



**Universidad Austral de Chile**

Facultad de Ciencias

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

**ANALISIS FUNCIONAL DE LAS MUTANTES G111A Y G116A  
EN EL TRANSPORTADOR DE HEXOSAS GLUT1**

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

**NATALIA ALEJANDRA RADDATZ CARDENAS**

**VALDIVIA-CHILE**

**2006**

*A mis padres,  
Rosa y Pablo  
con todo mi cariño y  
reconocimiento*

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar agradeciendo a los profesores que ayudaron de una u otra forma a que este trabajo fuera posible, destacando al profesor Alejandro Reyes, quien me acogió muy gentilmente en su grupo de trabajo, agradecerle además sus consejos muy oportunos, la confianza y la preocupación otorgada siempre. También agradecerle al profesor Jaime Figueroa por su amistad y generosidad brindada a lo largo de toda mi carrera y por su puesto, a la profesora Ilona Concha, por su disposición y gentileza.

Muy especialmente quisiera agradecer a mis padres, los máximos pilares en mi vida. El apoyo incondicional, el amor y la confianza que me han entregado a lo largo de mis 26 años, han sido fundamentales para mi desarrollo como persona y por su puesto, a nivel profesional. Espero que todo el esfuerzo que han dedicado para siempre entregarme lo mejor, se vea de alguna forma reflejado en este trabajo, que es la culminación de este proceso. También quisiera agradecer a Mario, quien con su amor, ternura y comprensión me ayudó a salir de los momentos difíciles y con quien compartí, cada uno de los momentos gratos de este período.

Como no agradecer a mis compañeros de laboratorio, quienes más que compañeros se convirtieron en amigos, Alejandro, Ximena, Mauricio, Patty, Ale, y otros que alguna vez formaron parte de este grupo como Ingrid y Franco.

Finalmente, pero no por eso menos importante, agradecer a cada uno de los miembros de este Instituto, especialmente a Pedro, Eli y don Dago, quienes siempre me entregaron su amistad y su sonrisa y a Claudia, que con su voluntad, excelente disposición y amistad, siempre hacía mucho más expedito el trabajo.

## INDICE DE CONTENIDOS

1. <b>RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
2. <b>INTRODUCCIÓN</b>	3
3. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	15
3.1. Materiales	15
3.2. Construcción de mutantes de GLUT1 en el putativo dominio I de unión de ATP	16
3.3. Preparación de RNA e inyección de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	17
3.3.1. Linearización y purificación del plasmidio pGEM3	17
3.3.2. Síntesis de mRNA para GLUT1 silvestre, Gly111→Ala y Gly116→Ala	18
3.3.3. Tratamiento de <i>Xenopus laevis</i> y obtención de ovocitos	19
3.4. Determinación de la expresión de proteína en la membrana de ovocitos	20
3.4.1. Preparación de membranas de ovocitos para posterior análisis Western blot	20
3.4.2. Análisis Western Blot	20
3.5. Determinación de la expresión del transportador en proteínas totales de ovocitos	21
3.5.1. Preparación de homogeneizado para posterior Dot blot	21
3.5.2. Dot blot	21
3.6. Ensayos de transporte y análisis cinéticos	21

3.6.1. Determinación del tiempo de transporte para GLUT1 silvestre, Gly111→Ala y Gly116→Ala, en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio	22
3.6.2. Curva de captación de 3-O-metilglucosa para GLUT1 silvestre, Gly111→Ala y Gly116→Ala, en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio	23
3.6.3. Determinación de $K_i$ para inhibidores de GLUT1 silvestre, Gly111→Ala y Gly116→Ala, en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio	24
3.6.4. Efecto de concentraciones fijas variables de inhibidores en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio para GLUT1 silvestre, Gly111→Ala y Gly116→Ala	25
<b>4. RESULTADOS</b>	27
4.1. Expresión de proteínas silvestre y mutantes G111A y G116A en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	27
4.2. Cinética de captación de 3-O-metilglucosa a través del tiempo para GLUT1 silvestre, Gly111→Ala y Gly116→Ala, en condiciones de entrada	30
4.3. Captación de 3-O-metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio para GLUT1 silvestre y cada una de las mutantes	31

4.4. Efecto de los inhibidores tirosina quinasa	34
4.5. Ensayos de competencia en condiciones trans-cero de entrada	43
4.6. Ensayos de competencia en condiciones de intercambio en equilibrio	51
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
5.1. Propiedades generales del transportador silvestre, GLUT1	58
5.2. Propiedades generales de las mutantes Gly111→Ala y Gly116→Ala	60
5.2.1. Análisis de la proteína transportadora mutada Gly111→Ala	61
5.2.2. Análisis de la proteína transportadora mutada, Gly116→Ala	62
<b>6. REFERENCIAS</b>	<b>66</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> : Expresión de proteínas en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .	28
<b>Figura 2</b> : Caracterización cinética de la captación de 3-metilglucosa 10 mM en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio a través del tiempo, en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> sobreexpresando GLUT1.	32
<b>Figura 3</b> : Curvas de saturación para la captación dosis dependiente de 3-O-metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada.	33
<b>Figura 4</b> : Estructuras de los inhibidores de tirosina quinasa empleados en este estudio.	37
<b>Figura 5</b> : Curva de inhibición del transporte de 3-O-metilglucosa con tirfostina A47.	38
<b>Figura 6</b> : Curva de inhibición del transporte de 3-O-metilglucosa con quercetina.	40
<b>Figura 7</b> : Curva de inhibición del transporte de 3-O-metilglucosa con citocalasina B	45
<b>Figura 8</b> : Ensayo de competencia en condiciones de entrada con quercetina	47
<b>Figura 9</b> : Ensayo de competencia en condiciones de entrada con tirfostina A47	49
<b>Figura 10</b> : Ensayo de competencia en condiciones de entrada con citocalasina B	50
<b>Figura 11</b> : Ensayo de competencia en condiciones de intercambio en equilibrio con quercetina	52
<b>Figura 12</b> : Ensayo de competencia en condiciones de intercambio en equilibrio con tirfostina A47	53
<b>Figura 13</b> : Ensayo de competencia en condiciones de intercambio en equilibrio con citocalasina B	55
<b>Figura 14</b> : Localizaciones de las mutantes G111A y G116A en el modelo estructural del transportador de glucosa, descrito por Salas-Burgos	65

**INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1 :</b> Parámetros cinéticos para el transporte de metilglucosa en condiciones de entrada y equilibrio para la proteína GLUT1 y sus mutantes	35
<b>Tabla 2 :</b> $K_i$ (app) para el transporte de 3-O-metilglucosa en condiciones de entrada para la proteína GLUT1 y sus mutantes	42
<b>Tabla 3 :</b> $K_i$ (app) para el transporte de 3-O-metilglucosa en condiciones de intercambio en equilibrio para la proteína GLUT1 y sus mutantes	44
<b>Tabla 4 :</b> Resumen de la forma de inhibición de cada inhibidor	56

**LISTADO DE ABREVIATURAS**

<b>ATP</b>	adenosin trifostato
<b>BSA</b>	seroalbúmina bovina
<b>cDNA</b>	ácido desoxiribonucleico complementario
<b>CTP</b>	citidintrifosfato
<b>DAB</b>	diaminobencidina
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>EDTA</b>	ácido etilen diamino tetraacético
<b>GLUT</b>	transportador facilitativo de hexosas.
<b>GTP</b>	guanosintrifosfato
<b>G111A</b>	mutación generada en GLUT1 donde se cambia una glicina en la posición 111 por una alanina.
<b>G116A</b>	mutación generada en GLUT1 donde se cambia una glicina en la posición 116 por una alanina.
<b>IC50</b>	concentración inhibitoria a 50% del efecto máximo
<b>kb</b>	kilobases
<b><i>K<sub>m</sub></i></b>	constante de Michaelis
<b><i>K<sub>i</sub>(app)</i></b>	constante inhibitoria aparente
<b>kDa</b>	kilo Daltons
<b>L117R</b>	mutación generada en GLUT1 donde se cambia una lisina en la posición 117 por una arginina.
<b>μCi</b>	microcurie

<b><math>\mu\text{M}</math></b>	micromolar
<b>mM</b>	milimolar
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitro
<b>mRNA</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>nm</b>	nanometros
<b>NTP</b>	nucleótidos trifosfato
<b>OR1</b>	solución Ringer para ovocitos 1
<b>OR2</b>	solución Ringer para ovocitos 2
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PBS</b>	tampón fosfato salino
<b>PMSE</b>	fluoruro de fenilmetilsulfonil
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	dodecilsulfato de sodio
<b>seg</b>	segundos.
<b>UTP</b>	uridina trifosfato
<b>V<sub>máx</sub></b>	velocidad máxima

## 1. RESUMEN

El transportador de glucosa, GLUT1, presenta tres secuencias aminoacídicas cortas (dominios I, II y III) que presentan similitud de secuencias con sitios de unión a nucleótidos como ATP. Sin embargo, este transportador es del tipo facilitativo, por lo que no requiere del aporte de energía de la hidrólisis de ATP para realizar su función. Para reconocer la importancia funcional de estos dominios nos propusimos estudiar específicamente el dominio I a través del análisis de dos mutaciones puntuales de los aminoácidos Gly111 y Gly116, ambas por Ala. Se llevó a cabo un análisis cinético detallado de la proteína silvestre y de las mutantes en un sistema de expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*, en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio. Asimismo, se estudió la regulación del transportador por ciertas flavonas y tirfostinas, por lo cual analizamos el efecto de tirfostina A47 (compuesto que se une a un sitio accesible por la cara endofacial) y quercetina (que se une a la cara exofacial de la proteína) tanto en condiciones trans-cero de entrada como de intercambio en equilibrio. Nuestros resultados muestran que las mutantes se expresan eficientemente en este sistema de expresión y que ambas son funcionales. Sus propiedades de eficiencia catalítica y de afinidad por sustrato no difieren de manera notable de aquellas de la proteína silvestre. Asimismo, la interacción con tirfostina A47 no se afecta en las mutantes, en cambio, la mutante G116A no es sensible a la flavona quercetina en condiciones trans-cero de entrada. Estos resultados nos indican que G116A podría formar parte de un sitio de unión alostérico para flavona, el cual al parecer es accesible por la superficie exofacial de la proteína.

## SUMMARY

The glucose carrier, GLUT1, has three short amino acid sequences (domains I, II and III), that shows sequence homology with binding sites for nucleotides, such as ATP. However this carrier is of facilitative type, so it does not require energy from ATP hydrolysis to accomplish its function. To recognize the functional importance of these domains we focus on domain I, through the analysis of two point-mutations of the amino acids Gly111 and Gly116, both mutated by Ala. We make a detailed kinetic analysis of the wild protein and mutants in *Xenopus laevis* oocytes expression system, in trans-zero uptake and equilibrium exchange conditions. Likewise, the regulation of the transporter by some flavones and tyrphostin was studied. We analyze the effect of Tyrphostin A47 (compound that binds to the endofacial face) and quercetin (flavone that binds to the exofacial face of the protein) both in trans-zero uptake and equilibrium exchange conditions. Our results shows that the mutants are efficiently expressed on this expression system and both are functional. Their properties of catalytic efficiency and substrate affinity do not differ on a notable way of those of the wild type protein. Moreover, the interaction with Tyrphostin A47 was not affected on the mutants, in contrast mutant G116A is insensitive to the flavone quercetin, under trans-zero uptake conditions. These results indicate us that G116 could be part of an allosteric binding site for flavones, wich seems to be accessible by the exofacial surface of the protein.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las bicapas fosfolipídicas que no contienen proteínas son virtualmente impermeables a los solutos hidrofílicos e incluso al agua. La generalidad de los solutos polares (que forman suficientes interacciones con el agua como para disolverse eficientemente en ella) requieren la presencia de alguna molécula transmembrana especial, usualmente una proteína, la cual atravesará la bicapa y permitirá su transporte a través de las membranas celulares.

La glucosa, molécula polar no cargada de masa 180 Da, corresponde a un importante sustrato metabólico y constituye la principal fuente de energía para muchas células. La captación celular de glucosa es realizada por dos grandes familias de transportadores, cuyos integrantes se han caracterizado por exhibir diferentes propiedades cinéticas, así como por su patrón diferencial de expresión en las distintas células del organismo (Bell *et al.*, 1990, Wright *et al.*, 1993, Scheepers *et al.*, 2004 ). La primera de estas familias corresponde a los cotransportadores sodio-glucosa, conocidos como SGLT (*sodium glucose linked transporter*), un grupo de proteínas caracterizadas por mediar el transporte activo de glucosa a favor de un gradiente electroquímico de iones  $\text{Na}^+$ . Estos cotransportadores no necesitan la presencia de ATP como fuente de energía directa puesto que el gradiente de sodio se mantiene favorable gracias a la bomba de  $\text{Na}^+$ -  $\text{K}^+$  (dependiente de ATP) y así la glucosa puede transportarse en contra de su gradiente desfavorable de concentración. En este caso, el transporte es del tipo simporte, dado que el paso de ambas moléculas se produce simultáneamente en el mismo sentido.

La otra gran familia de transportadores de glucosa, son los GLUT /SLC2A (*glucose transport/solute carrier 2A family*). Estos transportadores facilitativos trasladan la glucosa a

través de membranas biológicas a favor de su gradiente electroquímico (Pessin y Bell, 1992; Baldwin, 1993; Mueckler *et al.*, 1994).

En humanos se han clonado hasta la fecha 14 transportadores, muchos de ellos en los últimos cuatro años, con la ayuda de la información recopilada por diferentes proyectos de genoma. Estos difieren en su expresión, en sus propiedades cinéticas y en su especificidad por el sustrato (Joost y Thorens, 2001). Trece de las isoformas descritas hasta la fecha se han agrupado en tres diferentes clases (denominadas I, II y III) de acuerdo a sus características estructurales predichas a partir de su secuencia aminoacídica y a su grado de identidad entre ellos y con las isoformas tradicionalmente conocidas. Estudios de expresión a nivel de proteína y/o de RNA mensajero han revelado que las distintas isoformas de transportadores facilitativos presentan una distribución diferencial en células y tejidos, encontrándose que la mayoría de las células expresaría simultáneamente más de una isoforma del transportador. La clase I comprende las isoformas GLUT 1-4, las cuales presentan un alto grado de identidad en la secuencia primaria aminoacídica, superior al 51%. La clase II abarca a GLUT 5, 7, 9 y 11 (Phay *et al.*, 2000b; Doege *et al.*, 2001; Joost y Thorens, 2001; Li *et al.*, 2004). Entre sí estos transportadores presentan una gran similitud a nivel de su secuencia aminoacídica y sólo un 30% de similitud con los miembros de la clase I. Una característica destacada de este grupo es la ausencia de un residuo de triptófano a continuación del motivo GPXXXXP presente en el segmento transmembrana 10, un residuo que se ha propuesto es importante en la unión de ligandos como citocalasina B y forskolina (Phay *et al.*, 2000b; Doege *et al.*, 2001). La clase III está formada por los transportadores GLUT 6, 8, 10, 12 y HMIT (Doege *et al.*, 2000a; Doege *et al.*, 2000b; Ibberson *et al.*, 2000; Dawson *et al.*, 2001; McVie-Wylie *et al.*, 2001; Uldry *et al.*, 2001; Macheda *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2003a; Rogers *et al.*, 2003b). A nivel de su secuencia primaria, estas isoformas presentan un menor grado de similitud con los

integrantes de la clase I (aproximadamente un 28% de similitud a nivel de secuencia aminoacídica con GLUT1). En cuanto a la disposición estructural predicha a partir de las secuencias de aminoácidos de estas proteínas, destaca la presencia de una vuelta extracelular más corta entre los segmentos transmembrana 1 y 2. Esta diferencia estructural, característica de esta clase de transportadores de glucosa, favorece la disposición de un sitio de N-glicosilación en la vuelta extracelular comprendida entre los segmentos transmembrana 9 y 10 (Joost y Thorens, 2001; Joost *et al.*, 2002). A todo esto, se suma la identificación de un miembro de esta familia de transportadores, GLUT14, por medio de la búsqueda de homología de secuencias consenso de GLUT en bases de datos de secuencias genómicas (Wu y Freeze, 2002). Esta isoforma parece ser un duplicón de GLUT3 y debiera catalogarse por ende en la clase I.

GLUT1 es el más conspicuo de los transportadores de glucosa; está presente en casi todos los tejidos con diferentes niveles de expresión en sus respectivos tipos celulares. A pesar que fue inicialmente clonado a partir de una línea celular derivada de hepatoma humano (HepG2), GLUT1 no se expresa en hepatocitos normales. Sin embargo, se ha mostrado que a medida que se induce la transformación oncogénica, la expresión del transportador se correlaciona con el incremento en el metabolismo de glucosa observado en las células tumorales (Flier *et al.*, 1987). Esta isoforma cumple aparentemente un papel central en el metabolismo y es el transportador más estudiado desde el punto de vista cinético y estructural (Carruthers, 1991; Carruthers y Helgerson, 1991; Mueckler y Makepeace, 1997). Se expresa en el cerebro, principalmente en las células endoteliales que conforman la barrera hematoencefálica (Dick *et al.*, 1984; Kalaria *et al.*, 1988; Pardridge *et al.*, 1990; Farrell y Pardridge, 1991). Niveles moderados de expresión también se observan en el tejido adiposo, músculo e hígado. La expresión, la distribución subcelular y la actividad intrínseca de GLUT1 es

alterada por una gran variedad de estímulos, entre otros estrés, presencia de factores de crecimiento y durante la transformación neoplásica (Birnbaum *et al.*, 1987; Flier *et al.*, 1987; Asano *et al.*, 1991; Sviderskaya *et al.*, 1996; Behrooz y Ismail-Beigi, 1997). Por otra parte, GLUT1 es además un eficiente transportador de la forma oxidada de la vitamina C, ácido deshidroascórbico (Vera *et al.*, 1993; Vera *et al.*, 1995), por lo que cumple una importante función en el transporte y homeostasis de esta vitamina.

GLUT2, presenta una baja afinidad para el transporte de glucosa ( $K_m \sim 17\text{mM}$ ) (Johnson *et al.*, 1990a; Johnson *et al.*, 1990b), galactosa ( $K_m \sim 92\text{ mM}$ ), manosa ( $K_m \sim 125\text{ mM}$ ) y fructosa ( $K_m \sim 76\text{ mM}$ ) pero presenta una alta afinidad al transporte de glucosamina ( $\sim 0,8\text{ mM}$ ) (Uldry *et al.*, 2002). Se expresa en las células de la mucosa intestinal mientras que en el riñón se localiza en las células epiteliales del túbulo contorneado proximal; en ambos casos, a nivel de la membrana basolateral (Fukumoto *et al.*, 1988; Thorens *et al.*, 1990; Thorens *et al.*, 1992). En hepatocitos, GLUT2 se presenta en la membrana sinusoidal. También se localiza en altos niveles en la membrana plasmática de las células  $\beta$  pancreáticas, donde se encarga de permitir la entrada de glucosa al citoplasma, señal que según se ha propuesto, desencadena la secreción de insulina (Liang *et al.*, 1996; Matschinsky, 1996; Guillam *et al.*, 2000). GLUT3 transporta glucosa con alta afinidad ( $K_m \sim 1,4\text{ mM}$  para 2-DOG) y además permite el transporte de galactosa, manosa, maltosa, xilosa o ácido deshidroascórbico. Se expresa preferentemente en las células del parénquima de cerebro adulto (Kayano *et al.*, 1988; Nagamatsu *et al.*, 1992). También se encuentra en otros tejidos humanos como testículos donde está presente en espermatozoides (Haber *et al.*, 1993; Angulo *et al.*, 1998) así como en el músculo esquelético (Stuart *et al.*, 1999). Además, análisis de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, revelan que GLUT3 está presente en neuronas,

mayormente en la membrana plasmática, aunque una fracción se encuentran en vesículas intracelulares distintas a las vesículas sinápticas. GLUT4 presenta una  $K_m$  para el transporte de glucosa de  $\sim 5\text{mM}$ , además también transporta ácido dehidroascórbico y glucosamina, esta última con una  $K_m \sim 3,9\text{ mM}$ . Se expresa solamente en adipocitos y en células del músculo esquelético y cardiaco (Birnbaum, 1989; Charron *et al.*, 1989; Fukumoto *et al.*, 1989; James *et al.*, 1989). Estas células responden a la insulina con un aumento rápido y reversible en el transporte de glucosa. GLUT5 no presenta actividad transportadora para glucosa (Burant y Bell, 1992; Burant *et al.*, 1992) pero sí para fructosa ( $K_m \sim 6\text{ mM}$ ) (Angulo *et al.*, 1998; Concha *et al.*, 1997). Se expresa en la membrana apical de enterocitos intestinales, aunque también se le ha localizado en las membranas basolaterales (Blakemore *et al.*, 1995). También se ha encontrado bajos niveles de su mRNA, en riñón, músculo esquelético y adipocitos humanos. En el cerebro se lo ubica en microglías y en la barrera hemato encefálica (Mantych *et al.*, 1993). En el caso de GLUT6, sólo se ha detectado su mRNA, predominantemente en cerebro, bazo y leucocitos, sin embargo, la expresión de la proteína en estos tejidos aún no ha sido demostrada (Doege *et al.*, 2000a; Uldry y Thorens, 2004). Por medio de reconstitución en liposomas, se ha demostrado que el transportador sólo presenta actividad en presencia de 5 mM de glucosa, pero no en 1mM lo cual sugiere que se trata de un transportador de baja afinidad para este sustrato (Doege *et al.*, 2000a). GLUT7 fue recientemente clonado (Li *et al.*, 2004) a partir de la librería de cDNA intestinal humano. La proteína presenta un 68% de similaridad y un 53% de identidad con GLUT5. A partir de la expresión de GLUT7 en ovocitos de *Xenopus laevis* se determinó que presenta un transporte de alta afinidad por glucosa ( $K_m: 0,3\text{mM}$ ) y fructosa ( $IC_{50}: 0.060\text{ mM}$ ). Otros azúcares como 2-desoxiglucosa, galactosa y xilosa, no son transportados. Según los Northern blot realizados, el mRNA de GLUT7 se encontraría preferencialmente en intestino delgado, colon, testículo y próstata.

Además, considerando la inusual especificidad por los sustratos y la amplia identidad con GLUT5, se ha sugerido que GLUT7 representa un intermediario entre los GLUTs de la clase II y GLUT2, miembro de la clase I (Li *et al.*, 2004). GLUT8 revela una alta afinidad por glucosa, con una  $K_m$  de  $\sim 2\text{mM}$  (Ibberson *et al.*, 2000). El mRNA de GLUT8 se ha hallado predominantemente en testículos y en bajas concentraciones en muchos tejidos sensibles a insulina incluidos músculo esquelético y cardíaco (Doege *et al.*, 2000b; Ibberson *et al.*, 2000). También se expresa, aunque en bajos niveles, en cerebro, glándula adrenal, hígado, tejido adiposo y pulmón. GLUT9 presenta una secuencia muy similar al transportador de fructosa, GLUT5. Su mRNA se encuentra preferentemente en riñón e hígado y en bajos niveles, se ha detectado en intestino delgado, placenta, pulmones y leucocitos (Phay *et al.*, 2000a). No se han descrito datos acerca de sus características cinéticas. GLUT10 exhibe un transporte para 2-DOG con una alta afinidad ( $K_m \sim 0,3\text{mM}$ ). Se expresa fundamentalmente en páncreas e hígado y muestra bajos niveles de expresión en placenta, corazón, músculo esquelético y riñón, pero su localización subcelular permanece indeterminada (Dawson *et al.*, 2001; McVie-Wylie *et al.*, 2001). Análisis de RT-PCR muestran el mRNA de GLUT10 en cerebro fetal e hígado. GLUT11 presenta una baja afinidad por glucosa y un 41,9% de homología con GLUT5, por lo que presentaría un mayor transporte de fructosa (Doege *et al.*, 2001). En tejidos humanos se ha detectado su mRNA en altas concentraciones en el corazón y músculo esquelético, en niveles intermedios en cerebro, intestino delgado, pulmón y leucocitos; luego, en bajos niveles en hígado, riñón y placenta. Se desconoce la especificidad de sustrato para GLUT12, sin embargo, su análisis funcional demuestra una preferencia por D-glucosa, sobre otras hexosas (Rogers *et al.*, 2003a; Rogers *et al.*, 2003b). Su expresión ha sido identificada en corazón, músculo esquelético, tejido adiposo, próstata (Macheda *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2003b). Además, se lo ha identificado en células de cáncer mamario (Rogers *et al.*, 2002).

GLUT13 o HMIT presenta una actividad transportadora específica para mio-inositol y esta actividad es fuertemente aumentada por un descenso del pH extracelular, con un incremento en la  $V_{m\acute{a}x}$  sin cambio de  $K_m$  ( $\sim 100\mu M$ ). No se ha detectado transporte de glucosa. Se expresa predominantemente en cerebro, con una alta expresión en hipocampo, hipotálamo y cerebelo. Un nivel bajo de expresión se ha detectado en tejido adiposo y en riñón (Uldry y Thorens, 2004). Finalmente, GLUT14 se considera un duplicado de GLUT3, no ha sido asignado a ninguna clase y corresponde a un gen que se encuentra localizado en el cromosoma 12p13.3 (Wu y Freeze, 2002); presenta dos isoformas, GLUT14-S, consiste en 10 exones y produce una proteína de 497 aminoácidos con un 94,5% de identidad con GLUT3 mientras que GLUT14-L presenta un exón adicional y codifica para una proteína de 520 aminoácidos que difieren de GLUT-S, sólo en el N-terminal (Wu y Freeze, 2002).

La difusión facilitada de glucosa a través de la membrana plasmática se ha estudiado por muchas décadas para referencia de los estudios iniciales (Lieb y Stein, 1971). GLUT1 ha sido purificado desde eritrocitos humanos y reconstituido funcionalmente en liposomas; estos estudios revelan que GLUT1 es un transportador bidireccional que conduce el sustrato bajo un gradiente de concentración (Baker *et al.*, 1978; Carruthers, 1990; Gould y Holman, 1993; Hruz y Mueckler, 2001b). El transporte mediado por GLUT1 ocurre de manera independiente a la hidrólisis de ATP y por este motivo GLUT1 es considerado un transportador facilitativo (Carruthers, 1990). El gen de GLUT1 fue inicialmente clonado y secuenciado a partir de HepG2 (Mueckler *et al.*, 1985); está ubicado en el brazo corto del cromosoma 1, presenta 35 kb de largo, contiene 10 exones y codifica para una proteína de 492 aminoácidos con una masa molecular de 54.117 Da. Esta proteína presenta un sitio de glicosilación en Asn45 ubicado en la cara externa de la célula, lo cual incrementa el peso molecular a 61.000

(Haneskog *et al.*, 1996). Aproximadamente un 60% de la proteína se encuentra formada por residuos hidrofóbicos los que constituyen 12 distintos segmentos transmembrana. En 1985 el grupo de Mueckler (Mueckler *et al.*, 1985) presentó un modelo estructural para esta proteína, el que con los años ha sido ampliamente confirmado. En este modelo los 12 segmentos transmembrana presentan una conformación helicoidal y además los grupo N y C terminales y el gran lazo que une los segmentos transmembrana 6 y 7 se encuentran orientados intracelularmente, mientras que el lazo que une los segmentos transmembrana 1 y 2 se ubica en el lado extracelular. Estudios enzimáticos, inmunológicos, de marcaje con epítopes de glicosilación y de mapeo de saturación con cisteínas son compatibles con el modelo de 12  $\alpha$ -hélices transmembrana (Cairns *et al.*, 1984; Cairns *et al.*, 1987; Davies *et al.*, 1987; Andersson y Lundahl, 1988; Burdett y Klip, 1988; Gibbs *et al.*, 1988; Davies *et al.*, 1990; Asano *et al.*, 1992; Hresko *et al.*, 1994). La importancia de GLUT1 constituye un aliciente para determinar la estructura tridimensional de esta proteína en la membrana. Sin embargo, aun cuando se han logrado avances en la expresión y purificación de esta proteína, no se han obtenido modelos satisfactorios de ella. Por ello se han elaborado modelos teóricos sobre la base de la abundante información estructural que se ha compilado para la proteína. En uno de ellos, obtenido sobre la base de los resultados de la mutagénesis de cisteínas y de estudios de accesibilidad de sustituciones de cisteínas, implican a los segmentos transmembrana 1 (Heinze *et al.*, 2004), 2 (Olsowski *et al.*, 2000), 5 (Mueckler y Makepeace, 1999), 7 (Hruz y Mueckler, 1999; Olsowski *et al.*, 2000), 8 (Mueckler y Makepeace, 2004), 10 (Mueckler y Makepeace, 2002) y 11 (Hruz y Mueckler, 2000) en la formación de una “envoltura” helicoidal interna que comprende una cavidad accesible al agua a través de la membrana por donde también se translocaría el azúcar. Se predice además que ciertos aminoácidos que

contienen grupos aminos o hidroxilos formarían el sitio de unión al azúcar vía formación de puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo de la glucosa (Mueckler *et al.*, 1985). Este modelo también es consistente con las estructuras informadas para Lac permeasa (Abramson *et al.*, 2003) y el antiportador de glicerol-3-P (Huang *et al.*, 2003) ambos miembros de la Superfamilia Principal de Facilitadores. Por otra parte, se propone que las hélices 3, 6, 9 y 12 rodearían esta envoltura interna (Alisio y Mueckler, 2004). Según este modelo, el transportador de glucosa contiene dos sitios de unión al azúcar, uno accesible por el citoplasma y el otro por el solvente externo, los cuales no pueden ser ocupados simultáneamente (Hruz y Mueckler, 2001a). Carruthers (Hebert y Carruthers, 1992), introdujo un posible nivel de estructura cuaternaria al sugerir además la posibilidad que GLUT1 exista como un homotetrámero que muestra interacción cooperativa entre dos dímeros de GLUT1. En cada dímero, una subunidad es expuesta al sitio exofacial mientras que la otra es accesible por el sitio citoplasmático de unión al azúcar. La isomerización de una subunidad se acopla a la isomerización simultánea de la segunda subunidad en la conformación opuesta (Hamill *et al.*, 1999).

Dada la ausencia de alguna estructura obtenida del análisis de cristales, mucha de la información sobre la relación entre estructura y función del GLUT1 se ha obtenido a través de experimentos de mutagénesis sitio dirigidas y de marcaje por afinidad. Además, muchas estructuras de GLUT1 que participan en la unión de glucosa, se han identificado usando inhibidores fotoactivables conocidos por su interacción con la superficie endo o exofacial del transportador. El metabolito fúngico, citocalasina B (CytB), es el más estudiado de todos estos inhibidores (Shanahan, 1982, 1983; Baldwin y Lienhard, 1989). Estudios cinéticos establecen que CytB es un inhibidor competitivo de GLUT1 sólo en condiciones de salida y no competitivo en condiciones de entrada, por lo que se ha establecido que este inhibidor se

une por la cara interna del transportador (Basketter y Widdas, 1978; Deves y Krupka, 1978). Mediante estudios de fotomarcaje y de digestión proteolítica se localizó el sitio de unión de citocalasina B en la región citoplasmática de los segmentos de membrana 10 y 11, sugiriendo que esta región contiene o está muy cerca al sitio de unión interno de glucosa (Holman y Rees, 1987). Los residuos 388 y 412 ubicados en los segmentos de membrana 10 y 11 fueron fotomarcados por exposición de la proteína purificada a citocalasina B (Holman y Rees, 1987). Mutaciones individuales a leucina de los dos residuos de triptófanos, reducen pero no inhiben la unión de citocalasina B, mientras que el cambio simultáneo de ambos residuos inhibe completamente el fotomarcaje con citocalasina B (Inukai *et al.*, 1994). Estos datos se han esgrimido para sugerir que estos dos residuos estarían involucrados en la unión de citocalasina B al transportador GLUT1.

La utilización de inhibidores de tirosina quinasas con especificidad para sitios de unión de ATP, se ha validado como una herramienta apropiada para la detección de sitios con características funcionales de dominios de unión a nucleótidos en GLUT1 (Vera *et al.*, 1996; Vera *et al.*, 2001b). Estos inhibidores corresponden a pequeñas moléculas, tanto de origen natural como sintéticas (flavonas, isoflavonas y tirfostinas) que se caracterizan por haber sido descritos originalmente como inhibidores específicos de tirosinas quinasas. En general, solamente los inhibidores que se ligan a sitios de unión de ATP han sido 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.*, 1996; Vera *et al.*, 2001b). Las características, así como la especificidad de la inhibición y los resultados de estudios de desplazamiento de citocalasina B, muestran que los inhibidores de tirosina quinasa desplazan la glucosa y afectan la unión de citocalasina B a GLUT1 en eritrocitos humanos, indicando que el efecto inhibitorio en el

transporte se relaciona con la interacción directa de estos inhibidores con GLUT1. Dentro de los inhibidores de tirosina quinasa, se incluyen la flavona quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) y la tirfostina A47. La primera es un compuesto natural con especificidad por el sitio de unión de ATP, que además, inhibe de manera competitiva el transporte de metilglucosa, desoxiglucosa y de ácido deshidroascórbico en células HL-60 y en eritrocitos (Vera *et al.*, 2001b). La segunda, bloquea competitivamente la unión de tirosina a las proteína tirosina quinasas (Levitzki y Gazit, 1995) y a su vez, resultó ser un inhibidor no competitivo del transporte mediado por GLUT1 (Vera *et al.*, 2001a)

A pesar que la hidrólisis de ATP no se requiere para el transporte mediado por GLUT1, la actividad intrínseca de GLUT1 sí es sensible al contenido celular de ATP (Jacquez, 1983; Carruthers, 1986b, 1986a; Hebert y Carruthers, 1986; May, 1988; Carruthers y Helgerson, 1989; Helgerson *et al.*, 1989; Levine *et al.*, 1998). Por otra parte, estudios de marcaje por afinidad realizados en fantasmas de glóbulos rojos y en preparaciones de GLUT1 reconstituidas en liposomas, demostraron que el ATP interactúa directamente con el transportador (Carruthers, 1986b; Hebert y Carruthers, 1986; Carruthers y Helgerson, 1989; Wheeler, 1989; Levine *et al.*, 1998). Análisis de la secuencia primaria de GLUT1 revelan que esta proteína presenta tres segmentos aminoacídicos cortos (dominio I, II y III) con homologías a secuencias aminoacídicas que son parte de los dominios de unión a ATP en diversas ATPasas y en proteínas de unión a ATP (Carruthers *et al.*, 1989; Levine *et al.*, 1998; Fry *et al.*, 1986; Walker *et al.*, 1982). El dominio I, está conformado por los residuos aminoacídicos que van desde 111-118 (Gly-Phe-Ser-Lys-Leu-Gly-Lys-Ser), presenta una orientación exofacial y está constituido por parte del tercer dominio transmembrana y por parte del asa extracelular que une los dominios transmembrana 3 y 4. El dominio II, se ubica en gran asa intracelular entre los putativos dominios transmembrana 6 y 7 y estaría formado

por los residuos 225-229 (Lys-Ser-Val-Leu-Lys) y por último el dominio III está localizado en un asa intracelular predicha entre los dominios 8 y 9, comprendiendo los residuos que van desde 332-338 (Gly-Arg-Arg-Trp-Leu-His-Leu) (Mueckler *et al.*, 1985; Levine *et al.*, 1998). Aunque existen evidencias que indican que el ATP afecta el estado funcional de GLUT1, aún no se establece cómo la unión del ATP a los putativos sitios de unión de ATP pueden afectar la actividad intrínseca de GLUT1 en ausencia de hidrólisis de este nucleótido trifosfato, ya que se ha demostrado que su actividad, también es modulada por análogos de ATP no hidrolizables. Se postula que ATP podría jugar un papel estructural importante en determinar la conformación de los dominios del transportador que participan en el ciclo de transporte. Datos entregados por Liu (Liu *et al.*, 2001), señalan que los dominios de unión a ATP en GLUT1, son determinantes en la actividad funcional del transportador, por lo que estarían involucrados en el transporte de sustrato, participando directamente en el ciclo de transporte y regulando sus propiedades cinéticas. De esta forma, nuestra hipótesis de trabajo indica que estas secuencias con homología con sitios de unión a nucleótidos forman parte de sitios alostéricos de unión de ligandos. Por ejemplo, se ha mostrado que existen flavonas que se unen a proteínas que utilizan ATP y lo hacen en los sitios de unión a estas moléculas. Por este motivo, en esta tesis se propone probar la importancia del dominio I en la actividad funcional y la regulación del transportador GLUT1. Para lograr este objetivo se generarán dos mutantes G111A y G116A, pertenecientes al primer dominio y se expresarán en ovocitos de *Xenopus laevis*, después de lo cual se determinará el efecto de las mutaciones introducidas sobre las propiedades de transporte de GLUT-1 mediante ensayos de intercambio y ensayos de transporte de entrada de sustratos, así como su sensibilidad frente a los inhibidores citocalasina B, quercetina y tirfostina A47.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

3-O-metilglucosa, D-glucosa, citocalasina B, quercetina, tirfostina A47, benzocaína, APS, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. <sup>3</sup>H3-O-metilglucosa fue adquirido de American Radiolabeled Chemicals Inc, USA, mientras que el NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, HEPES, Tris-HCl, Tris-acetato, acrilamida, bisacrilamida, fueron obtenidos de J.T.Baker, USA. Colagenasa Tipo I se adquirió de United States Biological Inc. Triptona o peptona, extracto de lavadura, fueron adquiridos de Mo Bio Laboratories Inc. SDS, agarosa y bromuro de etidio fueron obtenidos de Winkler Ltda., mientras que el líquido de centelleo EcoScynt fue adquirido de National Diagnostic Inc. Por su parte EDTA fue adquirido de UCB Bioproducts. El TEMED se adquirió de Bio-Rad Laboratories. Además, los kit Qiagen Plasmid Midi y Qiagen Plasmid Mini, fueron obtenidos de Qiagen company. El kit de mutagénesis, Quickchange Site-Directed fue obtenido de Stratagene Corporation USA. El kit de transcripción mMACHINE High Yield Capped RNA Transcription fue obtenido de Ambion Inc. El ladder de DNA y RNA, High Range, fueron adquiridos de Fermentas UAB (Genesis Chile Ltda.). La lupa fue adquirida de Olympus. El anticuerpo monoclonal utilizado fue adquirido de Alpha Diagnostic. El iluminador de fibra óptica y el Nanoject II Auto-nanoliter Injector fueron adquiridos de Drummond Scientific Co. Las ranas fueron adquiridas en la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago y se mantuvieron en el laboratorio en vasijas con agua y temperatura ambiente.

### 3.2. Construcción de mutantes de GLUT1 en el putativo dominio I de unión de ATP

A partir de GLUT1 silvestre, clonado en el vector de expresión pGEM3, se generaron 2 mutantes puntuales: Gly111→Ala y Gly116→Ala, utilizando el Kit de mutagénesis, QuickChange Site-Directed de Stratagene. Para generar las mutantes, se diseñaron los siguientes partidores y se mandaron a sintetizar:

**G111A Sen** 5' TCC GCC GTG CTC ATG **GCC** TTC TCG AAA CTG GGC 3'

**G111A ASen** 5' GCC CAG TTT CGA GAA **GGC** CAT GAG CAC GGC GGA 3'

**G116A Sen** 5' GGC TTC TCG AAA CTG **GCC** AAG TCC TTT GAG ATG C 3'

**G116A ASen** 5' G CAT CTC AAA GGA CTT **GGC** CAG TTT CGA GAA GCC 3'

Se amplificaron las mutantes por medio de un protocolo de PCR que consistió en una mezcla de reacción de 50 µl finales compuesta por un tampón de reacción 10X (Tris-HCl 200 mM (pH 8,8), KCl 100 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 20 mM, 1% Tritón X-100, 1 mg/mL BSA libre de nucleasas), 50 ng del templado, 125 ng de cada partidador, 100 nm de dNTPs, 2,5 Unidades de Pfu Turbo DNA polimerasa y agua deshidrogenada para completar el volumen. La reacción fue cubierta con aproximadamente 30 µL de aceite mineral. Inicialmente, la mezcla de reacción se calentó a 95° C por 30 segundos. La reacción de PCR realizada consistió básicamente en 12 ciclos de 95° C por 30 segundos, 55° C por 60 segundos y 68° C por 330 segundos. Los productos de amplificación fueron analizados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,0) y visualizados por tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta. Como estándar de tamaño molecular se utilizó la mezcla comercial de Fermentas de 1kb. Luego se procedió a

la digestión del producto amplificado con *DpnI* (10U/μL) por 1 hora a 37° C, con el fin de digerir el DNA parental, que se encontraba metilado. Finalmente, se procedió a la transformación de células supercompetentes XL1-Blue para lo cual una alícuota del DNA tratado con *DpnI*, se transfirió a las células XL1-Blue y por 45 segundos se mantuvieron a 42° C, luego se depositaron en hielo por 2 minutos. Se agregó 0.5 mL de SOC precalentado a 42° C y se incubó la reacción por 1 hora a 37° C a 225-250 rpm. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas de agar conteniendo 100 mg/mL de ampicilina para la selección de las bacterias transformantes conteniendo el clon, e incubadas a 37° C. Fueron seleccionadas cinco colonias, las cuales crecieron en 3 mL de LB líquido. Se realizó una Miniprep y el producto del clonamiento, se analizó, en base al patrón de restricción, en este caso usando *HindIII*. Además, se realizó una Midiprep con el propósito de aumentar el número de copias de los clones. Se midió la absorbancia a 260 nm y se obtuvo la concentración en base a la siguiente fórmula:

$$[\mu\text{L}] : \frac{A_{260} * 50 * \text{factor de dilución}}{1000}$$

Después de confirmar cada una de las mutaciones por secuenciación del vector mutado se procedió a generar mRNA con el Kit de transcripción *in vitro*, mMessage mMachin de Ambion.

### **3.3. Preparación de RNA e inyección de ovocitos de *Xenopus laevis***

#### **3.3.1. Linearización y purificación del plasmidio pGEM3**

El plasmidio que contiene los diferentes constructos, fue linearizado con *XbaI* por 2 horas a 37° C. Luego, siempre con materiales libres de RNAsas, se eliminó cualquier tipo de

impurezas con una mezcla de reacción que contiene el DNA linearizado, SDS 5%, proteínasa K (10 mg/mL) y agua deshidrogenada con el fin de completar un volumen final de 30  $\mu$ L. Esta reacción se homogeneizó por inversión y se incubó a 50° C al menos por 30 minutos.

Listo el tiempo de reacción se agregó a la mezcla, un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, se homogeneizó por agitación vigorosa. Se centrifugó 1 minuto a temperatura ambiente a 1500 g, se separó la fase acuosa y se le agregó un volumen de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  y dos volúmenes de etanol absoluto. Esto se incubó a – 20° C al menos por 15 minutos. Finalmente se centrifugó a 15700 g por 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y una vez seco, el precipitado fue resuspendido en 10 - 20 mL de agua libre de nucleasas. Se midió la absorbancia a 260 nm y se obtuvo la concentración.

### **3.3.2. Síntesis de mRNA para GLUT1 silvestre, Gly111→Ala y Gly116→Ala.**

Los mRNA del transportador silvestre y de las mutantes fueron sintetizados desde estos constructos usando un kit de transcripción T7 RNA polimerasa (mMessage mMachine de Ambion), para lo cual, en un tubo plástico de 1,5 mL, se mezclaron 10  $\mu$ L de NTP (ATP (15 mM), CTP (15 mM), UTP (15 mM) y GTP (3 mM)), 2  $\mu$ L de tampón de reacción 10X para T7, 1  $\mu$ g de DNA linearizado, 2  $\mu$ L de enzima T7 y agua libre de nucleasas, para completar un volumen final de 20  $\mu$ L. Esta solución se incubó por 2 horas a 37°C, luego de lo cual se agregaron 20  $\mu$ L de cloruro de litio 7,5 M y se incubó a –20°C cerca de 20 minutos como mínimo. Pasado este tiempo, se centrifugó por 30 minutos a 15700 g, luego de lo cual se eliminó el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol 70% y se centrifugó nuevamente por 10 minutos. Finalmente se eliminó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua libre de nucleasas.

Con el fin de asegurar la integridad del RNA generado, se analiza por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE y se visualiza por tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta. Como estándar de tamaño molecular se utilizó la mezcla comercial de Fermenta RNA ladder, High Range (0,5 mg/mL). Luego, además de saber que nuestro RNA no está degradado, debemos medir su concentración, para lo cual, utilizamos la siguiente fórmula:

$$[\mu\text{L}] : \frac{A_{260} * 40 * \text{factor de dilución}}{1000}$$

### **3.3.3. Tratamiento de *Xenopus laevis* y obtención de ovocitos.**

Hembras adultas de *Xenopus laevis* fueron sumergidas en un litro de solución anestésica que contiene benzocaína al 0.05% por aproximadamente 10 minutos a 4° C. Una vez dormidas, se ubicaron en una bandeja con hielo y por medio de una incisión en el abdomen se procedió a la remoción de aproximadamente 3 gramos de tejido ovárico, los que debieron ser disgregados manualmente e incubados, en agitación constante a temperatura ambiente con una solución de colagenasa tipo I (1 mg/mL) en medio OR2 (NaCl 100 mM, KCl 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Hepes 5 mM, pH 7,5) por aproximadamente 2 horas. Después de este tiempo, los ovocitos son lavados con OR2 y aquellos en estado V y VI, fueron seleccionados con la ayuda de una lupa e incubados a 16° C durante toda una noche, en medio OR1 (CaCl<sub>2</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, KCl 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Hepes 5 mM, pH 7,5). Los mejores ovocitos fueron inyectados con una concentración de 50 ng de RNAs sintetizados, tanto del silvestre como de las mutantes. Los ovocitos fueron mantenidos en OR1 por 3 días a 16° C para poder lograr la máxima expresión del transportador.

### **3.4. Determinación de expresión de proteínas de membrana en ovocitos.**

#### **3.4.1. Preparación de membranas de ovocitos para posterior análisis Western blot**

Se seleccionaron aproximadamente 20 ovocitos intactos inyectados con el mRNA del transportador silvestre y con el mRNA del transportador mutado (G111A y G116A), además de 20 ovocitos sin inyectar para usarlos como control negativo. Fueron homogeneizados por repetidos pipeteos y resuspendidos en una solución de homogeneización (HEPES 10 mM, pH 7,5; sacarosa 250 mM, DTT 3mM, PMSF 1mM, EDTA 1mM, pestatina A 1µg/ µL, aprotinina 10 mg/mL, leupeptina 10 mg/mL). El homogeneizado total fue centrifugado tres veces a 1000 g por 10 minutos a 4° C. Se extrajo el sobrenadante y se centrifugó a 150000g por 1 hora a 4° C para coleccionar las membranas. El sedimento fue resuspendido en tampón de homogeneización y mantenidos a -20° C.

#### **3.4.2. Análisis Western blot**

La fracción de membranas totales fue sujeta a una electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 10% y luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas en solución de bloqueo (leche descremada al 5%, tween 0,03% y BSA al 1%) por 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante. Luego, se procedió a la incubación por un periodo de 5 horas a temperatura ambiente y agitación constante, con el primer anticuerpo 1:1000, anti-GLUT1 de ratón dirigido contra los últimos quince aminoácidos de la región carboxilo terminal de la proteína, el cual fue previamente purificado por afinidad desde conejo (Alpha Diagnostic Internacional). Una vez finalizada la incubación con el primer anticuerpo las membranas fueron lavadas en solución fosfato salino (PBS), 3 veces por 5 minutos cada vez, después de los cual, se procedió a

incubar con el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina por 1 hora en agitación constante y a temperatura ambiente. Finalmente la membrana se lavó 3 veces con PBS y se reveló con DAB (diaminobencidina) al 0,05% en PBS pH 7,4 y 0,03% de peróxido de hidrógeno por 10 minutos en oscuridad.

### **3.5. Determinación de la expresión del transportador en proteínas totales de ovocitos.**

#### **3.5.1. Preparación de homogeneizado para posterior Dot blot**

48 a 72 horas postmicroinyección con el mRNA del transportador silvestre y con el mRNA del transportador mutado (Gly111→Ala y Gly116→Ala), se seleccionaron 4 ovocitos, además de otros 4 sin inyectar, los que fueron usados como control negativo. Estos fueron ubicados en un tubo plástico de 1,5 mL donde se agregaron 50 µl de tampón de mantención para luego ser homogeneizados mediante repetidos pipeteos. A partir del homogeneizado obtenido, se agregaron 10 µg sobre una membrana de nitrocelulosa, cuidando que la primera gota se haya secado completamente antes de agregar la segunda.

#### **3.5.2. Dot blot**

Una vez seca la membrana de nitrocelulosa se procedió a la inmunodetección. Esta técnica es básicamente igual a la descrita en el apartado 3.4.2. motivo por el cual, no se describe nuevamente.

### **3.6. Ensayos de transporte y análisis cinéticos**

En cada uno de estos ensayos se utilizó 3-O-metilglucosa como sustrato para los análisis cinéticos. Por otra parte, los ovocitos fueron trabajados luego del tercer día de

microinyección, tanto con la proteína silvestre, como con cada una de las mutantes. Luego de la microinyección, los ovocitos fueron mantenidos a 16° C y diariamente se cambió el medio OR1 para eliminar ovocitos que puedan presentar deterioro en su estructura. Los ensayos fueron realizados a temperatura ambiente, utilizando siempre ovocitos inyectados y ovocitos sin inyección, para poder medir con estos últimos, la expresión basal. Además, es necesario precisar que cada determinación se realizó en triplicado.

### **3.6.1. Determinación del tiempo de transporte para GLUT1 silvestre, Gly111→Ala y Gly116→Ala, en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio.**

Para ensayos en condiciones trans-cero de entrada, grupos de tres ovocitos post inyección, además de los controles sin inyección, fueron incubados en tubos plásticos de 2 mL a temperatura ambiente, con 200 µl de una mezcla de reacción conteniendo 10 mM de 3-O-metilglucosa y 1 µCi de <sup>3</sup>H-metilglucosa. La reacción fue medida en diferentes tiempos: 0, 1, 3, 5, 10, 20, 35 minutos, luego de lo cual, fue detenida por tres lavados con OR1 frío conteniendo 10 µM de HgCl<sub>2</sub>. Después de cada lavado se succionó rápidamente la solución de detención. Las muestras fueron trasladadas a viales y lisadas con 200 µl de SDS 5%. Luego de agregar 2 mL de líquido de centelleo biodegradable (EcoScynt, National Diagnostic) la radiactividad incorporada fue cuantificada mediante centelleo líquido en un contador Packard 1600 TR y los resultados finales de incorporación fueron expresados como pmoles/ovocito. Se determinó que la captación de 3-O-metilglucosa es lineal por un período de al menos 7 minutos.

Para el caso de ensayos en condiciones de intercambio en equilibrio, se realizó el mismo procedimiento anterior, con la diferencia que los ovocitos fueron incubados en un

volumen inicial de 100  $\mu\text{L}$  con 3-O-metilglucosa 10 mM, durante 16 -18 horas a 16°C. La reacción comienza en el momento en que se agregan 100  $\mu\text{L}$  de una mezcla de reacción que contiene 10 mM de 3-O-metilglucosa y 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -metilglucosa, logrando un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . También bajo estas condiciones, se determinó que la captación de 3-OMG es lineal por un período de aproximadamente 7 min.

### **3.6.2. Curva de captación de 3-O-metilglucosa para GLUT1 silvestre, Gly111 $\rightarrow$ Ala y Gly116 $\rightarrow$ Ala, en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio.**

Para ensayos trans-cero de entrada, grupos de 3 ovocitos inyectados con mRNA y sin inyección, fueron incubados en tubos plásticos de 2 mL por 3 minutos en 200  $\mu\text{L}$  de una mezcla de reacción que contiene 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -metilglucosa y concentraciones variables de 3-O-metilglucosa, las que van desde 0 mM a 60 mM. Luego de este tiempo, se procedió a lavar los ovocitos y se trasladaron a viales donde fueron lisados, para posteriormente cuantificar su radiactividad. A grandes rasgos, lo que se mide en este experimento, es la capacidad que presentan los sustratos de ingresar hacia el citoplasma, en condiciones en que el interior de los ovocitos se encuentra vacío, vale decir, sin sustrato.

Para ensayos de intercambio en equilibrio, grupo de tres ovocitos, fueron incubados en tubos plásticos de 2 mL en un volumen inicial de 100  $\mu\text{L}$  de concentraciones variables de 3-O-metilglucosa (0 – 60  $\mu\text{M}$ ) por 16 -18 horas a 16° C. Al finalizar el tiempo de incubación, se agregó 100  $\mu\text{l}$  de una mezcla de reacción que contiene las correspondientes concentraciones de 3-O-metilglucosa (0 – 60  $\mu\text{M}$ ) y 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -metilglucosa, completando un volumen final de reacción de 200  $\mu\text{L}$ . Pasado los tres minutos de transporte se procedió al lavado para posteriormente trasladar las muestras a los viales, lisar los ovocitos y cuantificar su

radiactividad. De esta forma, la idea de este tipo de ensayos, es mantener la misma concentración del sustrato, tanto en el interior como en el exterior de la célula, tras lo cual, se mide el transporte del sustrato, considerando que el azúcar tritiado sólo se encuentra en el lado externo de la célula. Entonces, finalmente se mide la cantidad de glucosa tritiada que es capaz de ingresar a la célula.

### **3.6.3. Determinación de $K_i(\text{app})$ para inhibidores de GLUT1 silvestre, Gly111→Ala y Gly116→Ala, en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio.**

Para realizar los ensayos de inhibición, sea en condiciones trans-cero de entrada como de intercambio en equilibrio, fue necesario preparar soluciones concentradas de los diferentes inhibidores, cada uno de ellas, resuspendidas en DMSO. Así, para el caso de quercetina se prepararon tres diferentes soluciones madres de 1 mM, 10 mM y 30 mM, para tirfostina A47 se usaron dos soluciones de diferentes concentraciones, las cuales son 10 mM y 100 mM y finalmente para citocalasina B, la cual fue utilizada como control, las concentraciones utilizadas fueron de 50  $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$  y 1 mM.

Para ensayos trans-cero de entrada, grupos de tres ovocitos inyectados y no inyectados fueron incubados en tubos plásticos de 2 mL durante cinco minutos con tres distintos inhibidores: citocalasina B (0 – 1  $\mu\text{M}$ ), quercetina (0 – 60  $\mu\text{M}$ ) y tirfostina A47 (0 – 250  $\mu\text{M}$ ). En cada ensayo se agregó 100  $\mu\text{L}$  de las diferentes concentraciones de los inhibidores respectivos y se incubaron por cinco minutos, a temperatura ambiente. Luego de este tiempo se agregó 100  $\mu\text{L}$  de una solución que contiene 3-O-metilglucosa y 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -metilglucosa para completar un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  y lograr una concentración de 10 mM del

sustrato. Tres minutos después se detuvo el transporte del sustrato con OR1 frío y se lisaron los ovocitos para posteriormente cuantificar su radiactividad.

En condiciones de intercambio en equilibrio, grupos de tres ovocitos inyectados y no inyectados, fueron incubados en 100  $\mu$ L de una solución que presenta la misma concentración de azúcar fría, 10 mM, por 16 - 18 horas a 16° C. Después de este tiempo, se agregó 10  $\mu$ L de los respectivos inhibidores en sus distintas concentraciones y se incubaron por cinco minutos, para finalmente agregar 90  $\mu$ L de azúcar fría y azúcar caliente. La concentraciones tanto del grupo de inhibidores como del sustrato fueron las mismas que las utilizadas en el ensayo trans-cero de entrada. Se midió el transporte de la hexosa durante 3 minutos. La reacción se detuvo con OR1 frío. Los ovocitos fueron tratados con SDS 5% y se procedió a determinar la radiactividad, como se detalló anteriormente.

#### **3.6.4. Efecto de concentraciones fijas variables de inhibidores en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio para GLUT1 silvestre, Gly111→Ala y Gly116→Ala.**

En ensayos trans-cero de entrada, con grupos de tres ovocitos inyectados y no inyectados, se realizó una curva de saturación sin ningún tipo de inhibidor y otra curva donde se trabajó con una concentración fija del respectivo inhibidor y concentraciones variables del sustrato. De esta forma, las concentraciones usadas para cada inhibidor fueron: citocalasina B 0,2  $\mu$ M, quercetina 10  $\mu$ M y tirfostina A47 150  $\mu$ M. Las concentraciones que se usaron para el sustrato, en ambos casos fueron desde 0 – 60 mM y 1  $\mu$ Ci de  $^3$ H-metilglucosa. Los ovocitos fueron mantenidos a temperatura ambiente en 100  $\mu$ L de OR1. La reacción se inició cuando

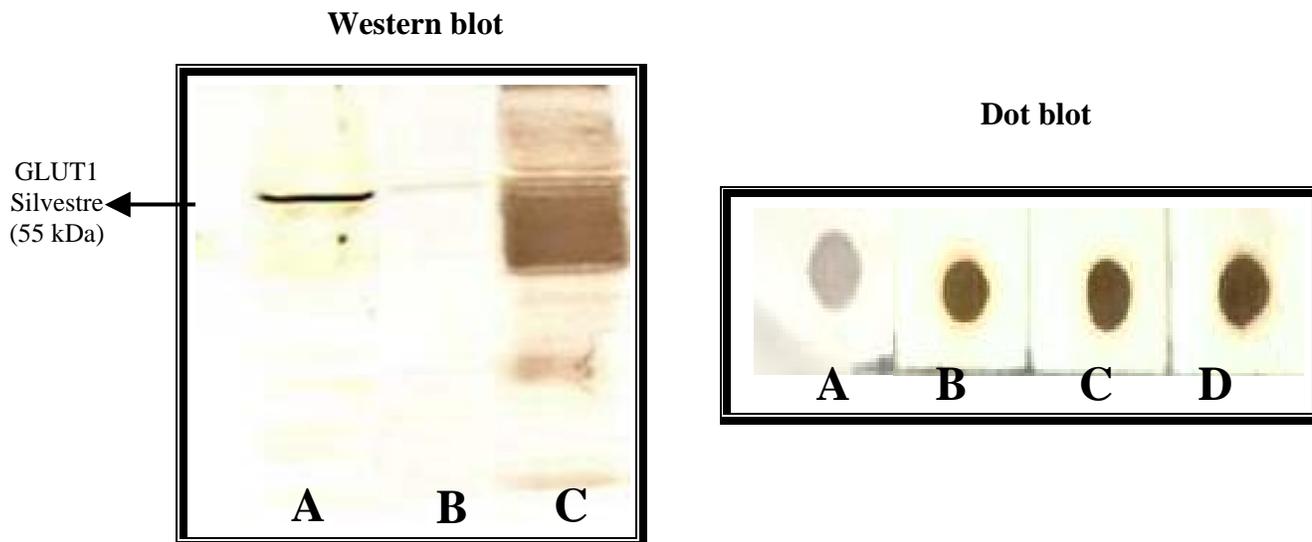
se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de una solución que contiene 3-O-metilglucosa,  $^3\text{H}$ -metilglucosa y el inhibidor con sus respectivas concentraciones, para completar un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ .

En condiciones de intercambio en equilibrio, grupos de ovocitos fueron incubados por 18 horas a  $16^\circ\text{C}$  en 100  $\mu\text{L}$ , con distintas concentraciones de azúcar que van de 0 – 60 mM. Pasado este tiempo se dio inicio a la reacción al agregar 100  $\mu\text{L}$  de una solución formada por 3-O-metilglucosa,  $^3\text{H}$ -metilglucosa y el inhibidor cuya concentración para el caso de quercetina es de 20  $\mu\text{M}$ , para tirfostina A47 de 200 $\mu\text{M}$  y para citocalasina B de 2  $\mu\text{M}$ , completando un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Expresión de proteínas silvestre y mutantes G111A y G116A en ovocitos de *Xenopus laevis*

Con el fin de averiguar el rol del putativo dominio I, el cual presenta homología a sitios de unión a nucleótidos, se realizaron dos mutaciones en aminoácidos altamente conservados, Gly111 y Gly116, los que fueron cambiados a través de mutagénesis sitio dirigida, por alaninas, por ser un cambio sutil. La estructura de los cDNA, fueron confirmadas por secuenciación de DNA y los correspondientes mRNA fueron sintetizados *in vitro*, para posteriormente ser usados en el análisis funcional de la proteína. Los mRNA, tanto del transportador silvestre, GLUT1, como de las respectivas mutantes, Gly111→Ala y Gly116→Ala, fueron inyectados en ovocitos de *Xenopus laevis* y el nivel de expresión y las propiedades funcionales del transportador silvestre fueron estudiadas mediante Western blot y ensayos de transporte, respectivamente. La figura 1A muestra que los ovocitos inyectados con el transportador silvestre (control positivo) mostraron diferencias significativas en cuanto a sus niveles de expresión en membrana en comparación a los ovocitos sin inyección (control negativo). Asimismo, mediante dot blot se compararon los niveles de expresión de las mutantes Gly111→Ala y Gly116→Ala con el del transportador silvestre y determinamos que éstos eran muy similares entre sí (Figura 1B). Entonces, es factible asumir que cada una de las proteínas transportadoras, tanto silvestre como las mutadas, se expresaron en



**Fig. 1: Expresión de proteínas en ovocitos de *Xenopus laevis*.**

**Western blot.** 15  $\mu\text{g}$  de proteínas de membranas de ovocitos de *Xenopus laevis* son analizadas luego de 3 días post-inyección utilizando un anticuerpo monoclonal contra un péptido sintético que contiene la secuencia de los últimos quince aminoácidos de la región carboxilo terminal del GLUT1 humano. A: ovocitos inyectados con la proteína nativa (control positivo). B: ovocitos sin inyección (control negativo) y C: proteínas de membrana de eritrocitos. **Dot Blot.** 10  $\mu\text{g}$  de proteínas totales de ovocitos fueron analizadas luego de 3 días post-microinyección. El anticuerpo utilizado fue el mismo que para el western-blot. A: ovocitos sin inyección (control negativo). B: ovocitos con mRNA de proteína GLUT1 nativa (control positivo). C: ovocitos con mRNA de la mutante G111A. D: ovocitos con mRNA de la mutante G116A.

efectivamente en las membranas de los ovocitos. Además, al igual que para el caso del transportador nativo, realizamos ensayos de transporte tanto con Gly111→Ala como con G116→Ala, con el objetivo de analizar sus propiedades funcionales.

La expresión del transportador silvestre es examinada en proteínas totales de membrana de ovocitos de *Xenopus laevis*, aisladas desde ovocitos inyectados con los respectivos mRNA. La suspensión de membranas totales fue sometida a una electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 10% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa, tras lo cual se agregó el anticuerpo contra el péptido C-terminal de GLUT1. El análisis revela que los ovocitos inyectados con el mRNA nativo, expresan una proteína de un peso molecular de aproximadamente 55 kDa, el cual prácticamente no se presenta en ovocitos no inyectados.

En esta tesis, utilizamos como modelo de estudio ovocitos de *Xenopus laevis*, puesto que este sistema presenta ventajas a la hora de analizar la función de proteínas de membranas modificadas mediante estrategias de biología molecular. No obstante, esta estrategia no se encuentra exenta de problemas, particularmente los ovocitos en algunos períodos del año no expresaron significativamente la proteína, por otra parte, se volvió muy difícil lograr que llegaran intactos al tercer día post inyección, puesto que sus membranas se deterioraban antes de lo presupuestado. Además, cada grupo de ovocitos, obtenidos de diferentes ranas, presentaron niveles de expresión desiguales, por lo cual, al comparar, por ejemplo, las velocidades máximas se observan grandes variaciones. Este último punto, es constante a lo largo del año. Es tanta la variación de  $V_{m\acute{a}x}$ , que existen publicaciones en donde se habla de un aumento de hasta 7 veces al compararlas en condiciones trans-cero de entrada en contraste con intercambio en equilibrio. Sin embargo, los datos obtenidos en nuestro laboratorio, demuestran que este aumento no es mayor a 2 veces. En un trabajo publicado en el año 1995

(Due *et. al.*, 1995) se menciona también la estacionalidad de los ovocitos y la abundante variabilidad en los niveles de expresión. A pesar de esto, existen otros meses del año en que las membranas de los ovocitos se mantienen intactas y además los niveles de expresión son los adecuados, aunque hay que tener en cuenta que están sujetos a variación. Es en este momento entonces, que generamos el máximo de resultados.

#### **4.2. Cinética de captación de 3-O-metilglucosa a través del tiempo para GLUT1 silvestre, Gly111→Ala y Gly116→Ala, en condiciones de entrada.**

La 3-O-metilglucosa es un análogo de glucosa comúnmente usado en ensayos de captación de hexosas. Este compuesto, a diferencia de la glucosa, no es acumulado por las células dado que no es metabolizado. Durante el proceso de captación celular se encontró que a medida que la 3-O-metilglucosa ingresa al interior de las células, la velocidad de transporte decrece hasta llegar a un estado de equilibrio entre las concentraciones intra y extracelulares; en este punto, las velocidades de entrada y de salida se equilibran y el sistema alcanza una velocidad neta igual a cero.

Los resultados de captación en el tiempo de 3-O-metilglucosa 10 mM, en experimentos de hasta 35 minutos, muestran que la captación ocurre en forma lineal dentro de los primeros 7 minutos. A tiempos posteriores a los 7 minutos, el sistema de captación se equilibra rápidamente, alcanzando una incorporación máxima de 700 pmol/ovocito (Figura 2A) en condiciones trans-cero de entrada y de aproximadamente 1450 pmol/ovocito (Figura 2B) en condiciones de intercambio en equilibrio. Este mecanismo fue repetido tanto para el caso de Gly111→Ala como para Gly116→Ala y los resultados obtenidos fueron muy similares a los entregados por los ovocitos inyectados con el GLUT1 nativo (datos no

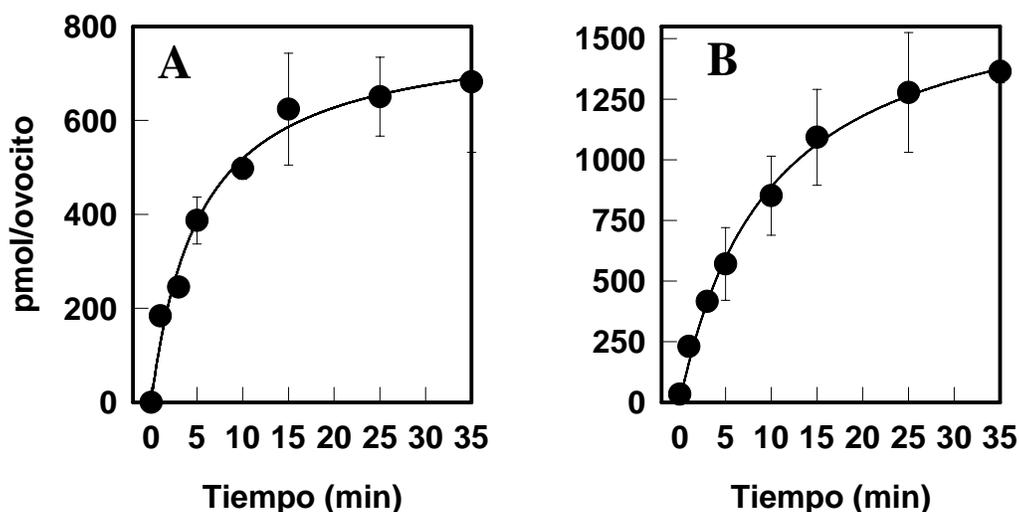
mostrados). De esta forma, en acuerdo con los resultados obtenidos, determinamos que el tiempo de transporte óptimo para cada ensayo, tanto en condiciones de trans-cero de entrada como en intercambio en equilibrio, es de 3 minutos para mantener las condiciones de velocidad inicial.

#### **4.3. Captación de 3-O-metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio para GLUT1 silvestre y cada una de las mutantes.**

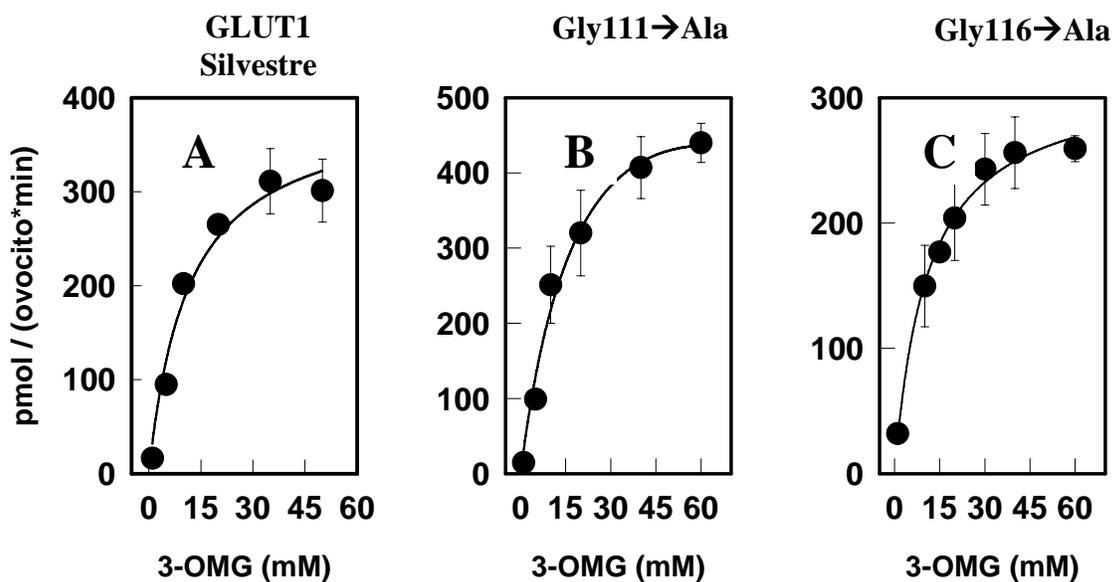
Se analizó entonces la capacidad funcional de las diferentes proteínas expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* para transportar 3-O-metilglucosa, en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio. Para lo cual, se utilizaron concentraciones de la hexosa desde 0 a 60 mM, salvo para el caso de GLUT1 silvestre, donde se utilizaron concentraciones hasta 50 mM. El transporte basal se midió usando ovocitos sin inyección y fue restado al transporte obtenido de los ovocitos inyectados. La figura 3 muestra que para la proteína silvestre y para cada una de las mutantes, el transporte de 3-O-metilglucosa fue saturable.

El ajuste de los datos a una curva de saturación hiperbólica permitió determinar los valores de  $K_m$  para el transporte. De esta forma, en condiciones de entrada, se determinó que la  $K_m$  para GLUT1 silvestre es de 11 mM (Figura 3A), para Gly111→Ala es de 20 mM (Figura 3B) y para Gly116→Ala la  $K_m$  es de 15 mM (Figura 3C).

Considerando además, que la expresión de cada una de las proteínas es similar, como lo demuestra el dot blot, se puede comparar la actividad de cada una de las mutantes con el transportador GLUT1 silvestre, demostrando que la mutante Gly111→Ala muestra un aumento de aproximadamente el doble en la actividad del transporte, lo cual no se ve reflejado en el caso de Gly116→Ala, la que muestra niveles muy similares al GLUT1



**Fig. 2:** Caracterización cinética de la captación de 3-O-metilglucosa 10 mM en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio a través del tiempo, en ovocitos de *Xenopus laevis* sobreexpresando GLUT1. Los ovocitos de *Xenopus laevis* en estado V-VI fueron microinyectados con 50 ng de RNA de GLUT1 y cultivados tres días antes de los experimentos de incorporación de 3-O-metilglucosa. (A) Se presenta la caracterización cinética para la proteína silvestre en condiciones trans-cero de entrada, mientras que en el panel (B) se presenta la caracterización cinética para la proteína silvestre en condiciones de intercambio en equilibrio. Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  la desviación estándar de determinaciones realizadas en triplicado.



**Fig. 3.** Curvas de saturación para la captación dosis dependiente de 3-O-metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada.  $K_m$  para el transporte de 3-O-metilglucosa en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con los siguientes mRNA: A. GLUT1 silvestre; B. mutante G111A; C. mutante G116A. Los ensayos fueron realizados luego de tres días de incubación. Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  la desviación estándar de determinaciones realizadas en triplicado.

silvestre. Los valores de los parámetros cinéticos se resumen en la Tabla 1.

Luego, en condiciones de intercambio en equilibrio, se determina la  $K_m$  después de 18 horas de incubación con diferentes concentraciones de 3-O-metilglucosa que van desde 0 a 60 mM, para cada una de las proteínas cuyo mRNA fue inyectada en ovocitos de *Xenopus laevis*. Para el caso del control positivo, es decir, GLUT1 silvestre, la  $K_m$  corresponde aproximadamente a 31 mM, la cual es muy similar a la obtenida por la mutante Gly111→Ala que da un valor de ~25 mM. Además, para el caso de la mutante Gly116→Ala en condiciones de intercambio en equilibrio, ésta aumenta aproximadamente a 45 mM (Tabla 1). Resultados similares, en cuanto a proporción, se obtienen para la  $V_{m\acute{a}x}$  del transporte para las diferentes mutantes medidas bajo condiciones de entrada y equilibrio (Tabla1).

#### **4.4. Efecto de los inhibidores tirosina quinasa**

Para los efectos de este estudio, seleccionamos quercetina como representante de las flavonas y tirfostina A47, como uno de los inhibidores de tirosina quinasa con especificidad por sitios de unión de tirosina (Levitzki y Gazit, 1995) (Figura 4). Con el fin de confirmar que el cambio de un aminoácido pueda afectar directamente la unión del sustrato al transportador, la captación de 3-O-metilglucosa es medida en presencia de quercetina y tirfostina A47. Se seleccionó tirfostina A47 por ser un inhibidor específico de los transportadores facilitativos de glucosa que se une por la cara interna del transportador (Vera *et al.*, 2001b). Así mismo, elegimos quercetina, la cual inhibe el transporte por unión con la cara externa del transportador GLUT1.

Condiciones de ensayo	WT		G111A		G116A	
	<i>K<sub>m</sub></i>	<i>V<sub>máx</sub></i>	<i>K<sub>m</sub></i>	<i>V<sub>máx</sub></i>	<i>K<sub>m</sub></i>	<i>V<sub>máx</sub></i>
trans-cero de entrada	11 ± 2	272 ± 22	20 ± 4	402 ± 23	15 ± 0,1	383 ± 46
intercambio en equilibrio	31 ± 3	669 ± 78	25 ± 4	495 ± 51	45 ± 6	575 ± 68

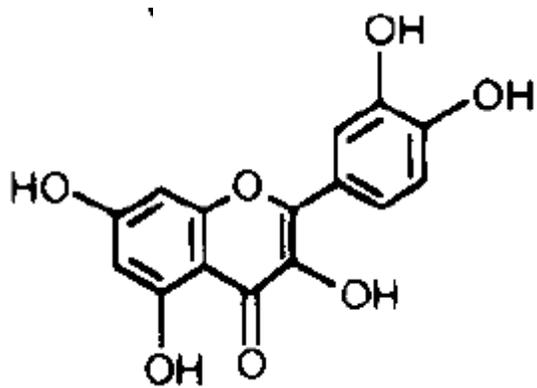
**Tabla 1:** Parámetros cinéticos para el transporte de 3-O-metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada y de intercambio en equilibrio para la proteína GLUT1 y sus **mutantes**: Se muestran los datos de *K<sub>m</sub>* obtenidos a partir de ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con sus respectivos mRNA e incubados por 3 días. Cada ensayo ha sido repetido 3 veces, usando conjuntos de ovocitos distintos.

Usamos además como control, citocalasina B, un inhibidor específico de la captación de azúcar, el cual se une por la cara endofacial del transportador (Basketter y Widdas 1978; Krupka y Devés 1978; Holman y Rees, 1987).

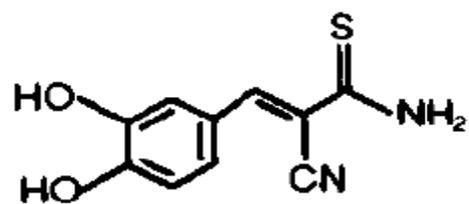
Ensayos de inhibición de 3-O-metilglucosa fueron realizados con tirfostina A47 en condiciones de entrada y de intercambio en equilibrio tanto para las mutantes como para el transportador silvestre (Figura 5). La concentración de 3-O-metilglucosa utilizada para realizar los ensayos de inhibición fue de 10 mM. En ambos tipos de ensayos, se incubó previamente por cinco minutos con el inhibidor, sin embargo, lo mismo se realizó sin incubación obteniéndose idénticos resultados. De esta forma, por comodidad, adoptamos realizar los ensayos sin incubación.

En condiciones trans-cero de entrada se usaron concentraciones del inhibidor que van entre 0 a 200  $\mu\text{M}$ . Los ensayos mostraron que el transporte de 3-O-metilglucosa es inhibido al menos en un 75% (Figura 5A), con una  $K_i(\text{app})$  para GLUT1 nativo de 157  $\mu\text{M}$ , Gly111 $\rightarrow$ Ala de 189  $\mu\text{M}$  y para Gly116 $\rightarrow$ Ala de 117  $\mu\text{M}$  (Tabla 2).

En condiciones de intercambio en equilibrio, se midió la inhibición del transporte de 3-O-metilglucosa determinándose que la sensibilidad del transportador frente a tirfostina A47 se mantiene (Figura 5B). Para el caso de Gly111 $\rightarrow$ Ala, la inhibición del transporte alcanza aproximadamente un 90%, manteniéndose por otra parte el 75% de inhibición para GLUT1 silvestre y Gly116 $\rightarrow$ Ala determinado en condiciones de entrada (Figura 5B). Para estos ensayos se usaron concentraciones del inhibidor que van de 0 a 300  $\mu\text{M}$  y la  $K_i$  (app) obtenida para GLUT1 silvestre es de 212  $\mu\text{M}$ , para Gly111 $\rightarrow$ Ala corresponde a una  $K_i(\text{app})$  de 114

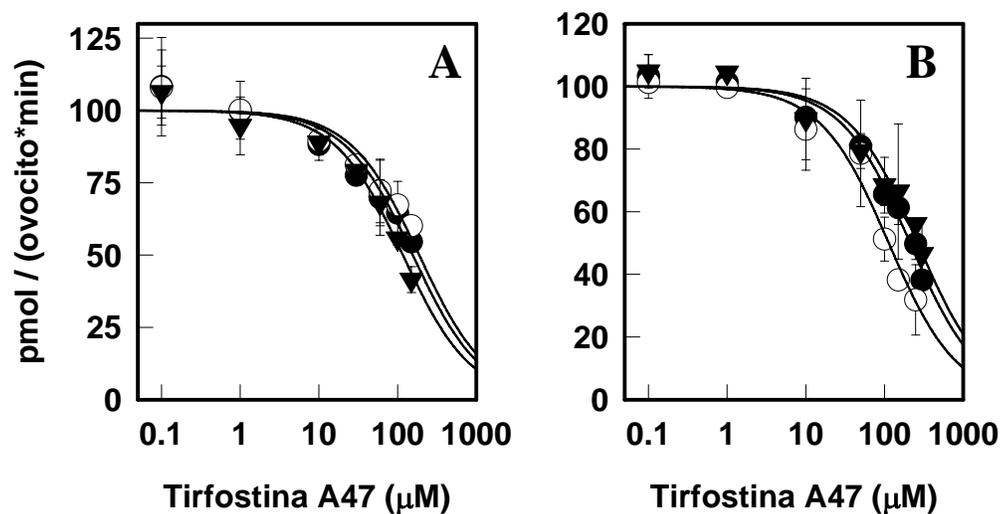


Quercetina



Tirfostina A47

**Fig. 4.** Estructuras de los inhibidores de tirosina quinasa empleados en este estudio.



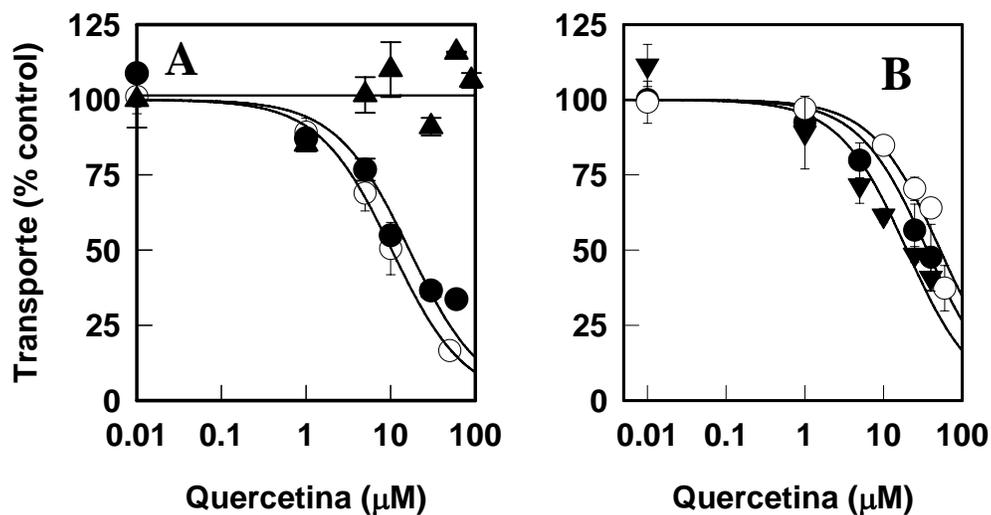
**Fig.5:** Curva de inhibición del transporte de 3-O-metilglucosa con tirfostina A47. A: en condiciones de entrada; B: en condiciones de equilibrio. (○: GLUT1WT; ●:Gly111→Ala; ▲:Gly116→Ala). Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  la desviación estándar de determinaciones realizadas en triplicado.

$\mu\text{M}$  y para Gly116→Ala es de 264  $\mu\text{M}$  (Tabla 3).

Buscando un inhibidor que se una por la cara externa se estudió el efecto de quercetina en condiciones trans-cero de entrada realizando ensayos de inhibición del transporte de 3-O-metilglucosa (Figura 6). Las concentraciones usadas por el inhibidor van de 0 a 60  $\mu\text{M}$  determinando aproximadamente un 85% de inhibición tanto para el caso de GLUT1 silvestre como para la mutante G111A (Figura 6A). Para el transportador nativo la  $K_i(\text{app})$  es de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  y para Gly111→Ala de 17  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, para el caso de la mutación Gly116→Ala se pierde la sensibilidad del transportador frente a quercetina; incluso se probaron concentraciones de quercetina hasta 90  $\mu\text{M}$ , sin obtener resultados en la disminución del transporte de 3-O-metilglucosa (Tabla 3). Concentraciones superiores del inhibidor no se pueden usar ya que quercetina comienza a precipitar, lo cual hace técnicamente imposible evaluar su efecto.

En el caso de la inhibición de 3-O-metilglucosa en condiciones de intercambio en equilibrio, quercetina (Figura 6B) actúa inhibiendo al transportador silvestre y a cada una de sus mutantes. Se usaron concentraciones del inhibidor desde 0  $\mu\text{M}$  a 60  $\mu\text{M}$ . De esta forma, para el caso de GLUT1 nativo se logró una inhibición de aproximadamente un 65%, mientras que para G111A y G116A se obtuvo una inhibición de alrededor de 75 y 80% respectivamente al usar la máxima concentración del inhibidor.

La  $K_i(\text{app})$  entregada para GLUT1 silvestre es de 36  $\mu\text{M}$ , para Gly111→Ala es de 53  $\mu\text{M}$  (Tabla 3), disminuyendo en este caso la afinidad del transportador frente al inhibidor y por lo tanto, el efecto inhibitorio del transporte de 3-O-metilglucosa es menor. Además, para el caso de Gly116→Ala, es de 20  $\mu\text{M}$  (Tabla 3), generándose un efecto inhibitorio incluso más fuerte que el ejercido por GLUT1 silvestre.



**Fig. 6:** Curva de inhibición del transporte de 3-O-metilglucosa con quercetina.

En condiciones de entrada (A) y de intercambio en equilibrio (B) para GLUT1 silvestre y sus mutantes (○: GLUT1WT; ●:Gly111→Ala; ▲:Gly116→Ala). Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  la desviación estándar de determinaciones realizadas en triplicado.

Finalmente, a modo de control, se utilizó citocalasina B, en ambos tipos de condiciones. En trans-cero de entrada se usaron concentraciones del alcaloide que iban de 0,001  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ . Se generó una inhibición de un 100% con la concentración mayor que correspondía a 1  $\mu\text{M}$ , tanto para GLUT1 nativo, como para Gly111 $\rightarrow$ Ala y Gly116 $\rightarrow$ Ala (Figura 7A). Además, para GLUT1 silvestre, así como para Gly111 $\rightarrow$ Ala, las  $K_i(\text{app})$  son muy similares, 0,25  $\mu\text{M}$  para la primera y 0,24  $\mu\text{M}$  para la segunda, mientras para el caso de la mutante Gly116 $\rightarrow$ Ala, la afinidad del transportador por el inhibidor aumenta ligeramente, obteniendo una  $K_i(\text{app})$  de 0,11  $\mu\text{M}$ . Los datos del efecto de citocalasina B en el transporte de 3-O-metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada, por GLUT1 silvestre y por proteínas GLUT1 mutantes expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis*, son corroborados por Liu (Liu *et al.*, 2001). Sin embargo, en este trabajo previo se establece que Gly116 $\rightarrow$ Ala se expresa en la membrana del ovocito pero no presenta actividad funcional, por lo que no se realizan los correspondientes ensayos, como determinar la  $K_m$  o para obtener la  $K_i(\text{app})$  con inhibidores como citocalasina B. En esta tesis, sin embargo, se demostró fehacientemente que además que el transportador mutado se expresa adecuadamente en la membrana de los ovocitos inyectados con el respectivo mRNA, también presenta una actividad funcional relativamente similar a GLUT1 silvestre, salvo para el caso de la inhibición con quercetina en condiciones de entrada, donde el transportador pierde sensibilidad frente al inhibidor.

En condiciones de intercambio en equilibrio las  $K_i(\text{app})$  para los tres casos, es decir, tanto para el transportador silvestre como para ambas mutantes, son muy similares. Se usaron concentraciones del inhibidor que iba desde 0,001  $\mu\text{M}$  a 10 $\mu\text{M}$ . De esta forma, tenemos que para GLUT1 silvestre la  $K_i(\text{app})$  es de 2,1  $\mu\text{M}$ , para Gly111 $\rightarrow$ Ala es de 2,3  $\mu\text{M}$  y para

<b><math>K_i</math> (<math>\mu\text{M}</math>) Trans-cero de Entrada</b>	<b>Quercetina</b>	<b>Tirfostina A47</b>	<b>Citocalasina B</b>
<b>WT</b>	<b><math>10 \pm 1</math></b>	<b><math>157 \pm 30</math></b>	<b><math>0,3 \pm 0,05</math></b>
<b>G111A</b>	<b><math>17 \pm 4</math></b>	<b><math>189 \pm 34</math></b>	<b><math>0,2 \pm 0,06</math></b>
<b>G116A</b>	<b><math>&gt;&gt; 100</math></b>	<b><math>117 \pm 25</math></b>	<b><math>0,1 \pm 0,001</math></b>

**Tabla 2:**  $K_i$  (app) para el transporte de 3-O-metilglucosa en condiciones de entrada para la proteína GLUT1 y sus mutantes: Se muestran los datos de  $K_i$  (app) obtenidos a partir de ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados e incubados por 3 días. Cada ensayo ha sido repetido 3 veces, con grupos de ovocitos distintos.

Gly116→Ala, es de 2,2  $\mu\text{M}$ , estos datos se encuentran resumidos en la Tabla 3. En los tres casos además, se obtiene aproximadamente hasta un 90% de inhibición a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  (Figura 7B).

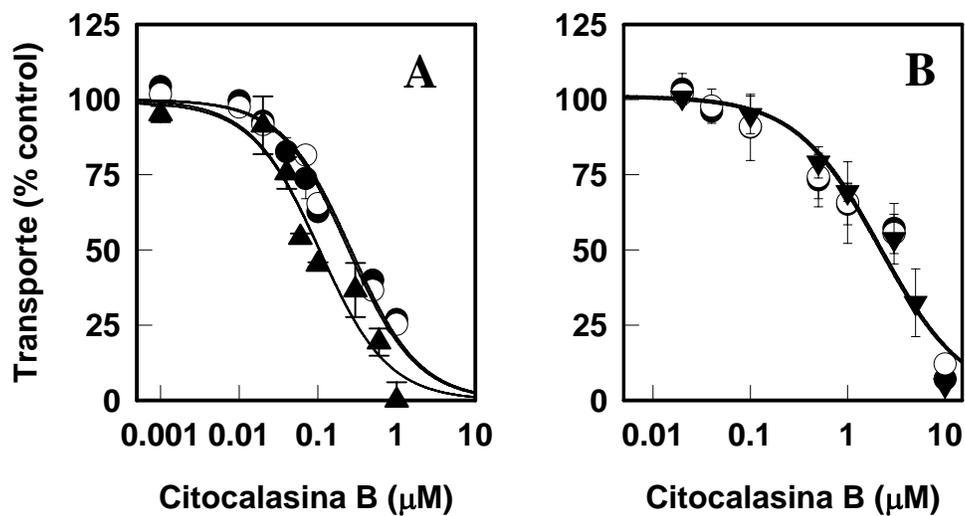
#### **4.5. Ensayos de competencia en condiciones trans-cero de entrada.**

Los diversos modos de inhibición reversible implican todos ellos la unión no covalente de un inhibidor al transportador, pero difieren en los mecanismos por medio de los cuales reducen la actividad transportadora y en la forma en que afectan la cinética de reacción. Por este motivo se describen diferentes formas en que los inhibidores actúan frente a los transportadores. En el caso de la inhibición competitiva, tanto el inhibidor como el sustrato compiten por unirse al transportador en el mismo sitio de manera que no se pueden unir a la vez. También la inhibición puede ser del tipo incompetitiva, donde la unión del inhibidor genera un complejo transportador-sustrato inactivo. El inhibidor, no se une al transportador libre, tampoco lo hace al sitio de unión al sustrato, sino a otro sitio, lo que hace que cambie la conformación y el transportador no sea proclive a catalizar transporte. Los inhibidores además, pueden presentar un tipo de inhibición mixta la cual es una inhibición intermedia entre incompetitiva y competitiva. El inhibidor (que no tiene por qué parecerse al sustrato) no se une al sitio de unión del sustrato aunque funcionalmente se comporta como inhibidor competitivo. La unión de uno y otro no son excluyentes. El resultado final depende de cual de los dos efectos (competitivo o incompetitivo) prevalezca.

Finalmente puede ser del tipo no competitivo. Esto se produce cuando una molécula puede unirse a un segundo lugar de unión presente en el transportador, distinto del sitio de unión del sustrato, inhibiendo el transporte pero sin afectar la afinidad del

<b><math>K_i</math> (<math>\mu\text{M}</math>) Intercambio en Equilibrio</b>	<b>Quercetina</b>	<b>Tirfostina A47</b>	<b>Citocalasina B</b>
<b>WT</b>	<b><math>36 \pm 2</math></b>	<b><math>212 \pm 11</math></b>	<b><math>2,1 \pm 0,2</math></b>
<b>G111A</b>	<b><math>53 \pm 5</math></b>	<b><math>114 \pm 11</math></b>	<b><math>2,3 \pm 0,2</math></b>
<b>G116A</b>	<b><math>20 \pm 3</math></b>	<b><math>264 \pm 47</math></b>	<b><math>2,2 \pm 0,4</math></b>

**Tabla 3:**  $K_i$  (app) para el transporte de 3-O-metilglucosa en condiciones de intercambio en equilibrio para la proteína GLUT1 y sus mutantes: Se muestran los datos de  $K_i$  (app) obtenidos a partir de ovocitos de *Xenopus* inyectados e incubados por 3 días. Cada ensayo ha sido repetido 3 veces, con grupos de ovocitos distintos.



**Fig.7: Curva de inhibición del transporte de 3-O-metilglucosa con citocalasina B.**

En condiciones trans cero de entrada (A) y de intercambio en equilibrio (B) para GLUT1 silvestre y sus mutantes. (○: GLUT1WT; ●:Gly111→Ala; ▲:Gly116→Ala). Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  la desviación estándar de determinaciones realizadas en triplicado.

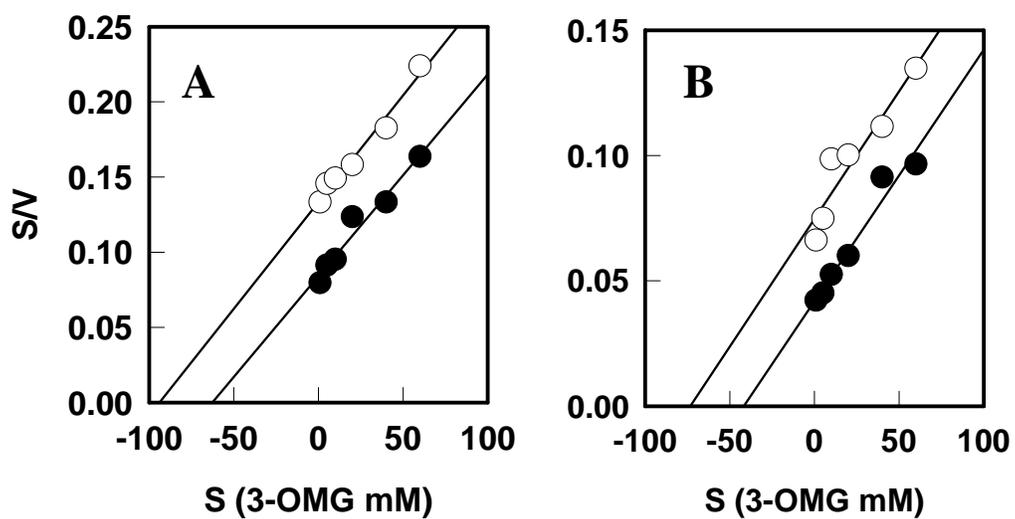
transportador por el sustrato.

Para dilucidar de que forma actúan nuestros inhibidores frente a GLUT1 silvestre y las mutantes Gly111→Ala y Gly116→Ala, se realizaron ensayos en condiciones de entrada trans-cero y en condiciones de intercambio en equilibrio utilizando concentraciones fijas variables del inhibidor, usando una concentración cero y otra cercana al  $K_i$  de cada uno de ellos sobre curvas de saturación para 3-O-metilglucosa. Los datos se expresan en un gráfico de Hanes-Woolf. Cada ensayo se realizó 3 veces con distintas preparaciones de ovocitos, usando en cada determinación 3 ovocitos. Los ensayos se realizaron sin incubación de los ovocitos con el inhibidor, puesto que se realizó un control para cada ensayo, tanto en condiciones de entrada como de equilibrio, donde se incubaron los ovocitos por 5 minutos con los respectivos inhibidores y los resultados obtenidos fueron idénticos en ambas condiciones.

Para el caso de quercetina, en condiciones de entrada trans-cero (Figura 8) se usaron 0 y 10  $\mu\text{M}$  del inhibidor, además de concentraciones variables del sustrato, 3-O-metilglucosa, que van de 1 a 60 mM. El ensayo se realizó sólo para el caso de GLUT1 silvestre y para la mutante Gly111→Ala, ya que para Gly116→Ala, se pierde la sensibilidad del transportador frente a quercetina bajo estas condiciones, por lo tanto, no se produjo inhibición.

El conjunto de rectas paralelas para la proteína silvestre y Gly111→Ala sugiere que la inhibición generada en ambos casos, es del tipo competitivo. Por tanto, este inhibidor presenta la característica que se une por la cara externa del transportador. Es viable concluir entonces que en ambas proteínas quercetina competiría por el sitio externo de unión al sustrato del transportador.

Por su parte, se ha determinado que tirfostina A47 se une al transportador por la cara interna (Vera *et al.*, 2001).

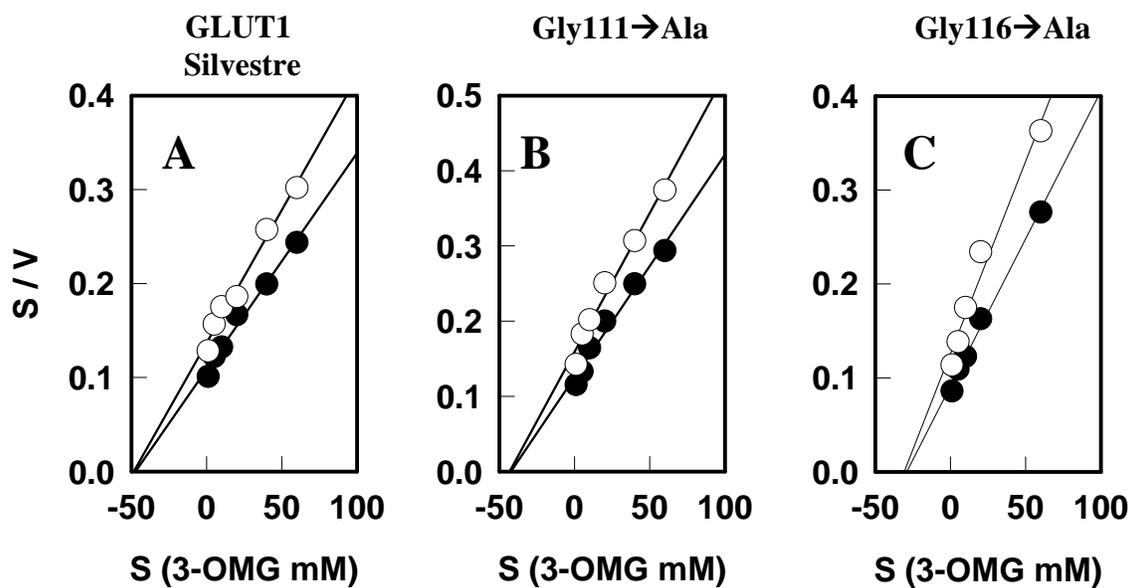


**Fig. 8:** Ensayo de competencia en condiciones de entrada con quercetina.

Para GLUT1 silvestre (A) y G111A (B), con quercetina, 0  $\mu\text{M}$  (●) y 10  $\mu\text{M}$  (○), además de concentraciones de 3-O-metilglucosa que van de cero a 60 mM. Los datos son expresados en un gráfico de Hanes-Woolf.

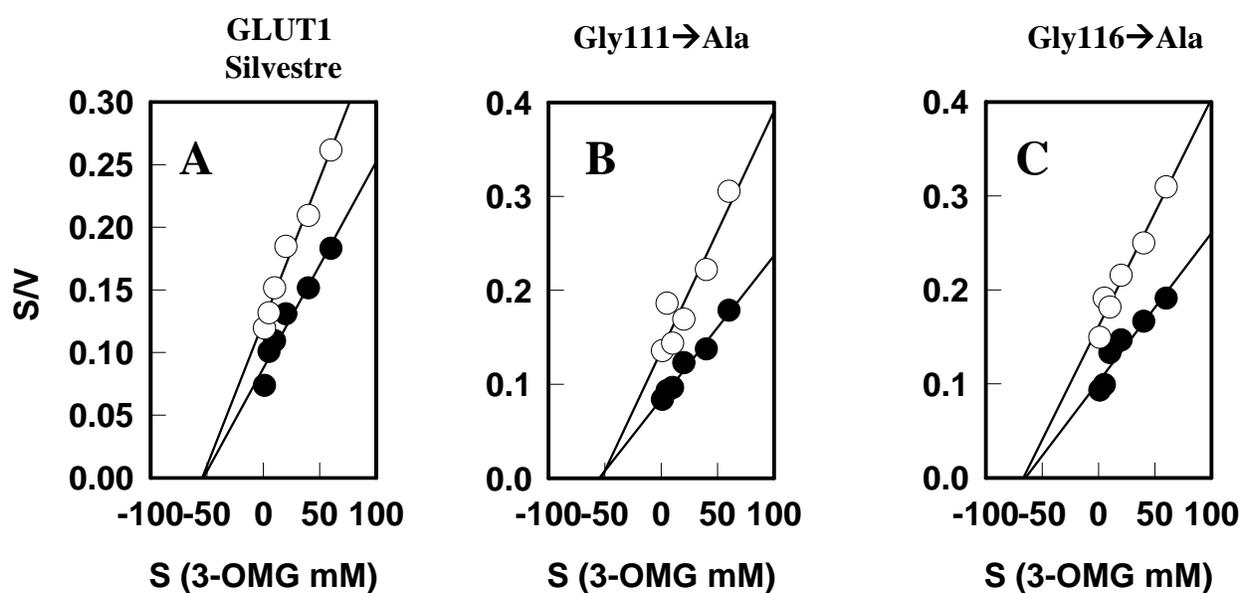
Para comprobar el modo de inhibición resultante con la proteína silvestre y las mutantes, se realizó el respectivo ensayo utilizando una concentración de 0 y 100 $\mu$ M de tirfostina A47, esta última concentración es cercana a la constante de inhibición que presenta el inhibidor (~150  $\mu$ M) y además concentraciones variables de 3-O-metilglucosa desde 0 mM a 60 mM (Figura 9). El carácter de la inhibición producida con GLUT1 silvestre y mutante fue del tipo no competitivo. Esto se verifica al determinar que ambas rectas se interceptan en el eje horizontal. Este resultado era esperado pues, al unirse tirfostina A47 por la cara interna del transportador, no competiría con la 3-O-metilglucosa por el sitio de unión al sustrato.

A modo de control, se realizaron ensayos en condiciones trans-cero de entrada con concentraciones fijas de 0 y 0,2  $\mu$ M de citocalasina B. Widdas y colaboradores (Baker y Widdas, 1973a, 1973b; Baker *et al.*, 1978; Basketter y Widdas, 1978; Aubby y Widdas, 1980) concluyeron que la unión de citocalasina B a la cara interna del transportador provoca que éste actúe como un inhibidor competitivo de la salida del azúcar en condiciones de trans-cero de salida y como un inhibidor no competitivo de la entrada del azúcar. Nuestros resultados confirman los datos previos. Este control corrobora que en condiciones de entrada, citocalasina B se comporta como un inhibidor no competitivo para la entrada de 3-O-metilglucosa a GLUT1 silvestre (Figura 10). Esto se determina debido al entrecruzamiento de las rectas de cada concentración fija del inhibidor, en el eje horizontal de la gráfica de Hanes-Woolf. Este tipo de inhibición, también se vio para las mutantes (Figura 10). En ambos ensayos con las mutantes se repiten las mismas concentraciones y condiciones usadas con la proteína silvestre.



**Fig. 9.** Ensayo de competencia en condiciones de entrada con tirifostina A47.

GLUT1 silvestre (A) y G111A (B) y G116A (C), con tirifostina A47, 0  $\mu\text{M}$  (●) y 100  $\mu\text{M}$  (○), además de concentraciones de 3-O-metilglucosa que van de cero a 60 mM. Los datos son expresados en un gráfico de Hanes-Woolf.



**Fig. 10:** Ensayo de competencia en condiciones de entrada con citocalasina B.

Para GLUT1 silvestre (A) y G111A (B) y G116A (C), con citocalasina B, 0  $\mu\text{M}$  (●) y 0,2  $\mu\text{M}$  (○), además de concentraciones de 3-O-metilglucosa que van de cero a 60 mM. Los datos son expresados en un gráfico de Hanes-Woolf.

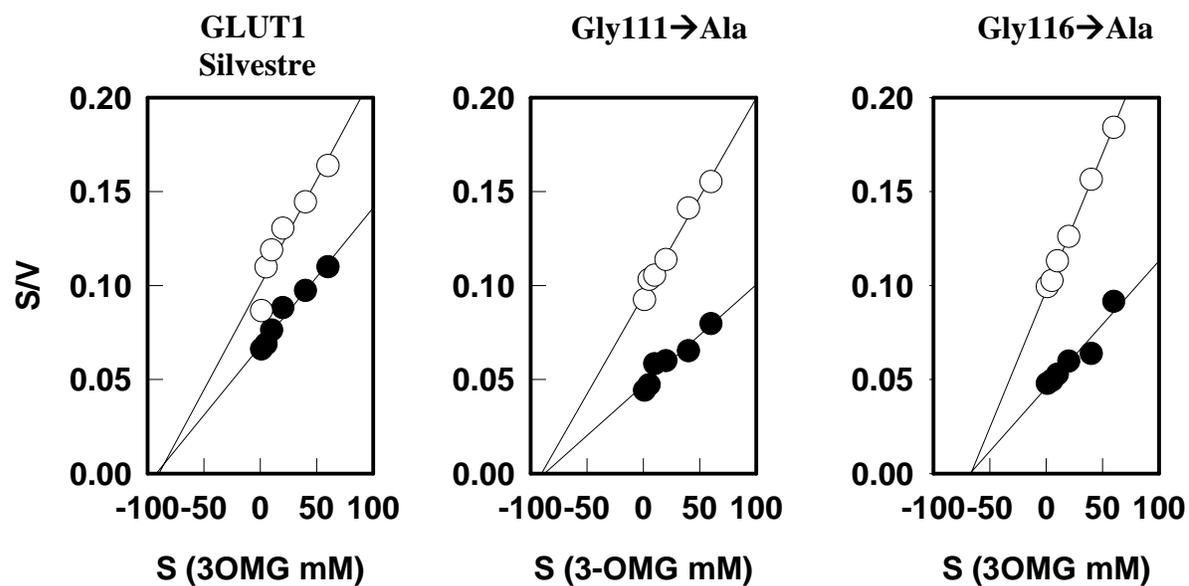
#### 4.6. Ensayos de competencia en condiciones de intercambio en equilibrio

Se estudió el comportamiento de quercetina y tirfostina A47 en condiciones de intercambio en equilibrio. Para esto, los ovocitos fueron incubados toda la noche previa con diferentes concentraciones de 3-O-metilglucosa en el intervalo de 1 a 60 mM. Se incubaron tres ovocitos por ensayo y cada ensayo se realizó en triplicado. Pasadas aproximadamente 18 horas de incubación, se agregan los inhibidores a sus respectivas concentraciones, de las cuales una siempre fue 0  $\mu\text{M}$  y otra cercana a la  $K_i$  obtenida en condiciones de intercambio en equilibrio, determinadas en estudios preliminares.

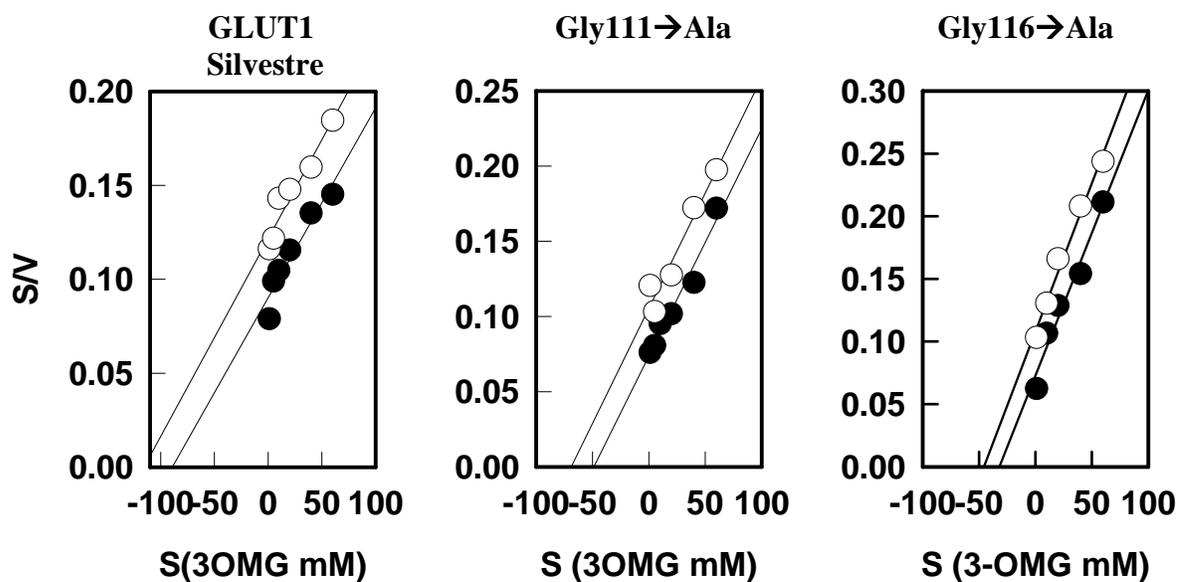
Con quercetina se usaron concentraciones de 0 y 20  $\mu\text{M}$ . Para la mutante G111A (que presenta una  $K_i$  en condiciones de intercambio en equilibrio de 52,8  $\mu\text{M}$ ), se realizó además un ensayo con una concentración de 40  $\mu\text{M}$ , sin embargo, el resultado obtenido fue idéntico, ya sea, usando la concentración de 20  $\mu\text{M}$  como la de 40  $\mu\text{M}$ . De esta forma, por simplicidad, se muestran el transportador silvestre y ambas mutantes usando la misma concentración.

De esta forma, se determinó, según lo expresado en la gráfica de Hanes-Woolf, que la inhibición por quercetina, es del tipo no competitivo (Figura 11). Este mismo ensayo se realizó con las mutantes. Los resultados obtenidos con cada una de ellas, se asemeja a lo obtenido con el transportador silvestre; en ambas ocasiones se determinó que el inhibidor actuó de una forma no competitiva frente al transporte de 3-O-metilglucosa en condiciones de equilibrio.

Por otra parte, tirfostina A47 en las mismas condiciones de intercambio en equilibrio, actuó de manera competitiva frente a la unión de 3-O-metilglucosa. Además, este mismo comportamiento se repitió para cada una de las mutantes (Figura 12). Las concentraciones usadas para este ensayo fueron 0 y 200  $\mu\text{M}$ . Al igual que para el caso de Gly111 $\rightarrow$ Ala con quercetina, donde se realizó un ensayo adicional para comprobar que la forma de inhibición era



**Fig. 11:** Ensayo de competencia en condiciones de intercambio en equilibrio con quercetina. Para GLUT1 silvestre (A) y G111A (B) y G116A (C) con quercetina, 0  $\mu\text{M}$  (●) y 20  $\mu\text{M}$  (○), además de concentraciones de 3-O-metilglucosa que van de cero a 60 mM. Los datos son expresados en un gráfico de Hanes-Woolf.

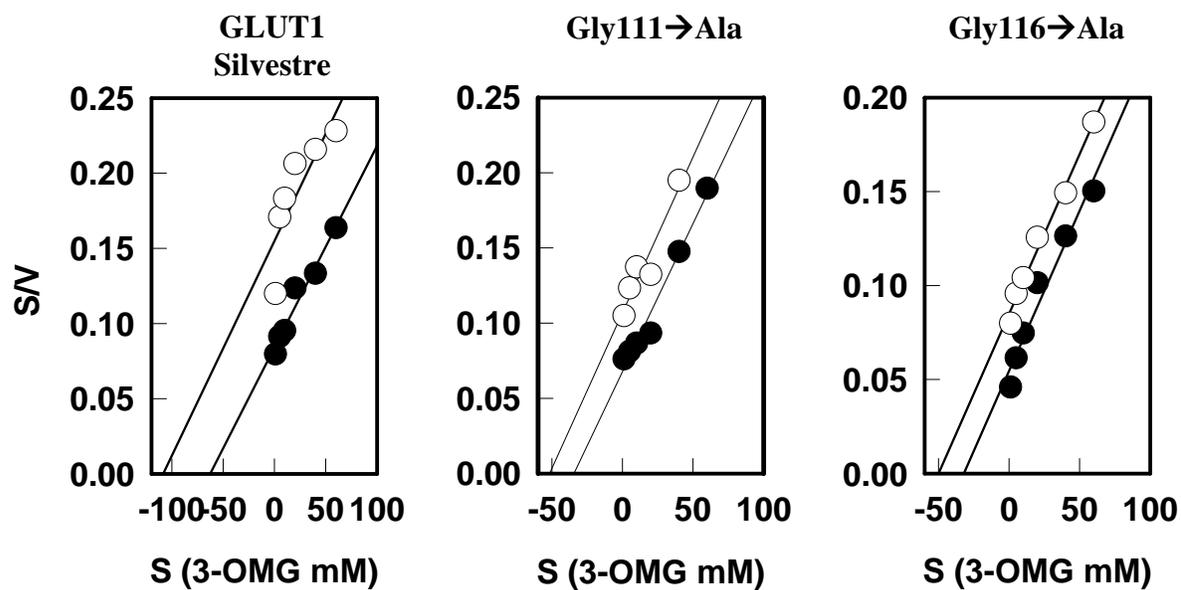


**Fig. 12:** Ensayo de competencia en condiciones de intercambio en equilibrio con **tirfostina A47**. Para GLUT1 silvestre (A) y G111A (B) y G116A (C) con tirfostina A47, 0  $\mu\text{M}$  (●) y 200  $\mu\text{M}$  (○), además de concentraciones de 3-O-metilglucosa que van de cero a 60 mM. Los datos son expresados en un gráfico de Hanes-Woolf.

idéntica a diferentes concentraciones, para la mutante Gly111→Ala también se realizó otro ensayo donde se usó una concentración de 100  $\mu\text{M}$  puesto que su  $K_i$  en condiciones de intercambio en equilibrio es de 113  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, no se advierten diferencias en su forma de inhibición, por lo que se optó por mostrar en las figuras, las mismas concentraciones para la proteína silvestre y sus mutantes.

Como un control adicional se trabajó con citocalasina B, bajo las mismas condiciones de intercambio en equilibrio (Figura 13). Los resultados del carácter de la inhibición fueron los esperados, vale decir, el inhibidor actuó de manera competitiva frente a la hexosa. Las concentraciones usadas para el caso de citocalasina B, fueron de 0 y 2  $\mu\text{M}$  y las concentraciones de azúcar usadas iban desde 1 a 60 mM.

Cada uno de los comportamientos de los diferentes inhibidores, tanto en condiciones trans-cero de entrada como de intercambio en equilibrio, se encuentran resumidas en la Tabla 4.



**Fig.13:** Ensayo de competencia en condiciones de intercambio en equilibrio con citocalasina B. Para GLUT1 silvestre (A) y G111A (B) y G116A (C), con citocalasina B, 0  $\mu\text{M}$  (●) y 2  $\mu\text{M}$  (○), además de concentraciones de 3-O-metilglucosa que van de cero a 60 mM. . Los datos son expresados en un gráfico de Hanes-Woolf.

Inhibidor	Condiciones de Transporte	
	Trans-cero de entrada	Intercambio en equilibrio
Quercetina	Competitiva	No competitiva
Tirfostina A47	No competitiva	Competitiva
Citocalasina B	No competitiva	Competitiva

**Tabla 4:** Resumen de la forma de inhibición de cada inhibidor. Esto se establece mediante condiciones trans- cero de entrada y de intercambio en equilibrio frente al transportador de glucosa silvestre, GLUT1 y las mutantes Gly111→Ala y Gly116→Ala, usando concentraciones variantes de sustrato 3-O-metilglucosa que va en el rango de 0  $\mu$ M y 60  $\mu$ M.

## 5. DISCUSIÓN

El análisis de la función de una proteína se puede realizar en base a alteraciones de estructura, para posteriormente determinar si se han modificado sus funciones biológicas y de qué manera. Esto es precisamente lo que hemos realizado con el transportador de hexosas, GLUT1. Esta proteína transmembrana, presenta tres segmentos aminoacídicos cortos con homología a sitios de unión a nucleótidos. En este trabajo, nos hemos enfocado en el dominio I, compuesto por los residuos 111-118 (Gly-Phe-Ser-Lys-Leu-Gly-Lys-Ser) el cual se ubica en la cara exofacial del transportador. Además, se encuentra formado por parte del tercer dominio transmembrana y por parte del asa extracelular que une los dominios transmembrana 3 y 4. De esta forma, decidimos mutar dos aminoácidos altamente conservados de este dominio, los cuales correspondieron a Gly111 y Gly116, ambos aminoácidos fueron cambiados por una alanina. Se realizaron cambios sutiles con el fin de evitar alteraciones por causa de cambios conformacionales generados por diferencias de cargas o de tamaño por otros posibles cambios que pudiéramos haber elegido. Por medio de los Western blot, y Dot blot podemos determinar que luego de inyectar los ovocitos con su respectivo mRNA, cada una de las proteínas se expresan en las membranas de los ovocitos. Por lo tanto, nuestro primer resultado importante fue que ambas mutantes y el transportador silvestre se expresaban en membranas de ovocitos y eran además, funcionales. Como veremos más adelante, éste último punto en particular, no era un dato trivial.

Con respecto a los parámetros cinéticos, tanto para el transportador silvestre como para cada una de las mutantes, se miden en función del paso limitante del ciclo de transporte total, el cual, en condiciones de trans-cero de entrada es el paso de relajación (regeneración de sitios de

unión al sustrato) y en condiciones de intercambio en equilibrio corresponde al paso de translocación, vale decir, importación y exportación del azúcar. Por este motivo, es probable que la introducción de mutaciones en el dominio I con homología a sitios de unión a nucleótidos, genere alteraciones en la capacidad del transportador para experimentar rearrreglos en sus propiedades conformacionales, los que se muestran en el progreso de cada ciclo de transporte, generando cambios en la afinidad por determinados compuestos (azúcar o inhibidores) y/o en las cinéticas de transporte.

### **5.1. Propiedades generales del transportador silvestre, GLUT1.**

Al comparar los datos obtenidos en ovocitos, con estudios previos realizados en nuestro laboratorio utilizando eritrocitos como modelo de trabajo, podemos determinar que los parámetros cinéticos son absolutamente reproducibles. Referente al tiempo de transporte del sustrato, 3-O-metilglucosa, la fase de incremento es lineal por un periodo mucho más breve en eritrocitos humanos que para el caso de los ovocitos, lo cual es lógico si pensamos que el volumen del eritrocito es mucho menor que el volumen del ovocito y por este motivo el sustrato se equilibrará mucho más rápido. Además, también en el caso de las  $K_m$  determinadas tanto en condiciones trans-cero de entrada como de intercambio en equilibrio los resultados obtenidos son levemente más bajos. Es decir, el transportador presentaría una afinidad ligeramente mayor hacia 3-O-metilglucosa en eritrocitos que en ovocitos. Por ejemplo, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio se obtuvo que en condiciones trans-cero de entrada, la  $K_m$  para 3-O-metilglucosa en eritrocitos fluctuaba entre 2-3 mM a temperatura ambiente (Saldivia, 2003) y en el caso de ovocito obtuvimos una  $K_m$  de ~ 11mM a igual temperatura. De igual forma en equilibrio, se manifiesta que en eritrocitos, el transportador presenta una mayor afinidad por el azúcar. Por otro lado, podemos agregar, que

nuestros valores obtenidos en condiciones trans-cero de entrada en ovocitos inyectados con el mRNA de GLUT1 silvestre han sido confirmados por estudios realizados previamente (Due *et. al.*, 1995 y Liu *et al.*, 2001b ). Sin embargo, en condiciones de intercambio en equilibrio, al igual que para el caso de  $V_{m\acute{a}x}$ , se ha descrito que la  $K_m$  aumenta considerablemente de 4 a 7 veces con respecto a la  $K_m$  en condiciones trans-cero de entrada, mientras que nuestros resultados muestran que el aumento no supera las 2 veces. Nuestra experiencia nos indica, no obstante, que un aumento tan drástico sólo podría ser “casual”, vale decir, que no implica necesariamente a la mayoría de los grupos de ovocitos.

Además de unir glucosa o análogos de la misma, se sabe que GLUT1 une moléculas que no tienen relación estructural con el sustrato como es el caso de todos los inhibidores que fueron usados en este trabajo y muchos otros. Así, se estudió el efecto inhibitorio de quercetina, una flavona que compite por el sitio de unión a ATP, de tirfostina A47, un inhibidor de tirosina quinasa y como control empleamos citocalasina B, un alcaloide procedente de hongo, puesto que estudios cinéticos previos establecieron que actúa como un inhibidor competitivo de la salida de glucosa del eritrocito (Basketter y Widdas, 1978; Deves y Krupka, 1978), por lo tanto, es de esperar que en condiciones de entrada actuaría como un inhibidor no competitivo. De esta forma, al comparar el efecto inhibitorio de citocalasina B ocasionado en eritrocitos frente al generado en ovocitos, podemos concluir que no difieren en lo medular, lo que sugiere que en ambos modelos de trabajo, el inhibidor se une por un sitio interno del transportador. Además, las  $K_i$  (app) obtenidas en ambos modelos, no varían mayormente. Respecto de este punto, podemos analizar los datos obtenidos por Liu (Liu *et al.*, 2001) y nos damos cuenta que las  $K_i$  obtenidas en ambos casos son muy similares, lo que nuevamente corrobora nuestros resultados.

En nuestro grupo, poseíamos estudios previos que señalaban que en eritrocitos, quercetina actuaba como un inhibidor competitivo en condiciones trans-cero de entrada (Andrade, 2001; Llévanes, 2000; Saldivia, 2003 y Vera *et al.*, 2001a), por lo que se postuló en ese entonces, que este compuesto podría ligarse a un sitio conformado por residuos que contengan el putativo dominio I de unión a nucleótidos. De esta forma, al realizar los ensayos correspondientes en ovocitos, determinamos que no existía variación alguna entre los datos obtenidos en eritrocitos con los obtenidos en ovocitos, a lo que se sumaba además que en condiciones de intercambio en equilibrio el inhibidor actuaba de forma no competitiva, por lo que pudimos establecer que verdaderamente este inhibidor podría unirse por la cara exofacial del transportador y probablemente en el primer dominio. Pensando en esto se generaron dos mutantes en este dominio, las que pasaremos a revisar posteriormente.

Al contrario de quercetina, se tenía antecedentes que tirfostina A47 (Vera *et al.*, 2001a y Monsalve, 2001) actuaba como inhibidor no competitivo en condiciones trans-cero de entrada. Así, este dato fue ratificado en este trabajo al comprobar que tirfostina A47 se uniría por la cara endofacial del transportador y además que en condiciones de intercambio en equilibrio, este inhibidor actuaría de forma competitiva.

También cabe agregar, que tanto para el caso de quercetina como de tirfostina A47, las  $K_i(\text{app})$  obtenidas en los ensayos con ovocitos, son muy similares a las obtenidas en eritrocitos.

## **5.2. Propiedades generales de las mutantes Gly111→Ala y Gly116→Ala.**

Con el fin de determinar el grado de importancia que presentan los residuos aminoacídicos en los dominios de unión a nucleótidos presentes en el transportador, generamos en el dominio I, dos mutantes que corresponden a los aminoácidos Gly111 y

Gly116. En ambos casos, se procedió a reemplazar una glicina por alanina. Estas mutaciones habían sido generadas con anterioridad (Liu *et al.*, 2001b), sin embargo los resultados obtenidos en esta publicación solamente mostraban valores cinéticos y valores de  $K_i$  determinadas sólo con citocalasina B. Entonces a los argumentos antes mencionados, se suma que además, quisimos tener una forma de validar nuestros resultados.

### **5.2.1. Análisis de la proteína transportadora mutada Gly111→Ala**

Los parámetros cinéticos obtenidos con esta mutante, son muy similares a los obtenidos con el transportador nativo, tanto para el caso de las  $K_m$  como para el caso de las  $V_{máx}$ ; de esta forma, se puede concluir que no existen mayores variaciones con respecto al transporte del sustrato, al generar el cambio de una glicina por una alanina en esta posición. Este dato también es concordante con lo informado por Liu *et al* (2001).

Luego, al analizar los valores de  $K_i(\text{app})$  para cada uno de los inhibidores, podemos comprobar que no existen diferencias significativas si los comparamos con los datos obtenidos en ovocitos que expresan el transportador silvestre, con lo que podemos concluir que, o bien, la mutación generada no es lo suficientemente drástica como para generar algún cambio en la afinidad de los inhibidores trabajados frente a sus sitios de unión en la proteína, o bien, para ninguna de las moléculas inhibidoras, G111 es un aminoácido importante en su sitio de unión. Referente a esto, teníamos antecedentes que tirfostina actuaría, probablemente en el dominio II o III, mientras que citocalasina B lo haría entre los segmentos transmembrana 10 y 11 por lo tanto, no estarían vinculados con el dominio I del transportador. Sin embargo, sospechábamos que el cambio en el aminoácido G111 podría haber provocado alguna modificación en la  $K_i$  respectiva, pero, esto no fue así.

Por otra parte, estudiamos si la mutación interfería de alguna forma con el modo de inhibición de cada inhibidor y el resultado fue negativo. Cada inhibidor actuaba de igual manera en ovocitos inyectados con la mutante Gly111→Ala como en los inyectados con el transportador silvestre, tanto en condiciones trans-cero de entrada como de intercambio en equilibrio.

### **5.2.2. Análisis de la proteína transportadora mutada, Gly116→Ala**

Al comparar los datos cinéticos en ovocitos inyectados con la proteína mutada (G116A) y aquellos inyectados con la proteína silvestre, podemos concluir que no existen diferencias significativas entre ellos, que permitan postular que la mutación hubiera generado algún tipo de cambio favorable o desfavorable para la captación del azúcar. Sin embargo, este dato se contrapone con los obtenidos en forma previa; Liu *et al* (2001) afirma que el transportador mutado se expresa en la membrana en niveles muy similares a los obtenidos por la proteína nativa, no obstante, al realizar los análisis funcionales determinaron que presentaba una actividad transportadora muy baja. Por ello no se analizó sus propiedades cinéticas. Por esta razón, es muy importante la obtención de expresión de la proteína a nivel de la membrana y más aún ser capaces de determinar que esta mutante presenta propiedades cinéticas muy similares a las obtenidas con la proteína silvestre.

Una vez analizadas las respectivas  $K_i(\text{app})$  tanto de tirfostina A47 como de citocalasina B, determinamos que la mutante generada, como era de esperar, tampoco afectaba la afinidad de estas moléculas por sus sitios de unión en la proteína transportadora. Estos datos corroboran los antecedentes que tanto tirfostina A47 como citocalasina B no se unen al dominio I y al parecer tampoco lo hacen en residuos cercanos a éste.

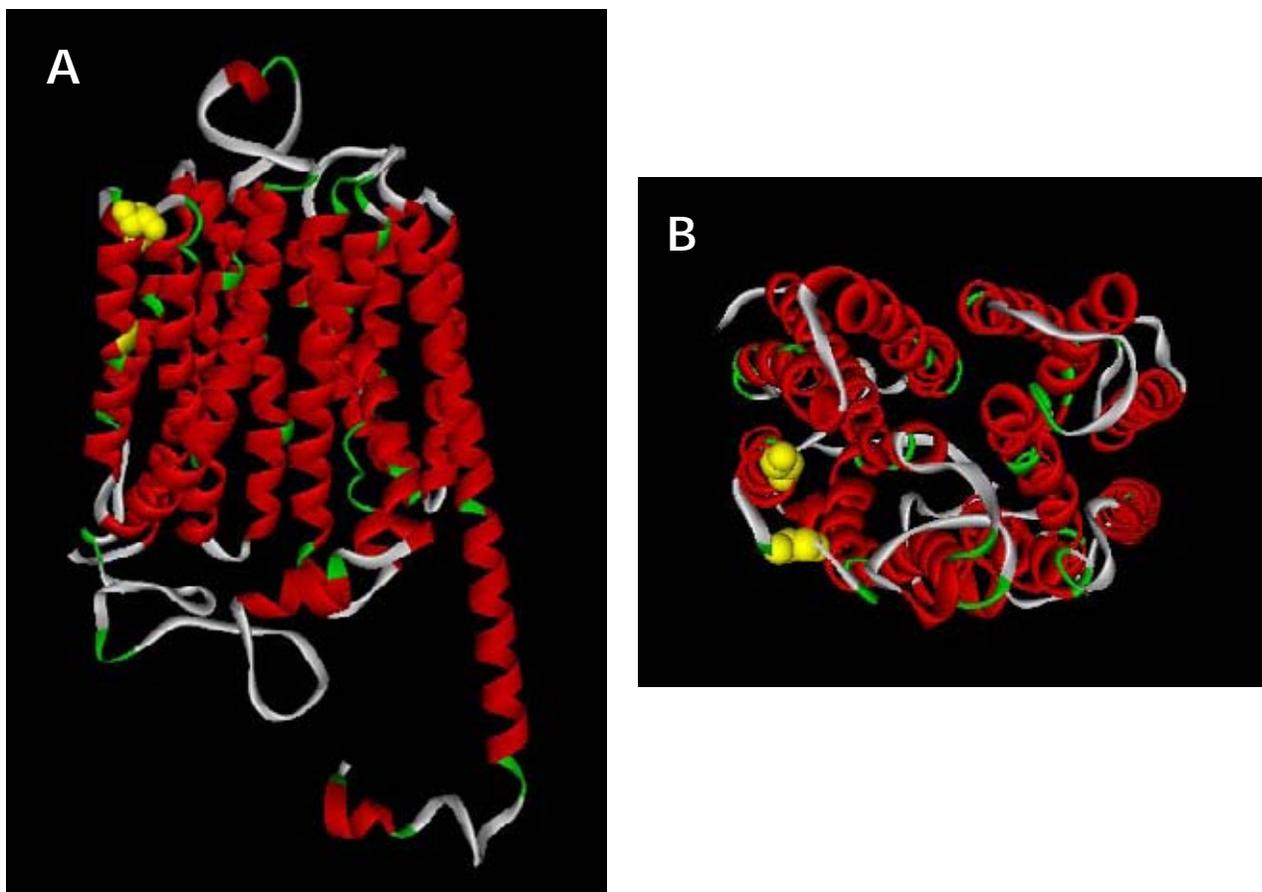
Otro resultado importante fue que con quercetina, encontramos que en condiciones de entrada, la mutante Gly116→Ala, pierde afinidad por este inhibidor, por lo cual nos fue imposible apreciar algún nivel significativo de inhibición. En cambio, en condiciones de intercambio en equilibrio, se determinó una leve diferencia en el  $K_i(\text{app})$  al ser comparado con el obtenido por la proteína silvestre. Este fenómeno puede ser explicado, ya que tanto en condiciones de intercambio en equilibrio como en trans-cero de entrada, la concentración de 3-O-metilglucosa es de 10 mM. En condiciones de equilibrio las concentraciones del sustrato se encuentran muy por debajo de la  $K_m$ . Es claro que el cambio G116A no afectó la unión de glucosa a su sitio externo, por lo que la diferencia se debe explicar como una consecuencia de la alteración de la unión de quercetina con la proteína. Este hecho, sugiere que en la proteína existen al menos dos sitios de unión de ligandos sensibles por la superficie externa de la proteína, el sitio externo de unión del azúcar y un sitio inhibitorio para quercetina.

Los datos cinéticos en eritrocitos humanos sugieren que la unión de azúcar al sitio externo y la de flavonas como genisteína, quercetina y miricetina es competitiva, vale decir, mutuamente excluyente. Es posible proponer entonces, como una hipótesis de trabajo, que la mutación G116A exagera el acoplamiento entre el sustrato y el sitio de unión para flavonas. En condiciones de entrada la concentración del sustrato es cercana al valor de  $K_m$ , por lo que el sitio de sustrato se encuentra semi-saturado. Esta unión afectaría estructuralmente el sitio de unión de las flavonas, desplazando el valor de  $K_i$  para quercetina fuera del intervalo de concentraciones que es técnicamente posible de analizar. En condiciones de equilibrio en cambio, la concentración del sustrato es subsaturante, lo cual explica que el transportador mutado preserve su sensibilidad a quercetina en estas condiciones. Si esta explicación es válida entonces es de esperar que al probar la sensibilidad de la mutante G116A frente a

quercetina en condiciones de equilibrio usando altas concentraciones de sustrato, los valores de  $K_i$  debieran ser bastante más altos que en estas condiciones

Otra posibilidad es que la mutación G116A afecte la posición del residuo lisina 117 de la proteína. Estudios realizados con la mutante K117R en nuestro laboratorio muestran que ello es completamente refractario a la inhibición por quercetina.

Nuestra propuesta entonces es que en GLUT1 existe un sitio alostérico que permite la unión de moléculas como flavonas y posiblemente tirfostinas y que explica la sensibilidad del transportador frente a estos compuestos (Figura 14). Algunos residuos del dominio I, como G116 y K117 serían parte de un lazo que definiría este sitio, de manera que el cambio de estos residuos o bien una alteración estructural producto de la unión del sustrato podría explicar la menor unión de los inhibidores en estas condiciones. Se requerirán estudios más refinados para dilucidar el papel de estos residuos en la conformación de este putativo sitio alostérico. No obstante lo anterior, los resultados descritos en este documento resaltan el potencial de la tecnología de expresión de proteínas en ovocito de *Xenopus* para detallar las propiedades cinéticas de proteínas de transporte transmembrana.



**Fig. 14: Localizaciones de las mutantes G111A y G116A en el modelo estructural del transportador de glucosa.** En el modelo estructural teórico de Glut1 descrito por Salas-Burgos (1sukpdb, Salas-Burgos et al. 2004), mostrando los 12 segmentos transmembrana en rojo y las asas que unen cada uno de estos segmentos en plomo. En la figura A se muestra una visión lateral del transportador de glucosa, orientada en forma perpendicular al plano de la membrana plasmática y en la cual la parte superior corresponde a la superficie exofacial y la inferior a la superficie endofacial. Se resaltan los residuos aminoacídicos mutados ubicados en el dominio I, G111A y G116A, en color amarillo. En la figura B, se observa la superficie exofacial de GLUT1. Los residuos mutados formarían parte de un bolsillo donde posiblemente se uniría la flavona quercetina.

## REFERENCIAS

- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R. y Iwata, S. (2003). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301, 610-615.
- Alisio, A. y Mueckler, M. (2004). Relative Proximity and Orientation of Helices 4 and 8 of the GLUT1 Glucose Transporter. *J Biol Chem* 279, 26540–26545
- 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.A. (2001). Inhibición del transportador de hexosas GLUT1 por genisteína. *Seminario de Titulación de Tecnólogo médico*. Universidad Austral de Chile. 38 pp.
- Angulo, C., Rauch, M.C., Droppelmann, A., Reyes, A.M., Slebe, J.C., Delgado-Lopez, F., Guaiquil, V.H., Vera, J.C., Concha, II. (1998). Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J Cell Biochem* 71(2), 189-203.
- Asano T, Katagiri H, Takata K, Lin JL, Ishihara H, Inukai K, Tsukuda K, Kikuchi M, Hirano H, Yazaki Y (1991). The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem.*, 266, 24632-24636
- Asano, T., Katagiri, H., Tsukuda, K., Lin, J.L., Ishihara, H., Inukai, K., Yazaki, Y. y Oka, Y. (1992). Glucose binding enhances the papain susceptibility of the intracellular loop of the GLUT1 glucose transporter. *FEBS Lett* 298, 129-132.

- Aubby, D.S. y Widdas, W.F. (1980). Asymmetry of hexose transfer system in erythrocytes of fetal and new-born guinea-pigs. *J Physiol* 309, 317-327.
- Baker, G.F., Basketter, D.A. y Widdas, W.F. (1978). Asymmetry of the hexose transfer system in human erythrocytes. Experiments with non-transportable inhibitors. *J Physiol* 278, 377-388.
- Baker, G.F. y Widdas, W.F. (1973a). The asymmetry of the facilitated transfer system for hexoses in human red cells and the simple kinetics of a two component model. *J Physiol* 231, 143-165.
- Baker, G.F. y Widdas, W.F. (1973b). The permeation of human red cells by 4,6-O-ethylidene-D-glucopyranose (ethylidene glucose). *J Physiol* 231, 129-142.
- Baldwin, S.A. (1993). Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim Biophys Acta* 1154, 17-49.
- Baldwin, S.A. y Lienhard, G.E. (1989). Purification and reconstitution of glucose transporter from human erythrocytes. *Methods Enzymol* 174, 39-50.
- 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.
- Behrooz, A. y Ismail-Beigi, F. (1997). Dual Control of glut1 Glucose Transporter Gene Expression by Hypoxia and by Inhibition of Oxidative Phosphorylation *J. Biol. Chem.* 272, 5555-5562.
- Bell, G.I., Kayano, T., Buse, J.B., Burant, C.F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H. y Seino, S. (1990). Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13, 198-208.

- Birnbaum, M.J. (1989). Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* 57, 305-315.
- Birnbaum, M.J., Haspel, H.C. y Rosen, O.M. (1987). Transformation of rat fibroblasts by FSV rapidly increases glucose transporter gene transcription. *Science* 235, 1495-1498.
- Blakemore, S.J., Aledo, J.C., James, J., Campbell, F.C., Lucocq, J.M. y Hundal, H.S. (1995). The GLUT5 hexose transporter is also localized to the basolateral membrane of the human jejunum. *Biochem J* 309 ( Pt 1), 7-12.
- 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.
- Burant, C.F., Takeda, J., Brot\_Laroche, E., Bell, G.I. y Davidson, N.O. (1992). Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J Biol Chem* 267, 14523-14526.
- Burdett, E. y Klip, A. (1988). Exofacial regions of the glucose transporter of human erythrocytes: detection with polyclonal antibodies. *Biochem Cell Biol* 66, 1126-1133.
- 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. (1986a). Anomalous asymmetric kinetics of human red cell hexose transfer: role of cytosolic adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* 25, 3592-3602.
- Carruthers, A. (1986b). 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. (1991). Mechanisms for the facilitated diffusion of substrates across cell membranes. *Biochemistry* 30, 3898-3906.
- Carruthers, A. y Helgerson, A.L. (1989). The human erythrocyte sugar transporter is also a nucleotide binding protein. *Biochemistry* 28, 8337-8346.
- Carruthers, A. y Helgerson, A.L. (1991). Inhibitions of sugar transport produced by ligands binding at opposite sides of the membrane. Evidence for simultaneous occupation of the carrier by maltose and cytochalasin B. *Biochemistry* 30, 3907-3915.
- Carruthers, A., Helgerson, A.L., Hebert, D.N., Tefft, R.E., Naderi, S. y Melchior, D.L. (1989). Effects of calcium, ATP, and lipids on human erythrocyte sugar transport. *Ann N Y Acad Sci* 568, 52-67.
- Charron, M.J., Brosius, F.C., Alper, S.L. y Lodish, H.F. (1989). A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2535-2539.
- Concha, II., Velasquez, F.V., Martinez, J.M., Angulo, C., Droppelmann, A., Reyes, A.M., Slebe, J.C., Vera, J.C., Golde, D.W., (1997) *Blood*.89 (11), 4190-5.
- 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). Cytochalasin B and the kinetics of inhibition of biological transport: a case of asymmetric binding to the glucose carrier. *Biochim Biophys Acta* 510, 339-348.
- Dick, A.P., Harik, S.I., Klip, A. y Walker, D.M. (1984). Identification and characterization of the glucose transporter of the blood-brain barrier by cytochalasin B binding and immunological reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7233-7237.
- 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.
- Due, A.D., Qu, Z.C., Thomas, J.M., Buchs, A., Powers, A.C. y May, J.M. (1995). Role of the C-terminal tail of the GLUT1 glucose transporter in its expression and function in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry* 34, 5462-5471.
- Farrell, C.L. y Pardridge, W.M. (1991). Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal

- membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5779-5783.
- Flier, J.S., Mueckler, M.M., Usher, P. y Lodish, H.F. (1987). Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science* 235, 1492-1495.
- Fry D.C., Kuby S.A., Mildvan A.S.(1986). ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 907-911.
- Fukumoto, H., Kayano, T., Buse, J.B., Edwards, Y., Pilch, P.F., Bell, G.I. y Seino, S. (1989). Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J Biol Chem* 264, 7776-7779.
- Fukumoto, H., Seino, S., Imura, H., Seino, Y., Eddy, R.L., Fukushima, Y., Byers, M.G., Shows, T.B. y Bell, G.I. (1988). Sequence, Tissue Distribution, and Chromosomal Localization of mRNA Encoding a Human Glucose Transporter-Like Protein *PNAS* 85, 5434-5438.
- 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.
- 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.
- Guillam, M., Dupraz, P. y Thorens, B. (2000). Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets *Diabetes* 49, 1485-1491.

- Haber, R.S., Weinstein, S.P., O Boyle, E. y Morgello, S. (1993). Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter. *Endocrinology* 132, 2538-2543.
- Hamill, S., Cloherty, E.K. y Carruthers, A. (1999). The human erythrocyte sugar transporter presents two sugar import sites. *Biochemistry* 38, 16974-16983.
- Haneskog, L., Andersson, L., Brekkan, E., Englund, A.K., Kameyama, K., Liljas, L., Greijer, E., Fischbarg, J. y Lundahl, P. (1996). Monomeric human red cell glucose transporter (Glut1) in non-ionic detergent solution and a semi-elliptical torus model for detergent binding to membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1282, 39-47.
- Hebert, D.N. y Carruthers, A. (1986). Direct evidence for ATP modulation of sugar transport in human erythrocyte ghosts. *J Biol Chem* 261, 10093-10099.
- Hebert, D.N. y Carruthers, A. (1992). Glucose transporter oligomeric structure determines transporter function. Reversible redox-dependent interconversions of tetrameric and dimeric GLUT1. *J Biol Chem* 267, 23829-23838.
- Heinze, M., Monden, I. y Keller, K. (2004). Cysteine-scanning mutagenesis of transmembrane segment 1 of glucose transporter GLUT1: extracellular accessibility of helix positions. *Biochemistry* 43, 931-936.
- 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.
- Holman, G.D. y Rees, W.D. (1987). Photolabelling of the hexose transporter at external and internal sites: fragmentation patterns and evidence for a conformational change. *Biochim Biophys Acta* 897, 395-405.

- Hresko, R.C., Kruse, M., Strube, M. y Mueckler, M. (1994). Topology of the Glut 1 glucose transporter deduced from glycosylation scanning mutagenesis. *J Biol Chem* 269, 20482-20488.
- Hruz, P. y Mueckler, M. (2001a). Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol Membr Biol* 18, 183-193.
- Hruz, P.W. y Mueckler, M.M. (1999). Cysteine-scanning mutagenesis of transmembrane segment 7 of the GLUT1 glucose transporter. *J Biol Chem* 274, 36176-36180.
- Hruz, P.W. y Mueckler, M.M. (2000). Cysteine-scanning mutagenesis of transmembrane segment 11 of the GLUT1 facilitative glucose transporter. *Biochemistry* 39, 9367-9372.
- Hruz, P.W. y Mueckler, M.M. (2001b). Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol Membr Biol* 18, 183-193.
- Huang, Y., Lemieux, M.J., Song, J., Auer, M. y Wang, D.N. (2003). Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from Escherichia coli. *Science* 301, 616-620.
- 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.
- Inukai, K., Asano, T., Katagiri, H., Anai, M., Funaki, M., Ishihara, H., Tsukuda, K., Kikuchi, M., Yazaki, Y. y Oka, Y. (1994). Replacement of both tryptophan residues at 388 and 412 completely abolished cytochalasin B photolabelling of the GLUT1 glucose transporter. *Biochem J* 302 ( Pt 2), 355-361.
- Jacquez, J.A. (1983). Modulation of glucose transport in human red blood cells by ATP. *Biochim Biophys Acta* 727, 367-378.

- James, D.E., Strube, M. y Mueckler, M. (1989). Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 338, 83-87.
- Johnson, J.H., Newgard, C.B., Milburn, J.L., Lodish, H.F. y Thorens, B. (1990a). The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *J Biol Chem* 265, 6548-6551.
- Johnson, J.H., Ogawa, A., Chen, L., Orci, L., Newgard, C.B., Alam, T. y Unger, R.H. (1990b). Underexpression of beta cell high Km glucose transporters in noninsulin-dependent diabetes. *Science* 250, 546-549.
- Joost, H. y Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 18, 247-256.
- 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.
- Kalaria, R.N., Gravina, S.A., Schmidley, J.W., Perry, G. y Harik, S.I. (1988). The glucose transporter of the human brain and blood-brain barrier. *Ann Neurol* 24, 757-764.
- Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R.L., Fan, Y.S., Byers, M.G., Shows, T.B. y Bell, G.I. (1988). Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem* 263, 15245-15248.

- 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.
- Levitzki, A. Y Gazit, A. (1995). Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 267, 1782-1788
- Li, Q., Manolescu, A., Ritzel, M., Yao, S., Slugoski, M., Young, J.D., Chen, X.-Z. y Cheeseman, C.I. (2004). Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G236-242.
- Liang, Y., Bai, G., Doliba, N., Buettger, C., Wang, L., Berner, D.K. y Matschinsky, F.M. (1996). Glucose metabolism and insulin release in mouse beta HC9 cells, as model for wild-type pancreatic beta-cells *Am J Physiol Endocrinol Metab* 270, E846-857.
- Lieb, W. y Stein, W. (1971). New theory for glucose transport across membranes. *Nat New Biol* 230, 108-109.
- Liu, Q., Vera, J., Peng, H. y Golde, D. (2001). The predicted ATP-binding domains in the hexose transporter GLUT1 critically affect transporter activity. *Biochemistry* 40, 7874-7881.
- LLévenes, A.M. (2001). Inhibición del transportador de hexosas GLUT1 por tirfostina B46. *Seminario de Titulación de Tecnólogo Médico*, Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. Valdivia. 40 pp.
- Macheda, M.L., Williams, E.D., Best, J.D., Wlodek, M.E. y Rogers, S. (2003). Expression and localisation of GLUT1 and GLUT12 glucose transporters in the pregnant and lactating rat mammary gland. *Cell Tissue Res* 311, 91-97.

- Mantych, G.J., James, D.E. y Devaskar, S.U. (1993). Jejunal/kidney glucose transporter isoform (Glut-5) is expressed in the human blood-brain barrier. *Endocrinology* 132, 35-40.
- Matschinsky, F. (1996). Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm *Diabetes* 45, 223-241.
- 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. A. (2001). Inhibición del transportador de hexosas GLUT1 por tirfostina A47. *Seminario de Titulación de Tecnólogo Médico, Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. Valdivia. 40 pp.*
- 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., Kruse, M., Strube, M., Riggs, A.C., Chiu, K.C. y Permutt, M.A. (1994). A mutation in the Glut2 glucose transporter gene of a diabetic patient abolishes transport activity. *J Biol Chem* 269, 17765-17767.
- 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.

- Mueckler, M. y Makepeace, C. (1999). Transmembrane segment 5 of the Glut1 glucose transporter is an amphipathic helix that forms part of the sugar permeation pathway. *J Biol Chem* 274, 10923-10926.
- Mueckler, M. y Makepeace, C. (2002). Analysis of transmembrane segment 10 of the Glut1 glucose transporter by cysteine-scanning mutagenesis and substituted cysteine accessibility. *J Biol Chem* 277, 3498-3503.
- Mueckler, M. y Makepeace, C. (2004). Analysis of Transmembrane Segment 8 of the GLUT1 Glucose Transporter by Cysteine-scanning Mutagenesis and Substituted Cysteine Accessibility *J. Biol. Chem.* 279, 10494-10499.
- Nagamatsu, S., Kornhauser, J.M., Burant, C.F., Seino, S., Mayo, K.E. y Bell, G.I. (1992). Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. *J Biol Chem* 267, 467-472.
- Olsowski, A., Monden, I., Krause, G. y Keller, K. (2000). Cysteine scanning mutagenesis of helices 2 and 7 in GLUT1 identifies an exofacial cleft in both transmembrane segments. *Biochemistry* 39, 2469-2474.
- Pardridge, W.M., Boado, R.J. y Farrell, C.R. (1990). Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J Biol Chem* 265, 18035-18040.
- Pessin, J.E. y Bell, G.I. (1992). Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu Rev Physiol* 54, 911-930.
- Phay, J.E., Hussain, H.B. y Moley, J.F. (2000a). Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* 66, 217-220.

- Phay, J.E., Hussain, H.B. y Moley, J.F. (2000b). Strategy for identification of novel glucose transporter family members by using internet-based genomic databases. *Surgery* 128, 946-951.
- Rogers, S., Chandler, J.D., Clarke, A.L., Petrou, S. y Best, J.D. (2003a). Glucose transporter GLUT12-functional characterization in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 422-426.
- Rogers, S., Docherty, S.E., Slavin, J.L., Henderson, M.A. y Best, J.D. (2003b). Differential expression of GLUT12 in breast cancer and normal breast tissue. *Cancer Lett* 193, 225-233.
- 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.
- Salas-Burgos, A., Iserovich, P., Zuniga, F., Vera, J.C., Fischbarg, J. (2004). Predicting the three-dimensional structure of the human facilitative glucose transporter glut1 by a novel evolutionary homology strategy: insights on the molecular mechanism of substrate migration, and binding sites for glucose and inhibitory molecules. *Biophys J*.87, 2990-2999.
- Saldivia, M.A. (2003). Caracterización parcial de la inhibición del transportador de hexosas GLUT1 por las flavonas quercetina y miricetina. *Seminario de Titulación de Tecnólogo Médico*. Universidad Austral de Chile. Valdivia. 36 pp.
- Scheepers, A., Joost, HG., Schurmann, A. (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT:molecular basis of normal and aberrant function. *J Parenter Enteral Nutr* 28, 364-371

- Shanahan, M.F. (1982). Cytochalasin B. A natural photoaffinity ligand for labeling the human erythrocyte glucose transporter. *J Biol Chem* 257, 7290-7293.
- Shanahan, M.F. (1983). Characterization of cytochalasin B photoincorporation into human erythrocyte D-glucose transporter and F-actin. *Biochemistry* 22, 2750-2756.
- Stuart, C.A., Wen, G. y Jiang, J. (1999). GLUT3 protein and mRNA in autopsy muscle specimens. *Metabolism* 48, 876-880.
- Sviderskaya, E.V., Jazrawi, E., Baldwin, S.A., Widnell, C.C. y Pasternak, C.A. (1996). Cellular stress causes accumulation of the glucose transporter at the surface of cells independently of their insulin sensitivity. *J Membr Biol* 149, 133-140.
- Thorens, B., Cheng, Z.Q., Brown, D. y Lodish, H.F. (1990). Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *Am J Physiol* 259, C279-285.
- Thorens, B. (1996). Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *Am J Physiol.* 270, G541-553.
- Thorens, B., Wu, Y.J., Leahy, J.L. y Weir, G.C. (1992). The loss of GLUT2 expression by glucose-unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment. *J Clin Invest* 90, 77-85.
- Uldry, M., Ibberson, M., Horisberger, J.-D., Chatton, J.-Y., Riederer, B.M. y Thorens, B. (2001). Identification of a mammalian H<sup>+</sup>-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain *EMBO J.* 20, 4467-4477.
- Uldry, M., Ibberson, M., Hosokawa, M. y Thorens, B. (2002). GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett* 524, 199-203.
- Uldry, M. y Thorens, B. (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch* 447, 480-489.

- Vera, J., Reyes, A., Velasquez, F., Rivas, C., Zhang, R., Strobel, P., Slebe, J., Nunez-Alarcon, J. y Golde, D. (2001a). Direct inhibition of the hexose transporter GLUT1 by tyrosine kinase inhibitors. *Biochemistry* 40, 777-790.
- 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. (1996). 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. (2001b). Direct inhibition of the hexose transporter GLUT1 by tyrosine kinase inhibitors. *Biochemistry* 40, 777-790.
- Vera, J.C., Rivas, C.I., Fischbarg, J. y Golde, D.W. (1993). Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature* 364, 79-82.
- Vera, J.C., Rivas, C.I., Velasquez, F.V., Zhang, R.H., Concha, I.I. y Golde, D.W. (1995). Resolution of the facilitated transport of dehydroascorbic acid from its intracellular accumulation as ascorbic acid. *J Biol Chem* 270, 23706-23712.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ.(1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*1(8):945–951
- Wheeler, T.J. (1989). ATP does not regulate the reconstituted glucose transporter. *Biochemistry* 28, 3413-3420.
- Wright, E. M. (1993). The intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Annu Rev Physiol.* 55, 575-589.
- 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.