




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



ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DEL TRANSPORTADOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO SCVT2

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

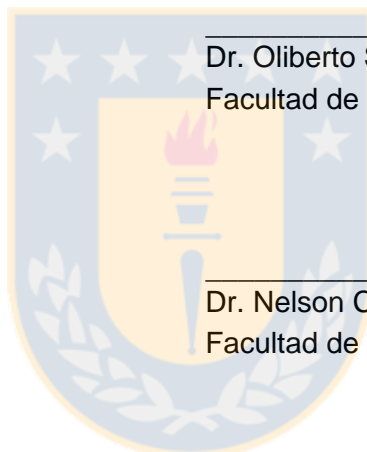
MARCELL ALEJANDRA GATICA MIRANDA
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

Profesor Guía: Dra. Coralia Rivas Rocco
Dpto. de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dra. Coralia Rivas Rocco
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas



Dr. Oliberto Sánchez Ramos
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Nelson Carvajal Baeza
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Juan Guillermo Cárcamo Matus
Profesor Evaluador Externo
Universidad Austral de Chile

Dr. Juan Pablo Henríquez H.
Director
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

1. ÍNDICE GENERAL

	Página
1. ÍNDICE GENERAL	I
2. ÍNDICE DE FIGURAS	IV
3. ÍNDICE DE TABLAS	VIII
4. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IX
5. RESUMEN	1
6. SUMMARY	4
7. INTRODUCCIÓN	7
7.1 Antecedentes generales, características químicas y propiedades fisiológicas de la vitamina C.	7
7.2 Transportadores de ácido deshidroascórbico.	12
7.3 Transportadores de ácido ascórbico.	15
7.4 Relación estructura función de transportadores Cristalizados.	21
7.5 Antecedentes estructurales en el transportador SVCT2.	24
7.6 Estructura cuaternaria de transportadores obtenida a partir de evidencia cristalográfica.	27
7.7 Estructura cuaternaria de transportadores obtenida de estudios biofísicos y funcionales.	33
8. HIPÓTESIS	40
9. OBJETIVO GENERAL	41
10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
11. MATERIALES Y MÉTODOS	43
11.1 Materiales.	43

11.2	Métodos.	45
11.2.1	Cultivo celular.	45
11.2.2	Mutaciones sitio dirigidas del transportador SVCT2.	45
11.2.3	Construcción de las quimeras de SVCT2-RED, SVCT2-Flag-His, SVCT2-HA y GFP-SVCT2.	46
11.2.4	Purificación de ADN plasmidial por columna de intercambio iónico.	48
11.2.5	Transfección transiente de plásmidos en células HEK-293.	49
11.2.6	Ensayos de inmunocitoquímica.	50
11.2.7	Ensayos de entrecruzamiento con paraformaldehído.	51
11.2.8	Ensayos de entrecruzamiento con DSS y BS3.	52
11.2.9	Western Blot.	53
11.2.10	Ensayos de transporte de ácido ascórbico.	54
12.	RESULTADOS	57
12.1	Construcción de transportadores SVCT2 quiméricos y mutantes.	57
12.2	Caracterización funcional de transportadores SVCT2 quiméricos y mutantes.	58
12.2.1	Quimera SVCT2-GFP.	60
12.2.2	Quimera SVCT2-RED.	65
12.2.3	Quimera GFP-SVCT2.	68
12.2.4	Quimera SVCT2-Flag-His.	71
12.2.5	Quimera SVCT2-HA.	73
12.2.6	Mutante H109Q(SVCT2-GFP).	78
12.2.7	Mutante C113S(SVCT2-GFP).	82
12.2.8	Mutante C160S(SVCT2-GFP).	85
12.3	Entrecruzamiento químico con paraformaldehído del transportador SVCT2 endógeno presente en líneas celulares humanas.	90
12.4	Entrecruzamiento químico con paraformaldehído de quimeras de SVCT2 expresadas en la línea celular HEK-293.	94
12.4.1.	Dependencia de la concentración de paraformaldehído.	94

12.4.2. Dependencia del tiempo de entrecruzamiento con paraformaldehído.	99
12.4.3. Dependencia de la temperatura de entrecruzamiento con paraformaldehído.	102
12.5 Entrecruzamiento químico de quimeras de SVCT2 expresadas en células HEK-293 utilizando reactivos entrecruzantes de longitud definida.	105
12.6 Entrecruzamiento químico de mutantes de SVCT2 expresadas en células HEK-293.	108
12.7 Determinación de la interacción funcional entre quimeras de SVCT2-nativo y SVCT2 mutantes mediante estudios cinéticos.	111
12.7.1 Caracterización funcional de las quimeras SVCT2-RED y SVCT2-GFP.	112
12.7.2 Caracterización funcional de SVCT2 y la mutante H109Q coexpresadas en células HEK-293.	115
12.7.3 Caracterización funcional de SVCT2 y la mutante C113S coexpresadas en células HEK-293.	123
12.7.4 Caracterización funcional de SVCT2 y la mutante C160S coexpresadas en células HEK-293.	130
12.7.5 Caracterización funcional de SVCT2-Flag-His y la mutante GFP-C160S-SVCT2 coexpresadas en células HEK-293.	137
13. DISCUSIÓN	144
14. BIBLIOGRAFÍA	189

2. ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Especies moleculares del ácido ascórbico.	9
Figura 2.	Modelo propuesto para la estructura secundaria de los transportadores de ácido ascórbico.	28
Figura 3.	Estructuras cuaternarias pertenecientes a diferentes transportadores de membrana.	34
Figura 4.	Modelos de quimeras y mutantes de SVCT2.	59
Figura 5.	Localización subcelular y análisis funcional de SVCT2-GFP y GFP.	61
Figura 6.	Localización subcelular y análisis funcional de SVCT2-RED.	66
Figura 7.	Localización subcelular y análisis funcional de GFP-SVCT2.	69
Figura 8.	Localización subcelular y análisis funcional de SVCT2-Flag-His.	72
Figura 9.	Localización subcelular y análisis funcional de SVCT2-HA.	74
Figura 10.	La mutación individual del residuo H109 en SVCT2 no afectó su localización subcelular pero si su capacidad de transporte de AA.	80
Figura 11.	La mutación individual del residuo C113 en SVCT2 no afectó su localización subcelular pero si su capacidad de transporte de AA y sus constantes cinéticas.	83
Figura 12.	La mutación individual del residuo C160 en SVCT2 no afectó su localización subcelular pero si las propiedades cinéticas asociadas al transporte de AA.	88

Figura 13.	La incubación con paraformaldehído sugiere la presencia de dímeros y la aparición de agregados macromoleculares de SVCT2 en distintas líneas celulares humanas.	92
Figura 14.	La incubación con paraformaldehído de células HEK-293 que sobreexpresan las quimeras del transportador sugiere la presencia de dímeros de SVCT2.	98
Figura 15.	La presencia de dímeros de SVCT2 detectados en células HEK-293 depende del tiempo de incubación con paraformaldehído.	101
Figura 16.	La presencia de dímeros de SVCT2 detectados en células HEK-293 depende de la temperatura de incubación con PFA.	104
Figura 17.	La incubación con DSS y BS3 de células HEK-293 que sobreexpresan el transportador sugiere la presencia de dímeros de SVCT2.	107
Figura 18.	La incubación con DSS de células HEK-293 que sobreexpresan las mutantes del transportador SVCT2-GFP sugiere la presencia de dímeros.	110
Figura 19.	La adición de proteínas fluorescentes en el extremo carboxilo terminal de SVCT2 no afectó las propiedades cinéticas del transportador.	114
Figura 20.	La coexpresión de SVCT2-GFP y la mutante inactiva H109Q-SVCT2-GFP reveló que cada una conservó sus propiedades de transporte de AA.	116
Figura 21.	La coexpresión de la mutante inactiva H109Q-SVCT2-GFP y SVCT2-RED reveló que cada una conservó sus propiedades de transporte de AA.	120
Figura 22.	La coexpresión de la mutante inactiva H109Q-SVCT2-GFP y el transportador nativo SVCT2-RED reveló que ambas proteínas colocalizan en membrana plasmática.	121
Figura 23.	La coexpresión del transportador SVCT2-RED y la proteína mutante C113S-SVCT2-GFP reveló que ambas proteínas se encuentran interaccionando y que la proteína que se expresa en mayor proporción es la que modula las propiedades cinéticas del transportador que se expresa en menor proporción.	125

Figura 24.	La coexpresión del transportador SVCT2-RED y la proteína mutante C113S-SVCT2-GFP reveló que ambas proteínas colocalizan en membrana plasmática.	127
Figura 25.	La coexpresión del transportador SVCT2-RED y la proteína mutante C113S-SVCT2-GFP reveló que ambas proteínas se encuentran interaccionando y que la proteína que se expresa en mayor proporción es la que modula las propiedades cinéticas del transportador que se expresa en menor proporción.	128
Figura 26.	La coexpresión del transportador SVCT2-RED y la proteína mutante C160S-SVCT2-GFP reveló que ambas proteínas se encuentran interaccionando y que la proteína que se expresa en mayor proporción es la que modula las propiedades cinéticas del transportador que se expresa en menor proporción.	132
Figura 27.	La coexpresión del transportador SVCT2-RED y la proteína mutante C160S-SVCT2-GFP reveló que ambas proteínas colocalizan en membrana plasmática.	134
Figura 28.	La coexpresión del transportador SVCT2-RED y la proteína mutante C160S-SVCT2-GFP reveló que ambas proteínas se encuentran interaccionando y que la proteína que se expresa en mayor proporción es la que modula las propiedades cinéticas del transportador que se expresa en menor proporción.	135
Figura 29.	La coexpresión del transportador SVCT2-Flag-His y la proteína mutante GFP-C160S-SVCT2 reveló que ambas proteínas se encuentran interaccionando y que la proteína que se expresa en mayor proporción es la que modula las propiedades cinéticas del transportador que se expresa en menor proporción.	139
Figura 30.	La coexpresión del transportador SVCT2-Flag-His y la proteína mutante C160S-SVCT2-GFP reveló que ambas proteínas colocalizan en membrana plasmática.	141
Figura 31.	La coexpresión del transportador SVCT2-Flag-His y la proteína mutante GFP-C160S-SVCT2 reveló que ambas proteínas se encuentran interaccionando y que es esta interacción la que modula las propiedades cinéticas del dímero.	142

Figura 32.	Resultados propuestos para la interacción entre el mutante inactivo tipo I (H109Q-SVCT2-GFP) y el transportador SVCT2 nativo (SVCT2-RED).	168
Figura 33.	Modelo propuesto para la interacción entre H109Q (mutante inactivo tipo I) y el transportador SVCT2 nativo.	173
Figura 34.	Posibles resultados al estudiar las propiedades cinéticas de Km y V _{máx} asociados al transporte de AA en células que coexpresan una mutante tipo II (C113S o C160S) y el transportador SVCT2 nativo.	176
Figura 35.	Modelo propuesto para la interacción entre C113S o C160S (mutante tipo II) y el transportador SVCT2 nativo.	188



3. ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I.-	Contenido de ácido ascórbico en tejidos humanos. 13
Tabla II.-	Propiedades cinéticas determinadas para las quimeras de SVCT2. 77
Tabla III.-	Velocidad máxima de transporte asociada con el transporte de AA en células HEK-293 que coexpresan SVCT2-GFP y la mutante H109Q-SVCT2-GFP en distintas proporciones moleculares. 117
Tabla IV.-	Velocidad máxima de transporte asociada con el transporte de AA mediado por células HEK-293 que coexpresan SVCT2-RED y la mutante H109Q-SVCT2-GFP en distintas proporciones moleculares. 122
Tabla V.-	K_m aparente y velocidad máxima de transporte asociada con el transporte de AA mediado por células HEK-293 que coexpresan SVCT2-RED y la mutante C113S-SVCT2-GFP en distintas proporciones moleculares. 129
Tabla VI.-	K_m aparente y velocidad máxima de transporte asociada con el transporte de AA mediado por células HEK-293 que coexpresan SVCT2-RED y la mutante C160S-SVCT2-GFP en distintas proporciones moleculares. 136
Tabla VII.-	K_m aparente y velocidad máxima de transporte asociada con el transporte de AA mediado por células HEK-293 que coexpresan SVCT2-RED y la mutante C160S-SVCT2-GFP en distintas proporciones moleculares. 143

4. INDICE DE ABREVIATURAS

AA: C ₆ H ₈ O ₆ :	ácido ascórbico o forma oxidada de la vitamina C
AcrB:	Transportador de multidrogas
AdiC:	Bomba de protones
ADN:	ácido desoxirribonucleico
Ala (A):	Alanina
ARNm:	Mensajero de ácido ribonucleico
Arg (R):	Arginina
Asn (N):	Aspargina
Asp (N):	Ácido aspártico
ATP:	adenosin trifosfato
BetP:	Transportador de Sodio/Betaína
Ca ²⁺ :	Ion calcio
Cys (C):	Cisteína
Cs ⁺ :	Ion Cesio
DAT:	Transportador de dopamina
DHA:	Ácido deshidroascórbico o forma reducida de la vitamina C
DMSO:	Dimetilsulfóxido
Ds.RED:	Proteína fluorescente roja
E°:	Potencial redox
EDTA:	Ácido etilen diamino tetraacético
EmrD:	Transportador multidrogas
FRET:	Transferencia de energía de resonancia de Förster
GAT1:	Transportador de GABA
GFP:	Proteína fluorescente verde
GlyT1b:	Transportador de glicina
GLUT:	Transportadores facilitativos de hexosas
Gln (Q):	Glutamina
GlpT:	Transportador glicerol-3-fosfato
Glu (E):	Ácido glutámico
Gly (G):	Glicina
GlTPh:	Transportador de Glutamato
HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano sulfónico
HEK-293:	Células embrionarias de riñón humano
His (H):	Histidina
HL-60:	Células de leucemia mieloide humana
HMIT	Cotransportador de H ⁺ -mio-inositol
Ile (I):	Isoleucina
K ⁺ :	Ion potasio
Km:	Constante cinética de Michaelis-Menten
LacY:	Transportador lactosa permeasa
Leu (L):	Leucina
LeuTA:	Transportador de leucina
Li ⁺ :	Ion litio
Lys (K):	Lisina

mCi:	Microcurie
Mg ²⁺ :	Magnesio
Mhp1:	Transportador de bencilo/hidantoina
Met (M):	Metionina
min:	Minutos
MFS:	Superfamilia de transportadores facilitativos
mg:	Miligramos
mL:	Mililitros
mM:	Milimolar
Na ⁺ :	Ion sodio
Na50:	Concentración de sodio que produce un 50% del efecto
NaOH:	Hidróxido de sodio
NhaA:	Antiporter Na ⁺ /H ⁺
NCS2:	Transportadores de nucleobase/ascorbato
NET:	Transportador de norepinefrina
nH:	Coeficiente de Hill
NPG:	p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido
PBS:	Tampón fosfato salino
PbuX :	Transportador de xantinas de bacterias
pH: (-)	Logaritmo de la concentración de H ⁺
Phe (F):	Fenilalanina
pH109Q-SVCT2-GFP:	Plásmido que codifica para la mutante H109Q
pC113S-SVCT2-GFP:	Plásmido que codifica para la mutante C113S
pC160S-SVCT2-GFP:	Plásmido que codifica para la mutante C160S
pKa:	(-) logaritmo de la constante de acidez
Pro (P):	Prolina
pSVCT2-RED:	Plásmido que codifica para el transportador SVCT2-RED
PyrP:	Permeasa de uracilo unida a membrana
rpm:	Revoluciones por minuto
SeqID: NP:	Código de identificación de proteínas en GenBank
Ser (S):	Serina
SERT:	Transportador de serotonina
SGLT:	Transportador de Sodio/Galactosa
SVCT:	Familia de cotransportadores de sodio-ascorbato
STM:	Segmento de transmembrana
TDG:	β -D-galactopiranosil-1-tio- β -D-galactopiranosido.
Thr (T):	Treonina
Tris:	Tris(hidroximetil)aminometano
Tritón X-100:	Polietilen glicol-p-isoctifenil eter
Trp (W):	Triptófano
Tyr (Y):	Tirosina
UapA:	Permeasa de ácido úrico-xantina de <i>Aspergillus nidulans</i>
UapC:	Permeasa de purinas
UraA:	Transportador de uracilo
Val (V):	Valina
Vmáx:	Velocidad Máxima, Parámetro cinético
μ M :	Micromolar

5. RESUMEN

La forma reducida de la vitamina C, el ácido ascórbico (AA), es transportado al interior de las células por la familia de cotransportadores de sodio-ascorbato SVCT, con 2 formas funcionalmente activas, SVCT1 y SVCT2.

Se ha propuesto un modelo funcional para el ciclo de transporte de ambos SVCTs, en el cual el transportador presenta un sitio de unión para el sustrato AA, al menos dos sitios de unión para Na^+ y un sitio de unión Ca^{2+} y Mg^{2+} . Durante el ciclo de transporte ambos sitios de unión a sodio interactúan entre ellos y además interaccionan con el sitio de unión a AA, el cual a su vez afectaría recíprocamente la interacción entre ambos sitios de unión a sodio. De igual manera el sitio de unión a cationes divalentes interacciona con el sitio de unión a AA ya que se ha visto que en ausencia de cationes divalentes el transportador es inactivo.

Aunque existen numerosos estudios acerca de los aspectos cinéticos y funcionales de SVCT2, no existe información estructural disponible para este transportador. Análisis de hidrofobicidad revelaron que los SVCTs son altamente hidrofóbicos y están compuestas por 12 hélices de transmembrana unidas entre sí por lazos ricos en aminoácidos hidrofílicos y con los extremos amino y carboxilo-terminal orientados hacia la cara citoplasmática de la célula. Sin embargo hasta la fecha, no se tienen antecedentes acerca de la estructura 3D de SVCT2 ni del estado de oligomerización de este transportador en la membrana celular.

Por otro lado, existe evidencia que indica que la oligomerización es una característica esencial para la estructura y función de los transportadores de membrana. Cristalización de diferentes transportadores de membrana bacterianos

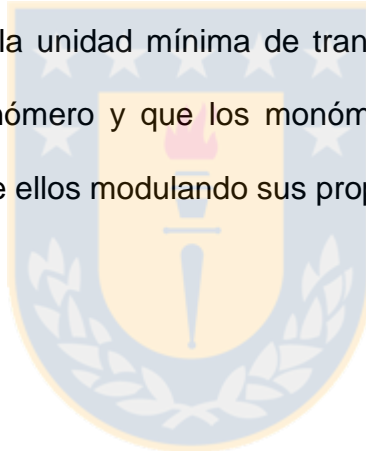
junto a diversos estudios utilizando técnicas alternativas a la cristalización, como ensayos de entrecruzamiento, transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), coimmunoprecipitación, entre otras, han llevado a proponer que aproximadamente el 70% de los transportadores están formando oligómeros en la membrana plasmática, por ejemplo, transportadores que usan el gradiente electroquímico como energía para catalizar la translocación de su sustrato, existen como oligómeros de alto orden, dímeros (vSGLT y LeuTA), trímeros (AcrB, GltPH y BetP) o tetrámeros (GLUT1)), aunque evidencia de monómeros (Mhp1) también fue reportada.

Recientes estudios de microscopía electrónica en hSVCT1 expresado en ovocito, reveló la presencia de dos poblaciones de partículas con distinta forma y estructura a baja resolución lo que sugiere la presencia de monómeros y dímeros del transportador. Por otro lado, ensayos de entrecruzamiento químico confirmaron la presencia de dímeros en membranas aisladas de estos ovocitos, aunque a concentraciones menores comparadas con el monómero de hSVCT1.

La información estructural es importante para comprender el mecanismo de estos transportadores a nivel molecular. Por lo que el propósito de esta tesis fue determinar la estructura cuaternaria de hSVCT2. Ensayos de entrecruzamiento químico de hSVCT2 seguido de inmunomarcaje con anticuerpos específicos sugieren que hSVCT2 existe como dímero. Además, realizamos ensayos de transporte de AA para comprender la significancia funcional de la oligomerización de hSVCT2 y así poder determinar la unidad mínima funcional de este transportador de membrana. Dentro de estos ensayos realizamos estudios funcionales de co-expresión del transportador activo (nativo) y una mutante

inactiva de hSVCT2 (H109Q), que revelaron que hSVCT2 nativo no restauró la capacidad de transporte de la mutante inactiva, ni esta última suprimió la capacidad de transporte del transportador nativo. Por otro lado, al coexpresar el transportador nativo junto a una mutante (C113S o C160S) que presenta características cinéticas alteradas (K_m aparente de transporte, al menos 5 veces superior a la del transportador nativo), revelaron que a todas las razones moleculares ensayadas se detectó un único componente cinético que corresponde a la proteína que se expresa en mayor proporción.

A partir de estos resultados, podemos proponer que hSVCT2 forma dímeros en membrana celular, que la unidad mínima de transporte dentro del dímero de hSVCT2 podría ser el monómero y que los monómeros dentro del dímero son capaces de interactuar entre ellos modulando sus propiedades cinéticas.



6. SUMMARY

Ascorbic acid is transported through biological membranes and organelles by members of the sodium ascorbate cotransporter family, which comprises two active forms: SVCT1 y SVCT2.

A functional transport model for SVCT's has been proposed which involves a single site for AA, at least two binding sites for Na⁺ and an additional binding site for Ca²⁺ and Mg²⁺. During the transport cycle, both sodium-binding sites closely interact between them along with the binding site for AA, which in turns is believed to reciprocally affect the functional relationship between both sodium-binding sites. In the same fashion, the binding sites for divalent cations are able to interact with the AA binding site because the absence of both cations renders the transporter inactive.

Although several SVCT2 kinetic and functional studies already exist, there is no structural information available for this transporter. Hydrophobicity assays revealed that SVCTs are highly hydrophobic and are composed of 12 membrane-spanning helices joined together by loops enriched in hydrophilic amino acids, with both ends oriented towards the cytoplasm. However, up to date, no information regarding SVCT2 3D structural or the oligomerization state of this transporter at the membrane has been made available.

Oligomerization is a essential feature for the structure and function of membrane embedded transporters. Crystallization experiments of several bacterial membrane bound transporters together with several other studies using different alternative techniques such as crosslinking assays, Förster resonance energy

transfer (FRET) and co-immunoprecipitation among others, have pointed out that nearly 70% of all known transporters form oligomeric aggregates at the plasma membrane, for instance, transporters which use electrochemical gradients to catalyze substrate translocations exist as high order oligomers, dimers (NhaA and LacS), trimers (AcrB, GlpH and BetP) or tetramers (GLUT1)), although evidence of functional monomers (Mhp1) has also been reported.

Recent electronic microscopy studies on oocyte expressed hSVCT1 revealed the presence of two populations of particles showing different shapes and structures at low resolution which suggests the existence of monomers and dimers of the transporter. On the other hand, chemical crosslinking studies confirmed the existence of dimers in isolated membranes from these same oocytes, although at a lower ratio compared to hSVCT1 monomers.

Structural information is important to fully understand the transport dynamics of these transporters at the molecular level. Therefore the purpose of this thesis is to unveil the quaternary structure of SVCT2. SVCT2 crosslinking assays followed by immune-tagging with specific antibodies suggest that hSVCT2 exists as a dimer. Ascorbic acid transport assays were also performed to understand the functional significance of hSVCT2 oligomerization and to establish the minimal functional unit of the transporter. Among the functional assays performed were: co-expression of the active transporter (wt) along with inactive hSVCT2 mutants (H109Q), which revealed that hSVCT2 (wt) was not able to restore the transport ability of the inactive mutant, or the mutant to suppress the transport ability of the fully functional native transporter. In the other hand, when the native transporter is expressed together with a set of mutants with altered functional properties (C113S or C160S)

(apparent K_m at least 5 times higher than the native counterpart), revealed that at all molecular ratios assayed a unique kinetic component was detected, that corresponds to the form of the protein expressed at higher proportion.

This results, altogether, suggest that hSVCT2 forms dimers at the plasma membrane, the minimal functional unit at the hSVCT2 dimer could be the monomer and that such monomers inside the context of the dimer are able to interact between them influencing reciprocally their kinetic properties



7. INTRODUCCION

7.1. Antecedentes generales, características químicas y propiedades fisiológicas de la vitamina C.

La vitamina C es un micronutriente esencial requerido para el normal funcionamiento del organismo (Liang *y col.*, 2001). La mayoría de las especies, a excepción del cobayo, el conejillo de indias, el salmón coho, el murciélago de la fruta, el ave bulbul ventirrojo, los primates y los humanos, son capaces de sintetizar el ácido ascórbico a partir de glucosa en el hígado o en el páncreas, en un proceso denominado ciclo del ácido hexurónico (Charterjee *y col.*, 1961). El proceso de síntesis comprende cuatro etapas, de las cuales la primera ocurre en el citoplasma de la célula mientras que las siguientes tres etapas enzimáticas ocurren en el retículo endoplasmático (Kiuchi *y col.*, 1980). Tras su síntesis, la vitamina C es distribuida hacia los distintos tejidos del organismo en donde es almacenada para cumplir sus distintas funciones (Rose, 1988).

Los seres humanos durante su evolución han perdido la capacidad de sintetizar la vitamina C (Charterjee *y col.*, 1961), por lo tanto deben obtenerla en forma exclusiva a partir de la dieta. La incapacidad de sintetizar esta vitamina se debe a que la gama-gulono-lactona oxidasa, enzima que cataliza el último paso de la reacción de síntesis del ácido ascórbico (Burns *y col.*, 1956; Hodges *y col.*, 1969; Hodges *y col.*, 1971), presenta múltiples mutaciones del gen que la codifica (Nishikimi *y Yagi*, 1991; Kawai *y col.*, 1992; Nishikimi *y col.*, 1992; Nishikimi *y col.*, 1994). La carencia total o deficiencia en la ingesta normal de vitamina C (100

mg/día) puede generar una serie de desórdenes clínicos y patologías como anomalías en el proceso de cicatrización, desorganización en el tejido conectivo y óseo, inestabilidad vasomotora, y finalmente puede desencadenar en escorbuto, enfermedad que puede ser letal si no es tratada a tiempo (Baker y *col.*, 1969; Hodges y *col.*, 1969; Baker y *col.*, 1971; Hodges, 1971; Englard y Seifter, 1986; Padh, 1990; Baker y *col.*, 1993; Weber y *col.*, 1996; Jacob y Sotoudeh 2002; Margittai y *col.*, 2005).

La vitamina C puede existir en solución en dos formas químicas biológicamente activas, la forma reducida, el ácido ascórbico (AA), y la forma oxidada, el ácido deshidroascórbico (DHA) (Carr y Frei, 1999). La oxidación y reducción de la vitamina C es reversible, constituyendo su propiedad química más importante y la base de sus propiedades fisiológicas como agente redox o antioxidante (Sapper y *col.*, 1982). El ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) es un ácido débil, constituido molecularmente por seis carbonos y dos grupos ionizables ($pK_{a1}=4,04$ y $pK_{a2}=11,34$), y es capaz de oxidarse y reducirse fácilmente al donar o aceptar electrones, presentando dos equilibrios químicos (Figura 1). El ácido ascórbico, al sufrir su primera oxidación producto de la pérdida de un electrón genera el radical libre ácido semi-deshidro ascórbico, compuesto que tiene la dualidad de aceptar o donar electrones de acuerdo a las condiciones en las cuales se encuentre (Coassin y *col.*, 1991; Mehlhorn, 1991). Si este radical se oxida producto de la pérdida de un segundo electrón se genera el ácido deshidroascórbico (Winkler, 1987), que se puede encontrar como tal o en su forma hidratada de hemiacetal (Figura 1). El ácido deshidroascórbico es inestable en solución acuosa, con una vida media menor a 0,25 minutos a pH 7,4, por lo que si

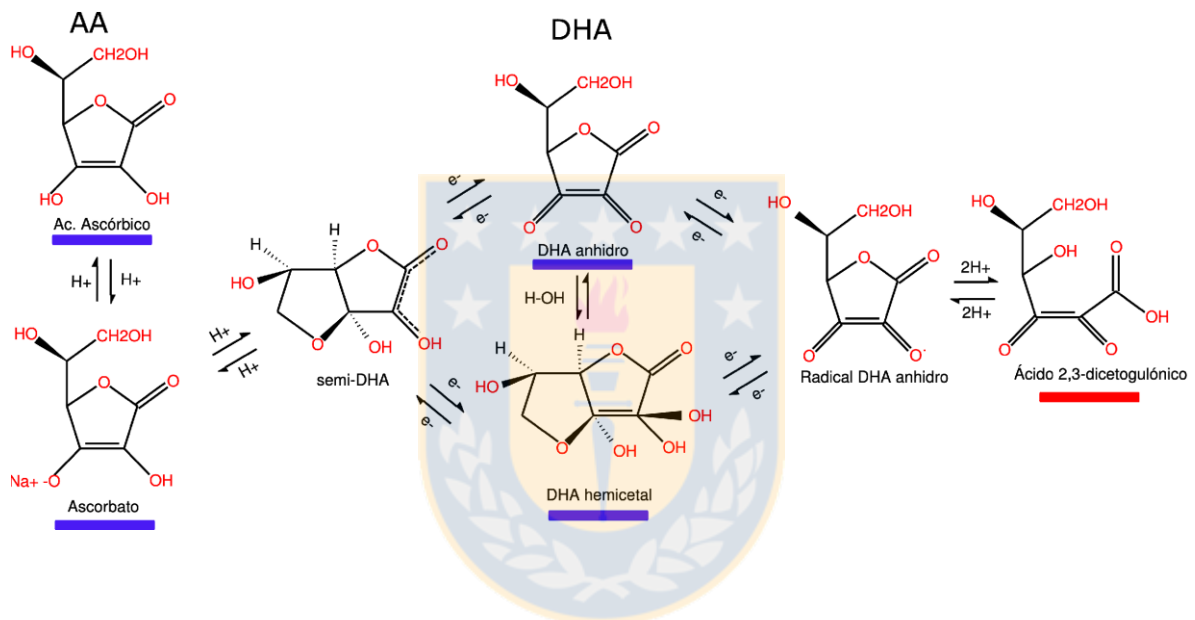


Figura 1. Especies moleculares del ácido ascórbico. El ácido ascórbico es capaz de oxidarse y reducirse fácilmente al donar o aceptar electrones, presentando dos equilibrios químicos, el de ácido ascórbico (AA) y su forma oxidada de ácido dehidroascórbico (DHA). Si el DHA no es reducido a AA, es hidrolizado de forma irreversible a ácido 2,3-diceto-L-gulónico, el cual carece de actividad biológica (Winkler, 1987; Nualart y col., 2003)

no es reducido a ácido ascórbico en forma rápida es hidrolizado de forma irreversible a ácido 2,3-diceto-L-gulónico, el cual carece de actividad biológica (Winkler, 1987; Nualart y *col.*, 2003).

La vitamina C es esencial para la mantención de un correcto metabolismo ya que participa en diversos procesos biológicos de importancia para el organismo (Liang y *col.*, 2001). Por ejemplo, interacciona con metales de transición como el hierro y cobre, participando como cofactor de hidroxilasas y monooxigenasas, enzimas que participan en la maduración de proteínas de la matriz extracelular como colágeno y elastina (Peterkofsky, 1991). También es necesaria para el sistema hematopoyético y reproductor, así como para la función leucocitaria y la síntesis de carnitina, péptidos neuroendocrinos y melanina (Englard y Seifter, 1986; Padh, 1990; Sauberlich 1994). Por otro lado, la vitamina C incrementa la biodisponibilidad y absorción de hierro desde el hierro no hémico consumido a través de la dieta (Bendich, 1990; Liang y *col.*, 2001) y además actúa como donador de electrones a enzimas que participan en el metabolismo de la histamina, colesterol y tirosina.

La vitamina C es el antioxidante soluble más importante dentro del organismo gracias a su bajo potencial redox ($E^{\circ}=+0,05V$ a $30^{\circ}C$ y $pH=7$), lo que le permite oxidarse y reducirse reversiblemente con facilidad, actuando como dador o aceptor de una pareja de electrones. Así, se le considera un antioxidante de amplio espectro capaz de neutralizar los radicales libres generados en los diferentes procesos metabólicos de los distintos tejidos, como por ejemplo, radicales peróxido, hidroxilo, radical superóxido y peroxinitrilo (Hodges y *col.*, 1969; Hodges y *col.*, 1971; Carr y Frei, 1999). Es por todo esto que el ácido

ascórbico juega un papel fundamental en la defensa de la célula, protegiendo a macromoléculas como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas del estrés oxidativo (Frei y Lynch, 1994; Carr y Frei, 1999). También puede revertir la oxidación de la vitamina E, la que actúa protegiendo los ácidos grasos poliinsaturados contra la peroxidación lipídica (Niki, 1991; Navas y col., 1994; Frei y col., 1996). Otra acción de la vitamina C es la activación de la red enzimática detoxificante en el hígado, potenciando la biotransformación de xenobióticos y metabolitos naturales (Zannoni y col., 1987).

Aquellas especies incapaces de sintetizar la vitamina C deben ingerirla a través de la dieta, por lo que este compuesto es absorbido a nivel del intestino delgado desde donde pasa al plasma para ser distribuido a los distintos tejidos. La vitamina C se encuentra en el plasma solamente en su estado reducido presentando concentraciones que fluctúan entre 20 a 50 μM (Capellmann y col., 1994). Sin embargo, algunas células presentan concentraciones de vitamina C en el rango milimolar (Tabla I), lo que apoya la existencia de sistemas de transporte altamente eficientes para el ingreso y almacenamiento de la vitamina C hacia el interior celular. Hasta el momento se han descrito dos sistemas de transporte distintos para la vitamina C, en los que participan proteínas de dos familias distintas que muestran especificidad solamente para una u otra de las formas químicas de la vitamina C (Hodges y col., 1969; Hodges y col., 1971; Rose, 1988). La forma oxidada de la vitamina C, el ácido deshidroascórbico, es transportada hacia el interior celular por miembros de la familia de transportadores facilitativos de hexosas, o GLUTs (Flier y col., 1987; Kayano y col., 1990; Joost y Thorens, 2001). De los catorce miembros de esta familia identificados hasta el momento, se

sabe que las isoformas GLUT1, GLUT2 GLUT3, GLUT4 y GLUT6 transportan DHA (Vera y col., 1993; Vera y col., 1994; Rumsey y col., 1997; Guzmán, 2004; Mardones, 2005). Por otro lado, la forma reducida de la vitamina C, el ácido ascórbico, es transportada a través de la membrana plasmática por la familia de transportadores conocida como SVCT, de la cual se han descrito dos isoformas funcionalmente activas, denominadas SVCT1 y SVCT2 (Faaland y col., 1998; Daruwala y col., 1999; Rajan y col., 1999; Tsukaguchi y col., 1999; Wang y col., 1999; Wang y col., 2000).

7.2. Transportadores de ácido deshidroascórbico.

El ácido deshidroascórbico es transportado al interior celular a favor de su gradiente de concentración, por proteínas integrales de membrana pertenecientes a la familia de transportadores facilitativos de hexosas o GLUTs (Vera y col., 1993). La familia de los GLUTs comprende 14 isoformas (GLUT1 a GLUT12, HMIT1 y GLUT14), las que se encuentran ampliamente distribuidos en las células de mamíferos, pudiendo expresarse más de una isoforma simultáneamente en un mismo tipo celular (Flier y col., 1987; Carruthers, 1990; Baldwin, 1993; Mueckler, 1994). Las propiedades de cada isoforma difieren unas de otras, ya sea por los diferentes sustratos que son capaces de transportar o por las diferencias en sus propiedades cinéticas (Vera y col., 1993; Mueckler, 1994).

Estudios de expresión de transportadores de glucosa en ovocitos de *Xenopus Leavis*, demostraron que las isoformas GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 y GLUT6 transportan el DHA al interior celular (Vera y col., 1993; Rumsey y col., 1997;

Tabla I: Contenido de ácido ascórbico en tejidos humanos ^(a).

TEJIDO	CONCENTRACIÓN ^(b) (mM)
Glándula Adrenal	1,9 – 2,5
Glándula Pituitaria	2,5 – 3,2
Hígado	0,6 – 1,0
Bazo	0,6 – 0,9
Pulmones	0,4
Riñones	0,3 – 0,9
Tiroides	0,1
Testículos	0,2
Timo	0,4 – 0,7
Cerebro	0,8 – 0,9
Músculo Esquelético	0,2 – 0,3
Corazón	0,2 – 0,7
Eritrocitos	0,043 – 0,016
Cornea	11
Leucocitos	3,8 – 1,0
Plasma	0,045 – 0,022
Glándula Adrenal	1,9 – 2,5

(a) Los valores expresados en esta tabla fueron determinados considerando el contenido de agua por gramo de tejido 79% p/p (Levine y Morita, 1985; Moser, 1987; Brubaker y *col.*, 2000).

(b) Como ácido ascórbico.

Gúzman, 2004; Mardones, 2005). Por otro lado, estudios funcionales del transporte de DHA realizados en células HL-60, células que no expresan SVCTs (Vera y col., 1994), establecieron definitivamente el papel de GLUT1 como un transportador de ácido deshidroascórbico y clarificaron la importancia del transporte de ácido deshidroascórbico en el reciclaje de la vitamina C y mantención intracelular de la forma reducida, ácido ascórbico. El transporte de DHA por GLUT1 es bidireccional y de baja afinidad, estudios de competencia mostraron que el transporte de DHA fue inhibido por metilglucosa y deoxiglucosa, sustratos de GLUT1, en cambio otras azúcares incapaces de interactuar con los transportadores de glucosa no tuvieron efecto en el transporte de DHA (Vera y col., 1995). Una vez que el DHA ingresa a la célula es rápidamente reducido a ácido ascórbico con la participación de reductasas de ácido deshidroascórbico que son dependientes de NADPH o de glutatión (Wells y col., 1990; Wells y Xu, 1994; Maellaro y col., 1997; Washburn y Wells, 1999; Nardai y col., 2001). Estos estudios permitieron establecer que los transportadores de glucosa son centrales en permitir el transporte de la vitamina C oxidada generada en reacciones de óxido-reducción, mecanismo altamente eficiente que permite la acumulación de ácido ascórbico, y el salvataje de la vitamina C oxidada que de otro modo se hidroliza en forma irreversible (Vera y col., 1995; Wang y col., 1997; Nualart y col., 2003). Dado que los transportadores de glucosa, se encuentran presentes en todas las células del organismo, el transporte, reducción y acumulación de DHA ocurre en todos los órganos y células del organismo. En los seres humanos este proceso parece ser de importancia central en el metabolismo de la vitamina C, especie incapaz de sintetizar vitamina C, y que paradójicamente posee un requerimiento

diario de vitamina C dietario bastante bajo, lográndose con una dosis cercana a 100 mg diarios, una concentración plasmáticas de alrededor de 50 μM (Levine y col., 1996). Esta cantidad de vitamina c permite la mantención de los contenidos celulares normales, incluso en órganos cuyo contenido asciende por sobre 100 veces la concentración promedio de esta vitamina (Rose, 1988; Levine y col., 1995).

Usando perfiles de hidrofobicidad y predicción de estructura secundaria se han propuesto doce dominios transmembrana altamente hidrofóbicos para la familia de los GLUTs. Estas proteínas se ubicarían con sus extremos amino y carboxilo terminal orientados hacia la cara citoplasmática de la membrana celular (Gould y Holman, 1993; Barrett y col., 1999), este modelo que fue corroborado con la reciente estructura cristalina del trasportador GLUT1 obtenida a 3,2 Å de resolución (Deng y col., 2014).

7.3 Transportadores de ácido ascórbico.

Diversos estudios de transporte han establecido que el ácido ascórbico (AA) es transportado al interior celular a través de una familia de transportadores saturables y activados por sodio denominados SVTC, los cuales transportan el ácido ascórbico acoplado al transporte simultáneo de iones sodio (Rose, 1988; Takanaga y col., 2004). Los SVCTs pertenecen a la familia de transportadores de nucleobase/ascorbato (NCS2 ó Nucleobase: Cati3n Symporter-2); esta familia adem3s incluye a la permeasa de 3cido 3rico-xantina de *Aspergillus nidulans* (UapA), la permeasa de purinas (UapC), el trasportador de xantinas de bacterias

(PbuX), el transportador de uracilo UraA) y la permeasa de uracilo unida a membrana (PyrP) (Faaland y col., 1998; Meintanis y col., 2000).

En humanos se han identificado cuatro secuencias genómicas que codifican para proteínas transportadoras de ácido ascórbico, las isoformas SVCT1, SVCT2, SVCT3 y SVCT4. Hasta el momento se han descrito que solo SVCT1 y SVCT2 son funcionales (Faaland y col., 1998; Daruwala y col., 1999; Tsukaguchi y col., 1999; Wang y col., 1999; Wang y col., 2000). La proteína SVCT1 (SeqID: NP_005838, previamente identificado como YSPL3) está compuesta de 598 aminoácidos y es codificada por el gen *SLC23A1* localizado en el cromosoma 5q31.2-31.3 (Stratakis y col., 2000; Wang y col., 2000; Eck y col., 2004). La proteína SVCT2 (SeqID: NP_005107, previamente identificado como YSPL2) está compuesta de 650 aminoácidos y es codificada por el gen *SLC23A2* localizado en el cromosoma 20p12.2-12.3 (Hogue y Ling 1999; Stratakis y col., 2000). Las proteínas SVCT3 (SeqID: BC030243, previamente identificado como YSPL1) y SVCT4 (SeqID: XM_069843) son dos transportadores huérfanos de los cuales se carece de información adicional (Takanaga y col., 2004).

Basados en la presencia de cortos segmentos de aminoácidos con características hidrofóbicas, ha sido propuesto que SVCT1 y SVCT2 contienen 12 hélices transmembrana altamente hidrofóbicas (hélices I a XII), unidas entre sí por lazos ricos en aminoácidos hidrofílicos, y que los extremos amino y carboxilo-terminal de ambas proteínas se encuentran orientados hacia la cara citoplasmática de la célula (Tsukaguchi y col., 1999). SVCT1 y SVCT2 presentan un elevado grado de identidad de secuencia (>67.4%), encontrándose la mayor conservación aminoacídica en los segmentos transmembrana y la mayor diferencia en los

extremos amino y carboxilo terminales y en el lazo extracelular entre los segmentos transmembrana III y IV (Liang y col., 2001).

Estudios de localización, utilizando hibridación *in situ* y *northern blot*, muestran que SVCT1 se ubica en tejidos como el hígado, el ovario, la próstata y en los epitelios de absorción como el intestino delgado, el riñón y el colon, en cambio SVCT2 se encuentra ampliamente distribuido en casi todos los tejidos del organismo (Daruwala y col., 1999). Ratones knock-out para el gen *SLC23A2*, que son completamente deficientes del transportador SVCT2 y células knock-down (células donde se bloquea la expresión de este gen) para este transportador han entregado mucha información sobre las funciones fisiológicas de SVCT2. Los ratones knock-out para SVCT2 se desarrollan normalmente durante su vida uterina, pero minutos después de su nacimiento mueren, mostrando cuadros de hemorragia cerebral intraparenquimal y una falla respiratoria producto de una falla a nivel del sistema nervioso central (Sotiriou y col., 2002). Por otro lado, ratones heterocigotos para SVCT2 al momento de nacer presentan bajos niveles de ácido ascórbico en varios tejidos, sin embargo, son capaces de desarrollarse hasta la edad adulta (Sotiriou y col., 2002). La expresión y función de los SVCTs puede ser regulada a través de diversos mecanismos, llevando a cambios en expresión, localización subcelular y expresión polarizada en células de barrera. El sustrato, ácido ascórbico, es capaz de influenciar la expresión de los transportadores en intestino (MacDonald y col., 2002), durante el envejecimiento en hepatocitos y durante la diferenciación de células osteoblásticas. También se han observado cambios en expresión y localización subcelular en modelos de células polarizadas intestinales y renales (Maulen y col., 2003; Subramanian y col., 2004) y producto

de la activación de vías de señalización por proteínas quinasas (Daruwala y *col.*, 1999, Liang y *col.*, 2002).

En cuanto a sus propiedades funcionales, SVCT1 y SVCT2 muestran una elevada especificidad por el ácido L-ascórbico, siendo incapaces de transportar ácido D-ascórbico, ácido deshidroascórbico, ácido ascórbico 2-fosfato, ácido ascórbico 2-sulfato ni L-gulono-c-lactona (Rumsey y *col.*, 1997; Tsukaguchi y *col.*, 1999). Ensayos de transporte, realizados tanto en SVCT1 como en SVCT2, revelaron que la curva de saturación para ácido ascórbico es de tipo hiperbólica concordante con una cinética de tipo Michaeliana (Daruwala y *col.*, 1999; Rajan y *col.*, 1999; Tsukaguchi y *col.*, 1999). Diversos estudios de transporte de ácido ascórbico realizadas bajo diferentes condiciones experimentales y en distintos tipos celulares han revelado que SVCT2 presenta un valor para la K_m de transporte de ácido ascórbico bastantes menores que los de SVCT1. Expresión de SVCT1 en distintas líneas celulares arrojaron resultados que oscilan en un rango desde 75 a 250 μM (Daruwala y *col.*, 1999; Wang y *col.*, 1999; Wang y *col.*, 2000), mientras que para SVCT2, la K_m de transporte en distintas líneas celulares y sistemas de expresión arrojó resultados en un rango que va desde 20 a 70 μM (Daruwala y *col.*, 1999; Rajan y *col.*, 1999). Sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio en al menos 10 sistemas celulares distintos nos indican que la K_m de transporte para SVCT2 se encuentra en el rango 15-25 μM y la K_m de transporte para SVCT1 se encuentra dentro del rango 80 - 200 μM , dependiendo de la línea celular utilizada.

El transporte de ácido ascórbico ocurre a favor de un gradiente electroquímico de sodio y es modulado diferencialmente por la presencia o

ausencia de cationes bivalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} (Tsukaguchi y col., 1999; Godoy, 2007; Zúñiga, 2008). Se ha establecido que el ión sodio activa el transporte de ácido ascórbico de forma cooperativa, con un coeficiente de Hill cercano a 2 (Rajan y col., 1999; Tsukaguchi y col., 1999; Wang y col., 1999). Este valor de cooperatividad sugiere la presencia de al menos dos sitios de unión a sodio, los cuáles serían funcionalmente distintos al sitio de unión a ácido ascórbico, sin embargo, existiría una estrecha comunicación funcional entre ellos durante el ciclo de transporte (Godoy y col., 2007). Otro punto importante es que el sodio es el catión específico para la activación del transporte de ácido ascórbico mediado por SVCT, pues estudios cinéticos realizados con otros cationes monovalentes como colina⁺, Cs⁺, K⁺ y Li⁺ disminuyeron la captación de ácido ascórbico en un 95% (Rajan y col., 1999; Godoy, 2004; Godoy y col., 2007). Estudios más detallados indican que la estequiometría de transporte de Na⁺: ácido ascórbico es 2:1 para el cotransporte mediado por ambas isoformas de los transportadores SVCTs (Godoy y col., 2007; Mackenzie y col., 2008), para SVCT1 el mecanismo de transporte es electrogénico (Tsukaguchi y col., 1999; Godoy y col., 2007; Mackenzie y col., 2008) lo que no ocurre en SVCT2 (Godoy y col., 2007). Se ha determinado también para SVCT2 que el orden de unión de ambos sustratos es Na⁺:AA:Na⁺ donde existe una cooperatividad de transporte recíproca entre ellos, así, la concentración extracelular de Na⁺ desde 5 a 135 mM produce una marcada disminución en la K_m aparente de transporte, desde 1,4 mM a 20 μM , lo que puede ser interpretado como que la unión de Na⁺ al transportador favorece cambios conformacionales que promueven un aumento en la afinidad para el transporte de ácido ascórbico (Godoy y col., 2007). El efecto de Na⁺ en la K_m aparente de

transporte en SVCT1 es similar a lo observado para SVCT2; al aumentar la concentración de Na⁺ desde 5 a 135 mM, la K_m aparente de transporte de ácido ascórbico disminuye desde 1,4 mM a 100 μM (Mackenzie y col., 2008; Godoy y col., 2007; Zúñiga, 2008). Respecto de los cationes divalentes, se ha observado que SVCT2 es incapaz de transportar ácido ascórbico en ausencia de ambos cationes, por el contrario SVCT1 es activo en la ausencia de Ca²⁺ y Mg²⁺, aunque muestra un marcado aumento en la K_m de transporte de ácido ascórbico en la ausencia de uno o ambos a cationes (Godoy, 2004; Zúñiga, 2008). En relación a esto, estudios recientes en el laboratorio han llevado a la identificación de un posible sitio de unión de cationes divalentes localizado en el lazo exofacial que une los dominios transmembrana XIII y XIV en SVCT1 (Escobar E., 2012), con respecto a SVCT2 no existe información al respecto.

Por otro lado se ha descrito que SVCT2 presenta una marcada dependencia al pH extracelular, observándose una marcada disminución en su actividad de transporte a pH bajo 6.5 (Tsukaguchi y col, 1999., Godoy y col, 2007). Estudios de mutagénesis sitio dirigida y tratamiento con dietilpirocarbonato (DEPC) han revelado que cinco (H109, H203, H206, H269 y H413) de los seis residuos de histidina que forman parte de la estructura del transportador son reguladores centrales de la función de SVCT2 y participan en diferentes grados modulando la sensibilidad al pH, la cinética de transporte, la cooperatividad por Na⁺, la estabilidad conformacional y la localización subcelular (Varma y col, 2007; Ormazabal y col, 2010).

7.4. Relación estructura función de transportadores cristalizados.

Las proteínas transportadoras son una gran familia de proteínas integrales de membrana, clasificadas en transportadores activos primarios o secundarios, dependiendo de su recurso de obtención de energía (ATP o gradiente electroquímica respectivamente). Los transportadores activos secundarios son maquinarias moleculares distribuidas ubicuamente, que utilizan un gradiente electroquímica para conducir la translocación de sustrato a través de ésta (Mitchell, 1963) y se dividen a su vez, en simportadores, antiportadores o uniportadores, dependiendo del número de solutos o del sentido de transporte de las moléculas transportadas (Abramson y Wright, 2009, Krishnamurthy y col., 2009). Las proteínas transportadoras de membrana son difíciles de estudiar a nivel estructural y funcional, debido a problemas en la sobreexpresión, estabilidad, conservación del plegamiento nativo, purificación y cristalización de ellas (Caffrey, 2003), dificultades que ayudan a explicar por qué hasta la fecha han sido resueltas menos de 300 estructuras de proteínas de membrana, a diferencia de las más de 20.000 estructuras de proteínas solubles resueltas. Con el fin de obtener una comprensión más profunda de los mecanismos implicados en el transporte de sustratos, es necesario complementar este concepto básico con el conocimiento detallado de las propiedades bioquímicas y la estructura terciaria de los transportadores.

La reciente disponibilidad de estructuras cristalográficas de rayos-X, ha permitido realizar numerosos avances en el entendimiento de los sistemas de transporte. Dentro de las proteínas de membrana que han sido cristalizadas a alta resolución se encuentran la permeasa de lactosa/protones LacY (Abramson y col., 2003, Guan y col., 2007) el transportador de glicerol-3-fosfato GlpT (Huang y col., 2003) y el transportador de multidrogas EmrD (Yin y col., 2006) pertenecientes a la gran superfamilia de transportadores principales o MFS; el transportador de leucina acoplado a sodio (LeuT) de la familia NSS (Yamashita y col., 2005), el simportador de sodio/hidantoina Mhp1 de la familia NCS1 (Shimamura y col., 2010, Weyand y col., 2008), y el más reciente cristalizado, el transportador de uracilo acoplado a protones, UraA de la familia NAT/NCS-2 (Lu y col., 2011), dentro de la cual se ha clasificado al transportador de sodio/ascorbato SVCT2, todos ellos pertenecientes a la gran superfamilia de cotrasnportadores de sodio.

Si bien los transportadores pertenecientes a la superfamilia de facilitadores principales presentan un bajo porcentaje de identidad a nivel de su estructura primaria (< 14%), ha sido propuesto que ellos poseerían estructuras terciarias muy similares (Hirai y col., 2002; Abramson y col., 2003; Lemieux y col., 2003; Lemieux, 2007), la que estaría compuesta por doce hélices transmembrana agrupadas en dos dominios de seis hélices cada uno. Ambos dominios presentan un plegamiento similar, apoyando el concepto que los dominios correspondientes a las mitades N- y C-terminal y corresponderían a duplicaciones de un gen ancestral común (Pao y col., 1998), y se encuentran posicionados pseudosimétricamente en la membrana dejando entre ellos una cavidad central. Este concepto de homología estructural entre los transportadores pertenecientes a

la familia MFS fue apoyado por la cristalización de otros miembros de esta superfamilia, como el transportador de glicerol-3-fosfato (GlpT) (Huang y col., 2003), el transportador multidrogas EmrD (Yin y col., 2006), el transportador de oxalato (OxIT) (Hirai y col., 2002) y la melibiosa permeasa (Purhonen y col., 2005), para los cuales se observó plegamientos similares. Basándose en que los transportadores GLUTs pertenecen a la gran superfamilia de transportadores facilitativos (MFS). Salas-Burgos en el año 2004 propuso un modelo 3D para el transportador de glucosa GLUT1 a partir de la estructura cristalina del transportador glicerol-3-fosfato de *E. coli* (Huang y col., 2003), utilizando como templado intermediario el modelo 3D de la glucosa-6-fosfato traslocasa de *Homo sapiens* (Salas-Burgos y col., 2004). El modelo 3D fue validado en base a la información existente acerca de la propiedades funcionales y estructurales de GLUT1 obtenidas por mutagénesis, alquilación de cisteínas, marcaje con reactivos de mercurio, uso de inhibidores para el influjo o eflujo del sustrato, uso de metabolitos marcados, anticuerpos, digestión por proteasas (Hruz y Mueckler, 2001) y la reciente estructura cristalina del transportador obtenida a 3,2Å de resolución (Deng y col. 2014).

El modelo 3D de GLUT1 propone que la proteína está formada por 12 segmentos de transmembrana agrupados en dos dominios de 6 hélices cada uno, separados por un largo lazo intracelular entre las hélices 6 y 7. El canal central está formado por las hélices 2, 4, 5, 7, 8 y 10 las que contienen residuos que han sido identificados como cruciales para la función de transporte: G75, E76, G79, N288, A289 (Olsowski y col., 2000), Q161 (Mueckler y col., 1994; Seatter y col., 1998), V165 (Mueckler y Makepeace, 1997), N317, T321 y P387 (Mueckler y

Makepeace, 2002), Q282 (Hruz y Mueckler, 1999; Olsowski y col., 2000), I287 (Hruz y Mueckler, 1999), W412 (García y col., 1992). En el modelo 3D de GLUT1, el motivo QLS (comenzando con Q279) que ha sido reconocido como crucial para la selectividad de los GLUTs (Seatter y col., 1998, Olsowski y col., 2000), se encuentra cerca de la entrada extracelular del canal, posiblemente posicionado para seleccionar a los sustratos que son transportados. Un segundo dominio QLS (comenzando con Q 283) se encuentra posicionado extracelularmente en el extremo del canal de transporte, se especula que este dominio también está implicado en la selectividad del transportador. Un dominio QLG (comenzando con Q 161) se encuentra posicionado en el extremo intracelular del poro de transporte; al igual que los dominios anteriores, éste podría estar implicado en la selección de moléculas que van saliendo de la célula, se ha visto que mutaciones conservadas realizadas Gln161 disminuyen el transporte entre 10 a 50 veces (Mueckler y col., 1994). Por otro lado, el sitio de glicosilación en Asn45, determinado por SDS-PAGE y confirmado por mutagenesis (Asano y col., 1991), y estudios de marcaje con biotina revelaron la localización extracelular del residuo K300 en el loop putativo 7-8 (Preston y Baldwin, 1993). Este modelo junto a los análisis funcionales fueron fuertemente apoyados por la obtención de la estructura cristalina del transportador GLUT1 a 3,2 Å de resolución (Deng y col., 2014).

7.5. Antecedentes estructurales en el transportador SVCT2.

Los estudios funcionales de SVCT2 han permitido proponer un modelo funcional en el cual el transportador posee, en su estructura 3D, un sitio de unión

para el sustrato ácido ascórbico, al menos dos sitios de unión para el catión monovalente Na^+ y un sitio de unión para los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} (Godoy y col, 2007). Se ha propuesto que durante el ciclo de transporte donde el orden de unión de los sustratos es $\text{Na}^+:\text{A}:\text{Na}^+$ ambos sitios de unión a sodio interactúan entre ellos y además interaccionan con el sitio de unión a ácido ascórbico, el cual a su vez afectaría recíprocamente la interacción entre ambos sitios de unión a sodio. Por otro lado, basados en la presencia de cortos segmentos de aminoácidos con características hidrofóbicas, ha sido propuesto que SVCT1 y SVCT2 contienen 12 hélices transmembrana altamente hidrofóbicas (hélices I a XII), unidas entre sí por lazos ricos en aminoácidos hidrofílicos, y que los extremos amino y carboxilo-terminal de ambas proteínas se encuentran orientados hacia la cara citoplasmática de la célula (Tsukaguchi y col., 1999). A pesar de todos los estudios realizados hasta la fecha no existen antecedentes publicados acerca de cuáles son los aspectos estructurales que definen tanto la estructura como las propiedades de estos transportadores, tampoco conocemos la estructura 3D ni la identidad de los residuos de aminoácidos fundamentales para su función, incluyendo aquellos involucrados en la unión de los sustratos ácido ascórbico y Na^+ . Ante la falta de antecedentes estructurales en nuestro laboratorio se construyó un modelo 3D del transportador SVCT2 utilizando como molde molecular la estructura cristalina del transportador de uracilo de *e. coli*, Ura A resuelta a 2,8 Å de resolución (Salas-Burgos, 2011). Este modelo fue construido en base a antecedentes que señalan que Ura A y los transportadores SVCTs pertenecen a la familia de cotransportadores de sodio, si bien ambos transportadores presentan un bajo porcentaje de identidad primaria (<20%), todas

las proteínas cristalizadas muestran un dominio central conservado de 10 STM que puede estar acompañado de STM adicionales en el extremo amino o carboxilo terminal y que podrían ser importantes para la función de cada transportador. Todas estas proteínas poseen un mecanismo de transporte que se caracteriza por la exposición alternante del sitio de unión del sustrato entre dos estados conformacionales de la proteína, endofacial y exofacial, con un estado intermedio donde el sustrato es inaccesible al solvente y se encuentra ocluido en la proteína. Toda esta evidencia ha permitido proponer plegamientos tridimensionales comunes para proteínas no relacionadas por secuencia primaria (Abramson y Wright 2009, Krishnamurthy *y col*, 2009).

En el modelo 3D de SVCT2 propuesto se observa que este transportador posee 14 STM con los extremos amino y carboxilo terminal orientados hacia el citoplasma (Figura 2). Las hélices se organizan en dos repeticiones de 7 STM cada una y de acuerdo a la posición de la vía de translocación de sustratos, la proteína se organiza en un dominio central (TM 1-4 y TM 8-11) y un dominio compuerta (TM 5-7 y TM 12-14). Ambos dominios se encuentran asociados a través de una interface fuertemente hidrofóbica entre los STM 1, 3 y los STM 5, 8. Otra característica es la presencia de dos hojas betas antiparalelas en la región central entre los STM 3 y 10 permitiendo su interacción (Salas-Burgos, 2011). A partir de la estructura 3D de SVCT2 y del análisis de conservación de secuencia del transportador de distintas especies, se identificó un grupo de residuos conservados, que fueron evaluados por mutagénesis sitio-dirigida, estos residuos se distribuyen en los STM 1 (Q108 e H109) y STM 10 (S440 y S441), y su

mutación individual provocó que el transportador se localice en membrana plasmática pero sea incapaz de transportar sustratos (Salas-Burgos, 2011).

7.6. Estructura cuaternaria de transportadores obtenida a partir de evidencia cristalográfica.

La membrana celular es una matriz lipídica en la cual las proteínas se encuentran organizadas y en la mayoría de los casos forman oligómeros que son favorecidos por la localización y la orientación de las proteínas en el espacio bidimensional de la membrana, lo que aumenta la probabilidad de autoasociación (Grasberger, 1986). En este sentido, la evidencia indica que la estructura cuaternaria que involucra oligómeros de alto orden es una característica esencial para la estructura y función de los transportadores de membrana (Veenhoff y *col.*, 2002; Padan, 2008).

La cristalización de distintos transportadores ha permitido obtener evidencia cristalográfica directa de la formación de estructuras oligoméricas que dan lugar a estructuras cuaternarias constituidas desde dímeros a hexámeros. Si bien no existe información acerca de la estructura cuaternaria del transportador SVCT2, si hay antecedentes de la estructura cristalina de otros transportadores secundarios procariontes de distintas familias (Krishnamurthy y *col.*, 2009). Sin embargo, la estructura cristalina de estos transportadores ha sido obtenida de transportadores modificados ya sea por mutagénesis, inserciones o deleciones para lograr estructuras más estables.

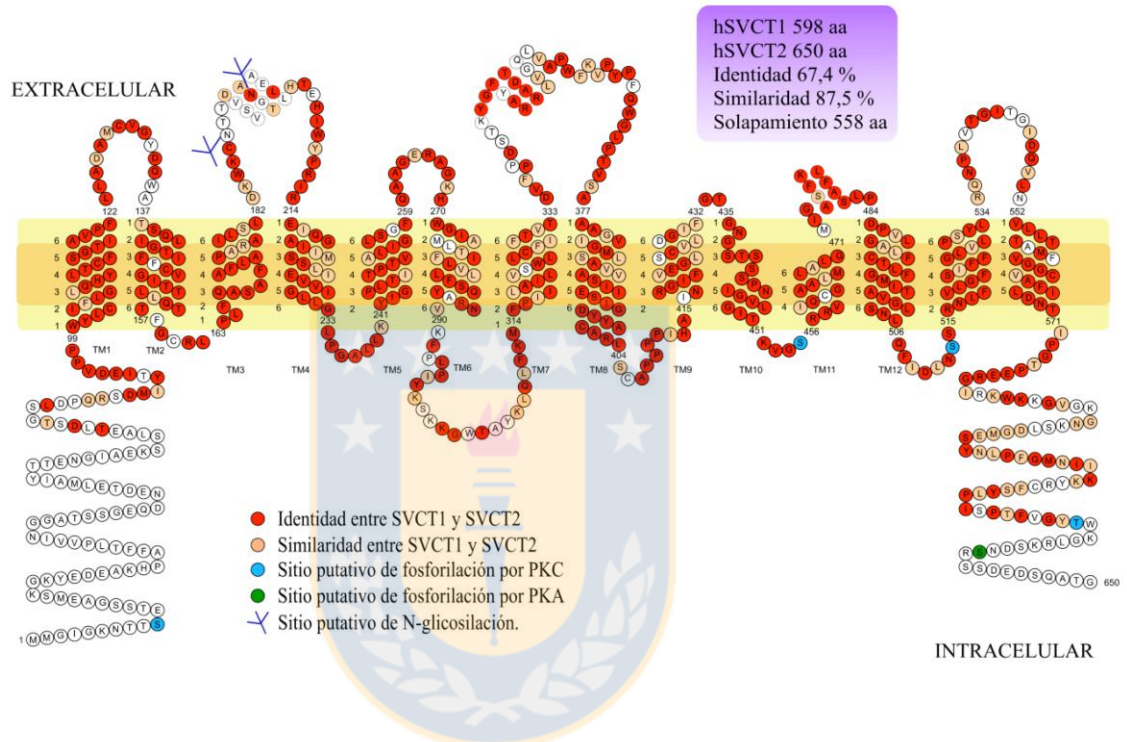


Figura 2. Modelo propuesto para la estructura secundaria de los transportadores de ácido ascórbico. Se muestra la secuencia de aminoácidos y la estructura secundaria propuesta para los SVCTs a partir de sus perfiles de hidrofobicidad. Los residuos de aminoácidos coloreados en rojo corresponden a aquellos idénticos en SVCT1 y SVCT2 y los de color naranja indican los residuos similares entre ambas isoformas. Los coloreados de celeste corresponden a los sitios de fosforilación por PKC y los de color verde a los sitios de fosforilación por PKA, además se indican con un símbolo ramificado azul (Ψ) los sitios de N-glicosilación.

Es así como, el 2002, fue reportada por primera vez la estructura cristalina a 2.8 Å de resolución del transportador secundario, AcrB, principal proteína que controla el eflujo de drogas acoplada a un gradiente de protones en *Escherichia coli* (Murakami y col, 2002). AcrB está organizado como un complejo trimérico con un eje de simetría perpendicular a la membrana plasmática (Figura 3 E). En el homotrímero cada subunidad posee distinta conformación correspondiente a uno de los tres estados funcionales del ciclo de transporte. La estructura cristalina indica que el sustrato se une solo a uno de los tres monómeros, denominado monómero de unión, y no se encuentra unido en la cavidad central del complejo proteico incluso a la máxima concentración de droga utilizada para la co-cristalización (Murakami y col, 2002).

Las primeras estructuras cristalográficas de transportadores secundarios acoplados a sodio fueron reportadas en los años 2004 y 2005 con las estructuras del transportador de glutamato GltPh perteneciente a la familia de cotransportadores dicarboxilato/aminoácido:cación (DAACS) (Yernool y col., 2004), seguido por el antiporter Na^+/H^+ NhaA de *E. coli* (Hunte y col, 2005) y el transportador bacteriano de leucina LeuT de la familia de cotransportadores neurotransmisores/sodio (NSS) (Yamashita y col, 2005). La estructura cristalina del transportador de glutamato GltPh (Yernool y col., 2004) de *P. horikoshii*, el cual comparte 37% de la identidad de secuencia aminoacídica con el transportador humano de aminoácidos excitatorios 2 (hEAAT2) fue obtenida a 3.2 Å de resolución. El uso de metales pesados utilizados durante el proceso de cristalización revelará la existencia de un complejo formado por tres subunidades del transportador, en el cual la homotrimerización es mediada exclusivamente por

STM 1, 2, 4 y 5 (Figura 3 D). La forma del trímero asemeja la mitad de una esfera con su cara cóncava hacia el lado extracelular y la convexa hacia el lado intracelular. Cada monómero está formado por 8 STM y dos horquillas helicoidales, la localización del sitio de unión a sustrato es interesante debido a que la secuencia de aminoácidos que lo conforman están conservados entre los transportadores homólogos y son críticos para su función. El sitio de unión a sustrato es uno por cada subunidad proteica y está localizado debajo del bolsillo cubierto por una de las horquillas helicoidales.

La estructura cristalina del principal antiporter Na^+/H^+ de *Escherichia coli* NhaA fue resuelta a 3,45 Å de resolución (Hunte y col., 2005). Los datos de difracción por rayos X obtenidos desde cristales del transportador nativo y cristales marcados con seleno-L-metionina crecidos a pH 4, revelaron que el NhaA, formado por 388 aminoácidos se organiza en 12 STM con los extremos amino y carboxilo ubicados hacia el interior de la célula. NhaA se cristalizó en un grupo espacial compuesto por dos monómeros que se orientan opuestamente, orientación de tipo no fisiológica (Hunte y col., 2005), sin embargo, a partir de cristales en dos dimensiones de NhaA analizados por microscopía electrónica junto a ensayos bioquímicos se sabe que este transportador en membrana nativa forman dímeros (Williams y col., 1999, Williams y col., 2000; Gerchman y col., 2001).

Por su parte, la estructura cristalina de LeuTA fue determinada a 1,9 Å de resolución a partir de *Aquifex aeolicus* (Yamashita y col., 2005). Este transportador bacteriano presenta alta conservación de secuencia aminoacídica (20-25%) con sus homólogos en humanos, los transportadores de glicina (GlyT1b), GABA

(GAT1), dopamina (DAT) y serotonina (SERT). LeuTA forma un dímero en el cristal, donde ambos monómeros muestran un eje de simetría y adoptan una orientación paralela (Figura 3 B). La interface del dímero está formada por lazo extracelular 2, el STM 9 y el STM 12, estos dos últimos STM junto a sus dos compañeros de simetría forman un dominio de interacción de 4 hélices. Cada monómero mide 70 Å de alto y 48 Å de diámetro y está formado por 12 STM unidos entre sí por numerosos lazos y hélices en la superficie intra y extracelulares. Además, cada monómero dentro del dímero presenta su poro de transporte y es capaz de unir una molécula de leucina junto a dos moléculas de sodio. Interesantemente, el plegamiento observado en LeuT, que consiste en que 10 STM del transportador organizados en dos dominios de cinco hélices cada uno que presentan un plegamiento similar, fue observado subsecuentemente en otras dos estructuras reportadas para los transportadores secundarios acoplados a sodio, el transportador de galactosa SGLT (perteneciente a la familia SSS) y el transportador de bencilo/hidantoina Mhp1 (perteneciente a la familia NCS1). Este plegamiento también fue reportado para transportadores secundarios no acoplados a sodio, como el caso del transportador de resistencia bacteriano AdiC y el betaina/colina/carnitina BetP.

La estructura del simporter sodio/galactosa vSGLT de *Vibrio parahaemolyticus* (Faham y col., 2008) fue resuelta a 3 Å de resolución. La estructura cristalina reveló que el transportador está formado por 14 STM en conformación endofacial con dos dominios simétricos invertidos de 5 hélices cada uno (STM2-STM6 y TM7-TM11) y con los extremos amino y carboxilo expuestos al citoplasma. La galactosa está unida en el centro de ambos dominios simétricos y

rodeada por residuos hidrofóbicos. La proteína se ensambla dentro de la bicapalipídica como un dímero paralelo altamente compacto, con una superficie de contacto de 1488 Å entre los STM (Figura 3 A). La relevancia funcional del dímero no está clara debido a que estudios microscópicos de criofractura indican que los SGLTs funcionan como monómeros (Turk y col., 2000; Eskandari y col., 1998).

La estructura del transportador de bencilo/hidantoina, Mhp1 desde *Microbacterium liquefaciens* fue resuelta a 2,85 Å de resolución. Mhp1 contiene 12 STM, de los cuales 10 están organizadas en dos dominios de 5 STM (STM 1-5 que comprende de los aminoácidos 20 al 190 y STM 6-10 que comprende de los aminoácidos 204 al 388), ambos dominios presentan un plegamiento similar, mostrando un eje de simetría. Los STM 1, 3, 6 y 10 conforman el poro de transporte, siendo los residuos de aminoácidos W117, W 220, N 318, Q121 y Q 42 los que interactúan directamente con el sustrato durante el proceso de transporte. Por otro lado el sitio de unión catión está formado por los STM 1 y 8 siendo los residuos de aminoácidos A38, I41, A309, S312 y T313 los que interactúan directamente con el catión. Mhp1 existe como monómero en membrana plasmática (Weyand y col., 2008).

AdiC es un importante componente del sistema de resistencia a ácidos en enterobacterias (Fang y col., 2007). Esta bomba de H⁺, usa la energía obtenida de la descarboxilación de L-arginina para catalizar la salida de un protón. La estructura de AdiC fue resuelta a 3,2 Å de resolución desde *Salmonella* y muestra que el transportador se organiza como homodímero (Fang y col., 2009). Cada monómero dentro del dímero tiene un diámetro de aproximadamente 45 Å y está compuesto de 12 STM; donde los STM 1 y 6 son interrumpidos por cortos

segmentos no helicoidales y los STM 1-10 rodean una gran cavidad expuesta al medio extracelular (Figura 3 C). Por otra parte los STM 1-10 se organizan en dos grupos que presentan un plegamiento común, mostrando un eje de simetría similar a los descritos en los casos anteriores. Los STM 11 y 12 no participan en este plegamiento común pero representan la interface de homodimerización con una superficie de $2,500 \text{ \AA}^2$ (Fang y col., 2009).

Por otro lado, la estructura cristalina de un simporter sodio/sustrato miembro de la familia de transportadores de betaina/colina/carnitina, BetP, fue obtenida desde *Corynebacterium glutamicum*. Estos transportadores son osmoreguladores que sensan la presión osmótica intracelular y responden al estrés hiperosmótico acumulando osmolitos para restaurar los niveles de hidratación normal. La estructura cristalina determinada mostró ser un trímero sin ejes de simetría lo que sugiere ser un mecanismo regulatorio para contrarrestar el estrés osmótico intracelular (Tsai y col., 2011) (Figura 3 F).

7.7 Estructura cuaternaria de transportadores obtenida de estudios biofísicos y funcionales.

La obtención de la estructura cuaternaria de los transportadores es escasa debido a la dificultad de su cristalización y el análisis funcional y estructural de la gran mayoría de ellos está aún en estadios iniciales. Para obtener información acerca de la estructura cuaternaria de transportadores que no han sido cristalizados se han utilizado fundamentalmente proteínas modificadas por técnicas de biología molecular, ya sea por mutación sitio dirigida y fusión de genes

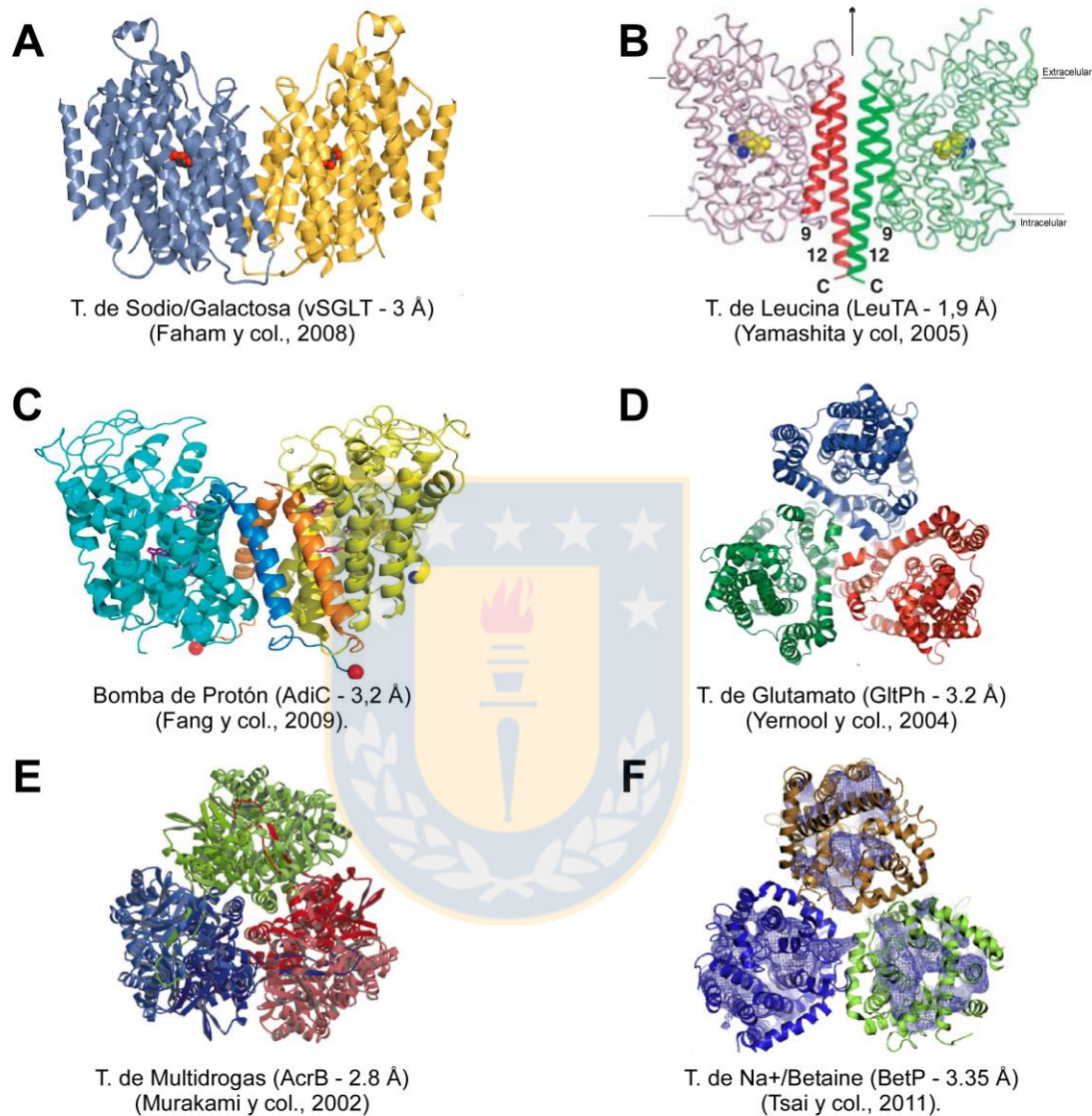


Figura 3: Estructuras cuaternarias pertenecientes a diferentes transportadores de membrana: A, B y C. Disposición tridimensional de las hélices de transmembrana para dímeros de transportadores cristalizados a alta resolución, el transportador de Sodio/Galactosa vSGLT (A) , el transportador de leucina LeuTA (B) y la bomba de protones AdiC (C). **D, E y F.** Disposición tridimensional de las hélices de transmembrana para trímeros de transportadores cristalizados a alta resolución, el transportador de Glutamato GltPh (D), el transportador de multidrogas AcrB (E) y el transportador de Sodio/Betaina BetP (F). Nótese la disposición espacial y los ejes de simetría entre los monómeros dentro de cada complejo proteico.

para generar transportadores quiméricos de distinto tipo. Estos transportadores ya sea nativos, mutantes y/o quiméricos han sido estudiados tanto por técnicas biofísicas como en ensayos de coexpresión, complementación y función. Dentro de las aproximaciones alternativas a la cristalización utilizadas en el estudio del estado oligomérico de proteínas se encuentran, geles nativos de poliacrilamida, entrecruzamiento con diversos reactivos químicos, coimmunoprecipitación y copurificación, estructura cristalina en dos dimensiones, complemento de función, microscopía de criofractura, FRET, cromatografía de exclusión de tamaño, entre otras (Veenhoff y col., 2002).

Es así como se pudo determinar que el transportador NhaA funciona como un dímero (Gerchman y col., 2001) mediante el uso combinado de ensayos de microscopía crioelectrónica en cristales en dos dimensiones (2D) (Williams y col., 1999; Williams y col., 2000), estudios de complemento de función entre mutantes letales a alto pH y concentraciones de Na⁺, coimmunoprecipitación y entrecruzamiento intermolecular (Gerchman y col., 2001) y resonancia paramagnética electrónica (Hilger y col., 2005; Hilger y col., 2007). La cristalización del transportador reveló que efectivamente NhaA existe como un dímero en membrana de *Escherichia coli* (Hunte y col., 2005), lo que permitió validar los métodos indirectos para el estudio de la estructura cuaternaria de proteínas.

Por otro lado, aunque la unidad funcional de los transportadores de neurotransmisores dependientes de Na⁺/Cl⁻ (SCL6a) que incluye transportadores para ácido γ -aminobutírico (GAT1-3), glicina (Gly1 y 2), dopamina (DAT),

serotonina (SERT) y norepinefrina (NET) parece ser un monómero, existe evidencia de que estos transportadores forman dímeros dentro de la membrana plasmática (Farhan y *col.*, 2006). Tratamiento oxidativo de DAT produce dímeros y tetrámeros debido a la formación de un puente disulfuro intermolecular entre los residuos de cisteínas 306 y 246 localizados en los segmentos de transmembrana 6 y el 4, respectivamente (Hastrup y *col.*, 2001; Hastrup y *col.*, 2003). Por otra parte, estudios de entrecruzamiento y aislamiento de polipeptidos del transportador marcados diferencialmente, han mostrado que el SERT forma oligómeros en células HEK-293 (Jess y *col.*, 1996; Kilic y *col.*, 2000). Además para GAT, DAT y SERT se ha visto que coexpresión de los transportadores fusionados a la proteína fluorescente cian (CFP) y a la proteína fluorescente amarilla (YFP) resulta en una señal de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), sugiriendo que estos transportadores existen al menos como dímeros (Schmid y *col.*, 2001; Sorkina y *col.*, 2003). Una posible interface de oligomerización ha sido identificada en el STM2 de GAT1, ya que la disrupción del motivo de siete leucinas y la sustitución de residuos de aminoácidos polares de este SMT causaron retención del transportador y la pérdida de la señal de FRET (Scholze y *col.*, 2002; Korkhov y *col.*, 2004). Por otra parte, estudios cristalográficos de ortólogos bacterianos de la familia de transportadores SCL6a, LeuTAa, revelaron que este transportador forma homodímeros (Yamashita y *col.*, 2005), antecedente que apoya la existencia de oligómeros en la membrana celular de los transportadores neurotransmisores dependientes de Na^+/Cl^- .

Para el transportador de glucosa, GLUT1 algunos estudios proponen la existencia de un homotetrámero, en el cual cada subunidad es una vía de

transporte funcional. En cada etapa del ciclo de transporte dos subunidades pueden existir en un estado de importe mientras que las subunidades restantes pueden existir en un estado de exporte, de esta manera el transportador presenta sitios de captación y eflujo simultáneamente (Hebert y Carruthers, 1992; Zottola y col., 1995). Estas conclusiones están basadas en que ligandos como citocalasina B y maltosa se unen a los sitios de salida y de entrada respectivamente y por otro lado, que ensayos de entrecruzamiento químico y estudios de las propiedades hidrodinámicas de GLUT1 solubilizado en ácido cólico y Tritón X-100 reflejan certeramente la estructura tetramérica de estos transportadores en las membranas celulares (Hebert y Carruthers, 1992; Zottola y col., 1995). GLUT1 comparte 65-66% de identidad de secuencia con GLUT3 y el transportador sensible a insulina GLUT4, pero no forma heterocomplejos con ellos cuando es sobreexpresado en adipocitos 3T3-L1, en ovocitos de *X.laevis* o HEK-293 (Burant y Bell, 1992; Pessino y col., 1991, Zutter y col., 2013). Utilizando quimeras de GLUT1-GLUT3 se propuso que el STM 9 de GLUT1 participa en el proceso de tetramerización y que los STM 2, 5, 8 y 11 contribuyen a la dimerización (Zutter y col., 2013).

Una publicación realizada durante el desarrollo de esta tesis, mostró que, SVCT1 humano purificado desde membranas de ovocitos de *X. laevis* que sobreexpresan el transportador se organizan en monómeros y dímeros. El análisis estructural de SVCT1 humano por microscopía electrónica, a baja resolución, evidenció la presencia de partículas que por su forma, dimensión y estructura correspondían a monómeros y dímeros del transportador. La organización en monómeros y dímeros fue confirmada por estudios de entrecruzamiento con DSS en membranas aisladas de ovocitos que expresan hSVCT1; Este es el único

trabajo donde se ha estudiado la estructura cuaternaria de SVCT1 y los autores proponen que el transportador presenta un estado de oligomerización mixto entre monómero y homodímero (Boggavarapu y *col.*, 2013).

Con respecto a SVCT2, si bien conocemos en detalle los aspectos cinéticos y funcionales asociados al transporte de ácido ascórbico, hasta la fecha no existen antecedentes publicados acerca de cuál es la estructura cuaternaria que adopta esta proteína en la membrana. Permaneciendo aún desconocidas preguntas básicas, tales como, ¿cuál es la unidad mínima funcional del transportador?, ¿SVCT2 se encuentra en la membrana como un oligómero (dímero, trímero, tetrámero, etc.)?, ¿Es la oligomerización necesaria para la función del transportador?, ¿cómo afecta la oligomerización las propiedades cinéticas de SVCT2?. Para intentar responder estas preguntas planteamos, como objetivo central de esta tesis determinar la estructura cuaternaria del transportador SVCT2.

La propuesta central de esta tesis es que el transportador SVCT2 se encontraría en la membrana como un oligómero de 2 subunidades (un dímero), que los monómeros dentro del dímero son capaces de interactuar entre ellos modulando las propiedades cinéticas del transporte y que la unidad mínima de transporte dentro del dímero sería el monómero.

Para demostrar lo anterior utilizaremos métodos bioquímicos, biofísicos y funcionales en células HEK-293 que sobreexpresan SVCT2 humano. Para ello, células HEK-293 sobreexpresando distintas formas del transportador SVCT2, incluyendo SVCT2 nativo, SVCT2 conteniendo diversos tipos de mutaciones puntuales en residuos de aminoácidos que afectan su función de transporte

(mutantes incapaces de transportar ácido ascórbico y mutantes con propiedades cinéticas alteradas, es decir, con una K_m aparente de transporte, al menos 5 veces superior a la del transportador nativo) y SVCT2 quiméricos fusionados a moléculas reporteras tales como péptidos antigénicos (Flag-His, HA) o proteínas fluorescentes (GFP, DsRED.) que permitirán la detección del transportador quimérico tanto por métodos inmunológicos como bioquímicos y biofísicos (inmunofluorescencia confocal, entrecruzamiento químico e inmunoblot).

Para examinar el efecto de la oligomerización sobre las características funcionales de SVCT2 hemos desarrollado variantes de SVCT2 por mutagénesis sitio dirigida, variantes que muestran cambios importantes en sus propiedades funcionales cuando son sobreexpresados en células HEK-293. Nuestra hipótesis es que los distintos SVCT2 mutantes mantienen su capacidad para oligomerizar en un dímero, y por lo tanto su coexpresión, por ejemplo en pares, en células HEK-293 llevará a la formación de dímeros mixtos conteniendo ambos transportadores, y por lo tanto podremos realizar ensayos de transporte de ácido ascórbico para determinar las propiedades cinéticas y funcionales de estos oligómeros mixtos.

8. HIPOTESIS

La propuesta central de este proyecto es que el transportador SVCT2 se encuentra en la membrana como un oligómero de 2 subunidades (un dímero), que el dímero es capaz de oligomerizar en entidades oligoméricas de orden superior, que los monómeros dentro del dímero son capaces de interactuar entre ellos modulando las propiedades cinéticas del transporte, que la unidad mínima de transporte dentro del dímero sería el monómero.



9. OBJETIVOS GENERAL

Determinar la estructura cuaternaria del transportador SVCT2.



10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1:

Establecer si SVCT2 se encuentra como un oligómero en la membrana y determinar la estequiometría y especificidad de oligomerización. Proponemos establecer que el transportador SVCT2 se encuentra en la membrana formando un oligómero de dos subunidades (dímero).

Objetivo específico 2:

Establecer si la oligomerización afecta las propiedades cinéticas y funcionales del transporte de ácido ascórbico mediado por SVCT2. Proponemos establecer que los monómeros dentro del oligómero son capaces de interactuar entre ellos modulando las propiedades cinéticas y funcionales del transporte mediado por SVCT2, y que la unidad mínima de transporte dentro del oligómero sería el monómero.

11. MATERIALES Y MÉTODOS

11.1. Materiales

Para la realización de esta tesis se utilizó la línea celular derivada de riñón embrionario humano HEK-293T, la línea celular de cáncer de próstata DU-145 y la línea celular de cáncer de mama MCF-7, las cuales fueron cultivadas utilizando los siguientes productos: DPBS/modified, medio de cultivo DMEM-High glucose, medio de cultivo RPMI-1640, suero fetal bovino 10%, tripsina-EDTA, L-glutamina, solución y penicilina-estreptomina, todos obtenidos de Hyclone; dimetilsulfóxido (DMSO) de Winkler Ltda; poli-L-lisina y azul de tripán de Sigma-Aldich; el material plástico, frascos T75 y placas de 24 pocillos, pipetas, etc. se adquirieron de la empresa Falcon.

Para la construcción de los mutantes de SVCT2 (H109Q-SVCT2-GFP, C113S-SVCT2-GFP C160S-SVCT2-GFP) y las quimeras del transportador (SVCT2-Flag-His, SVCT2-HA, SVCT2-RED y GFP-SVCT2) se utilizó el QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit y Pfu Ultra™ II fusion HS DNA polimerase, de Stratagene. También se utilizaron las enzimas *EcoRI*, *SacII*, *EcoRV*, *T4 DNA ligase*, *Antarctic Phosphatase* y *DpnI*, obtenidas de New England BioLabs y las bacterias *E.coli* XL1-Blue electrocompetentes de Stratagene. Los vectores de expresión pDsRed-Monomer-N, pEGFP-C1 obtenidos de Clontech. El antibiótico kanamicina fue obtenido de USBiological.

Los productos de digestión obtenidos por estudios de restricción fueron separados en geles de agarosa de USBiological, teñidos con bromuro de etidio

(Winkler Ltda); el marcador de peso molecular utilizado fue *Low-Range Rainbow*, de Bio Rad.

Para la purificación del ADN plasmidial se utilizó Genopure Plasmid Midi kit obtenidos de Roche; para las tranfecciones se utilizó el reactivo de transfección polietilenimina de Sigma-Aldich. El reactivo de montaje Vectashield/DAPI fue obtenido de Vector Laboratories.

Para la confección de soluciones se utilizó: tampón Tris, y cloruro de calcio obtenidos de Winkler Ltda. Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano sulfónico (Hepes), cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de (2-hidroxietil)trimetilamonio (cloruro de colina), fosfato monobásico de potasio monohidratado, fosfato dibásico de sodio dihidratado y fosfato monobásico de sodio monohidratado fueron obtenidos de Fisher Biotech Co; cloruro de mercurio y EDTA fueron obtenidos de Boehringer-Mannheim Co; cloruro de calcio fue obtenido de Winkler Ltda.

Para los ensayos de entrecruzamiento, westerblot e inmunocitoquímica se utilizó paraformaldehído, acrilamida, bis-acrilamida, Suero albumina de bovino (BSA) todos obtenidos de Sigma-Aldich; DSS, BS3, inhibidores de proteasas (Halt Proteinase Inhibitor Cocktail), RIPA, membranas de PDVF, kit de quimioluminiscencia ECL (Pierce ECL Western Blotting Substrate) todos obtenidos de ThermoScientific, Glicina de USBiological, metanol de Merck, Reactivo de Bradford y Tween 20 obtenidos de Bio Rad, anticuerpo primario anti SVCT2 (S-19 Santacruz), anticuerpo primario anti Flag (M2 Sigma-Aldich), anticuerpo primario anti HA (05-904 Millipore), anticuerpo primario anti GFP (B-2 y FL Santacruz),

anticuerpo secundario anti mouse conjugado a FITC (Jackson), anticuerpo secundario anti-Goat conjugado a HRP (Dako).

Para los ensayos de transporte se utilizó ditiotretol (DTT) de Sigma-Aldich; L-[1-14C]-ácido ascórbico (8,0 mCi/mmol) fue obtenido de DuPont NEN; líquido de centelleo no tóxico, carente de tolueno (Ecoscint H), fue obtenido de National Diagnostics; los viales de centelleo de 7 mL fueron obtenidos de Kimble, México.

Los programas computacionales utilizados en fueron: Igor pro (WaveMetrics), sigma plot (Systat Software Inc), canvas (ACD System Inc), Microsoft Office 2007.



11.2. Métodos

11.2.1. Cultivo celular. La línea celular HEK 293T, que corresponde a células embrionarias de riñón humano fue cultivada en medio de cultivo DMEM-High Glucose y las líneas de cáncer de próstata metástasis cerebro DU-145 y de cáncer de mama MCF-7 fueron crecidas en medio de cultivo RPMI-1640. Ambos medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero bovino fetal inactivado, 1% de penicilina-streptomina y 2,5 mM de L-glutamina. La viabilidad celular fue determinada por el método de Azul de Tripán, con el número de células determinadas en una cámara de Neubauer.

11.2.2. Mutaciones sitio dirigidas del transportador SVCT2. Para las mutaciones sitio dirigidas se utilizó el QuickChange Site-Directed mutagenesis Kit

y Pfu Ultra™ II fusion HS DNA polimerase de Stratagene. Para cada mutante de utilizó el vector *pEGFP-N1*, el cual contiene la secuencia codificante para SVCT2, entre los sitios de restricción *EcoRI* y *SacII*. Las parejas de partidores diseñados para generar las proteínas mutantes de SVCT2 fueron los siguientes:

Para H109Q-SVCT2-GFP:

Sentido 5'-TTTCTGGGGCTACAGCAATACCTGACATGCTTCAG-3'

Antisentido 5'-CTGAAGCATGTCAGGTATTGCTGTAGCCCCAGAAA-3'

Para C113S-SVCT2-GFP:

Sentido 5'-CAGCACTACCTGACGAGCTTCAGCGGCACGATC-3'

Antisentido 5'-GATCGTGCCGCTGAAGCTCGTCAGGTAGTGCTG-3'

Para C160S-SVCT2-GFP:

Sentido 5'-CTACAGACAACGTTTGGATCCCGGTTACCCCTGTTTCAG-3'

Antisentido 5'-CTGAAACAGGGGTAACCGGGATCCAAACGTTGTCTGTAG-3'

La mutagénesis se realizó utilizando 10U de Pfu Ultra™ II fusion HS DNA polimerase y 14 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C, 3 min a 68 °C. Finalmente, el producto de PCR se digirió utilizando 20U de la enzima de restricción *Dpn I* y se incubó durante 4 horas a 37 °C. 10µl del producto de PCR digerido con *Dpn I* se transformó en bacterias electrocompetentes *E. coli* XL1200.

11.2.3. Construcción de las quimeras de SVCT2-RED, SVCT2-Flag-His, SVCT2-HA y GFP-SVCT2. Para la construcción de la quimera SVCT2-RED y GFP-SVCT2, SVCT2 fue subclonado a partir del plásmido pSVCT2-EGFP-N1 (presente en nuestro laboratorio) en los vectores de expresión pDsRed-Monomer-N1 y pEGFP-C1 respectivamente, entre los sitios de restricción *EcoRI* y *SacII*.

Para la construcción de SVCT2-Flag-His, se hicieron dos subclonamientos sucesivos a partir de vectores existentes en nuestro laboratorio. El primero se realizó a partir del vector SVCT2_{Cysless}-pMK que contiene los epitopes Flag-His fusionado en el extremo carboxilo terminal al transportador SVCT2_{Cysless} (Tesis doctoral Carlos Aylwin, 2014) entre los sitios de restricción *EcoRI* y *EcoRV*. El inserto SVCT2_{Cysless}-Flag-His fue subclonado entre los sitios *EcoRI* y *EcoRV* en el vector de expresión pCMV-stop (tesis doctoral Felipe Zuñiga, 2008) al cual previamente se le eliminó un sitio *SacII*. Finalmente para el segundo subclonamiento se procedió a intercambiar el transportador SVCT2_{Cysless} por SVCT2_{nativo} entre los sitios de restricción *EcoRI* y *SacII*.

Al igual que en el caso anterior para la construcción de SVCT2-HA, se realizaron dos subclonamientos sucesivos, el primero se realizó a partir de un vector que contiene el epitope HA fusionado en el extremo carboxilo terminal de un gen entre los sitios de restricción *EcoRI* y *KpnI*, este inserto fue subclonado al vector de expresión pCMV-stop al cual previamente se le eliminó el sitio de restricción *SacII* (tesis doctoral Felipe Zuñiga, 2008) entre los sitios de restricción *EcoRI* y *KpnI*. Finalmente para el segundo subclonamiento se procedió a intercambiar el gen por la secuencia que codifica para SVCT2_{nativo} entre los sitios de restricción *EcoRI* y *SacII*.

Todos los subclonamientos se transformaron en bacterias electrocompetentes *E. coli* XL1200 y se incubaron por una hora a 37 °C en medio de cultivo LB. Posteriormente se sembraron en placas Petri con agar LB con el antibiótico de selección (kanamicina 60 µg/mL) y se incubaron por 16 hrs a 37 °C. Las colonias obtenidas fueron picadas y sembradas en 2 mL de medio líquido LB

con Kanamicina e incubadas por 24 hrs a 37 °C para luego purificar los plásmidos por el método de lisis alcalina, para ello las bacterias crecidas se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se agregó 200 µL de solución de resuspensión P1 (50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNAsa). Después, se adicionó 400 µL de solución de lisis P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) y se agitó suavemente por menos de 5 min. Luego, se agregó 200 µL de solución de neutralización P3 frío (3,0 M acetato de potasio, pH 5,5) y se mezcló suavemente por 5 min hasta ver un precipitado blanco para luego incubar la muestra a 4°C durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 10.000 rpm y se rescató el sobrenadante. Cada plásmido fue precipitado agregando 500 µL de isopropanol por 30 min a temperatura ambiente. Luego, las muestras se centrifugaron por 10 min a 10.000 rpm eliminando el sobrenadante. Posteriormente cada precipitado se lavó con 400 µL de etanol al 70% y se centrifugó por 3 min a 10.000 rpm. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 30 µL de agua estéril libre de nucleasas. Para determinar la identidad del ADN plasmidial obtenido se realizaron análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *SacII*, para finalmente ser confirmadas por secuenciación automática de ADN.

11.2.4. Purificación de ADN plasmidial por columna de intercambio iónico.

Una vez que la secuenciación automática de ADN confirmó que nuestras mutantes y las quimeras construidas eran positivas se procedió a la extracción por columna del ADN plasmidial utilizando el Genopure Plasmid Midi kit. Primero las bacterias fueron crecidas en un matraz conteniendo 300 mL de medio LB/kanamicina el cual

se incubó en agitación un día a 37 °C. Luego las bacterias fueron centrifugadas por 10 min a 6000 rpm a 4°C (centrífuga Sorvall RC6+, rotor F12S-6X500Lex). El precipitado bacteriano obtenido se resuspendió en 4 mL de solución de resuspensión (50 mM Tris·Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNasa), después se agregaron 4 mL de solución de lisis (NaOH 0,2 N + SDS al 1%) y se homogenizó. Posteriormente se agregaron 4 mL de solución de neutralización helada (ácido acético glacial 5M y acetato de sodio 3M). Después del todo el procedimiento descrito se incubó la solución por 5 min a -20°C para posteriormente centrifugarla (centrífuga Sorvall RC6+, rotor SS-34) por 40 min a 11000 rpm a 4°C. Finalmente el sobrenadante obtenido después de la centrifugación se hizo pasar por una columna de intercambio iónico. Una vez obtenido el ADN plasmidial, las muestra fueron cuantificadas utilizando un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 260 nm.

11.2.5. Transfección transiente de plásmidos en células HEK-293. Las células HEK-293 fueron sembradas en placas de 24 pocillos con o sin vidrios estériles circulares de 12 mm de diámetro previamente tratadas con poli-L-lisina a una densidad de 50.000 ó 200.000 células por pocillo dependiendo del experimento a realizar, esto se hizo 24 hrs antes de realizar la transfección. Para la transfección se incubó la polietilenimina (1µl por pocillo a transfectar) con 24.5 µL de medio DMEM sin suero durante 10 min y, paralelamente se incubó el ADN a transfretar con 24.5µL de DMEM sin suero (1 µg ADN por pocillo). Posteriormente se mezclaron con vortex los tubos de polietilenimina-medio y ADN-medio para ser incubados durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se agregó 50 µL esta

mezcla en los pocillos conteniendo 200 μ l de medio DMEM sin suero y se incubaron las placas por 24 hrs a 37 °C y 5% CO₂, para finalmente cambiar a cada pocillo medio fresco sin suero pasadas 24 hrs. Todos los experimentos posteriores con células transfectadas fueron realizados 48 hrs post-transfección.

Las células crecidas en vidrios fueron lavadas 3 veces en solución de incubación sodio (15mM Hepes, 135mM NaCl, 5mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 0.8mM MgCl₂, pH 7.4) por 10 min cada vez y montadas con 8 μ L de medio de montaje con DAPI (Vectashield) en un portaobjetos.

Las células transfectadas fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia de disco rotatorio (Olympus IX81).

11.2.6. Ensayos de inmunocitoquímica: Aproximadamente 50.000 células fueron sembradas en placas de 24 pocillos y adheridas con poli-L-lisina en vidrios estériles circulares de 12 mm de diámetro. 24 hrs después fueron transfectada con los vectores de interés siguiendo el protocolo detallado anteriormente. 48 hrs post-transfección las células fueron lavadas 2 veces con solución de incubación sodio (15mM Hepes, 135mM NaCl, 5mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 0.8mM MgCl₂, pH 7.4) por 5 min cada vez, luego fueron fijadas en PFA al 4% (preparado en solución de incubación sodio) por 30 min a 4°C y posteriormente lavadas 3 veces con solución de incubación sodio por 5 min cada vez. Se permeabilizaron las células utilizando Tritón X-100 (0.1% en solución de incubación sodio) por 5 min, se lavaron las células 3 veces en solución de incubación sodio por 5 min cada vez y se bloquearon con buffer BSA (1% BSA en solución de incubación sodio) por 1 hr. Luego, las células fueron incubadas con la misma solución, pero en presencia del

anticuerpo primario específico para cada proteína por 14 hrs. Posteriormente fueron lavadas 3 veces en solución de incubación sodio por 10 min cada vez e incubadas por 4 hrs con anticuerpo secundario específico para cada anticuerpo primario. Finalmente, las células fueron lavadas 3 veces en solución sodio por 10 min cada vez y montadas con 8 μ L de medio de montaje con DAPI (Vectashield) en un portaobjetos. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia de disco rotatorio (Olympus IX81).

Para la detección de SVCT2-Flag-His se utilizó el anticuerpo primario anti Flag (Sigma) a una dilución 1:100 en BSA 1% y el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con FITC (Jackson) a una dilución 1:800 en BSA 1%.

Para la detección de SVCT2-HA se utilizó el anticuerpo anti HA (Millipore) a una dilución 1:100 en BSA 1% y el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con FITC (Jackson) a una dilución 1:800 en BSA 1%.

11.2.7. Ensayos de entrecruzamiento con paraformaldehído. Las líneas celulares HEK-293, DU-145 y MCF7 cultivadas independientemente en placas de 24 mm fueron lavadas 2 veces con DPBS para posteriormente ser incubadas con concentraciones crecientes (0; 0,1; 0,3; 1 y 3% p/v) del agente entrecruzante PFA diluido en DPBS, por 5 min a 37°C. Luego fueron lavadas dos veces con una solución de glicina 0,125 M (diluida en DPBS) seguidas de 2 veces con DPBS. Las células luego fueron lisadas solución RIPA suplementado con inhibidores de proteasas por 30 min a 4°C en agitación. 70 μ g de estas proteínas fueron sometidas a fraccionamiento por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, transferencia a membranas de PDVF e inmunodetección con anti-SVCT2.

Por otra parte, ensayos de entrecruzamiento fueron realizados en células HEK-293 sobreexpresando los constructos SVCT2-GFP, SVCT2-Flag-His, SVCT2-HA y GFP-SVCT2. En este caso las células fueron tratadas con soluciones de PFA 0; 0,001, 0,003, 0,1; 0,3; 1 y 3% p/v siguiendo el mismo protocolo detallado anteriormente. 10 μ g de estas proteínas fueron sometidas a fraccionamiento por electroforesis en geles poliacrilamida-SDS al 7%, transferencia a membranas de PDVF e inmunodetección con un anticuerpo específico para cada constructo.

Además se estudió la dependencia del tiempo de incubación y la temperatura en la formación de los complejos oligoméricos. Para ello, se realizaron estudios con 3% p/v de PFA en células HEK-293 sobreexpresando las diferentes quimeras de SVCT2 a una temperatura fija de 37°C variando el tiempo de entrecruzamiento de 0; 0,16; 0,5; 1; 2; 5 a 10 min, y en paralelo se realizaron estudios de entrecruzamiento a un tiempo fijo de 5 min variando las temperaturas entre 4, 8, 12, 22 y 37°C.

11.2.8. Ensayos de entrecruzamiento con DSS y BS3. Células HEK-293 sobreexpresando transientemente los constructos SVCT2-Flag-His, SVCT2-HA o GFP-SVCT2 cultivadas en placas de 24 pocillos fueron lavadas 2 veces con DPBS para posteriormente ser incubadas con concentraciones crecientes (0; 0,001, 0,003, 0,1; 0,3; 1, 3 y 5 mM) del agente entrecruzante permeable DSS (solubilizado en DMSO y posteriormente en DPBS) o del agente entrecruzante impermeable BS3 (solubilizado en DPBS), por 1 hr a temperatura ambiente. Luego fueron lavadas dos veces con una solución de glicina 0,125M y 2 veces con

DPBS. Las células luego fueron lisadas solución RIPA suplementado con inhibidores de proteasas por 30 min a 4°C en agitación. 10 µg de proteínas fueron sometidas a fraccionamiento por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 7%, transferencia a membranas de PDVF e inmunodetección con anticuerpo específico para cada constructo.

11.2.9. Western Blot. En cada experimento después de lisar las células con solución RIPA suplementado con inhibidores de proteasas por 30 min a 4°C en agitación, se procedió a la cuantificación de los extractos de proteína a través del método de Bradford para luego ser luego separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7 o 10% para ser posteriormente transferidas mediante transferencia semi seca a una membrana de PVDF activada previamente con metanol. Las membranas de PVDF fueron bloqueadas con TBS-leche al 5% para luego ser incubadas por 4 hrs a temperatura ambiente con el anticuerpo primario específico para cada epítipo. Posteriormente en las membranas se realizaron tres lavados de 10 min con TBS-Tween 20 (0,1%) y se incubaron por dos horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (conjugado con HRP) específico para cada anticuerpo primario. Una vez terminada la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas fueron lavadas 3 veces por 10 min cada vez en TBS-Tween20. Finalmente, las muestras fueron reveladas con el kit de quimioluminiscencia ECL. Las bandas fueron cuantificadas utilizando el programa computacional ImageJ.

Para la detección de SVCT2 endógeno se utilizó el anticuerpo anti SVCT2 (Santa Cruz Sc-9926), a una dilución 1:1000 en TBS-leche 1% y el anticuerpo

secundario anti-goat conjugado con HRP (DAKO) a una dilución 1:1000 en TBS-leche 1%.

Para la detección de GFP-SVCT2 se utilizó el anticuerpo anti GFP (Santa Cruz B-2), a una dilución 1:1000 en TBS-Tween20 0,05% y el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con HRP (DAKO) a una dilución 1:1000 en TBS-Tween20 0,05%.

Para la detección de SVCT2-GFP se utilizó el anticuerpo anti GFP (Santa Cruz FL), a una dilución 1:1000 en TBS-Tween20 0,05% leche 1% y el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con HRP (DAKO) a una dilución 1:1000 en TBS-Tween20 0,05% leche 1%.

Para la detección de SVCT2-Flag-His se utilizó el anticuerpo anti Flag (M2-Sigma), a una dilución 1:1000 en PBS leche 1% y el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con HRP (DAKO) a una dilución 1:1000 en PBS leche 1%.

Para la detección de SVCT2-HA se utilizó el anticuerpo anti HA (Millipore), a una dilución 1:1000 en PBS leche 1% y el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con HRP (DAKO) a una dilución 1:1000 en PBS leche 1%.

11.2.10. Ensayos de transporte de ácido ascórbico. Para estos ensayos se utilizaron placas de 24 pocillos conteniendo un número aproximado de 600.000 células transfectadas por pocillo. A cada pocillo se le adicionaron 200 μ L de tampón de transporte (Hepes 15 mM, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM y MgCl₂ 0,8 mM, pH 7,4) y se incubaron por 30 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se retiró el tampón de transporte y se agregó 150 μ L de mezcla radiactiva que contenía L-[1-14 C]-ácido ascórbico y ácido ascórbico no radiactivo; se

incubaron por un tiempo determinado (0-10 min) dependiendo del experimento desarrollado. Pasado este tiempo se agregó 250 μL de tampón de detención (HgCl_2 0,2 mM, NaCl 135 mM, CaCl_2 1mM, KCl 5 mM, Hepes 15 mM y MgSO_4 0,8 mM, pH 7,4) a 4 °C. Luego se agregó 100 μL de la mezcla de lisis (Tris-HCl 10 mM, SDS 0,2%, pH 8,0) a cada pocillo y se incubó durante 24 hrs en agitación. El lisado de células fue recolectado en viales de centelleo conteniendo 1 mL de líquido de centelleo. La radiactividad incorporada por las células fue cuantificada por centelleo líquido. Para estudiar el efecto del sodio sobre el transporte de ácido ascórbico se realizaron experimentos utilizando concentraciones crecientes de sodio hasta una concentración final de 135 mM, para mantener la osmolaridad se agregó cloruro de colina al tampón de transporte (Hepes 15 mM, pH 7,4, Cloruro de colina 135 mM, KCl 5 mM, EGTA 1mM y EDTA 1mM) (Godoy y *col.*, 2007; Ormazabal y *col.*, 2010; Mardones y *col.*, 2012). Para determinar la K_m tanto de SVCT2 nativo como de las mutantes se utilizaron concentraciones crecientes de AA, las cuales variaron entre 10 y 500 μM bajo condiciones de velocidad inicial. En estos ensayos los datos obtenidos, fueron matemáticamente transformados a velocidades para luego realizar los gráficos de Michaelis-Menten. Para poder observar mejor los resultados y hacerlos más comparables unos con otros, linealizamos la ecuación de Michaelis-Menten y realizamos gráficos de Eadie-Hofstee, los que permiten visualizar rápidamente los parámetros cinéticos de K_m y $V_{\text{máx}}$. Este gráfico fue seleccionado por sobre el de Lineweaver-Burke debido a que permite ver los puntos equidistantes unos de otros para las concentraciones que utilizamos y establecer si existen dos parámetros cinéticos dentro de un mismo experimento que es lo que nos interesa. Por el contrario, descartamos el

gráfico de Lineweaver-Burke debido a que por las concentraciones que utilizamos todos los puntos se agruparon cercanos al eje Y, lo que no nos permitía ver si existían dos componentes cinéticos dentro del experimento.



12. RESULTADOS

12.1 Construcción de transportadores SVCT2 quiméricos y mutantes.

Parte importante de esta tesis consistió en la preparación de una serie de variantes del transportador SVCT2 fusionado con con distintos epitopes o proteínas fluorescentes (Figura 4). Esto facilitó determinar la expresión, localización subcelular y propiedades funcionales del transportador.

Con este propósito el cDNA codificante para SVCT2 fue inicialmente subclonado en el vector de expresión pEGFP-N1 para generar la quimera fusionada en el carboxilo terminal con la proteína fluorescente verde GFP (SVCT2-GFP) y la proteína fluorescente roja Red (SVCT2-RED) (Figura 4 A). Además se construyó la quimera GFP-SVCT2 donde la proteína fluorescente GFP fue fusionada en el amino-terminal. La fusión con las proteínas fluorescente permitió detectar la expresión y la localización del transportador. Por otro lado, se construyeron las quimeras de SVCT fusionada al carboxilo terminal, los epitopes Flag-His (SVCT-Flag-His, 3 epitopes Flag consecutivos más 6 residuos de histidina, Ter, 2003) y HA (SVCT2-HA, Maue, 2007) (Figura 4 A). La sobreexpresión de estas dos quimeras pueden ser detectadas por ensayos de inmunocitoquímica y western blot. Como veremos más adelante, todas estas proteínas quiméricas mantienen las propiedades funcionales de SVCT2 nativo pero pueden ser diferenciadas e identificadas en células cotransfectadas simultáneamente con dos de ellas utilizando anticuerpos específicos (anti-GFP, anti-Flag, anti-His o anti-HA) o su perfil de fluorescencia (GFP versus RED).

Además de lo anterior, se generaron tres mutantes puntuales de SVCT2, H109Q, C113S y C160S, que se diferencian de SVCT2 por alteración de sus propiedades funcionales. Las tres mutantes al ser sobreexpresadas se localizan en la membrana plasmática y la H109Q no transporta ácido ascórbico, mientras que C113S y C160S transportan ácido ascórbico con una K_m de al menos 8 veces superior al transportador nativo. Todos los constructos fueron verificados en su identidad por secuenciación automatizada disponibles de fuentes comerciales (Figura 4 A y B).

12.2 Caracterización funcional de transportadores SVCT2 quiméricos y mutantes

Los diferentes transportadores quiméricos fueron caracterizados funcionalmente en términos de su localización subcelular y su capacidad para transportar AA (constantes cinéticas K_m y $V_{máx}$ aparentes de transporte) y su activación cooperativa por Na^+ (coeficiente de Hill (n_H) y Na^{+50}). Se caracterizaron 5 quimeras: SVCT2-GFP, SVCT2-RED, GFP-SVCT2, SVCT2-Flag-His, y SVCT2-HA.

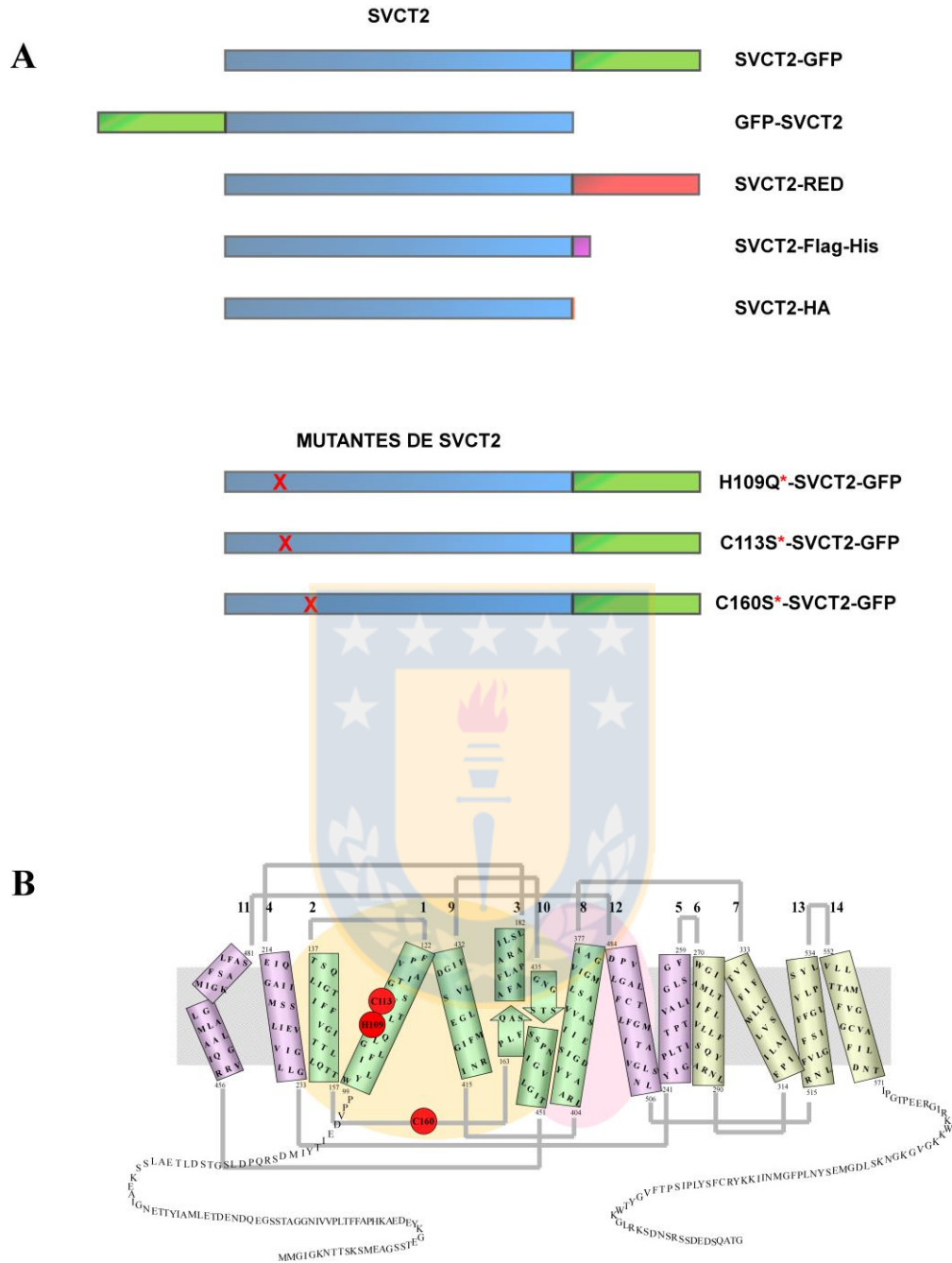


Figura 4. Modelos de quimeras y mutantes de SVCT2. A. Representación esquemática de los distintos constructos, quimeras y mutantes de SVCT2. **B.** Modelo 2D que representa la ubicación de los residuos mutados en el transportador SVCT2. Los segmentos transmembrana están posicionados en un esquema de membrana con sus largos a escala. En círculos rojo se especifica la posición de los residuos H109, C113 y C160 que contiene SVCT2 en su secuencia aminoacídica.

También caracterizamos 3 proteínas mutantes construidas en el contexto de la quimera SVCT2-GFP, las mutantes H109Q, C113S y C160S, las que fueron analizadas en términos de su localización subcelular y su capacidad para transportar AA (constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ aparentes de transporte) y su activación cooperativa por Na^+ (coeficiente de Hill (n_H) y Na^{+50}).

12.2.1. Quimera SVCT2-GFP

Para facilitar la capacidad de verificar rápidamente la expresión y la localización subcelular del transportador SVCT2 y distintos transportadores quiméricos y mutantes utilizados en la presente tesis, el cDNA codificante para SVCT2 fue subclonado en el vector de expresión pEGFP-N1 para generar la quimera SVCT2-GFP. Luego de transfectar células HEK-293, la observación por microscopía de fluorescencia convencional y confocal reveló una elevada eficiencia de transfección de alrededor de un 90% (datos no mostrados). En células HEK-293 expresando SVCT2-GFP, el análisis de planos ópticos a lo largo del eje-z reveló que la fluorescencia estaba asociada a los bordes exteriores de la célula, con una baja o ausente fluorescencia a nivel intracelular, indicando que el transportador se encuentra fundamentalmente a nivel de la membrana plasmática (Figura 5 B). Esto fue confirmado en estudios de colocalización con el marcador de membrana plasmática GLUT1-RED, cuya fluorescencia está asociada fundamentalmente a la periferia de la célula; en estos estudios se observó una colocalización total de la fluorescencia de SVCT2-GFP con la de GLUT1-RED,

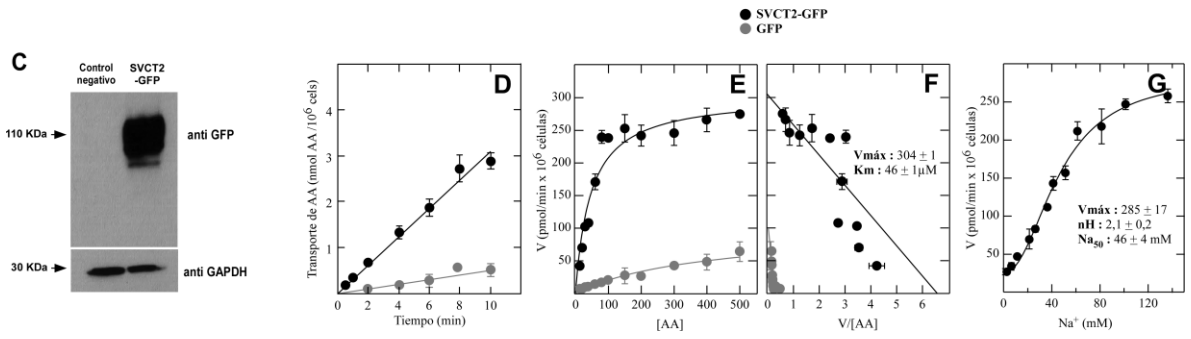
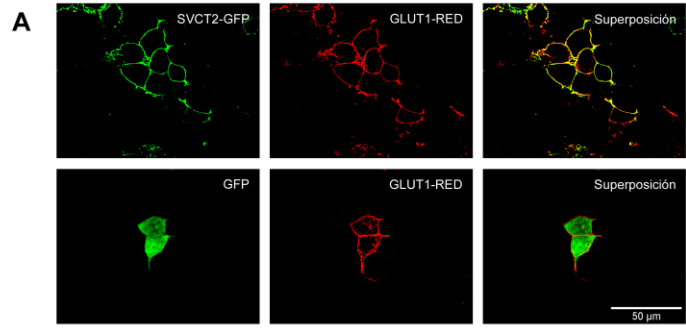


Figura 5. Localización subcelular y análisis funcional de SVCT2-GFP y GFP. **A.** Microscopía confocal de células HEK-293 que fueron cotransfectadas con pSVCT2-GFP y pGLUT1-RED o pEGFP-N1 y pGLUT1-RED, revelaron que el transportador se expresó a nivel de membrana plasmática. La fijación de las células HEK-293 se realizó en PFA al 4%, la imagen obtenida por microscopía confocal en aumento 60X representa un plano medial de la célula. **B.** Microscopía confocal de células HEK-293 transfectadas con pSVCT2-GFP, confirmaron que el transportador se expresó a nivel de membrana plasmática. Las imágenes en aumento de 60X corresponden a cortes ópticos consecutivos obtenidos cada 2 μm en células fijadas en PFA al 4%. **C.** Evaluación de la expresión transiente de SVCT2-GFP en las células HEK-293 mediante inmunodetección (Western Blot) con un anticuerpo primario dirigido contra GFP. Como control negativo se utilizaron células no transfectadas. El ensayo se realizó con 10 μg proteínas totales sembradas en un gel SDS-PAGE al 10%. **D.** Curva de transporte de AA en el tiempo realizado en células HEK-293 que expresan transientemente SVCT2-GFP (círculos negros) o GFP (círculos grises). El ensayo se realizó a 100 μM de AA de 0 a 10 min a 37°C. **E, F.** Determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA mediado por SVCT2-GFP (círculos negros) expresado transientemente en células HEK-293 o SVCT2 endógeno expresado en células HEK-293 transfectadas con pEGFP-N1 (círculos grises), se utilizó un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 μM en un ensayo de transporte de 5 min a 37°C. **G.** Efecto de distintas concentraciones de sodio sobre el transporte de AA realizado en células HEK-293 que expresan transientemente SVCT2-GFP (círculos negros), el ensayo se realizó a 100 μM de AA por 5 min a 37°C. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección.



confirmando que SVCT2-GFP se localiza a nivel de la membrana plasmática en las células HEK-293 transfectadas (Figura 5 A). Por otro lado, en las células control transfectadas expresando GFP, se observó la fluorescencia de GFP a nivel intracelular, con una total ausencia de colocalización con GLUT1-RED (Figura 5 A). La fluorescencia de SVCT2-GFP y GFP se mantuvo estable entre 2 a 4 días post transfección, por lo que para cada uno de los ensayos funcionales realizados durante la presente tesis se utilizaron células a 2 días post-transfección. Ensayos de inmunoblot con anti-GFP reveló la presencia de tres bandas heterogéneas en un rango de peso molecular desde 90 a 130 KDa aproximadamente en células HEK-293 expresando SVCT2-GFP, sin señal en células control no transfectadas (Figura 5 C).

Estudios de transporte de AA en células HEK-293 transfectadas expresando SVCT2-GFP confirmaron expresión de un transportador con propiedades cinéticas similares a las esperadas para SVCT2; esta células transportaron AA a una velocidad aproximadamente 10 veces mayor que células control expresando GFP (0,3 y 0,025 nmoles/minuto $\times 10^6$ células, respectivamente) (Figura 5 D). La velocidad de transporte permaneció constante durante la duración del ensayo, con una incorporación total de 3 nmoles/ 10^6 células luego de 10 minutos de incubación en las células expresando SVCT2-GFP.

Para la determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA mediado por SVCT2-GFP, se realizaron ensayos de concentración-respuesta para determinar la dependencia de la velocidad de transporte en función de concentraciones crecientes de AA extracelular, utilizando un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 μM , en un ensayo de transporte de 5

minutos. La curva de velocidad de transporte versus concentración de sustrato mostró una forma hiperbólica, observándose que la velocidad de transporte se aproxima a saturación a concentraciones de AA superiores a 100 μM (Figura 5 E). Análisis de los datos de transporte utilizando el método de Eadie-Hofstee generó una línea recta que es consistente con la presencia de un único componente cinético involucrado en el transporte de AA, con una K_m aparente de transporte de AA de $46 \pm 1 \mu\text{M}$ para SVCT2-GFP y una $V_{\text{máx}}$ aparente de $304 \pm 1 \text{ pmoles/minuto} \times 10^6 \text{ células}$ (Figura 5 F). El transporte basal observado en células HEK-293 expresando GFP (Figura 5 F), se debe a la expresión de bajos niveles de un transportador SVCT2 endógeno, el cual fue identificado por experimentos de RT-PCR, inmunolocalización e inmunoblotting (datos no mostrados).

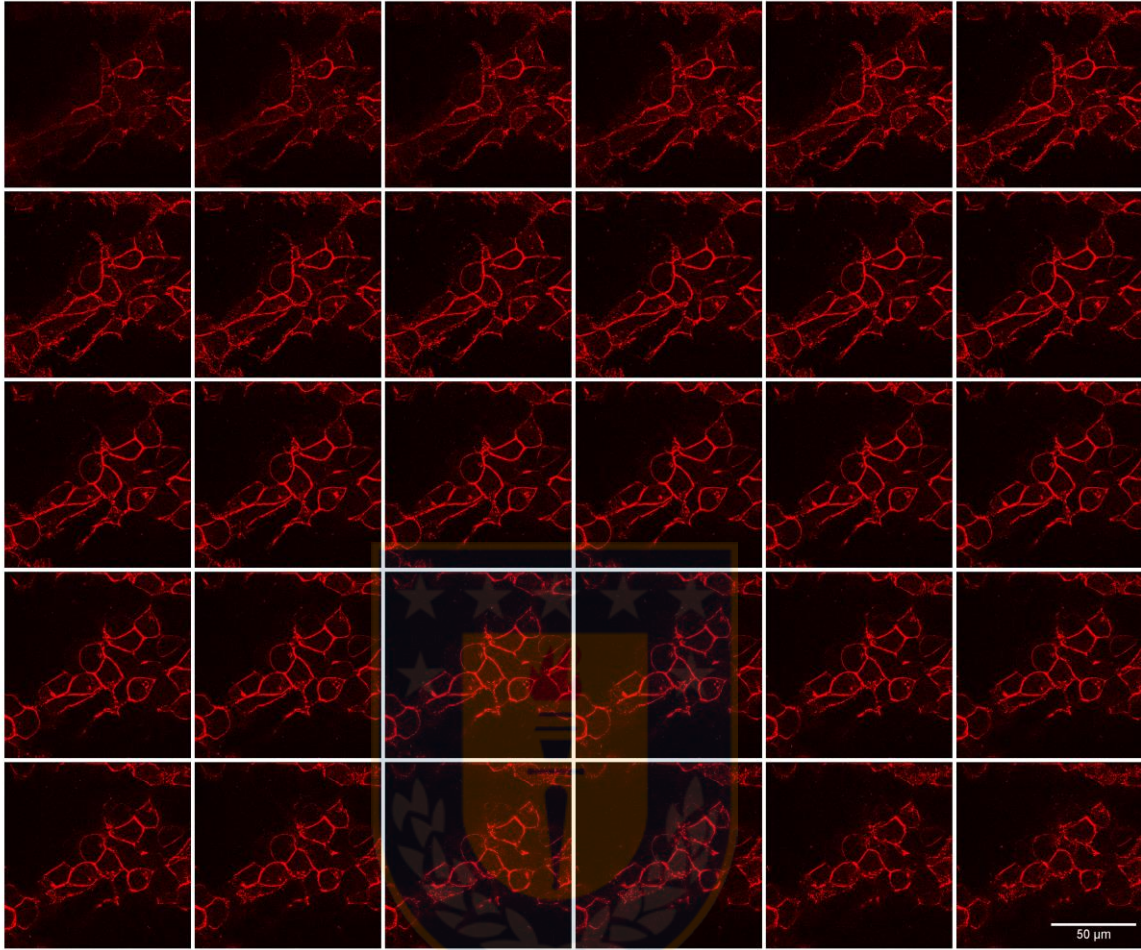
Ensayos de concentración-respuesta para analizar el efecto del Na^+ en el transporte de AA confirmaron la activación del transporte de AA mediado por SVCT2-GFP por Na^+ extracelular (Figura 5 G). La velocidad de transporte de AA aumentó progresivamente en forma sigmoidea como función de la concentración de Na^+ extracelular, lo que es característico de un comportamiento cooperativo; para un aumento total de aproximadamente 10 veces en la velocidad de transporte a 135 mM Na^+ respecto del control en ausencia de Na^+ (datos no mostrados). Análisis utilizando la ecuación de Hill permitió calcular un coeficiente de Hill (n_H) de $2,1 \pm 0,2$ para el efecto del Na^+ extracelular sobre transporte de AA por SVCT2-GFP, y un Na_{50} (la concentración de Na^+ a la que se observa el 50% de la activación máxima) de $46 \pm 4 \text{ mM}$ (Figura 5 G). Concluimos que la fusión de la proteína fluorescente verde en el extremo carboxilo-terminal de SVCT2 no alteró las propiedades cinéticas y funcionales del transportador (Godoy y col., 2007).

12.2.2. Quimera SVCT2-RED.

Análisis de cortes ópticos por microscopía confocal reveló que células HEK-293 transfectadas expresando SVCT2-RED (> 90% eficiencia) muestran una marcada fluorescencia que delimita los bordes de la célula, con una baja intensidad de fluorescencia a nivel intracelular, lo que es consistente con la localización de SVCT2-RED a nivel de la membrana plasmática; sin embargo, en etapas tardías post-transfección se observó un incremento gradual de fluorescencia intracelular, por lo que concluimos que la presencia de fluorescencia intracelular se debe probablemente a un problema de sobreexpresión (Figura 6 A). La fluorescencia de SVCT2-RED se mantuvo estable entre 2 y 4 días post-transfección, por lo que para los ensayos funcionales se utilizaron células a 2 días post-transfección.

Células HEK-293 transfectadas expresando SVCT2-RED mostraron expresión de un transportador con propiedades cinéticas similares al transportador SVCT2; estas células transportaron AA a una velocidad aproximadamente 6 veces mayor que células controles expresando GFP (0,36 y 0,06 nmoles/minutox10⁶ células, respectivamente) (Figura 6 B), con una incorporación total de AA de 2,9 nmoles/10⁶ células durante el ensayo de transporte (10 minutos). La curva de velocidad de transporte versus concentración de sustrato fue hiperbólica y se aproxima a saturación a concentraciones de AA superiores a 100 µM (Figura 6 C). Análisis por el método de Eadie-Hofstee generó una línea recta (Figura 6 D), con un único componente cinético caracterizado por una K_m y V_{máx} aparente de transporte de AA de 27 ± 5 µM y 320 ± 15 pmoles/minutox10⁶ células,

A



● SVCT2-RED
● GFP

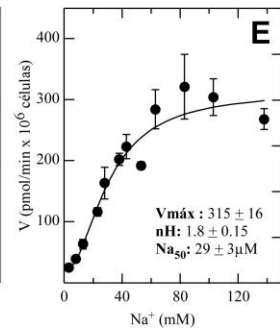
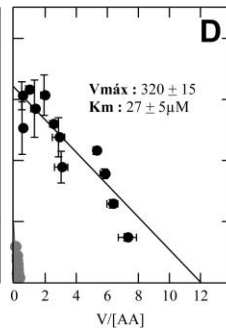
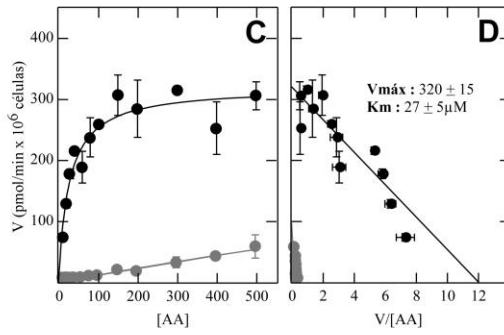
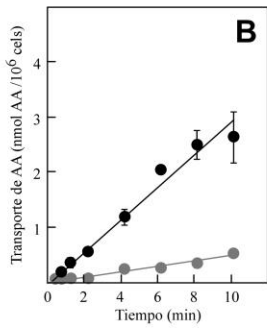


Figura 6. Localización subcelular y análisis funcional de SVCT2-RED. A. Microscopía confocal de células HEK-293 transfectadas con pSVCT2-RED, revelaron que el transportador se expresó a nivel de membrana plasmática. Las imágenes en aumento de 60X corresponden a cortes ópticos consecutivos obtenidos cada 2 μm en células fijadas en PFA al 4%. B. Curva de transporte de AA en el tiempo realizado en células HEK-293 que expresan transientemente SVCT2-RED (círculos negros) o GFP (círculos grises). El ensayo se realizó a 100 μM de AA de 0 a 10 minutos a 37°C. C, D. Determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA mediado por SVCT2-RED (círculos negros) expresado transientemente en células HEK-293 o SVCT2 endógeno expresado en células HEK-293 transfectadas con pEGFP-N1 (círculos grises), se utilizó un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 μM en un ensayo de transporte de 5 min a 37° C. E. Efecto de distintas concentraciones de sodio sobre el transporte de AA realizado en células HEK-293 que expresan transientemente SVCT2-RED (círculos negros), el ensayo se realizó a 100 μM de AA por 5 min a 37°C. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección



respectivamente, para SVCT2-RED (Figura 6 D). El Na⁺ extracelular activó el transporte de AA por SVCT2-RED en forma cooperativa ($n_H = 1,8 \pm 0,15$; $Na_{50} = 29 \pm 3$ mM), con la velocidad de transporte de AA aumentando en forma sigmoidea como función de la concentración de Na⁺ extracelular, para un aumento máximo de aproximadamente 14 veces (Figura 6 E). Así, la fusión de la proteína fluorescente roja en el extremo carboxilo-terminal de SVCT2 no alteró las propiedades cinéticas y funcionales del transportador (Godoy y col., 2007).

12.2.3. Quimera GFP-SVCT2.

La quimera GFP-SVCT2 mostró una eficiencia de transfección de alrededor de un 90% en células HEK-293, y análisis por microscopía confocal de cortes ópticos en el plano-z reveló su localización en la zona de la periferia de la célula, consistente con localización a nivel de la membrana plasmática (Figura 7 B). Esto fue confirmado en estudios de colocalización con el marcador de membrana plasmática GLUT1-RED, estudios que revelaron una colocalización total de la fluorescencia de GFP-SVCT2 con la de GLUT1-RED, confirmando que GFP-SVCT2 se localiza a nivel de la membrana plasmática en las células HEK-293 transfectadas (Figura 7 A). Ensayos de inmunoblot con anti-GFP reveló la presencia de tres bandas heterogéneas en un rango de peso molecular desde 90 a 130 KDa aproximadamente en células HEK-293 expresando GFP-SVCT2, sin señal en células control no transfectadas (Figura 7 C). Células expresando GFP-SVCT2 mostraron una velocidad de transporte de AA aproximadamente 10 veces

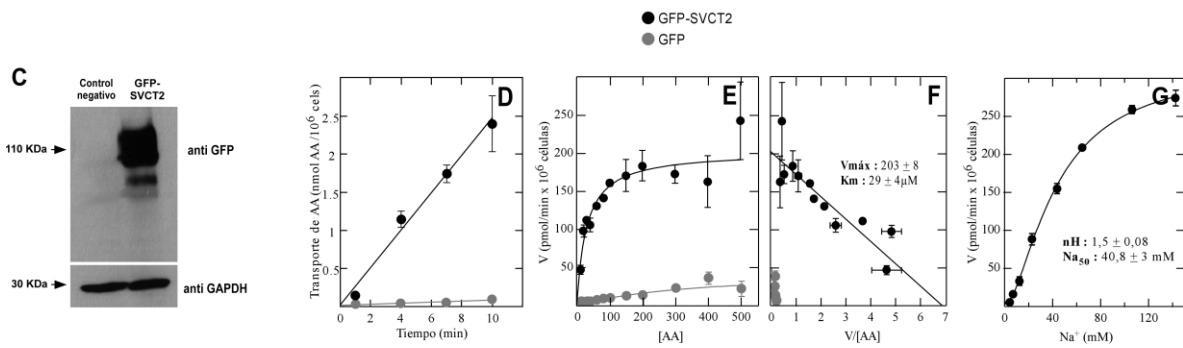
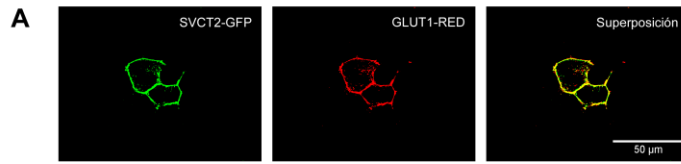


Figura 7. Localización subcelular y análisis funcional de GFP-SVCT2. **A.** Microscopía confocal de células HEK-293 que fueron cotransfectadas con pGFP-SVCT2 y pGLUT1-RED revelaron que el transportador se expresó a nivel de membrana plasmática. La fijación de las células HEK-293 se realizó en PFA al 4%, la imagen obtenida por microscopía confocal en aumento 60X representa un plano medial de la célula. **B.** Microscopía confocal de células HEK-293 transfectadas con pGFP-SVCT2, confirmaron que el transportador se expresó a nivel de membrana plasmática. Las imágenes en aumento de 60X corresponden a cortes ópticos consecutivos obtenidos cada 2 μm en células fijadas en PFA al 4%. **C.** Evaluación de la expresión transiente de GFP-SVCT2 en las células HEK-293 mediante inmunodetección (Western Blot) con un anticuerpo primario dirigido contra GFP. Como control negativo se utilizaron células no transfectadas. El ensayo se realizó con 10 μg proteínas totales sembradas en un gel SDS-PAGE al 10%. **D.** Curva de transporte de AA en el tiempo realizado en células HEK-293 que expresan transientemente GFP-SVCT2 (círculos negros) o GFP (círculos grises). El ensayo se realizó a 100 μM de AA de 0 a 10 minutos a 37°C. **E, F.** Determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA mediado por GFP-SVCT2 (círculos negros) expresado transientemente en células HEK-293 o SVCT2 endógeno expresado en células HEK-293 transfectadas con pEGFP-N1 (círculos grises), se utilizó un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 μM en un ensayo de transporte de 5 min a 37°C. **G.** Efecto de distintas concentraciones de sodio sobre el transporte de AA realizado en células HEK-293 que expresan transientemente GFP-SVCT2 (círculos negros), el ensayo se realizó a 100 μM de AA por 5 minutos a 37°C. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección.



mayor que en células expresando GFP (250 y 24 pmoles/minx10⁶ células, respectivamente) (Figura 7 D).

La curva de velocidad de transporte versus concentración de AA fue hiperbólica y se aproximó a saturación a concentraciones de AA superiores a 100 μ M (Figura 7 E), y la linealización de Eadie-Hofstee generó una línea recta consistente con un único componente cinético con una K_m y $V_{m\acute{a}x}$ aparente de transporte de $29 \pm 4 \mu$ M y 203 ± 8 pmoles/minutox10⁶ células, respectivamente (Figura 7 F). El Na⁺ extracelular activó cooperativamente el transporte de AA, con un n_H de $1,5 \pm 0,08$ y un Na_{50} de 41 ± 3 mM (Figura 7 G). Así, la quimera GFP-SVCT2 conservó las propiedades cinéticas y funcionales del transportador SVCT2 (Godoy y col., 2007).

12.2.4. Quimera SVCT2-Flag-His.

La quimera SVCT2-Flag-His corresponde a la secuencia codificando el transportador SVCT2 fusionado a 3 epítopes Flag seguidos por 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal del transportador, secuencia que codifica para una extensión total de 31 aminoácidos.

Ensayos de inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-Flag mostraron una eficiencia de transfección de alrededor del 90% en células HEK-293, y análisis por microscopía confocal de la inmunoreactividad anti-Flag en cortes ópticos en el plano-z en células HEK-293 transfectadas, reveló que la proteína SVCT2-Flag-His se localiza en la zona de la periferia de las células, una observación consistente

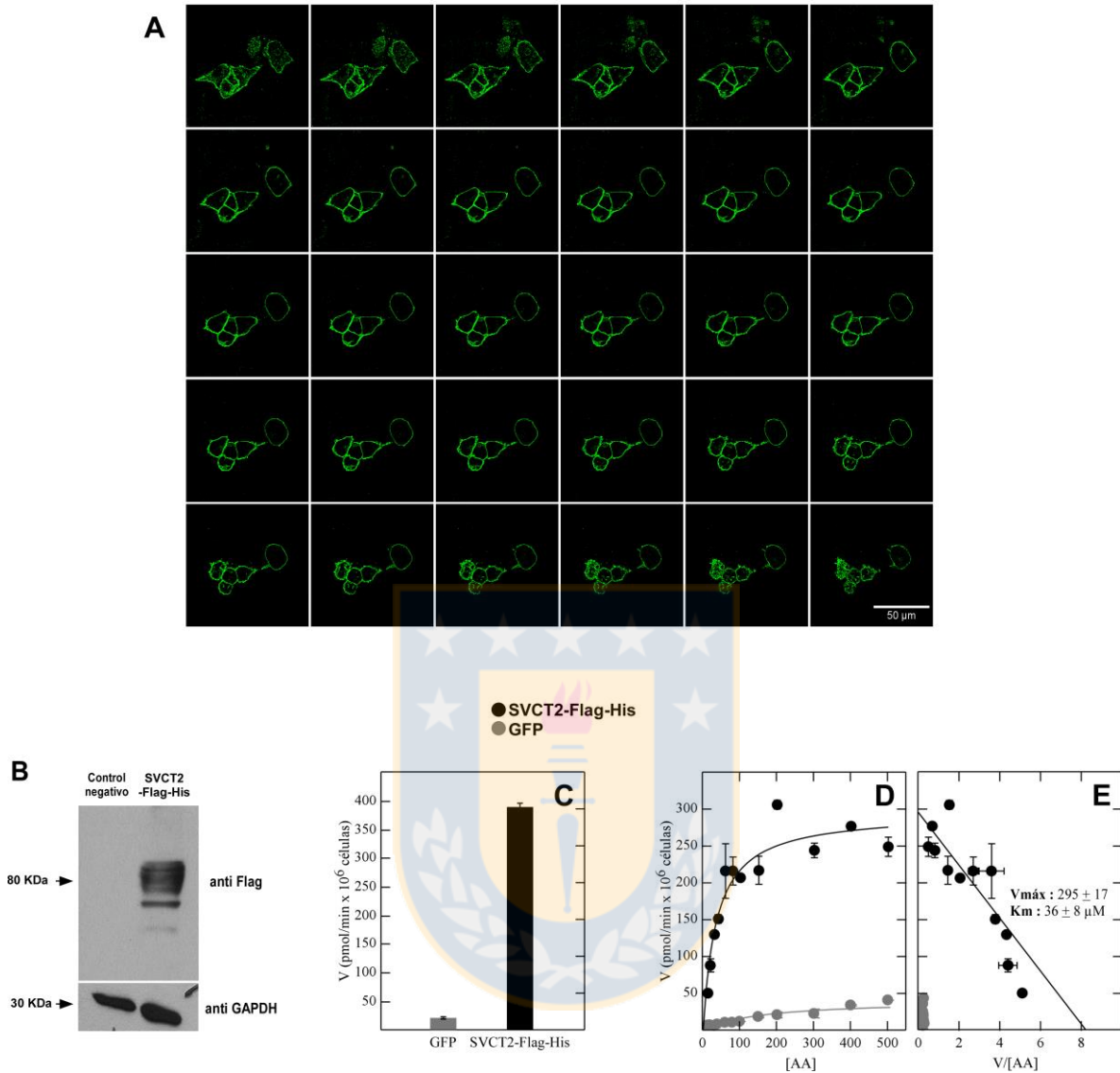


Figura 8. Localización subcelular y análisis funcional de SVCT2-Flag-His. **A.** Ensayos de Inmunocitoquímica de células HEK-293 transfectadas con pSVCT2-Flag-His, revelaron que la proteína se expresó a nivel de membrana plasmática. Para la detección de la quimera se utilizó un anticuerpo primario dirigido contra Flag en células fijadas con PFA al 4%. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal en aumento de 60X corresponden a cortes ópticos consecutivos obtenidos cada 2 μm . **B.** Evaluación de la expresión transiente de SVCT2-Flag-His en las células HEK-293 mediante inmunodetección (Western Blot) con un anticuerpo primario anti-Flag. El ensayo se realizó con 10 μg proteínas totales sembradas en un gel SDS-PAGE al 10% y como control negativo se usaron células no transfectadas. **C.** Ensayo de captación de AA realizado en células HEK-293 que expresan transientemente SVCT2-Flag-His (barras negras) o GFP (barras grises). Se utilizó 100 μM AA en un ensayo de transporte de 5 min a 37° C. **D, E.** Determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA mediado por SVCT2-Flag-His (círculos negros) expresado transientemente en células HEK-293 o SVCT2 endógeno expresado en células HEK-293 transfectadas con pEGFP-N1 (círculos grises), se utilizó un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 μM en un ensayo de transporte de 5 min a 37° C.

con su localización a nivel de la membrana plasmática (Figura 8 A). Análisis por inmunoblot reveló la presencia de un grupo de bandas heterogéneas en el rango de 70 a 85 KDa reactivas con anti-Flag en células HEK-293 transfectadas expresando SVCT2-Flag-His, sin material inmunoreactivo en células control sin transfectadas (Figura 8 B).

Células HEK-293 que expresan SVCT2-Flag-His transportaron AA a una velocidad 19 veces mayor que células control expresando GFP (388 y 20 pmoles/minutox10⁶ células, respectivamente) (Figura 8 C). La curva de velocidad de transporte versus concentración de AA fue hiperbólica y se aproxima a saturación a concentraciones de AA > 100 μ M (Figura 8 D), y el análisis de Eadie-Hofstee reveló un único componente cinético con una K_m y una V_{máx} aparente de transporte de AA de 36 \pm 8 μ M y 295 \pm 17 pmoles/minutox10⁶ células, respectivamente, en células HEK-293 expresando SVCT2-Flag-His (Figura 8 E). Por lo tanto, la quimera SVCT2-Flag-His conservó las propiedades cinéticas de SVCT2 (Godoy y col, 2007).

12.2.5. Quimera SVCT2-HA.

La quimera SVCT2-HA corresponde al transportador SVCT2 con un epítipo HA fusionado en el extremo carboxilo terminal. HA es un epítipo pequeño constituido por sólo 9 aminoácidos, a diferencia de los epítopes GFP y RED constituidos por aproximadamente 230 aminoácidos.

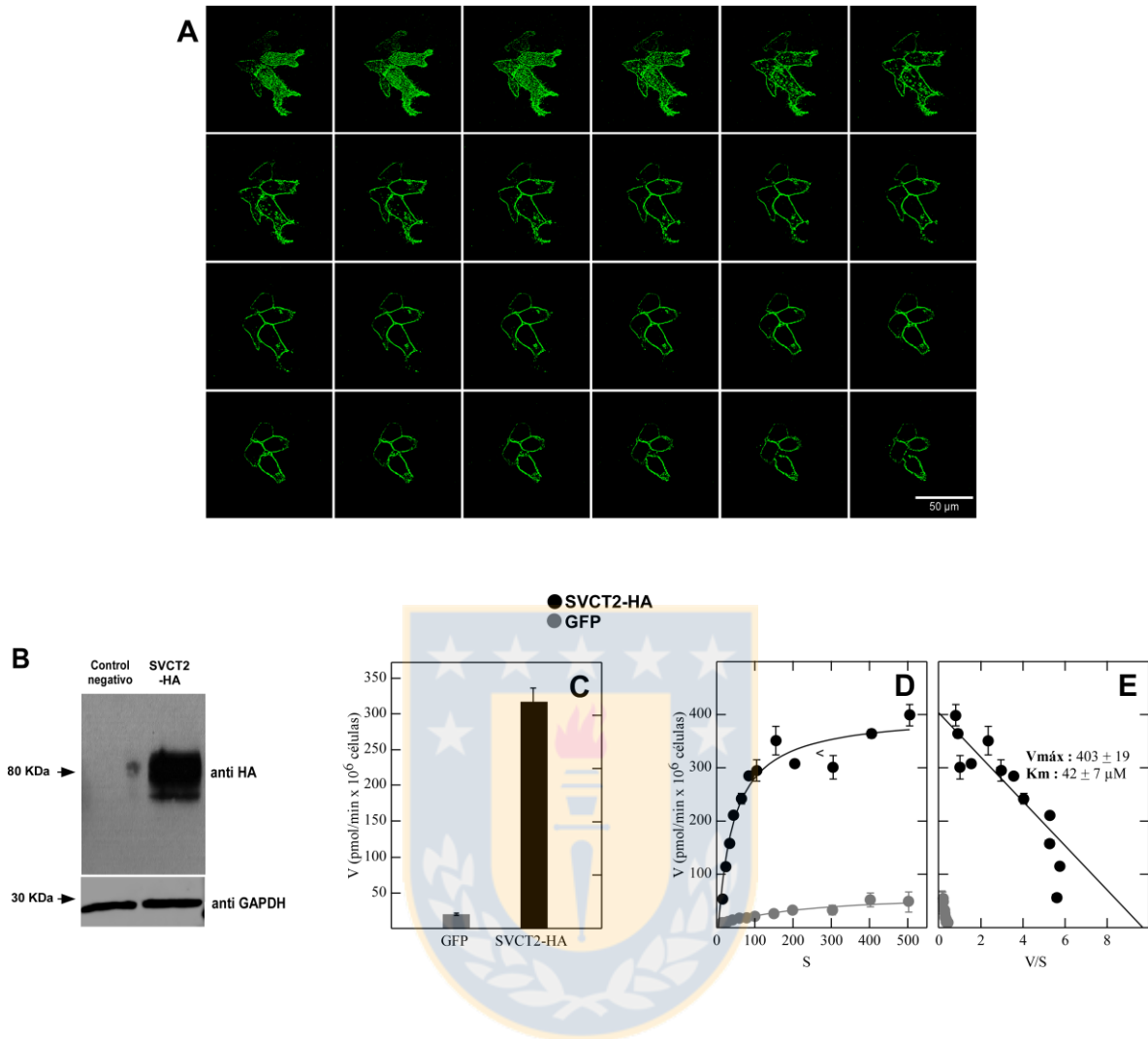


Figura 9. Localización subcelular y análisis funcional de SVCT2-HA. **A.** Inmunocitoquímica de células HEK-293 transfectadas con pSVCT2-HA, revelaron que la proteína se expresó a nivel de membrana plasmática. Para la detección de la quimera se utilizó un anticuerpo primario anti-HA en células fijadas con PFA al 4%. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal en aumento 60X corresponden a cortes ópticos consecutivos obtenidos cada 2 μm. **B.** Evaluación de la expresión transiente de SVCT2-HA en las células HEK-293 mediante inmunodetección (Western Blot) con un anticuerpo primario anti-Flag. El ensayo se realizó con 10 μg proteínas totales sembradas en un gel SDS-PAGE al 10% y como control negativo se usaron células no transfectadas. **C.** Ensayo de captación de AA realizado en células HEK-293 que expresan transientemente SVCT2-HA (barras negras) o GFP (barras grises). Se utilizó 100 μM AA en un ensayo de transporte de 5 minutos a 37° C. **D, E.** Determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA mediado por SVCT2-Flag-His (círculos negros) expresado transientemente en células HEK-293 o SVCT2 endógeno expresado en células HEK-293 transfectadas con pEGFP-N1 (círculos grises), se utilizó un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 μM en un ensayo de transporte de 5 min a 37° C.

Análisis de inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-HA mostraron una eficiencia de transfección de alrededor de un 90% del transportador SVCT2-HA en células HEK-293, y el análisis por microscopía confocal de cortes ópticos en el plano-z revelaron que la proteína se localiza consistentemente en la zona de la periferia de la célula, lo que es compatible con su localización a nivel de la membrana plasmática (Figura 9 A). Análisis por inmunobloting reveló la presencia de una amplia banda de proteína inmunoreactiva con anti-HA de entre 70-85 KDa en células HEK-293 expresando SVCT2-HA, banda que fue ausente en células expresando GFP (Figura 9 B).

Células HEK-293 expresando SVCT2-HA transportaron AA a una velocidad 15 veces mayor que células control expresando GFP (316 y 21 pmoles/minutox10⁶ células, respectivamente) (Figura 9 C). La curva de velocidad de transporte versus concentración de sustrato fue sigmoidea y se aproxima a saturación a concentraciones de AA > 100 μM (Figura 9 D), y el análisis de Eadie-Hofstee reveló un único componente cinético con una K_m y V_{máx} de transporte aparente de 42 ± 7 μM y 403 ± 19 pmoles/minutox10⁶ células, respectivamente (Figura 9 E). Así, la quimera SVCT2-HA conservó las propiedades cinéticas reportadas para SVCT2 (Godoy y col., 2007).

En resumen, los resultados descritos en las 5 subsecciones anteriores nos permiten concluir que la fusión con los epítopes GFP, RED, Flag-His o HA, independientemente de que esto ocurra a nivel del amino o del carboxilo terminal de SVCT2, no alteraron las propiedades cinéticas y funcionales de SVCT2 (Tabla II). En primer lugar, todas las proteínas de fusión conteniendo SVCT2 se

localizaron en forma prácticamente exclusiva a nivel de la membrana plasmática. Segundo, todas las quimeras retuvieron su capacidad para transportar AA a velocidades similares a SVCT2 nativo. En tercer lugar, tanto la K_m como la $V_{m\acute{a}x}$ aparente de transporte de AA de las quimeras fueron similares a las descritas para SVCT2 nativo. Más aún, el efecto activador cooperativo del Na^+ extracelular sobre el transporte de AA fue conservado en las diferentes quimeras, con valores de n_H y Na^+_{50} muy similares a lo descrito para SVCT2 nativo (Godoy y col., 2007). Debido a lo anterior, durante el desarrollo de la presente tesis fue posible utilizar las distintas quimeras en los estudios cinéticos, de localización subcelular y de análisis de la posible estructura cuaternaria de SVCT2.



Tabla II: Propiedades cinéticas determinadas para las quimeras de SVCT2.

Constructo	Captación (nmoles/min/10 ⁶ céls)	K _m (μM)	V _{máx} (pmoles/minx10 ⁶ céls)	n _H	Na ₅₀ (mM)
SVCT2-GFP	0,30	46 ± 1	304 ± 1	2,1 ± 0,2	46 ± 4
SVCT2-RED	0,36	27 ± 5	320 ± 15	1,8 ± 0,15	29 ± 3
GFP-SVCT2	0,25	29 ± 4	203 ± 8	1,5 ± 0,08	41 ± 3
SVCT2-Flag-His	0,38	36 ± 8	295 ± 17	N.D	N.D
SVCT2-HA	0,31	42 ± 7	403 ± 19	N.D	N.D

(a) Los valores expresados en esta tabla corresponden a la determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA mediado por las quimeras de SVCT2 expresadas transientemente en células HEK-293. Todos los ensayos se realizaron en triplicado.

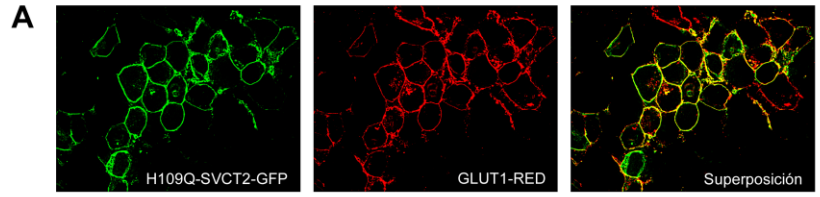
(b) N.D corresponde a las constantes cinéticas que no fueron determinadas.

Además de lo anterior, para examinar el efecto de la oligomerización sobre las características funcionales de SVCT2 se generaron tres mutantes puntuales de SVCT2, las cuales se caracterizan por la alteración de las propiedades cinéticas del transportador, los residuos de aminoácidos mutados fueron H109, C113 y C160. A partir de ensayos de transporte junto a análisis bioinformáticos realizados en nuestro laboratorio proponemos que H109 forma parte del sitio de unión a AA, por otro lado, a partir de ensayos de transporte de AA junto al uso de agentes alquilantes específicos de cisteínas y el uso de DTT, proponemos que las cisteínas las 113 y 160 son dos residuos que participan en cambios conformacionales importantes durante el ciclo de transporte de AA/Na⁺ pero que no forman parte del sitio de unión a sustrato (esto se describirá en detalle durante el transcurso de la discusión). Las proteínas mutantes de SVCT2 generadas pueden ser clasificadas en 2 tipos: i) Mutantes tipo I (H109Q); el transportador se localizó a nivel de la membrana plasmática pero fue inactivo, es decir, perdió su capacidad para transportar AA y ii) Mutantes tipo II (C113S y C160S); el transportador se localizó a nivel de la membrana plasmática y mostró marcados cambios en la K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de transporte de AA.

12.2.6. Mutante H109Q(SVCT2-GFP).

Análisis por microscopía confocal de planos ópticos a lo largo del eje-z de células HEK-293 expresando la mutante H109Q mostraron que la fluorescencia estaba limitada a la periferia de las células, consistente con la localización de la mutante a nivel de membrana plasmática (Figura 10 B). Esto fue confirmado en

estudios de colocalización con GLUT1, los que revelaron que las señales fluorescentes para H109Q(SVCT2-GFP) y GLUT1-RED se superponen a nivel de la periferia de la célula, una clara indicación de la localización de la mutante H109Q a nivel de la membrana plasmática de las células HEK-293 (Figura 10 A). Sin embargo, los ensayos de transporte en condiciones de velocidad inicial revelaron que las células HEK-293 expresando la mutante H109Q mostraron una velocidad de transporte de AA similar a la de células control expresando GFP, velocidad que en ambos casos fue aproximadamente 10 veces menor a la de células expresando SVCT2-GFP (Figura 10 C y D). Esto fue observado al realizar los ensayos de transporte utilizando dos concentraciones diferentes de AA, 100 y 500 μM . Las velocidades de transporte de AA de las células expresando la mutante H109Q fueron 0,01 y 0,03 $\text{nmoles}/\text{minuto} \times 10^6$ células a concentraciones de AA de 100 y 500 μM , respectivamente, comparadas con valores respectivos de 0,01 y 0,02 para las células expresando GFP y de 0,04 y 0,12 para las células expresando SVCT2-GFP. Concluimos que la mutante H109Q es expresada eficientemente en las células HEK-293 transfectadas y se localiza adecuadamente a nivel de la membrana plasmática, pero carece de la capacidad para transportar AA. Concluimos que el transportador SVCT2 conteniendo la mutación H109Q en el segundo dominio transmembrana es un transportador inactivo que ha perdido la capacidad para transportar AA.



● H109Q-SVCT2-GFP
● SVCT2-GFP
● GFP

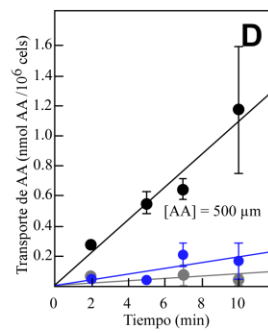
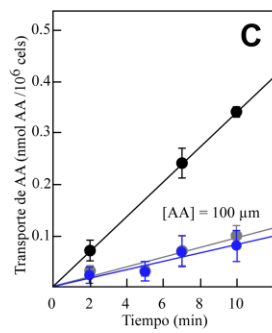


Figura 10. La mutación individual del residuo H109 en SVCT2 no afectó su localización subcelular pero sí su capacidad de transporte de AA. A. Microscopía confocal de células HEK-293 que fueron cotransfectadas con pH109Q-SVCT2-GFP y pGLUT1-RED, revelaron que el transportador se expresó a nivel de membrana plasmática. La fijación de las células HEK-293 se realizó en PFA al 4%, las imágenes obtenidas por microscopía confocal en aumento 60X representa un plano medial de la célula. **B.** Microscopía confocal de células HEK-293 transfectadas con pH109Q-SVCT2-GFP, confirmó que la proteína mutante se expresó a nivel de membrana plasmática. Las imágenes en aumento de 60X corresponden a cortes ópticos consecutivos obtenidos cada 2 μm en células fijadas en PFA al 4%. **C, D.** Curva de transporte de AA en el tiempo realizado en células HEK-293 que expresan transientemente H109Q-SVCT2-GFP (círculos azules), SVCT2-GFP (círculos negros) o GFP (círculos grises), revelaron que la mutante fue incapaz de transportar AA. los ensayos se realizaron a 100 μM (C) o 500 μM (D) de AA de 0 a 10 minutos a 37°C y 48 hrs. post-transfección.



12.2.7. Mutante C113S(SVCT2-GFP).

El análisis por microscopía confocal de planos ópticos a lo largo del eje-z en células HEK-293 expresando la proteína mutante C113S(SVCT2-GFP) reveló que la fluorescencia estaba asociada a la periferia de las células, con nula fluorescencia a nivel intracelular, lo que es consistente con localización a nivel de la membrana plasmática (Figura 11 B). Esto fue confirmado en ensayos de colocalización con el marcador de membrana plasmática GLUT1-RED, los que revelaron colocalización de la señal fluorescente asociada a la mutante C113S(SVCT2-GFP) con la fluorescencia de GLUT1-RED en la membrana plasmática (Figura 11 A).

Análisis de la cinética temporal de transporte de AA reveló que las células HEK-293 expresando la proteína mutante C113S(SVCT2-GFP) transportaron AA a una velocidad que fue aproximadamente 30% menor que células controles expresando SVCT2-GFP (0,21 y 0,34 nmoles/minutox10⁶células, respectivamente), y aproximadamente 7 veces mayor que la velocidad de transporte de células expresando GFP (0,03 nmoles/minutox10⁶células) (Figura 11 C). Por otro lado, la curva de velocidad de transporte versus concentración de sustrato en células expresando la mutante C113S(SVCT2-GFP) mostró una forma hiperbólica en la que la velocidad de transporte aún no llega a saturación a concentraciones de AA de 500 μ M, concentración a la cual la velocidad de transporte fue al menos 2 veces superior a la velocidad de células control expresando SVCT2-GFP, en las cuales además se observa claramente que se llega a saturación a 200 μ M AA, indicando posibles cambios tanto a nivel de la K_m

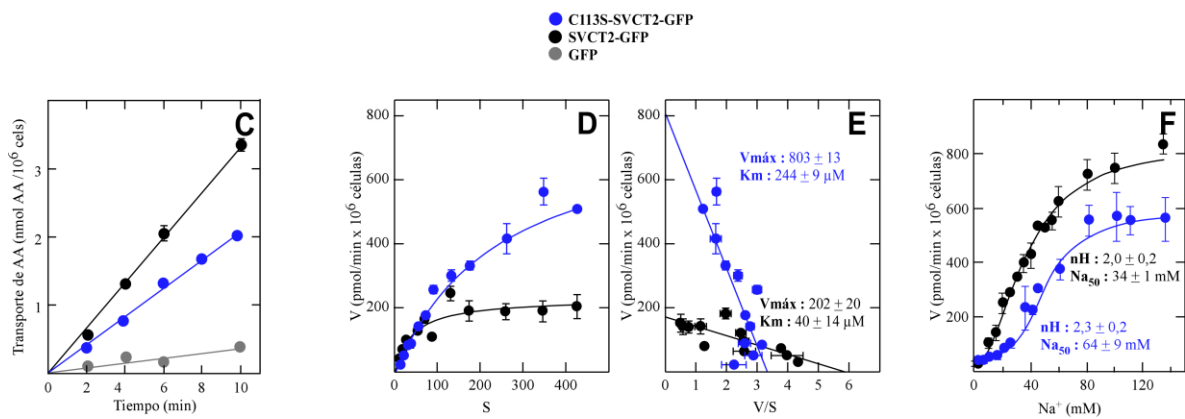
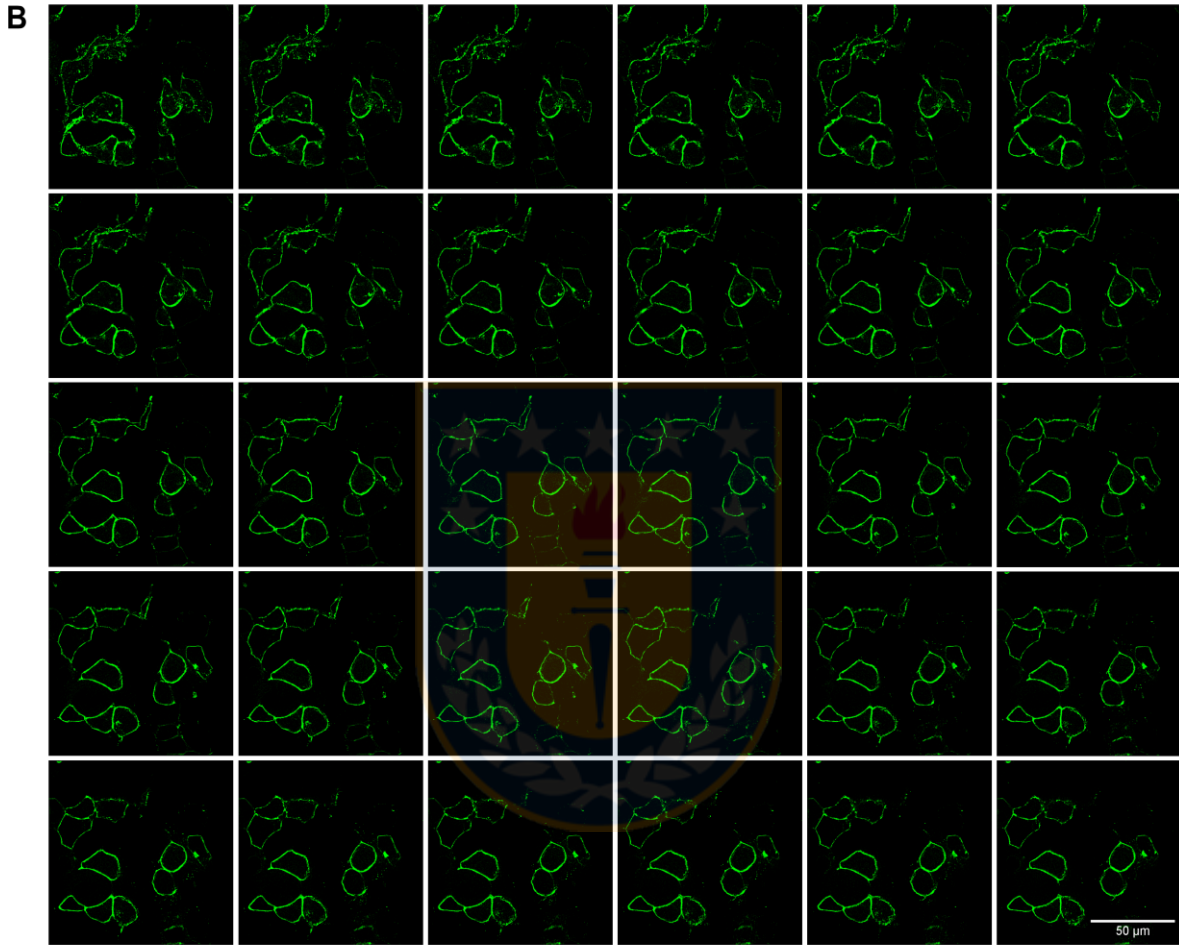
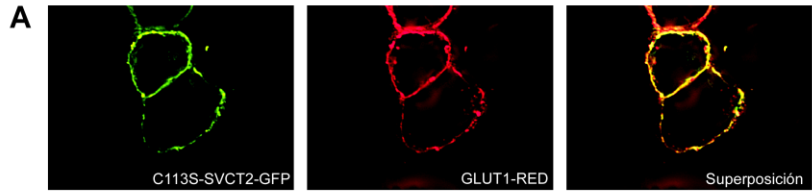


Figura 11. La mutación individual del residuo C113 en SVCT2 no afectó su localización subcelular pero sí su capacidad de transporte de AA y sus constantes cinéticas. A. Microscopía confocal de células HEK-293 que fueron cotransfectadas con pC113S-SVCT2-GFP y pGLUT1-RED, revelaron que el transportador se expresó a nivel de membrana plasmática. La fijación de las células HEK-293 se realizó en PFA al 4%, las imágenes obtenidas por microscopía confocal en aumento 60X representan un plano medial de la célula. **B.** Microscopía confocal de células HEK-293 transfectadas con pC113S-SVCT2-GFP, confirmó que la proteína mutante se expresó a nivel de membrana plasmática. Las imágenes en aumento de 60X corresponden a cortes ópticos consecutivos obtenidos cada 2 μm en células fijadas en PFA al 4%. **C.** Curva de transporte de AA en el tiempo realizado en células HEK-293 que expresan transientemente C113S-SVCT2-GFP (círculos azules), SVCT2-GFP (círculos negros) o GFP (círculos grises). El ensayo se realizó a 50 μM de AA de 0 a 10 minutos a 37°C. **D, E.** Determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA mediado por C113S-SVCT2-GFP (círculos azules) o SVCT2-GFP (círculos negros) expresados transientemente en células HEK-293, se utilizó un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 μM en un ensayo de transporte de 5 minutos a 37°C. **F.** Efecto de distintas concentraciones de sodio sobre el transporte de AA realizado en células HEK-293 que expresan transientemente C113S-SVCT2-GFP (círculos azules) o SVCT2-GFP (círculos negros), el ensayo se realizó a 100 μM de AA por 5 min a 37°C. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección.



como de la $V_{m\acute{a}x}$ de transporte en el caso de la mutante C113S(SVCT2-GFP) (Figura 11 D). Confirmando lo anterior, el análisis de Eadie-Hofstee de los datos de transporte de AA en células expresando la mutante C113S(SVCT2-GFP) reveló un único componente cinético asociado al transporte de AA, con una K_m aparente de transporte de AA de $244 \pm 9 \mu\text{M}$ y una $V_{m\acute{a}x}$ aparente de $803 \pm 13 \text{ pmoles/minuto} \times 10^6 \text{ células}$ (Figura 11 E). En células controles expresando SVCT2-GFP, los respectivos valores fueron $40 \pm 14 \mu\text{M}$ y $202 \pm \text{ pmoles/minuto} \times 10^6 \text{ células}$. Por otro lado, el Na^+ extracelular activó el transporte de AA mediado por la mutante C113S-SVCT2-GFP en forma cooperativa, con un n_H de $2,3 \pm 0,2$ y un Na_{50^+} de $64 \pm 9 \text{ mM}$ similar a lo observado para SVCT2-GFP (Figura 11 F).

En resumen, la introducción de la mutación C113S en el dominio transmembrana dos de SVCT2 genera una proteína mutante con propiedades cinéticas alteradas, con un aumento de aproximadamente 6 veces en el valor de la K_m aparente de transporte de AA y de 4 veces en la $V_{m\acute{a}x}$, sin afectar el efecto cooperativo del Na^+ .

12.2.8. Mutante C160S(SVCT2-GFP).

El análisis por microscopía confocal de planos ópticos a lo largo del eje-z en células HEK-293 expresando la proteína mutante C160(SVCT2-GFP) reveló que la fluorescencia estaba consistentemente asociada a la periferia de las células, con nula fluorescencia a nivel intracelular, lo que es consistente con localización a nivel de la membrana plasmática (Figura 12 B). Esto fue confirmado en ensayos

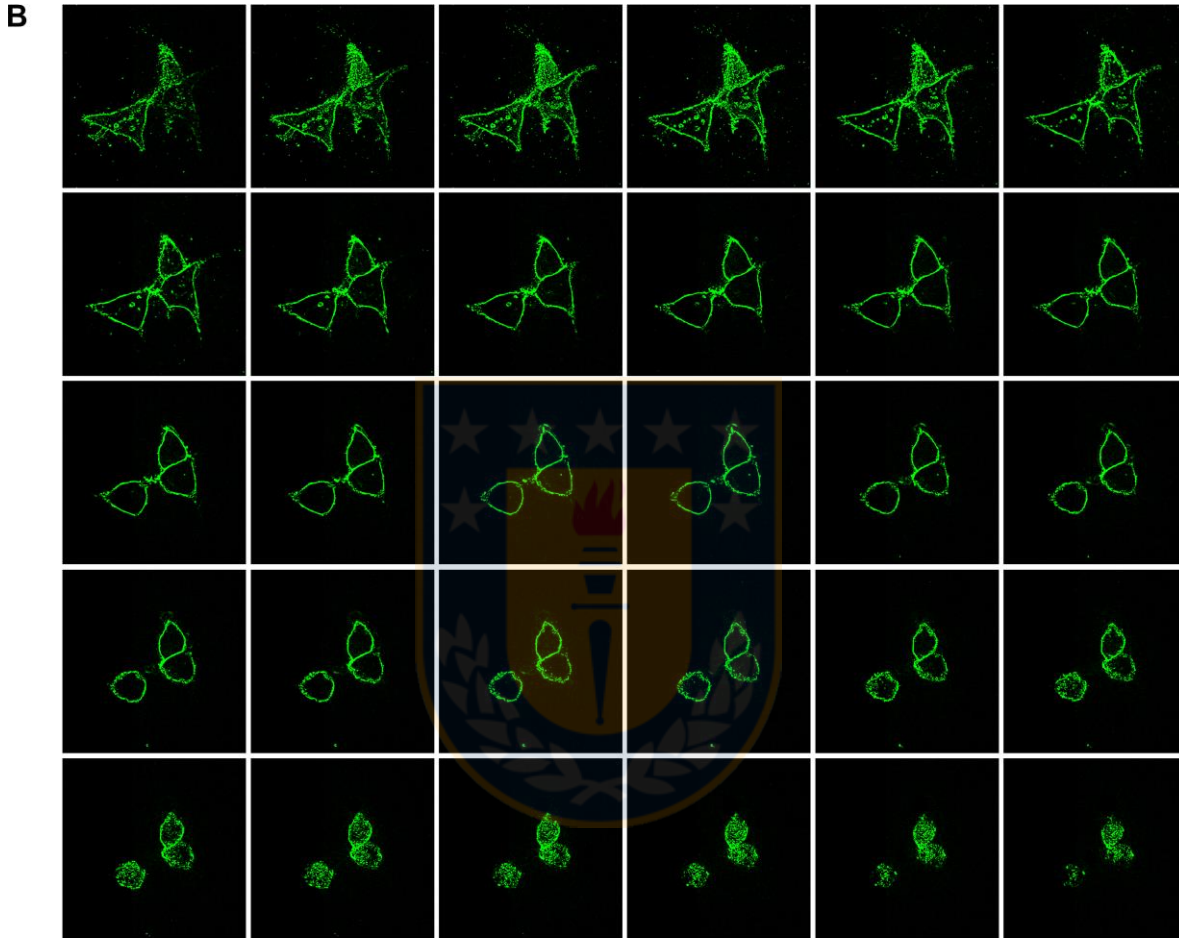
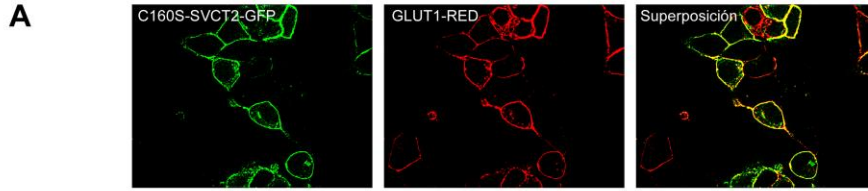
de colocalización con el marcador de membrana plasmática GLUT1-RED, los que revelaron colocalización de la señal fluorescente asociada a la mutante C160S(SVCT2-GFP) con la fluorescencia de GLUT1-RED en la membrana plasmática (Figura 12 A).

Las células HEK-293 expresando la proteína mutante C160S(SVCT2-GFP) transportaron AA a una velocidad similar a la de células control expresando SVCT2-GFP (0,38 y 0,34 nmoles/minutox10⁶ células, respectivamente) y aproximadamente 11 veces mayor que la velocidad de transporte de células expresando GFP (0,03 nmoles/minutox10⁶ células) (Figura 12 C). La curva de velocidad de transporte versus concentración de sustrato en células expresando la mutante C160S(SVCT2-GFP) mostró una forma hiperbólica en la que la velocidad de transporte aún no llega a saturación a concentraciones de AA de 500 μ M, concentración a la cual la velocidad de transporte fue al menos 2 veces superior a la velocidad de células control expresando SVCT2-GFP, en las cuales además se observa que se llega a saturación a 200 μ M AA, indicando posibles cambios tanto a nivel de la K_m como de la $V_{m\acute{a}x}$ de transporte en el caso de la mutante C160S(SVCT2-GFP) (Figura 12 D). Confirmando lo anterior, el análisis de Eadie-Hofstee reveló un único componente cinético asociado al transporte de AA en células expresando la mutante C160S(SVCT2-GFP), con una K_m aparente de transporte de AA de $143 \pm 22 \mu\text{M}$ y una $V_{m\acute{a}x}$ aparente de 762 ± 49 pmoles/minutox10⁶células (Figura 12 E). En células controles expresando SVCT2-GFP, los respectivos valores fueron $40 \pm 4 \mu\text{M}$ y 299 ± 10 pmoles/minutox10⁶ células. Por otro lado, el Na⁺ extracelular activó el transporte mediado por la

mutante C160S(SVCT2-GFP) en forma cooperativa, con un n_H de $2,1 \pm 0,5$ y un Na_{50}^+ de 41 ± 2 mM, similar a lo observado para SVCT2-GFP (Figura 12 F).

En resumen, la introducción de la mutación C160S en un lazo endofacial de SVCT2 genera una proteína mutante con propiedades cinéticas alteradas, con un aumento de 3-4 veces en el valor de la K_m y $V_{m\acute{a}x}$ aparente de transporte de AA, sin afectar el efecto cooperativo del Na^+ .





● C160S-SVCT2-GFP
● SVCT2-GFP
● GFP

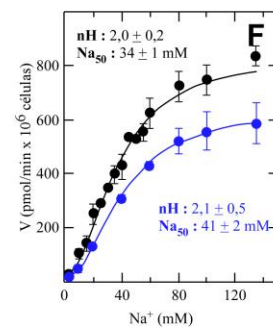
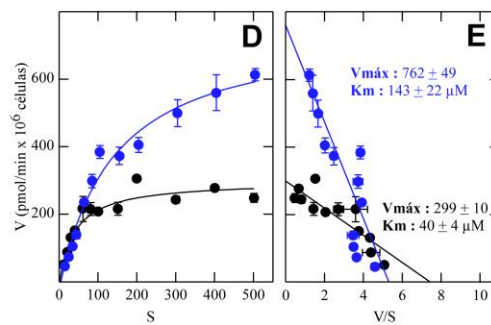
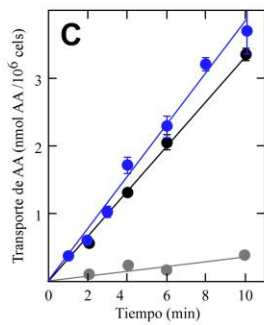


Figura 12. La mutación individual del residuo C160 en SVCT2 no afectó su localización subcelular pero si las propiedades cinéticas asociadas al transporte de AA. **A.** Microscopía confocal de células HEK-293 que fueron cotransfectadas con pC160S-SVCT2-GFP y pGLUT1-RED, revelaron que el transportador se expresó a nivel de membrana plasmática. La fijación de las células HEK-293 se realizó en PFA al 4%, las imágenes obtenidas por microscopía confocal en aumento 60X representan un plano medial de la célula. **B.** Microscopía confocal de células HEK-293 transfectadas con pC160S-SVCT2-GFP, confirmó que la proteína mutante se expresó a nivel de membrana plasmática. Las imágenes en aumento de 60X corresponden a cortes ópticos consecutivos obtenidos cada 2 μm en células fijadas en PFA al 4%. **C.** Curva de transporte de AA en el tiempo realizado en células HEK-293 que expresan transientemente C160S-SVCT2-GFP (círculos azules), SVCT2-GFP (círculos negros) o GFP (círculos grises). El ensayo se realizó a 50 μM de AA entre 0 a 10 min a 37°C. **D, E.** Determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA mediado por C160S-SVCT2-GFP (círculos azules) o SVCT2-GFP (círculos negros) expresados transientemente en células HEK-293, se utilizó un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 μM en un ensayo de transporte de 5 min a 37° C. **F.** Efecto de distintas concentraciones de sodio sobre el transporte de AA realizado en células HEK-293 que expresan transientemente C160S-SVCT2-GFP (círculos azules) o SVCT2-GFP (círculos negros), el ensayo se realizó a 100 μM de AA por 5 minutos a 37°C. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección



12.3. Entrecruzamiento químico con paraformaldehído del transportador SVCT2 endógeno presente en líneas celulares humanas

Los reactivos de entrecruzamiento contienen en sus extremos grupos reactivos para grupos funcionales específicos (aminas primarias, sulfidrilos, etc) en proteínas u otras moléculas. Es debido a la disponibilidad de diferentes grupos químicos de elevada reactividad que las proteínas y péptidos pueden ser blanco de estas reacciones y ser estudiados utilizando diferentes tipos de agentes entrecruzantes. El paraformaldehído (PFA) es la forma polimerizada del formaldehído por lo que no se conoce su longitud de entrecruzamiento; sin embargo, este reactivo reacciona con el grupo amino de la lisina a través de una reacción amina-formaldehído, por lo que es ampliamente utilizado como un eficiente reactivo de entrecruzamiento de bajo costo y muy simple de manejar.

Como primera aproximación para abordar el estudio de la posible estructura cuaternaria del transportador SVCT2 se realizaron ensayos de entrecruzamiento con PFA en tres líneas celulares humanas que expresan endógenamente SVCT2; la línea celular HEK-293 derivada de riñón embrionario humano (Figura 13 A), la línea celular DU-145 de cáncer de próstata derivada de una metástasis cerebral (Figura 13 B), y la línea celular MCF-7 de cáncer de mama (Figura 13 C). Las tres líneas celulares fueron incubadas con concentraciones crecientes de PFA (0; 0,1; 0,3; 1 y 3%), seguido por homogenización celular y fraccionamiento de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes, transferencia e inmunodetección en membranas con anticuerpo anti-SVCT2. En la figura 13 se observan los ensayos de entrecruzamiento en las tres líneas celulares

ensayadas (HEK-293, DU-145 y MCF-7) a diferentes concentraciones de PFA. En contraste a las células incubadas en ausencia de PFA (surco 1 de cada experimento), la presencia del agente entrecruzante indujo la formación de oligómeros de peso molecular creciente. Específicamente, los resultados muestran que en las células control sin tratamiento, el transportador se presentó como monómero, con una masa molecular cercana a 35 KDa, mientras que en células entrecruzadas con 0,1% de PFA se observó una banda adicional de aproximadamente 70 KDa consistente con el tamaño esperado para un dímero de SVCT2. En células tratadas con concentraciones más elevadas de PFA se observó que la banda correspondiente al monómero comenzó a desaparecer, lo que se vio acompañado de la aparición de bandas de peso molecular superior, de aproximadamente 70, 140, 210, 280 y 350 KDa (Figura 13). En principio, estos serían los tamaños estimados para la formación de oligómeros de SVCT2 consistentes en dímeros, tetrámeros, hexámeros, octámeros, etc. de SVCT2 (Figure 13). El análisis densitométrico de las bandas de tamaño creciente confirmó en todos los casos la disminución del monómero a medida que aumenta la concentración de PFA; así, la banda de 35 KDa no está presente en las muestras obtenidas de células tratadas con 3% PFA. La formación de dímeros comienza a observarse a bajas concentraciones de PFA (0,1%), llega a un máximo y luego disminuye a las concentraciones más elevadas de PFA, lo que es consistente con la aparición de las bandas representando los oligómeros de mayor tamaño. La formación de estos oligómeros fue independiente de la línea celular ensayada ya que se obtuvieron resultados similares en las tres líneas celulares utilizadas.

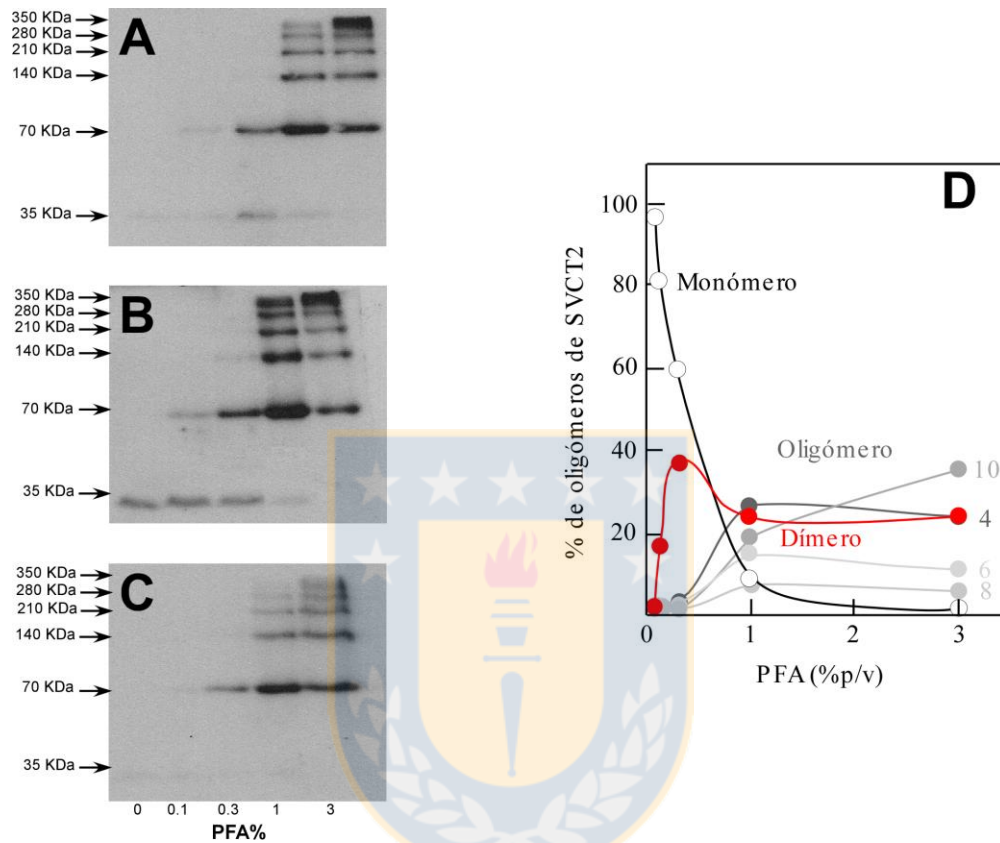


Figura 13. La incubación con paraformaldehído sugiere la presencia de dímeros y la aparición de agregados macromoleculares de SVCT2 en distintas líneas celulares humanas. **A, B, C** Ensayos de entrecruzamiento de SVCT2 en las líneas celulares HEK-293 (A), DU-145 (B) y MCF-7 (C) reveló la presencia de dímeros y agregados de mayor peso molecular del transportador SVCT2. Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de PFA (0-3%) por 5 min a 37 °C y luego lisadas con RIPA. Para el análisis de westerblot se sembraron 70 µg proteínas (lisado total) en un gel SDS-Poliacrilamida al 10%, SVCT2 fue detectado con un anticuerpo específico anti-SVCT2 (S-19 Santa cruz). **D.** Representación gráfica de la cuantificación de la densidad de las bandas de SVCT2 a partir del ensayo de entrecruzamiento acoplado a *Western blot* en la línea celular DU-145.

Como ejemplo, la cuantificación de la densidad de las bandas del experimento realizado en la línea celular DU-145 (Figura 13 D) mostró que en las células sin tratamiento, sobre el 95% de la población de SVCT2 corresponde a la banda de 35 KDa. En células que fueron tratadas con 0.1% de PFA el 81% de SVCT2 corresponde a la banda cercana a 35 KDa, el 16% corresponde a la banda cercana a 70 KDa y el 3% restante se distribuyó entre las bandas de pesos moleculares superiores. En células tratadas con 0.3% de PFA el 59% de SVCT2 corresponde a la banda cercana a 35 KDa, el 37% corresponde a la banda cercana a 70 KDa, el 3% corresponde a la banda cercana a 140 KDa y el 1% restante se distribuyó entre las bandas de pesos moleculares superiores. En células que fueron tratadas con 1% de PFA el 8% de SVCT2 corresponde a la banda cercana a 35 KDa, el 24% corresponde a la banda cercana a 70 KDa, el 27% corresponde a la banda cercana a 140 KDa, el 15% corresponde a la banda cercana a 210 KDa, el 7% corresponde a la banda cercana a 280 KDa y el 19% restante corresponde a la banda cercana a 350 KDa. En células tratadas con 3% de PFA el 24% de SVCT2 corresponde a la banda cercana a 70 KDa, 24% corresponde a la banda cercana a 140 KDa, el 11% corresponde a la banda cercana a 210 KDa, el 6% 280 KDa y el 35% restante corresponde a la banda cercana a 350 KDa. Lo interesante de este análisis es que identifica al dímero como el oligómero clave en el proceso de oligomerización, pues su formación parece ser necesaria para la formación de oligómeros de orden superior que son multímeros del dímero, sin evidencia de la formación, por ejemplo de trímeros u oligómeros de orden superior formados por números impares de SVCT2.

12.4. Entrecruzamiento químico con paraformaldehído de quimeras de SVCT2 expresadas en la línea celular HEK-293.

Una vez que se confirmó que el agente entrecruzante paraformaldehído indujo la formación de oligómeros de SVCT2, acompañado a la desaparición del monómero del transportador a medida que aumentó la concentración del reactivo en forma independiente de la línea celular utilizada, se evaluó si estos resultados eran extrapolables a las quimeras de SVCT2. Para ello se trataron con concentraciones crecientes del agente entrecruzante PFA células HEK-293 expresando en forma transitoria las distintas quimeras de SVCT2. En estudios iniciales de entrecruzamiento encontramos que el transportador SVCT2 endógeno de las células HEK-293 también formaba oligómeros (aparentemente dímeros y tetrámeros) en la presencia de concentraciones crecientes de PFA, muy similar a lo ya observado en las líneas celulares de cáncer. En estos estudios analizamos tres parámetros, la dependencia de la concentración de PFA, la dependencia del tiempo de incubación con PFA y la dependencia de la temperatura de incubación con PFA.

12.4.1. Dependencia de la concentración de paraformaldehído.

Células HEK-293 transfectadas y sobreexpresando en forma transitoria e individual las quimeras SVCT2-GFP (Figura 14 A), SVCT2-Flag-His (Figura 14 B), SVCT2-HA (Figura 14 C) o GFP-SVCT2 (Figura 14 D) fueron incubadas con

concentraciones crecientes de PFA en el rango de 0,01 a 3% (0; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 y 3%) por un período de 5 minutos a 37°C, seguido por homogenización y fraccionamiento por electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE), transferencia e inmunodetección en membranas con anticuerpo específicos para cada quimera (anti-GFP, anti-Flag, anti-HA). En ausencia del agente entrecruzante, las cuatro quimeras estudiadas migraron como una banda de proteína altamente heterogénea que corresponde a la forma monomérica del transportador (debido a las condiciones denaturantes del sistema de separación electroforética). En todos los casos analizados, en presencia de concentraciones crecientes del agente entrecruzante PFA se observó la aparición de una banda heterogénea que migra más lentamente durante la separación electroforética, banda que presenta un tamaño molecular de aproximadamente dos veces el tamaño del monómero y que es consistente con el entrecruzamiento de un dímero del transportador.

Quimera SVCT2-GFP. Ensayos de inmunoblot llevados a cabo luego de separación por SDS-PAGE de homogenizados obtenidos de células HEK-293 expresando la quimera SVCT2-GFP, revelaron que el monómero, observado en células controles sin tratar con PFA, corresponde a una banda heterogénea de proteína conteniendo al menos 4 bandas de proteínas con masas moleculares que van desde aproximadamente 90 a 130 KDa, con el componente cuantitativamente más importante migrando en una amplia banda de proteína centrada en alrededor de 110 KDa (surco 1 Figura 14 A). En células tratadas con 0,1 a 3% PFA se observó la aparición de una banda de proteína de mayor tamaño, de aproximadamente 230 KDa, que podría corresponder a la formación de un dímero

(surcos 4-7 en la Figura 14 A). La fracción de proteína correspondiente a la banda de aproximadamente 230 KDa aumentó claramente en las muestras obtenidas desde células tratadas con 1 y 3% de PFA, condiciones bajo las cuales se observó la aparición de una banda de mayor tamaño que podría corresponder a un tetrámero de SVCT2 (carril 7 en la Figura 14 A).

Quimera SVCT2-Flag-His. En células HEK-293 controles que expresan la quimera SVCT2-Flag-His, el monómero se detectó como una banda heterogénea de proteína compuesta de múltiples sub-bandas en el rango de 60 a 85 KDa (surco 1 en Figura 14 B). En células incubadas con concentraciones de PFA en el rango de 0,01 a 3%, el elemento mayoritario fue la banda heterogénea de proteína de 60-85 KDa (surcos 2-7 en Figura 14 B). Adicionalmente se observó una banda de mayor tamaño, de aproximadamente 170 KDa, en células incubadas con concentraciones de PFA $\geq 0,1\%$, lo que es consistente con el tamaño esperado para un dímero de SVCT2 (Figura 14 B). Aunque se observó que la intensidad de la banda de 170 KDa aumentó a medida que se incrementaron las concentraciones de PFA en el rango de 0,1 a 3%, no se observó una disminución en la intensidad de la banda de 60-85 KDa a ninguna de las concentraciones de PFA ensayadas, probablemente debido a la cantidad muy elevada de proteína utilizada en este ensayo (Figura 14 B).

Quimera SVCT2-HA. En células HEK-293 controles que expresan la quimera SVCT2-HA, el monómero se detectó como una banda heterogénea de proteína compuesta de múltiples sub-bandas en el rango de 60 a 85 KDa (surco 1 en Figura 14 C). En células incubadas con concentraciones de PFA en el rango de 0,01 a 3% se observó como elemento mayoritario la banda heterogénea de

proteína correspondiente al monómero de aproximadamente 60-85 KDa (surcos 2-7 en Figura 14 C). Adicionalmente se observó una banda de mayor tamaño, de aproximadamente 170 KDa, en células tratadas con concentraciones de PFA en el rango de 0,1 a 3% PFA, lo que es consistente con el tamaño esperado para un dímero de SVCT2 (surcos 4-7 en Figura 14 C). La intensidad de la banda de 170 KDa aumentó a medida que se incrementaron las concentraciones PFA, pero no se observó una disminución en la intensidad de la banda de 60-85 KDa a ninguna de las concentraciones de PFA ensayadas, probablemente debido a la cantidad muy elevada de proteína utilizada en este ensayo (Figura 14 C).

Quimera GFP-SVCT2. A diferencia de las anteriores, la quimera GFP-SVCT2 corresponde a una proteína de fusión en la cual la proteína GFP se encuentra fusionada al amino terminal de SVCT2. En células HEK-293 controles que expresan la quimera GFP-SVCT2, el monómero se detectó como una banda heterogénea de proteína compuesta de al menos 3 sub-bandas en el rango de 90 a 130 KDa (surco 1 en Figura 14 D). En células incubadas con concentraciones de PFA en el rango de 0,01 a 0,3% se observó como elemento mayoritario la banda heterogénea de proteína correspondiente al monómero de aproximadamente 90-130 KDa (surcos 2-5 en Figura 14 C). En células tratadas con concentraciones de PFA de 0,3, 1 y 3% se observó una banda de mayor tamaño, de aproximadamente 240 KDa, consistente con el tamaño esperado para un dímero (surcos 6-7 en Figura 14 C). En células que tratadas con las mayores concentraciones de PFA (1 y 3%) se observó que la banda correspondiente al dímero (240 KDa) aumentó en intensidad, lo que se vio acompañado de una disminución en la intensidad de la banda correspondiente al monómero (carriles 6-7 en la Figura 14 C).

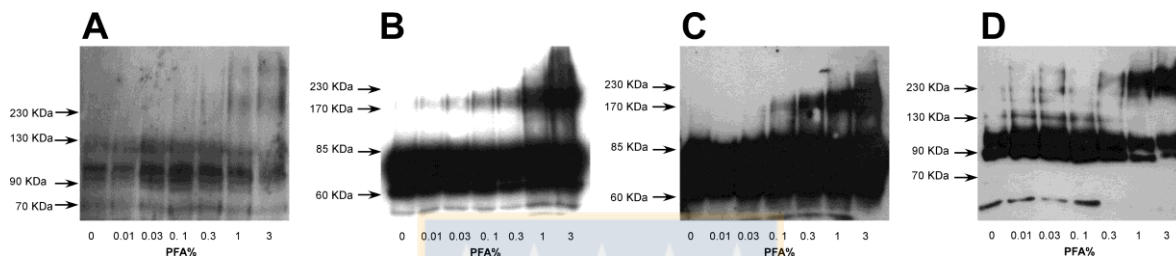


Figura 14. La incubación con paraformaldehído de células HEK-293 que sobreexpresan las quimeras del transportador sugiere la presencia de dímeros de SVCT2. Ensayos de entrecruzamiento con PFA en células HEK-293 que sobreexpresaron SVCT2-GFP (A), SVCT2-Flag-His (B), SVCT2-HA (C) o GFP-SVCT2 (D) reveló la presencia de dímeros del transportador de manera dosis dependiente. 800000 células HEK-293 que sobreexpresan el transportador fueron incubadas con concentraciones crecientes de PFA (0-3%) por 5 min a 37 °C y luego lisadas en RIPA. Para el análisis de westerblot se sembraron 10 µg proteínas (lisado total) en un gel SDS-Poliacrilamida al 7%. SVCT2-GFP y GFP-SVCT2 fueron detectados con anticuerpo anti-GFP (B-2 Santa Cruz), SVCT2-Flag-His con anti-Flag (M2 Sigma-Aldrich), SVCT2-HA con anti-HA (05-904 Millipore).

12.4.2. Dependencia del tiempo de entrecruzamiento con paraformaldehído.

De los experimentos anteriores, seleccionamos el uso de PFA al 3% para la detección consistente y repetitiva de dímeros de SVCT2 para las distintas quimeras de SVCT2 analizadas. En todos los casos, el entrecruzamiento con PFA fue realizado por un período de 5 minutos a 37°C. En la siguiente etapa, procedimos a estudiar la dependencia del tiempo de incubación con el agente entrecruzante, utilizando una concentración fija de PFA al 3% y una temperatura de incubación de 37°C. Brevemente, las células expresando cada una de 3 quimeras, SVCT2-Flag-His, SVCT2-HA o GFP-SVCT2, fueron incubadas con PFA al 3% a 37°C utilizando tiempos de incubación en el rango de 10 segundos a 10 minutos (0; 0,16; 0,5; 1; 2; 5 y 10 minutos). Al finalizar el período de incubación, las células fueron homogenizadas y las proteínas totales fueron separadas por electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE), transferidas a membranas de PDVF y las distintas quimeras fueron identificadas por su inmunoreactividad con anti-Flag, anti-HA o anti-GFP.

Quimera SVCT2-Flag-His. Para esta quimera, el monómero correspondió a una banda heterogénea en el rango de 60-85 KDa, la que estuvo presente a todos los tiempos de incubación (surcos 1-7 en Figura 15 A). A medida que aumentaba el tiempo de incubación se observó la aparición de una banda de mayor tamaño, centrada en un peso molecular de aproximadamente 170 KDa, cuya intensidad aumentó progresivamente con el tiempo de incubación y cuyo tamaño es consistente con un dímero de la quimera SVCT2-Flag-His (surcos 2-7 en Figura 15 A). La banda de 170 KDa es evidente tan temprano como a los 10 segundos de

incubación, y a los 10 minutos se cuenta de al menos un tercio de la intensidad de la banda centrada en 170 KDa (surco 7 en Figura 15 A).

Quimera SVCT2-HA. Para esta quimera, el monómero correspondió a una banda heterogénea en el rango de 60-85 KDa, la que estuvo presente a todos los tiempos de incubación (surcos 1-7 en Figura 15 B). A medida que aumentaba el tiempo de incubación se observó la aparición de una banda de mayor tamaño, centrada en un peso molecular de aproximadamente 170 KDa, cuya intensidad aumentó progresivamente con el tiempo de incubación y cuyo tamaño es consistente con la formación de un dímero de la quimera SVCT2-HA (surcos 2-7 en Figura 15 B). La banda de 170 KDa se observa ya a los 10 segundos de incubación, y a los 10 minutos se cuenta de al menos un tercio de la intensidad de la banda centrada en 170 KDa que a su vez muestra un aumento en intensidad respecto del tiempo cero (surcos 1 y 7 en Figura 15 B).

Quimera GFP-SVCT2. Para esta quimera, el monómero correspondió a una banda heterogénea en el rango de 90-130 KDa, la que estuvo presente a todos los tiempos de incubación (carriles 1-7 en Figura 15 C). A medida que aumentaba el tiempo de incubación se observó la aparición de una banda de mayor tamaño, centrada en un peso molecular de aproximadamente 240 KDa, cuya intensidad aumentó progresivamente con el tiempo de incubación y cuyo tamaño es consistente con la formación de un dímero de la quimera GFP-SVCT2 (surcos 2-7 en Figura 15 C). La banda de 240 KDa se observa ya a los 10 segundos de incubación, y a los 10 minutos es al menos tan intensa como la banda de 90-130 KDa que a su vez muestra una disminución en intensidad de al menos un 50% respecto del tiempo cero (surcos 1 y 7 en Figura 15 C).

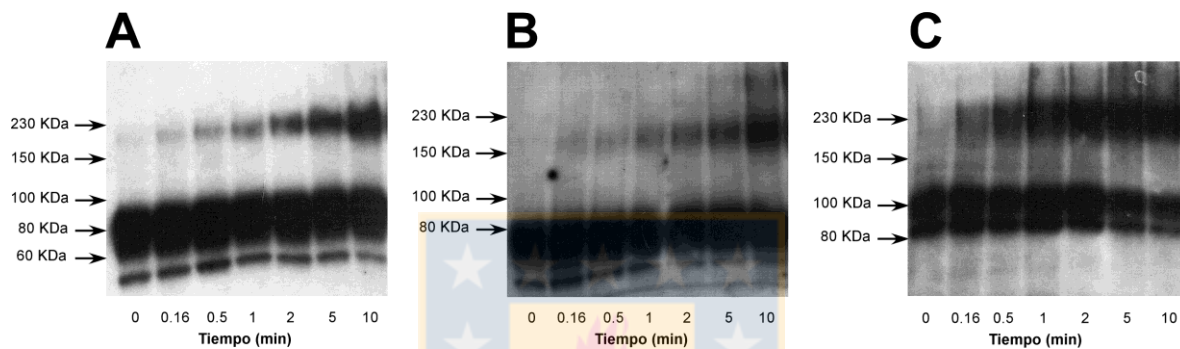


Figura 15. La presencia de dímeros de SVCT2 detectados en células HEK-293 depende del tiempo de incubación con paraformaldehído. Ensayos de entrecruzamiento con PFA en células HEK-293 que sobreexpresan SVCT2-Flag-His (A), SVCT2-HA (B) o GFP-SVCT2 (C) reveló que la cantidad de dímeros del transportador depende del tiempo de incubación con el agente el entrecruzante. 800000 células HEK-293 que sobreexpresan el transportador fueron incubadas con PFA al 3% a 37 °C a distintos tiempos (0 a 10 min) y luego lisadas con RIPA, el control fueron células incubadas en ausencia de PFA. Para el análisis de westerblot se sembraron 10 µg proteínas (lisado total) en un gel SDS-Poliacrilamida al 7%. SVCT2-Flag-His fue detectado con anti-Flag (M2 Sigma-Aldrich), SVCT2-HA con anti-HA (05-904 Millipore) y SVCT2-GFP con anti-GFP (B-2 Santa Cruz).

12.4.3. Dependencia de la temperatura de entrecruzamiento con paraformaldehído.

De los experimentos anteriores, seleccionamos el uso de PFA al 3% y un tiempo de incubación de 5 minutos para la detección consistente y repetitiva de dímeros de SVCT2 para las distintas quimeras de SVCT2 analizadas. En todos los casos, el entrecruzamiento con PFA fue realizado a 37°C. En la siguiente etapa, procedimos a estudiar la dependencia de la temperatura de incubación con el agente entrecruzante, utilizando una concentración fija de PFA al 3%, un tiempo de incubación de 5 minutos y una temperatura de incubación en el rango de 4 a 37°C. Brevemente, las células expresando cada una de 3 quimeras, SVCT2-Flag-His, SVCT2-HA o GFP-SVCT2, fueron incubadas por 5 minutos con PFA al 3% y a distintas temperaturas (4, 8, 12, 22 o 37°C). Al finalizar el período de incubación, las células fueron homogenizadas y las proteínas totales fueron separadas por electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE), transferidas a membranas de PDVF y las distintas quimeras fueron identificadas por su inmunoreactividad con anti-Flag, anti-HA o anti-GFP.

Quimera SVCT2-Flag-His. El monómero de 60-85 KDa estuvo presente a todas las temperaturas de incubación, desde 4 a 37°C (surcos 2-6 en Figura 16 C). Lo mismo ocurrió con la banda de mayor tamaño, centrada en un peso molecular de aproximadamente 170 KDa, cuyo tamaño es consistente con un dímero de la quimera SVCT2-Flag-His, pero la intensidad de esta banda aumentó progresivamente con la temperatura de incubación a partir desde los 4 y hasta los 37°C (surcos 2-6 en Figura 16 A). No se observó una disminución de la intensidad

de la banda centrada en 60-85 KDa con el aumento de la temperatura desde 4 a 37°C (surcos 1-6 en Figura 16 A).

Quimera SVCT2-HA. El monómero de 60-85 KDa estuvo presente a todas las temperaturas de incubación, desde 4 a 37°C (surcos 2-6 en Figura 16 B). Lo mismo ocurrió con la banda de mayor tamaño, centrada en un peso molecular de aproximadamente 170 KDa, cuyo tamaño es consistente con un dímero de la quimera SVCT2-HA, pero la intensidad de esta banda aumentó progresivamente con la temperatura de incubación a partir desde los 4 y hasta los 37°C (surcos 2-6 en Figura 16 B). No se observó una disminución de la intensidad de la banda centrada en 60- 85 KDa con el aumento de la temperatura desde 4 a 37°C (surcos 1-6 en Figura 16 B).

Quimera GFP-SVCT2. El monómero de 90-130 KDa estuvo presente a todas las temperaturas de incubación, desde 4 a 37°C, pero disminuyó notablemente a 37°C (surcos 2-6 en Figura 16 C). La banda de mayor tamaño, centrada en un peso molecular de aproximadamente 240 KDa y cuyo tamaño es consistente con un dímero de la quimera GFP-SVCT2, se observa ya a 4°C, pero la intensidad de esta banda aumentó progresivamente con la temperatura de incubación, observándose una banda de intensidad mucho mayor que la banda de 90-130 KDa a 37°C (surcos 2-6 en Figura 16 C).

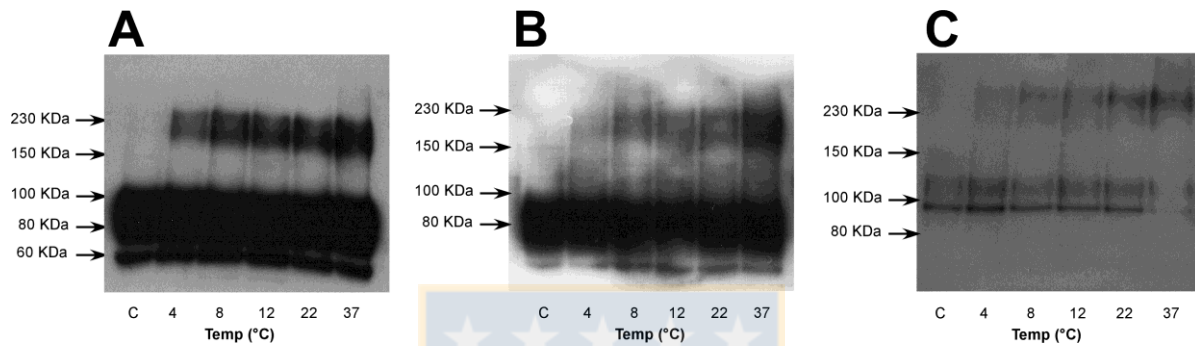


Figura 16. La presencia de dímeros de SVCT2 detectados en células HEK-293 depende de la temperatura de incubación con PFA. Ensayos de entrecruzamiento con PFA en células HEK-293 que sobreexpresan SVCT2-Flag-His (A), SVCT2-HA (B) o GFP-SVCT2 (C) reveló que la cantidad de dímeros del transportador depende de la temperatura de incubación con el agente el entrecruzante. 800000 células HEK-293 que sobreexpresan el transportador fueron incubadas con PFA al 3% por 5 min de 4 a 37 °C y luego lisadas con RIPA, el control fueron células incubadas en ausencia de PFA. Para el análisis de westerblot se sembraron 10 µg proteínas (lisado total) en un gel SDS-Poliacrilamida al 7%. SVCT2-Flag-His fue detectado con anti-Flag (M2 Sigma-Aldrich), SVCT2-HA con anti-HA (05-904 Millipore) y SVCT2-GFP con anti-GFP (B-2 Santa Cruz).

12.5. Entrecruzamiento químico de quimeras de SVCT2 expresadas en células HEK-293 utilizando reactivos entrecruzantes de longitud definida.

Los resultados anteriores permitieron confirmar la formación de dímeros de SVCT2 utilizando PFA, un agente entrecruzante sin un largo de cadena definido. Para confirmar la especificidad del entrecruzamiento, utilizamos dos reactivos entrecruzantes adicionales que poseen una distancia de entrecruzamiento de 11.4 Å y muestran una capacidad de entrecruzamiento similar. Ellos corresponden a dos reactivos bifuncionales, el reactivo disuccinimidylsuberato (DSS), que corresponde a un éster homobifuncional de la N-hidroxisuccinimida que es altamente insoluble en medio acuoso y posee la propiedad de ser permeable a la membrana plasmática, y el análogo soluble en medio acuoso e impermeable a la membrana plasmática bis(sulfosuccinimidyl)suberato (BS3). Ambos reactivos bifuncionales reaccionan eficientemente con aminas primarias (-NH₂) presentes en la cadena lateral de residuos de lisina en proteínas, formando enlaces amida que son estables y resisten el procesamiento de las proteínas desde la etapa de homogenización hasta los ensayos de inmunoblot. La diferencia entre ambos reactivos es que DSS, al ser permeable a la membrana plasmática, es utilizado para estudiar interacciones de proteínas de membrana cuyos residuos de lisina son accesible tanto desde el medio extracelular como intracelular, además de permitir el estudio de proteínas intracelulares; por otro lado, BS3, al ser impermeable a la membrana plasmática es útil solamente en el estudio de interacciones de proteínas de membrana plasmática con residuos de lisina accesibles desde el medio extracelular.

Tres de las quimeras de SVCT2 (SVCT2-Flag-His, SVCT2-HA y GFP-SVCT2) fueron sometidas a experimentos de entrecruzamiento con DSS y BS3.

En células expresando la quimera SVCT2-Flag-His como una banda heterogénea de 60-85 KDa, la incubación con concentraciones crecientes de DSS (Figura 17 A) o BS3 (Figura 17 B) resultó en la aparición de una banda de proteína aproximadamente 170 KDa, el tamaño esperado para el dímero de SVCT2-Flag-His, banda de proteína que fue observada a concentraciones de DSS y BS3 $\geq 0,03$ mM (Figura 17 A-B). La intensidad de esta banda aumentó en ambos casos en forma dependiente de la concentración del reactivo entrecruzante, alcanzando una máxima intensidad a concentraciones de 3 mM DSS y BS3, sin que se observe una disminución en la intensidad de la banda del monómero de 60-85 KDa (Figura 17 A-B).

Una situación similar se observó para células HEK-293 expresando la quimera GFP-SVCT2, la que migra como un par de bandas heterogéneas entre 90 y 130 KDa en las células control sin agente entrecruzante (Figura 17 C-D). La incubación con concentraciones crecientes de DSS (Figura 17 C) o BS3 (Figura 17 D) resultó en la aparición de una banda de proteína de aproximadamente 240 KDa, el tamaño esperado para el dímero de GFP-SVCT2 (Figura 17 C-D). La banda de 240 KDa fue observada a concentraciones de DSS $\geq 0,03$ mM y su intensidad aumentó concomitantemente con el aumento en la concentración de DSS hasta alcanzar un nivel máximo a 5 mM DSS, lo que fue acompañado por una marcada disminución en la intensidad de la banda de 90-130 KDa representando el monómero de GFP-SVCT2 (Figura 17 C). Al parecer el entrecruzamiento con BS3 fue menos eficiente, ya que la banda del dímero de 240

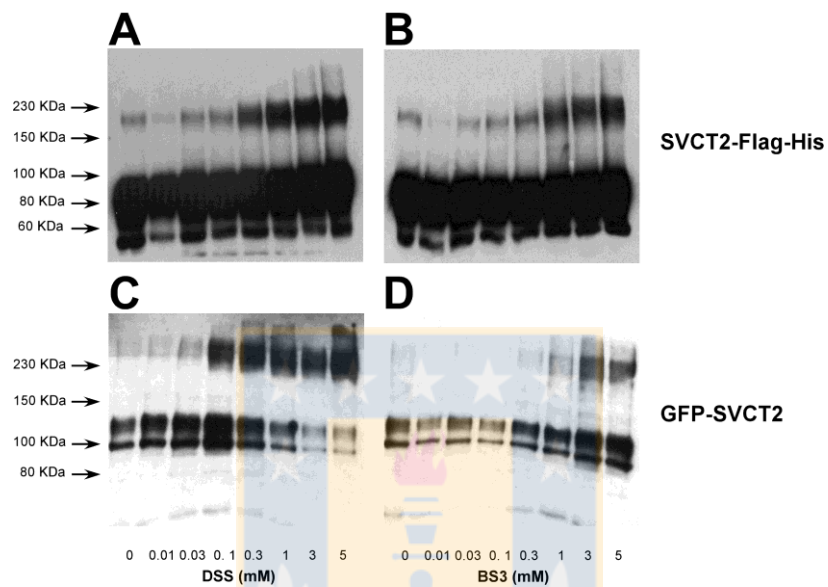


Figura 17. La incubación con DSS y BS3 de células HEK-293 que sobreexpresan el transportador sugiere la presencia de dímeros de SVCT2. Ensayos de entrecruzamiento con DSS, reactivo de 11.4 Å de longitud y permeable (A y C) y BS3, reactivo de 11.4 Å de longitud e impermeable (B y D) en células HEK-293 que sobreexpresaron SVCT2-Flag-His (A y B) o GFP-SVCT2 (C y D) reveló la presencia de dímeros del transportador de manera dosis dependiente. 800000 células HEK-293 que sobreexpresan las quimeras del transportador fueron incubadas con concentraciones crecientes de DSS o BS3 (0-5 mM) por 1 hr a temperatura ambiente y luego lisadas en RIPA. Para el análisis de westerblot se sembraron 10 µg proteínas (lisado total) en un gel SDS-Poliacrilamida al 7%. SVCT2-GFP y GFP-SVCT2 fueron detectados con anticuerpo anti-GFP (B-2 Santa Cruz), SVCT2-Flag-His con anti-Flag (M2 Sigma-Aldrich), SVCT2-HA con anti-HA (05-904 Millipore).

KDa fue observada recién a concentraciones de BS3 \geq 1 mM (Figura 17 D). La intensidad de la banda de 240 KDa aumentó concomitantemente con el aumento a 3 y 5 mM BS3, lo que no fue acompañado por una marcada disminución en la intensidad de la banda de 90-130 KDa representando el monómero de GFP-SVCT2 (Figura 17 D).

12.6. Entrecruzamiento químico de mutantes de SVCT2 expresadas en células HEK-293.

Los resultados anteriores permitieron confirmar la formación de dímeros de SVCT2-GFP nativo utilizando distintos agentes entrecruzantes. Considerando estos resultados, se quiso determinar si las mutantes de SVCT2-GFP, H109Q, C113S y C160S también son capaces de formar dímeros al ser expresadas en células HEK-293. Brevemente, células HEK-293 transfectadas y sobreexpresando en forma transitoria e individual las mutantes de SVCT2-GFP, H109Q, C113S y C160S (Figura 18) fueron incubadas con 3mM DSS por un período de 1 hora a temperatura ambiente, seguido por homogenización y fraccionamiento por electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE), transferencia e inmunodetección en membranas con anticuerpo anti-GFP. En ausencia del agente entrecruzante, las tres mutantes estudiadas migraron como una banda de proteína altamente heterogénea que abarca pesos moleculares de 90-130 KDa y que corresponde a la forma monomérica del transportador (debido a las condiciones denaturantes del sistema de separación electroforética) (Figura 18). En todos los

casos analizados, en presencia de PFA al 3% se observó la aparición de una banda heterogénea que migra más lentamente durante la separación electroforética, banda que presenta un tamaño molecular de aproximadamente dos veces el tamaño del monómero, es decir, 240 KDa y que es consistente con el entrecruzamiento de un dímero del transportador (Figura 18).



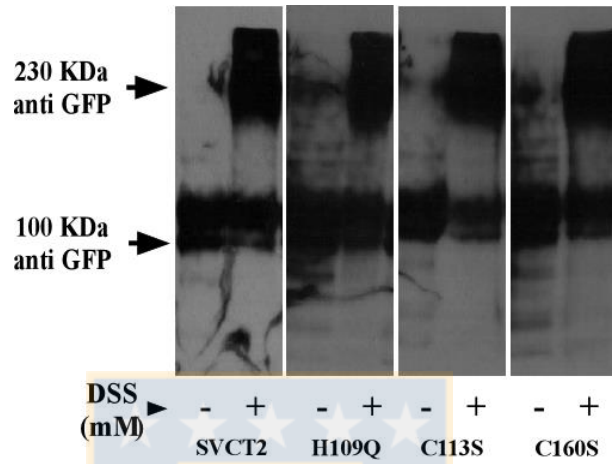


Figura 18. La incubación con DSS de células HEK-293 que sobreexpresan las mutantes del transportador SVCT2-GFP sugiere la presencia de dímeros. Ensayos de entrecruzamiento con DSS (11.4 Å, permeable) en células HEK-293 que sobreexpresaron las mutantes de SVCT2-GFP, H109Q, C113S y C160S reveló la presencia de dímeros de los transportadores mutantes de manera similar al observado en el transportador no mutado. 800000 células HEK-293 que sobreexpresan el transportador fueron incubadas con 3 mM de DSS por 1 hr a temperatura ambiente y luego lisadas en RIPA. Para el análisis de westerblot se sembraron 10 µg proteínas (lisado total) en un gel SDS-Poliacrilamida al 7%. Las proteínas mutantes y el control SVCT2-GFP fueron detectados con anticuerpo anti-GFP (FL Santa Cruz). Como control de entrecruzamiento células fueron incubadas en ausencia del agente entrecruzante.

12.7. Determinación de la interacción funcional entre quimeras de SVCT2-nativo y SVCT2 mutantes mediante estudios cinéticos.

Todo lo que se observó acerca de las propiedades cinéticas y funcionales de SVCT2 al sobreexpresar en células HEK-293 las quimeras del transportador (SVCT2-GFP, SVCT2-RED, SVCT2-HA, SVCT2-Flag y GFP-SVCT2), se resumen en los siguientes puntos: 1) un valor de K_m para el transporte de AA cercana a 20 μM ; 2) activación cooperativa por Na^+ con un Na^+_{50} de aproximadamente 35 mM; 3) sobreexpresión asociada a una localización a nivel de la membrana plasmática y prácticamente ausencia de retención a nivel intracelular.

Por otro lado, las proteínas mutantes de SVCT2 que fueron utilizadas durante el transcurso de esta tesis presentaron alteraciones tanto en sus propiedades cinéticas como funcionales, lo que permitió clasificarlas en 2 tipos: i) Mutantes tipo I; el transportador se localizó a nivel de la membrana plasmática pero fue inactivo, es decir, perdió su capacidad para transportar AA. ii) Mutantes tipo II; el transportador se localizó a nivel de la membrana plasmática y mostró marcados cambios en la K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de transporte de AA. Estas propiedades cinéticas y funcionales alteradas convirtieron a las proteínas mutantes de SVCT2 en una herramienta fundamental para el estudio de la estructura cuaternaria del transportador SVCT2, debido a que la coexpresión de proteínas mutantes y nativas dentro de una misma célula es un método muy poderoso para estudiar potenciales interacciones entre polipéptidos. Esto puede generar la supresión de la actividad de transporte por una mutante inactiva coexpresada con la nativa (dominancia negativa) o restauración de la actividad de transporte por coexpresión

de dos mutantes inactivas (complemento de función), lo que puede proveer evidencia de su organización oligomérica.

12.7.1. Caracterización funcional de las quimeras SVCT2-RED y SVCT2-GFP.

Antes de coexpresar en distintas proporciones las quimeras de SVCT2 y SVCT2 mutantes se observó si las propiedades cinéticas se mantuvieron inalteradas al cotransfectar pSVCT2-RED con pSVCT2-GFP. Esto, debido a que se quiso descartar cualquier alteración en los parámetros cinéticos provocado por los fluoróforos fusionados en el extremo del transportador y que los cambios observados en las mezclas fuera sólo producto de la interacción entre el transportador nativo y el mutante.

En células control expresando por separado SVCT2-GFP o SVCT2-RED (Figura 19 B), el análisis por microscopía confocal reveló que las fluorescencias emitidas por cada quimera de SVCT2 estaba asociada a los bordes exteriores de la célula, indicando que ambas quimeras del transportador se encuentran fundamentalmente a nivel de la membrana plasmática. Por otra parte en células HEK-293 coexpresando SVCT2-GFP y SVCT2-RED, el análisis por microscopía confocal reveló una colocalización total de la fluorescencia de SVCT2-GFP con la de SVCT2-RED, confirmando que ambas quimeras se localizan fundamentalmente a nivel de la membrana plasmática (Figura 19 B).

Para la determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA mediado por células que coexpresan SVCT2-GFP y SVCT2-RED, se realizaron ensayos de concentración-respuesta para determinar la dependencia de

la velocidad de transporte en función de concentraciones crecientes de AA extracelular, utilizando un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 μM , en un ensayo de transporte de 5 minutos a 37°C. La curva resultante al graficar los datos de transporte versus concentración de sustrato mostró una forma hiperbólica, observándose que la velocidad de transporte se aproxima a saturación a concentraciones de AA superiores a 100 μM (Figura 19 A). Análisis de los datos de transporte utilizando el método de Eadie-Hofstee generó una recta para el transporte de AA (Figura 19 B); esto es consistente con la presencia de un único componente cinético involucrado en el transporte de AA. Determinándose una K_m aparente de transporte de AA de $43 \pm 7 \mu\text{M}$ (valor que es consistente con la K_m reportada para SVCT2) y una $V_{m\acute{a}x}$ de $593 \pm 26 \text{ pmoles}/10^6\text{células}\times\text{min}$ (Figura 19 B). En células control, expresando SVCT2-GFP y SVCT2-RED por separado se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en los ensayos de coexpresión, obteniéndose valores de K_m $30 \pm 4 \mu\text{M}$ y una $V_{m\acute{a}x}$ de $563 \pm 18 \text{ pmoles}/10^6\text{células}\times\text{min}$ para SVCT2-GFP y valores de K_m $28 \pm 3 \mu\text{M}$ y una $V_{m\acute{a}x}$ de $539 \pm 15 \text{ pmoles}/10^6\text{células}\times\text{min}$ para SVCT2-RED (Figura 19 B). Estos resultados permitieron validar ambas quimeras como controles de parámetros cinéticos de AA, de localización subcelular y de expresión en ensayos de mezcla entre quimeras de SVCT2 nativo y mutantes.

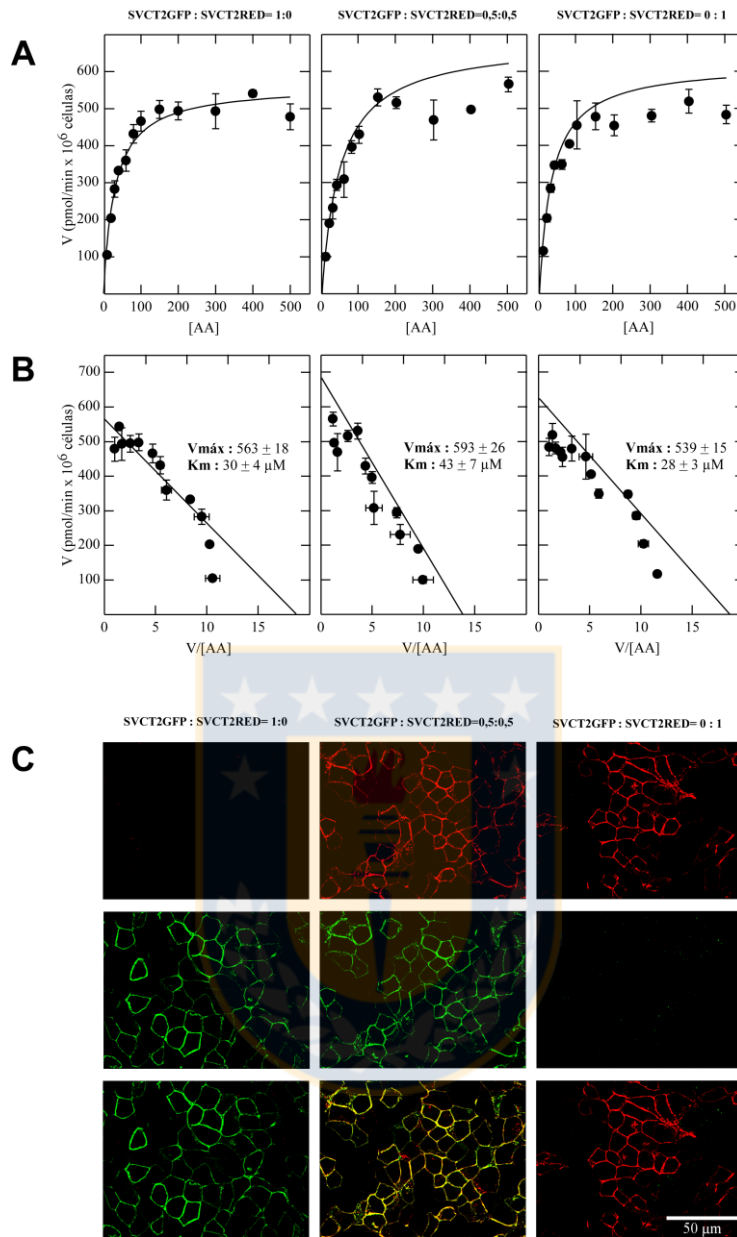


Figura 19. La adición de proteínas fluorescentes en el extremo carboxilo terminal de SVCT2 no afectó las propiedades cinéticas del transportador. A, B. Determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA en células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-GFP y pSVCT2-RED (1:0; 0,5:0,5 y 0:1 μg DNA respectivamente) reveló que la adición de proteínas fluorescentes en el extremo carboxilo terminal del transportador SVCT2 no afectó las propiedades cinéticas de éste. Se utilizó un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 μM en un ensayo de transporte de 5 min a 37°. **C.** Microscopía confocal de células HEK-293 que fueron cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-GFP y pSVCT2-RED (1:0; 0,5:0,5 y 0:1 μg DNA respectivamente), reveló que ambas proteínas se expresan y colocalizan a nivel de membrana plasmática. La fijación de las células HEK-293 se realizó en PFA al 4%, las imágenes obtenidas por microscopía confocal en aumento 60X representa un plano medial de las células. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección.

12.7.2. Caracterización funcional de SVCT2 y la mutante H109Q coexpresadas en células HEK-293.

Como fue descrito anteriormente el análisis por microscopía de fluorescencia confocal de células HEK-293 que expresan transientemente la proteína mutante H109Q-SVCT2-GFP (H109Q), reveló que el transportador se expresa a nivel de la membrana plasmática (Figura 10 A) y fue incapaz de transportar AA, obteniéndose valores de velocidades de transporte de AA similares a los obtenidos en células que expresan GFP (Figura 10 D y E).

La caracterización funcional permitió clasificar a H109Q como una mutante tipo I, en la que el transportador se localizó a nivel de la membrana plasmática pero fue inactivo, es decir, perdió su capacidad para transportar AA. Esta incapacidad de transportar AA convirtió a esta mutante de SVCT2 en una herramienta fundamental para el estudio de la estructura cuaternaria del transportador SVCT2, debido a que la coexpresión de proteínas mutantes y nativas dentro de una misma célula es un método muy poderoso para estudiar potenciales interacciones entre polipéptidos. Esto puede generar la supresión de la actividad de transporte por una mutante inactiva coexpresada con la nativa (dominancia negativa) o restauración de la actividad de transporte por coexpresión de dos mutantes inactivas (complemento de función) lo que puede proveer evidencia de su organización oligomérica (Rubin, R y Levy, 1991). Por ejemplo, esta estrategia fue utilizada para estudiar la estructura cuaternaria del transportador de lactosa (LacS), midiendo el transporte de sustratos en proteoliposomas conteniendo diferentes proporciones moleculares del

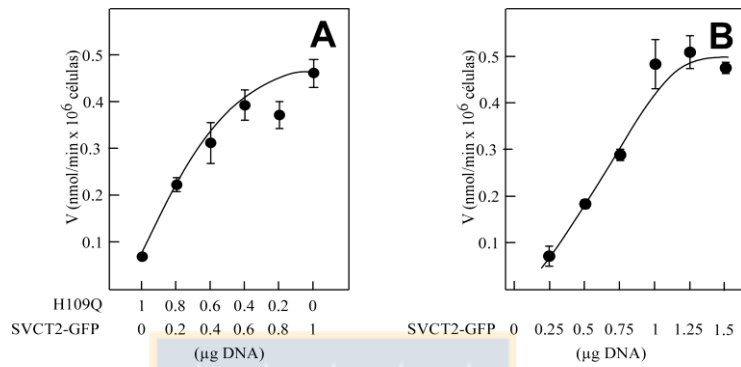


Figura 20. La coexpresión de SVCT2-GFP y la mutante inactiva H109Q-SVCT2-GFP reveló que cada una conservó sus propiedades de transporte de AA. A. Determinación de la velocidad de transporte de AA en células cotransfectadas con diferentes razones de H109Q-SVCT2-GFP y pSVCT2-GFP (1:0; 0,8:0,2; 0,6:0,4; 0,4:0,6; 0,2:0,8; 0:1 µg DNA respectivamente). **B.** Determinación de la velocidad de transporte de AA en células transfectadas con concentraciones crecientes de pSVCT2-GFP (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 y 1,2 µg DNA respectivamente). Los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección y se utilizó una concentración de AA de 100 µM en un ensayo de transporte de 5 min a 37° C.

Tabla III. Velocidad máxima de transporte asociada con el transporte de AA en células HEK-293 que coexpresan SVCT2-GFP y la mutante H109Q-SVCT2-GFP en distintas proporciones moleculares (μg de plásmido transfectedo respectivamente).

SVCT2 (μDNA)	H109Q (μDNA)	Velocidad (nmoles/min $\times 10^6$ células)
1,0	0	$0,48 \pm 0,02$
0,8	0,2	$0,38 \pm 0,02$
0,6	0,4	$0,41 \pm 0,03$
0,4	0,6	$0,32 \pm 0,03$
0,2	0,8	$0,23 \pm 0,01$
0	1,0	$0,07 \pm 0,007$

Los datos de transporte fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar de los experimentos realizados en triplicado.

transportador lacS mutado en los residuos de cisteína 67 y 320. A partir de este estudio se concluye que LacS es un dímero y que ambas subunidades que conforman el dímero son funcionales (Venhoff y *col.*, 2001).

El ensayo realizado en células HEK-293 que coexpresan la mutante H109Q y SVCT2-GFP nativo en distintas proporciones (Figura 20 A) reveló que a medida que aumentó la expresión de SVCT2-GFP y por ende disminuyó la expresión de H109Q-SVCT2-GFP, el transporte de AA fue aumentando (Tabla III), es decir, la velocidad de transporte fue proporcional a la cantidad relativa de SVCT2-GFP expresado (Figura 20 B). Así, células que solo expresaron la proteína mutante alcanzaron una velocidad de transporte de AA de aproximadamente 0,07 nmoles/10⁶ células x minuto en comparación con células que sólo expresaron el transportador nativo SVCT2-GFP que alcanzaron una velocidad de transporte de AA de 0,48 nmoles/10⁶ células x minuto (Figura 20 A), es decir, existió un aumento de la velocidad de transporte de AA de aproximadamente 7 veces.

El ensayo descrito anteriormente fue confirmado por un ensayo similar pero esta vez utilizando el transportador nativo fusionado a la proteína fluorescente roja y el transportador mutante fusionado a la proteína fluorescente verde. En células control expresando por separado SVCT2-RED o la mutante H109Q (Figura 22), el análisis por microscopía confocal reveló que las fluorescencias emitidas por cada transportador estaba asociada a los bordes exteriores de la célula, indicando que ambos transportadores se encuentran fundamentalmente a nivel de la membrana plasmática. Por otra parte en células HEK-293 coexpresando en distintas proporciones moleculares SVCT2-RED y H109Q, el análisis por microscopía confocal reveló una colocación total de la fluorescencia de SVCT2-RED con la

mutante, confirmando que ambos transportadores se localizan fundamentalmente a nivel de la membrana plasmática (Figura 22). El ensayo de transporte de AA realizado en células HEK-293 que coexpresan la mutante H109Q y SVCT2-RED nativo en distintas proporciones (Figura 21 A) reveló que a medida que aumentó la expresión de SVCT2-RED y por ende disminuyó la expresión de H109Q, el transporte de AA fue aumentando (Tabla IV), es decir, la velocidad de transporte fue proporcional a la cantidad relativa de SVCT2-RED expresado (Figura 21 B), el aumento o la disminución de la expresión de dichos transportadores fue confirmada por microscopía de fluorescencia (Figura 21 C). Así, células que sólo expresaron la proteína mutante alcanzaron una velocidad de transporte de AA de aproximadamente 0,40 nmoles/10⁶célulasxmin en comparación con células que sólo expresaron el transportador nativo SVCT2-RED que alcanzaron una velocidad de transporte de AA de 0,32 nmoles/10⁶célulasxmin (Figura 21 A), es decir, existió un aumento de la velocidad de transporte de AA de aproximadamente 8 veces.

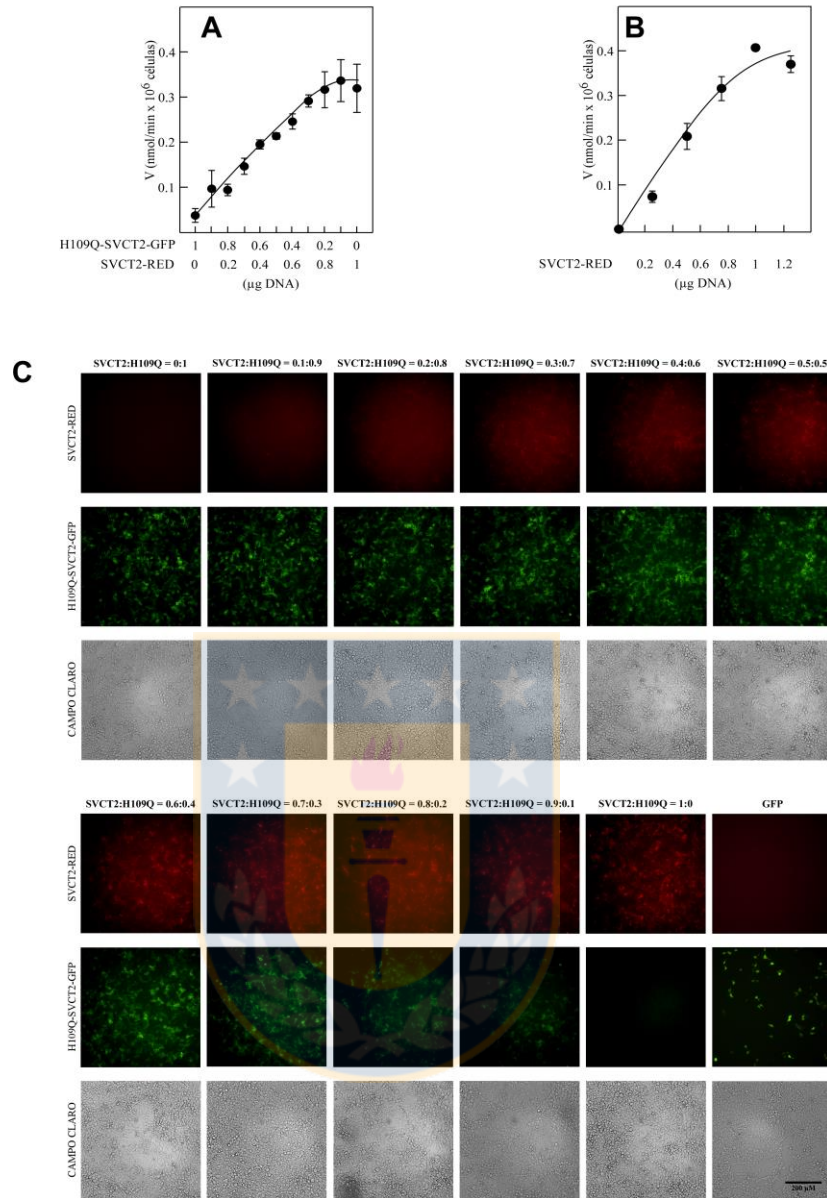


Figura 21. La coexpresión de la mutante inactiva H109Q-SVCT2-GFP y SVCT2-RED reveló que cada una conservó sus propiedades de transporte de AA. A. Determinación de la velocidad de transporte de AA en células cotransfectadas con diferentes razones de pH109Q-SVCT2-GFP y pSVCT2-RED (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,1:0,9; 0:1 μg DNA respectivamente), los datos fueron corregidos por las células tansfectadas con el vector vacío pGFP-N1. **B.** Determinación de la velocidad de transporte de AA en células transfectadas con cantidades crecientes de pSVCT2-RED (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1 y 1,25 μg DNA respectivamente), los datos fueron corregidos por las células tansfectadas con el vector vacío pGFP-N1. **C.** Microscopía de fluorescencia y campo claro de células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pH109Q-SVCT2-GFP y pSVCT2-RED (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,1:0,9; 0:1 μg DNA respectivamente). Como control de transfección se utilizó el pEGFP-N1, las imágenes fueron obtenidas por microscopía con aumento de 10X. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección.

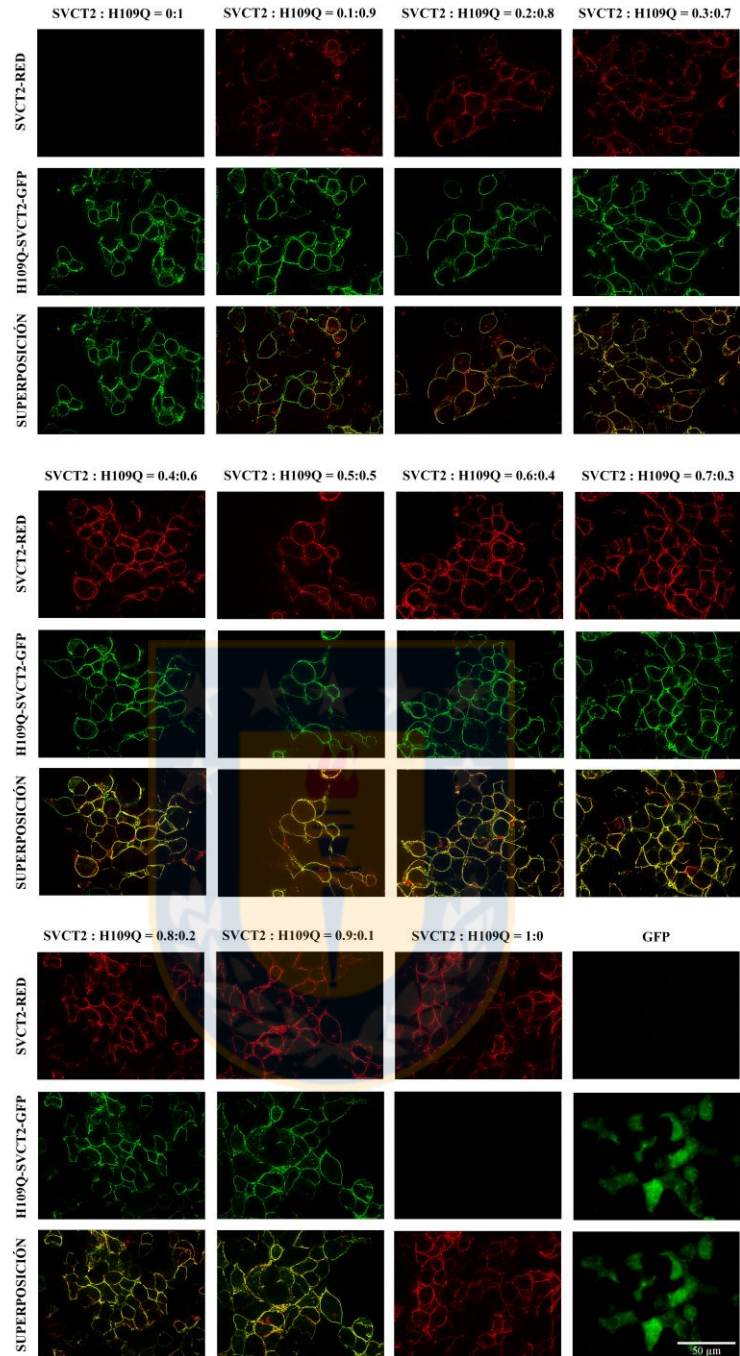


Figura 22. La coexpresión de la mutante inactiva H109Q-SVCT2-GFP y el transportador nativo SVCT2-RED reveló que ambas proteínas colocalizan en membrana plasmática. Microscopía de fluorescencia de células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pH109Q-SVCT2-GFP y pSVCT2-RED (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,1:0,9; 0:1 μ g DNA respectivamente). Como control de transfección se utilizó el pEGFP-N1. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección.

Tabla IV. Velocidad máxima de transporte asociada con el transporte de AA mediado por células HEK-293 que coexpresan SVCT2-RED y la mutante H109Q-SVCT2-GFP en distintas proporciones moleculares (μg de plásmido transfectedo respectivamente).

SVCT2 (μDNA)	H109Q (μDNA)	Velocidad (nmoles/min $\times 10^6$ células)
1	0	$0,32 \pm 0,005$
0,9	0,1	$0,34 \pm 0,05$
0,8	0,2	$0,32 \pm 0,04$
0,7	0,3	$0,29 \pm 0,01$
0,6	0,4	$0,25 \pm 0,02$
0,5	0,5	$0,21 \pm 0,01$
0,4	0,6	$0,20 \pm 0,01$
0,3	0,7	$0,15 \pm 0,02$
0,2	0,8	$0,09 \pm 0,01$
0,1	0,9	$0,10 \pm 0,04$
0	1	$0,040 \pm 0,02$

Los datos de transporte fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar de los experimentos realizados en triplicado.

12.7.3. Caracterización funcional de SVCT2 y la mutante C113S coexpresadas en células HEK-293.

Como fue descrito anteriormente el análisis por microscopía de fluorescencia y confocal en células HEK-293 que expresan transientemente la proteína mutante C113S-SVCT2-GFP (C113S) reveló que el transportador se expresó principalmente a nivel de la membrana plasmática (Figura 11 A). Ensayos cinéticos realizados en células HEK-293 que expresan C113S-SVCT2-GFP revelaron que la mutante mostró alteraciones en el transporte de AA, caracterizado por una K_m aparente de transporte de AA de $244 \pm 9 \mu\text{M}$ y una $V_{\text{máx}}$ aparente de $803 \pm 13 \text{ pmoles}/10^6\text{células}\times\text{min}$ (Figura 11 E), en comparación con SVCT2-RED que presentó una K_m aparente de transporte de AA de $27 \pm 5 \mu\text{M}$ y una $V_{\text{máx}}$ de $320 \pm 15 \text{ pmoles}/10^6\text{células}\times\text{min}$ (Figura 6 D). Por el contrario, los parámetros cinéticos asociados al ion Na^+ no fueron afectados ya que esta mutante conservó su efecto cooperativo por este ión (Figura 11 F).

La caracterización funcional permitió clasificar a C113S como una mutante tipo II, en la que el transportador se localizó a nivel de la membrana plasmática pero mostró alteraciones en sus parámetros cinéticos asociados al transporte de AA lo que se vio reflejado en un marcado aumento en la K_m y $V_{\text{máx}}$ de transporte. Esta alteración en las propiedades cinéticas asociadas al transporte de AA fue fundamental para el estudio de la estructura cuaternaria del transportador SVCT2, ya que se permitió coexpresar C113S con el transportador nativo SVCT2-RED para ver si en la interacción de ambos transportadores producía una alteración en las propiedades cinéticas de cada proteína.

Se coexpresó SVCT2-RED (transportador nativo) con C113S (transportador mutante) en células HEK-293 en diferentes proporciones moleculares. Así la razón transfectada de pSVCT2-RED:pC113S varió desde 1,0:0,0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8 a 0,1:0,9 a 0,0:1,0 μg de DNA. Ensayos de colocalización realizados por microscopía confocal en estas células HEK-293 que coexpresan el C113S (emite fluorescencia verde) y SVCT2-RED (emite fluorescencia roja), revelaron que ambas proteínas se localizaron en la zona de la periferia de la célula en la que se encuentra la membrana plasmática (Figura 24).

En todos los ensayos de transporte realizados células HEK-293 que coexpresan SVCT2-RED y C113S en diferentes proporciones moleculares (Figura 23 A, B), se observó un único componente cinético involucrado en el transporte de AA, caracterizado por una única recta presente en el gráfico de Eadie-Hofstee (Figura 23 B). Interesantemente se observó que células que fueron transfectadas con mayor cantidad de pSVCT2-RED (DNA mayor a 0,5 μg), las K_m s obtenidas fueron similares a la de SVCT2-RED, por el contrario, cuando mayor cantidad de pC113S fue transfectado (DNA mayor a 0,5 μg), las K_m s obtenidas fueron similares a las de la mutante C113S-SVCT2-GFP (Tabla V, Figura 25). El aumento o la disminución de la expresión de dichos transportadores fue confirmada por microscopía de fluorescencia (Figura 23 C).

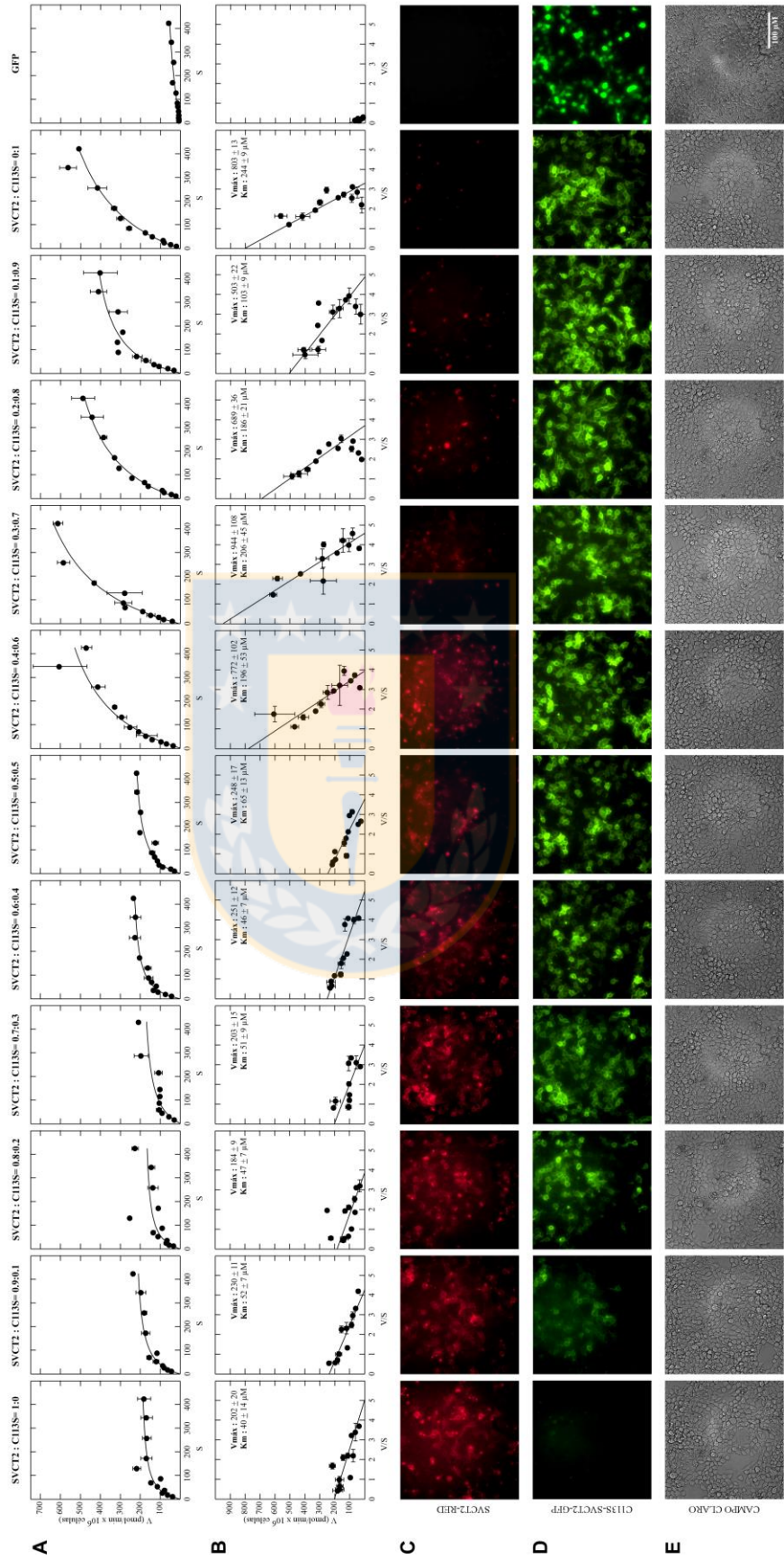


Figura 23. La coexpresión del transportador SVCT2-RED y la proteína mutante C113S-SVCT2-GFP reveló que ambas proteínas se encuentran interaccionando y que la proteína que se expresa en mayor proporción es la que modula las propiedades cinéticas del transportador que se expresa en menor proporción. **A, B.** Determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA en células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-RED y C113S-SVCT2-GFP (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 μg DNA respectivamente). Se utilizó un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 μM en un ensayo de transporte de 5 minutos a 37°. **C, D, E.** Microscopía de fluorescencia y campo claro de células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-RED y pC113S-SVCT2-GFP (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 μg DNA respectivamente), las imágenes fueron obtenidas por microscopía con aumento de 20X. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección.



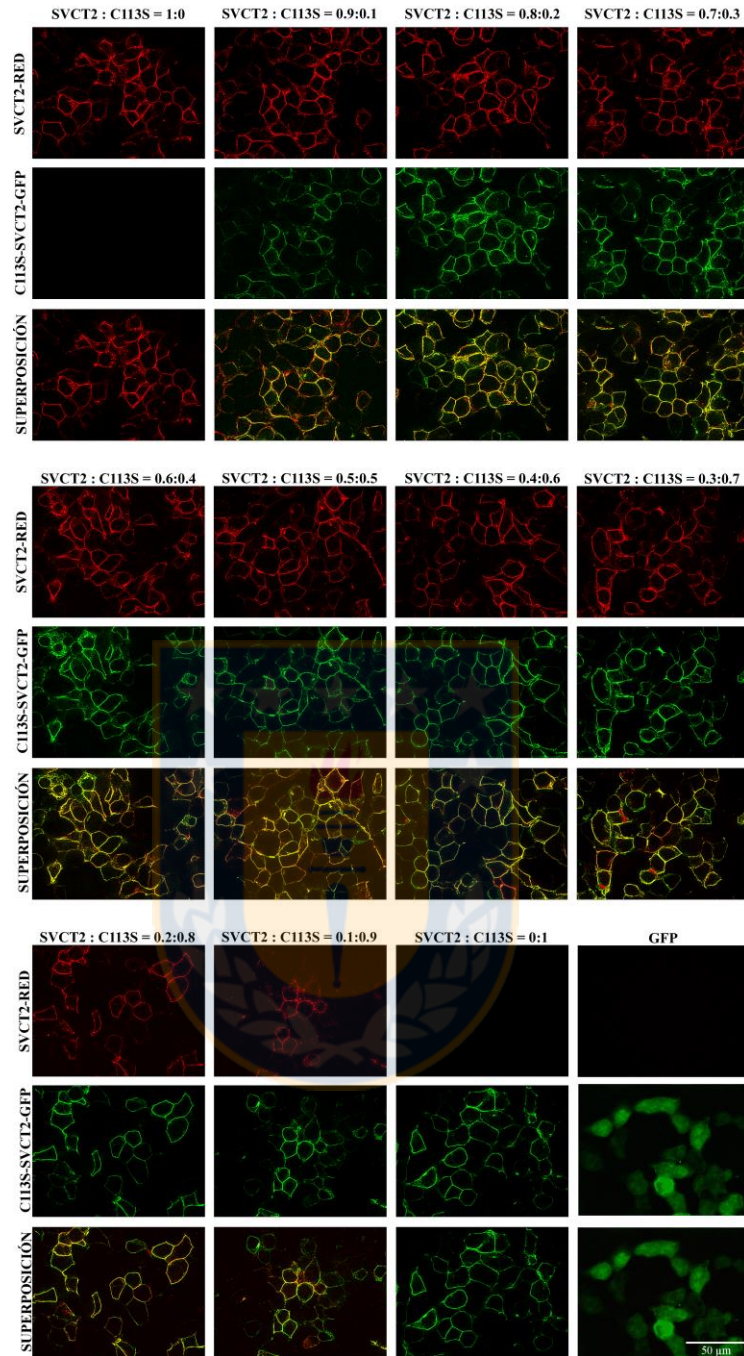


Figura 24. La coexpresión del transportador SVCT2-RED y la proteína mutante C113S-SVCT2-GFP reveló que ambas proteínas colocalizan en membrana plasmática. Microscopía confocal de células HEK-293 que fueron cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-RED y pC113S-SVCT2-GFP (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 μ g DNA respectivamente), revelaron que ambas proteínas se expresaron y colocalizaron a nivel de membrana plasmática. Como control se utilizaron células transfectadas con el vector vacío pEGFP-N1. La fijación de las células HEK-293 se realizó en PFA al 4%, las imágenes obtenidas por microscopía confocal en aumento 60X representa un plano medial de las células.

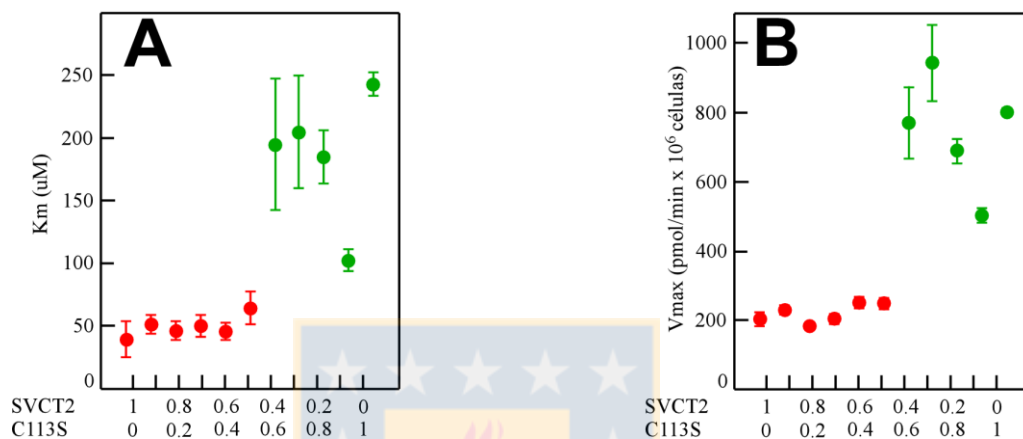


Figura 25. La coexpresión del transportador SVCT2-RED y la proteína mutante C113S-SVCT2-GFP reveló que ambas proteínas se encuentran interaccionando y que la proteína que se expresa en mayor proporción es la que modula las propiedades cinéticas del transportador que se expresa en menor proporción. **A.** K_ms asociadas al transporte de AA en células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-RED y pC113S-SVCT2-GFP (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 µg DNA respectivamente) **B.** Velocidades máximas asociadas al transporte de AA en células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-RED y C113S-SVCT2-GFP (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 µg DNA respectivamente). Se utilizó un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 µM en un ensayo de transporte de 5 minutos a 37°. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección.

Tabla V. K_m aparente y velocidad máxima de transporte asociada con el transporte de AA mediado por células HEK-293 que coexpresan SVCT2-RED y la mutante C113S-SVCT2-GFP en distintas proporciones moleculares (μg de plásmido transfectedo respectivamente).

SVCT2 : C113S (μDNA)	K_m (μM)	$V_{\text{máx}}$ ($\text{pmol}/\text{min} \times 10^6 \text{ cels}$)
1,0 : 0,0	40 ± 14	202 ± 14
0,9 : 0,1	52 ± 7	230 ± 11
0,8 : 0,2	44 ± 6	171 ± 9
0,7 : 0,3	51 ± 9	203 ± 15
0,6 : 0,4	46 ± 7	251 ± 12
0,5 : 0,5	65 ± 13	248 ± 17
0,4 : 0,6	196 ± 53	772 ± 101
0,3 : 0,7	206 ± 45	944 ± 108
0,2 : 0,8	186 ± 21	689 ± 36
0,1 : 0,9	103 ± 9	503 ± 22
0,0 : 1,0	244 ± 9	803 ± 13

Los datos de transporte fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar de los experimentos realizados en triplicado.

12.7.4. Caracterización funcional de SVCT2 y la mutante C160S coexpresadas en células HEK-293.

Como fue descrito anteriormente el análisis por microscopía de fluorescencia y confocal en células HEK-293 que expresan transientemente la proteína mutante C160S (C160S) reveló que el transportador se expresó principalmente a nivel de la membrana plasmática (Figura 12 A). Ensayos cinéticos realizados en células HEK-293 que expresan C160S revelaron que la mutante mostró alteraciones en el transporte de AA, caracterizado por una K_m aparente de transporte de AA de $143 \pm 22 \mu\text{M}$ y una $V_{m\acute{a}x}$ aparente de 762 ± 49 pmoles/ 10^6 célulasxmin (Figura 12 E), en comparación con SVCT2-RED que presentó una K_m aparente de transporte de AA de $27 \pm 5 \mu\text{M}$ y una $V_{m\acute{a}x}$ de 320 ± 15 pmoles/ 10^6 célulasxmin (Figura 6 D). Por el contrario, los parámetros cinéticos asociados al ion Na^+ no fueron afectados ya que esta mutante conservó su efecto cooperativo por este ión (Figura 12 F).

La caracterización funcional permitió clasificar a C160S como una mutante tipo II, en la que el transportador se localizó a nivel de la membrana plasmática pero mostró alteraciones en sus parámetros cinéticos asociados al transporte de AA lo que se vio reflejado en un marcado aumento en la K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de transporte. Esta alteración en las propiedades cinéticas asociadas al transporte de AA fue fundamental para el estudio de la estructura cuaternaria del transportador SVCT2, ya que se permitió coexpresar C160S con el transportador nativo SVCT2-RED para ver si en la interacción de ambos transportadores producía una alteración en las propiedades cinéticas de cada proteína.

Se coexpresó SVCT2-RED (transportador nativo) con C160S (transportador mutante) en células HEK-293 en diferentes proporciones moleculares. Así la razón transfectada de pSVCT2-RED: pC160S varió desde 1,0:0,0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8 a 0,1:0,9 a 0,0:1,0 μg de DNA. Ensayos de colocalización realizados por microscopía confocal en estas células HEK-293 que coexpresan el C160S (emite fluorescencia verde) y SVCT2-RED (emite fluorescencia roja), revelaron que ambas proteínas se localizaron en la zona de la periferia de la célula en la que se encuentra la membrana plasmática (Figura 22).

En todos los ensayos de transporte realizados células HEK-293 que coexpresan SVCT2-RED y C160S en diferentes proporciones moleculares (Figura 21 C-E), se observó un único componente cinético involucrado en el transporte de AA, caracterizado por una única recta presente en el gráfico de Eadie-Hofstee (Figuras 21 A y B). Interesantemente se observó que células que fueron transfectadas con mayor cantidad de pSVCT2-RED (DNA mayor a 0,5 μg), las K_m s obtenidas fueron similares a la de SVCT2-RED, por el contrario, cuando mayor cantidad de C160Sr fue transfectado (DNA mayor a 0,5 μg), las K_m s obtenidas fueron similares a las de la mutante C160S (Tabla VI, Figura 23). El aumento o la disminución de la expresión de dichos transportadores fue confirmada por microscopía de fluorescencia (Figura 23 C).

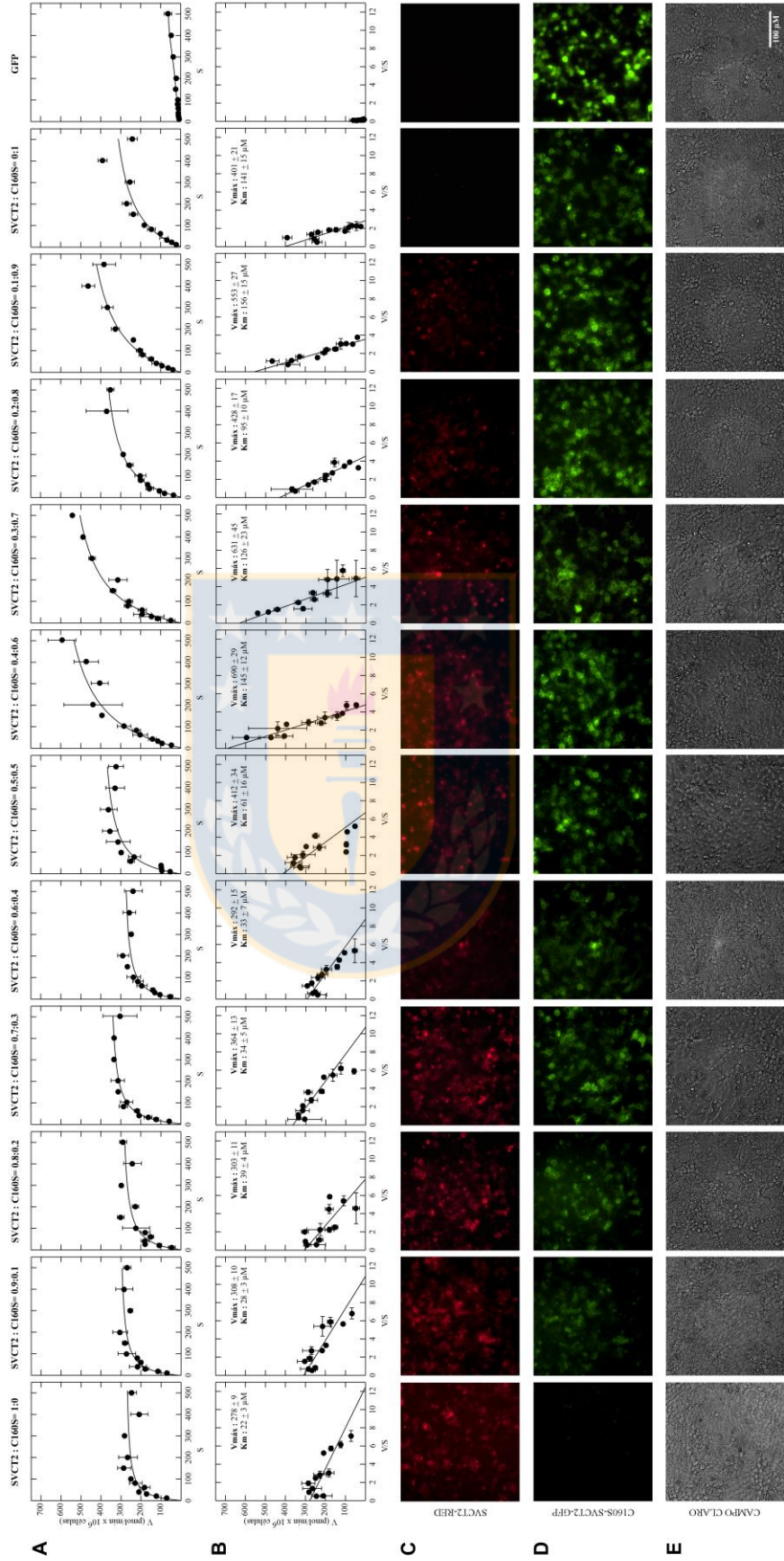


Figura 26. La coexpresión del transportador SVCT2-RED y la proteína mutante C160S-SVCT2-GFP reveló que ambas proteínas se encuentran interaccionando y que la proteína que se expresa en mayor proporción es la que modula las propiedades cinéticas del transportador que se expresa en menor proporción. A, B. Determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA en células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-RED y C160S-SVCT2-GFP (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 μg DNA respectivamente). Se utilizó un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 μM en un ensayo de transporte de 5 minutos a 37°. **C, D, E.** Microscopía de fluorescencia y campo claro de células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-RED y pC160S-SVCT2-GFP (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 μg DNA respectivamente), las imágenes fueron obtenidas por microscopía con aumento de 20X. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección.



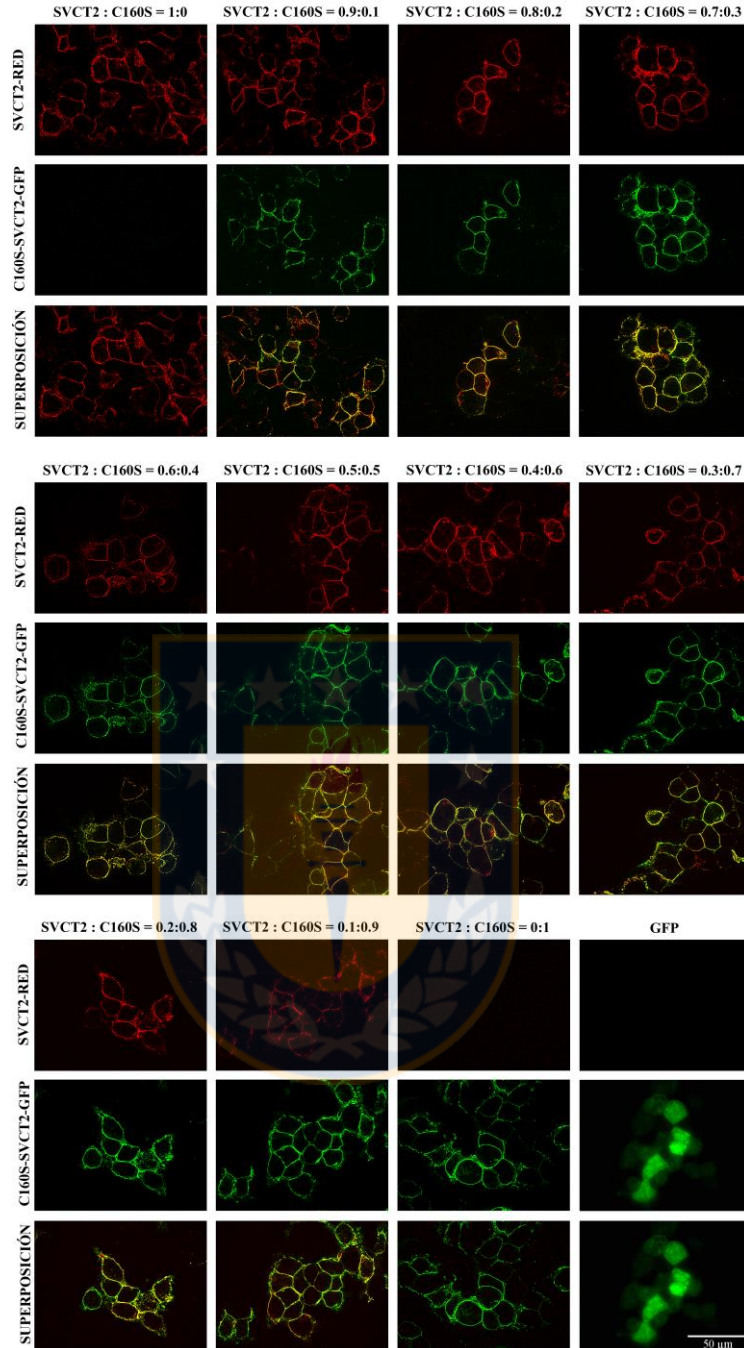


Figura 27. La coexpresión del transportador SVCT2-RED y la proteína mutante C160S-SVCT2-GFP reveló que ambas proteínas colocalizan en membrana plasmática. Microscopía confocal de células HEK-293 que fueron cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-RED y pC160S-SVCT2-GFP (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 μ g DNA respectivamente), revelaron que ambas proteínas se expresaron y colocalizaron a nivel de membrana plasmática. Como control se utilizaron células transfectadas con el vector vacío pEGFP-N1. La fijación de las células HEK-293 se realizó en PFA al 4%, las imágenes obtenidas por microscopía confocal en aumento 60X representa un plano medial de las células.

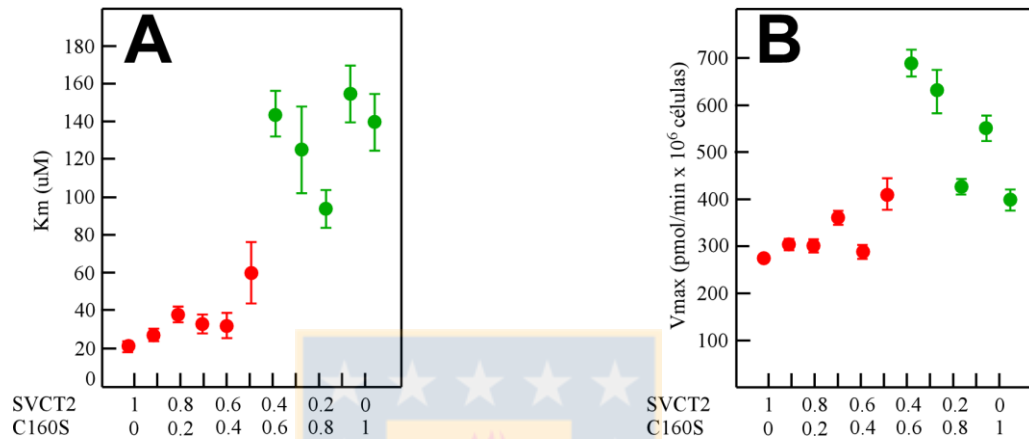


Figura 28. La coexpresión del transportador SVCT2-RED y la proteína mutante C160S-SVCT2-GFP reveló que ambas proteínas se encuentran interaccionando y que la proteína que se expresa en mayor proporción es la que modula las propiedades cinéticas del transportador que se expresa en menor proporción. **A.** K_m s asociadas al transporte de AA en células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-RED y pC160S-SVCT2-GFP (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 μ g DNA respectivamente). **B.** Velocidades máximas asociadas al transporte de AA en células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-RED y C160S-SVCT2-GFP (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 μ g DNA respectivamente). Se utilizó un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 μ M en un ensayo de transporte de 5 minutos a 37°. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección.

Tabla VI. K_m aparente y velocidad máxima de transporte asociada con el transporte de AA mediado por células HEK-293 que coexpresan SVCT2-RED y la mutante C160S-SVCT2-GFP en distintas proporciones moleculares (μg de plásmido transfectado respectivamente).

SVCT2 : C160S (μDNA)	K_m (μM)	$V_{\text{máx}}$ ($\text{pmol}/\text{min} \times 10^6 \text{ cels}$)
1,0 : 0,0	22 \pm 3	278 \pm 9
0,9 : 0,1	28 \pm 3	308 \pm 10
0,8 : 0,2	39 \pm 4	303 \pm 11
0,7 : 0,3	34 \pm 5	364 \pm 13
0,6 : 0,4	33 \pm 7	292 \pm 15
0,5 : 0,5	61 \pm 16	412 \pm 34
0,4 : 0,6	145 \pm 12	690 \pm 29
0,3 : 0,7	126 \pm 23	631 \pm 45
0,2 : 0,8	95 \pm 10	428 \pm 17
0,1 : 0,9	156 \pm 15	553 \pm 27
0,0 : 1,0	141 \pm 15	401 \pm 21

Los datos de transporte fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar de los experimentos realizados en triplicado.

12.7.5. Caracterización funcional de SVCT2-Flag-His y la mutante GFP-C160S-SVCT2 coexpresadas en células HEK-293.

Debido a que por microscopía de fluorescencia solo se detectó pero no se pudo cuantificar la expresión de ni del transportador nativo ni del transportador mutante en células HEK-293 que coexpresaron en distintas razones moleculares ambas proteínas. Se repitió el ensayo con pero esta vez con SVCT2-Flag-His y GFP-C160S-SVCT2 (C160S), proteínas que si fue posible detectar y semicuantificar por ensayos de *Western blot* con anticuerpos específicos para cada epítotope.

La caracterización funcional permitió clasificar a C160S como una mutante tipo II, en la que el transportador se localizó a nivel de la membrana plasmática pero mostró alteraciones en sus parámetros cinéticos asociados al transporte de AA lo que se vio reflejado en un marcado aumento en la K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de transporte, $186 \pm 33 \mu M$ y $989 \pm 78 \text{ pmoles}/10^6 \text{ células} \times \text{minuto}$ respectivamente (Figura 29 E), en comparación con SVCT2-Flag-His que presentó una K_m aparente de transporte de AA de $36 \pm 8 \mu M$ y una $V_{m\acute{a}x}$ de $295 \pm 17 \text{ pmoles}/10^6 \text{ células} \times \text{min}$ (Figura 29 E).

Se coexpresó SVCT2-Flag-His (transportador nativo) con C160S (transportador mutante) en células HEK-293 en diferentes proporciones moleculares. Así la razón transfectada de pSVCT2-Flag-His: pC160S varió desde 1,0:0,0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,1:0,9 a 0,0:1,0 μg de DNA. Ensayos de colocalización realizados por microscopía confocal en estas células HEK-293 que coexpresan el C160S (emite fluorescencia verde) y

SVCT2-Flag-His (no emite fluorescencia), revelaron que la proteína mutante se localizó en la zona de la periferia de la célula en la que se encuentra la membrana plasmática (Figura 25 C y D).

En todos los ensayos de transporte realizados células HEK-293 que coexpresan SVCT2-Flag-His y C160S en diferentes proporciones moleculares, se observó un único componente cinético involucrado en el transporte de AA, caracterizado por una única recta presente en el gráfico de Eadie-Hofstee (Figuras 25 A y B). Interesantemente se observó que la K_m aumentó a medida que disminuyó la expresión de SVCT2-Flag-His y por ende aumentó la expresión de C1160S (Tabla VII, figuras 29 A y B). El aumento de la expresión de la mutante fue confirmada por microscopía de fluorescencia (Figura 29, 30).

La expresión transitoria de SVCT2-Flag-His y C160S coexpresadas en diferentes proporciones moleculares en células HEK-293, fue evaluada mediante inmunodetección (*Western Blot*) con anticuerpos primarios específicos para cada transportador. SVCT2-Flag-His presentó un tamaño molecular cercano a 85 KDa, en comparación a la mutante C160S que presentó un tamaño molecular cercano a 110 KDa. Interesantemente, se observó que la disminución en la expresión del transportador nativo se acompañó de un aumento de la expresión del transportador mutante. Lo que se reflejó en los ensayos cinéticos detallados anteriormente donde se observó que la K_m aumentó a medida que disminuyó la expresión de SVCT2-Flag-His y por ende aumentó la expresión de C1160S (Tabla 6, figuras 29C, 30).

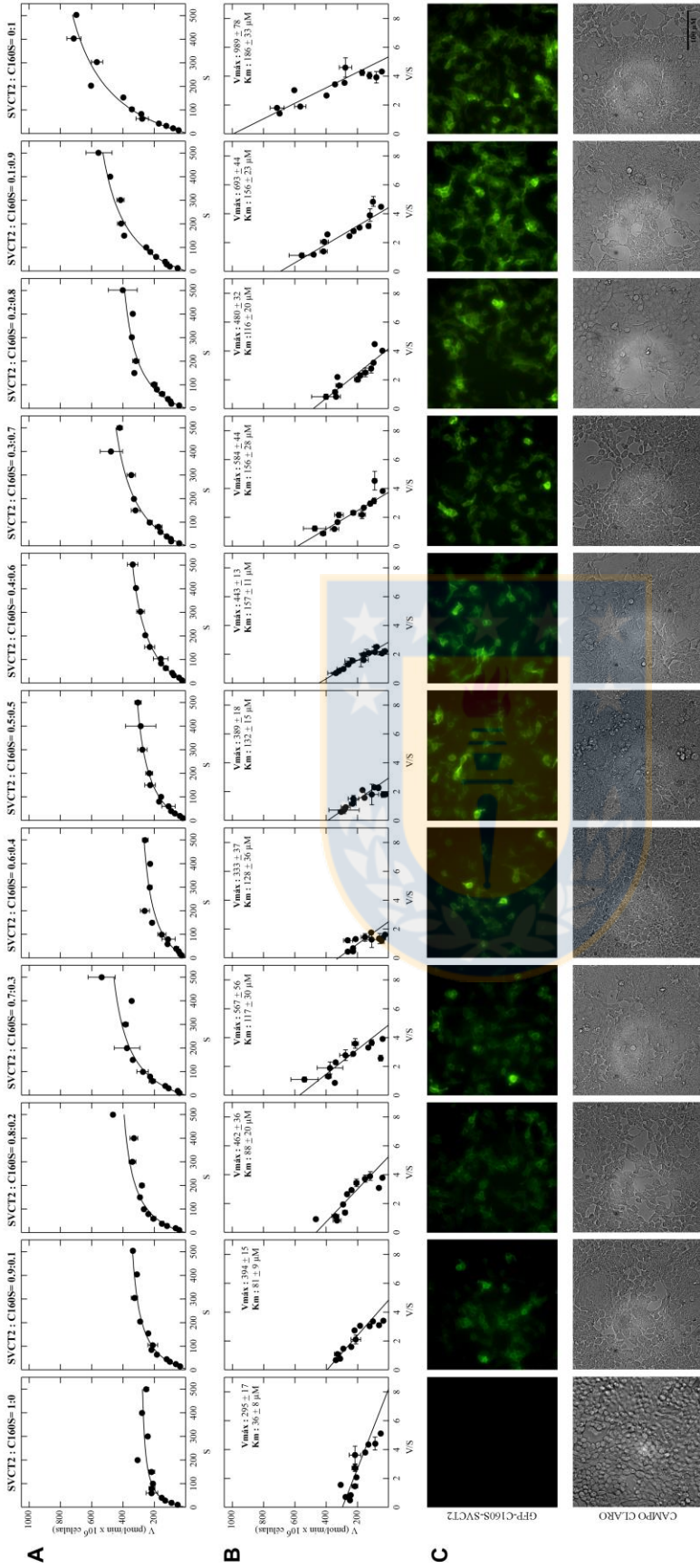


Figura 29. La coexpresión del transportador SVCT2-Flag-His y la proteína mutante GFP-C160S-SVCT2 reveló que ambas proteínas se encuentran interaccionando y que la proteína que se expresa en mayor proporción es la que modula las propiedades cinéticas del transportador que se expresa en menor proporción. A, B. Determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA en células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-Flag-His y pGFP-C160S-SVCT2 (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 μg DNA respectivamente). Se utilizó un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 μM en un ensayo de transporte de 5 min a 37°. **C.** Microscopía de fluorescencia y en campo claro de células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-Flag y pGFP-C160S-SVCT2 (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 μg DNA respectivamente), las imágenes fueron obtenidas por microscopía con aumento de 20X. **D.** Evaluación de la expresión transiente de SVCT2-Flag-His y GFP-C160-SVCT2 en células HEK-293 mediante inmunodetección (Western Blot) con un anticuerpo primario anti-Flag o anti-GFP. Las células HEK-293 fueron cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-Flag-His y GFP-C160S-SVCT2 (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 μg DNA respectivamente). El ensayo se realizó con 10 μg proteínas totales sembradas en un gel SDS-PAGE al 10% y como control negativo se usaron células no transfectadas. Como control de carga se utilizó GapdH. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección.



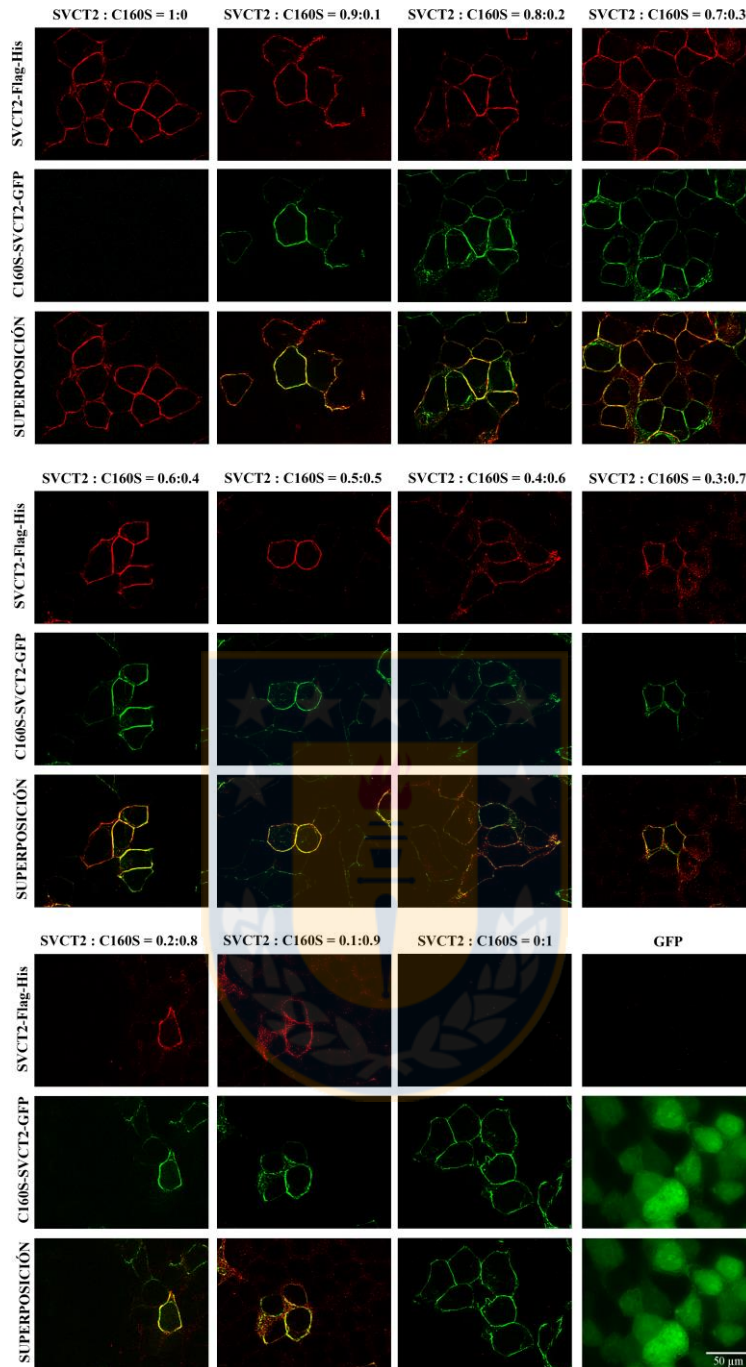


Figura 30. La coexpresión del transportador SVCT2-Flag-His y la proteína mutante C160S-SVCT2-GFP reveló que ambas proteínas colocalizan en membrana plasmática. Ensayos de inmunocitoquímica de células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-Flag-His y pGFP-C160S-SVCT2 (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 μ g DNA respectivamente) revelaron que ambas proteínas se expresaron y colocalizaron a nivel de membrana plasmática. Para la detección de la quimera SVCT2-Flag-His se utilizó un anticuerpo primario dirigido contra Flag en células fijadas con PFA al 4%. , las imágenes obtenidas por microscopía confocal en aumento 100X representan un plano medial de las células.

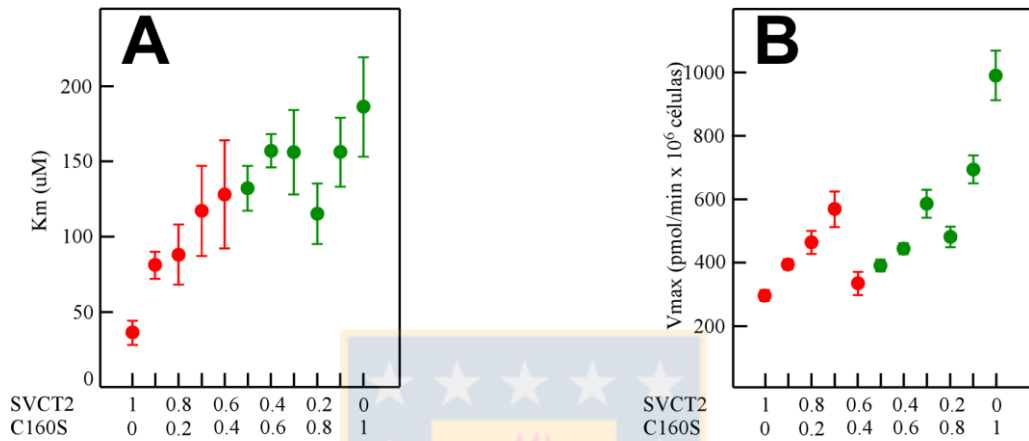


Figura 31. La coexpresión del transportador SVCT2-Flag-His y la proteína mutante GFP-C160S-SVCT2 reveló que ambas proteínas se encuentran interaccionando y que es esta interacción la que modula las propiedades cinéticas del dímero. A. K_m asociadas al transporte de AA en células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-Flag-His y pGFP-C160S-SVCT2 (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 µg DNA respectivamente) **B.** Velocidades máximas asociadas al transporte de AA en células HEK-293 cotransfectadas con diferentes razones moleculares de pSVCT2-Flag-His y pGFP-C160S-SVCT2 (1:0; 0,9:0,1; 0,8:0,2; 0,7:0,3; 0,6:0,4; 0,5:0,5; 0,4:0,6; 0,3:0,7; 0,2:0,8; 0,9:0,1 y 0:1 µg DNA respectivamente). Se utilizó un rango de concentraciones de AA desde 5 a 500 µM en un ensayo de transporte de 5 minutos a 37°. Todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron 48 hrs post-transfección.

Tabla VII. K_m aparente y velocidad máxima de transporte asociada con el transporte de AA mediado por células HEK-293 que coexpresan SVCT2-RED y la mutante C160S-SVCT2-GFP en distintas proporciones moleculares (μg de plásmido transfectado respectivamente).

SVCT2 : C160S (μDNA)	K_m (μM)	$V_{\text{máx}}$ ($\text{pmol}/\text{min} \times 10^6 \text{ cels}$)
1,0 : 0,0	36 ± 8	295 ± 17
0,9 : 0,1	81 ± 9	394 ± 15
0,8 : 0,2	88 ± 20	462 ± 36
0,7 : 0,3	117 ± 30	567 ± 56
0,6 : 0,4	128 ± 36	333 ± 37
0,5 : 0,5	132 ± 15	389 ± 18
0,4 : 0,6	157 ± 11	443 ± 13
0,3 : 0,7	156 ± 28	584 ± 44
0,2 : 0,8	115 ± 20	480 ± 32
0,1 : 0,9	156 ± 23	693 ± 44
0,0 : 1,0	186 ± 33	989 ± 78

Los datos de transporte fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar de los experimentos realizados en triplicado.

13. DISCUSIÓN

En esta tesis realicé un estudio detallado destinado a establecer la posible estructura cuaternaria del transportador de ácido ascórbico SVCT2. Este estudio tiene como objetivo final establecer si el transportador SVCT2 se encuentra en la membrana formando un oligómero, cuál es la estequiometría de dicho oligómero (dímero, trímero, tetrámero, etc.), si los monómeros dentro del putativo oligómero son capaces de interactuar entre ellos modulando las propiedades cinéticas del transporte y cuál sería la unidad mínima de transporte dentro del oligómero.

SVCT2 pertenece a la familia de transportadores de nucleobases (Nucleobase-Ascorbate Transporter family, NAT o Nucleobase-Cation Symporter family, NCS-2) (Faaland y *col.*, 1998; Meintanis y *col.*, 2000). La información publicada sobre la estructura y función de SVCT2 está limitada a estudios de expresión en células y tejidos, modificaciones post-traduccionales, regulación de la expresión a nivel de mRNA y proteína, mecanismo de transporte e importancia de residuos de aminoácidos específicos para su actividad (Bürzle y *col.*, 2007; Daruwala y *col.*, 1999; Sotiriou y *col.*, 2002; Maulen y *col.*, 2003; Subramanian y *col.*, 2004; 2004; Rumsey y *col.*, 1997; Tsukaguchi y *col.*, 1999; Godoy y *col.*, 2007). Sin embargo, no existen antecedentes publicados sobre la estructura cuaternaria de SVCT2, no se sabe si este se encuentran como monómero en la membrana, o si se encuentran formando complejos macromoleculares al transportar los sustratos al interior de la célula.

La reciente disponibilidad de estructuras cristalográficas de rayos-X de proteínas de membrana ha permitido realizar numerosos avances en el entendimiento de los sistemas de transporte. Es así como dentro de las proteínas de membrana que han sido cristalizadas hasta la fecha, se encuentran la permeasa de lactosa/protones LacY (Abramson y *col.*, 2003, Guan y *col.*, 2007) el transportador de glicerol-3-fosfato GlpT (Huang y *col.*, 2003) y el transportador de multidrogas EmrD (Yin et al., 2006), transportador de glucosa GLUT1, (Deng y *col.*, 2014) pertenecientes a la MFS; el transportador de leucina acoplado a sodio (LeuT) de la familia NSS (Yamashita y *col.*, 2005), el simportador de sodio/hidantoina Mhp1 de la familia NCS1 (Shimamura y *col.*, 2010, Weyand y *col.*, 2008), y el más reciente cristalizado, el transportador de uracilo acoplado a protones, UraA de la familia NAT/NCS-2 (Lu y *col.*, 2011), dentro de la cual se ha clasificado al transportador de sodio/ascorbato SVCT2. Todos estos estudios cristalográficos (Purhonen y *col.*, 2005; Abramson y *col.*, 2003; Huang y *col.*, 2003; Yin y *col.*, 2006) permitieron corroborar que los transportadores pertenecientes a la MFS a pesar de su baja identidad de secuencias (inferior al 14%) poseen un plegamiento tridimensional similar, lo que llevó a proponer un modelo de plegamiento común compuesto de 12 STM y con una doble pseudosimetría a lo largo del eje mayor de la proteína para todos los transportadores pertenecientes a esta familia de proteínas (Hirai y *col.*, 2002, Hirai y *col.*, 2003). Basados en la propuesta de que los distintos miembros de la familia presentan un plegamiento 3D común, este modelo común de plegamiento ha sido utilizado para la construcción de modelos 3D de proteínas pertenecientes de la MFS como por ejemplo la estructura 3D de GLUT1 a partir del cristal del transportador glicerol-3-

fosfato de *E. coli* (Salas-Burgos y *col.*, 2004), modelo compuesto por 12 STM que puede ser comparado con la reciente estructura cristalina del transportador GLUT1 obtenida a 3,2 Å de resolución (Deng y *col.*, 2014),

La cristalización del transportador de uracilo de *E. coli*, UraA perteneciente a la familia NCS-2 (Lu y *col.*, 2011), ha permitido generar un modelo por difracción de rayos X que presenta 14 STM para este transportador, modelo que de acuerdo a lo descrito anteriormente sería homologable al resto de los miembros de esta familia, entre ellos los SVCTs. Recientemente, fue publicado el modelo 3D del transportador de ácido úrico y xantinas acoplado a H⁺, UapA a partir de la estructura cristalina de UraA (Costi y *col.*, 2012), ambos pertenecientes a la familia de proteínas NCS-2, la que se caracteriza por presentar una secuencia aminoacídica o firma de familia conocida como motivo NAT, [QEP]NxGxxxxT[RKG], la cual está compuesta por 10 aminoácidos (Koukaki y *col.*, 2005; Koning y Diallinas, 2000), en SVCT2 este motivo NAT se encuentra ubicada entre los aminoácidos 443 y 452 y corresponde a la secuencia PNIGVLGITK. De acuerdo a los antecedentes presentados anteriormente, en nuestro laboratorio se construyó un modelo 3D in silico del transportador SVCT2 por homología estructural con la estructura 3D transportador de uracilo acoplado a protones (UraA) (Lu y *col.*, 2011, Tesis Doctoral Salas-Burgos, 2011). Este modelo contempla la presencia de 14 STM con estructuras de alfa-hélice, los que están organizados en dos repeticiones invertidas (STM I – STM VII y STM VIII - STM XIV) relacionados mediante una rotación de alrededor de 180°. En forma similar a UraA, el nuevo modelo de SVCT2 presenta una topología donde destaca la presencia de tres grupos de hélices: las hélices que forman el canal central (I, II,

III, VIII, IX y X), cuatro hélices accesorias (VI, VII, XIII y XIV) las cuales junto a las hélices V y XII formarían el dominio de compuerta del transportador y cuatro hélices de acople entre los dominios (IV, V, XI y XII). Sin embargo, a pesar de que filogenéticamente los SVCTs pertenecen a la familia NCS-2 y que la estructura de UraA presenta 14 STM, hasta la fecha, los modelos publicados para los SVCTs los cuales se han generado partir de análisis de hidrofobicidad, muestran una posible estructura secundaria compuesta por 12 STM, con los extremos amino y carboxilo terminal del transportador localizados en el lado citoplasmático de la membrana celular (Bürzle y col., 2013; Faaland y col., 1998; Liang y col., 2001).

La oligomerización es una característica esencial para la estructura y función de muchos de los transportadores de membrana (Veenhoff y col., 2002; Padan, 2008). Las estructuras cristalográficas de transportadores secundarios acoplados a sodio revelan que estos transportadores existen como oligómeros de alto orden, por ejemplo, el transportador de glutamato GltPh perteneciente a la familia de cotransportadores dicarboxilato/aminoácido:cación (DAACS) (Yernool y col., 2004) y el simporter sodio/sustrato miembro de la familia de transportadores de betaina/colina/carnitina, BetP (Tsai y col., 2011) existen como homotrímeros, el antiporter Na^+/H^+ NhaA de *E. coli* (Hunte y col., 2005), el transportador bacteriano de leucina LeuT de la familia de cotransportadores neurotransmisores/sodio (NSS) (Yamashita y col., 2005), el simporter sodio/galactosa vSGLT (Faham y col., 2008) y el transportador AdiC (Fang y col., 2007) que es un importante componente del sistema de resistencia a ácidos en enterobacterias, se organizan como homodímeros. Por otro lado, también se han reportado estructuras monoméricas,

como es el caso del transportador de bencilo/hidantoina Mhp1 (Weyand y col., 2008).

Debido a que las proteínas transportadoras de membrana son difíciles de estudiar a nivel estructural y funcional, por problemas en la sobreexpresión, estabilidad, conservación del plegamiento nativo, purificación y cristalización (Caffrey, 2003). Se han desarrollado diversos métodos indirectos para obtener información acerca de la estructura cuaternaria de estas proteínas, entre los que se encuentran geles nativos de poliacrilamida, entrecruzamiento con diversos reactivos químicos, coinmunoprecipitación y copurificación, estructura cristalina en dos dimensiones, complemento de función, microscopía de criofractura, FRET, cromatografía de exclusión de tamaño, entre otras. Es así como se pudo determinar que el transportador NhaA funciona como un dímero (Gerchman y col., 2001) mediante el uso combinado de ensayos de microscopía crioelectrónica en cristales en dos dimensiones (2D) (Williams y col., 1999; Williams y col., 2000), estudios de complemento de función entre mutantes letales a alto pH y concentraciones de Na⁺, coinmunoprecipitación y entrecruzamiento intermolecular (Gerchman y col., 2001) y resonancia paramagnética electrónica (Hilger y col., 2005; Hilger y col., 2007). La cristalización del transportador reveló que efectivamente NhaA existe como un dímero en membrana de *Escherichia coli* (Hunte y col., 2005), lo que permitió validar los métodos indirectos para el estudio de la estructura cuaternaria de proteínas.

Con respecto a los transportadores de AA, en año 2013 se estableció mediante estudios de microscopía electrónica acoplado a ensayos de entrecruzamiento químico, que el transportador SVCT1 humano presenta un

estado de oligomerización mixto entre monómero y homodímero (Boggavarapu y *col.*, 2013).

Sin embargo, hasta la fecha no existen antecedentes publicados acerca de la estructura cuaternaria del transportador SVCT2. Ante la carencia de información, nos propusimos realizar un análisis del estado de oligomerización de SVCT2. La factibilidad de esta tesis se basa en el abundante número de transportadores de membrana que han sido estudiados mediante este tipo de metodologías, entre los que se encuentran ensayos de entrecruzamiento y coexpresión de proteínas nativas y mutantes.

En la presente tesis se utilizaron ensayos de entrecruzamiento, coexpresión de proteínas nativas y mutantes y de función para dilucidar la estructura cuaternaria del transportador SVCT2 metodologías que han sido utilizados para el análisis de otros transportadores. Con este propósito, utilizamos como modelo de estudio células HEK-293 que expresan bajos niveles de SVCT2 endógeno, y células HEK-293 transfectadas sobreexpresando distintas formas del transportador SVCT2. Las distintas formas de SVCT2 utilizadas correspondieron a proteínas quiméricas en las cuales SVCT2 se encontraba fusionada a moléculas reporteras tales como péptidos antigénicos (Flag-His, HA) o proteínas fluorescentes (GFP y RED), La fusión a distintas proteínas fluorescentes o epítopes permitió el reconocimiento este transportador por técnicas de inmunocitoquímica, microscopía confocal y westerblot al ser sobreexpresadas en dicha línea celular. Además de SVCT2 nativo como parte de las proteínas quiméricas, utilizamos 3 mutantes de SVCT2, H109, C113 y C160. La mutante H109 corresponde a un mutante de SVCT2 inactivo que ha perdido la capacidad

para transportar el AA. Las mutantes C113 y C160 corresponden a SVCT2 mutantes con una K_m de transporte de AA alterada (244 ± 9 y $143 \pm 22 \mu\text{M}$, respectivamente). Todas las proteínas quiméricas (con SVCT2 nativo y mutantes) fueron ensayadas por su capacidad para transportar AA y su localización subcelular. La gran eficiencia de transfección de las células HEK-293 permite que los niveles basales de transporte, debido al transportador endógeno, sean muy bajas, lo que permite estudiar sin problemas la función de los transportadores sobreexpresados.

En una primera etapa se realizaron ensayos de entrecruzamiento con distintos reactivos químicos en las células *in situ*, lo que nos permitió evaluar el estado oligomérico de SVCT2 expresado endógenamente en diferentes líneas celulares humanas y en las distintas quimeras de SVCT2 sobreexpresados en células HEK-293. En una segunda etapa se realizaron ensayos de transporte de AA en células que coexpresan un par SVCT2 + SVCT2 mutado, y se evaluó como se afectan los parámetros cinéticos como consecuencia de la posible interacción entre ambos transportadores.

Los ensayos de entrecruzamiento químico en células *in situ* sugieren que SVCT2 endógeno se encontraría en distintas células formando oligómeros conteniendo al menos dos subunidades, es decir, en la forma de un dímero, y obtuvimos también evidencia preliminar de la formación de oligómeros de orden superior. Concordante con lo anterior, también observamos que distintas formas de SVCT2 sobreexpresado en células HEK-293, incluyendo mezclas de SVCT2 quiméricos y mutados, se encuentran en las células *in situ* en forma de dímeros, lo que sugiere que SVCT2 sobreexpresado también se encuentra como oligómeros

de dos subunidades. Los resultados funcionales obtenidos de la coexpresión de mezclas de pares de diferentes formas del transportador con distintas propiedades cinéticas también sugieren la formación de heterodímeros, que en el heterodímero la unidad mínima de transporte es el monómero, que los hetero-monómeros dentro del dímero son capaces de interactuar entre ellos, y que las propiedades cinéticas de transporte del dímero son moduladas en un orden jerárquico que depende de la abundancia relativa de los distintos hetero-monómeros dentro del dímero.

Las quimeras de SVCT2 conservaron intactas las propiedades funcionales de SVCT2.

Como se comentó anteriormente, las formas de SVCT2 utilizadas durante el desarrollo de esta tesis incluyeron SVCT2 quiméricos fusionados a moléculas reporteras tales como péptidos antigénicos (Flag-His, HA) o proteínas fluorescentes (GFP y RED), que fueron sobreexpresados en células HEK-293. Así las quimeras utilizadas durante el desarrollo de la presente tesis fueron: SVCT2-Flag-His, SVCT2-HA, SVCT2-GFP, SVCT2-RED y GFP-SVCT2. La utilización de proteínas quiméricas en fusión con GFP ha sido validado en múltiple sistemas, incluyendo su utilización como molécula reportera para identificar, verificar el nivel de expresión, localizar subcelularmente proteínas de interés (Berg y Beachy, 2008; Maue, 2007) y estudiar la dinámica de proteínas en células vivas (Ashby y *col.*, 2004; Kumar y *col.*, 2006; Takanishi y *col.*, 2006). Si bien estos estudios han revelado que en la mayoría de los casos la proteína fusionada a GFP mantiene

tanto su función como su distribución subcelular, es igualmente necesario establecer que la proteína fusionada a los diferentes epítopes mantiene las propiedades de la proteína original, en este caso SVCT2. En el caso de las quimeras SVCT2-Flag-His, SVCT2-HA, SVCT2-GFP, GFP-SVCT2 y SVCT2-RED, se estudiaron 4 parámetros experimentales para examinar el grado de conservación de la función de SVCT2, considerando las características principales ya conocidas en células que expresan endógenamente el transportador. Estos parámetros fueron: localización subcelular, capacidad para transportar AA, valor de la K_m de transporte de AA y activación cooperativa por Na^+ del transporte de AA.

i y ii) La localización de las quimeras de SVCT2 fue preferencialmente a nivel de membrana plasmática y se correlacionó con un aumento equivalente de la capacidad de las células para transportar AA. El análisis por fluorescencia de los experimentos de transfección e inmunocitoquímica reveló expresión de las quimeras en más de un 85% de las células HEK-293 transfectadas. La localización subcelular de las quimeras fue examinada por microscopía confocal, realizando múltiples cortes ópticos a diversos niveles en el plano z (eje-y) de la célula. Los resultados revelaron que la fluorescencia estaba fundamentalmente localizada a nivel de la membrana plasmática, demostrada por su colocalización con GLUT1, lo que es consistente con la propuesta de que la fusión a los epítopes no afectó el destino subcelular esperado para SVCT2. La actividad funcional de las quimeras fue examinada realizando ensayos de transporte de AA en condiciones de velocidad inicial, con resultados que indicaron un aumento de aproximadamente 8 veces en la velocidad de transporte de AA en las células transfectadas

sobreexpresando independientemente cada uno de los constructos, comparado con células control transfectadas en forma paralela bajo las mismas condiciones experimentales y expresando solamente GFP. Concluimos que la fusión con los epítopes Flag-His, HA, GFP o RED no alteró la correcta localización subcelular ni la capacidad de transportar AA de SVCT2.

iii) El valor de las K_m s de transporte de AA obtenido para las quimeras fue similar a aquella observada para SVCT2 nativo. Un análisis de los experimentos realizados en células expresando las distintas quimeras en forma individual permitió determinar valores de K_m s de transporte de AA en el rango de 27-46 μ M. Estos valores están en absoluta concordancia con el valor de la K_m de transporte de AA determinado en el caso de SVCT2 expresado endógenamente en diversos tipos celulares. Si bien hay valores en bibliografía que señalan una K_m para SVCT2 de 70 μ m (Rajan y *col.*, 1999), estudios realizados en nuestro laboratorio en al menos 10 sistemas celulares distintos nos indican que la K_m de transporte para SVCT2 se encuentra en el rango 15-35 μ M, dependiendo de la línea celular utilizada. Concluimos que la fusión a los distintos epítopes no alteró la K_m de transporte de ácido ascórbico de SVCT2.

iv) En las quimeras analizadas se observó una activación cooperativa por Na^+ del transporte de AA. Una propiedad fundamental de los transportadores de AA es su capacidad para ser activados en la presencia de Na^+ . Así, diversos estudios utilizando modelos celulares que expresan SVCT2 en forma endógena o SVCT2 clonado y sobreexpresado en sistemas de expresión exógenos, han establecido que el Na^+ activa el transporte de AA en forma cooperativa (Daruwala y *col.*, 1999; Rajan y *col.*, 1999), con un coeficiente de Hill (n_H) cercano a dos y un valor de

Na^{+50} de 35 mM (Daruwala *y col.*, 1999; Faaland *y col.*, 1998; Rajan *y col.*, 1999; Tsukaguchi *y col.*, 1999; Wang *y col.*, 1999; Wang *y col.*, 2000). En el caso de las quimeras sobreexpresadas individualmente en las células HEK-293 se obtuvieron valores de n_H de alrededor de 2 y valores de Na^{+50} de alrededor de 35 mM. En nuestro laboratorio hemos analizado esta propiedad de SVCT2 con todo detalle, confirmando los valores de del coeficiente de Hill ($n_H \approx 2,0$) y de Na^{+50} ($35 \approx \text{mM}$) (Godoy *y col.*, 2007). Con estos datos concluimos que la fusión de los epítopes no alteró las propiedades de la activación cooperativa por el Na^+ del transporte de AA en SVCT2, manteniéndose inalterados los valores del n_H y el Na^{+50} .

En su conjunto, los antecedentes discutidos en los párrafos anteriores permitieron establecer que las distintas quimeras de SVCT2, SVCT2-Flag-His, SVCT2-HA, SVCT2-GFP, SVCT2-RED y GFP-SVCT2 conservaron las propiedades funcionales del SVCT2, incluyendo una destinación subcelular hacia la membrana plasmática, una K_m de transporte de alrededor de 35 μM , y la activación cooperativa por Na^+ con un n_H cercano a 2 y un Na^{+50} de aproximadamente 30 mM. Todo esto pese a la gran diferencia en los tamaños de los epítopes utilizados (el epítipo Flag-His está constituido por 31 aminoácidos, el epítipo HA está constituido por 9 aminoácidos, GFP está constituido por 238 aminoácidos y DsRED está constituido por 225 aminoácidos) y la localización en la que fue fusionado el epítipo o la proteína fluorescente al transportador SVCT2 (amino o carboxilo terminal).

SVCT2 endógeno y las quimeras del transportador SVCT2 forman oligómeros en membranas celulares.

Las interacciones entre proteínas son transitorias o estables, sin embargo, el estudio de estas interacciones se dificulta generalmente por las condiciones denaturantes de los sistemas experimentales. El entrecruzamiento es el proceso de unión química de dos o más moléculas mediante un enlace covalente; los reactivos de entrecruzamiento pueden proporcionar los medios para conservar las interacciones entre dos o más proteínas ya que contienen en sus extremos grupos reactivos para grupos funcionales específicos (aminas primarias, sulfidrilos, etc.) de proteínas u otras moléculas. Es debido a estas razones que los ensayos de entrecruzamiento son uno de los métodos más frecuentemente empleados para estudiar interacciones de proteínas en un sistema biológico. Por ejemplo, en el transportador de dopamina DAT, la existencia de dímeros y tetrámeros fue demostrada a través de ensayos de entrecruzamiento con agentes oxidantes (Hastrup y col., 2001; Hastrup y col., 2003). Por otro lado, estudios de entrecruzamiento y aislamiento de polipéptidos marcados diferencialmente, han revelado que el transportador de serotonina SERT forma oligómeros en membrana (Jess y col., 1996; Kilic y col., 2000). Estos ensayos junto a muchos otros han llevado a proponer que si bien la unidad funcional de los transportadores de neurotransmisores dependientes de Na^+/Cl^- (SCL6a) parece ser un monómero, ellos se encuentran formando dímeros dentro de la membrana plasmática (Farhan y col., 2006).

Considerando estos antecedentes, en primer lugar se quiso establecer si SVCT2 forma oligómeros en membranas celulares y cuál es la estequiometría de

estos oligómeros. Para ello como primera aproximación se realizaron estudios de entrecruzamiento con paraformaldehído (PFA) en tres líneas celulares humanas que expresan endógenamente el transportador SVCT2, la línea celular de riñón embrionario humano HEK-293, la línea celular de cáncer de próstata DU-145, y la línea celular de cáncer de mama MCF-7. El PFA es la forma polimerizada del formaldehído por lo que no se conoce su largo de entrecruzamiento, sin embargo, este reactivo reacciona con el grupo amino de la lisina a través de una reacción amina-formaldehído. Así, las células fueron incubadas con el agente entrecruzante seguido por solubilización y homogenización celular, fraccionamiento de las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, transferencia a membranas de PDVF e inmunodetección con anticuerpos específicos para cada forma del transportador.

En células incubadas en ausencia del agente entrecruzante PFA, el transportador se presentó como monómero debido a las condiciones denaturantes del sistema de separación electroforética, como por ejemplo, el uso de detergentes fuertes, agentes reductores y altas temperaturas. Por otro lado, el patrón de entrecruzamiento de SVCT2 *in situ* en las distintas líneas celulares humanas tratadas con concentraciones crecientes de PFA, mostró una predominancia para la formación de dímeros entrecruzados; con una disminución progresiva de estos productos de entrecruzamiento dimérico, a partir de los cuales se formaron especies de tipo tetraméricas y oligoméricas de orden superior (esto a mayores concentración de agente entrecruzante). Este patrón podría resultar de un ensamblaje oligomérico heterogéneo de SVCT2 en las membranas, o alternativamente del entrecruzamiento complejo producto de las colisiones

aleatorias entre los dímeros de SVCT2 ya formados. Esto debido a que como SVCT2 se encuentra embebido en la membrana de las células, la proteína es libre para difundir lateralmente en el plano de la bicapa lipídica, experimentando una frecuencia de colisiones entre dímeros ya existentes. En este sentido, las estructuras oligoméricas de orden superior que se observaron, serían el producto de la suma de entrecruzamiento intermoleculares entre los dímeros presentes en la membranas celulares. Otra posible causa de estas estructuras oligoméricas de orden superior es que el PFA como ya se comentó anteriormente, no tiene un largo de entrecruzamiento definido, debido a que es la forma polimerizada del formaldehído por lo que podría estar uniendo proteínas que se encuentran separadas a una mayor distancia.

Los resultados obtenidos en esta parte de nuestro estudio sugieren que las estructuras oligoméricas de SVCT2 son independientes de la línea celular utilizada, indicando que el estado de oligomerización de SVCT2 sería independiente del contexto celular donde se estudie, ya que ensayos de entrecruzamiento con PFA en tres líneas celulares distintas (HEK-293, DU-145 y MCF-7) que provienen de distintos tejidos mostraron el mismo patrón de entrecruzamiento.

La existencia del estado dimérico de SVCT2 fue apoyado por los ensayos de entrecruzamiento con PFA realizados sobre distintas quimeras del transportador (SVCT2-Flag-His, SVCT2-HA, SVCT2-GFP y GFP-SVCT2) sobreexpresados en células HEK-293, donde se observó sólo la existencia de bandas de proteína del tamaño esperado para monómeros y dímeros del transportador. Al igual que el caso del transportador endógeno, la detección del

dímero de las quimeras de SVCT2 fue dependiente de la concentración de PFA utilizada, del tiempo de tratamiento con PFA y de la temperatura de incubación. Estos resultados eran los esperados dado que si las quimeras de SVCT2 forma dímeros específicos, entonces la interface de una molécula debería consecuentemente estar ya ocupada, impidiendo la formación de productos oligoméricos de orden superior. Esto es apoyado por ensayos biofísicos, bioquímicos y estructuras cristalinas de diferentes transportadores, donde se ha revelado, que la superficie de interacción ocurre en STM específicos y no son interacciones al azar, por ejemplo, en el transportador de leucina LeuT, la interface de dimerización está formada por el lazo extracelular 2, el STM 9 y el STM 12, donde estos dos últimos STM, juntos a sus dos compañeros de simetría forman un dominio de interacción de 4 hélices (Yamashita *y col.*, 2005) o en el transportador de dopamina DAT cuyo tratamiento oxidativo produce dímeros y tetrámeros debido a la formación de un puente disulfuro intermolecular entre los residuos de cisteínas 243 y 246 localizados en los STM 4 y el lazo 3, respectivamente (Hastrup *y col.*, 2001; Hastrup *y col.*, 2003). Así también como sucede en el transportador del neurotransmisor GABA, GAT1, donde se ha identificado que la interface de dimerización corresponde al STM 2 y se ha observado que la destrucción del motivo de siete leucinas y la sustitución de residuos de aminoácidos polares causaron retención del transportador y la pérdida de la señal de FRET (Scholze *y col.*, 2002; Korkhov *y col.*, 2004).

Los ensayos de entrecruzamiento con PFA fueron confirmados con dos agentes entrecruzantes bifuncionales de apertura de brazos específica, lo que reduce la inespecificidad en la formación de estructuras oligoméricas producto de

interacciones de largo alcance como podría ser el caso del PFA. DSS (disuccinimidyl suberate) es un éster homobifuncional de N-hidroxisuccinimida (NHS-éster) insoluble en agua y BS3 (bis(sulfosuccinimidyl)suberate) es su análogo soluble en agua. Estos tipos de éster reaccionan eficazmente con grupos de aminas primarias (-NH₂) presentes en la cadena lateral de la lisina para formar enlaces amida estables. Ambos reactivos tienen un largo de entrecruzamiento de 11.4 Å, sin embargo, DSS al ser permeable a la membrana plasmática es útil para estudiar interacciones de proteínas tanto en membrana como en el interior de la célula, por el contrario, BS3 al ser impermeable, es útil en el estudio de interacciones solo a nivel de membrana plasmática.

Los resultados obtenidos para la oligomerización de las quimeras de SVCT2 con DSS y BS3 fueron similares a los observados con PFA, es decir, en células incubadas en ausencia de agente entrecruzante el transportador se visualizó como un monómero debido a las condiciones denaturantes del sistema experimental. Por otro lado, en células tratadas con DSS o BS3 monómeros y dímeros fueron detectados. Además se observó que la cantidad de dímero detectado fue dependiente de la concentración de agente entrecruzante utilizado, al igual que lo que sucedió con PFA.

En consecuencia, se concluye que los productos de entrecruzamiento observados estuvieron muy lejos de representar agregaciones de tipo inespecífico, debido a que la solubilización del transportador en detergente y la ejecución de los ensayos de entrecruzamiento a concentraciones bajas de agente entrecruzante, sirvió para reducir la probabilidad de que los productos entrecruzados resultaran

de colisiones accidentales y aleatorias entre dímeros existentes en las membranas de las células.

La formación de dímeros en todas las quimeras del transportador SVCT2 analizadas (SVCT2-Flag-His, SVCT2-HA, SVCT2-GFP y GFP-SVCT2) por los tres agentes entrecruzantes (PFA, DSS y BS3) fue incompleta, es decir, a ninguna concentración de agente entrecruzante ensayada se logró el 100% de entrecruzamiento del transportador. Sin embargo, para SVCT2-Flag-His, SVCT2-HA y SVCT2-GFP si se observó un aumento en la intensidad de la banda del dímero a medida que aumentó la concentración del agente entrecruzante utilizado, lo que no fue acompañado de una disminución de la banda del monómero. Por otro lado, sólo en la quimera GFP-SVCT2 se observó una disminución en la intensidad de la banda del monómero a las dos concentraciones mayores de los agentes entrecruzantes ensayadas. Esta quimera es la única en que el transportador SVCT2 fue intervenido en el extremo amino terminal de la proteína lo que sugiere que el extremo carboxilo terminal puede estar involucrado en el proceso de dimerización del transportador.

Todos los datos de entrecruzamiento de las quimeras son relevantes ya que posteriormente las distintas variantes de SVCT2 fueron utilizadas para confirmar la estequiometría del oligómero y estudiar la interacción entre los monómeros dentro del dímero a través de ensayos de transporte de AA.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se construyó un modelo de plegamiento 3D del transportador SVCT2 utilizando como molde molecular la estructura cristalina del transportador de uracilo, UraA ya que ambos transportadores pertenecen a la familia de cotransportadores de nucleobase/

catión 2, familia para la cual que se ha propuesto un arreglo tridimensional similar (Lu y col., 2011). SVCT2 estaría formado por 14 STM conectados por lazos exo y endofaciales hidofílicos de distinto tamaño, la vía de translocación del AA a través del transportador está delimitada por un grupo de ocho STM (I-IV, VIII-IX), las cuales están asociadas con dos STM denominados de acople (STM IV, V, XI y XII) que permiten la interacción con el dominio compuerta formado de cuatro STM (VI, VII, XIII y XIV) que actúan como filtro de selectividad (Salas-Burgos, Tesis doctoral 2012). Este modelo sugiere que en la interface de dimerización de SVCT2 pueden estar involucrados los STM 6, 7, 13 y/o 14 (extremo carboxilo terminal de SVCT2), la participación del STM 14 es sugerido también por los ensayos de entrecruzamiento que revelaron que tres quimeras donde el transportador fue intervenido en el extremo carboxilo terminal no se observó una disminución en la banda del monómero, por lo que los epítopes fusionados en este extremo podrían estar influyendo en la dimerización del transportador. Esta sugerencia también es apoyada por la evidencia que la intervención del transportador en extremo el amino terminal si se acompañó de una disminución del monómero y un aumento del dímero en los ensayos de entrecruzamiento.

Ha sido descrito para varios transportadores que la interface de oligomerización involucra STM específicos, como por ejemplo, el transportador de glucosa GLUT1 para el cual, a través de estudios de unión a ligando, entrecruzamiento químico y ensayos hidrodinámicos se ha propuesto que es un homotetrámero, en el cual cada subunidad es una vía de transporte funcional (Hebert y Carruthers, 1992; Zottola y col., 1995). Ensayos utilizando quimeras de GLUT1 con GLUT3 han permitido proponer que el STM 9 de GLUT1 participa en

el proceso de tetramerización y que los STM 2, 5, 8 y 11 contribuyen a la dimerización del transportador (Zutter y *col.*, 2013). Del mismo modo una posible interface de oligomerización ha sido identificada en el STM 2 de GAT1, donde se ha observado que la destrucción del motivo de siete leucinas y la sustitución de residuos de aminoácidos polares en el mismo STM causaron retención del transportador y la pérdida de la señal de FRET (Scholze y *col.*, 2002; Korkhov y *col.*, 2004).

Todos los estudios de entrecruzamiento realizados, utilizando diferentes agentes químicos bifuncionales sugieren la existencia del transportador SVCT2 bajo un arreglo cuaternario de tipo dimérico. Sin embargo, para conocer los STM que forman parte de la interface de oligomerización es necesario realizar ensayos más específicos, por ejemplo, quimeras del transportador SVCT2-SVCT1, deleciones o mutaciones de segmentos del transportador que forman parte de la interface de oligomerización, etc.

Los monómeros dentro del dímero de SVCT2 son capaces de interactuar entre ellos modulando las propiedades cinéticas del transporte.

Como los resultados de entrecruzamiento sugirieron que la estructura cuaternaria del transportador SVCT2 localizado a nivel de membrana corresponde a un oligómero constituido por dos subunidades de SVCT2 (un dímero), se quiso responder a través de ensayos funcionales si los monómeros de SVCT2 en el dímero interactúan entre ellos modulando las propiedades cinéticas del transporte del complejo dimérico.

La coexpresión simultánea de proteínas mutantes y nativas es una técnica muy utilizada para estudiar interacción entre proteínas, ya que la supresión de la actividad de transporte por una mutante inactiva coexpresada con la nativa (dominancia negativa) o restauración de la actividad de transporte por coexpresión de dos mutantes inactivas (complemento de función) puede proveer evidencia de la organización oligomérica. Esta estrategia ha sido usada para estudiar el transportador de tetraciclina acoplado a H^+ Tet que media la resistencia a tetraciclina en bacterias gram negativas. La forma del transportador Tet(B) está compuesta por dos dominios α y β que corresponden a la mitad N y C terminal respectivamente, ambos dominios son requeridos para que el transportador sea funcional. Un ensayo reveló que dos proteínas inactivas, cada una conteniendo una mutación en dominios opuestos de Tet(B), fueron capaces de complementar su función y mediar la resistencia a tetraciclina en bacterias gram negativas (Rubin, R y Levy, 1991).

Para examinar el efecto de la oligomerización sobre las características funcionales de SVCT2 se desarrollaron variantes de SVCT2 por mutagénesis sitio dirigida. Los residuos de aminoácidos mutados fueron histidina 109, que forma parte del sitio de unión a AA, y cisteínas 113 y 160 que son dos residuos que participan en cambios conformacionales importantes durante el ciclo de transporte de AA/ Na^+ pero que no forman parte del sitio de unión a sustrato, estos antecedentes se detallan durante el transcurso de esta discusión. Las mutantes simples de estos residuos se expresaron a nivel de membrana celular del mismo modo que el transportador no mutado al ser sobreexpresadas en células HEK-293, pero presentaron cambios importantes en sus propiedades cinéticas. Si nuestra

propuesta que las subunidades dentro del oligómero interaccionan entre ellas es correcta y se forman oligómeros mixtos, deberíamos observar alteraciones en las propiedades funcionales del hétero-oligómero SVCT2-SVCT2_{mutante}, por supuesto dependiente del tipo de mutante utilizado.

Si recapitulamos lo que se observó acerca de las propiedades cinéticas y funcionales de SVCT2 sobreexpresado en células HEK-293, ya sea como SVCT2 nativo o la quimera SVCT2-GFP, se puede resumir en los siguientes puntos: 1) un valor de K_m aparente para el transporte de AA cercana a 35 μM ; 2) activación cooperativa por Na^+ con un Na^+_{50} de aproximadamente 35 mM; 3) sobreexpresión asociada a una localización a nivel de la membrana plasmática y prácticamente ausencia de retención a nivel intracelular. Estas propiedades fueron examinadas para establecer la funcionalidad de los oligómeros mixtos ensayados. Nuestras proteínas mutantes de SVCT2 construidas pueden ser clasificadas en 2 tipos: i) Mutantes tipo I (H109Q-SVCT2-GFP); el transportador se localizó a nivel de la membrana plasmática pero fue inactivo, es decir, perdió su capacidad para transportar AA y ii) Mutantes tipo II (C113S-SVCT2-GFP y C160S-SVCT2-GFP); el transportador se localizó a nivel de la membrana plasmática y mostró marcados cambios en la K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de transporte de AA. Estas propiedades cinéticas y funcionales alteradas convirtieron a las proteínas mutantes de SVCT2 en una herramienta fundamental para el estudio de la organización oligomérica del transportador SVCT2.

La coexpresión simultánea de SVCT2-RED y el mutante inactivo H109Q-SVCT2-GFP reveló que cada uno conservó sus propiedades de transporte de ácido ascórbico.

En la presente tesis, analizamos el efecto de la coexpresión simultánea del mutante H109Q-SVCT2-GFP con el transportador nativo SVCT2-RED sobre el transporte de AA. El mutante H109Q-SVCT2-GFP fue clasificado como un mutante tipo I, caracterizado por ser un transportador inactivo localizado a nivel de la membrana plasmática, es decir, perdió su capacidad para transportar AA. Por el contrario, el transportador SVCT2-RED no mutado se localizó a nivel de la membrana plasmática y transporta AA eficientemente.

En los ensayos de coexpresión de SVCT2-RED y H109Q-SVCT2-GFP, el análisis por microscopía confocal reveló que ambos transportadores se encuentran localizados fundamentalmente a nivel de la membrana plasmática, es decir, la localización de ambos transportadores no se vio afectada al ser expresados simultáneamente. Por otra parte los de ensayos de entrecruzamiento con DSS revelaron que la mutante H109Q, al igual que el transportador SVCT2 nativo, se encuentra bajo un arreglo cuaternario de tipo dimérico en células HEK-293.

Considerando las características cinéticas de los transportadores nativo y mutante y suponiendo que ambas proteínas interaccionan al ser coexpresadas simultáneamente en una misma célula, existen tres posibles resultados para este ensayo: i) que la interacción entre ellos permita que SVCT2 restablezca la actividad de transporte de SVCT2 mutante, lo que se traduciría en una velocidad

constante de transporte a todas las razones SVCT2:SVCT2_{mutante} ii) que la interacción entre ellos permita que SVCT2 mutante suprima la actividad de transporte de SVCT2 debido a la interacción entre ellos, lo que se traduciría en una disminución acelerada de la velocidad de transporte a medida que la razón SVCT2:SVCT2_{mutante} disminuye, iii) que aunque ocurra interacción entre ellos SVCT2 no restablezca la actividad de SVCT2 mutante ya que la pérdida de función es irreversible, lo que se traduciría en una disminución de la velocidad de transporte a medida que SVCT2 disminuye, lo que sería independientemente de la razón SVCT2:SVCT2_{mutante} y similar a la velocidad de transporte de SVCT2 expresado en ausencia de SVCT2 mutante (Figura 32).

Los resultados al coexpresar en distintas proporciones moleculares el mutante H109Q-SVCT2-GFP (mutante tipo I), con el transportador no mutado SVCT2-RED revelaron que el transportador nativo no restableció la función de transporte de la proteína mutante, ni la proteína mutante suprimió la actividad de transporte de SVCT2 no mutado, es decir, cada transportador conservó sus propiedades de transporte. Esto se puede explicar porque de acuerdo a la estructura 3D propuesta para el transportador SVCT2 a partir de la estructura cristalina del transportador UraA, que como ya fue comentado al inicio de esta discusión, presenta una topología de 14 STM donde destaca la presencia de tres grupos de hélices: las hélices que forman el canal central (I, II, III, VIII, IX y X), cuatro hélices accesorias (VI, VII, XIII y XIV) las cuales junto a las hélices V y XII formarían el dominio de compuerta del transportador y cuatro hélices de acople entre los dominios (IV, V, XI y XII) (datos no publicados, Tesis Doctoral Alexis Salas 2011), el residuo de aminoácido H109 se encuentra localizado en la cara

hidrofílica de la hélice I, con sus cadenas laterales orientado hacia el canal de transporte central.

En el mutante H109Q-SVCT2-GFP, el residuo de aminoácido histidina fue reemplazado por glutamina que posee propiedades muy distintas, se reemplazó un residuo de aminoácido con carga positiva por uno polar no cargado que si bien conserva el tamaño de la cadena lateral hay pérdida del anillo imidazol. Esto sugiere que este residuo podría ser fundamental para la estabilización de la



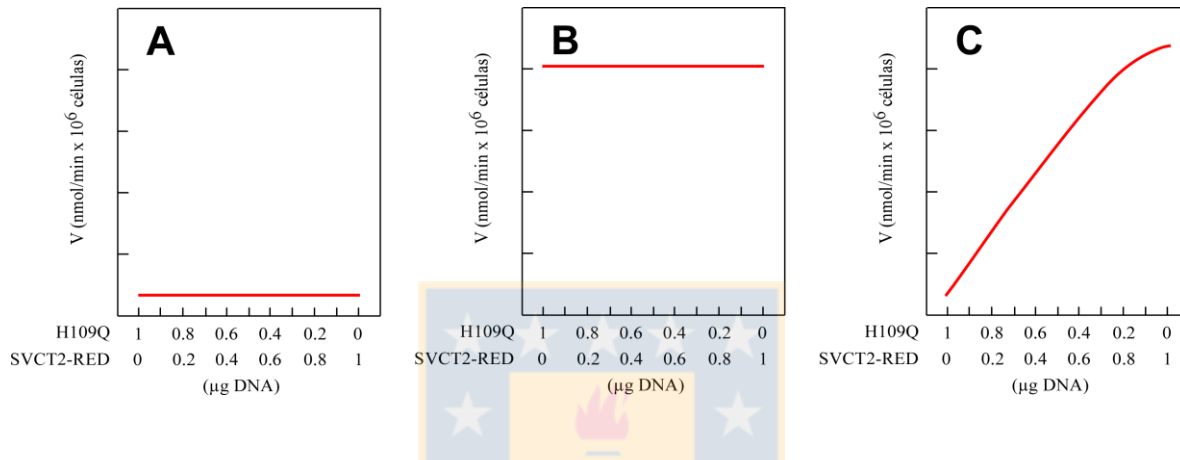


Figura 32: Resultados propuestos para la interacción entre el mutante inactivo tipo I (H109Q-SVCT2-GFP) y el transportador SVCT2 nativo (SVCT2-RED). **A.** Proponemos que en la interacción entre SVCT2-RED y H109Q-SVCT2-GFP, SVCT2 podría reestablecer la actividad de transporte del mutante, lo que se traduciría en una velocidad constante de transporte a todas las razones SVCT2:SVCT2_{mutante} ensayadas. **B.** Proponemos que en la interacción entre ambos transportadores, el mutante de SVCT2 podría suprimir la actividad de transporte de SVCT2, lo que se traduciría en una disminución acelerada de la velocidad de transporte en todas las razones SVCT2:SVCT2_{mutante} ensayadas. **C.** Proponemos que aunque ocurra interacción entre ellos SVCT2 no pueda restablecer la actividad de SVCT2 mutante ya que la pérdida de función es irreversible, lo que se traduciría en una disminución de la velocidad de transporte a medida que SVCT2 disminuye, lo que sería independientemente de la razón SVCT2:SVCT2_{mutante} y similar a la velocidad de transporte de SVCT2 expresado en ausencia de SVCT2 mutante.

estructura local 3D necesaria para la interacción con el sustrato, o que interactuara directamente con el AA. Hay que recordar que SVCT2 es un cotransportador que transporta dos sustratos, Na⁺ y AA, y que el transporte de un sustrato es afectado por la presencia del otro y viceversa. Por lo tanto, una posibilidad que debe tomarse en cuenta es que las mutaciones pudieran abolir la capacidad del transportador para unir Na⁺ y que el efecto sobre el transporte de AA sea secundario a la incapacidad para unir Na⁺. Dado que el mutante de tipo I es totalmente inactivo en el transporte de AA, no fue posible analizar el posible papel del reemplazo de H109 sobre el efecto del Na⁺ sobre el transporte de AA. Sin embargo, la información disponible acerca de las características funcionales de SVCT2 indica que el transportador es completamente inactivo en la ausencia de Na⁺ y que el efecto del ión es activar cooperativamente el transporte de AA asociado a una marcada disminución en la K_m de transporte (Godoy y col., 2007). Por lo que los datos de mutagénesis de H109 fueron interpretados directamente como la pérdida de la capacidad para transportar el AA y no la pérdida de la capacidad de unir el ión sodio (Tesis Doctoral Alexis Salas 2011). Por otro lado, un análisis de alineamiento de secuencia entre los miembros de la familia NCS-2 reveló que el residuo H109 del transportador SVCT2 es altamente conservado en esta familia, su homólogo en la estructura cristalina de UraA, histidina 24 se localiza en el STM1, hélice que forma parte del canal central de dicho transportador (Lu y col., 2011). La importancia del residuo H109 es apoyada por un estudio que se refiere al papel de los residuos de histidina en la función de SVCT2, el cual reveló que solamente la H109, ubicado en la hélice transmembrana I, es esencial para la función de SVCT2 (Varma y col., 2007).

Además se propuso que las histidinas presentes en SVCT2 son importantes elementos estructurales que definen no solamente la sensibilidad de SVCT2 al efecto inhibitorio a pH ácido, sino que además son importantes para mantener las constantes cinéticas de transporte de AA, en este estudio se reveló que el residuo H109 es crucial para la actividad de SVCT2 ya que su sustitución lo transforma en un transportador inactivo (Ormazabal y *col.*, 2010). En este mismo sentido existen antecedentes que señalan que los aminoácidos que interaccionan con el sustrato durante el proceso de transporte son irremplazables, ya que las interacciones que se producen durante el paso del sustrato por el poro son específicas, por ejemplo, para el transportador lactosa permeasa que es probablemente el transportador sobre el que se tiene la mayor cantidad de información estructural y funcional (Kaback y *col.*, 2001), se sabe en base a resultados obtenidos de mutaciones sitio dirigida y ensayos funcionales que los residuos de aminoácidos F20, Q126, R144, W151, E269, N272 interaccionan con el sustrato durante el ciclo de transporte, estos residuos de aminos son irreemplazables, es decir, al ser mutados por cualquier otro residuo el transportador se vuelve totalmente inactivo (Roepe y *col.*, 1989; Sahin-Tóth y *col.*, 1999; Abramson y *col.*, 2003; Guan y Kaback 2006; Kasho y *col.*, 2006). Los aminoácidos que forman parte del dominio de unión a lactosa fueron confirmados por la obtención de la estructura cristalina del transportador lactosa permeasa unido a un análogo del sustrato (Van Iwaarden y *col.*, 1991).

Los ensayos de entrecruzamiento indican que H109Q-SVCT2-GFP mantiene su capacidad para oligomerizar en un dímero, y por lo tanto proponemos que su coexpresión con SVCT2-RED no mutado, llevó a la formación de hetero-

dímeros mixtos conteniendo ambos transportadores. Sin embargo, era esperable que al coexpresar en distintas proporciones moleculares el mutante H109Q-SVCT2-GFP con SVCT2-RED, cada proteína conservara sus propiedades cinéticas. Esto debido a que H109 es esencial para las interacciones entre el transportador y el sustrato durante el proceso de translocación de AA a través del poro acuoso, siendo este transportador un mutante de tipo irrecuperable con respecto a su función de transporte. Hay que recordar que las interacciones sustrato-transportador son específicas y es posible que al mutar el residuo de histidina por el de glutamina los cambios de carga y distancias de la cadena lateral del residuo puedan modificar la unión del sustrato y/o subsecuentemente generar cambios conformacionales que permitan la disociación del sustrato. Este cambio conformacional no produjo un plegamiento defectuoso de la proteína ya que H109Q-SVCT2-GFP es destinado eficientemente a la membrana plasmática en forma similar al transportador SVCT2 no mutado, sin que se observe retención intracelular del mutante. Así, nuestros datos indicando ausencia de transporte a pesar de una destinación subcelular correcta del transportador son consistentes con el concepto de que las mutaciones afectan directamente el proceso de transporte, a través de alteraciones estructurales restringidas localmente a la interacción del AA con el transportador, lo que provoca que este transportador sea incapaz de transportar AA incluso cuando se encuentra interaccionando a la forma de dímeros con el transportador SVCT2 no mutado. Concluimos que el transportador SVCT2-RED no mutado fue incapaz corregir la alteración estructural de H109Q-SVCT2-GFP y de transformar esta mutante irrecuperable en una proteína activa al interaccionar con ella en un dímero (Figura 33). Sin embargo,

nuestra propuesta que H109Q-SVCT2-GFP es capaz de oligomerizar con SVCT2-RED no mutado, formando hetero-dímeros mixtos que contienen ambos transportadores deberá ser confirmada a través de ensayos de coprecipitación de la proteína mutante y el transportador nativo en el estado de hetero-dímero. Datos muy similares fueron obtenidos al coexpresar H109Q-SVCT2-GFP con el transportador SVCT2-GFP.

SVCT2-RED y las proteínas mutante tipo II interaccionan dentro del dímero durante el proceso de transporte.

En la presente tesis, analizamos el efecto de la coexpresión de los mutante C113S-SVCT2-GFP o C160S-SVCT2-GFP, con el transportador nativo SVCT2-RED sobre el efecto de las propiedades cinéticas de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ asociados al transporte de AA.

El análisis por microscopía confocal reveló que ambas mutantes de SVCT2, C113S-SVCT2-GFP y C160S-SVCT2-GFP (C113 y C160S), presentan un patrón de expresión similar a SVCT2 nativo y la fluorescencia asociada se observa preferentemente en los bordes celulares, lo que sugiere una expresión a nivel de membrana plasmática. Interesantemente, al coexpresar SVCT2-RED con una de estas mutantes no se afectó la localización de ninguno de los transportadores observándose que ambos colocalizan en membrana plasmática. Por otra parte los de ensayos de entrecruzamiento con DSS revelaron que tanto C113S como C160S, al igual que el transportador SVCT2 nativo, se encuentra bajo un arreglo

cuaternario de tipo dimérico en células HEK-293. Los ensayos de cinética temporal revelaron que C113S-SVCT2-GFP y C160S-SVCT2-GFP fueron capaces

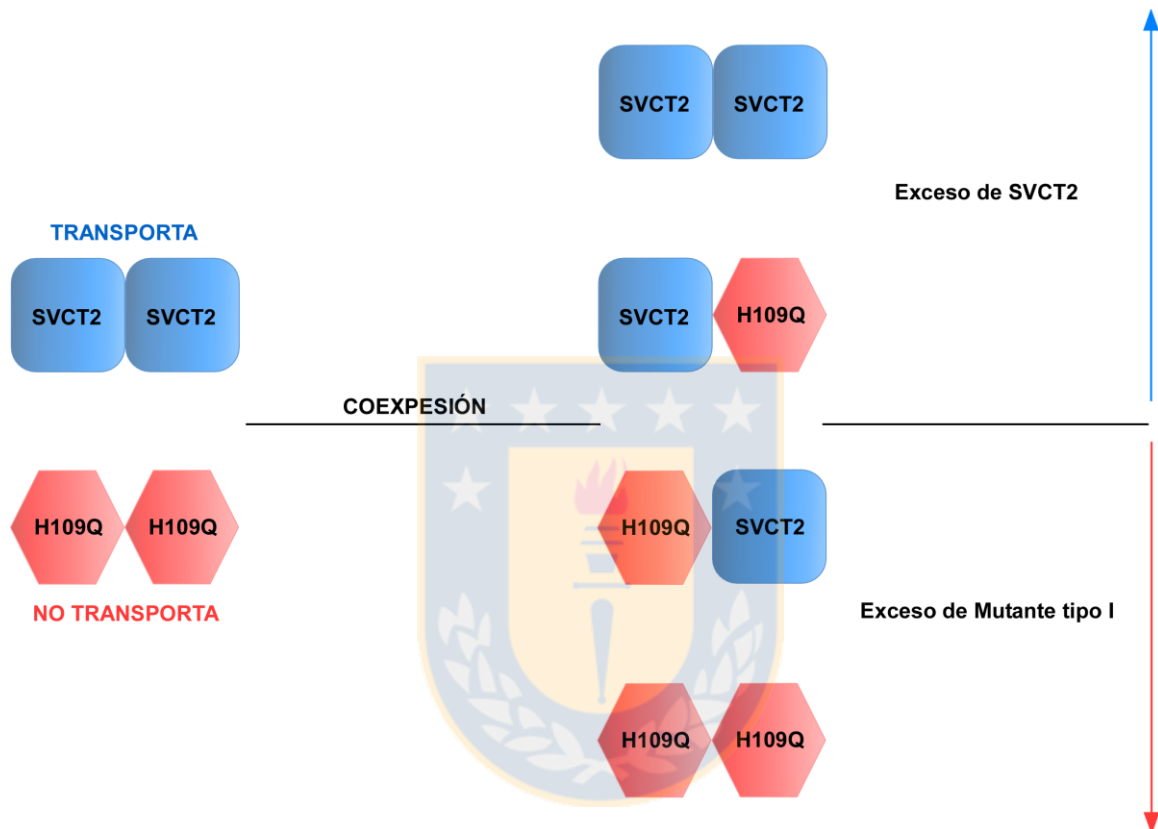


Figura 33: Modelo propuesto para la interacción entre H109Q (mutante inactivo tipo I) y el transportador SVCT2 nativo. Proponemos que H109Q es capaz de oligomerizar con SVCT2 no mutado, formando hetero-dímeros mixtos que contienen ambos transportadores, sin embargo el transportador SVCT2 fue incapaz corregir la alteración estructural de H109Q y de transformar esta mutante irrecuperable en una proteína activa al interactuar con ella en un dímero.

de transportar AA de manera eficiente, similar a SVCT2-RED, pero fueron clasificados como mutantes tipo II, debido a que se localizan a nivel de la membrana plasmática pero muestran marcados cambios en la K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de transporte de AA, con conservación del efecto de activación cooperativa por Na^+ . Las constantes cinéticas alteradas y la característica estructural-funcional de mutantes conformacionales convirtieron a estos transportadores mutantes en una herramienta fundamental para el estudio de la estructura cuaternaria del transportador SVCT2, debido a que su coexpresión con el transportador nativo nos permite analizar si los monómeros dentro del oligómero son capaces de interactuar entre ellos, modulando las propiedades cinéticas y funcionales del transporte mediado por SVCT2, y cuál sería la unidad mínima de transporte dentro del oligómero.

Considerando lo anterior, al coexpresar simultáneamente en células HEK-293 los transportadores nativo (SVCT2-RED) y mutante tipo II (C113S-SVCT2-GFP o C160S-SVCT2-GFP), existen varios resultados posibles entre los cuales solo algunos serían distinguibles experimentalmente: i) que ambas proteínas no interaccionen y sean estructural y funcionalmente independientes, por lo que al realizar ensayos para determinar la K_m de transporte se observarán dos pendientes pertenecientes a SVCT2 y a SVCT2 mutante, respectivamente, con valores respectivos de $V_{m\acute{a}x}$ que variarán en función de la razón SVCT2:SVCT2_{mutante}; ii) que ambas proteínas formen un hetero-dímero pero que cada hetero-monómero sea funcionalmente independiente dentro del hetero-dímero, por lo que al hacer ensayos para determinar la K_m de transporte se observen dos pendientes pertenecientes a SVCT2 y a SVCT2 mutante y cuyos

valores respectivos de $V_{m\acute{a}x}$ variarán en función de la razón SVCT2:SVCT2_{mutante};

iii) que ambas proteínas formen un hetero-dímero en el que los hetero-monómeros interactúan recíprocamente entre ellos generando un hetero-dímero con valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ aparente de transporte intermedia entre los valores para cada proteína y varíen con la razón SVCT2:SVCT2_{mutante}; iv) que ambas proteínas formen un hetero-dímero en el que los hetero-monómeros interactúan entre ellos, generando un hetero-dímero en que SVCT2 rescata la función del mutante conformacional obteniéndose sólo la K_m de SVCT2 a todas las razones SVCT2:SVCT2_{mutante}; v) que ambas proteínas formen un hetero-dímero en el que los hetero-monómeros interactúan entre ellos, generando un hetero-dímero en que SVCT2 mutante modifica la función de SVCT2 obteniéndose sólo la K_m de SVCT2 mutante a todas las razones SVCT2:SVCT2_{mutante}; y vi) que ambas proteínas formen un hetero-dímero en el que los hetero-monómeros interactúan entre ellos pero con una dominancia dependiente de la razón SVCT2:SVCT2_{mutante}, generando un hetero-dímero en que en exceso de SVCT2 (razón SVCT2:SVCT2_{mutante} $\geq 0,5$), se observa solamente la K_m de SVCT2, y en exceso de SVCT2 mutante (razón SVCT2:SVCT2_{mutante} $\leq 0,5$), se observa solamente la K_m de SVCT2 mutante (Figura 34).

Al coexpresar simultáneamente y en distintas proporciones moleculares SVCT2-RED (K_m para AA cercana a 35 μ M) con un SVCT2 mutante de tipo II (C113S-SVCT2-GFP o C160S-SVCT2-GFP, ambos con una K_m de transporte para AA mayor a 100 μ M), se observa expresión de ambas proteínas en las células HEK-293 con un elevado grado de colocalización a nivel de la periferia celular consistente con localización a nivel de la membrana plasmática; los resultados de

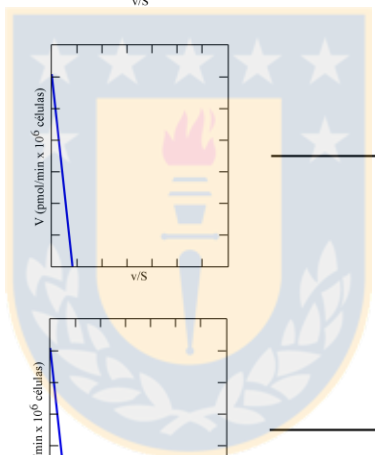
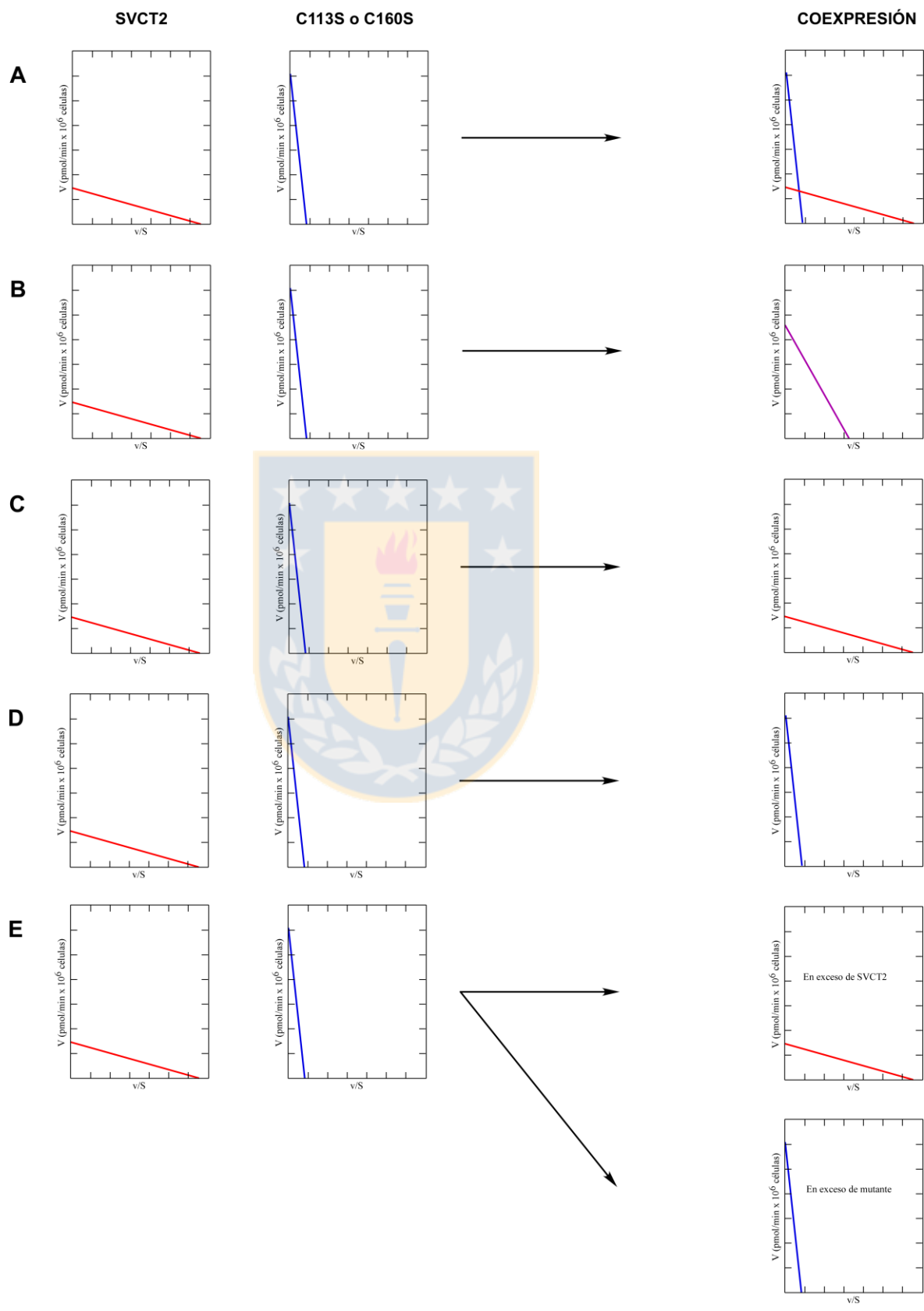


Figura 34: Posibles resultados al estudiar las propiedades cinéticas de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ asociados al transporte de AA en células que coexpresan una mutante tipo II (C113S o C160S) y el transportador SVCT2 nativo. **A.** Si ambas proteínas no interactúan y son estructural y funcionalmente independientes, al realizar ensayos para determinar la K_m de transporte se deberían observar dos pendientes pertenecientes a ambos transportadores. Un resultado similar se podría obtener si ambas proteínas forman un hetero-dímero pero con cada hetero-monómero funcionalmente independiente. **B.** Ambas proteínas podrían formar un hetero-dímero en el que los hetero-monómeros interactúan recíprocamente entre ellos generando un hetero-dímero con valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ aparente de transporte intermedia entre los valores para cada proteína y que varían con la razón SVCT2:SVCT2_{mutante}. **C.** Si ambas proteínas forman un hetero-dímero en el que los hetero-monómeros interactúan entre ellos, generando un hetero-dímero en que SVCT2 rescata la función del mutante conformacional, en este caso se obtendría sólo la K_m de SVCT2 a todas las razones SVCT2:SVCT2_{mutante}. **D.** Si ambas proteínas forman un hetero-dímero en el que los hetero-monómeros interactúan entre ellos, generando un hetero-dímero en que SVCT2 mutante modifica la función de SVCT2, en este caso se obtendría sólo la K_m de SVCT2 mutante a todas las razones SVCT2:SVCT2 mutante. **E.** Si ambas proteínas forman un hetero-dímero en el que los hetero-monómeros interactúan entre ellos pero con una dominancia dependiente de la razón SVCT2:SVCT2_{mutante}, generando un hetero-dímero en que en exceso de SVCT2 (razón SVCT2:SVCT2_{mutante} > 0,5), se observa solamente la K_m de SVCT2, y en exceso de SVCT2 mutante (razón SVCT2:SVCT2_{mutante} < 0,5), se observa solamente la K_m de SVCT2 mutante



los ensayos de transporte revelaron un comportamiento cinético compatible con un modelo de dominancia de función dependiente de la razón SVCT2:SVCT2_{mutante}. Así, en condiciones de exceso de SVCT2 (razón SVCT2:SVCT2_{mutante} $\geq 0,5$) observamos un único valor de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de transporte de AA que fue muy similar a la K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de SVCT2, mientras que bajo condiciones de exceso de SVCT2 mutante (razón SVCT2:SVCT2_{mutante} $\leq 0,5$) observamos un único valor de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de transporte de AA que fue muy similar a la K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de SVCT2 mutante. En otras palabras, la K_m de transporte aparente en células que coexpresaron simultáneamente SVCT2 y SVCT2 mutante conformacional fue similar a la del transportador que se expresó en mayor proporción, es decir, aproximadamente 35 μM en exceso de SVCT2 y mayor a 100 μM en exceso de SVCT2 mutante conformacional.

Estos resultados se pueden explicar porque de acuerdo a la estructura 3D propuesta para el transportador SVCT2, ninguno de los 14 residuos de cisteína que posee SVCT2, forma parte de los residuos de interactúan con el sustrato en cada ciclo de transporte, sugiriendo que ninguno sería esencial para la actividad funcional de SVCT2 (Tesis Doctoral Carlos Aylwin, 2011). En los mutantes C113S-SVCT2-GFP y C160S-SVCT2-GFP, los residuos de cisteína 113 pertenecientes al STM1 y 160 ubicada en el lazo endofacial que une los STM 2-3 fueron reemplazados por el residuo serina, el cual presenta un grupo hidroxilo (-OH) como grupo terminal de su cadena lateral, de mayor electronegatividad pero mantiene relativamente similares las propiedades hidrofílicas y de tamaño respecto a la cadena lateral de residuos de cisteína. El análisis de expresión por microscopía confocal junto con ensayos de colocación con el marcador de

membrana GLUT1-RED, indicaron que la sustitución individual de ambos residuos de cisteína de SVCT2, no produce alteraciones en la expresión y tráfico hacia la membrana plasmática. Los ensayos de cinética temporal revelaron que ambos mutantes transportan AA de manera bastante eficiente (>80% respecto a SVCT2 nativo). Sin embargo, la determinación de las constantes cinéticas asociadas al transporte de AA reveló un aumento de al menos 5 veces el valor de la K_m de transporte para AA en ambas mutantes, sugiriendo que estos residuos son importantes para el ciclo de transporte pero no son esenciales para la función del transportador. Lo interesante de estos resultados es que los residuos de cisteína de importancia funcional no se restringen a aquellos localizados en los STM. El gran aumento en la K_m de transporte para AA de la mutante C113S en el STM1 era esperable ya que estos STM forman parte del poro central de transporte, mientras que el residuo de cisteína 160 es intracelular y se encuentra ubicada en el lazo endofacial que une los STM 2-3. Estos resultados indican que los lazos endo y exofaciales hidrofílicos de SVCT2, además de conectar a dos STM participan probablemente en interacciones altamente específicas con otros elementos estructurales del transportador, con otros lazos u otros STM. En este sentido, cualquier modificación estructural importante, como en el caso de la mutagénesis, puede modificar estas interacciones y provocar cambios funcionales del transportador. Entre los posibles efectos que puede producir una mutación individual se incluyen alteraciones en la estructura del sitio de unión a sustratos, reordenamientos conformacionales que alteran la sensibilidad a alquilantes específicos o interacciones intramoleculares (Frillingos, 2012). Si consideramos el tipo de sustitución aminoacídica que introdujimos en SVCT2 al adicionar un grupo

hidroxilo a la cadena lateral, si bien se mantuvo constante el tamaño, el hidroxilo presenta una mayor electronegatividad y mayor reactividad para formar enlaces de tipo puente hidrógeno.

Por otro lado, hay que considerar que a pesar de la relativamente baja abundancia de los residuos de cisteína (menor al 3%) en las proteínas, la capacidad de su grupo terminal tiol (-SH) para donar electrones y oscilar entre un estado reducido y diversos estados oxidados, le confiere la capacidad de participar en muchos aspectos de la estructura y función de proteínas (Chalker y col., 2009). Así, los residuos de cisteína juegan un papel importante en fenómenos de estabilidad, plegamiento, unión de metales, catálisis enzimática y regulación de la actividad proteica (Trivedi y col., 2009). El grupo tiol es altamente reactivo, no se ioniza a pH fisiológico y forma enlaces puente de hidrógeno relativamente débiles, por lo que no contribuye significativamente a la estabilidad de las proteínas por medio de enlaces salinos o puente hidrógeno. No obstante, si dos grupos tiol de una misma o distinta cadena polipeptídica se encuentran próximos y en la orientación espacial adecuada, pueden formar un enlace covalente de tipo puente disulfuro intra o intermolecular, siendo la correcta formación de este tipo de enlace, a menudo, la etapa limitante de la velocidad de plegamiento *in vivo* e *in vitro* (Molinari y col., 1999).

La literatura muestra que la relevancia de la presencia de puentes disulfuro en la función de proteínas de membrana está basada principalmente en la estabilización de una estructura terciaria apropiada (Bulleid y col., 2012; Oka y col., 2013). Una conformación correcta es, a su vez, esencial en fenómenos como síntesis, tráfico hacia la membrana plasmática, estabilidad y función de transporte.

De esta manera, el tipo de participación de puentes disulfuro en la estructura-función de transportadores muestra resultados bastante variados. Un ejemplo es el transportador de dopamina humano DAT perteneciente a la familia de transportadores de neurotransmisores dependientes de Na^+/Cl^- SLC6a. Aunque la unidad funcional para los transportadores de esta familia parece ser un monómero, existe evidencia que indica que estos transportadores forman dímeros o incluso oligómeros de alto orden dentro de la membrana plasmática (Farhan y *col.*, 2006). El tratamiento oxidativo de DAT produce dímeros y tetrámeros debido a la formación de puentes disulfuro intermoleculares (Hastrup y *col.*, 2001; Hastrup y *col.*, 2003). Más específicamente, estudios de entrecruzamiento con el agente oxidativo fenantrolina de cobre (CuP) indican que DAT posee una migración electroforética correspondiente a los tamaños esperados para dímeros, trímeros y tetrámeros, sin embargo, esta migración se reduce al tamaño de un monómero en los transportadores que no fueron tratados con el agente entrecruzante, sugiriendo que DAT forma dímeros y tetrámeros en membrana plasmática. Interesantemente el entrecruzamiento de DAT no afecta la captación de tiramina que es un sustrato del transportador al igual que dopamina (Hastrup y *col.*, 2001). Por otro lado, después ser de entrecruzados, pero no antes, los transportadores marcados con diferentes epitopes fueron coimmunoprecipitados, así el complejo formado fue un homodímero de 195 KDa de tamaño (Hastrup y *col.*, 2001). DAT posee 13 cisteínas y según el modelo 2D propuesto, 4 cisteínas son extracelulares, 4 forman parte de lazos intracelulares y 5 forman parte de los STM (Hastrup y *col.*, 2001). Estudios de mutagénesis, indican que el residuo de cisteína 306 está involucrado en la dimerización de DAT, ya que el reemplazo de este residuo por

alanina, previno el entrecruzamiento del transportador, así la ausencia de este puente disulfuro produce la interrupción de la dimerización del transportador aparentemente sin alterar su función (Hastrup y *col.*, 2001). Por otro lado, en un DAT depletado de cisteínas, solamente cuando la cisteína 243 o la 306 fue reintroducida el transportador se entrecruzó a la forma de dímero, sugiriendo que estas cisteínas (presentes en el STM4 y STM6 respectivamente) participan en la formación de puentes disulfuro y están involucradas en la oligomerización. La reintroducción de ambas cisteínas, 243 y 306 en el DAT carente de cisteínas, permitió un patrón de entrecruzamiento indistinguible al obtenido para el transportador no mutado, con bandas de dímeros, trímeros y tetrameros. Estos resultados revelaron que en la membrana plasmática, DAT puede existir como dímero de dímeros, con dos interfaces de oligomerización simétricas formadas por los STM6-STM6 a través de puentes disulfuros entre las C306 que participan en la interface de dimerización y por otro lado la interface de tetramerización entre los STM4-STM4 a través de puentes disulfuros entre C243 (Hastrup y *col.*, 2003; Sitte y *col.*, 2004). Adicionalmente, se ha propuesto la existencia puentes disulfuro intramoleculares entre los residuos de cisteínas 180 y 189 de DAT los cuales han mostrado ser esenciales para la expresión y correcta inserción en membrana del transportador (Wang y *col.*, 1995; Chen y *col.*, 1997). Este ejemplo indica que la presencia de puentes disulfuro entre residuos de cisteína en un mismo transportador pueden cumplir más de una función.

La ausencia de efecto de DTT sobre el transporte de AA, sugiere que SVCT2 no posee enlaces covalentes reversibles en residuos de cisteína que sean esenciales para su actividad. Esto último no quita la posibilidad de que no los

tenga, solo indica que no son importantes para su actividad de transporte de AA (Tesis Doctoral, Carlos Aylwin, 2014). Por otro lado, ensayos de modificación química de residuos de cisteína con agentes alquilantes específicos, indican que tanto PCMB y NEM inhiben el transporte de AA mediado por SVCT2 en forma concentración-dependiente, a través de un mecanismo que involucra una disminución de la $V_{m\acute{a}x}$ sin alterar la K_m de transporte ni la activación cooperativa por el Na^+ (Tesis Doctoral, Carlos Aylwin, 2014). Utilizando AA como agente protector de la modificación con PCMB y NEM, los resultados indican que el AA es capaz de proteger a SVCT2 del efecto inhibitorio de ambos alquilantes, a partir de concentraciones mayores a 100 μM alcanzando una protección máxima a partir de 300 μM , lo que sugiere que el mecanismo es distinto a su rol como sustrato (Tesis Doctoral, Carlos Aylwin, 2014). Estos antecedentes junto a las propiedades cinéticas de los mutantes C113S-SVCT2-GFP y C160S-SVCT2-GFP sugieren que las cisteínas 113 y 160 presentes en el transportador SVCT2 participan en reordenamientos conformacionales importantes asociados a distintos estados de actividad de SVCT2. Es por lo tanto factible concluir que C113S-SVCT2-GFP y C160S-SVCT2-GFP corresponderían a mutantes conformacionales y por lo tanto potencialmente "recuperables" en un oligómero mixto. Considerando estos antecedentes, si al coexpresar en distintas proporciones moleculares SVCT2-RED (K_m para AA cercana a 35 μM) simultáneamente con un SVCT2 mutante tipo II (K_m para ácido ascórbico mayor a 100 μM), se obtiene un solo componente cinético en todas las proporciones SVCT2-RED/SVCT2-GFP_{mutante} estudiadas sugiere que ambos transportadores, nativo y mutado, se encuentran interaccionando; por el contrario si ambas proteínas son funcionalmente independientes, obtendríamos

dos K_m asociadas al transporte de AA, una perteneciente a la proteína mutante y la perteneciente al SVCT2-RED. Datos de literatura muestran, que en la línea celular CaCo-2 el análisis de transporte por el método de Eadie-Hofstee reveló la presencia de dos componentes funcionales envueltos en el transporte de AA, cada uno con diferentes afinidades por el sustrato (Maulén y col., 2002). El componente de menor afinidad con una K_m aparente de 125 μM es similar a la K_m descrita para SVCT1 humano clonado y expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*. A partir de los datos de K_m y resultados de RT-PCR, los autores proponen que el transportador de AA de menor afinidad expresado en células CaCo-2 es SVCT1 (Maulén y col., 2002). El segundo componente de alta afinidad para AA detectado en CaCo-2 con una K_m aparente de 8 μM posee un valor similar al descrito para el transportador SVCT2 humano clonado y expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*. Análisis de RT-PCR confirmaron la expresión de SVCT2 en células CaCo-2 (Maulén y col., 2002).

Interesantemente, el único componente cinético detectado al coexpresar en distintas proporciones moleculares SVCT2-RED simultáneamente con un mutante tipo II fue similar a la del transportador que se expresó en mayor proporción, es decir, una K_m aproximadamente 35 μM en exceso de SVCT2 y una K_m mayor a 100 μM en exceso de SVCT2 mutante tipo II. Estos resultados sugieren que el transportador que se expresó en mayor proporción es el que modula la función de transporte dentro del oligómero de SVCT2, es decir, considerando que los mutantes tipo II son mutantes conformacionales, el transportador que se expresa en mayor proporción es el que modula el "empaquetamiento" de los monómeros dentro del oligómero (Figura 35). Complementario a lo anterior, el análisis de las

respectivas $V_{\text{máx}}$ sugiere que en exceso de SVCT2, solamente se observa la $V_{\text{máx}}$ correspondiente a SVCT2, mientras que en exceso de SVCT2 mutante tipo II solamente se observa la $V_{\text{máx}}$ esperada para SVCT2 mutante tipo II. Nunca se observó una $V_{\text{máx}}$ que corresponda a la sumatoria de las $V_{\text{máx}}$ de SVCT2 y de SVCT2 mutante tipo II. Esto permite sugerir que en el oligómero SVCT2-SVCT2 mutante tipo II, las actividades de los monómeros son excluyentes; así, SVCT2 sería activo solamente cuando se encuentra en exceso sobre SVCT2 mutante tipo II, mientras que SVCT2 mutante sería activo solamente cuando se encuentra en exceso sobre SVCT2. En términos estructurales, esto significaría que en el oligómero con empaquetamiento tipo SVCT2 (con SVCT2 en exceso sobre SVCT2 mutante tipo II), el mutante tipo II sería inactivo ($V_{\text{máx}} = 0$), mientras que en el oligómero con empaquetamiento tipo SVCT2 mutante tipo II (con SVCT2 mutante tipo II en exceso sobre SVCT2), SVCT2 sería inactivo ($V_{\text{máx}} = 0$).

En ensayos de coexpresión del transportador nativo SVCT2-Flag-His (K_m para AA cercana a $36 \mu\text{M}$) con el mutante tipo II GFP-C160S-SVCT2 (K_m para AA cercana a $180 \mu\text{M}$), se obtuvo un solo componente funcional en todas las razones SVCT2-Flag-His:GFP-C160S-SVCT2 ensayadas. Interesantemente la K_m aumentó en su valor a medida que disminuyó la expresión de la proteína nativa SVCT2-Flag-His y aumentó la expresión de la proteína mutante GFP-C160S-SVCT2, según lo observado a través de ensayos de *Western blot*. La gran diferencia entre este ensayo y el anterior donde se coexpresó SVCT2-RED con C160S-SVCT2-GFP fueron los epítopes utilizados en cada constructo. En este ensayo se utilizó el epítopes Flag-His y no la proteína fluorescente roja para marcar el transportador nativo en el extremo carboxilo terminal; y el epítope GFP para marcar la proteína

mutante, pero esta vez la proteína fluorescente verde fue fusionada en el extremo amino terminal y no en el carboxilo-terminal como en el caso anterior. Un aspecto importante a destacar es la gran diferencia de tamaño entre el epítipo Flag-His, compuesto por 31 aminoácidos y tamaño molecular cercano a 1 KDa y la proteína fluorescente roja, compuesta por 225 aminoácidos y tamaño molecular cercano a 27,6 KDa. Si bien, la fusión de los epítipes Flag-His, DsRED y GFP no modificaron las propiedades cinéticas y funcionales de SVCT2, observándose para todos los constructos una K_m de transporte de AA y el efecto cooperativo por Na^+ similares a los descritos para el transportador SVCT2 nativo (Godoy y col., 2007). Los ensayos de entrecruzamiento revelaron que solo en la quimera GFP-SVCT2 hubo una disminución en la intensidad de la banda del monómero a las dos concentraciones mayores de los agentes entrecruzantes ensayadas, lo que indica una mayor proporción de transportador a la forma de dímeros. La quimera GFP-SVCT2 fue la única en que el transportador SVCT2 fue intervenido en el extremo amino terminal de la proteína lo que sugiere que el extremo carboxilo terminal puede estar involucrado en el proceso de dimerización del transportador. Por lo que la diferencia entre el tamaño y la ubicación de los epítipes, puede explicar la diferencia entre los resultados obtenidos para la coexpresión de SVCT2-RED y C160S-SVCT2-GFP versus la coexpresión de SVCT2-Flag-His y GFP-C160S-SVCT2.

En resumen nuestros resultados de entrecruzamiento con distintos agentes químicos mostraron que el transportador SVCT2 se encuentra bajo un arreglo cuaternario de tipo dimérico. Esto sugiere que SVCT2 está presente *in vivo* como un oligómero funcional de dos subunidades. Además los ensayos de coexpresión

del transportador nativo y mutante dentro de una misma célula sugieren que la unidad mínima de transporte dentro del dímero de SVCT2 podría ser el monómero y que los monómeros dentro del dímero son capaces de interactuar entre ellos modulando sus propiedades cinéticas.



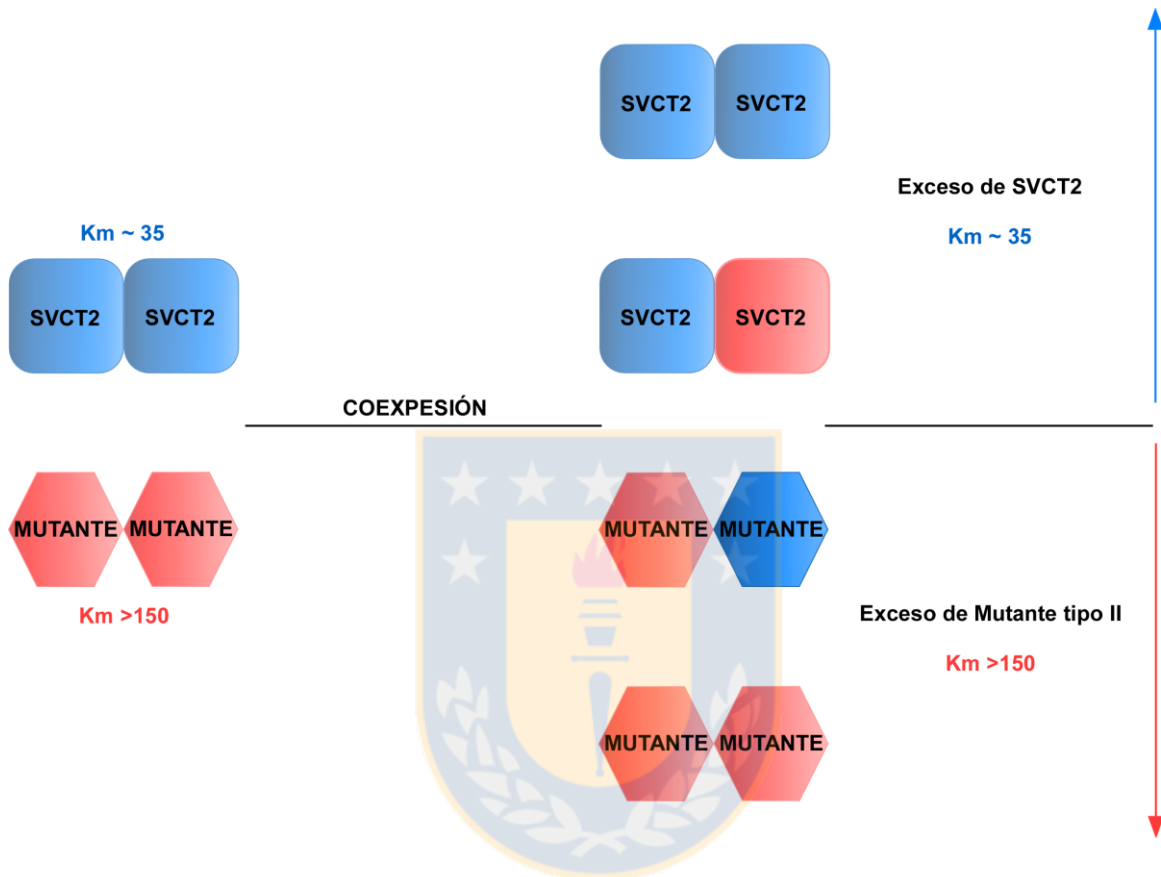


Figura 35: Modelo propuesto para la interacción entre C113S o C160S (mutante tipo II) y el transportador SVCT2 nativo. Proponemos que el mutante tipo II es capaz de oligomerizar con SVCT2 nativo, formando hetero-dímeros mixtos que contienen ambos transportadores, siendo el transportador que se expresa en mayor proporción el que modula la función de transporte dentro del oligómero

14. BIBLIOGRAFIA

- Abramson, J., I. Smirnova, et al. (2003). "Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*." *Science* **301**(5633): 610-615.
- Abramson, J. and E. M. Wright (2009). "Structure and function of Na(+)-symporters with inverted repeats." *Curr Opin Struct Biol* **19**(4): 425-432.
- Asano, T., H. Katagiri, et al. (1991). "The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity." *J Biol Chem* **266**(36): 24632-24636.
- Ashby, M. C., K. Ibaraki, et al. (2004). "It's green outside: tracking cell surface proteins with pH-sensitive GFP." *Trends Neurosci* **27**(5): 257-261.
- Aylwin, C. (2014). "Análisis del papel funcional y estructural de residuos de cisteína del transportador de ácido ascórbico SVCT2." *Tesis Doctoral*. Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.
- Baker, E. M., R. E. Hodges, et al. (1969). "Metabolism of ascorbic-1-14C acid in experimental human scurvy." *Am J Clin Nutr* **22**(5): 549-558.
- Baker, E. M., R. E. Hodges, et al. (1993). "Metabolism of ascorbic-1-14C acid in experimental human scurvy. 1969." *Nutrition* **9**(1): 75-84.
- Baker, E. M., R. E. Hodges, et al. (1971). "Metabolism of 14C- and 3H-labeled L-ascorbic acid in human scurvy." *Am J Clin Nutr* **24**(4): 444-454.
- Baldwin, S. A. (1993). "Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins." *Biochim Biophys Acta* **1154**(1): 17-49.
- Barrett, M. P., A. R. Walmsley, et al. (1999). "Structure and function of facilitative sugar transporters." *Curr Opin Cell Biol* **11**(4): 496-502.
- Bendich, A. (1990). "Antioxidant micronutrients and immune responses." *Ann N Y Acad Sci* **587**: 168-180.
- Berg, R. H. and R. N. Beachy (2008). "Fluorescent protein applications in plants." *Methods Cell Biol* **85**: 153-177.
- Blodgett, D. M., C. Graybill, et al. (2008). "Analysis of glucose transporter topology and structural dynamics." *J Biol Chem* **283**(52): 36416-36424.
- Boggavarapu, R., J. M. Jeckelmann, et al. (2013). "Expression, purification and low-resolution structure of human vitamin C transporter SVCT1 (SLC23A1)." *PLoS One* **8**(10): e76427.
- Brubaker, R. F., W. M. Bourne, et al. (2000). "Ascorbic acid content of human corneal epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(7): 1681-1683.
- Bulleid, N. J. (2012). "Disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(11).
- Burant, C. F. and G. I. Bell (1992). "Mammalian facilitative glucose transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins." *Biochemistry* **31**(42): 10414-10420.
- Burns, J. J., A. Moltz, et al. (1956). "Missing step in guinea pigs required for the biosynthesis of L-ascorbic acid." *Science* **124**(3232): 1148-1149.
- Burzle, M. and M. A. Hediger (2012). "Functional and physiological role of vitamin C transporters." *Curr Top Membr* **70**: 357-375.
- Caffrey, M. (2003). "Membrane protein crystallization." *J Struct Biol* **142**(1): 108-132.
- Capellmann, M., M. Becka, et al. (1994). "A note on distribution of human plasma levels of ascorbic and dehydroascorbic acid." *J Physiol Pharmacol* **45**(1): 183-187.
- Carr, A. and B. Frei (1999). "Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?" *FASEB J* **13**(9): 1007-1024.
- Carruthers, A. (1990). "Facilitated diffusion of glucose." *Physiol Rev* **70**(4): 1135-1176.
- Coassin, M., A. Tomasi, et al. (1991). "Enzymatic recycling of oxidized ascorbate in pig heart: one-electron vs two-electron pathway." *Arch Biochem Biophys* **290**(2): 458-462.
- Chalker, J. M., G. J. Bernardes, et al. (2009). "Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology." *Chem Asian J* **4**(5): 630-640.
- Chatterjee, I. B., N. C. Kar, et al. (1961). "Biosynthesis of L-ascorbic acid: missing steps in animals incapable of synthesizing the vitamin." *Nature* **192**: 163-164.

- Chen, J. G., S. Liu-Chen, et al. (1997). "External cysteine residues in the serotonin transporter." Biochemistry **36**(6): 1479-1486.
- Daruwala, R., J. Song, et al. (1999). "Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2." FEBS Lett **460**(3): 480-484.
- de Koning, H. and G. Diallinas (2000). "Nucleobase transporters (review)." Mol Membr Biol **17**(2): 75-94.
- De Zutter, J. K., K. B. Levine, et al. (2013). "Sequence determinants of GLUT1 oligomerization: analysis by homology-scanning mutagenesis." J Biol Chem **288**(28): 20734-20744.
- Deng, D., C. Xu, et al. (2014). "Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1." Nature **510**(7503): 121-125.
- Eck, P., H. C. Erichsen, et al. (2004). "Comparison of the genomic structure and variation in the two human sodium-dependent vitamin C transporters, SLC23A1 and SLC23A2." Hum Genet **115**(4): 285-294.
- Englard, S. and S. Seifter (1986). "The biochemical functions of ascorbic acid." Annu Rev Nutr **6**: 365-406.
- Eskandari, S., E. M. Wright, et al. (1998). "Structural analysis of cloned plasma membrane proteins by freeze-fracture electron microscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(19): 11235-11240.
- Faaland, C. A., J. E. Race, et al. (1998). "Molecular characterization of two novel transporters from human and mouse kidney and from LLC-PK1 cells reveals a novel conserved family that is homologous to bacterial and Aspergillus nucleobase transporters." Biochim Biophys Acta **1442**(2-3): 353-360.
- Faham, S., A. Watanabe, et al. (2008). "The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport." Science **321**(5890): 810-814.
- Fang, Y., H. Jayaram, et al. (2009). "Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution." Nature **460**(7258): 1040-1043.
- Fang, Y., L. Kolmakova-Partensky, et al. (2007). "A bacterial arginine-arginine exchange transporter involved in extreme acid resistance." J Biol Chem **282**(1): 176-182.
- Farhan, H., M. Freissmuth, et al. (2006). "Oligomerization of neurotransmitter transporters: a ticket from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane." Handb Exp Pharmacol(175): 233-249.
- Flier, J. S., M. Mueckler, et al. (1987). "Distribution of glucose transporter messenger RNA transcripts in tissues of rat and man." J Clin Invest **79**(2): 657-661.
- Frei, B., J. F. Keaney, Jr., et al. (1996). "Vitamins C and E and LDL oxidation." Vitam Horm **52**: 1-34.
- Frei, B. and S. M. Lynch (1994). "Effects of combined supplementation with antioxidants on low-density lipoprotein oxidation." Circulation **90**(6): 3119-3121.
- Frillingos, S. (2012). "Insights to the evolution of Nucleobase-Ascorbate Transporters (NAT/NCS2 family) from the Cys-scanning analysis of xanthine permease XanQ." Int J Biochem Mol Biol **3**(3): 250-272.
- Garcia, J. C., M. Strube, et al. (1992). "Amino acid substitutions at tryptophan 388 and tryptophan 412 of the HepG2 (Glut1) glucose transporter inhibit transport activity and targeting to the plasma membrane in *Xenopus* oocytes." J Biol Chem **267**(11): 7770-7776.
- Gerchman, Y., A. Rimón, et al. (2001). "Oligomerization of NhaA, the Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* in the membrane and its functional and structural consequences." Biochemistry **40**(11): 3403-3412.
- Godoy, A., V. Ormazabal, et al. (2007). "Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the ascorbic acid transporter SVCT2. Activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations." J Biol Chem **282**(1): 615-624.
- Gould, G. W. and G. D. Holman (1993). "The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression." Biochem J **295** (Pt 2): 329-341.
- Grasberger, B., A. P. Minton, et al. (1986). "Interaction between proteins localized in membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(17): 6258-6262.
- Guan, L. and H. R. Kaback (2006). "Lessons from lactose permease." Annu Rev Biophys Biomol Struct **35**: 67-91.
- Guan, L., O. Mirza, et al. (2007). "Structural determination of wild-type lactose permease." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(39): 15294-15298.

- Hastrup, H., A. Karlin, et al. (2001). "Symmetrical dimer of the human dopamine transporter revealed by cross-linking Cys-306 at the extracellular end of the sixth transmembrane segment." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10055-10060.
- Hastrup, H., N. Sen, et al. (2003). "The human dopamine transporter forms a tetramer in the plasma membrane: cross-linking of a cysteine in the fourth transmembrane segment is sensitive to cocaine analogs." J Biol Chem **278**(46): 45045-45048.
- Hebert, D. N. and A. Carruthers (1992). "Glucose transporter oligomeric structure determines transporter function. Reversible redox-dependent interconversions of tetrameric and dimeric GLUT1." J Biol Chem **267**(33): 23829-23838.
- Hilger, D., H. Jung, et al. (2005). "Assessing oligomerization of membrane proteins by four-pulse DEER: pH-dependent dimerization of NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of *E. coli*." Biophys J **89**(2): 1328-1338.
- Hilger, D., Y. Polyhach, et al. (2007). "High-resolution structure of a Na⁺/H⁺ antiporter dimer obtained by pulsed electron paramagnetic resonance distance measurements." Biophys J **93**(10): 3675-3683.
- Hirai, T., J. A. Heymann, et al. (2002). "Three-dimensional structure of a bacterial oxalate transporter." Nat Struct Biol **9**(8): 597-600.
- Hodges, R. E. (1971). "What's new about scurvy?" Am J Clin Nutr **24**(4): 383-384.
- Hodges, R. E., E. M. Baker, et al. (1969). "Experimental scurvy in man." Am J Clin Nutr **22**(5): 535-548.
- Hogue, D. L. and V. Ling (1999). "A human nucleobase transporter-like cDNA (SLC23A1): member of a transporter family conserved from bacteria to mammals." Genomics **59**(1): 18-23.
- Hruz, P. W. and M. M. Mueckler (1999). "Cysteine-scanning mutagenesis of transmembrane segment 7 of the GLUT1 glucose transporter." J Biol Chem **274**(51): 36176-36180.
- Hruz, P. W. and M. M. Mueckler (2001). "Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review)." Mol Membr Biol **18**(3): 183-193.
- Huang, Y., M. J. Lemieux, et al. (2003). "Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*." Science **301**(5633): 616-620.
- Hunte, C., E. Screpanti, et al. (2005). "Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH." Nature **435**(7046): 1197-1202.
- Jacob, R. A. and G. Sotoudeh (2002). "Vitamin C function and status in chronic disease." Nutr Clin Care **5**(2): 66-74.
- Jess, U., H. Betz, et al. (1996). "The membrane-bound rat serotonin transporter, SERT1, is an oligomeric protein." FEBS Lett **394**(1): 44-46.
- Joost, H. G. and B. Thorens (2001). "The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review)." Mol Membr Biol **18**(4): 247-256.
- Kaback, H. R., M. Sahin-Toth, et al. (2001). "The kamikaze approach to membrane transport." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(8): 610-620.
- Kasho, V. N., I. N. Smirnova, et al. (2006). "Sequence alignment and homology threading reveals prokaryotic and eukaryotic proteins similar to lactose permease." J Mol Biol **358**(4): 1060-1070.
- Kawai, T., M. Nishikimi, et al. (1992). "A missense mutation of L-gulonolactone oxidase causes the inability of scurvy-prone osteogenic disorder rats to synthesize L-ascorbic acid." J Biol Chem **267**(30): 21973-21976.
- Kayano, T., C. F. Burant, et al. (1990). "Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6)." J Biol Chem **265**(22): 13276-13282.
- Kilic, F. and G. Rudnick (2000). "Oligomerization of serotonin transporter and its functional consequences." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3106-3111.
- Kiuchi, K., M. Nishikimi, et al. (1980). "L-gulonolactone oxidase activity and vitamin C status in riboflavin-deficient rats." Biochim Biophys Acta **630**(3): 330-337.
- Korkhov, V. M., H. Farhan, et al. (2004). "Oligomerization of the {gamma}-aminobutyric acid transporter-1 is driven by an interplay of polar and hydrophobic interactions in transmembrane helix II." J Biol Chem **279**(53): 55728-55736.

- Kosti, V., G. Lambrinidis, et al. (2012). "Identification of the substrate recognition and transport pathway in a eukaryotic member of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family." PLoS One **7**(7): e41939.
- Koukaki, M., A. Vianti, et al. (2005). "The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway." J Mol Biol **350**(3): 499-513.
- Krishnamurthy, H., C. L. Piscitelli, et al. (2009). "Unlocking the molecular secrets of sodium-coupled transporters." Nature **459**(7245): 347-355.
- Kumar, S., M. Saradhi, et al. (2006). "Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: an overview." Mol Cell Endocrinol **246**(1-2): 147-156.
- Lemieux, M. J. (2007). "Eukaryotic major facilitator superfamily transporter modeling based on the prokaryotic GlpT crystal structure." Mol Membr Biol **24**(5-6): 333-341.
- Lemieux, M. J., J. Song, et al. (2003). "Three-dimensional crystallization of the Escherichia coli glycerol-3-phosphate transporter: a member of the major facilitator superfamily." Protein Sci **12**(12): 2748-2756.
- Levine, M., C. Conry-Cantilena, et al. (1996). "Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(8): 3704-3709.
- Levine, M., K. R. Dhariwal, et al. (1995). "Determination of optimal vitamin C requirements in humans." Am J Clin Nutr **62**(6 Suppl): 1347S-1356S.
- Levine, M. and K. Morita (1985). "Ascorbic acid in endocrine systems." Vitam Horm **42**: 1-64.
- Liang, W. J., D. Johnson, et al. (2001). "Vitamin C transport systems of mammalian cells." Mol Membr Biol **18**(1): 87-95.
- Liang, W. J., D. Johnson, et al. (2002). "Regulation of the human vitamin C transporters expressed in COS-1 cells by protein kinase C [corrected]." Am J Physiol Cell Physiol **283**(6): C1696-1704.
- Lu, F., S. Li, et al. (2011). "Structure and mechanism of the uracil transporter UraA." Nature **472**(7342): 243-246.
- MacDonald, L., A. E. Thumser, et al. (2002). "Decreased expression of the vitamin C transporter SVCT1 by ascorbic acid in a human intestinal epithelial cell line." Br J Nutr **87**(2): 97-100.
- Mackenzie, B., A. C. Illing, et al. (2008). "Transport model of the human Na⁺-coupled L-ascorbic acid (vitamin C) transporter SVCT1." Am J Physiol Cell Physiol **294**(2): C451-459.
- Maellaro, E., B. Del Bello, et al. (1997). "Purification and characterization of glutathione-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver." Methods Enzymol **279**: 30-35.
- Mardones, L., F. A. Zuniga, et al. (2012). "Essential role of intracellular glutathione in controlling ascorbic acid transporter expression and function in rat hepatocytes and hepatoma cells." Free Radic Biol Med **52**(9): 1874-1887.
- Margittai, E., G. Banhegyi, et al. (2005). "Scurvy leads to endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the liver of Guinea pigs." J Nutr **135**(11): 2530-2534.
- Maue, R. A. (2007). "Understanding ion channel biology using epitope tags: progress, pitfalls, and promise." J Cell Physiol **213**(3): 618-625.
- Maulen, N. P., E. A. Henriquez, et al. (2003). "Up-regulation and polarized expression of the sodium-ascorbic acid transporter SVCT1 in post-confluent differentiated CaCo-2 cells." J Biol Chem **278**(11): 9035-9041.
- Mehlhorn, R. J. (1991). "Ascorbate- and dehydroascorbic acid-mediated reduction of free radicals in the human erythrocyte." J Biol Chem **266**(5): 2724-2731.
- Meintanis, C., A. D. Karagouni, et al. (2000). "Amino acid residues N450 and Q449 are critical for the uptake capacity and specificity of UapA, a prototype of a nucleobase-ascorbate transporter family." Mol Membr Biol **17**(1): 47-57.
- Michels, A. J., N. Joisher, et al. (2003). "Age-related decline of sodium-dependent ascorbic acid transport in isolated rat hepatocytes." Arch Biochem Biophys **410**(1): 112-120.
- Mitchell, P. (1963). "Molecule, group and electron translocation through the natural membranes." Biochem Soc Symp **22**, 141-168.
- Molinari, M. and A. Helenius (1999). "Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells." Nature **402**(6757): 90-93.
- Moser, U. (1987). "Uptake of ascorbic acid by leukocytes." Ann N Y Acad Sci **498**: 200-215.
- Mueckler, M. (1994). "Facilitative glucose transporters." Eur J Biochem **219**(3): 713-725.

- Mueckler, M. and C. Makepeace (1997). "Identification of an amino acid residue that lies between the exofacial vestibule and exofacial substrate-binding site of the Glut1 sugar permeation pathway." J Biol Chem **272**(48): 30141-30146.
- Mueckler, M. and C. Makepeace (2002). "Analysis of transmembrane segment 10 of the Glut1 glucose transporter by cysteine-scanning mutagenesis and substituted cysteine accessibility." J Biol Chem **277**(5): 3498-3503.
- Murakami, S., R. Nakashima, et al. (2002). "Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB." Nature **419**(6907): 587-593.
- Nardai, G., L. Braun, et al. (2001). "Protein-disulfide isomerase- and protein thiol-dependent dehydroascorbate reduction and ascorbate accumulation in the lumen of the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **276**(12): 8825-8828.
- Navas, P., J. M. Villalba, et al. (1994). "Ascorbate function at the plasma membrane." Biochim Biophys Acta **1197**(1): 1-13.
- Niki, E. (1991). "Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals." Am J Clin Nutr **54**(6 Suppl): 1119S-1124S.
- Nishikimi, M., R. Fukuyama, et al. (1994). "Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonon-gamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man." J Biol Chem **269**(18): 13685-13688.
- Nishikimi, M. and K. Yagi (1991). "Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis." Am J Clin Nutr **54**(6 Suppl): 1203S-1208S.
- Nualart, F. J., C. I. Rivas, et al. (2003). "Recycling of vitamin C by a bystander effect." J Biol Chem **278**(12): 10128-10133.
- Oka, O. B. and N. J. Bulleid (2013). "Forming disulfides in the endoplasmic reticulum." Biochim Biophys Acta **1833**(11): 2425-2429.
- Olsowski, A., I. Monden, et al. (2000). "Cysteine scanning mutagenesis of helices 2 and 7 in GLUT1 identifies an exofacial cleft in both transmembrane segments." Biochemistry **39**(10): 2469-2474.
- Ormazabal, V., F. A. Zuniga, et al. (2010). "Histidine residues in the Na⁺-coupled ascorbic acid transporter-2 (SVCT2) are central regulators of SVCT2 function, modulating pH sensitivity, transporter kinetics, Na⁺ cooperativity, conformational stability, and subcellular localization." J Biol Chem **285**(47): 36471-36485.
- Padan, E. (2008). "The enlightening encounter between structure and function in the NhaA Na⁺-H⁺ antiporter." Trends Biochem Sci **33**(9): 435-443.
- Padh, H. (1990). "Cellular functions of ascorbic acid." Biochem Cell Biol **68**(10): 1166-1173.
- Pao, S. S., I. T. Paulsen, et al. (1998). "Major facilitator superfamily." Microbiol Mol Biol Rev **62**(1): 1-34.
- Pessino, A., D. N. Hebert, et al. (1991). "Evidence that functional erythrocyte-type glucose transporters are oligomers." J Biol Chem **266**(30): 20213-20217.
- Peterkofsky, B. (1991). "Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy." Am J Clin Nutr **54**(6 Suppl): 1135S-1140S.
- Preston, R. A. and S. A. Baldwin (1993). "GLUT 1: identification of exofacial lysine-residues." Biochem Soc Trans **21**(2): 309-312.
- Purhonen, P., A. K. Lundback, et al. (2005). "Three-dimensional structure of the sugar symporter melibiose permease from cryo-electron microscopy." J Struct Biol **152**(1): 76-83.
- Rajan, D. P., W. Huang, et al. (1999). "Human placental sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT2): molecular cloning and transport function." Biochem Biophys Res Commun **262**(3): 762-768.
- Roepe, P. D., R. I. Zbar, et al. (1989). "A five-residue sequence near the carboxyl terminus of the polytopic membrane protein lac permease is required for stability within the membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(11): 3992-3996.
- Rose, R. C. (1988). "Transport of ascorbic acid and other water-soluble vitamins." Biochim Biophys Acta **947**(2): 335-366.

- Rubin, R. A. and S. B. Levy (1991). "Tet protein domains interact productively to mediate tetracycline resistance when present on separate polypeptides." *J Bacteriol* **173**(14): 4503-4509.
- Rumsey, S. C., O. Kwon, et al. (1997). "Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid." *J Biol Chem* **272**(30): 18982-18989.
- Sahin-Toth, M., J. le Coutre, et al. (1999). "Characterization of Glu126 and Arg144, two residues that are indispensable for substrate binding in the lactose permease of *Escherichia coli*." *Biochemistry* **38**(2): 813-819.
- Salas-Burgos, A., P. Iserovich, et al. (2004). "Predicting the three-dimensional structure of the human facilitative glucose transporter glut1 by a novel evolutionary homology strategy: insights on the molecular mechanism of substrate migration, and binding sites for glucose and inhibitory molecules." *Biophys J* **87**(5): 2990-2999.
- Salas, A. (2011). "Determinantes Estructurales para el Transporte de Ácido Ascórbico: Validación de un Modelo Tridimensional y Caracterización de la Vía de Migración de Sustratos a través del Transportador de Vitamina C SVCT2." *Tesis Doctoral*. Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.
- Sapper, H., S. O. Kang, et al. (1982). "The reversibility of the vitamin C redox system: electrochemical reasons and biological aspects." *Z Naturforsch C* **37**(10): 942-946.
- Sauberlich, H. E. (1994). "Pharmacology of vitamin C." *Annu Rev Nutr* **14**: 371-391.
- Schmid, J. A., P. Scholze, et al. (2001). "Oligomerization of the human serotonin transporter and of the rat GABA transporter 1 visualized by fluorescence resonance energy transfer microscopy in living cells." *J Biol Chem* **276**(6): 3805-3810.
- Scholze, P., M. Freissmuth, et al. (2002). "Mutations within an intramembrane leucine heptad repeat disrupt oligomer formation of the rat GABA transporter 1." *J Biol Chem* **277**(46): 43682-43690.
- Seatter, M. J., S. A. De la Rue, et al. (1998). "QLS motif in transmembrane helix VII of the glucose transporter family interacts with the C-1 position of D-glucose and is involved in substrate selection at the exofacial binding site." *Biochemistry* **37**(5): 1322-1326.
- Shimamura, T., S. Weyand, et al. (2010). "Molecular basis of alternating access membrane transport by the sodium-hydantoin transporter Mhp1." *Science* **328**(5977): 470-473.
- Sitte, H. H., H. Farhan, et al. (2004). "Sodium-dependent neurotransmitter transporters: oligomerization as a determinant of transporter function and trafficking." *Mol Interv* **4**(1): 38-47.
- Sorkina, T., S. Doolen, et al. (2003). "Oligomerization of dopamine transporters visualized in living cells by fluorescence resonance energy transfer microscopy." *J Biol Chem* **278**(30): 28274-28283.
- Sotiriou, S., S. Gispert, et al. (2002). "Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival." *Nat Med* **8**(5): 514-517.
- Stratakis, C. A., S. E. Taymans, et al. (2000). "Mapping of the human genes (SLC23A2 and SLC23A1) coding for vitamin C transporters 1 and 2 (SVCT1 and SVCT2) to 5q23 and 20p12, respectively." *J Med Genet* **37**(9): E20.
- Subramanian, V. S., J. S. Marchant, et al. (2004). "A C-terminal region dictates the apical plasma membrane targeting of the human sodium-dependent vitamin C transporter-1 in polarized epithelia." *J Biol Chem* **279**(26): 27719-27728.
- Takanaga, H., B. Mackenzie, et al. (2004). "Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23." *Pflugers Arch* **447**(5): 677-682.
- Takanishi, C. L., E. A. Bykova, et al. (2006). "GFP-based FRET analysis in live cells." *Brain Res* **1091**(1): 132-139.
- Terpe, K. (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." *Appl Microbiol Biotechnol* **60**(5): 523-533.
- Trivedi, M. V., J. S. Laurence, et al. (2009). "The role of thiols and disulfides on protein stability." *Curr Protein Pept Sci* **10**(6): 614-625.
- Tsai, C. J., K. Khafizov, et al. (2011). "Structural asymmetry in a trimeric Na⁺/betaine symporter, BetP, from *Corynebacterium glutamicum*." *J Mol Biol* **407**(3): 368-381.
- Tsukaguchi, H., T. Tokui, et al. (1999). "A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters." *Nature* **399**(6731): 70-75.

- Turk, E., O. Kim, et al. (2000). "Molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* vSGLT: a model for sodium-coupled sugar cotransporters." *J Biol Chem* **275**(33): 25711-25716.
- van Iwaarden, P. R., J. C. Pastore, et al. (1991). "Construction of a functional lactose permease devoid of cysteine residues." *Biochemistry* **30**(40): 9595-9600.
- Varma, S., C. E. Campbell, et al. (2008). "Functional role of conserved transmembrane segment 1 residues in human sodium-dependent vitamin C transporters." *Biochemistry* **47**(9): 2952-2960.
- Veenhoff, L. M., E. H. Heuberger, et al. (2001). "The lactose transport protein is a cooperative dimer with two sugar translocation pathways." *EMBO J* **20**(12): 3056-3062.
- Veenhoff, L. M., E. H. Heuberger, et al. (2002). "Quaternary structure and function of transport proteins." *Trends Biochem Sci* **27**(5): 242-249.
- Vera, J. C., C. I. Rivas, et al. (1993). "Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid." *Nature* **364**(6432): 79-82.
- Vera, J. C., C. I. Rivas, et al. (1995). "Resolution of the facilitated transport of dehydroascorbic acid from its intracellular accumulation as ascorbic acid." *J Biol Chem* **270**(40): 23706-23712.
- Vera, J. C., C. I. Rivas, et al. (1994). "Human HL-60 myeloid leukemia cells transport dehydroascorbic acid via the glucose transporters and accumulate reduced ascorbic acid." *Blood* **84**(5): 1628-1634.
- Wang, H., B. Dutta, et al. (1999). "Human Na(+)-dependent vitamin C transporter 1 (hSVCT1): primary structure, functional characteristics and evidence for a non-functional splice variant." *Biochim Biophys Acta* **1461**(1): 1-9.
- Wang, J. B., A. Moriwaki, et al. (1995). "Dopamine transporter cysteine mutants: second extracellular loop cysteines are required for transporter expression." *J Neurochem* **64**(3): 1416-1419.
- Wang, Y., B. Mackenzie, et al. (2000). "Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1." *Biochem Biophys Res Commun* **267**(2): 488-494.
- Wang, Y., T. A. Russo, et al. (1997). "Ascorbate recycling in human neutrophils: induction by bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13816-13819.
- Washburn, M. P. and W. W. Wells (1999). "Identification of the dehydroascorbic acid reductase and thioltransferase (Glutaredoxin) activities of bovine erythrocyte glutathione peroxidase." *Biochem Biophys Res Commun* **257**(2): 567-571.
- Weber, P., A. Bendich, et al. (1996). "Vitamin C and human health--a review of recent data relevant to human requirements." *Int J Vitam Nutr Res* **66**(1): 19-30.
- Wells, W. W. and D. P. Xu (1994). "Dehydroascorbate reduction." *J Bioenerg Biomembr* **26**(4): 369-377.
- Wells, W. W., D. P. Xu, et al. (1990). "Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity." *J Biol Chem* **265**(26): 15361-15364.
- Weyand, S., T. Shimamura, et al. (2008). "Structure and molecular mechanism of a nucleobase-transport-symport-1 family transporter." *Science* **322**(5902): 709-713.
- Williams, K. A. (2000). "Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA." *Nature* **403**(6765): 112-115.
- Williams, K. A., U. Geldmacher-Kaufer, et al. (1999). "Projection structure of NhaA, a secondary transporter from *Escherichia coli*, at 4.0 Å resolution." *EMBO J* **18**(13): 3558-3563.
- Winkler, B. S. (1987). "In vitro oxidation of ascorbic acid and its prevention by GSH." *Biochim Biophys Acta* **925**(3): 258-264.
- Wu, X., N. Itoh, et al. (2004). "Stimulation of differentiation in sodium-dependent vitamin C transporter 2 overexpressing MC3T3-E1 osteoblasts." *Biochem Biophys Res Commun* **317**(4): 1159-1164.
- Wu, X., N. Itoh, et al. (2003). "Zinc-induced sodium-dependent vitamin C transporter 2 expression: potent roles in osteoblast differentiation." *Arch Biochem Biophys* **420**(1): 114-120.
- Xiang, Z. and B. Honig (2001). "Extending the accuracy limits of prediction for side-chain conformations." *J Mol Biol* **311**(2): 421-430.
- Yamashita, A., S. K. Singh, et al. (2005). "Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters." *Nature* **437**(7056): 215-223.

- Yernool, D., O. Boudker, et al. (2004). "Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*." Nature **431**(7010): 811-818.
- Yin, Y., X. He, et al. (2006). "Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*." Science **312**(5774): 741-744.
- Zannoni, V. G., J. I. Brodfuehrer, et al. (1987). "Ascorbic acid, alcohol, and environmental chemicals." Ann N Y Acad Sci **498**: 364-388.
- Zottola, R. J., E. K. Cloherty, et al. (1995). "Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GLUT1 tetramerization." Biochemistry **34**(30): 9734-9747.
- Zuñiga, F. (2008). "Determinantes estructurales y funcionales que definen las propiedades cinéticas y regulatorias de los transportadores de ácido ascórbico SVCT1 y SVCT2." Tesis Doctoral. Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.

