

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



**Determinantes estructurales y funcionales que definen las propiedades
cinéticas y regulatorias de los transportadores de ácido ascórbico
SVCT1 y SVCT2**

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

Por

Felipe Andrés Zúñiga Arbalti

2008

5.- RESUMEN

El ácido ascórbico es transportado al interior celular por los transportadores de Na^+ -ácido ascórbico, SVCT1 y SVCT2, a favor del gradiente electroquímico del Na^+ . Ambos transportadores son altamente similares, con una identidad de secuencia mayor al 65% y patrones de hidrofobicidad consistentes con una estructura secundaria de 12 hélices transmembrana. Dado que ambos transportadores son activados cooperativamente por el Na^+ en forma similar, el principal criterio funcional utilizado hasta ahora para diferenciarlos es la K_m de transporte de ácido ascórbico.

Estudios recientes de nuestro laboratorio indican que para SVCT2, el Na^+ afecta la K_m de transporte de ácido ascórbico, el ácido ascórbico afecta la cooperatividad por el Na^+ y los cationes bivalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} son esenciales para la función del transportador. SVCT1, por otro lado, es activo en la ausencia de cationes bivalentes. De acuerdo a lo anterior, proponemos que las propiedades funcionales de SVCT1 y SVCT2 son moduladas diferencialmente por los sustratos Na^+ y ácido ascórbico y por cationes bivalentes, y que SVCT1 y SVCT2 poseen sitios de unión de cationes bivalentes que son responsables de su sensibilidad diferencial al Ca^{2+} y al Mg^{2+} .

En el contexto anterior, llevamos a cabo un estudio detallado de SCVT1 y SVCT2, expresados en células HEK-293 como proteínas de fusión con la proteína fluorescente verde y realizamos estudios de transporte de ácido ascórbico bajo distintas condiciones experimentales para establecer de que modo el Na^+ , el ácido ascórbico, el Ca^{2+} y el Mg^{2+} afectan las propiedades de ambos transportadores y determinan sus diferencias funcionales. 1) Analizamos el efecto del Na^+ sobre el transporte de ácido ascórbico examinando el grado de cooperatividad (n_H , Na_{50} y R_{Na}) y su efecto sobre las

constantes cinéticas de transporte (K_m y V_{max}). ii) Analizamos de que modo el ácido ascórbico afecta la activación por el Na^+ (n_H , Na_{50} y R_{Na}). iii) Determinamos la generación de corrientes de Na^+ inducidas por el ácido ascórbico. iv) Examinamos el efecto del Ca^{2+} y el Mg^{2+} sobre el transporte de ácido ascórbico (K_m y V_{max}) y la cooperatividad por el Na^+ (n_H , Na_{50} y R_{Na}). v) Utilizamos análisis de secuencia, introducción de mutaciones sitio-dirigidas y la construcción de una proteína quimérica para establecer la presencia de posibles sitios exofaciales de unión de Ca^{2+} responsables de la sensibilidad de SVCT1 y SVCT2 al Ca^{2+} y al Mg^{2+} .

Los resultados de estos estudios revelaron que: i) El Na^+ modula la función de SVCT1 y SVCT2 afectando diferencialmente el valor de la K_m de transporte de ácido ascórbico, con una curva de concentración-respuesta desplazada hacia menores concentraciones en el caso de SVCT2. ii) El ácido ascórbico modula la función de SVCT1 y SVCT2 afectando diferencialmente la capacidad del Na^+ para activar en forma cooperativa el transporte de ácido ascórbico. Para SVCT1, el Na^+ activa el transporte en forma cooperativa a todas las concentraciones de ácido ascórbico, mientras que para SVCT2 se pierde la cooperatividad y luego se hace totalmente independiente del Na^+ a elevadas concentraciones de ácido ascórbico. iii) El Ca^{2+} y el Mg^{2+} modulan diferencialmente la función de SVCT1 y SVCT2 debido a que SVCT2, pero no SVCT1, posee un dominio de unión de Ca^{2+} de tipo EF-Hand localizado en el lazo extracelular que conecta los dominios transmembrana III y IV. Este dominio corresponde a la secuencia $_{191}DVS\text{VANGTAE}LLHT_{204}$. Su inactivación por mutagénesis sitio-dirigida convierte a SVCT2 en un transportador con propiedades tipo-SVCT1 y su introducción en SVCT1 genera un transportador quimérico que se acumula intracelularmente.