



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

ANALISIS DEL PAPEL FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE RESIDUOS DE CISTEINA DEL TRANSPORTADOR DE ACIDO ASCORBICO SVCT2

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.

CARLOS FRANCISCO AYLWIN RAMÍREZ
CONCEPCIÓN – CHILE
2014

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

5.- RESUMEN

SVCT2 es un transportador de ácido ascórbico de expresión ubicua importante para la mantención de niveles normales de ácido ascórbico en tejidos. Funcionalmente, SVCT2 posee una K_m de transporte de ácido ascórbico cercana a $20 \mu\text{M}$ y un mecanismo de co-transporte de 2 iones sodio por molécula de ácido ascórbico. El ión sodio activa cooperativamente el transporte de ácido ascórbico a través de una disminución de la K_m de transporte desde $\approx 2 \text{ mM}$ en ausencia de ión sodio, hasta $\approx 20 \mu\text{M}$ en presencia de 135 mM ión sodio. El modelo 3D predicho de SVCT2 sugiere un plegamiento de 14 segmentos transmembrana (STM) agrupados en tres grupos. El dominio central está formado por los STM 1, 2, 3, 8, 9 y 10 y contiene los sitios de unión a ácido ascórbico y iones sodio. El dominio de compuerta está formado por los STM 6, 7, 13 y 14 y actúa como un filtro de selectividad. Los STM 4, 5, 11 y 12 actúan como STM de acoplamiento entre los dominios de compuerta y el canal central.

SVCT2 posee 14 residuos de cisteína presentes en los tres grupos que definen la topología del transportador en la membrana celular. En esta tesis propusimos establecer la importancia estructural-funcional de los residuos de cisteína de SVCT2. El modelo de estudio correspondió a células HEK-293 SVCT2 fusionado a la proteína fluorescente verde (SVCT2-GFP). Analizamos el efecto de agente reductor DTT y del tratamiento con los alquilantes PCMB y NEM sobre el transporte de ácido ascórbico mediado por SVCT2. Luego, reemplazamos sistemáticamente cada residuo de cisteína por serina generando mutantes simples, dobles, triples y un transportador sin residuos de cisteína (SVCT2 cys-less). Además, se prepararon 5 grupos de mutantes múltiples, reemplazando los residuos de cisteína presentes en el dominio central, dominio de compuerta, STM de acoplamiento, en lazos exofaciales y lazos endofaciales en SVCT2. Cada mutante fue examinado por su

localización subcelular, propiedades funcionales y sensibilidad al tratamiento con PCMB y NEM. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con DTT no afecta el transporte de ácido ascórbico, sugiriendo que la actividad de SVCT2 no requiere de un estado oxidado a nivel de cadenas laterales de residuos de cisteínas. Por otro lado, el tratamiento con una concentración PCMB y NEM equivalente a cada IC_{50} , produce una disminución de la V_{max} de transporte sin alterar la K_m para ácido ascórbico ni la activación cooperativa por el Na^+ , probablemente a través de la inactivación completa del transportador.

Los resultados de mutagénesis sitio-dirigida de residuos de cisteína, revelaron que la sustitución individual de 9 de los 14 residuos de cisteína no afectan el nivel de expresión, localización subcelular ni sus propiedades de transporte de ácido ascórbico. SVCT2 posee 5 residuos de cisteína (113, 129, 160, 187 y 401) importantes para mantener la K_m de transporte para ácido ascórbico, presentes en los STM y lazos conectores del dominio central del transportador, con residuos de cisteína en el STM1, STM8, lazo exofacial 1-2, lazo exofacial 3-4 y lazo endofacial 2-3. El reemplazo de residuos de cisteína de la mitad carboxilo-terminal está localizado en la membrana plasmática y posee una muy baja actividad de transporte. SVCT2 mutante de la mitad amino-terminal, presenta una localización intracelular. SVCT2 cys-less presenta bajo nivel de expresión y se localiza a nivel de retículo endoplásmico. Basados en los resultados obtenidos en esta tesis, proponemos que los residuos de cisteína de SVCT2 participan en al menos dos aspectos de importancia funcional-estructural. Primero, el proceso de plegamiento y tráfico hacia la membrana plasmática es altamente dependiente de la presencia de residuos de cisteína de SVCT2. Segundo, los residuos de cisteínas de los STM del dominio central, son importantes en modular aspectos específicos de las propiedades funcionales de SVCT2, principalmente la K_m para ácido ascórbico sin alterar la cooperatividad por el Na^+ .