



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Caracterización de SVCT-1 short una nueva variante de empalme de SVCT-1 con propiedades regulatorias



Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Biólogo

Paulina Saavedra Sieyes

Concepción, Chile, Julio 2012

5. RESUMEN

La vitamina C juega un importante papel en la mantención de la homeostásis normal de nuestro organismo y en la prevención de enfermedades. La vitamina C o ácido ascórbico (AA), funciona como un importante cofactor enzimático, permitiendo la síntesis de colágeno, péptidos neuroendocrinos y carnitina. Por otro lado, el AA es un poderoso antioxidante que participa en la neutralización de radicales peroxilo e hidróxilo, radicales superóxido y peroxinitrilo.

Para adquirir estas funciones, el AA debe ser transportado activamente al interior de la célula, lo cual es llevado a cabo por transportadores específicos presentes a nivel de membrana celular. En humanos, se han descrito 2 familias distintas de transportadores capaces de transportar la vitamina C. Uno de estos corresponde a los transportadores de hexosas o GLUTs, dentro de los cuales se ha descrito que las isoformas 1, 2, 3,4 y 6 corresponden a transportadores de ácido deshidroascórbico, la forma oxidada de la vitamina C. Por otro lado, se ha descrito la presencia de una familia de transportadores con la capacidad de transportar AA aprovechando la gradiente electroquímica del catión Na^+ , denominados SVCTs. Dentro de esta familia se han descrito 2 isoformas funcionales: SVCT1 y SVCT2, las cuales presentan una estructura bastante similar y son específicas para el transporte de ácido ascórbico. Además para SVCT2 ha sido caracterizada una variante incapaz de transportar AA además actuando como dominante negativo para SVCT1 y SVCT2. En este trabajo clonamos y caracterizamos una nueva isoforma, denominada SVCT-1 short (shSVCT1). Nuestra hipótesis de trabajo es que shSVCT1 es capaz de regular la capacidad de transporte de vitamina C actuando como dominante negativo.

SVCT1 short fue clonado desde cDNA de Caco-2 y luego subclonado en el vector pEGFP-N1. Al ser expresado en células HEK-293, shSVCT1 mostro una localización principalmente intracelular siendo incapaz de transportar ácido ascórbico al interior de las células. Experimentos de colocalización con marcadores específicos de organelos indicaron que shSVCT1 se encuentra localizado principalmente a nivel de retículo endoplásmico. Realizamos estudios de expresión del mensajero para shSVCT1 por la técnica de PCR utilizando partidores específicos que pudieran amplificar selectivamente el transportador

clonado. SVCT1 short se expresa en las líneas celulares HEK 293, de cáncer de próstata DU-145 y cáncer de mama ZR-75.

Para evaluar la función de shSVCT1, realizamos estudios de captación de ácido ascórbico y determinamos de los parámetros cinéticos de transporte en presencia o no de la isoforma shSVCT1. Interesantemente, cuando sobre-expresamos shSVCT1 en células que solo expresan de forma endógena el transportador SVCT2, como lo son las células Hek-293, no observamos cambios en los parámetros cinéticos estudiados, sin embargo, cuando sobre-expresamos shSVCT1 en células que expresan normalmente ambos transportadores SVCT1 y SVCT2, como lo son las células COS-7, observamos la disminución selectiva del componente de mayor capacidad de transporte, SVCT1 sin afectar aparentemente la capacidad de transporte para SVCT2.

En conclusión hemos podido clonar y caracterizar una nueva isoforma de los transportadores de vitamina C que tiene capacidades regulatorias del transporte de ácido ascórbico. Específicamente, la isoforma shSVCT1 es capaz de interactuar de forma selectiva y específica con el transportador SVCT1 (y no SVCT2) produciendo una retención del transportador a nivel intracelular y con esto disminuyendo la eficiencia de transporte para SVCT1. Actuando así shSVCT1 como un dominante negativo selectivo para el transportador SVCT1.