



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

**Determinantes estructurales en la vía de translocación de
sustratos del co-transportador de sodio-ascorbato
SVCT1.**

HENNY MARIANNE HAENSGEN SAEZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2013

Profesor Guía: Dr. Juan Carlos Vera Cárcamo
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:

Dr. Juan Carlos Vera Cárcamo
Profesor Tutor
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Coralia Rivas Rocco
Profesor Co-Tutor
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Nelson Carvajal Baeza
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Sergio Oñate Betancour
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Juan Carlos Sáez
Profesor Evaluador Externo
Universidad de Chile

Dr. José Guzmán G.
Director
Programa Doctorado en Ciencias
Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

AGRADECIMIENTOS

En este espacio quisiera agradecer a todos quienes colaboraron en mi desarrollo personal e intelectual a lo largo de los años que duró mi doctorado.

En primer lugar deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan Carlos Vera por aceptarme para realizar mi tesis doctoral en su laboratorio. Nuestra ya larga trayectoria juntos se vio enriquecida con buenas conversaciones y consejos que permitieron que esta tesis se llevara a cabo con éxito y favorecieron mi formación personal.

También agradezco a mis compañeros y personal administrativo que hicieron que mi paso por el laboratorio fuera muy grato y no solamente trabajo. Karen Susan, Eduardo, Ely, Paula, Felipe, Valeska, Zopin, Lota, Marquitos, Alejandra, gracias. De manera especial quisiera darle las gracias a Kirsty, Marita y Osmán con quienes además de ser compañeros compartimos una gran amistad y un sin fin de buenos recuerdos.

A mi papá, por impulsarme a realizar estudios de Postgrado posterior a la obtención del grado de Bioquímico.

A mi mamá y mi hermana por su apoyo constante y paciencia durante estos años.

A Fernando J., por ser mi amigo y compañero ideal durante todo este proceso. Por estar ahí tanto en los momentos difíciles como buenos, sus consejos y animarme hasta el último momento para finalizar con esta ardua tarea.

No puedo dejar de agradecer a todos mis amigos que han sido testigos del esfuerzo realizado y comparten la alegría que este paso supone para mí.

Para finalizar, agradezco a CONICYT por brindarme apoyo financiero a través de la beca para estudios de doctorado en Chile y becas de asistencia a congresos nacionales.

A todos, muchas gracias!

Henny M. Haensgen Sáez.-

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
INTRODUCCION	
I. Aspectos generales de la Vitamina C.....	7
II. Transporte de ácido deshidroascórbico (DHA).....	11
III. Transporte de ácido ascórbico (AA).....	12
III a. Organización genómica y estructural.....	12
III b. Regulación de la expresión de los transportadores SVCT.....	18
III c. Propiedades funcionales de los SVCT.....	20
III d. Relación estructura función; residuos involucrados en el transporte de ácido ascórbico.....	24
III e. Aspectos estructurales de los transportadores SVCT y su relación con la Superfamilia de Facilitadores Principales.....	25
IV. Nuevos antecedentes; Cambio en el modelo de estudio.....	31
IDENTIFICACION DEL PROBLEMA Y PROPUESTA DE TRABAJO	47
HIPOTESIS	50
OBJETIVO GENERAL	51
OBJETIVOS ESPECIFICOS	52
MATERIALES	53
METODOS	
1. Cultivo celular.....	55
2. Elección de residuos a mutar.....	55
3. Elección de las sustituciones de residuos aminoacídicos.....	55

4. Diseño de partidores destinados a la construcción de las mutantes en estudio.....	56
5. Construcción de mutantes mediante mutagénesis sitio-dirigida en el transportador SVCT1	56
6. Transformación de bacterias competentes <i>E.Coli</i> XL1-blue por electroporación.....	61
7. Selección de transformantes.....	61
8. Purificación de DNA plasmidial	61
9. Ensayos con enzimas de restricción	62
10. Purificación de ADN plasmidial por columna de intercambio iónico.....	64
11. Transfección transitoria del plásmido pEGFP-SVCT1 y mutantes SVCT1 en células HEK-293.....	64
12. Determinación de localización subcelular.....	65
13. Ensayo de transporte en células HEK-293 transfectadas con pEGFP-SVCT1 y mutantes.....	66
14. Detección de la expresión de mutantes por análisis de Western blot.....	67

RESULTADOS

1. Caracterización funcional de la quimera SVCT1-GFP. Localización subceluar, K_m de transporte de AA y activación cooperativa por Na^+	69
2. Análisis de localización subcelular.....	77
2.1 Mutantes localizadas en STM del dominio central.....	77
2.2 Mutantes localizadas en STM del dominio compuerta	87
3. Ensayos funcionales de captación de AA en el tiempo.....	92
3.1 Mutantes localizadas en STM accesorias del dominio central.....	92
3.2. Mutantes localizadas en STM del poro del dominio central.....	93
3.3 Mutantes localizadas en STM del dominio compuerta y lazos exofaciales.....	96
4. Ensayos funcionales para determinar K_m y V_{max} de transporte para AA.....	100
4.1. Mutantes localizadas en STM accesorias del dominio central.....	100
4.2 Mutantes localizadas en STM del poro del dominio central.....	101
4.3 Mutantes localizadas en STM del dominio compuerta y lazos exofaciales.....	104
5. Ensayos funcionales para determinar el efecto cooperativo del Na^+	107
5.1 Mutantes localizadas en STM accesorias del dominio central.....	109
5.2 Mutantes localizadas en STM del poro del dominio central.....	109
5.3 Mutantes localizadas en STM del dominio compuerta y lazos exofaciales.....	111
6. Análisis de mutaciones conservadas de los residuos aminoacídicos S80, L322 y S335.....	119
7. Estudio del efecto del Na^+ sobre la K_m de L322S.....	123

DISCUSION	128
1. Alteraciones de localización subcelular.....	129
2. Alteraciones funcionales.....	135
BIBLIOGRAFIA	156

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores comparativos de Km descritos para SVCT1 y SVCT2 en diversos modelos experimentales.....	21
Tabla 2. Identidad y similitud de secuencias alineadas con Fasta36.....	40
Tabla 3. Mutaciones propuestas para determinar elementos estructurales importantes para la actividad de SVCT1.....	49
Tabla 4. Partidores utilizados para la síntesis de las proteínas mutantes.....	59
Tabla 5. Resumen de los datos obtenidos del análisis funcional de las mutantes construidas para caracterizar la vía de translocación de sustratos en SVCT1.....	116
Tabla 6. Resumen de los datos obtenidos en la tesis y comparación con los datos conocidos en otras proteínas de la familia NCS2.....	149

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vitamina C en solución	10
Figura 2. Modelo propuesto para la estructura secundaria de los transportadores de ácido ascórbico.....	14
Figura 3. Estructura de las proteínas de la familia MFS que han sido cristalizadas a la fecha.....	27
Figura 4. Posibles residuos necesarios para la función en SVCT2 análogas a LacY.....	30
Figura 5. Estructuras 3D de cotransportadores de sodio.....	32
Figura 6. Modelo de alternancia de conformaciones para la translocación de sustratos en la superfamilia de cotransportadores del Na ⁺	35
Figura 7. Topología de las proteínas representantes de la MFS y SSS.....	38
Figura 8. Análisis filogenético y la predicción de hélices de membrana para la familia NCS: MEMSAT3.....	43
Figura 9. Topología para SVCT1 en base a la familia NCS2.....	44
Figura 10. Construcción de proteínas mutantes de SVCT1 por mutagénesis sitio-dirigida.....	58
Figura 11. Análisis de restricción de las proteínas SVCT1 y mutantes construidas en el vector pEGFP-N1...	63
Figura 12. Análisis de localización subcelular y funcional del transportador SVCT1-GFP y la proteína EGFP.....	73
Figura 13. Velocidades de transporte de AA por minuto mediado por todas las mutantes realizadas.....	74
Figura 14. Niveles de expresión de las proteínas mutantes transfectadas en células HEK-293.....	76
Figura 15. Clasificación de las mutantes del dominio central de acuerdo a su localización subcelular.....	78
Figura 16. Localización subcelular de las mutantes G171P y S80L.....	79
Figura 17. Localización subcelular de las mutantes H51D y L322S.....	80
Figura 18. Localización subcelular de la mutante S335L.....	81
Figura 19. Localización subcelular de las mutantes T417L y A418S.....	83
Figura 20. Localización subcelular de las mutantes I170S y T375L.....	84
Figura 21. Localización subcelular de las mutantes G378P y S381L	85
Figura 22. Localización subcelular de las mutantes S381L y V321S	86
Figura 23. Localización subcelular de la mutante S379L.....	88
Figura 24. Análisis de localización subcelular de las mutantes S217L e I218S.....	89
Figura 25. Análisis de localización subcelular de las mutantes T434L, G437P y T440V.....	90
Figura 26. Análisis de localización subcelular de las mutantes H210D y N478L localizadas en lazos exofaciales del transportador SVCT1.....	91
Figura 27. Captación en el tiempo de las mutantes localizadas en STM accesorias en el dominio central.....	94

Figura 28. Captación en el tiempo de las mutantes localizadas en STM del poro en el dominio central.....	97
Figura 29. Captación en el tiempo de las mutantes localizadas en STM del dominio compuerta y lazos exofaciales.....	99
Figura 30. Curvas concentración-respuesta para AA en las mutantes localizadas en STM accesorias en el dominio central.....	102
Figura 31. Curvas concentración-respuesta para AA en las mutantes localizadas en STM del poro en el dominio central.....	105
Figura 32. Curvas concentración-respuesta para AA en las mutantes localizadas en STM del poro en el dominio central	106
Figura 33. Curvas concentración-respuesta para AA en las mutantes localizadas en STM del dominio compuerta y lazos exofaciales.....	108
Figura 34. Efecto del Na ⁺ en la captación de AA mediado por las mutantes localizadas en STM accesorias en el dominio central.....	110
Figura 35. Efecto del Na ⁺ en la captación de AA mediado por las mutantes localizadas en STM del poro en el dominio central	112
Figura 36. Efecto del Na ⁺ en la captación de AA mediado por las mutantes localizadas en STM del dominio compuerta y lazos exofaciales.....	115
Figura 37. Resumen de las propiedades funcionales obtenidas en casa mutante y su relación con la localización en el modelo propuesto para SVCT1.....	118
Figura 38. Análisis de localización subcelular y funcional de las mutantes revertantes S80T, L322I y S335T.....	124
Figura 39. Análisis del efecto de la mutante L322S sobre la Km de transporte.....	127
Figura 40. Organización de los STM de SVCT1 desde una vista superior, acompañado de las ruedas helicoidales de los STM 1, 8 y 10 del dominio central.....	151
Figura 41. Cambios relevantes de las mutantes en el contexto de la topología del transportador SVCT1.....	154