



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Alejandro Reyes
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL
ÁCIDO METIL 2,5- DIHIDROXICINÁMICO SOBRE EL
TRANSPORTADOR DE HEXOSAS GLUT-1**

Tesis de Grado presentada
como parte de los requisitos
para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y
Título Profesional de
Bioquímico

WALLY ROCIO BERGMANN MUÑOZ

VALDIVIA – CHILE

2005

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias al Dr. Alejandro Reyes P. por su confianza y buena voluntad al permitirme integrarme a su laboratorio, además de su apoyo personal y académico durante la realización de esta tesis.

Quiero dar gracias también de manera muy especial a mis compañeros de laboratorio: Ximena, Paola, Natalia, Patricia, Alejandra, Mauricio, Franco y Alejandro, por hacer mas grato mi paso por este lugar y quienes no dudaron en brindarme su ayuda desinteresada cada vez que la necesite.

El presente trabajo se realizo en el Laboratorio de Estructura y Función de Proteínas de Membranas del Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, que contó con el financiamiento del proyecto FONDECYT 1020908.

DEDICATORIA

Sofía y Oscar, ustedes son la magia de mi vida, sus pequeñas sonrisas han sido mi razón. Los amo por sobre todas las cosas.

Pepi, llegar hasta aquí no ha sido fácil y sin tu amor, apoyo y comprensión nada hubiera sido lo mismo. Te quiero mucho.

Papás y Karencita, sin duda ustedes han sido mi sostén, siempre conmigo en las buenas y en las malas. Nada habría logrado sin su cariño y dedicación incondicional. Los quiero mucho.

INDICE DE CONTENIDOS

1.	Resumen	1
1.1.	Summary	2
2.	Introducción	3
3.	Materiales y métodos	18
3.1.	Materiales	18
3.2.	Aislamiento de los eritrocitos	18
3.3.	Obtención de membranas de eritrocitos humanos	19
3.4.	Ensayos de desplazamiento de la unión de citocalasina B a membranas de eritrocitos.	20
3.5.	Ensayos de eflujo de D-glucosa	21
3.6.	Ensayos de transporte trans-cero de entrada para glucosa	22
3.7.	Ensayos cinéticos de intercambio en equilibrio para metilglucosa	24
3.8.	Ensayos de transporte trans-cero de salida para metilglucosa	25
3.9.	Lavado y determinación de la radiactividad	27
4.	Resultados	28
4.1.	Ensayos de unión y desplazamiento de citocalasina B	28
4.2.	Ensayos de transporte de metilglucosa y desoxiglucosa en eritrocitos	31
4.3.	Ensayos de entrada con DOG	31
4.4.	Ensayos de entrada con OMG	36
4.5.	Ensayos en condiciones de intercambio en equilibrio	39
4.6.	Ensayos en condiciones de salida	40
4.7.	Ensayos de salida de D-glucosa (Ensayo de Sen y Widdas)	44

5. Discusión	47
6. Bibliografía	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de la erbstatina y su análogo sintético ácido 2,5-metildihidroxicinámico (MHC).....	17
Figura 2: Curvas de unión y desplazamiento con citocalasina B.....	30
Figura 3: Curvas de saturación de la velocidad del transporte de desoxiglucosa y metilglucosa en eritrocitos humanos.....	34
Figura 4: Efecto del MHC en la incorporación de desoxiglucosa en eritrocitos humanos y caracterización del patrón de inhibición de la incorporación de desoxiglucosa por MHC.....	35
Figura 5: Efecto del MHC en la incorporación de metilglucosa en eritrocitos humanos y caracterización del patrón de inhibición de la incorporación de metilglucosa por MHC.....	38
Figura 6: Efecto del MHC sobre el transporte de metilglucosa en condiciones de equilibrio y caracterización del patrón de inhibición del transporte de metilglucosa por el MHC en condiciones de equilibrio.....	41
Figura 7: Efecto del MHC sobre el transporte de salida de metilglucosa y caracterización del patrón de inhibición del transporte de salida de metilglucosa por MHC.....	43
Figura 8: Efecto del MHC sobre la salida de D- glucosa en eritrocitos humanos y caracterización del patrón de inhibición del MHC sobre la salida de D- glucosa en eritrocitos humanos.....	46
Figura 9: Compuestos que interactúan con el transportador de hexosas GLUT1	57

ABREVIATURAS

OMG: 3-O-metilglucosa

DOG: 2-deoxi-D-glucosa

MHC: Ácido metil 2,5-dihidroxicinámico

GLUT: Transportador facilitativo de hexosas

DMSO: Dimetilsulfóxido

CCB: Citocalasina B

1. RESUMEN

GLUT1 es un transportador facilitativo de hexosas, ampliamente distribuido en diversos tipos celulares y especialmente abundante en eritrocitos humanos, cuya actividad es modificada por una serie de compuestos caracterizados como inhibidores de tirosina quinasas (Vera *et al. Biochemistry* 40, 777, 2001). Entre estos destaca el ácido 2,5-metildihidroxicinámico (MHC), un análogo sintético de erbstatina, el que es un producto natural de *Actinomycetes*. Nuestro estudio se ha centrado en averiguar de qué manera el ácido 2,5-metildihidroxicinámico interactúa con el transportador y cómo modifica su actividad. Para ello hemos realizado un análisis cinético detallado del transporte de análogos de D-glucosa usando condiciones de entrada, salida y de intercambio en equilibrio en eritrocitos humanos. Se ensayó la salida de D-glucosa en condiciones trans-cero y cis-infinito (ensayos de Sen – Widdas). En todas estas condiciones MHC fue un inhibidor eficaz, con valores de IC_{50} entre 150-750 μ M. Nosotros encontramos que en condiciones de equilibrio y de salida la inhibición fue competitiva, mientras que en los ensayos de entrada fue de tipo incompetitiva. Las determinaciones en ensayos cis-infinito mostraron que el inhibidor no afecta la unión de D-glucosa a su sitio externo. Por otro lado, ensayos de desplazamiento con citocalasina B unida a GLUT1 en membranas de eritrocitos indican que MHC se une de manera directa al transportador y que lo haría de manera competitiva. Nuestros resultados son compatibles entonces con la unión del inhibidor a un sitio accesible por la cara interna (endofacial) del transportador.

2. SUMMARY

GLUT1 is a facilitative hexose transporter highly expressed in diverse cell types and especially abundant in human erythrocytes, whose activity is be modified by a variety of compounds characterized as tyrosine kinase inhibitors (Vera *et al. Biochemistry* 40, 777, 2001). Between them results the methyl 2,5- dihydroxycinnamic acid (MHC), a synthetic analog of erbstatin, which is a natural product of *Actinomycetes*. Our investigation centers on the way in which MHC interacts with the transporter and how it modifies transporter activity. To do this we have performed a detailed analysis of the transport of D-glucose analogs in human erythrocytes using conditions of influx, efflux and exchange at equilibrium. We also tested the exit of D-glucose in zero-trans and infinite-cis conditions (Sen – Widdas assays). In every case MHC was an excellent inhibitor with IC_{50} values between 150-750 μ M. We found that in equilibrium and efflux conditions the inhibition was competitive, while in influx conditions it was uncompetitive. The results from infinite-cis assays shown that the inhibitor does not affect the binding of D-glucose to its external binding site. On the other side displacement assays with cytochalasin B bound to GLUT1 indicates that the MHC binds directly to the transporter and it does in a competitive fashion. Our results are consistent with the binding of the inhibitor to a site accessible by the inner endofacial face of the transporter.

2. INTRODUCCION

Los sistemas de transporte a nivel celular permiten el intercambio de iones y nutrientes, la excreción de productos del metabolismo y de sustancias nocivas, así como también la comunicación entre las células con su entorno. Para ello existen decenas de familias de transportadores de solutos o SLC (“solute carriers”) las que incluyen a transportadores de tipo pasivos, iónicos e intercambiadores, entre otros. Se conoce que al menos el 5% del total de genes humanos están relacionados con transportadores, lo que es consistente con su importancia biológica y con su función en la homeostasis celular. La familia de los SLC representa una porción considerable de estos genes; a la fecha se conocen 43 familias y 319 genes que se incluyen en la familia de transportadores de soluto o familia SLC, a los que se están sumando constantemente nuevos miembros (para una actualización de las tablas SLC, ver www.bioparadigms.org). Para que un determinado transportador sea considerado como miembro de los SLC debe demostrar entre un 20-25% de identidad en su secuencia de aminoácidos con otros miembros de esta familia. El remanente de genes que codifican para transportadores “no SLC” incluye canales, receptores ionotópicos, acuaporinas, subunidades de transportadores y canales, proteínas reguladoras o auxiliares del transporte, etc.

El transporte de glucosa a través de la membrana plasmática representa uno de los eventos celulares de transporte de nutrientes más importantes en células de mamíferos, dado que la glucosa juega un papel central en el metabolismo y la homeostasis celular. Su trascendencia radica esencialmente en que esta hexosa es una

fuente de energía básica para las células y su metabolismo les provee de ATP bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. El transporte de glucosa a través de la membrana plasmática se realiza por dos familias de proteínas distintas que pertenecen a los SLC.

La primera corresponde a la familia SLC5, transportadores que se caracterizan por utilizar el gradiente electroquímico de sodio para transportar hexosas en contra de sus gradientes de concentración, por ello se denominan transportadores activos de hexosas. Esta forma de transporte sodio-glucosa utiliza el intercambio de sodio para transportar glucosa y la energía que se requiere para este evento se obtiene de un gradiente iónico generado en las células por la bomba sodio-potasio dependiente de ATP (Wright, 2001).

El segundo grupo de transportadores corresponde a aquellos miembros que facilitan el transporte de carbohidratos a través de las membranas celulares de manera independiente de energía celular y a favor del gradiente de concentración de sustrato, por lo que se denominan transportadores facilitativos de glucosa y están presentes en la superficie de las células (Pessin *et al.*, 1991; Burant y Bell, 1992; Thorens, 1993; Joost *et al.*, 2002). Esta familia de transportadores corresponde a los SLC2, los cuales permiten el transporte facilitado de glucosa y otras hexosas en células de mamíferos (Carruthers, 1990; Bell *et al.*, 1993; Mueckler, 1994; Barrett *et al.*, 1999). Hasta el momento, en humanos se han clonado 14 isoformas de transportadores de hexosas (GLUT 1-14), los que muestran una gran diversidad tanto en su expresión en los diferentes tejidos, como en sus propiedades cinéticas y en su especificidad de sustrato. Por otra parte, se ha mostrado que en un mismo tejido o tipo celular es posible

encontrar más de una isoforma de los transportadores (Olson y Pessin, 1996a; Joost y Thorens, 2001; Wu y Freeze, 2002). Este transporte facilitativo de azúcares es saturable, estereoselectivo y bidireccional (Gould y Holman, 1993; Graeme-Cook *et al.*, 1993).

Basado en la secuencia de aminoácidos de los GLUTs, se ha propuesto un modelo que predice la orientación de las hélices transmembrana en la membrana celular (ver más adelante). Existe un alto grado de homología entre las hélices transmembrana de los GLUTs, mientras las secuencias de los extremos amino y carboxilo y del lazo son variables. Los alineamientos de las secuencias sugieren que las 14 isoformas descritas a la fecha se pueden agrupar a su vez en tres clases, individualizadas como I, II y III. Los miembros de las clases I y II tienen un largo lazo extracelular entre los dominios transmembrana 1 y 2 que contiene un sitio de glicosilación. Los miembros de la clase III carecen de este lazo entre los dominios 1 y 2, pero contienen un largo lazo con posibles sitios de glicosilación entre los dominios transmembrana 9 y 10 (Joost y Thorens, 2001; Macheda *et al.*, 2005).

La clase I está conformada por los transportadores GLUT1, 2, 3, y 4 los que han sido bien caracterizados en cuanto a su estructura, función y distribución en los tejidos. GLUT1 en tejidos fetales y en tejidos adultos se encuentra altamente expresado en eritrocitos, barrera hematoencefálica, riñón y colon. Sus propiedades se analizarán con detalle más adelante. GLUT2 es un transportador que tiene alta capacidad y baja afinidad por glucosa y se expresa mayoritariamente en células β -pancreáticas, en hígado y riñón. En las células α del páncreas, este transportador forma parte del mecanismo de sensibilidad a glucosa, mientras que en el hígado se expresa en la

membrana sinusoidal de hepatocitos y se encuentra regulado por un control hormonal. También se lo encuentra en el túbulo proximal del riñón, intestino delgado y en eritrocitos, donde forma parte de la vía transcelular para el transporte de glucosa y fructosa. GLUT3 es un transportador de glucosa con una alta afinidad y se encuentra presente en tejidos que tienen una alta demanda de glucosa como combustible, como es el cerebro; también se encuentra en placenta y testículos. GLUT4, es un transportador de glucosa que responde a insulina, se encuentra en corazón, músculo esquelético y tejido adiposo, donde es responsable de la disminución de los niveles de glucosa elevados en el plasma. También se encuentra en el cerebro (Rayner *et al.*, 1994).

Los transportadores facilitativos que se agrupan en la clase II son GLUT 7, 9 (ninguno de los cuales ha sido caracterizado funcionalmente), 5 y 11. Esta clase se encuentra representada por GLUT5 que transporta fructosa pero no glucosa (Kayano *et al.*, 1990), el cual se expresa principalmente en intestino delgado, testículo y riñón. GLUT7 es el miembro menos conocido de esta familia; el gen fue identificado por homología y se lo ha mapeado en el cromosoma 1, pero sus posibles tejidos de expresión son desconocidos (Joost y Thorens, 2001). GLUT9 se expresa en hígado y riñón, en bajos niveles se encuentra también en intestino delgado, pulmones, placenta y leucocitos (Phay *et al.*, 2000). En cuanto a GLUT11 se han descrito dos variantes de corte y empalme alrededor del exón 2, los cuales dan como resultado dos formas de proteína; una larga y una corta de 503 y 493 residuos de aminoácidos, respectivamente (Sasaki *et al.*, 2001). Ambas variantes se expresan en forma diferencial y en tejidos particulares. La forma corta que presenta una baja afinidad por glucosa se expresa

predominantemente en corazón y músculo esquelético (Doege *et al.*, 2001). La forma larga no se expresa ni en músculo ni en corazón pero se encuentra en hígado, pulmón, traquea y cerebro y estudios recientes sugieren que transporta fructosa (Wu *et al.*, 2002). Por estas razones parece ser que fructosa es el principal sustrato para GLUT11.

Por último, en la clase III encontramos cinco miembros que han sido descritos recientemente: GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT 12 y HMIT (que correspondería a GLUT13). GLUT6 se expresa en bazo, leucocitos, tejido adiposo y cerebro y se ha demostrado que el transportador reconstituido promueve el transporte de D-glucosa (Doege *et al.*, 2000a; Lisinski *et al.*, 2001). GLUT8 en cambio transporta glucosa y fructosa y se expresa preferentemente en la línea germinal masculina, pero también se lo localiza en hígado, músculos, tejido adiposo y neuronas (Doege *et al.*, 2000a; Doege *et al.*, 2000b; Ibberson *et al.*, 2000). A GLUT10 se lo ha identificado en tejidos como corazón, pulmones, cerebro, hígado, músculo esquelético, páncreas, placenta y riñón (Dawson *et al.*, 2001; McVie-Wylie *et al.*, 2001). GLUT12 fue identificado a partir de una línea de cáncer mamario y se ha descrito que se expresa normalmente en músculo esquelético, corazón, próstata tejido adiposo e intestino delgado (Rogers *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2003). Su análisis funcional muestra que transporta D-glucosa de preferencia sobre otras hexosas (Rogers *et al.*, 2003). GLUT13 ha sido encontrado exclusivamente en cerebro (corteza e hipotálamo) y muestra homología con GLUT8. La expresión de la proteína en ovocitos de *Xenopus* demostró que corresponde funcionalmente a un cotransportador de H⁺-mioinositol ((Uldry *et al.*, 2004). Por último, GLUT14 sería una isoforma que resulta como producto de una duplicación de GLUT3 y se expresa exclusivamente en testículo humano (Wu y Freeze, 2002).

De todos los GLUTs identificados, GLUT1 ha sido el transportador de glucosa más ampliamente estudiado debido, entre otras razones, a su abundancia y fácil aislamiento a partir de eritrocitos, donde comprende alrededor de 3-5% del total de las proteínas de membrana (Gould y Holman, 1993; Mueckler, 1994; Mueckler y Makepeace, 1997). El gen de GLUT1 se ha mapeado en el cromosoma 1 (1p35.31.3) y presenta 10 exones y 9 intrones con un largo aproximado de 35 kb. La secuencia de aminoácidos de GLUT1 se dedujo a partir de clones de cDNA (Mueckler *et al.*, 1985) y posee 492 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 54.117 Da. De acuerdo con los análisis de predicción de su estructura secundaria se propuso un modelo estructural para esta proteína, el cual consta de 12 dominios hidrofóbicos que atraviesan la membrana celular, alternados con segmentos cortos hidrofílicos. En esta conformación los extremos amino- y carboxilo- terminales y un gran lazo entre los segmentos 6 y 7 se encuentran orientados intracelularmente, mientras que un sitio de N-glicosilación ubicado en Asn 45 se encuentra en el primer lazo extracelular entre los segmentos transmembrana 1 y 2. Este modelo de 12 α -hélices transmembrana se extiende para todos los miembros de la familia de GLUTs que se encuentran clonados hasta el momento (Joost y Thorens, 2001). Estudios enzimáticos, inmunológicos, de marcaje con epítopes de glicosilación y de mapeo de saturación con cisteínas han confirmado en gran medida el modelo de 12 α -hélices transmembranas (Cairns *et al.*, 1984; Cairns *et al.*, 1987; Davies *et al.*, 1987; Andersson y Lundahl, 1988; Gibbs *et al.*, 1988; Davies *et al.*, 1990; Asano *et al.*, 1992; Hresko *et al.*, 1994).

Funcionalmente GLUT1, a pesar de ser un transportador muy eficiente de azúcares, permite la entrada sólo de D-hexosas y es incapaz de transportar isómeros L.

GLUT1 corresponde a un transportador de tipo facilitativo y, como tal, es capaz de transportar su sustrato en forma bidireccional. La dirección neta del transporte está determinada sólo por la concentración relativa del sustrato a ambos lados de la membrana plasmática y el ciclo de transporte no requiere consumo de energía. Dado el carácter facilitativo del transporte se espera que esta proteína muestre un sitio de unión para hexosas accesible desde la cara externa (exofacial) y otro en la cara interna (endofacial) en la membrana plasmática. La presencia de sitios de unión de orientación endo y exofacial se ha demostrado fehacientemente, así como también se ha evidenciado la existencia de un poro acuoso que participaría en la translocación del azúcar y que es accesible desde el medio acuoso externo (Carruthers, 1990).

Se presume que el mecanismo mediante el cual GLUT1 cataliza el transporte de azúcares involucra cambios conformacionales alternantes que exponen secuencialmente el sitio de unión de las hexosas a las superficies externa e interna de la membrana plasmática (Carruthers, 1990). Para entender este mecanismo se propone un modelo simplificado en el cual el transporte neto del azúcar hacia la célula (influjo) comprende: 1) una rápida unión al sitio exofacial del transportador, 2) translocación del complejo 3) liberación del azúcar desde un sitio endofacial hacia el citoplasma y finalmente, 4) una etapa de relajación del transportador libre que regenera el sitio de unión exofacial para el sustrato. En sentido reverso (eflujo), el ciclo completo involucra: 1)) la unión del sustrato al sitio endofacial, 2) la translocación del complejo, 3) la liberación del azúcar desde el sitio exofacial hacia el ambiente externo y ,4) la relajación que regenera el sitio de unión endofacial (Barnett *et al.*, 1973a, 1973b; Walmsley y Lowe, 1987).

Estas características implican que es posible obtener información detallada acerca del mecanismo catalítico, así como de la contribución de cada una de las etapas involucradas en el ciclo completo, realizando ensayos bajo condiciones en las cuales se mide transporte, a través de la membrana, en presencia de diferentes concentraciones de sustrato en el mismo lado (cis) o bien en el lado opuesto (trans) de la membrana plasmática (Deves y Krupka, 1978; Krupka y Deves, 1983; Deves y Krupka, 1989). Por ejemplo, es posible medir la entrada de diferentes concentraciones de sustrato en el medio externo en ausencia de sustrato en el medio intracelular (trans-cero influjo), o medir la salida de distintos niveles de azúcar desde la célula hacia el medio externo que no tiene sustrato (trans-cero eflujo), o bien medir la entrada de una pequeña cantidad de sustrato radiactivo cuando la concentración de sustrato es idéntica a ambos lados de la membrana (intercambio en equilibrio), o en que existe una concentración saturante de sustrato en el lado trans de la membrana (trans-infinito). El transporte de glucosa y sus análogos, mediado por GLUT1, exhibe cinéticas de Michealis–Menten simples cuando se realizan bajo este repertorio de condiciones, pero los valores de K_m y V_{max} que se obtienen son diferentes. Por ejemplo, en eritrocitos humanos los valores de K_m y V_{max} medidos para el eflujo trans-cero son alrededor de 10 veces mayores que aquellos derivados de mediciones de influjo trans-cero. La diferencia se debe a que en el primer ensayo se mide la K_m del sitio endofacial y la V_{max} de salida, mientras que en el segundo ensayo se mide K_m del sitio exofacial y la V_{max} de entrada. Se dice entonces que en eritrocitos intactos el transportador es asimétrico (Carruthers, 1990). A pesar de toda la información existente aun no se conoce con exactitud como ocurre el ciclo de

transporte, ni cuales residuos de aminoácidos estarían involucrados, ni la regulación del proceso en si mismo.

Se ha comprobado que GLUT1 es capaz de interactuar con una serie de moléculas de distinto y variado origen, que no están relacionadas estructuralmente con sus sustratos y aparentemente tampoco entre sí. Entre ellas se puede mencionar por ejemplo esteroides, derivados del ácido benzoico, flavonas, tirfostinas, lavendustinas, la chalcona floretina y citocalasina B (Bloch, 1973; Lacko *et al.*, 1975; Basketter y Widdas, 1978; Lacko *et al.*, 1981; Vera *et al.*, 1996a; Vera *et al.*, 2001). Estos compuestos comparten la propiedad que al interactuar con el transportador pueden modificar su actividad por medio de distintos mecanismos dependiendo de la naturaleza de su estructura. En particular, floretina y citocalasina B han sido utilizados ampliamente como controles en un gran número de investigaciones, dado que se encuentra muy caracterizado su mecanismo de acción; aunque poseen distintas propiedades cinéticas y estructurales, ambos son capaces de interactuar de manera directa con el transportador GLUT1.

Dado que un inhibidor, por definición, no es transportado, su sitio de unión puede ser accesible desde una o ambas caras del transportador, dependiendo, principalmente, de su ubicación en la proteína. Mediante ensayos cinéticos es posible dilucidar la orientación de estos sitios de unión (Deves y Krupka, 1978; Krupka y Deves, 1983; Deves y Krupka, 1989, 1990). Así, ensayos de intercambio en equilibrio permiten identificar aquellos compuestos que inhiben en forma competitiva la actividad de GLUT1 independientemente de la cara del transportador (exo o endofacial) por la cual tienen acceso a su sitio de unión y que corresponde a su sitio inhibitorio. Es así que si la

competencia se debe exclusivamente a la unión del inhibidor a un sitio accesible desde la cara externa del transportador, la inhibición debería ser competitiva en ensayos de influjo, pero no competitiva en ensayo de eflujo. En cambio, si el inhibidor se une a un sitio accesible desde la cara interna del transportador, los ensayos de eflujo trans-cero deberían resultar en un patrón de inhibición competitiva, mientras el influjo trans-cero de hexosas debería ser bloqueado de manera no competitiva.

Las proteínas quinasas participan en la regulación de una serie de procesos celulares, como el metabolismo intermediario, el ciclo celular, la transcripción/traducción genética y la traducción de señales. La fosforilación de otras proteínas en algunos de sus residuos serina, treonina o tirosina por estas proteínas quinasas es central en los procesos nombrados (Levitzki, 2002, 2003b). Se han clonado y caracterizado más de cien diferentes proteínas quinasas, pero no se ha determinado aún la totalidad de sus funciones en la célula (Manning *et al.*, 2002). Esto ha estimulado el desarrollo de inhibidores de bajo peso molecular, los que parecen exhibir una especificidad razonable por proteínas quinasas particulares, a pesar de la aparente similitud estructural de las proteínas (Casnellie, 1991; Levitsky *et al.*, 1994; Levitzki, 2003a).

Estudios recientes han validado la utilización de estos inhibidores de proteínas tirosina quinasas con especificidad para sitios de unión de ATP, como herramientas apropiadas para la detección de sitios con características funcionales de sitios de unión de nucleótidos en GLUT1 (Vera *et al.*, 1996b; Vera *et al.*, 2001). Estos inhibidores corresponden a moléculas pequeñas, tanto de origen natural como sintéticas (flavonas, isoflavonas y tirfostinas), que se caracterizan por ser inhibidores específicos de tirosina quinasas. De estas sustancias, solo los inhibidores que se ligan a sitios de unión de

ATP fueron capaces de inhibir de manera competitiva la actividad de GLUT1. En cambio, los inhibidores con afinidad por sitios de unión de tirosina, no bloquean la actividad de GLUT1 o la inhiben de manera no competitiva (Vera *et al.*, 1996a; Vera *et al.*, 2001). Estudios funcionales con GLUT1 purificado y reconstituido en proteoliposomas revelan que el transportador mantiene su actividad en ausencia de ATP, (Kasahara y Hinkle, 1977; Baldwin *et al.*, 1981), con lo que se confirma que GLUT1 es un transportador facilitativo, en donde la translocación del sustrato es independiente de energía. Sin embargo, estos resultados no se relacionan con los datos que sugieren que ATP sería capaz de modular el transporte de glucosa mediado por GLUT1 (Jacquez, 1983; Carruthers, 1986; May, 1988; Carruthers y Helgerson, 1989; Helgerson *et al.*, 1989; Levine *et al.*, 1998). Asimismo, se demostró mediante marcaje por afinidad que GLUT1 une ATP (Carruthers y Helgerson, 1989).

Un análisis de la estructura primaria de GLUT1 sugiere que este transportador posee secuencias que presentan homología con motivos de secuencias reconocidos en sitios de unión de nucleótidos en otras proteínas las que si requieren hidrólisis de ATP para ejercer su función. Estos sitios de unión a ATP corresponden a tres cortas secuencias, (sitio I-II-III), separadas en la estructura primaria, de los cuales dos se encuentran en la cara exofacial del transportador y el tercero en la cara endofacial. El putativo sitio I comprendería los residuos de aminoácidos que van del 111 al 118, lo que incluye parte del dominio transmembrana 3 y parte del asa exofacial que une los segmentos 3 y 4. El dominio II comprendería los residuos 225 al 229 y se ubicaría en el gran lazo intracelular que conecta los segmentos transmembrana 6 y 7. El último, dominio III, está formado por los residuos de aminoácidos 332 al 338 y se ubicaría en el

asa intracelular que une los segmentos transmembrana 8 y 9 (Carruthers y Helgerson, 1989; Levine *et al.*, 1998). No obstante, la actividad de GLUT1 es también modulada por análogos de ATP no hidrolizables, lo que demuestra que el efecto modulador no requiere hidrólisis y estaría mediado simplemente por la unión del nucleótido.

Estas posibles secuencias de unión de ATP no corresponderían a regiones con actividad enzimática relacionada a la hidrólisis del nucleótido-trifosfato, pero jugarían un papel importante en modular las propiedades funcionales de GLUT1. No se ha dilucidado de qué manera ATP puede afectar la actividad de GLUT1 sin la hidrólisis del nucleótido trifosfato, dado que la participación de proteínas extrínsecas se ha descartado. En vez, se postula que ATP puede desempeñar un papel estructural importante en determinar la conformación de los dominios del transportador que participan en el ciclo de transporte.

Es importante resaltar, sin embargo, que los sitios implicados en la unión de los inhibidores de proteína tirosina quinasas parecen ser funcionalmente diferentes a los sitios de unión alostéricos que dan cuenta de la modulación de la actividad de GLUT1 por ATP (Wheeler, 1989; Levine *et al.*, 1998; Heard *et al.*, 2000), debido a que se ha descrito que la presencia de ATP aumenta la afinidad y el número de sitios de unión para los azúcares e GLUT1. Por su parte los inhibidores de proteína tirosina quinasas bloquean competitivamente el transporte de sustratos y existe un único sitio alostérico para ATP en GLUT1, el cual es accesible sólo desde la cara intracelular de la proteína, mientras que distintos inhibidores acceden a su sitio de unión tanto desde la cara endo como exofacial (Andrade, 2001; Llévanes, 2001; Monsalve, 2001; Sanchez, 2003; Pérez, 2003; Ojeda, 2005).

De acuerdo a su acción sobre la actividad funcional de GLUT1 los inhibidores de proteína tirosina quinasas se pueden clasificar en dos grupos: los de tipo I que incluyen aquellos compuestos que inhiben eficientemente y de manera competitiva la actividad del transportador, y los de tipo II que corresponden a aquellos que inhiben de forma no competitiva o no inhiben la actividad de GLUT1 (Vera *et al.*, 2001). Una correlación interesante es que aquellos compuestos que no afectan la actividad de GLUT1, o inhiben la entrada de sustrato de forma no competitiva (tipo II) compiten por la unión de tirosina en las proteínas tirosina quinasa, mientras que sólo aquellos compuestos que bloquean de manera competitiva la unión de ATP a la tirosina quinasa son capaces de afectar la actividad de GLUT1 y lo hacen de una manera competitiva (inhibidores de tipo I).

El metil 2,5-dihidroxicinamato (MHC) es un compuesto sintético, análogo de la erbstatina, compuesto este último que es un producto natural aislado de *Actinomycetes* y que es también un potente inhibidor de la actividad proteína tirosina quinásica asociada al receptor del factor de crecimiento epidermal (Umezawa *et al.*, 1990). Erbstatina sin embargo se inactiva rápidamente en suero. No obstante, metil 2,5-dihidroxicinamato es un análogo más estable y que inhibe al factor de crecimiento epidermal de una manera competitiva con el sustrato y no competitiva por ATP (Stanwell *et al.*, 1996).

MHC inhibe también el transporte de metilglucosa, desoxiglucosa y de la forma reducida del ácido ascórbico, en células HL-60 con una similar dependencia de la dosis (Vera *et al.*, 2001). La inhibición es de carácter no competitivo, lo cual sugiere que no se une al transportador por un sitio accesible por la cara externa de GLUT1. MHC es

estructural y funcionalmente muy similar a las tirstofinas y debido a esto varios autores lo consideran como parte de este grupo de moléculas (Figura 1). De hecho no solo modifica la actividad de GLUT1, sino que comparte una serie de efectos a nivel celular con las tirstofinas. Como ejemplo se puede mencionar que afecta la tumorigénesis inducida por oncogenes, la proliferación celular, la diferenciación celular, la angiogénesis y ciertos mecanismos de transducción de señal. Se presume, por lo tanto, que estos múltiples efectos reflejan su habilidad para inhibir la actividad de proteína tirosina quinasas.

Con estos antecedentes, nos planteamos la interrogante entonces acerca de que manera el ácido metil 2,5-dihidroxicinámico bloquea la actividad de GLUT1. Por ello nos formulamos la hipótesis “la unión específica del ácido metil 2,5-dihidroxicinámico (MHC) en un sitio endofacial estabiliza al transportador GLUT1 en una conformación inactiva”. Para probar esta hipótesis nos propusimos desarrollar los siguientes objetivos.

1. Probar el mecanismo de inhibición de GLUT1 por el MHC en ensayos cinéticos de transporte.
2. Probar cómo el MHC desplaza a citocalasina B desde su sitio en GLUT1.

Las características y la especificidad de la inhibición y los resultados de los ensayos de unión en membranas y cinéticos en eritrocitos enteros, indican que el efecto del MHC está relacionado a su interacción directa con GLUT1. Estos resultados enfatizan la habilidad de GLUT1 para interactuar con moléculas estructuralmente no relacionadas con glucosa. Esto tiene en el contexto de comprender el efecto del MHC sobre la fisiología celular.

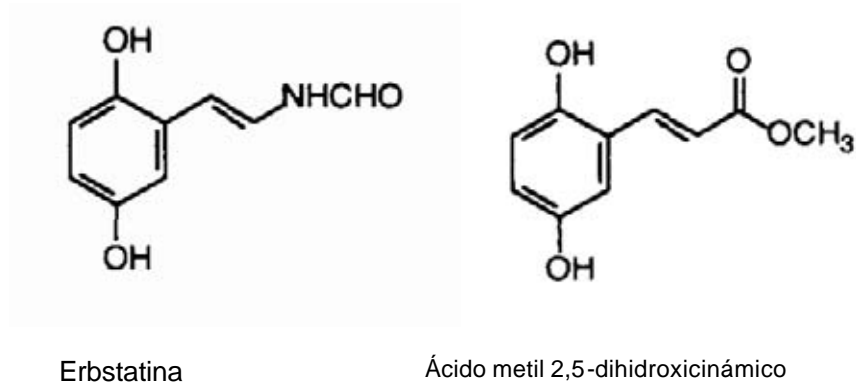


Figura 1: Estructura química de, ácido metil 2,5-dihidroxicinámico. Se muestran las estructuras químicas de la erbstatina, su análogo sintético, ácido metil-2,5-dihidroxicinámico y de la tirfosfatina A-47.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Materiales

3-O-[metil-³H]-D-glucosa (86,7 Ci/mmol), 2-[1,2-³H]-desoxi-D-glucosa (26,2 Ci/mmol), y [4-³H]-citocalasina B (11,9 Ci/mmol) fueron obtenidos de DuPont NEM. Cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de potasio monobásico, Hepes, dimetilsulfóxido (DMSO), cloruro de mercurio y metanol fueron adquiridos de J.T.Baker. El ácido metil 2,5-dihidroxicinámico (MHC), D-glucosa, floretina, yoduro de potasio, D-sorbitol, citocalasina B, citocalasina E, 2-desoxi-D-glucosa, Tris, 3-O-metil-glucosa y cloruro de magnesio, fueron adquiridos en Sigma, Chemical Co, MO, USA.

3.2. Aislamiento de los eritrocitos.

La sangre para la obtención de eritrocitos fue solicitada al servicio de Banco de Sangre del Hospital Regional Valdivia, en bolsas de 450 mL aproximadamente de sangre entera. Cada unidad contenía dextrosa, adenina y como anticoagulante citrato de sodio. El aislamiento de eritrocitos se realizó a partir de 5 mL de sangre que se resuspende en 10 mL de HEPES salino (HEPES 150 mM pH 7,4; cloruro de sodio 135 mM, cloruro de potasio 50 mM, cloruro de calcio 18 mM y cloruro de magnesio 8 mM). Sobre los eritrocitos sedimentados se deposita una capa blanca, que corresponde a las células de la línea blanca (neutrófilos, macrófagos, linfocitos), la que se extrae fácilmente por aspiración con una pipeta. Luego los eritrocitos se lavan tres veces sucesivamente por centrifugación en una centrífuga clínica por dos minutos y

resuspensión cada vez con HEPES salino. Se elimina en cada ocasión el sobrenadante hasta que éste sea claro y se resuspende este sedimento celular en HEPES salino. Después del último lavado los eritrocitos son resuspendidos en el tampón de lavado y almacenados a 4° C hasta su posterior utilización.

3.3. Obtención de membranas de eritrocitos humanos.

La preparación de membranas aisladas se realiza siguiendo un método descrito en estudios previos (Carruthers, 1986). Los eritrocitos se colocan en tubos plásticos de 250 mL y se lavan tres veces con una solución de fosfato salino pH 7,4. Para esto la sangre se centrifuga en una centrífuga Sorvall RC-5C a 4.500 rpm en rotor GSA por 10 minutos cada vez. Sobre los eritrocitos sedimentados se deposita una capa blanquecina, la que corresponde a las células de la línea blanca, la que se extrae fácilmente por aspiración con una pipeta y se resuspenden las células con un volumen de fosfato salino. Después del último lavado los eritrocitos se lisan por estrés hipotónico al agregarles 5 volúmenes de fosfato de sodio 5 mM pH 7,4 por 10 minutos a 4°C. Las membranas se recolectan por centrifugación a 10.000 rpm por 25 minutos a 4°C; se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en fosfato de sodio 10 mM pH 7,4. El proceso de centrifugación y resuspensión se repite tres veces, para obtener membranas de eritrocitos totalmente desprovistas de citoplasma. Las membranas se resuspenden finalmente en fosfato de sodio 10 mM pH 7,4. A estas membranas se les determina la concentración de proteínas mediante la utilización de una curva de calibración, previamente elaborada con albúmina bovina como estándar, cada vez que se realiza la preparación de membranas.

3.4. Ensayos de desplazamiento de la unión de citocalasina B a membranas de eritrocitos.

Para determinar la unión de citocalasina B al transportador en membranas de eritrocitos, el método se montó en base a lo descrito por diversos autores (Gorga y Lienhard, 1981; Lavis *et al.*, 1987; Vera *et al.*, 1996a). La unión de citocalasina B al transportador de glucosa se estima a partir de la diferencia entre la unión de citocalasina B en presencia de D-sorbitol 0,5 M (unión total) D-glucosa y 0,5 M (unión inespecífica). El ensayo se inicia por la adición de 0,1 mL de preparación de membranas (0,3-0,4 mg proteína/mL) en fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4 sobre 50 μ L de una mezcla de reacción, para tener una composición final de citocalasina B fría 0,1 μ M, [4-³H]-citocalasina B (11,9 Ci/mmol) 0,07 μ Ci, citocalasina E 10 μ M (exceso para desplazar la unión inespecífica de CCB a membrana (Mookerjee *et al.*, 1981), el compuesto inhibidor en un intervalo de concentraciones de 0-500 μ M y 0,5 M D-sorbitol o D-glucosa. La mezcla se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos, luego se centrifuga a 15.000 rpm por 10 minutos en micro centrifuga Eppendorf a 4° C. El precipitado se resuspende en 0,1 mL de Tris-HCl 10 mM, 0,5 % SDS, pH 8,0 y se agrega a un vial de centelleo para conteo de radiactividad, posteriormente se realizan dos lavados más del tubo con 50 μ L cada uno con el tampón fosfato-sodio 10 mM, pH 7,4, los cuales también se agregan al vial. También se puede calcular la cantidad de ligando radiactivo midiendo la diferencia entre citocalasina B soluble antes (cuentas totales) y después de la centrifugación (cuentas solubles).

Para determinar el desplazamiento inducido por MHC en la unión de citocalasina B a membranas de eritrocitos, se realizan ensayos a concentraciones fijas de 0, 0,3, 1,

3, 10, 30, 100 y 300 μM de MHC. Para este ensayo se agregan 0,1 mL de solución de membranas (0,3-0,5 mg proteína/mL) en fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4 sobre una mezcla de reacción para tener un volumen final de 150 μL que contiene citocalasina B fría 0-1,6 μM , [4-³H] citocalasina B (12 Ci/ mmol) 0,01 μCi , citocalasina E 10 μM , el MHC en la concentración correspondiente y 0,5 M D-sorbitol 0 D-glucosa. Para determinar la constante de disociación y la unión máxima de citocalasina B en cada caso, los datos de la unión específica (desplazable por D-glucosa) se calculan en cada ensayo.

3.5 Ensayos de eflujo de D-glucosa.

Este tipo de ensayo se basa en la metódica descrita por Sen y Widdas (Sen y Widdas, 1962). Los eritrocitos previamente lavados se incuban a 30° C por al menos 1 h en 100 mM D-glucosa. El ensayo comienza cuando se adiciona directamente sobre 5 μL de células cargadas con D-glucosa ($50-60 \times 10^6$ células por mL), 2,5 mL de HEPES salino pH 7,4, en una cubeta de cuarzo de 3 mL. Para probar la inhibición de la salida de D-glucosa por MHC, a 5 μL de eritrocitos previamente incubados con D-glucosa se le adiciona 2,5 mL de hepes salino pH 7,3 que contenían concentraciones crecientes de MHC cuyos valores iban de 0 a 500 μM , estas soluciones se prepararon en tubos falcon de 15 mL. Para determinar el tipo de inhibición que ejerce el MHC sobre el sitio de unión externo de D-glucosa en el transportador de hexosa GLUT1, el método se basa en lo descrito por Sen-Widdas (Sen y Widdas, 1962). En este caso, los 2,5 ml de HEPES salino además contenían una concentración fija de D-glucosa, entre 0 y 12

mM. Los datos de transporte obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de D-glucosa en el lado externo de las células se expresan como tiempo de salida en función de la concentración de glucosa externa (Gráfico de Sen-Widdas). En todos los casos la velocidad de salida de D-glucosa se registra usando un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50 con temperatura controlada a 30° C y provisto de un agitador magnético. La longitud de onda de excitación y de emisión utilizada es de 650 nm, con ranuras de 5 nm en ambos casos.

3.6. Ensayos de transporte trans-cero de entrada para glucosa.

Este tipo de ensayo consiste en medir transporte de glucosa en condiciones en que el sustrato radiactivo se encuentra inicialmente en el lado externo, fuera de los eritrocitos y las células se encuentran depletadas de hexosas. Se mide entonces la cantidad de metilglucosa o desoxiglucosa tritiada que es capaz de ingresar hacia el citoplasma en función del tiempo. Experimentalmente, se prepara por una parte una suspensión de células libres de glucosa en Hepes salino a una concentración adecuada (40-60 x 10⁶ células por ensayo) y, por otra, una mezcla radiactiva que consiste de Hepes salino que contiene [³H]-metilglucosa (20-35 μCi/mL) y una cantidad de metilglucosa fría en una concentración adecuada y suficiente para alcanzar la concentración final que se desea usar en el ensayo de transporte, esta concentración puede ser fija o variable dependiendo del ensayo. Todos los ensayos se realizaron a temperatura de 4° C y por triplicado.

Para obtener la cinética de entrada de los sustratos, los ensayos se realizan en tubos plásticos eppendorf de 1,5 ml, teniendo un volumen final total de reacción de 200

μL con una concentración final de metilglucosa o desoxiglucosa de 0,5 mM. Del volumen total, 20 μL corresponden a los eritrocitos diluidos en Hepes salino pH 7,3 ($40 \cdot 10^6$ células) y los restantes 180 μL corresponden al volumen de mezcla radioactiva que contiene metilglucosa o desoxiglucosa 100 mM, 0,8-1 μCi de ^3H -metilglucosa o ^3H -desoxiglucosa y 18 μL de Hepes salino pH 7,3. Los ensayos se ejecutan en triplicado para lo cual sobre los 20 μL de eritrocitos se adicionan los 180 μL de mezcla. La reacción se detiene a distintos tiempos, los que varían de 0 a 900 seg, diluyendo la mezcla alrededor de 5 veces con solución de detención fría (buffer fosfato salino pH 7,3, cloruro de mercurio 10 μM , floretina 100 μM y yoduro de potasio 1,5 mM). Se realiza además un control basal en el cual se mide la radiación propia del sistema (tiempo cero) el cual se obtiene al adicionar sobre los 20 μL de eritrocitos, en forma simultánea los 180 μL de mezcla y la solución de detención. Cada una de estas muestras se centrifuga a 12.000 rpm por 15 seg, se extrae el sobrenadante y se repite la operación dos veces mas para lavar las células. Luego de lissarlas con 200 μL de metanol, se tratan las muestras para conteo de radiactividad (ver más adelante).

Para obtener las curvas de saturación para el transporte de hexosas, los 180 μL de las mezclas radiactivas contenían diferentes cantidades de metilglucosa o desoxiglucosa fría en Hepes salino pH 7,3, para obtener concentraciones finales de 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM y 50 mM.

Para evaluar la inhibición del transporte por MHC, fue necesario preparar una solución madre de MHC, de 100 y 200 mM, en DMSO. Ambas se diluyeron en 180 μL de mezcla radioactiva. Las concentraciones finales de MHC se variaron desde 0 a 1000 μM .

Para la determinación del tipo de inhibición del transporte por MHC en ensayos de entrada trans-cero, se midió el transporte de diferentes concentraciones de metilglucosa o desoxiglucosa en presencia de una concentración fija de MHC. A 20 μL de células ($40\text{-}60 \times 10^6$ células) se le adicionan los 180 μL de mezcla que contenía distintas concentraciones de OMG o DOG frío (entre 2 y 50 mM), $[3\text{H}]$ OMG 0,8 μCi y Hepes salino pH 7,3., además de las alícuotas de inhibidor necesarias para obtener la concentración deseada. En todos los casos la reacción se detuvo al cabo de 30 seg. Cada una de estas muestras se centrifuga a 12.000 rpm por 15, seg se extrae el sobrenadante y se repite la operación dos veces mas para lavar las células. Luego de lissarlas con 200 μL de metanol, se tratan las muestras para conteo de radiactividad (ver más adelante).

3.7. Ensayos cinéticos de intercambio en equilibrio para metilglucosa.

Este ensayo consiste en medir el eflujo (o infujo) de una pequeña cantidad de metilglucosa radiactiva en células en las que se mantiene a ambos lados de la membrana plasmática la misma concentración de metilglucosa. Experimentalmente realizamos el ensayo de intercambio en equilibrio en condiciones de entrada. Para ello preparamos por una parte una suspensión de células en Hepes salino a una concentración adecuada ($40\text{-}60 \times 10^6$ células por ensayo) las cuales fueron equilibradas con una concentración fija de metilglucosa fría por 1 hr a temperatura ambiente. 20 μL de esta suspensión de células se diluyó con 180 μL de una mezcla radiactiva que contenía una concentración idéntica de metilglucosa fría y además 0,8-1 μCi de

isótopos. Las cinéticas de transporte, curvas de saturación con metilglucosa, inhibición del intercambio y determinación del tipo de inhibición se realizaron como se detalla para los ensayos de entrada, con la precaución de preincubar las células con la correspondiente concentración de metilglucosa fría.

3.8. Ensayos de transporte trans-cero de salida para metilglucosa.

Estos ensayos consisten en medir transporte de metilglucosa en condiciones en que el sustrato radiactivo se encuentra en el lado interno de los eritrocitos, mientras que el espacio extracelular se encuentra libre del sustrato. Se mide por tanto la cantidad de metilglucosa tritiada que es capaz de salir desde el espacio intracelular hacia el exterior de la célula. Experimentalmente se prepara una suspensión de células en Hepes salino a una concentración adecuada ($40-60 \times 10^6$ células por ensayo) que además contiene [^3H] metilglucosa ($20-35 \mu\text{Ci/ml}$) y una cantidad de metilglucosa fría en una concentración adecuada, que puede ser fija o variable dependiendo del ensayo. Esta mezcla se equilibró 30 min a 37°C y luego por otros 30 min a 4°C . Todos los ensayos se realizaron en un volumen final de $200 \mu\text{L}$ en tubos plásticos de $1,5 \text{ mL}$.

Para las cinéticas de salida se usó una concentración final de metilglucosa 10 mM . Del volumen total, $8 \mu\text{L}$ corresponde al volumen de mezcla radioactiva que contiene eritrocitos diluidos en Hepes salino pH 7,3 ($40-60 \times 10^6$ células), $0,8 \mu\text{L}$ de metilglucosa 100 mM , $0,2 \mu\text{L}$ de [^3H] metilglucosa y $1 \mu\text{L}$ de Hepes salino pH 7,3 y $192 \mu\text{L}$ de Hepes salino pH 7,3. Los ensayos se ejecutan en triplicado para lo cual sobre los $8 \mu\text{L}$ de la mezcla de eritrocitos previamente incubados 30 min con metilglucosa a 37°C y que luego se incuban 30 minutos mas a 4°C se adicionan los $192 \mu\text{L}$ de Hepes. La

reacción se detiene a distintos tiempos, los que varían de 0 a 900 seg, diluyendo la mezcla alrededor de 5 veces con solución de detención fría (amortiguador fosfato salino pH 7,3, cloruro de mercurio 10 μM , floretina 100 μM y yoduro de potasio 1,5 mM). Se realiza además un control basal en el cual se mide la radiación propia del sistema (tiempo cero) el cual se obtiene al adicionar sobre los 8 μL de mezcla de eritrocitos, en forma simultánea los 192 μL de hepes y la solución de detención. Para obtener las curva de saturación de metilglucosa el ensayo se inicia al añadir 192 μL de hepes a 8 μL de una suspensión de células preincubadas ($50\text{-}60 \times 10^6$ células) con una mezcla radiactiva que contenía [^3H] metilglucosa 0,8 μCi y diferentes cantidades de metilglucosa fría en Hepes salino pH 7,3, para obtener concentraciones finales de 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM y 50 mM.

Para evaluar la inhibición del transporte por MHC es necesario preparar una solución madre de MHC en Hepes salino pH 7,3. El ensayo se realiza por triplicado con un total de 7 concentraciones que varían entre 0 μM y 300 μM . Las alícuotas de inhibidor se incluyen en los 192 μL de Hepes con los que se inicia la reacción.

Para la determinación del tipo de inhibición del transporte por MHC en ensayos trans-cero salida se midió transporte de diferentes concentraciones de metilglucosa en presencia de una concentración fija de MHC. A 8 μL de la mezcla de células ($40\text{-}60 \times 10^6$ células) preincubadas que contiene distintas concentraciones de OMG frío (entre 2 y 50 mM), [^3H] OMG 0.2 μCi y Hepes salino pH 7,3 se le adicionaron los 192 μL de la solución, que contiene diferentes concentraciones de MHC.

3.9. Lavado y determinación de la radiactividad.

Una vez que se ha detenido la reacción de transporte, se centrifuga inmediatamente a 11.000 rpm por 15 seg para extraer el sobrenadante por aspiración (con la ayuda de una bomba de vacío) y se repite el procedimiento de lavado 2 veces más con la solución de detención, con el fin de eliminar la glucosa tritiada unida inespecíficamente a las células. Después de extraer todo el sobrenadante, se adicionan 200 μ L de metanol con el fin de lisar los eritrocitos y liberar la glucosa tritiada. Se centrifuga a 14.000 rpm por 5 min y se transfieren los 200 μ L del sobrenadante a viales de vidrio de 7 mL de capacidad. Se agregó 2 mL de mezcla de centelleo líquido biodegradable comercial (EcoScynt; National Diagnostics, USA). Las mediciones de radiactividad se efectuaron en un contador de centelleo líquido Packard, modelo 1600 TR.

4. RESULTADOS

4.1. Ensayos de unión y desplazamiento de citocalasina B.

Se sabe que citocalasina B se une de manera directa al transportador de hexosas GLUT1. Por ello probamos la capacidad de MHC de desplazar la citocalasina B unida al transportador para comprobar que este inhibidor se une en forma directa. En la figura 2 (panel izquierdo) se observa que MHC desplaza la unión de citocalasina B desde su sitio de unión en GLUT1 de manera dosis-dependiente, es decir, a mayores concentraciones del inhibidor se observa una menor cantidad de pmoles de citocalasina B unida por mg de proteína. La línea continua corresponde al ajuste no lineal de los datos de la ecuación $B = B_{\max} / (1+I/K_D)$, donde B corresponde a citocalasina B unida a una cierta concentración de MHC, B_{\max} representa la unión máxima aparente medida en ausencia del inhibidor, I corresponde a la concentración de MHC y K_D es la constante de disociación aparente para citocalasina B. De este análisis se obtuvo una constante de disociación (K_D) de 185 μM y una unión máxima de 230 pmoles/mg de proteína, lo que es concordante con los datos descritos por otros autores. En el panel derecho de la figura 2 se representa el efecto de distintas concentraciones fijas variables de MHC sobre la unión de citocalasina B al transportador en un gráfico de Scatchard. Se utilizaron concentraciones de 0, 100 y 200 μM MHC respectivamente. En este tipo de gráficos, los valores se distribuyen en una línea recta en la cual la pendiente corresponde a $-K_D$ para citocalasina B el intercepto en el eje X corresponde a la unión máxima a una concentración saturante de ligando (B_0). Al observar la figura 1 (panel

derecho) es evidente que todas las rectas convergen hacia un valor común en B_0 cercano a 550 pmoles/mg de proteína. Esta conducta corresponde a un patrón de

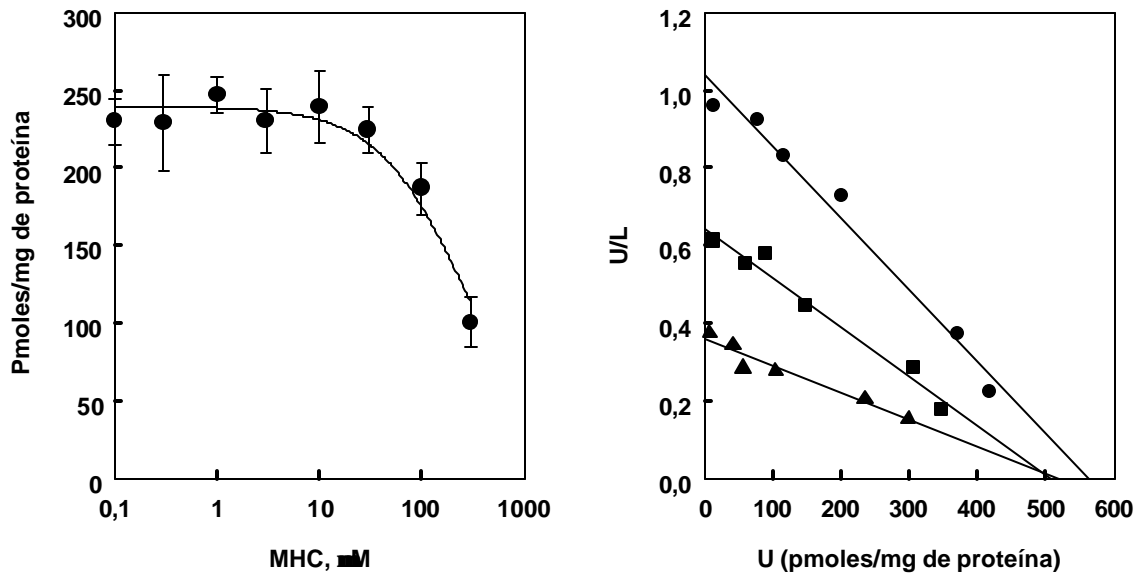


Figura 2. Curvas de unión y desplazamiento con citocalasina B. *Panel izquierdo.*

Se determina el efecto del MHC sobre el desplazamiento de CCB unida al transportador en membranas de eritrocitos. ***Panel derecho.*** Se determina el patrón de inhibición de la unión de CCB al transportador en membranas de eritrocitos con 0 (●), 100 (■) y 200 (▲) μM de MHC. Cada determinación se hizo por triplicado y se representa en el gráfico como el promedio ± DS. Para mas detalles ver Materiales y Métodos.

inhibición del tipo competitivo. Este resultado sugiere que ambos, MHC y citocalasina B, podrían compartir el mismo sitio de unión o bien compiten por el mismo conformero en el ciclo de transporte. Cualquiera sea el mecanismo, el carácter competitivo de desplazamiento se demuestra que el MHC se une de manera directa al transportador.

4.2. Ensayos de transporte de metilglucosa y desoxiglucosa en eritrocitos.

4.2.1. Ensayos de entrada con DOG.

Para determinar los parámetros cinéticos del transporte los ensayos se deben realizar durante un período de tiempo en que el transporte es lineal, es decir, en condiciones de velocidad inicial. Esto permite establecer claramente la diferencia entre el proceso de transporte en sí mismo y la posible acumulación del sustrato. En este estudio también es importante considerar la temperatura a la que se realizan los ensayos. Se conoce que a temperatura ambiente las condiciones de velocidad inicial se mantienen por los primeros 20 seg. En este estudio es necesario realizar los ensayos en eritrocitos humanos intactos a 4°C, puesto que a esta temperatura el transporte es suficientemente lento como para asegurar que las condiciones de velocidad inicial se mantengan en los diferentes ensayos a aplicar y se pueda seguir el transporte de manera fidedigna.

En ensayos preliminares se determinó que la entrada de desoxiglucosa 0,5 mM a los eritrocitos se mantuvo lineal durante los primeros 80 seg a 4° C; el equilibrio se alcanzó más allá de los 150 seg de ensayo. Basado en este resultado es posible afirmar que se puede medir transporte de entrada de desoxiglucosa 0,5 mM a 4°C en un tiempo de entre 20-40 seg. Usando estas condiciones (4°C, transporte durante 30 seg) se

determinó que la saturación del transporte de desoxiglucosa en el intervalo de concentraciones de hexosa entre 2 y 50 mM. Los valores de V_{\max} y K_M obtenidos son de 1900 pmoles/(10^6 células \times min) y de 9 mM respectivamente (Fig. 3).

El estudio del efecto del MHC sobre la incorporación de metilglucosa y desoxiglucosa en eritrocitos humanos se realizó a 4°C, por 30 seg y una concentración de sustrato de 0,5 o 10 mM dependiendo del tipo de ensayo. Estas condiciones se establecieron gracias al estudio previo de la cinética y saturación en condiciones de entrada. El estudio de inhibición se llevó a cabo utilizando concentraciones crecientes del MHC (Fig.4, panel izquierdo) y se determinó la constante de inhibición para el inhibidor, es decir, la concentración del MHC que se necesita para obtener una inhibición del 50% (IC_{50}). El valor obtenido para IC_{50} es de 670 μ M, mientras la actividad en ausencia del inhibidor fue de 73 pmoles/(10^6 células \times min). Se puede concluir, por lo tanto, que la inhibición del transporte en condiciones de entrada es dosis dependiente.

Para la caracterización del patrón de la inhibición del transporte de hexosas por MHC, la estrategia experimental consistió en determinar el efecto de distintas concentraciones del MHC sobre curvas de saturación para desoxiglucosa. Se utilizó 0 y 300 μ M del MHC. El resultado obtenido se representa en la figura 4 (panel derecho) como un gráfico de Eadie-Scatchard, o sea, v/S en función de v , donde las rectas corresponden a un ajuste lineal de los datos. Se puede apreciar que ambas rectas se intersectan casi en el mismo valor del eje de las y. Este resultado se puede interpretar como un patrón de inhibición del tipo incompetitivo, lo que significa que en estas

condiciones el MHC fue capaz de afectar tanto el valor de K_M como de V_{max} para el transporte

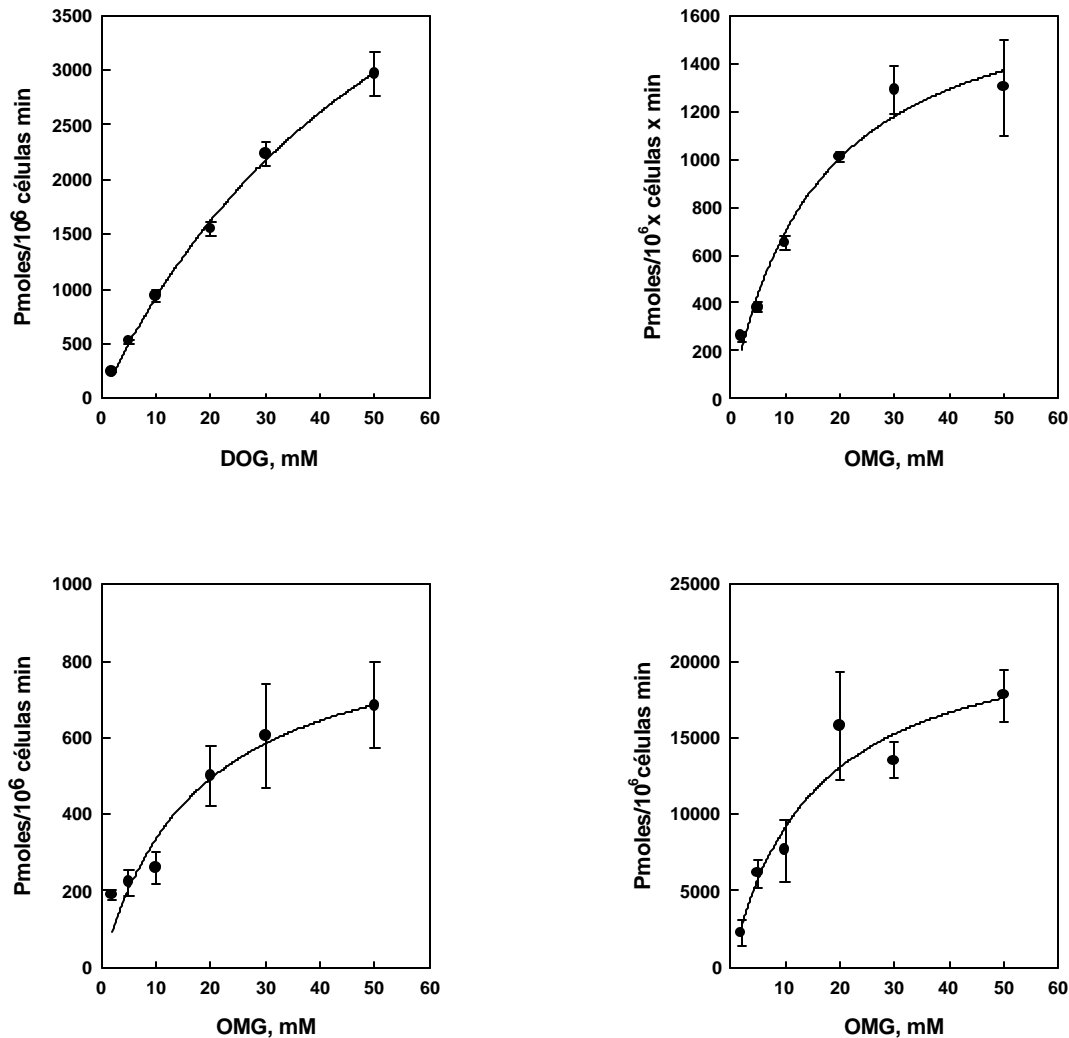


Figura 3: Curvas de saturación de la velocidad del transporte de desoxiglucosa y metilglucosa en eritrocitos humanos. *Superior izquierda.* Curva de saturación para desoxiglucosa. *Superior derecha.* Curva de saturación para metilglucosa. *Inferior izquierda.* Curva de saturación para metilglucosa en equilibrio. *Inferior derecha.* Curva de saturación para metilglucosa en condiciones de salida. Para los ensayos con DOG y OMG se midió la velocidad de entrada y en intercambio en equilibrio durante 30 seg y la velocidad de salida durante 45 seg y, en presencia de distintas concentraciones de sustrato frío y de 0,8 y 0,2 μCi de los sustratos radiactivos respectivamente. Todos los ensayos se realizaron a 4° C. Cada ensayo se realiza en triplicado y se representa \pm una desviación estándar.

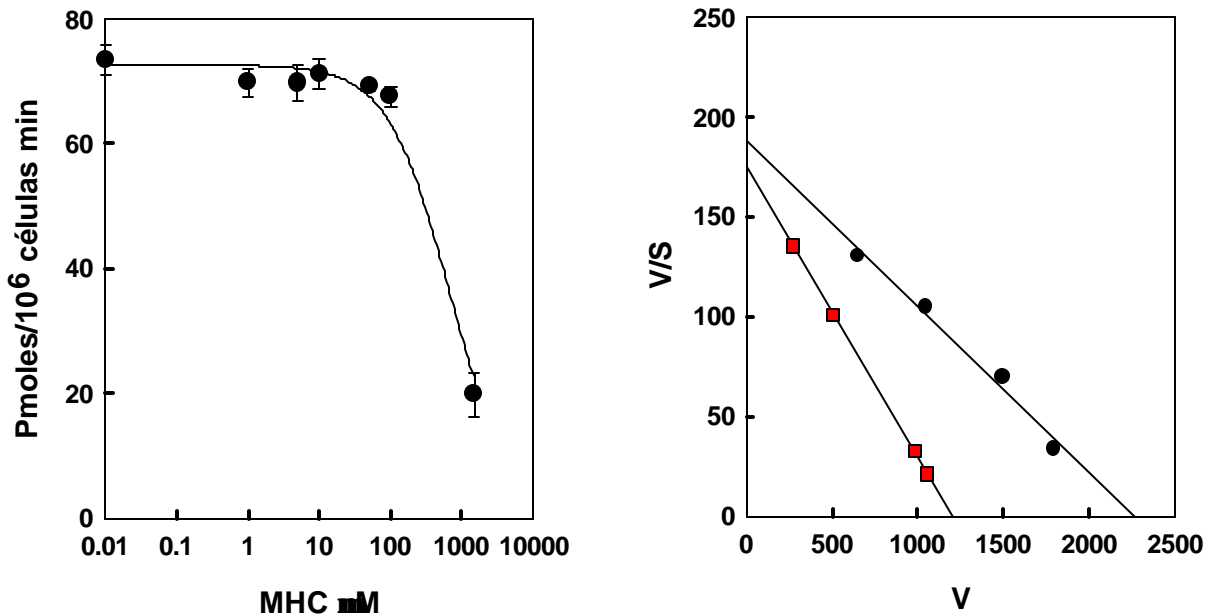


Figura 4: Panel izquierdo. Efecto del MHC en la incorporación de desoxiglucosa en eritrocitos humanos. Se midió la incorporación de desoxiglucosa 0.5 mM durante 30 seg a 4° C en presencia de concentraciones crecientes del MHC que van desde 0 hasta 1000 μM y un n número de eritrocitos de 40- 50 x 10⁶. **Panel derecho.** Caracterización del patrón de inhibición de la incorporación de desoxiglucosa por MHC. Se midió la incorporación de distintas y crecientes concentraciones desoxiglucosa en presencia de dos concentraciones diferentes de MHC 0 (●) y 300 (■). Para ambos ensayos cada punto en el gráfico corresponde al promedio de cuatro determinaciones ± desviación estándar. Para mayor detalle en la realización de los ensayos consultar materiales y métodos.

del azúcar. Los parámetros variaron de la siguiente manera; K_M disminuyó de 9 a 6 mM y V_{max} también disminuyó de 1900 a 1200 pmoles/(10^6 células \times min). Este tipo de inhibición refleja la capacidad del inhibidor de unirse reversiblemente al complejo proteína-sustrato, formándose un nuevo complejo proteína-sustrato-inhibidor que es inactivo, sin capacidad para translocar el sustrato a través de la membrana.

4.2.2. Ensayos de entrada con OMG.

En primer lugar y al igual que en los ensayos de incorporación de desoxiglucosa descritos con anterioridad, fue necesario determinar los parámetros cinéticos del transporte y para este propósito los estudios se deben realizar durante un período de tiempo en que el transporte es lineal, es decir, en condiciones de velocidad inicial. Se decidió usar metilglucosa para los ensayos de transporte pues es un sustrato natural de GLUT1 que no se metaboliza de modo que su transporte puede ser medido fielmente a tiempos cortos de ensayo y no se acumula en la célula, lo que permite llevar a cabo ensayos en condiciones de equilibrio y salida. En este estudio realizamos los ensayos en eritrocitos humanos intactos a 4°C, puesto que en esta condición el transporte es suficientemente lento como para asegurar que la condición de velocidad inicial se mantiene por un periodo suficiente de tiempo y se pueda seguir el transporte de manera fidedigna en condiciones de intercambio en equilibrio y en condiciones de salida. La cinética de entrada reveló que la velocidad del transporte a 4°C se mantuvo lineal durante los primeros 200 seg en estas condiciones; el equilibrio se alcanzó más allá de los 300 seg de ensayo. Basado en este resultado es posible afirmar que se puede medir

fielmente el transporte de entrada de metilglucosa 0,5 mM a 4° C en un tiempo de entre 20-40 seg. A 4°C y durante 30 seg determinó la saturación del transporte de metilglucosa entre 2 y 50 mM y los valores de $V_{\text{máx}}$ y K_M fueron de 2100 pmoles/(10^6 células×min) y de 16 mM, respectivamente (Fig. 3 superior derecha).

Sobre la base de estos estudios preliminares, en primer lugar se estudió el efecto del MHC sobre la entrada de metilglucosa en eritrocitos humanos en estas condiciones y a una concentración de sustrato de 0,5 mM. En la figura 5 (panel izquierdo) se determinó el valor de la constante de inhibición para el inhibidor, es decir, la concentración del MHC que se necesita para obtener una inhibición del 50%. El valor obtenido para IC_{50} fue de 700 μ M. Se puede concluir, por lo tanto, que la inhibición del transporte de metilglucosa en condiciones de entrada es dependiente de la dosis.

Para la caracterización del patrón de inhibición del transporte la estrategia experimental utilizada también consistió en determinar el efecto de distintas concentraciones del MHC sobre curvas de saturación de metilglucosa. Se utilizó 0 y 300 μ M del MHC. El resultado obtenido se representa en la figura 5 (panel derecho) en la forma de un gráfico de Eadie-Scatchard, o sea, v/S en función de v . Se puede apreciar que las rectas obtenidas por ajuste lineal de los datos se intersectan casi en el mismo valor del eje de las y, lo que se puede interpretar como un patrón de inhibición del tipo incompetitivo. Este resultado sugiere que en estas condiciones el MHC fue capaz de afectar el valor de K_M como de $V_{\text{máx}}$ para el transporte de metilglucosa. Los parámetros variaron de la siguiente manera; K_M disminuyó de 16 a

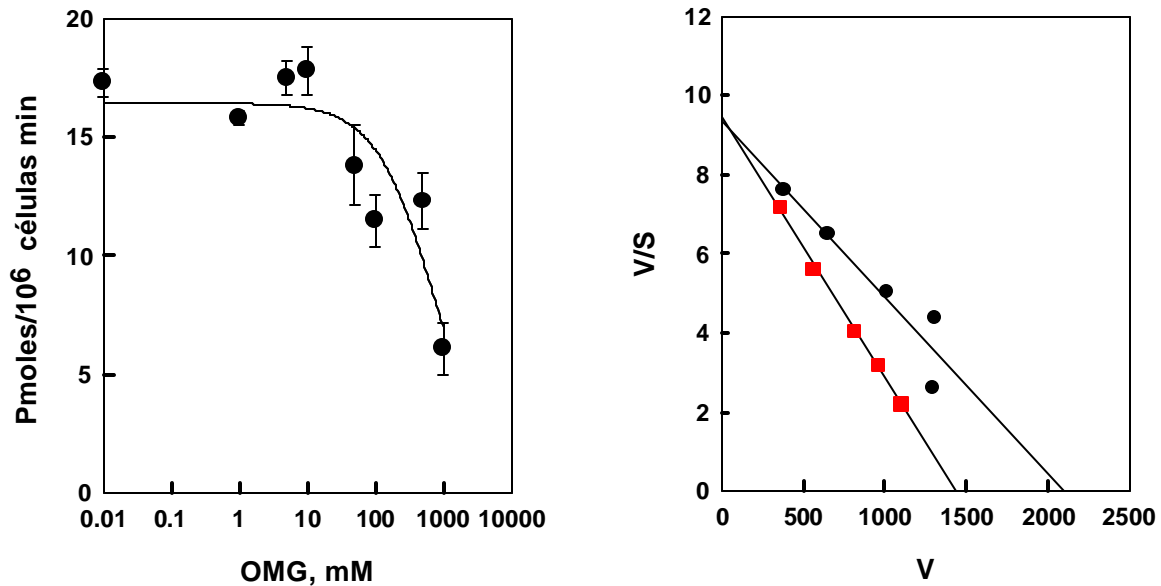


Figura 5: *Panel izquierdo.* Efecto del MHC en la incorporación de metilglucosa en eritrocitos humanos. Se midió la incorporación de metilglucosa (OMG) 0.5 mM durante 30 seg a 4° C en presencia de concentraciones crecientes del MHC que van desde 0 hasta 1000 μM y un número de eritrocitos de 40-50 x 10⁶. ***Panel derecho.* Caracterización del patrón de inhibición de la incorporación de metilglucosa por MHC.** Se midió la incorporación de distintas y crecientes concentraciones de metilglucosa en presencia de dos concentraciones diferentes de MHC 0 (■) y 200 (■) μM a un tiempo de 30 seg, 4° C de temperatura y con 40-50 x 10⁶ eritrocitos por ensayo. Para ambos ensayos cada punto en el gráfico corresponde al promedio de cuatro determinaciones ± desviación estándar. Para mayor detalle en la realización de los ensayos consultar materiales y métodos.

14 mM y V_{\max} también decayó de 2100 a 1400 pmoles/(10^6 células \times min). Este tipo de inhibición refleja la capacidad del inhibidor de unirse reversiblemente al complejo proteína-sustrato formándose un nuevo complejo proteína-sustrato-inhibidor que es inactivo, sin capacidad para translocar el sustrato a través de la membrana.

4.2.3. Ensayos en condiciones de equilibrio.

Al medir el transporte de metilglucosa en condiciones de intercambio en equilibrio, se mantiene el lado externo e interno de las células con idéntica concentración el sustrato no marcado. Se mide entonces el flujo unidireccional en condiciones de velocidad inicial de una pequeña fracción del sustrato marcado que se agrega en el lado externo de las células. Experimentos previos determinaron las condiciones apropiadas para equilibrar las células con diferentes concentraciones de metilglucosa. La cinética del intercambio en el equilibrio de metilglucosa 0,5 mM a 4° C en eritrocitos intactos mostró que el transporte en función del tiempo se mantuvo lineal hasta los 200 seg y el equilibrio en la concentración de sustrato marcado a ambos lados de la membrana plasmática se logra aproximadamente después de los 500 seg (datos no mostrados).

Se analizó la variación de velocidad de transporte en función de la concentración del sustrato (Fig. 3 inferior izquierda). Para esto las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de metilglucosa entre 2 y 5 mM. La velocidad del intercambio fue saturable y se determinaron valores de K_M y V_{\max} de 18 mM y de 1500 pmoles/(10^6 células \times min), respectivamente.

El efecto del MHC sobre el intercambio en equilibrio de metilglucosa se analizó mediante la utilización de concentraciones crecientes del inhibidor desde 0,01 hasta 1000 μM y efectivamente inhibió el intercambio en equilibrio de metilglucosa de manera dosis-dependiente (Fig.6, panel izquierdo) y con un valor de IC_{50} de 180 μM . Asimismo, determinamos el patrón de la inhibición del transporte en condiciones de intercambio en equilibrio, usando 0 y 150 μM de MHC como concentraciones fijas variables del inhibidor. En un gráfico de v/S en función de v el resultado fue una inhibición del tipo competitivo (Fig.6, panel derecho), lo cual sugiere que el inhibidor bloquea uno de los sitios a los que se une la glucosa en el transportador. Esto implica que en presencia del inhibidor disminuye la afinidad por el sustrato (aumenta el valor de K_M), pero altas concentraciones de sustrato son capaces de revertir completamente el bloqueo de la actividad (se mantiene V_{max}). Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos son de 18 mM para K_M y de 1500 pmoles/(10^6 células \times min) para V_{max} en ausencia del inhibidor y de 37 mM para K_M y 1400 pmoles/(10^6 células \times min) para V_{max} en presencia de 150 μM del MHC. Estos datos concuerdan con las variaciones de los parámetros que se esperarían para un inhibidor competitivo, es decir, que aumente K_M y V_{max} no varíe.

5.2.3. Ensayos en condiciones de salida.

En este tipo de ensayo se incuban las células con una concentración fija de metilglucosa no marcada por un período de tiempo suficiente para que los eritrocitos se equilibren con el sustrato. Para caracterizar las condiciones de ensayo se midió el eflujo de metilglucosa 10 mM desde el compartimiento interior al exterior del eritrocito. La

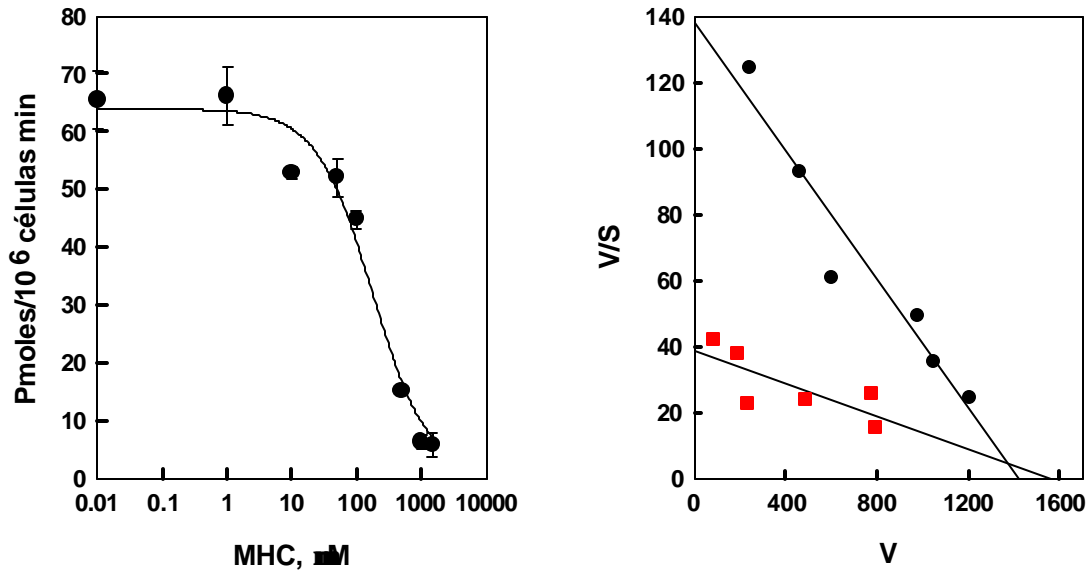


Figura 6: Panel izquierdo. Efecto del MHC sobre el transporte de metilglucosa en condiciones de equilibrio. Se midió el transporte de metilglucosa 0.5 mM en presencia de concentraciones crecientes del MHC de 0 hasta 1000 μM por un tiempo de 30 seg a 4° C y con un número de eritrocitos de $40\text{-}60 \times 10^6$ previamente incubadas con metilglucosa. **Panel derecho. Caracterización del patrón de inhibición del transporte de metilglucosa por el MHC en condiciones de equilibrio.** Se midió el transporte de concentraciones crecientes de metilglucosa en presencia de diferentes concentraciones del MHC 0 (●) y 150 (■) μM por un tiempo de 30 seg a 4° C y con un número de $40\text{-}60 \times 10^6$ de eritrocitos previamente incubados con metilglucosa. Para ambos ensayos cada punto en el gráfico corresponde al promedio de cuatro determinaciones \pm desviación estándar. Para mayor detalle en la realización de los ensayos consultar materiales y métodos.

velocidad de salida se mantuvo lineal hasta los 80 seg y el equilibrio entre las concentraciones interna y externa del sustrato marcado se alcanzó después de aproximadamente los 100 seg.

Para medir la dependencia de la velocidad de eflujo con la concentración de sustrato se emplearon concentraciones de metilglucosa entre 2 y 5 mM. Se logró determinar que el transporte se satura a concentraciones milimolares de glucosa. (Fig. 3 inferior derecha). Los valores para los parámetros cinéticos K_M y V_{max} obtenidos a partir de estos datos fueron de 18 mM y 18000 pmoles/(10^6 células×min), respectivamente.

El efecto de diferentes niveles del inhibidor sobre la salida de metilglucosa de células enteras también se evaluó en estas condiciones utilizando para ello concentraciones crecientes del MHC entre 0,01 y 1000 μ M. Como era de esperar, MHC fue capaz de bloquear la salida de metilglucosa de manera dosis-dependiente con un valor para IC_{50} de 180 μ M. El patrón de inhibición del MHC en este tipo de ensayo, que se representa como un gráfico de Eadie-Scatchard muestra que el MHC es un inhibidor del tipo competitivo. Esto sugiere nuevamente que el inhibidor bloquea uno de los sitios a los que se une la glucosa en el transportador. El inhibidor aumenta el valor de K_M , pero altas concentraciones de sustrato son capaces de revertir completamente el bloqueo de la actividad (se mantiene V_{max}). En relación a los valores para los parámetros cinéticos tenemos que K_M sin inhibidor es de 18 mM y en presencia de este es de 43 mM, para la V_{max} son de 18000 y 16000 pmoles/(10^6 células×min) en ausencia y presencia de 150 μ M de MHC respectivamente. El carácter competitivo de la inhibición en estos ensayos de salida indica que MHC bloquea la unión de metilglucosa

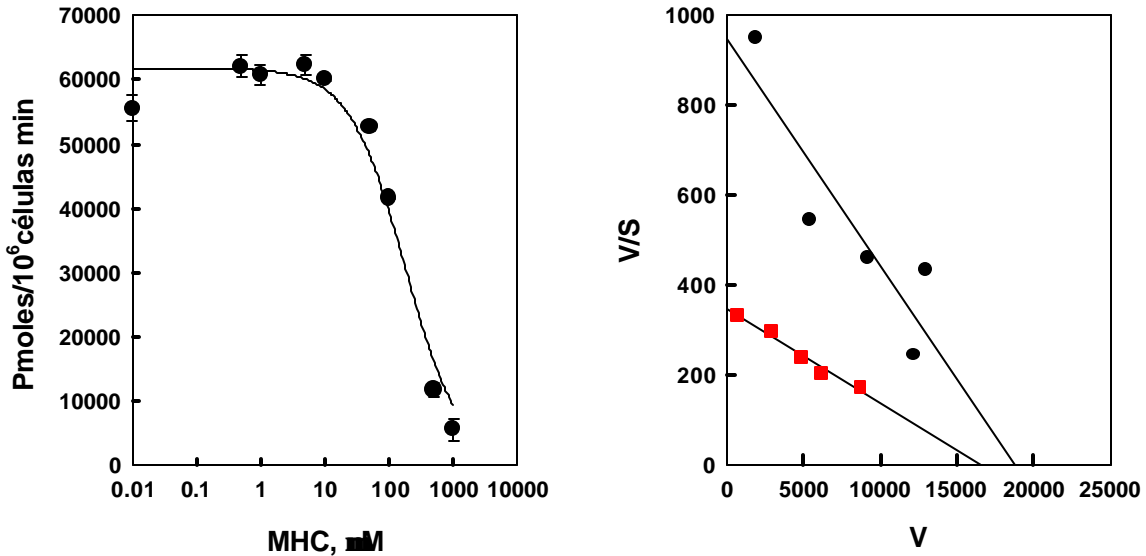


Figura 7: Panel izquierdo. Efecto del MHC sobre el transporte de salida de metilglucosa. Se midió la salida de metilglucosa 10 mM en presencia de concentraciones crecientes del MHC de entre 0 y 1000 μM por un tiempo de 45 seg a 4° C de temperatura y con un número de eritrocitos de 40-60 $\times 10^6$ previamente incubados con metilglucosa. **Panel derecho.** Caracterización del patrón de inhibición del transporte de salida de metilglucosa por MHC. Se midió la salida de concentraciones crecientes de metilglucosa en presencia de distintas concentraciones del MHC de 0 (●) y 150 (■) μM por un tiempo de 45 seg a 4° C de temperatura y con un número de eritrocitos de 40-60 $\times 10^6$ previamente incubados con metilglucosa. Para ambos ensayos cada punto en el gráfico corresponde al promedio de cuatro determinaciones \pm desviación estándar. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

en el sitio accesible hacia el lado interno del transportador. Este resultado provee entonces un argumento convincente para postular que MHC se une al transportador por su cara endofacial.

Por otro lado, los valores obtenidos para K_M y V_{max} en las distintas condiciones de ensayos están en el intervalo de valores descritos en la literatura, así como también se observa que la afinidad del transportador es mayor para desoxiglucosa que para metilglucosa lo que concuerda con lo que se ha descrito hasta el momento.

4.3. Ensayos de salida de D-glucosa (Ensayo de Sen y Widdas).

Nuestros resultados previos sugieren que el MHC se une al transportador GLUT1 en un sitio accesible desde su cara endofacial. Quisimos probar esta interpretación midiendo por otra metodología si MHC afecta la unión de D-glucosa al sitio externo o exofacial. Para ello realizamos ensayos de salida de D-glucosa en condiciones cis-infinito (ensayos de Sen-Widdas). En este caso se evalúa la variación del tamaño de los eritrocitos, cargados en forma previa con 100 mM de D-glucosa al pasarlos de forma rápida a un medio que no contiene D-glucosa. Este cambio de osmolaridad da paso a la salida de glucosa desde las células, que conlleva un cambio de volumen y eventualmente a un aumento de la luz dispersada. Este aumento en la dispersión de luz es función de la velocidad del transporte de D-glucosa desde el interior de las células. Estos incrementos en la luz dispersada se debieron ajustar a una curva monoexponencial de la cual se extrajo el valor de la constante de velocidad (k) para alcanzar el equilibrio osmótico a medida que se incrementa la concentración de un inhibidor, en otras palabras los valores de k debieran disminuir. Nuestros resultados

muestran que la salida de D-glucosa es inhibida por MHC (Fig. 8, panel izquierdo). La línea sólida se obtiene al ajustar los datos experimentales a una ecuación clásica de inhibición dosis-dependiente; de este ajuste se puede estimar el valor de la constante de inhibición IC_{50} , que fue equivalente a $150 \mu\text{M}$ (Fig. 8, panel izquierdo).

Por otro lado, Sen y Widdas demostraron que si se expresan los datos de transporte obtenidos al diluir las células en medios que contienen distintas concentraciones de D-glucosa en el lado externo de la membrana, como el tiempo de salida en función de la concentración de glucosa externa (Gráfico de Sen y Widdas, 1962), se puede obtener el valor de la constante de semisaturación para el sitio externo de D-glucosa (Figura 8, panel derecho). El intercepto en el eje x corresponde al valor negativo de la constante de semisaturación para el sitio de glucosa externo.

Bajo estas condiciones encontramos que tanto en presencia como en ausencia de MHC la constante de semisaturación se mantuvo en un valor de 5 mM . Es decir que el MHC no afectó la afinidad de D-glucosa por su sitio de unión externo. Esta conducta concuerda con un patrón de inhibición de tipo no competitivo, o sea el MHC no compite con D-glucosa por su sitio de unión externo.

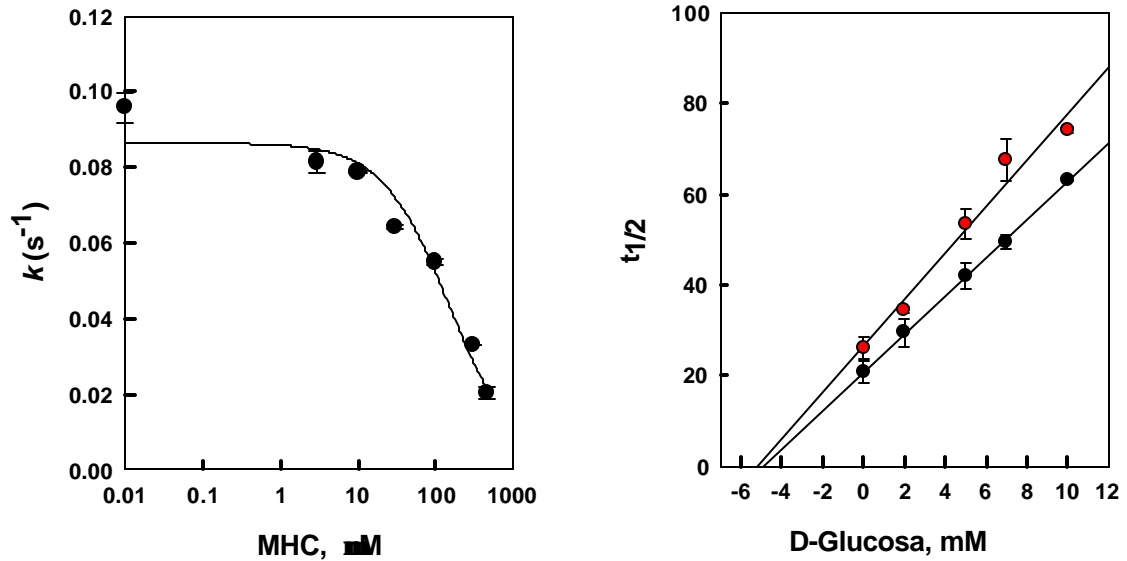


Figura 8: Panel izquierdo. Efecto del MHC sobre la salida de D- glucosa en eritrocitos humanos. La salida de D-glucosa se midió por el cambio de volumen de eritrocitos cargados con 100 mM del azúcar, mediante la dispersión de luz en presencia de diferentes concentraciones de MHC. Se grafica velocidad de salida de D-glucosa en función de la concentración del inhibidor. **Panel derecho. Patrón de inhibición del MHC sobre la salida de D- glucosa en eritrocitos humanos.** Se mide la salida de concentraciones crecientes de D-glucosa en presencia de diferentes concentraciones del MHC (0 y 150 μM). Los datos se presentan como el promedio de dos determinaciones.

5. DISCUSIÓN

GLUT1 se ha identificado como un típico transportador del tipo facilitativo el cual permite el transporte de sustrato a través de la membrana plasmática a favor de un gradiente de concentración. En otras palabras, el flujo neto del sustrato está determinado exclusivamente por la concentración relativa de sustrato a ambos lados de la membrana. Por lo tanto es posible concebir a GLUT1 como una proteína integral de membrana, la que posee un poro acuoso que permite la translocación del azúcar a través del plano de la membrana plasmática. Entonces, es necesario que un transportador de estas características exista en al menos dos conformaciones, cada una de las cuales muestra un sitio de unión de sustrato expuesto sobre uno de los lados de la membrana, en cada uno de los extremos del canal acuoso. De esta manera el transportador sería capaz de permitir la unión del sustrato, etapa previa a su translocación. Sin embargo, un posible sitio de unión para un determinado inhibidor puede estar localizado en sólo una de las superficies de la membrana, debido a que el inhibidor, por definición, no sufre transporte. Por estas razones es de gran utilidad determinar si el inhibidor posee su sitio de unión en la superficie interna, externa o ambas. En especial esto será relevante con aquellos inhibidores que tienen la capacidad de unirse a un único lado del transportador y que compiten por la unión de los sustratos. Estos inhibidores pueden transformarse en una eficiente herramienta en la investigación del mecanismo del transporte en GLUT1.

Es por esta razón que esta tesis tuvo como propósito caracterizar la interacción del ácido 2,5-metil dihidroxicinámico (MHC) con el transportador, un compuesto sintético análogo de una molécula de origen natural denominada erbstatina, que se identificó por

su capacidad de inhibir la acción de proteínas tirosina quinasas (Vera et al., 2001) y cuyos efectos a nivel celular están estrechamente relacionadas con esta propiedad. Es precisamente el modo de acción de este compuesto, el MHC, sobre el transportador GLUT1 lo que fue objeto de análisis en esta tesis.

Cuando se trata del caso de enzimas es relativamente sencillo establecer si un inhibidor se une al mismo sitio que el sustrato, o bien a sitios diferentes. Si el sustrato y el inhibidor se unen al mismo sitio, el inhibidor se comporta de manera competitiva, vale decir, disminuye la afinidad aparente para el sustrato (aumenta el valor de K_M aparente), pero altas concentraciones del sustrato son capaces de revertir completamente el bloqueo de la actividad (se mantiene el valor de V_{max}). Si en cambio el sustrato y el inhibidor se unen a sitios distintos e independientes, el inhibidor se comportará como de tipo mixto o no-competitivo, el cual disminuye la actividad de la enzima incluso a concentraciones saturantes del sustrato (disminuye V_{max}), mientras la afinidad aparente hacia el sustrato se mantiene (inhibidor no-competitivo) o bien se altera (inhibidor mixto).

En el caso de los transportadores facilitativos la situación es más compleja, pues ellos permiten el transporte de sustratos tanto hacia dentro como hacia fuera de la célula, de modo que se comportan como si tuvieran al menos dos sitios de unión para el sustrato, uno con orientación exofacial y otro con orientación endofacial (Krupka y Deves, 1983). Sin embargo, es posible realizar ensayos que permiten discriminar el tipo de inhibidor e incluso la orientación del sitio (exo o endofacial) que está siendo analizado. Así, se emplean ensayos en distintas condiciones de sentido de flujo del sustrato para dilucidar si un inhibidor compite con los sitios de unión de sustratos sea

endofacial, exofacial o ambos, o bien si se une a un sitio diferente e independiente de la proteína.

En los ensayos de intercambio en equilibrio la concentración de sustrato es idéntica a ambos lados de la membrana plasmática. Si el inhibidor compite con el sustrato por unión a cualquier sitio (exofacial, endofacial o ambos), se comportará como un inhibidor competitivo, pero si se une a un sitio diferente se comportará como un inhibidor no-competitivo. Por otra parte en los ensayos trans cero, si se mide el transporte de entrada neto de un sustrato (influjo), los valores de K_M y V_{max} que se miden corresponden a los del sitio exofacial para el sustrato. Si se analiza el efecto de un inhibidor competitivo para este ensayo se obtendrán diferentes respuestas si el inhibidor compite con el sitio exofacial o endofacial. Si la unión ocurre en el lado exofacial, la inhibición será competitiva, pero si se liga por la cara endofacial se comportará como un inhibidor mixto o no competitivo. Por otra parte, si se mide el transporte neto desde dentro hacia fuera de la célula (eflujo) se determinan los valores de K_M y V_{max} del sitio endofacial para el sustrato. Con idéntica lógica del análisis anterior, si el inhibidor compite en el sitio endofacial se comportará como un inhibidor competitivo, pero si compite por el sitio exofacial se comportará como un inhibidor no-competitivo o mixto.

Gracias a este tipo de estudios cinéticos detallados se ha logrado dilucidar como interactúan algunas moléculas inhibitoras sobre el transportador de hexosas. De hecho, se han obtenido pruebas que GLUT1 posee diferentes sitios de unión para sus efectores, accesibles desde las superficies externa e interna de la proteína. Es así que floretina se une al transportador por un sitio accesible desde su cara externa, donde compite con D-glucosa y otras hexosas en la unión al sitio exofacial (Vera *et al.*, 2001).

Por otro lado se ha demostrado que citocalasina B se une al transportador en un sitio que es accesible sólo por su lado citoplasmático, donde aparentemente comparte determinantes de unión con el sitio endofacial de unión de hexosas (Basketter y Widdas, 1978).

Nuestros datos nos permitieron verificar en primera instancia la interacción directa del transportador con el inhibidor MHC. Esto se logró mediante los estudios de unión y desplazamiento de citocalasina B en las membranas de eritrocitos humanos. Los resultados obtenidos confirman que el MHC se une directamente a GLUT1 puesto que efectivamente el MHC desplaza la unión de citocalasina B al transportador y lo hace de manera dosis dependiente. Más aún, concentraciones crecientes del inhibidor compitieron eficientemente por el sitio de unión para citocalasina B.

Una vez claro que MHC se une al transportador GLUT1, el punto que interesó esclarecer fue de qué manera lo hace, vale decir, si se une a la cara interna (endofacial), a la cara externa (exofacial) o a ambas caras del transportador.

Al medir influjo, eflujo e intercambio en equilibrio a 4° C pudimos establecer que el MHC es un eficiente inhibidor de la actividad de transporte de glucosa de GLUT1 y que lo hace de manera dosis-dependiente, tanto usando como sustrato desoxiglucosa como metilglucosa. La inhibición causada por MHC, en condiciones de intercambio en equilibrio fue de tipo competitiva, lo cual sugiere que este inhibidor bloquea al transportador en uno de los sitios a los cuales se une D-glucosa. Los ensayos de entrada tanto usando como sustrato desoxiglucosa como metilglucosa en condiciones trans-cero resultaron en cambio en un tipo de inhibición incompetitiva. En primera instancia este resultado nos indica que el inhibidor no interactúa directamente con el

sitio de unión externo, sino que es necesario que se encuentre previamente unido el sustrato. El ensayo que esclarece la orientación del sitio de unión del MHC a la proteína transportadora GLUT1, se obtuvo a partir de los experimentos de salida de metilglucosa en condiciones trans-cero. En estos ensayos el MHC inhibió el transporte de modo competitivo. Estos resultados indican que el MHC comparte con D-glucosa un sitio de unión que es accesible por la cara interna del transportador y mediante el cual este inhibidor modificaría su actividad.

Finalmente, los resultados cinéticos de salida de D-glucosa mostraron que el inhibidor en estas circunstancias también fue capaz de bloquear la salida de D-glucosa en condiciones trans-cero y cis-infinito (Sen-Widdas). Más aún, en los experimentos en condiciones cis-infinito, MHC se comportó como un inhibidor del tipo no-competitivo, es decir, no afectó la afinidad de D-glucosa por su sitio de unión externo.

Este resultado demuestra de manera convincente que MHC no se une a la cara externa del transportador GLUT1. Por tanto es dable concluir que MHC interactúa con el transportador mediante la unión a un sitio que se encuentra en la superficie endofacial. La capacidad del MHC de bloquear el transporte de glucosa es compartida con varios otros compuestos naturales y sintéticos, cuya característica común es ser eficientes bloqueadores de la actividad de tirosina quinasas (Vera *et al.*, 2001). Otra posible explicación para la inhibición de la actividad de GLUT1 sería que ocurre como consecuencia de la alteración de otras propiedades, ya sea, por alteración de la fluidez de la membrana, por interacción con otro tipo de moléculas o más directamente que el MHC estuviera inhibiendo la actividad de proteínas tirosina quinasas cuya actividad fosforilante fuera fundamental en la actividad de GLUT1. Sin embargo, esto es muy

poco probable pues no hay evidencia que indique que GLUT1 necesite de este paso para expresar su actividad. Además, hay datos que muestran que la inhibición de las proteínas tirosina quinasas es tiempo-dependiente, lo que significa que se necesita de períodos prolongados de incubación para obtener el bloqueo de la actividad tirosina quinásica. En nuestro caso usando MHC no fue necesario un período previo de incubación con el inhibidor para ver el efecto inhibitorio sobre el transporte de D-glucosa o sus análogos.

Nuestros datos son más bien compatibles con el hecho que el MHC interactúa directamente con el transportador e indican que el efecto sobre el transporte es debido a su interacción con GLUT1 y no involucra el evento celular de fosforilación-desfosforilación. La interacción directa necesaria con GLUT1 se ha corroborado también por los ensayos de desplazamiento de citocalasina B.

La interacción de GLUT1 con compuestos funcionalmente definidos por su interacción específica con proteínas quinasas plantea un gran número de preguntas en relación tanto a la identidad de los residuos aminoácidos que forman parte del o los sitios de unión como de las características funcionales de esos sitios y como se relacionan con la regulación de la función del transportador. Tiene directa relevancia en este hecho la evidencia que muestra que los inhibidores de tirosina quinasas interactúan con otros blancos celulares, aparte de GLUT1. Por ejemplo, varias tirfostinas e inhibidores de tirosina quinasa como genisteína y erbstatina (ácido metil 2,5-dihidroxicinámico) son potentes inhibidores de DNA topoisomerasas (Markovits et al., 1994; Hagiwara *et al.*, 1988). Entonces los datos existentes apuntan a la existencia de determinantes estructurales discretos en GLUT1 con propiedades que se esperarían

para sitios de unión de nucleótidos, determinantes que pueden ser responsables del efecto de los inhibidores de tirosina quinasas en el transporte.

Sin embargo, hemos mencionado que GLUT1 es un transportador de tipo facilitativo que transporta sus sustratos a favor de su gradiente de concentración y no requiere por tanto de la energía aportada por la hidrólisis de ATP. Un detallado análisis de GLUT1 en sistemas reconstituidos ha revelado que el ciclo de transporte ocurre en ausencia de ATP (Carruthers, 1990). El transporte de azúcar, no obstante, es regulado por el ATP intracelular de una manera que sugiere que el transportador es sensible al contenido celular de ATP, pero donde la hidrólisis no es requerida para la regulación de su función. Sin embargo la naturaleza exacta de esta regulación es aún desconocida. Por otro lado, experimentos utilizando GLUT1 reconstituido en vesículas o usando membranas de eritrocitos han revelado que la regulación por ATP ocurre por su interacción directa con GLUT1 (Carruthers, 1986; Hebert et al., 1986; Carruthers et al., 1989; Wheeler, 1989; Levine et al., 1998). Estos antecedentes apoyan fehacientemente el concepto que GLUT1 posee sitios de unión para nucleótidos y que son importantes para la actividad del transportador. Se ha obtenido evidencia directa de la presencia de estos sitios de unión en el transportador a través de experimentos que muestran que GLUT1 purificado puede ser fotomarcado con azido-ATP y que este marcaje compite selectiva y específicamente con glucosa y citocalasina B.

Más aún, estudios de análisis de su estructura primaria revela que GLUT1 posee tres cortas secuencias de aminoácidos (dominios I-III), separadas una de otras en la secuencia, las que presentan homología de secuencia con los dominios presentes en

típicos sitios de unión de ATP de ATPasas y proteínas que dependen de la unión e hidrólisis de ATP para su función.

Sin embargo, la actividad de GLUT1 es también modulada por análogos de ATP no hidrolizables, lo que demuestra que el efecto modulador no requiere hidrólisis y sería mediado simplemente por la unión del nucleótido.

Datos previos de este laboratorio indican que en cuanto a su efecto sobre GLUT1, los inhibidores de tirosina quinasas se pueden clasificar en dos grupos: los de tipo I que incluye aquellos compuestos que inhiben eficientemente y de manera competitiva la actividad del transportador, y los de tipo II que corresponden a aquellos que inhiben de forma no competitiva o no inhiben la actividad de GLUT1 (Vera et al., 2001). Una correlación interesante es que aquellos compuestos que no afectan la actividad de GLUT1, o bien inhiben la entrada de sustrato de forma no competitiva (tipo II) compiten por la unión de tirosina en las proteínas tirosina quinasa, mientras que sólo aquellos compuestos que bloquean de manera competitiva la unión de ATP a la tirosina quinasa son capaces de afectar la actividad de GLUT1 y lo hacen de una manera competitiva (inhibidores de tipo I). De acuerdo a nuestros datos el MHC correspondería a un inhibidor del tipo II.

El hecho que MHC es un potente inhibidor del transportador GLUT1 se puede relacionar con sus efectos sobre la función celular general. La literatura contiene algunos informes de los efectos del MHC en diferentes sistemas y procesos celulares. Estos incluyen inhibición de la proliferación endotelial, angiogénesis *in vitro*, ciclo celular, además de inducción de eventos apoptóticos en algunos tipos celulares (Young et al., 1993). Dada la presencia de transportadores de glucosa en todas las células y

tejidos, y la importancia de estas proteínas para la provisión de hexosas esenciales y para una función celular normal, es razonable considerar que algunos de los efectos del MHC sobre la proliferación y diferenciación pueden estar relacionados con su capacidad de inhibir la actividad de transportadores de glucosa. GLUT1 es expresado en todas las células y tejidos, es especialmente abundante en cerebro y eritrocitos, y es responsable de la captación basal de glucosa en las células. Por ende el hecho que un compuesto como el MHC sea inhibidor de la actividad de GLUT1 podría ser importante en la fisiología del cáncer. Se sabe que una de las características que presentan las células cancerígenas es un incremento en el metabolismo de la glucosa. Estas células no acumulan la glucosa como glicógeno o ácidos grasos, por lo que la glucosa debe ser obtenida constantemente desde fuentes externas y transportada intracelularmente (Chao *et al.*, 2004; Damjanov y Meropol, 2004). El mecanismo por el cual las células cancerígenas incrementan su habilidad para adquirir glucosa parece ser en gran parte de los casos mediante la sobreexpresión selectiva de GLUT1. Se hace interesante la posibilidad que este compuesto pudiera ser utilizado en ensayos que buscan desarrollar la investigación de causa, diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad como lo están siendo varios otros inhibidores de tirosina quinasas (Moulder *et al.*, 2001). Pero lo que es de interés inmediato para nuestra investigación tiene relación con el hecho que el MHC se identificó como uno de los compuestos que se une a GLUT1 por su superficie endofacial puede tener interesantes consecuencias para comprender la estructura y modo de acción de esta importante molécula transportadora, contribuyendo a esclarecer el ciclo del transporte de hexosas.

Los datos recopilados en el laboratorio nos dan a conocer el modo de interacción con GLUT1 de una amplia variedad de moléculas de distinto origen como lavendustinas, metilxantinas, tirfostinas, gossipol y flavonas (miricetina). Estos compuestos tienen distintas características en su modo de interactuar GLUT1, ya sea, a nivel del tipo de unión con el transportador, capacidad inhibitoria de la actividad de GLUT1, y por supuesto la cara del transportador a la que se unen. Se ha determinado que las flavonas genisteína, quercetina, miricetina, metilxantinas y trifostina B46 se unen a un sitio ubicado en la cara exofacial del transportador. Por otra parte MHC, tirfostina A-47 y gossipol se unen a un sitio ubicado en la cara endofacial de GLUT1 (Fig. 10). Sin embargo el hecho que un grupo de compuestos se unan a la misma cara del transportador no significa que se unan al mismo sitio. Con propósito de dilucidar si los compuestos que al igual que MHC se unen por la cara interna comparten o no un sitio de unión es necesario realizar estudios complementarios con este grupo de compuestos.

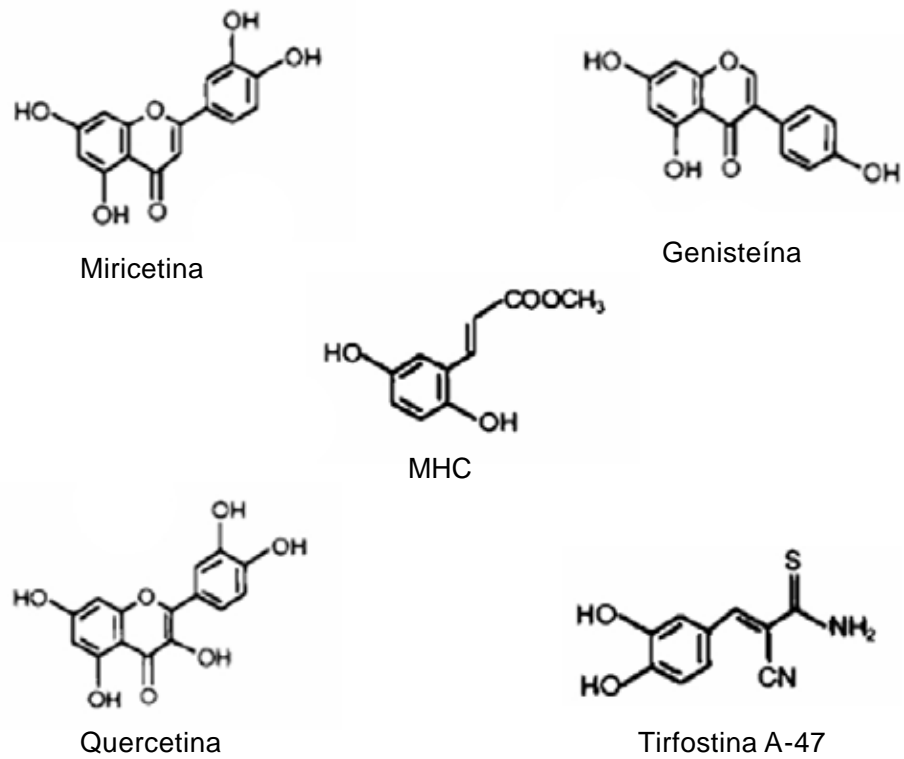


Figura 10: Compuestos que interactúan con el transportador de hexosas GLUT1. Genisteína y miricetina se unen a la cara exofacial del transportador, mientras MHC, quercetina y trifostina A-47 se unen a la cara endofacial del transportador.

6. Bibliografía

- Andersson, L. y Lundahl, P. (1988). C-terminal-specific monoclonal antibodies against the human red cell glucose transporter. Epitope localization with synthetic peptides. *J Biol Chem* **263**, 11414-11420.
- Andrade, C. (2001). Inhibición del transportador de hexosas GLUT1 por genisteína, *Seminario de titulación para optar al título de Tecnólogo Médico*. Universidad Austral de Chile.
- Asano, T., Takata, K., Katagiri, H., Tsukuda, K., Lin, J.L., Ishihara, H., Inukai, K., Hirano, H., Yazaki, Y. y Oka, Y. (1992). Domains responsible for the differential targeting of glucose transporter isoforms. *J Biol Chem* **267**, 19636-19641.
- Baldwin, J.M., Gorga, J.C. y Lienhard, G.E. (1981). The monosaccharide transporter of the human erythrocyte. Transport activity upon reconstitution. *J Biol Chem* **256**, 3685-3689.
- Barnett, J.E., Holman, G.D. y Munday, K.A. (1973a). An explanation of the asymmetric binding of sugars to the human erythrocyte sugar-transport systems. *Biochem J* **135**, 539-541.
- Barnett, J.E., Holman, G.D. y Munday, K.A. (1973b). Structural requirements for binding to the sugar-transport system of the human erythrocyte. *Biochem J* **131**, 211-221.
- Barrett, M.P., Walmsley, A.R. y Gould, G.W. (1999). Structure and function of facilitative sugar transporters. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 496-502.

- Basketter, D.A. y Widdas, W.F. (1978). Asymmetry of the hexose transfer system in human erythrocytes. Comparison of the effects of cytochalasin B, phloretin and maltose as competitive inhibitors. *J Physiol* **278**, 389-401.
- Bell, G.I., Burant, C.F., Takeda, J. y Gould, G.W. (1993). Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem* **268**, 19161-19164.
- Bloch, R. (1973). Inhibition of glucose transport in the human erythrocyte by cytochalasin B. *Biochemistry* **12**, 4799-4801.
- Burant, C.F. y Bell, G.I. (1992). Mammalian facilitative glucose transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins. *Biochemistry* **31**, 10414-10420.
- Cairns, M.T., Alvarez, J., Panico, M., Gibbs, A.F., Morris, H.R., Chapman, D. y Baldwin, S.A. (1987). Investigation of the structure and function of the human erythrocyte glucose transporter by proteolytic dissection. *Biochim Biophys Acta* **905**, 295-310.
- Cairns, M.T., Elliot, D.A., Scudder, P.R. y Baldwin, S.A. (1984). Proteolytic and chemical dissection of the human erythrocyte glucose transporter. *Biochem J* **221**, 179-188.
- Carruthers, A. (1986). ATP regulation of the human red cell sugar transporter. *J Biol Chem* **261**, 11028-11037.
- Carruthers, A. (1990). Facilitated diffusion of glucose. *Physiol Rev* **70**, 1135-1176.
- Carruthers, A. y Helgerson, A.L. (1989). The human erythrocyte sugar transporter is also a nucleotide binding protein. *Biochemistry* **28**, 8337-8346.
- Casnellie, J. (1991). Protein kinase inhibitors: probes for the functions of protein phosphorylation. *Adv Pharmacol* **22**, 167-205.

- Chao, J., Peng, W. y Chen, S. (2004). Effects of epidermal growth factor and its signal transduction inhibitors on apoptosis in human colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol* **10**, 540-544.
- Damjanov, N. y Meropol, N. (2004). Epidermal growth factor receptor inhibitors for the treatment of colorectal cancer: a promise fulfilled? *Oncology (Williston Park)* **18**, 479-488; discussion 488, 493, 497 passim.
- Davies, A., Ciardelli, T.L., Lienhard, G.E., Boyle, J.M., Whetton, A.D. y Baldwin, S.A. (1990). Site-specific antibodies as probes of the topology and function of the human erythrocyte glucose transporter. *Biochem J* **266**, 799-808.
- Davies, A., Meeran, K., Cairns, M.T. y Baldwin, S.A. (1987). Peptide-specific antibodies as probes of the orientation of the glucose transporter in the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* **262**, 9347-9352.
- Dawson, P.A., Mychaleckyj, J.C., Fossey, S.C., Mihic, S.J., Craddock, A.L. y Bowden, D.W. (2001). Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab* **74**, 186-199.
- Deves, R. y Krupka, R.M. (1978). Testing transport models with substrates and reversible inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **513**, 156-172.
- Deves, R. y Krupka, R.M. (1989). Inhibition kinetics of carrier systems. *Methods Enzymol* **171**, 113-132.
- Deves, R. y Krupka, R.M. (1990). A simple test for the sidedness of binding of transport inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1030**, 24-31.

- Doege, H., Bocianski, A., Joost, H.G. y Schurmann, A. (2000a). Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem J* **350 Pt 3**, 771-776.
- Doege, H., Bocianski, A., Scheepers, A., Axer, H., Eckel, J., Joost, H.G. y Schurmann, A. (2001). Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem J* **359**, 443-449.
- Doege, H., Schurmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A. y Joost, H.G. (2000b). GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem* **275**, 16275-16280.
- Gibbs, E.M., Lienhard, G.E. y Gould, G.W. (1988). Insulin-induced translocation of glucose transporters to the plasma membrane precedes full stimulation of hexose transport. *Biochemistry* **27**, 6681-6685.
- Gorga, F.R. y Lienhard, G.E. (1981). Equilibria and kinetics of ligand binding to the human erythrocyte glucose transporter. Evidence for an alternating conformation model for transport. *Biochemistry* **20**, 5108-5113.
- Gould, G.W. y Holman, G.D. (1993). The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* **295 (Pt 2)**, 329-341.
- Graeme-Cook, F., Bhan, A. y Harris, N. (1993). Immunohistochemical characterization of intraepithelial and subepithelial mononuclear cells of the upper airways *Am. J. Pathol.* **143**, 1416-1422.

- Hagiwara, M., Inoue, S., Tanaka, T., Nunoki, K., Ito, M. y Hidaka, H. (1988). Differential effects of flavonoids as inhibitors of tyrosine protein kinases and serine/threonine protein kinases. *Biochem Pharmacol* **37**, 2987-2992.
- Heard, K.S., Fidyk, N. y Carruthers, A. (2000). ATP-dependent substrate occlusion by the human erythrocyte sugar transporter. *Biochemistry* **39**, 3005-3014.
- Helgerson, A.L., Hebert, D.N., Naderi, S. y Carruthers, A. (1989). Characterization of two independent modes of action of ATP on human erythrocyte sugar transport. *Biochemistry* **28**, 6410-6417.
- Hresko, R.C., Murata, H., Marshall, B.A. y Mueckler, M. (1994). Discrete structural domains determine differential endoplasmic reticulum to Golgi transit times for glucose transporter isoforms. *J Biol Chem* **269**, 32110-32119.
- Ibberson, M., Uldry, M. y Thorens, B. (2000). GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem* **275**, 4607-4612.
- Jacquez, J.A. (1983). Modulation of glucose transport in human red blood cells by ATP. *Biochim Biophys Acta* **727**, 367-378.
- Joost, H.-G., Bell, G.I., Best, J.D., Birnbaum, M.J., Charron, M.J., Chen, Y.T., Doege, H., James, D.E., Lodish, H.F., Moley, K.H., Moley, J.F., Mueckler, M., Rogers, S., Schurmann, A., Seino, S. y Thorens, B. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E974-976.

- Joost, H.G. y Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol Membr Biol* **18**, 247-256.
- Kasahara, M. y Hinkle, P.C. (1977). Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J Biol Chem* **252**, 7384-7390.
- Kayano, T., Burant, C.F., Fukumoto, H., Gould, G.W., Fan, Y.S., Eddy, R.L., Byers, M.G., Shows, T.B., Seino, S. y Bell, G.I. (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**, 13276-13282.
- Krupka, R.M. y Deves, R. (1983). Kinetics of inhibition of transport systems. *Int Rev Cytol* **84**, 303-352.
- Lacko, L., Wittke, B. y Geck, P. (1975). Interaction of steroids with the transport system of glucose in human erythrocytes. *J Cell Physiol* **86 Suppl 2**, 673-680.
- Lacko, L., Wittke, B. y Zimmer, G. (1981). Interaction of benzoic acid derivatives with the transport system of glucose in human erythrocytes. *Biochem Pharmacol* **30**, 1425-1431.
- Lavis, V.R., Lee, D.P. y Shenolikar, S. (1987). Evidence that forskolin binds to the glucose transporter of human erythrocytes. *J Biol Chem* **262**, 14571-14575.
- Levine, K.B., Cloherty, E.K., Fidyk, N.J. y Carruthers, A. (1998). Structural and physiologic determinants of human erythrocyte sugar transport regulation by adenosine triphosphate. *Biochemistry* **37**, 12221-12232.

- Levitsky, L.L., Zheng, Q., Mink, K. y Rhoads, D.B. (1994). GLUT-1 and GLUT-2 mRNA, protein, and glucose transporter activity in cultured fetal and adult hepatocytes. *Am J Physiol* **267**, E88-94.
- Levitzki, A. (2002). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *Eur J Cancer* **38 Suppl 5**, S11-18.
- Levitzki, A. (2003a). Protein kinase inhibitors as a therapeutic modality. *Acc Chem Res* **36**, 462-469.
- Levitzki, A. (2003b). Protein kinase inhibitors as a therapeutic modality. *Acc Chem Res* **36**, 462-469.
- Lisinski, I., Schurmann, A., Joost, H., Cushman, S. y Al-Hasani, H. (2001). Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem J* **358**, 517-522.
- Llévenes, A. (2001). Inhibición del transportador de hexosas GLUT1 por Tirfostina B-46, *Seminario de titulación para optar al título de Tecnólogo Médico*. Universidad Austral de Chile.
- Macheda, M., Rogers, S. y Best, J. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol* **202**, 654-662.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. y Sudarsanam, S. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome *Science* **298**, 1912-1934.
- May, J.M. (1988). Reaction of an exofacial sulfhydryl group on the erythrocyte hexose carrier with an impermeant maleimide. Relevance to the mechanism of hexose transport. *J Biol Chem* **263**, 13635-13640.

- McVie-Wylie, A.J., Lamson, D.R. y Chen, Y.T. (2001). Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* **72**, 113-117.
- Monsalve, R. (2001) Inhibición del transportador de hexosas GLUT1 por Tirfostina A-47, *Seminario de titulación para optar al título de Tecnólogo Médico*. Universidad Austral de Chile.
- Mookerjee, B.K., Cuppoletti, J., Rampal, A.L. y Jung, C.Y. (1981). The effects of cytochalasins on lymphocytes. Identification of distinct cytochalasin-binding sites in relation to mitogenic response and hexose transport. *J Biol Chem* **256**, 1290-1300.
- Moulder, S.L., Yakes, F.M., Muthuswamy, S.K., Bianco, R., Simpson, J.F. y Arteaga, C.L. (2001). Epidermal Growth Factor Receptor (HER1) Tyrosine Kinase Inhibitor ZD1839 (Iressa) Inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing Breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo *Cancer Res.* **61**, 8887-8895.
- Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* **219**, 713-725.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E. y Lodish, H.F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**, 941-945.
- Mueckler, M. y Makepeace, C. (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**, 30141-30146.

- Ojeda, P. (2005). Interacción de las metilxantinas con el transportador de hexosas GLUT1. *Tesis de grado para optar al título de Bioquímico*, Universidad Austral de Chile.
- Olson, A. y Pessin, J. (1996a). Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr* **16**, 235-256.
- Olson, A.L. y Pessin, J.E. (1996b). Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr* **16**, 235-256.
- Pérez, A. (2003). Caracterización de la interacción de flavonas tirfostinas con el transportador de hexosas GLUT1. *Tesis de grado para optar al título de Bioquímico*, Universidad Austral de Chile.
- Pessin, J.E., Richardson, J.M. y Sivitz, W.I. (1991). Regulation of the glucose transporter in animal models of diabetes. *Adv Exp Med Biol* **293**, 249-262.
- Phay, J.E., Hussain, H.B. y Moley, J.F. (2000). Strategy for identification of novel glucose transporter family members by using internet-based genomic databases. *Surgery* **128**, 946-951.
- Rayner, D.V., Thomas, M.E. y Trayhurn, P. (1994). Glucose transporters (GLUTs 1-4) and their mRNAs in regions of the rat brain: insulin-sensitive transporter expression in the cerebellum. *Can J Physiol Pharmacol* **72**, 476-479.
- Rogers, S., Chandler, J.D., Clarke, A.L., Petrou, S. y Best, J.D. (2003). Glucose transporter GLUT12-functional characterization in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **308**, 422-426.
- Rogers, S., Macheda, M.L., Docherty, S.E., Carty, M.D., Henderson, M.A., Soeller, W.C., Gibbs, E.M., James, D.E. y Best, J.D. (2002). Identification of a novel

- glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E733-738.
- Sanchez, C. (2003). Caracterización de la interacción de gossypol con el transportador de hexosas GLUT1. *Tesis de grado para optar al título de Bioquímico*, Universidad Austral de Chile.
- Sasaki, T., Minoshima, S., Shiohama, A., Shintani, A., Shimizu, A., Asakawa, S., Kawasaki, K. y Shimizu, N. (2001). Molecular cloning of a member of the facilitative glucose transporter gene family GLUT11 (SLC2A11) and identification of transcription variants. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 1218-1224.
- Sen, A.K. y Widdas, W.F. (1962). Determination of the temperature and pH dependence of glucose transfer across the human erythrocyte membrane measured by glucose exit *J. Physiol.* **160**, 392-403.
- Stanwell, C., Ye, B., Yuspa, S. y Burke, T. (1996). Cell protein cross-linking by erbstatin and related compounds. *Biochem Pharmacol* **52**, 475-480.
- Thorens, B. (1993). Facilitated glucose transporters in epithelial cells. *Annu Rev Physiol* **55**, 591-608.
- Uldry, M., Steiner, P., Zurich, M.-G., Beguin, P., Hirling, H., Dolci, W. y Thorens, B. (2004). Regulated exocytosis of an H⁺/myo-inositol symporter at synapses and growth cones *EMBO J.* **23**, 531-540.
- Umezawa, K., Hori, T., Tajima, H., Imoto, M., Isshiki, K. y Takeuchi, T. (1990). Inhibition of epidermal growth factor-induced DNA synthesis by tyrosine kinase inhibitors. *FEBS Lett* **260**, 198-200.

- Vera, J.C., Reyes, A.M., Carcamo, J.G., Velasquez, F.V., Rivas, C.I., Zhang, R.H., Strobel, P., Iribarren, R., Scher, H.I. y Slebe, J.C. (1996a). Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1. *J Biol Chem* **271**, 8719-8724.
- Vera, J.C., Reyes, A.M., Cárcamo, J.G., Velásquez, F.V., Rivas, C.I., Zhang, R.H., Strobel, P., Iribarren, R., Scher, H.I., Slebe, J.C. y Golde, D.W. (1996b). Genistein Is a Natural Inhibitor of Hexose and Dehydroascorbic Acid Transport through the Glucose Transporter, GLUT1 *J. Biol. Chem.* **271**, 8719-8724.
- Vera, J.C., Reyes, A.M., Velasquez, F.V., Rivas, C.I., Zhang, R.H., Strobel, P., Slebe, J.C., Nunez_Alarcón, J. y Golde, D.W. (2001). Direct inhibition of the hexose transporter GLUT1 by tyrosine kinase inhibitors. *Biochemistry* **40**, 777-790.
- Walmsley, A.R. y Lowe, A.G. (1987). Comparison of the kinetics and thermodynamics of the carrier systems for glucose and leucine in human red blood cells. *Biochim Biophys Acta* **901**, 229-238.
- Wheeler, T.J. (1989). ATP does not regulate the reconstituted glucose transporter. *Biochemistry* **28**, 3413-3420.
- Wright, E.M. (2001). Renal Na(+)-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**, F10-18.
- Wood, I.S., Hunter, L. y Trayhurn, P. (2003). Expression of Class III facilitative glucose transporter genes (GLUT-10 and GLUT-12) in mouse and human adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **308**, 43-49.
- Wu, X. y Freeze, H.H. (2002). GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* **80**, 553-557.

Wu, X., Li, W., Sharma, V., Godzik, A. y Freeze, H. (2002). Cloning and characterization of glucose transporter 11, a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues. *Mol Genet Metab* **76**, 37-45.

Young, S., Poole, R., Hudson, A., Halestrap, A., Denton, R. y Tavare, J. (1993). Effects of tyrosine kinase inhibitors on protein kinase-independent systems. *FEBS Lett* **316**, 278-282.