estados conformacionales de la proteína, endofacial y exofacial, con un vestíbulo accesible intracelularmente en la conformación endofacial o extracelularmente en la conformación exofacial. Además, un aspecto central del modelo es que los cambios conformacionales inducidos por la unión del sustrato y que llevan a su translocación a través del transportador, son favorecidos por la presencia de cosustratos o moléculas activadoras. SVCT2 corresponde a un cotransportador de sodio-ácido ascórbico en el cual el ión sodio activa en forma cooperativa el transporte de ácido ascórbico disminuyendo marcadamente la K_m de transporte, mientras el ácido ascórbico a su vez afecta el efecto cooperativo del ión sodio.

En esta Tesis nos propusimos utilizar la estructura cristalina de LacY como molde

molecular para construir un modelo 3D del transportador de ácido ascórbico SVCT2, con el fin de identificar aquellos residuos de aminoácidos importantes para el transporte de ácido ascórbico por homología estructural con LacY, en base a los siguientes antecedentes: i) LacY es un cotransportador de H⁺-lactosa perteneciente a la superfamilia MFS y posee un mecanismo de transporte similar al de SVCT2, ii) LacY ha sido cristalizado por lo que se dispone de un modelo 3D de alta resolución, iii) estudios de mutagénesis sitio dirigida y de dinámica molecular han permitido identificar los residuos de aminoácidos implicados en la unión y el transporte de lactosa en LacY y correlacionarlos con la estructura 3D, iv) los miembros de la superfamilia MFS parecen tener una estructura 3D altamente conservada, v) existe un número importante de transportadores SVCT secuenciados en diversas especies, lo que permite un análisis filogenético de conservación de secuencia en la familia completa de los SVCTs para identificar residuos de aminoácidos altamente conservados importantes funcionalmente, y vi) existe evidencia indicando que es posible generar un modelo 3D de un transportador por homología estructural con otro miembro de la misma familia.

El estudio de homología estructural entre SVCT2 y LacY permitió identificar 9 residuos de aminoácidos, Gln108, His109, Ile229, His269, Ile277, Thr434, Gly437, Ser440 y Ser441, los que de acuerdo a su conservación y localización en el modelo 3D de SVCT2 deberían ser claves para la unión endofacial de ácido ascórbico. Estos residuos fueron reemplazados por mutagénesis sitio-dirigida, llevando a cabo reemplazos conservativos y no conservativos, y las respectivas mutantes de SVCT2 fueron transfectadas y expresadas en células HEK-293, determinando su nivel y sitio de expresión celular por microscopía confocal, analizando su capacidad para transportar ácido ascórbico, las propiedades funcionales y cinéticas asociadas al transporte y el efecto sobre la activación por sodio. La

hipótesis central de esta Tesis es que si estos residuos de aminoácidos son parte del sitio endofacial de unión de ácido ascórbico en SVCT2, su reemplazo debería afectar marcadamente la capacidad de SVCT2 para transportar ácido ascórbico, alterando tanto el valor de las constantes cinéticas de transporte como el efecto activador del sodio.

Los resultados de este estudio permitieron identificar cuatro grupos de mutaciones introducidas en 9 residuos de aminoácidos distintos, los que se encuentran localizados endofacialmente en tres dominios transmembrana no continuos en la secuencia de SVCT2, y cuyo reemplazo afecta la localización y las propiedades funcionales del transportador: i) mutaciones tipo I, que inactivan totalmente el transportador con pérdida de la capacidad de transporte; ii) mutaciones tipo II, que producen marcados cambios en la K_m y en la V_{max} de transporte de ácido ascórbico, con conservación del efecto de activación cooperativa por Na^+ ; iii) mutaciones tipo III, que producen marcados cambios en la K_m y en la V_{max} de transporte de ácido ascórbico asociado a una pérdida del efecto de activación cooperativa por Na^+ ; y iv) mutaciones tipo IV, que alteran la localización celular de SVCT2, el que queda retenido intracelularmente con ausencia de expresión a nivel de la membrana plasmática.

En conjunto con el modelo 3D del transportador, los resultados funcionales permiten concluir que estos tres grupos de aminoácidos serían parte del sitio de unión endofacial de ácido ascórbico y son fundamentales en definir las características funcionales y cinéticas de SVCT2.