



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

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

**PUTATIVOS DOMINIOS DE UNIÓN A NUCLEÓTIDOS EN
GLUT1 FORMAN PARTE DE SITIOS DE UNIÓN PARA
INHIBIDORES**

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

ALEJANDRO JAVIER ALBORNOZ PINO

VALDIVIA – CHILE

2007

Dedicada a mi madre Rosana,
a mis hermanos Gino y Camila
y especialmente a Milton (mi padre)

AGRADECIMIENTOS

Deseo en primer lugar dar las gracias al Dr. Alejandro Reyes por haberme aceptado en su laboratorio y por el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo. Agradecer también al Dr. Juan Guillermo Cárcamo y al Dr Alejandro Yañes por haber aceptado formar parte de la comisión evaluadora.

Quiero agradecer especialmente a mi madre Rosana por su amor y apoyo incondicional, a mi padre Milton por todo lo que fue en su vida y significó en la mía y a mis hermanos Gino y Camila por su cariño y apoyo.

Por último agradecer a los amigos, aquellos personajes que hacen que los años de universidad se conviertan en una lucha constante entre el obrar bien y mal. A Franco, Sebastián (cosa), Joaquín, Felipe (macaco), Paola, Loreto, Javier, Nacho, Mauricio, Paty, Luciano, Pancho blanco y Pancho negro gracias por su amistad y por haberme acompañado en los momentos difíciles.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Proteínas de Membranas del Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile y contó con el financiamiento del proyecto FONDECYT 1060198

INDICE DE CONTENIDOS

1	RESUMEN	1
	SUMMARY	2
2	INTRODUCCIÓN	3
3	MATERIALES Y MÉTODOS	15
	3.1 Materiales.	15
	3.2 Generación de mutantes de GLUT 1 en los dominios de unión a nucleótidos. ...	16
	3.2.1 Mutagénesis sitio-dirigida.	16
	3.2.2 Transformación de células XL1- Blue supercompetentes.	18
	3.2.3 Purificación de DNA plasmidial a gran escala Midiprep.	18
	3.3 Expresión heteróloga en ovocitos de <i>Xenopus Laevis</i>	19
	3.3.1 Síntesis <i>in Vitro</i> de mRNA de GLUT 1 silvestre y mutantes K114R, K225Q y S226A.	19
	3.3.2 Tratamiento de <i>Xenopus laevis</i> y obtención de ovocitos.	21
	3.3.3 Microinyección de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	21
	3.4 Inmunodetección de GLUT 1 silvestre y mutantes.	21
	3.4.1 Preparación membranas de ovocitos.	21
	3.4.2 Análisis de Western Blot.	22
	3.5 Análisis funcional de GLUT 1 silvestre y mutantes.	22
	3.5.1. Determinación de constantes cinéticas en condiciones trans-cero de entrada.	22

3.5.2. Determinación de K_i app para inhibidores de GLUT 1 silvestre y mutantes en condiciones trans-cero de entrada.	23
3.5.3. Análisis estadístico	24
4. RESULTADOS	25
4.1. Expresión de GLUT 1 silvestre y mutantes en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	26
4.2. Captación de 3-O-metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada para GLUT 1 silvestre y mutantes.....	28
4.3. Rol de los dominios de unión a nucleótidos de GLUT 1 en su interacción con inhibidores.	30
4.4. Efecto de inhibidores de unión exofacial sobre mutantes de GLUT 1.	36
4.5. Efecto de inhibidores de unión endofacial sobre mutantes de GLUT 1.	39
5. DISCUSIÓN	43
5.1. GLUT 1 silvestre.	44
5.2. Análisis de la mutante K114R del dominio I.	46
5.3. Análisis de las mutantes K225Q y S226A del dominio II.	50
6. BIBLIOGRAFÍA	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de 12 α - helices para el transportador GLUT 1.....	13
Figura 2. Expresión de GLUT 1 silvestre y mutantes en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	27
Figura 3. Curvas de saturación para la captación de 3-O-metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada.....	29
Figura 4. Eficiencia catalítica determinada para GLUT 1 silvestre y mutantes	31
Figura 5. Estructura de inhibidores de GLUT 1 utilizados en este estudio.....	34
Figura 6. Ensayo de inhibición del transporte de 3-O-metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada para GLUT 1 silvestre	35
Figura 7. Ensayos de inhibición del transporte de metilglucosa por pentoxifilina en mutantes de GLUT 1	37
Figura 8. Ensayos de inhibición del transporte de metilglucosa por quercetina en mutantes de GLUT 1.....	38
Figura 9. Ensayo de inhibición del transporte de metilglucosa por citocalasina B en mutantes de GLUT 1	41
Figura 10. Ensayo de inhibición del transporte de metilglucosa por tirfostina A 47 en mutantes de GLUT 1.....	42
Figura 11. Localización del dominio I de unión a nucleótidos en el modelo tridimensional del transportador GLUT 1.....	49
Figura 12. Localización del dominio II de unión a nucleótidos en el modelo tridimensional del transportador GLUT 1.....	52

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Constantes cinéticas del transporte de 3-O-metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada para GLUT 1 silvestre y mutantes.....	31
---	----

LISTADO DE ABREVIATURAS

ATP	adenosin trifostato
BSA	seroalbúmina bovina
cDNA	ácido desoxiribonucleico complementario
DAB	diaminobencidina
DMSO	dimetil sulfóxido
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
GLUT	transportador facilitativo de hexosas.
K_M	constante de Michaelis
IC₅₀	constante de inhibición aparente
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
OMG	3-O-metilglucosa
OR1	solución Ringer para ovocitos 1
OR2	solución Ringer para ovocitos 2
PBS	tampón fosfato salino
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonil
SDS	dodecilsulfato de sodio
V_{máx}	velocidad máxima

1. RESUMEN

El transporte facilitativo de glucosa es mediado principalmente por GLUT 1, proteína expresada en forma ubicua en los tejidos celulares humanos. GLUT 1 presenta tres secuencias cortas (dominio I, II y III) que exhiben homología de secuencia con sitios de unión a ATP. Si bien su funcionalidad es independiente de la hidrólisis de ATP, se sabe que su actividad intrínseca se ve afectada por la presencia de este nucleótido. Nosotros evaluamos el papel que juegan los dominios I y II en la actividad funcional de GLUT 1 mediante mutagénesis sitio dirigida y expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*. A cada mutante se le determinó su cinética de transporte y su sensibilidad frente a inhibidores de unión endofacial y exofacial en ensayos bajo condiciones trans-cero de entrada. Todas las mutantes exhibieron niveles de expresión y propiedades cinéticas similares a la proteína silvestre, además de no presentar diferencias en su comportamiento frente a pentoxifilina, y citocalasina B. La mutante K114R del dominio I, de orientación exofacial, mostró una sensibilidad menor por quercetina, una flavona que interacciona con la cara externa de GLUT 1. Por otro lado, las mutantes endofaciales del dominio II perdieron su sensibilidad frente a tirfostina A 47 en diferente magnitud; mientras S226A muestra una pérdida significativa, K225Q resultó ser completamente insensible. Los resultados obtenidos permiten sugerir que el dominio I forma parte de un sitio de unión exofacial para quercetina y que además existe un sitio de unión endofacial para tirfostina A 47 que involucra al dominio II.

SUMMARY

Facilitative transport of glucose is mediated mainly by GLUT 1, a protein expressed in all human tissues. GLUT 1 shows three short sequences (domains I, II and III) which exhibit homology with ATP binding domains. Although its functionality is independent from ATP hydrolysis, its intrinsic activity is influenced by the presence of this nucleotide. We evaluated the role of the domains I and II on GLUT 1 functional activity by site directed mutagenesis and expression in *Xenopus leavis* oocytes. Transport kinetics and sensitivity against endofacial and exofacial inhibitors under zero-trans influx conditions, were determined for each mutant. All mutants showed expression levels and kinetic properties similar to the wild type protein, and also they show no differences in their behavior against pentoxifylline and cytochalasin B. The exofacial domain I mutant K114R showed a decreased sensitivity by quercetin, a flavone which interacts with the GLUT 1 at its external face. On the other hand, the endofacial domain II mutants lost their sensitivity against tyrphostin A 47 in different degrees; while S226A showed a significant loss, K225Q was completely insensitive. The results obtained here suggest that domain I is part of an exofacial binding site for quercetin and also that there is an endofacial binding site for tyrphostin A 47 involving domain II.

2. INTRODUCCION

Las células necesitan movilizar a través de su membrana plasmática una gran variedad de moléculas, proceso esencial para su supervivencia. Sin embargo, la hidrofobicidad de la bicapa lipídica hace impermeable a esta membrana frente a metabolitos polares, por ello se han adaptado macromoléculas especializadas en dar comunicación entre el medio externo e interno. La glucosa, fuente primordial para la generación de ATP en el metabolismo de las células animales, es transportado básicamente por dos familias de transportadores de hexosas, ambos miembros de la superfamilia principal de transportadores (MFS, *Major Facilitator Superfamily*). La primera familia, SGLT/SLC5A (*sodium glucose linked transporter*) corresponde a un sistema de transporte activo que depende del cotransporte de iones sodio, siendo la glucosa transportada contra su gradiente de concentración. El gradiente electroquímico de sodio se genera por la acción de la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dependiente de ATP (Wright, 1993). Estos transportadores son expresados principalmente en intestino delgado y riñón (Kanai *et al.*, 1994). La segunda, corresponde a la familia de transportadores facilitativos de hexosas y polioles, GLUT/SLC2A (*glucose transport/solute carrier 2A family*), ampliamente expresados en todas las células y tejidos, que median el transporte de glucosa a favor de su gradiente de concentración (Carruthers, 1990; Pessin y Bell, 1992; Baldwin, 1993; Mueckler, 1994).

En mamíferos hasta la fecha se han logrado identificar y clonar 14 isoformas de transportadores de glucosa (GLUT 1-12, HMIT y GLUT 14), ellas se diferencian en su especificidad por sustrato, en sus propiedades cinéticas, y en su ubicación celular, pudiendo encontrarse más de una isoforma de transportadores en un tipo celular específico (Joost y

Thorens, 2001; Wood *et al.*, 2003; Olson y Pessin, 1996). La presencia de doce dominios transmembrana, con su amino y carboxilo terminal localizado en el citosol, es un rasgo estructural común de esta familia de transportadores, ellos además presentan un cierto número de secuencias conservadas, localizadas en distintos lugares de la secuencia primaria (Burant *et al.*, 1991; Barrett *et al.*, 1999; Hruz y Mueckler, 2001a). Estas secuencias sin embargo, no predicen la selectividad por sustrato de los distintos miembros. En base a estas similitudes tanto en su secuencia aminoacídica como a las características estructurales que comparten, Joost y Thorens clasificaron a esta familia de transportadores en tres clases (Joost y Thorens, 2001; Joost *et al.*, 2002).

Clase I

Este grupo está conformado por los miembros mejor caracterizados hasta la fecha, GLUT 1 a GLUT 4, que presentan entre si un grado de identidad sobre el 55% (Baldwin, 1993; Bell *et al.*, 1993; Gould y Holman, 1993). GLUT 1, principal integrante de esta familia posee alta afinidad por D-glucosa ($K_M \sim 2-3$ mM), otros sustratos son galactosa, manosa y glucosamina. Se encuentra expresado en todos los tejidos, siendo especialmente abundante en eritrocitos y cerebro (Mueckler *et al.*, 1985; Mueckler, 1994; Dick *et al.*, 1984; Kalaria *et al.*, 1988; Pardridge *et al.*, 1990; Farrell y Pardridge, 1991). 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; Sviderskaya *et al.*, 1996; Behrooz y Ismail-Beigi, 1997). GLUT 1 es también un eficiente transportador de la forma oxidada de la vitamina C, el ácido dehidroascorbico (Vera *et al.*, 1994; Vera *et al.*, 1995).

GLUT 2 es selectivamente expresado en hepatocitos, células β pancreáticas, células de la mucosa intestinal y de epitelio renal (Fukumoto *et al.*, 1988; Liang *et al.*, 1996; Matschinsky, 1996; Guillam *et al.*, 2000). Es un transportador de baja afinidad para glucosa ($K_M \sim 17$ mM) (Johnson *et al.*, 1990), galactosa ($K_M \sim 92$ mM), manosa ($K_M \sim 125$ mM), pero de alta afinidad para glucosamina ($K_M \sim 0,8$ mM) (Uldry *et al.*, 2002). El transporte de fructosa por GLUT 2 se ha relacionado a la carencia de un motivo QLS en la hélice 7 de este transportador (Seatter *et al.*, 1998).

GLUT 3 presenta alta afinidad por glucosa ($K_M \sim 1,4$ mM por 2-desoxiglucosa) y transporta además galactosa, manosa, maltosa, y ácido dehidroascórbico. Se encuentra expresado principalmente en cerebro (Kayano *et al.*, 1988; Nagamatsu *et al.*, 1992) y testículos, donde está presente en espermatozoides (Haber *et al.*, 1993). También ha sido detectado en músculo liso. Análisis de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica indican la presencia de GLUT 3 en neuronas, principalmente a nivel de membrana plasmática, aunque también se observan vesículas intracelulares distintas de vesículas sinápticas (Thoidis *et al.*, 1999).

El último integrante de este grupo, GLUT 4, posee una K_M para glucosa de 5 mM aproximadamente, transporta además ácido deshidroascórbico y glucosamina ($K_M \sim 3,9$ mM). Este transportador responde al estímulo de insulina y se expresa en tejido adiposo, músculo esquelético y cardiaco (Tejero *et al.*, 2004; Fukumoto *et al.*, 1989; Birnbaum, 1989; Charron *et al.*, 1989; James *et al.*, 1989). La insulina estimula la translocación de vesículas conteniendo GLUT 4 desde el medio intracelular a la membrana plasmática, incrementando la captación de glucosa (Stephens *et al.*, 1992; Shepherd y Kahn, 1999; Bryant *et al.*, 2002).

Clase II

Dentro de esta clase se encuentran GLUT 5, 7, 9 y 11, los cuales exhiben aproximadamente un 35% de identidad con los miembros de la clase I. La principal característica de estos transportadores es la ausencia de un residuo de triptófano a continuación del motivo conservado GPXXXP (X: cualquier aminoácido) localizado en la hélice 10 y que en GLUT 1 corresponde a triptofano388. Este residuo ha sido implicado en la unión de ligandos como forscolina y citocalasina B (Garcia *et al.*, 1992; Schurmann *et al.*, 1993).

GLUT 5 no presenta actividad de transporte por glucosa, en cambio se ha determinado que transporta fructosa (Burant *et al.*, 1992), con una K_M de aproximadamente 6 mM (Concha *et al.*, 1997; Angulo *et al.*, 1998). Esta isoforma juega un rol clave en la absorción de fructosa por el intestino. GLUT 5 está localizada en su mayor parte en la membrana apical del epitelio intestinal, sin embargo también se ha descrito su ubicación en la membrana basolateral (Blakemore *et al.*, 1995). En el cerebro se lo ubica en microglías y en la barrera hemato-encefálica (Mantych *et al.*, 1993).

GLUT 7 exhibe un 68% de similaridad y un 53% de identidad con GLUT 5, la isoforma estrechamente más relacionada. Revela una K_M de 0,3 mM para glucosa y un IC_{50} de 0,06 mM para fructosa al ser expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*. Análisis de *Northen Blot* delatan la presencia de mRNA en mayor medida en intestino delgado, colon, testículo y próstata. La inusual especificidad por sustrato, además del estrecho grado de identidad con GLUT 5, sugieren a GLUT 7 como una isoforma intermedia entre la clase I y II (Li *et al.*, 2004).

Del tercer miembro de esta clase, GLUT 9 hasta la fecha no se han descrito datos sobre la actividad de transporte de azúcares, no obstante presenta un alto grado de similitud de secuencia con GLUT 5, por lo que podría ser un transportador de fructosa. En cuanto a su ubicación, el mRNA de GLUT 9 ha sido detectado en hígado, riñón y en niveles más bajos en intestino delgado, placenta, pulmón, y leucocitos (Phay *et al.*, 2000).

GLUT 11 exhibe baja afinidad por glucosa y además fructosa ejerce un efecto inhibitorio sobre el transporte de glucosa. Análisis sobre su secuencia aminoacídica denotan una identidad del 41,9 % con GLUT 5 (Doege *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002).

Clase III

Esta clase agrupa a las isoformas GLUT 6, 8, 10, 12 y HMIT, las que se distinguen por presentar un putativo sitio de N-glicosilación en el noveno lazo, sitio que en los miembros de la clase I y II se presentaría en el lazo que conecta a los dominios transmembrana 1 y 2.

GLUT 6 exhibe actividad de transporte a concentraciones de glucosa por sobre 5 mM, por lo que se comporta como un transportador de baja afinidad por este sustrato. El mRNA humano de GLUT 6 está predominantemente expresado en cerebro, bazo, leucocitos (Doege *et al.*, 2000a). La baja afinidad de este transportador por glucosa, no descarta la posible existencia de un sustrato con una mayor afinidad por esta proteína.

GLUT 8 ha mostrado ser un transportador de alta afinidad por glucosa ($K_M \sim 2$ mM), con una expresión de su mRNA predominantemente en testículos, además a menor nivel de expresión en otros tejidos incluidos los sensibles a insulina como músculo esquelético y corazón (Doege *et al.*, 2000b; Ibberson *et al.*, 2000). GLUT 8 estaría

implicado en la provisión de glucosa en el espermatozoide maduro y su expresión dependería de la secreción de gonadotropina (Schurmann *et al.*, 2002). Por otro lado se ha sugerido su participación en el transporte de glucosa regulada por insulina en tejidos que carecen de GLUT 4 (Carayannopoulos *et al.*, 2000).

GLUT 10 revela alta afinidad por glucosa, con una K_M de 0,3 mM aproximadamente por 2-DOG (Dawson *et al.*, 2001), en cuanto a su ubicación, su mRNA se expresa principalmente en hígado y páncreas (McVie-Wylie *et al.*, 2001).

GLUT 12 se expresa en músculo esquelético, tejido adiposo, intestino delgado, corazón y placenta (Macheda *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2003b; Stuart *et al.*, 2006; Gude *et al.*, 2005; Sukanuma *et al.*, 2007). Exhibe un 40% de homología en su secuencia primaria con GLUT 10 y un 29% con GLUT 4. Estudios de su actividad funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* indican un transporte preferencial de glucosa por sobre otras hexosas (Rogers *et al.*, 2003a). GLUT 12 comparte ciertas características con GLUT 4 que hacen suponer un sistema secundario para el transporte de glucosa sensible a insulina (Rogers *et al.*, 2002).

HMIT (GLUT 13) corresponde a un cotransportador H^+ -myoinositol, se encuentra expresado en cerebro, principalmente en el hipocampo, hipotálamo, cerebelo (Uldry *et al.*, 2001). La expresión de HMIT en ovocitos de *Xenopus laevis* revelan que el transporte de myo-inositol se ve fuertemente activado a medida que decrece el pH extracelular. No se ha detectado actividad de transporte por glucosa.

Finalmente, GLUT14 ultimo miembro descrito de esta familia 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).

Propiedades estructurales y funcionales de GLUT 1.

El transportador GLUT 1 es el miembro mejor estudiado de esta familia, debido en gran medida a su abundancia en eritrocitos humanos y su expresión ubicua en tejidos humanos. Fue clonado y secuenciado por primera vez desde células HepG2 (Mueckler *et al.*, 1985), su cDNA codifica una proteína de 492 aminoácidos y presenta una masa molecular de 55 kDa aproximadamente. Existe bastante información acerca de su estructura y función, obtenida gracias a la aplicación de variadas técnicas como por ejemplo mutagénesis, accesibilidad por cisteínas, uso de metabolitos marcados, inhibidores del transporte, uso de anticuerpos y digestión con proteasas (Davies *et al.*, 1987; Andersson y Lundahl, 1988; Cairns *et al.*, 1984; Cairns *et al.*, 1987; Burdett y Klip, 1988; Asano *et al.*, 1992; Hresko *et al.*, 1994; Hruz y Mueckler, 2001b; Davies *et al.*, 1990). Estructuralmente GLUT 1 está constituido por 12 α -hélices transmembrana con su amino y carboxilo terminal y un gran lazo entre los segmentos 6 y 7 orientados hacia el citosol; este lazo se cree divide la proteína en dos dominios de 6 hélices. Se han descrito una serie de residuos identificados como claves en la función de transporte que soportan esto último, G75, G76, G79, N288, y A289 (Olsowski *et al.*, 2000); Q161 (Seatter *et al.*, 1998; Mueckler *et al.*, 1994); V165 (Mueckler y Makepeace, 1997); N317, T321, y P387 (Mueckler y Makepeace, 2002); Q282 (Hruz y Mueckler, 1999; Olsowski *et al.*, 2000); I287 (Hruz y Mueckler,

1999). Otro detalle importante que avala la conformación de dos dominios de 6 hélices, es la presencia del motivo conservado RXGRR ubicado en los lazos intracelulares que conectan los segmentos 2-3 y 8-9 (Sato y Mueckler, 1999). Se ha determinado su sitio de N-glicosilación entre las hélices 1 y 2, específicamente en la asparragina 45 (Asano *et al.*, 1991) y marcaje con biotina revela la localización exofacial del residuo lisina 300 en el lazo que conecta a los segmento transmembrana 7 y 8 (Preston y Baldwin, 1993).

El estudio en pacientes con el síndrome de deficiencia del transportador de glucosa tipo 1 (De Vivo *et al.*, 1991; De Vivo *et al.*, 2002), también ha permitido localizar residuos cruciales para el transporte: S66 y T310 (Klepper *et al.*, 1999); G91 (Klepper *et al.*, 2001); R126 (Pascual *et al.*, 2002; Brockmann *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000); E247 y K256 (Pascual *et al.*, 2002); y E146 y R333 (Wang *et al.*, 2000).

El problema que acarrea la no existencia de una estructura cristalina para GLUT 1 ha llevado en los últimos años al diseño de nuevas estrategias para predecir su estructura tridimensional. La posibilidad de obtener cristales de miembros de la familia MFS ha permitido utilizarlos como moldes en la generación de modelos estructurales teóricos. Estos cristales, principalmente de Lac permeasa (Abramson *et al.*, 2003) y el antiportador Glicerol -3- fosfato (Huang *et al.*, 2003) de *Escherichia coli* presentan altos grados de homología en su estructura secundaria, lo que hace pensar en un orden de plegamiento universal para esta familia. Estos modelos han sido validados al comparar los datos obtenidos por técnicas bioquímicas y mutagénicas. Es así que se ha determinado que las hélices 3, 6, 9, 12 formarían una especie de caja rodeando a las demás, en una disposición que favorece la formación de un canal de comunicación entre el medio interno y externo con su correspondiente sitio de unión para glucosa (Alisio y Mueckler, 2004).

Un avance en técnicas de modelamiento tridimensional fue lo realizado por Salas-Burgos, que utilizó como molde el cristal de GlpT (transportador de glicerol fosfato de *E. coli*) para generar un modelo tridimensional para GLUT 1. La ventaja de este modelo sobre otros, es la homología que presenta GlpT con la proteína humana Glucosa-6-fosfato translocasa y que se utilizó para corregir la asignación de residuos para GLUT 1 (Salas-Burgos *et al.*, 2004).

La capacidad que tiene GLUT 1 de unir moléculas que no tienen relación estructural con su sustrato también ha sido ampliamente utilizada para dilucidar su estructura y función. El metabolito fúngico citocalasina B es el más estudiado de ellos (Shanahan, 1982, 1983; Baldwin y Lienhard, 1989). Se sabe que interacciona en forma directa con el transportador, comportándose como un inhibidor competitivo en ensayos que miden la unión endofacial de glucosa y como un inhibidor no competitivo para la unión exofacial. Esto indica una interacción con la cara externa de GLUT 1 (Basketter y Widdas, 1978; Deves y Krupka, 1978a). Análisis de fotomarcaje y digestión proteolítica localizaron el sitio de unión de citocalasina B en la región citoplasmática de los segmentos 10 y 11. Se han descrito los residuos 388 (Kasahara y Kasahara, 1998; Garcia *et al.*, 1992) y 412 (Garcia *et al.*, 1992) como importantes en la unión. Otra familia de moléculas inhibidoras del transporte de glucosa son las metilxantinas cafeína, teobromina, teofilina (Challiss *et al.*, 1980; Yasuhara y Levy, 1988). Estas moléculas son tres alcaloides relacionados que se encuentran en plantas alrededor de todo el mundo. Además podemos mencionar a pentoxifilina e isobutilmetilxantina, que corresponden a metilxantinas sintéticas. Existen variados productos que contienen elevadas cantidades de estas metilxantinas, como es el caso por ejemplo de las bebidas cola (Daly y Fredholm, 1998).

La pentoxifilina es un derivado de las xantinas (1-(5-oxohexil)-teobromina) que ha mostrado interactuar directamente con el transportador GLUT 1. En nuestro laboratorio ensayos realizados tanto en eritrocitos como en ovocitos de *Xenopus laevis* expresando la proteína indican una interacción exofacial de este inhibidor (Ojeda, 2005).

Funcionalmente GLUT 1 es un transportador bidireccional que conduce su sustrato en contra de su gradiente de concentración (Baker *et al.*, 1978; Carruthers, 1990; Gould y Holman, 1993; Hruz y Mueckler, 2001b). El transporte ocurre de manera no dependiente de ATP, considerándose así a GLUT 1 como un transportador facilitativo, es decir que no necesita de energía para translocar su sustrato (Carruthers, 1990).

Si bien GLUT 1 no requiere de la hidrólisis de ATP, su actividad intrínseca si es sensible al contenido celular de este nucleótido. Estudios de fotomarcaje revelan la directa interacción de ATP con GLUT 1 (Hebert y Carruthers, 1986; Carruthers, 1986; Carruthers y Helgerson, 1989; Wheeler, 1989; Carruthers *et al.*, 1989; Jacquez, 1983; Levine *et al.*, 1998; Helgerson *et al.*, 1989). Análisis sobre la secuencia primaria de GLUT 1 revelan la presencia de tres segmentos con homología a secuencias aminoacídicas que son parte de sitios de unión a nucleótidos en un numero de ATPasas y proteínas que unen ATP (Walker *et al.*, 1982; Fry *et al.*, 1986; Levine *et al.*, 1998). El dominio I comprende los residuos 111 a 118 (Gly-Phe-Ser-Lys-Leu-Gly-Lys-Ser), el dominio II a los residuos 225 a 229 (Lys-Ser-Val-Leu-Lys) y el dominio III a los residuos 332 a 338 (Gly-Arg-Arg-Trp-Leu-His-Leu). En base al modelo de 12 α - hélices, el dominio I predicho abarca parte del segmento transmembrana 3 y el lazo extracelular que conecta el segmento 3 y 4, el dominio II esta localizado en el lazo intracelular que une los segmentos transmembrana 6 y 7, y el dominio III se localiza entre los segmentos transmembrana 8 y 9 (Figura 1).

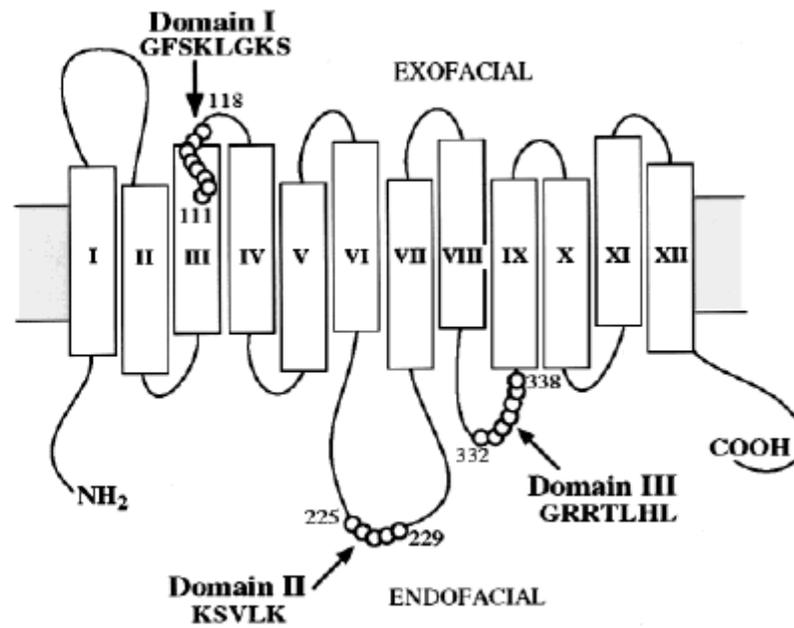


Figura 1. Modelo de 12 α - helices para el transportador GLUT 1. Se muestran dominios predichos de unión a nucleótidos. Dominios se indican como círculos blancos, con cada círculo representando un aminoácido (*Biochemistry* 40, 7874-7881).

En los últimos años se ha validado la utilización de inhibidores de tirosina quinasas con especificidad para sitios de unión de ATP como herramientas apropiadas para la detección de sitios con características funcionales de sitios de unión de nucleótidos en GLUT1 (Vera *et al.*, 1996; Vera *et al.*, 2001). Estos inhibidores corresponden a moléculas pequeñas, tanto de origen natural como sintéticas (flavonas, isoflavonas y tirfostinas), que se caracterizan por ser inhibidores específicos de tirosinas quinasas, además de exhibir un gran número de efectos a nivel celular (Gazit *et al.*, 1989; Gazit *et al.*, 1991; Levitzki y Gazit, 1995; Kang y Liang, 1997; Murota y Terao, 2003). De estas moléculas, sólo los inhibidores que se ligan a sitios de unión de ATP fueron capaces de inhibir de manera competitiva la actividad de GLUT1. En cambio, los inhibidores con afinidad por sitios de unión de tirosina, no bloquean la actividad de GLUT1 o la inhiben de manera no competitiva (Vera *et al.*, 1996, Vera *et al.*, 2001). La forma en que estos dominios de unión a ATP en GLUT 1, puedan estar afectando la actividad de esta proteína, llevó a formular la hipótesis que estos dominios regularían su función, formando parte de sitios alostéricos de unión a inhibidores. Se generaron entonces por mutagénesis sitio-dirigida 3 mutantes del transportador silvestre, K114R del dominio I, K225Q y S226A del dominio II y luego de expresarlas en ovocitos de *Xenopus laevis*, se evaluó su comportamiento cinético y el efecto de los inhibidores pentoxifilina y quercetina de unión exofacial y citocalasina B y tirfostina A 47 de unión endofacial.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales

3-O-metilglucosa, D-glucosa, citocalasina B, quercetina, tirfostina A47, benzocaína, pentoxifilina, APS, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. [³H] 3-O-metilglucosa fue adquirido de American Radiolabeled Chemicals Inc, USA, mientras que el NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl, 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 Mol 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 mMESSAGE 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.). El anticuerpo monoclonal utilizado fue adquirido de Alpha Diagnostic

Equipos

La lupa fue adquirida de Olympus. 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 a temperatura ambiente.

3.2 Generación de mutantes de GLUT 1 en los dominios de unión a nucleótidos.

3.2.1 Mutagénesis sitio-dirigida.

Diseño de partidores: El cDNA de GLUT 1 contenido en el vector pGEM se utilizó como molde para generar mutantes sitio específicas. Se diseñaron 3 juegos de partidores, oligonucleótidos complementarios conteniendo en su secuencia la mutación deseada. Se resaltan en negro el codón correspondiente a cada cambio aminoacídico.

K114R:

Sen 5'-GTG CTC ATG GGC TTC TCG **AGA** CTG GGC AAG TCC TTT G- 3'
 As 5'-C AAA GGA CTT GCC CAG **TCT** CGA GAA GCC CAT GAG CAC- 3'

K225Q:

Sen 5'-C GAG GAG AAC CGG GCC **CAG** AGT GTG CTA AAG AAG C- 3'
 As 5'-G CTT CTT TAG CAC ACT **CTG** GGC CCG GTT CTC CTC G- 3'

S226A:

Sen 5'-CG CAG CTT CTT TAG CAC **AGC** CTT GGC CCG GTT CTC C-3'
 As 5'-G GAG AAC CGG GCC AAG **GCT** GTG CTA AAG AAG CTG CG-3'

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Las mutantes fueron amplificadas por PCR siguiendo el siguiente protocolo. En un tubo de 1,5 ml se adicionaron 10 μ l de tampón 10 X (Tris-HCl 200mM pH 8,8; KCl 100 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 mM, MgSO_4 20 mM, 1% Tritón X-100, 1mg/ml BSA libre de nucleasas), 50 ng de templado, 125 g de cada partidor, 1 μ l de dNTPs, 1 μ l de *pfu* Turbo DNA polimerasa (2,5 U/ μ l) y ddH₂O para completar un volumen final de 50 μ l. Se adicionaron 30 μ l de aceite mineral para evitar evaporación de la mezcla. El ciclo termal utilizado se detalla a continuación:

- | | | |
|-------------------------|--|-----------|
| 1- 95 °C x 30 segundos | | |
| 2- 95 °C x 30 segundos | | 12 ciclos |
| 3- 55 °C x 55 segundos | | |
| 4- 68 °C x 330 segundos | | |
| | | |

Electroforesis de DNA en geles de agarosa: Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1,5 % en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,0), agregando 2 μ l de bromuro de etidio para su visualización bajo luz ultravioleta. Se utilizó como estándar de tamaño molecular la mezcla comercial de fermentas de 1 kb.

3.2.2 Transformación de células XL1- Blue supercompetentes.

Antes de proceder con la transformación se procedió a digerir con la enzima DpnI (10U/ μ l) el DNA parental metilado, que se encuentra en el producto de amplificación. El tiempo de digestión fue de 1 hora a 37 °C. Luego las células XL1- Blue fueron descongeladas y 50 μ l de ellas fueron depositadas en un tubo preenfriado y se adicionó una alícuota de DNA tratado con DpnI, se le dió un pulso de calor a 42 °C por 45 segundos y se depositó en hielo por 2 minutos, se agregó 0,5 ml de SOC precalentado a 42 °C y se incubó a 37 °C por 1 hora a 250 rpm. Las bacterias fueron sembradas en placas de agar-ampicilina (100 mg/mL) a 37 °C para seleccionar bacterias portadoras del clon. Se tomaron algunas colonias y fueron crecidas en LB líquido para aislar DNA plasmidial (miniprep) y así revisar el patrón de restricción con HindIII. Cada cDNA fue secuenciado, para verificar la correcta construcción de las mutantes de GLUT 1.

3.2.3 Purificación de DNA plasmidial a gran escala (Midiprep).

Para asegurar una concentración adecuada de DNA tanto de la proteína silvestre como de las mutantes se realizó una amplificación y aislamiento a gran escala en base al protocolo de kit midiprep Qiagen. Este consiste en un protocolo modificado del método clásico de lisis alcalina seguida de la unión del DNA plasmidial a una resina de intercambio aniónico bajo apropiadas condiciones de sales y pH. 50 ml de bacterias fueron centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 4 ml de tampón P1 que contenía RNAsa (Resuspension Buffer P1), luego las células se lisaron por la adición de 4 ml de tampón P2 (Lysis Buffer P2), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. La reacción se

detuvo con la adición de 4 ml de tampón de neutralización (Neutralization Buffer P3) y luego de 15 minutos de incubación a 4 °C la mezcla se trasvasió a un tubo de polipropileno y se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos. El sobrenadante claro conteniendo el DNA plasmidial se pasó a través de la columna de intercambio aniónico y la resina se lavó dos veces con tampón QC (Wash buffer QC). El DNA se eluyó con 5 ml de tampón QF (elution buffer QF) y fue precipitado con la adición de 0,7 volúmenes de isopropanol.

La concentración de DNA se calculó por espectrofotometría con la siguiente fórmula:

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

3.3 Expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*.

3.3.1 Síntesis *in vitro* de mRNA de GLUT 1 silvestre y mutantes K114R, K225Q y S226A.

El plásmido conteniendo los cDNA de la proteína silvestre y sus mutantes fue linearizado con la enzima XbaI, incubando la mezcla de reacción a 37 °C por 2 a 3 horas. El DNA lineal se purificó con la adición de una solución conteniendo proteinasa K (10mg/ml), SDS 5% y agua desionizada para completar un volumen final de 30 μL . La mezcla fue homogeneizada por inversión e incubada a 50 °C por 30 minutos. Se realizó una extracción fenólica adicionando a la mezcla 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) y agitando vigorosamente en vortex. Se centrifugó 1 minuto a temperatura ambiente

a 4000 rpm, se separó la fase acuosa y se le agregó un volumen de NH_4OAc y dos volúmenes de etanol absoluto. Esto se incubó a -20°C al menos por 15 minutos. Finalmente se centrifugó a 13000 rpm 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. El mRNA se obtuvo con el uso del kit transcripción *in vitro*, T7 RNA polimerasa (mMessage mMachine de Ambion). Siempre con materiales libres de RNasas en un tubo de 1,5 ml se adicionaron 2 μl de tampón 10 X para T7, 10 μl de NTP/CAP (ATP 15 mM; CTP 15 mM; UTP 15 mM; GTP 3 mM, CAP 12mM), 1 μg de cDNA lineal, 2 μl mix de enzima y se llevó a un volumen final de 20 μl con agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 37°C por 2 horas, para asegurar un máximo rendimiento. Luego se trató con 1 μl DNasa Turbo por 15 minutos a 37°C , para remover el templado de DNA. La reacción se detuvo y se precipitó el RNA adicionando 30 μl agua libre de nucleasas y 30 μl de LiCl e incubando por 1 hora a -20°C y centrifugado a máxima velocidad por 30 minutos como mínimo. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con 1 ml de etanol 70 %. Luego de la completa eliminación del etanol, se resuspendió en 20 μl de agua libre de nucleasas y se determinó su concentración por espectrofotometría aplicando la formula:

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

$$1000$$

3.3.2 Tratamiento de *Xenopus laevis* y obtención de ovocitos.

Hembras adultas de *Xenopus laevis* fueron anestesiadas por inmersión en 1 L de solución de benzocaína 0,08 % a 4 °C. La rana completamente dormida fue depositada en hielo y la extracción del tejido ovárico se llevó a cabo por incisión abdominal. Aproximadamente 2 g fueron depositados en medio OR II (NaCl 100 mM, KCl 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes 5 mM, pH 7,5), fueron disgregados en forma mecánica y luego incubados por 2 horas a agitación constante con colagenasa tipo I (1,2 mg/ml). Los ovocitos se lavaron con OR II y se seleccionaron los que se encontraban en estadio de maduración V y VI. Se cambiaron a medio OR I (CaCl₂ 20 mM, NaCl 100 mM, KCl 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes 5 mM, pH 7,5) y se incubaron a 15 °C por 3 a 4 horas antes de inyección.

3.3.3 Microinyección de ovocitos de *Xenopus laevis*.

Se utilizó el sistema de inyección automatizado Nanoject II Auto-nanoliter Injector. Los ovocitos fueron inyectados con aproximadamente 40 ng de mRNA de GLUT 1 silvestre y mutantes e incubados a 15 °C por 48 horas en medio OR I. Dos veces por día se inspeccionó la integridad de los ovocitos, desechando siempre los que presentaban deterioro y cambiando el medio de incubación cada vez.

3.4 Inmunodetección de GLUT 1 silvestre y mutantes.

3.4.1 Preparación membranas de ovocitos.

Grupos de 20 ovocitos íntegros, inyectados con 40 ng de mRNA de GLUT 1 silvestre o de proteínas mutantes, fueron separados en tubos de 1,5 ml y se les adicionó 100 µl de solución de homogenización (HEPES 10 mM, pH 7,5; sacarosa 250 mM, DTT

3mM, PMSF 1mM, EDTA 1mM, pestatina A 1 μ g/ μ L, aprotinina 10 mg/mL, leupeptina 10 mg/mL). Las células se homogeneizaron por pipeteo repetitivo con el uso de una pipeta P 200 y luego se centrifugó varias veces a 1000 rpm por 30 segundos a 4 °C, se rescató el sobrenadante y se almacenó a -20 °C hasta su utilización. Como control negativo se utilizaron ovocitos sin inyectar.

3.4.2 Análisis de Western Blot.

Las muestras de membranas totales se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%. Cada carril fue cargado con la muestra de las correspondientes membranas totales y luego electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa. La membrana de nitrocelulosa fue incubada con solución de bloqueo (leche descremada 5%, BSA 1%, tween 0,03%) por 2 horas. Luego de esto se incubó por 8 horas con el anticuerpo primario anti-GLUT 1 (dilución 1: 1000), dirigido contra un péptido del carboxilo terminal de la proteína. Se lavó 3 veces con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina por 1 hora. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente con agitación constante. Finalmente se lavó con PBS y se reveló con diaminobencidina 0,05 % en PBS y 0,03 % de peróxido de hidrogeno en la oscuridad.

3.5 Análisis funcional de GLUT 1 silvestre y mutantes

3.5.1 Determinación de constantes cinéticas en condiciones trans-cero de entrada

48 horas post inyección con 40 ng de mRNA de cada proteína los ovocitos en medio OR I, fueron seleccionados y agrupados. El transporte de 1, 2, 4, 8, 16, 30 y 60 mM

3-O-metilglucosa se midió a temperatura ambiente con $0,8 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -metilglucosa por ensayo, en una mezcla de reacción de $200 \mu\text{l}$. El tiempo de captación por ensayo fue de 3 minutos, tiempo obtenido a partir de la cinética de captación para 3-O-metilglucosa (dato no mostrado). Los ovocitos se depositaron en tubos de 2 ml y se adicionó la mezcla de reacción por el tiempo determinado; luego la captación fue detenida con OR I frío, los ovocitos se lavaron y fueron lisados con $100 \mu\text{l}$ de solución Tris-HCl 10mM, 2 % SDS y la radioactividad se cuantificó por centelleo líquido. Cada ensayo se realizó por triplicado con 3 ovocitos por ensayo. Además el transporte basal en ovocitos sin inyectar fue determinado bajo las mismas condiciones, valor que fue restado a cada resultado obtenido con los ovocitos inyectados.

3.5.2 Determinación de IC_{50} para inhibidores de GLUT 1 silvestre y mutantes en condiciones trans-cero de entrada

Para los ensayos de inhibición se prepararon concentraciones stock de los 4 inhibidores utilizados. Para quercetina se prepararon concentraciones de trabajo de 1 mM y 5 mM, para citocalasina B concentraciones de 50 y $800 \mu\text{M}$, tirfostina A 47 una concentración de 10 mM, todos disueltos en DMSO (dimetilsulfóxido). Para el caso de pentoxifilina la solución se preparó en agua destilada a una concentración de 100 mM.

La captación de metilglucosa 1 mM se midió a 3 minutos a temperatura ambiente en presencia de concentraciones crecientes de los inhibidores. Para quercetina 0 a $100 \mu\text{M}$, pentoxifilina 0 a 30 mM, tirfostina A 47 0 a $500 \mu\text{M}$ y citocalasina B 0 a $30 \mu\text{M}$ en un volumen final de reacción de $200 \mu\text{l}$ conteniendo $0,8 \mu\text{Ci}$ de ^3H -metilglucosa. La reacción se detuvo con OR I frío y la radioactividad fue cuantificada por centelleo líquido. Cada

determinación se realizó por triplicado y se les resto el valor obtenido para el transporte basal en ovocitos sin inyectar

3.5.3 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico para determinar el grado de significancia de las diferencias en los datos obtenidos por las proteínas mutantes, con respecto a los datos de GLUT 1 silvestre aplicando t-Student a valores promedios no pareados.

4. RESULTADOS

El estudio del posible rol que ejercen los dominios de unión a nucleótidos sobre la función de GLUT 1, llevó a la construcción de 4 mutantes con ubicación específica sobre los dominios de unión I y II para evaluar su comportamiento frente a dos inhibidores de unión exofacial y dos de unión endofacial. Como modelo experimental se utilizó la expresión heteróloga de los transportadores silvestre y mutados en ovocitos de *Xenopus laevis*, determinándose entonces sus constantes cinéticas para el transporte de metilglucosa. A pesar de la ventaja que ofrece este sistema por sobre otros sistemas de expresión, como se explica en detalle más adelante, no está exenta de problemas.

En una primera instancia se comenzó trabajando con ovocitos a 72 horas post inyección, sin embargo la tasa de deterioro que mostraron los ovocitos al cabo de este tiempo fue alto. Esto hizo necesario trabajar con un tiempo de expresión más corto de 48 horas, no sin antes evaluar las diferencias con respecto al transporte basal. Incluso a 36 horas post inyección ya se podía obtener una diferencia significativa en épocas de mayor expresión.

En cuanto a los inhibidores no hubo mayores problemas, no obstante se debe señalar que los intervalos de concentración se ven limitados por la poca solubilidad de algunos de los inhibidores y por el efecto citotóxico de su solvente (DMSO). Esta limitación en las concentraciones accesibles a analizar fue notable sobre todo para quercetina y tirfostina A 47, alcanzando para este último inhibidor solo un 60 % de inhibición a las concentraciones más altas que se pudieron estudiar.

4.1 Expresión de GLUT 1 silvestre y mutantes en ovocitos de *Xenopus laevis*.

La elección de cada mutante se realizó en base a las características de los aminoácidos involucrados en estos sitios. Es así que en el caso de lisina 114 ésta fue cambiada por arginina, un aminoácido con una cadena lateral de un tamaño levemente mayor y que comparte el hecho de tener una carga neta positiva en su cadena lateral a pH fisiológico. Para el caso de lisina 225 se mutó por glutamina, aminoácido con una cadena lateral de menor tamaño, que mantiene la polaridad, pero no la carga neta positiva. En cuanto a serina 226 esta fue reemplazado por el residuo apolar alanina. La correcta construcción de cada mutante fue confirmada por secuenciación de los correspondientes cDNA, que luego fueron utilizadas en la síntesis *in vitro* de mRNA para su análisis funcional. Los mRNA generados fueron inyectados en ovocitos de *Xenopus laevis* y se determinó su expresión y actividad funcional mediante inmunodetección y ensayos de transporte respectivamente.

La expresión de la proteína silvestre y de cada mutante en ovocitos de *Xenopus laevis* se analizó mediante la extracción y fraccionamiento de proteínas de membranas totales en un gel de poliacrilamida SDS- PAGE 10 %, el cual fue revelado con un anticuerpo contra un péptido del carboxilo terminal (Figura 2). Como control negativo se utilizaron membranas de ovocitos sin inyectar. Se puede observar que todas las proteínas mutantes mostraron niveles relativamente similares de expresión respecto de la proteína silvestre, como se evidencia por la aparición de una proteína sensible al anticuerpo contra GLUT 1, que se aprecia como una banda con un peso molecular aproximado de 55 kDa. Esta banda no era detectada en membranas aisladas desde ovocitos sin inyección.

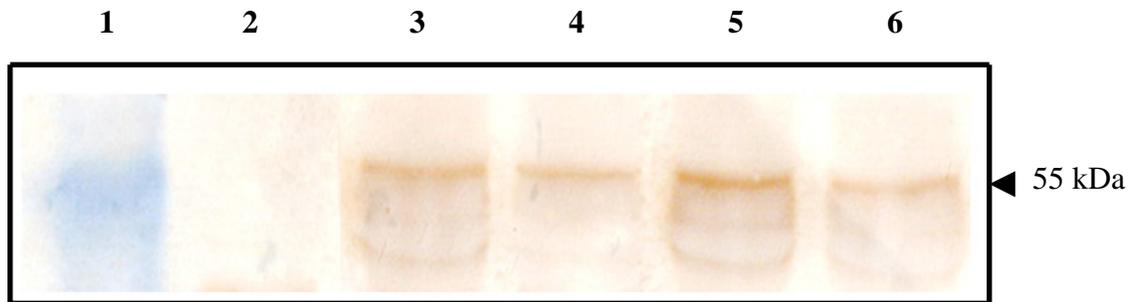


Figura 2. Expresión de GLUT 1 silvestre y mutantes en ovocitos de *Xenopus laevis*

Proteínas totales aisladas desde membranas de ovocitos de *Xenopus laevis* fueron sometidas a gel de poliacrilamida 10% en condiciones desnaturalantes, luego transferidas a nitrocelulosa e inmunodetectadas con anticuerpo dirigido contra un péptido del carboxilo terminal de GLUT 1. Cada carril fue cargado con proteínas de membrana de *Xenopus laevis* 2 días post inyección con 40 ng de mRNA. Carril 1) estándar de peso molecular, 2) control negativo, correspondiente a membranas de ovocitos sin inyectar, 3) GLUT 1 silvestre, 4) K114R, 5) K225Q, 6) S226A.

4.2 Captación de 3-O-metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada para GLUT 1 silvestre y mutantes

Tanto la proteína silvestre como las mutantes mostraron la capacidad de transportar 3-O-metilglucosa, un sustrato análogo no metabolizable de glucosa. Cinéticas de captación para este sustrato obtenidos en nuestro laboratorio indican una captación lineal hasta los 10 minutos aproximadamente (Raddatz, 2006), por lo que el tiempo elegido para la determinación de sus constantes cinéticas fue de 3 minutos, para así mantener las condiciones de velocidad inicial. Para los ensayos de velocidad inicial de transporte se utilizaron concentraciones de 3-O-metilglucosa desde 0 a 60 mM

Todos los datos de velocidad inicial de transporte en función de la concentración de metilglucosa se ajustaron a una curva hiperbólica (Figura 3). Los cambios mutacionales realizados en estos dominios no afectaron de forma significativa las propiedades cinéticas del transportador, como se deduce al evaluar que todas las proteínas mutantes se comportaron de forma similar a la proteína silvestre en ensayos trans-cero de entrada. Es así que para GLUT 1 silvestre se obtuvo una K_M de 18 mM, para K114R una K_M de 16 mM, K225Q una K_M de 11 mM y S226A una K_M de 12 mM (Tabla I).

En cuanto al valor de V_{max} , el comportamiento de las mutantes fue semejante al de GLUT 1 silvestre. Para K114R, K225Q, y S226A los valores de V_{max} fueron 225, 200, 250 (pmoles /ovo x min) respectivamente. Cabe señalar que la expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* presenta una complicación para la determinación de V_{max} . Se sabe que la expresión es dependiente de los grupos de ovocitos utilizados (de la rana utilizada) y de la época del año en que se trabaja, exhibiendo grandes diferencias en valores de V_{max} entre

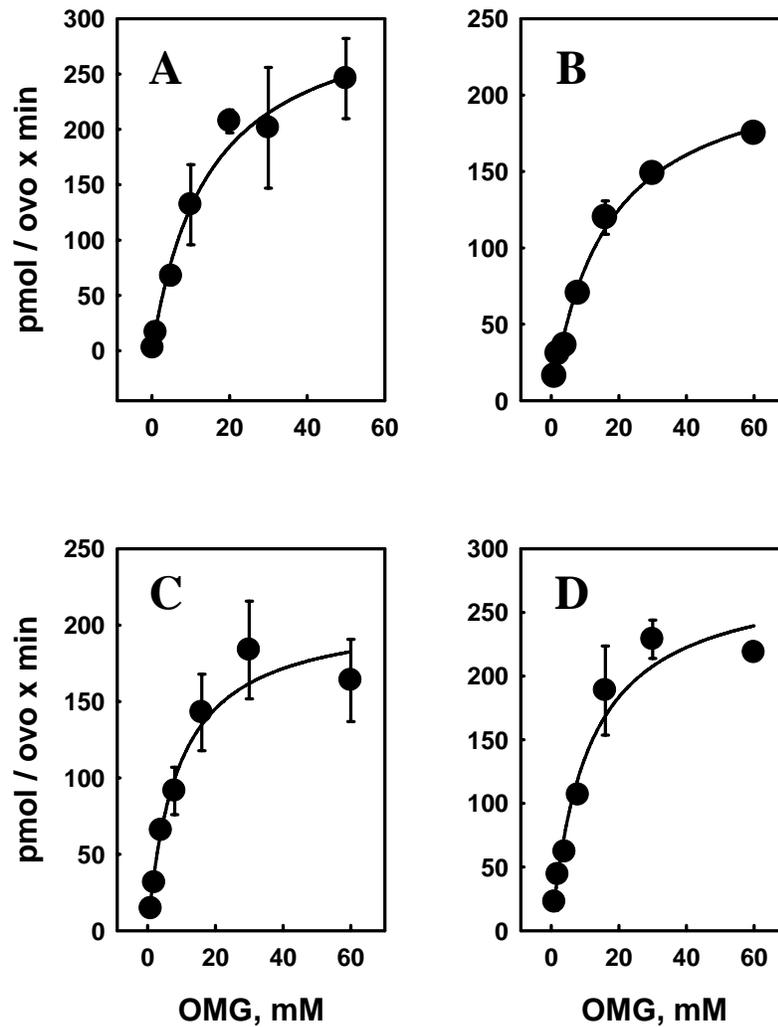


Figura 3. Curvas de saturación para la captación de 3-O-metilglucosa en condiciones **trans-cero de entrada**. Las velocidades se obtuvieron durante 3 minutos de captación usando concentraciones de 3-metilglucosa desde 1 a 60 mM sobre ovocitos inyectados con 40 ng de mRNA. A) GLUT 1 silvestre, B) K114R, C) K225Q, D) S226A. Los valores corresponden al promedio \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

una época del año y otra. Esto último se pudo comprobar en este trabajo, encontrándose diferencias de hasta 3 veces en distintas épocas del año, sin embargo no se detectaron grandes diferencias entre los distintos grupos de ovocitos analizados, por lo que los datos presentados aquí corresponden a los obtenidos en los meses desde mayo a septiembre y que resultó ser la estación de mejor expresión.

Los valores de K_M y V_{max} se resumen en la tabla I. En la figura 4 se muestra el valor de la razón V_{max}/K_M , calculada como una medida de la eficiencia catalítica de las proteínas. Es de manifiesto un comportamiento análogo de las proteínas mutantes con respecto a GLUT 1 silvestre.

4.3 Rol de los dominios de unión a nucleótidos de GLUT 1 en su interacción con inhibidores.

Sabiendo que GLUT 1 silvestre y las mutantes mostraron un mismo comportamiento frente al transporte de metilglucosa se procedió a determinar el efecto de los inhibidores sobre su actividad funcional. El análisis se realizó en base a ensayos en condiciones trans-cero de entrada usando como sustrato 3-O-metilglucosa a una concentración fija de 1 mM, durante 3 minutos de captación y en presencia de concentraciones variables de inhibidor. Los inhibidores utilizados fueron citocalasina B, pentoxifilina, quercetina, tirfostina A 47 y se eligieron en base a sus características de interacción con GLUT 1, sus estructuras se muestran en la figura 5. Quercetina es una flavona que se une a sitios de unión a nucleótidos en tirosinas quinasas y se ha descrito que interacciona con la cara exofacial del transportador GLUT 1 (Saldivia, 2003). Pentoxifilina pertenece a la familia de las metilxantinas, que se han descrito como inhibidores de GLUTs

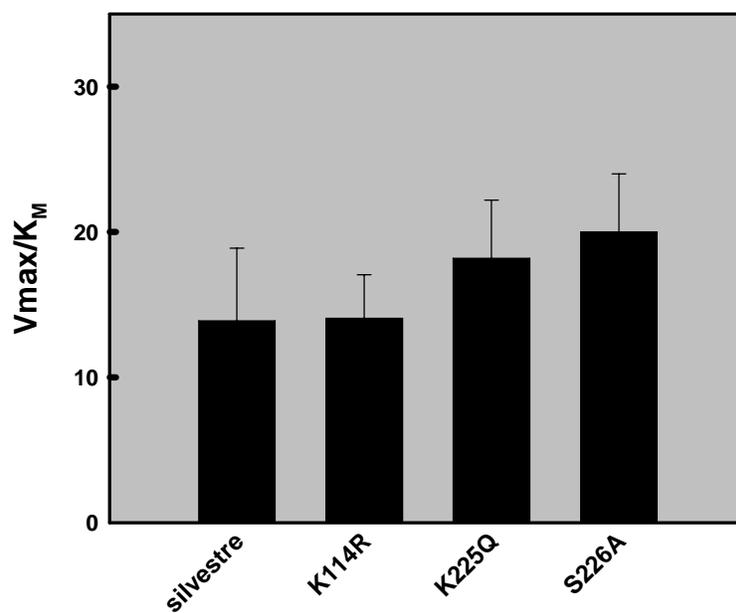


Figura 4. Eficiencia catalítica de GLUT 1 silvestre y sus mutantes. La eficiencia se evaluó como la razón V_{max}/K_M . Los valores de K_M y V_{max} se determinaron como lo indica la leyenda de la figura 3. Los datos fueron analizados estadísticamente para determinar el grado de significancia de las diferencias respecto a la proteína silvestre ($p < 0,05$). No hay diferencias significativas entre estos valores.

	GLUT1	K114R	K225Q	S226A
K_M OMG, mM	18 ± 5	16 ± 3	11 ± 4	12 ± 4
V_{max}, pmol/ovo*min	250 ± 90	225 ± 30	200 ± 10	250 ± 40

Tabla 1. Constantes cinéticas del transporte de 3-O-metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada para GLUT 1 silvestre y mutantes. Los datos corresponden a experimentos realizados en condiciones trans-cero de entrada para el sustrato 3-O-metilglucosa medido en ovocitos de *Xenopus laevis* a 48 horas post inyección con 40 ng de mRNA. Cada valor es resultado del promedio \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

y también existen datos que sugieren una unión exofacial al transportador GLUT 1 (Ojeda, 2005). En cuanto a tirfostina A 47, datos preliminares sugieren que se une a la cara endofacial del transportador (Monsalve, 2001). Finalmente citocalasina B es un clásico inhibidor de GLUT 1 cuya unión al transportador ocurre con su cara endofacial (Basketter y Widdas, 1978; Deves y Krupka, 1978b; Holman y Rees, 1987).

GLUT 1 silvestre fue sensible a todos estos inhibidores, no siendo necesario un periodo de incubación previo a cada ensayo. Las constantes de inhibición aparentes (IC_{50}) sobre el transporte de metilglucosa se obtuvieron ajustando los datos a una curva de inhibición hiperbólica; el ensayo sin inhibidor se consideró como el 100 % de transporte. Los valores de IC_{50} fueron 1,1; 15 y 242 μ M para citocalasina B, quercetina y tirfostina A 47, respectivamente, mientras que el valor fue de 1,8 mM para pentoxifilina (Figura 6).

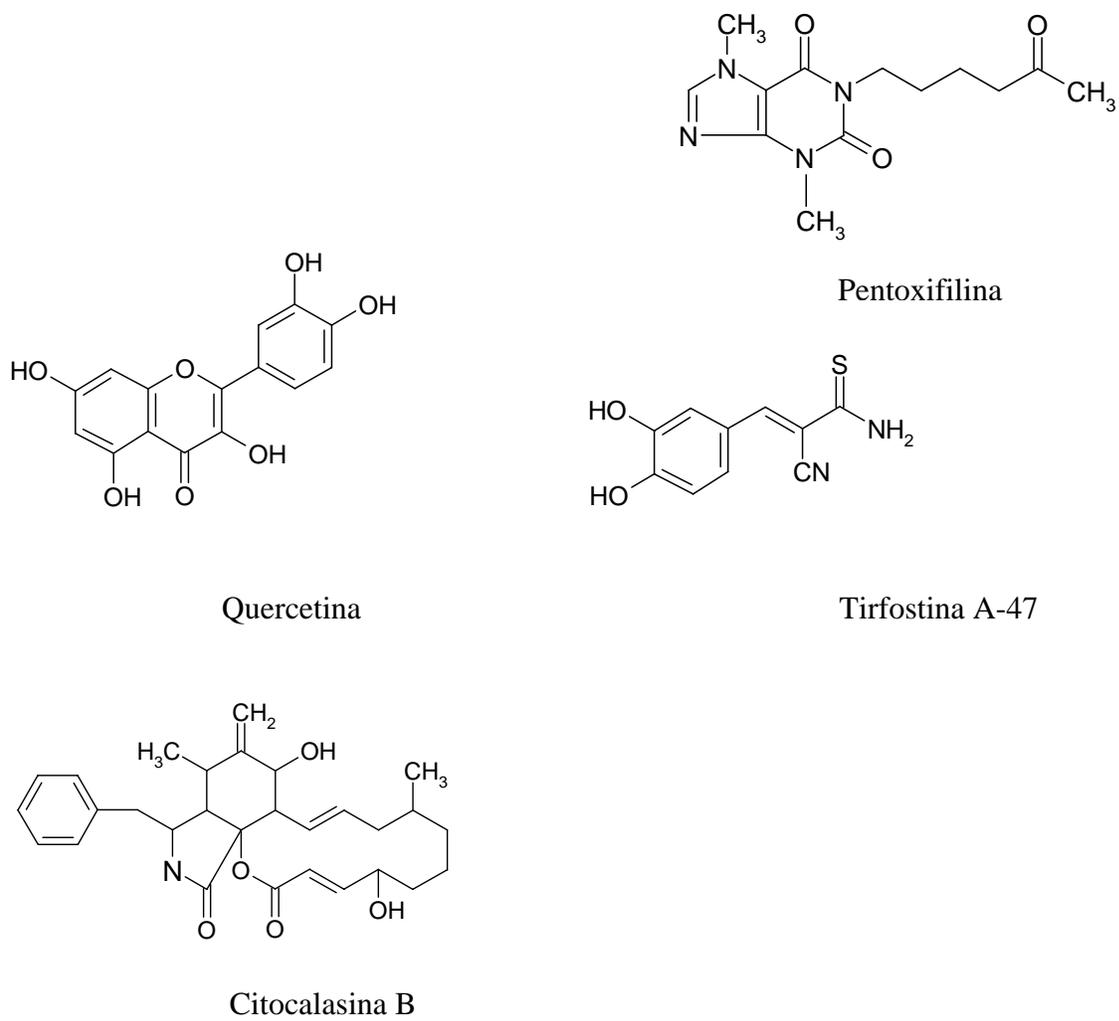


Figura 5. Estructura de los inhibidores de GLUT 1 utilizados en este estudio.

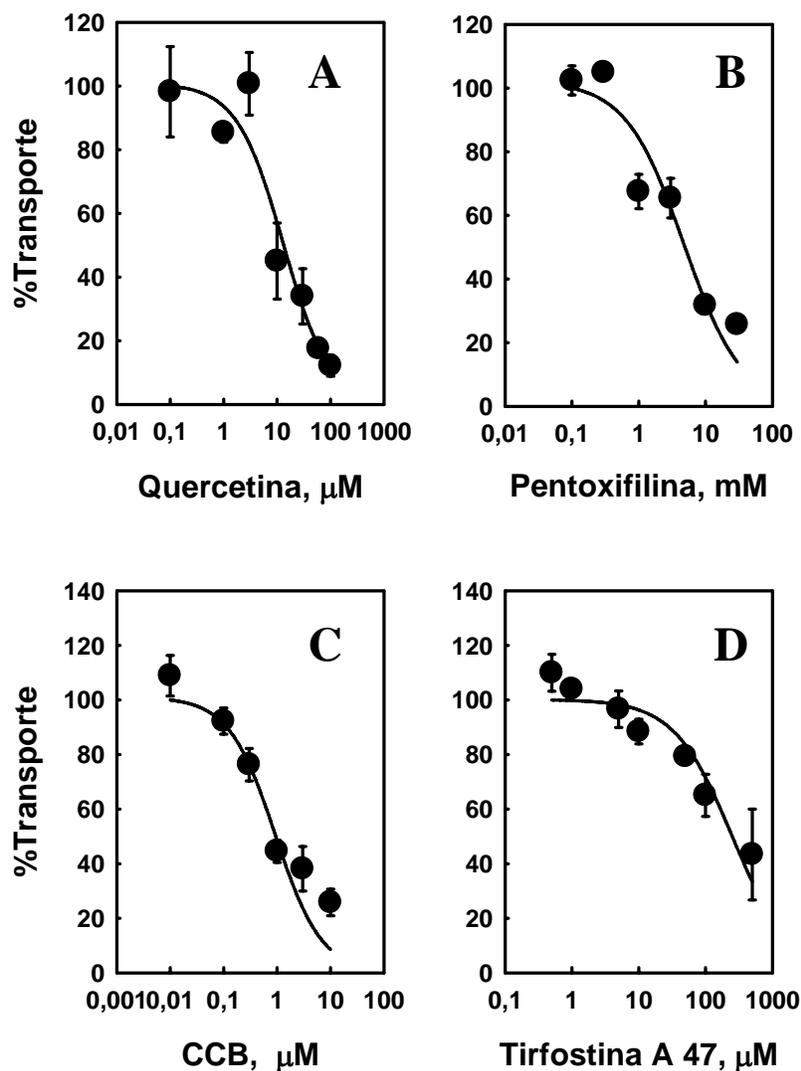


Figura 6. Ensayos de inhibición del transporte de 3-O-metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada para GLUT 1 silvestre. El transporte de 1 mM de metilglucosa se midió en presencia de concentraciones variables de inhibidor. Los datos se presentan como el porcentaje de transporte, considerándose al control sin inhibidor como el 100 %. A) quercetina (0 a 100 μ M), B) pentoxifilina (0 a 30 mM) C) citocalasina B (0 a 10 μ M) y D) tirfostina A 47 (0 a 500 μ M). Los resultados corresponden al promedio \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

4.4 Efecto de inhibidores de unión exofacial sobre las mutantes de GLUT 1.

Los ensayos de transporte de metilglucosa a una concentración fija de 1 mM frente a inhibidores de unión exofacial exhibieron variados resultados. Para pentoxifilina se probaron concentraciones desde 0 a 30 mM. Todas las mutantes presentaron una sensibilidad similar a la obtenida para la proteína silvestre, superando todas el 90 % de inhibición a la concentración más alta que se empleó (Figura 7). La IC_{50} determinada para K114R fue de 2,6 mM, para K225Q fue de 4,4 mM y para S226A fue de 2,4 mM.

En el caso de quercetina el intervalo de concentraciones utilizadas fue desde 0 a 100 μ M. Las dos mutantes del dominio II K225Q ($IC_{50} = 19 \mu$ M) y S226A ($IC_{50} = 20 \mu$ M) no mostraron mayor diferencia con respecto a GLUT 1 silvestre ($IC_{50} = 15 \mu$ M) y presentaron además un porcentaje de inhibición por sobre el 80 % a la concentración más alta que se usó (Figura 8). Sin embargo la mutante del dominio I K114R perdió de manera significativa su sensibilidad, mostrando un IC_{50} de 79 μ M. A la concentración más alta solo presentó un 50 % de inhibición. Como no es técnicamente posible usar concentraciones mayores a 100 μ M de este inhibidor, debido a su poca solubilidad, no se logró obtener un porcentaje mayor de inhibición final.

Las figuras 7D y 8D corresponden a gráficos semi-logarítmicos de las constantes de inhibición aparente para quercetina y pentoxifilina, que permiten apreciar de mejor manera las diferencias de cada mutante respecto de la proteína silvestre. Se determinó el grado de significancia de las diferencias ($p < 0,05$) por la aplicación de t- Student sobre promedios de valores no pareados. Solamente el valor de IC_{50} que presenta K114R frente a quercetina resultó ser estadísticamente diferente ($P = 0,004$) con respecto a GLUT 1.

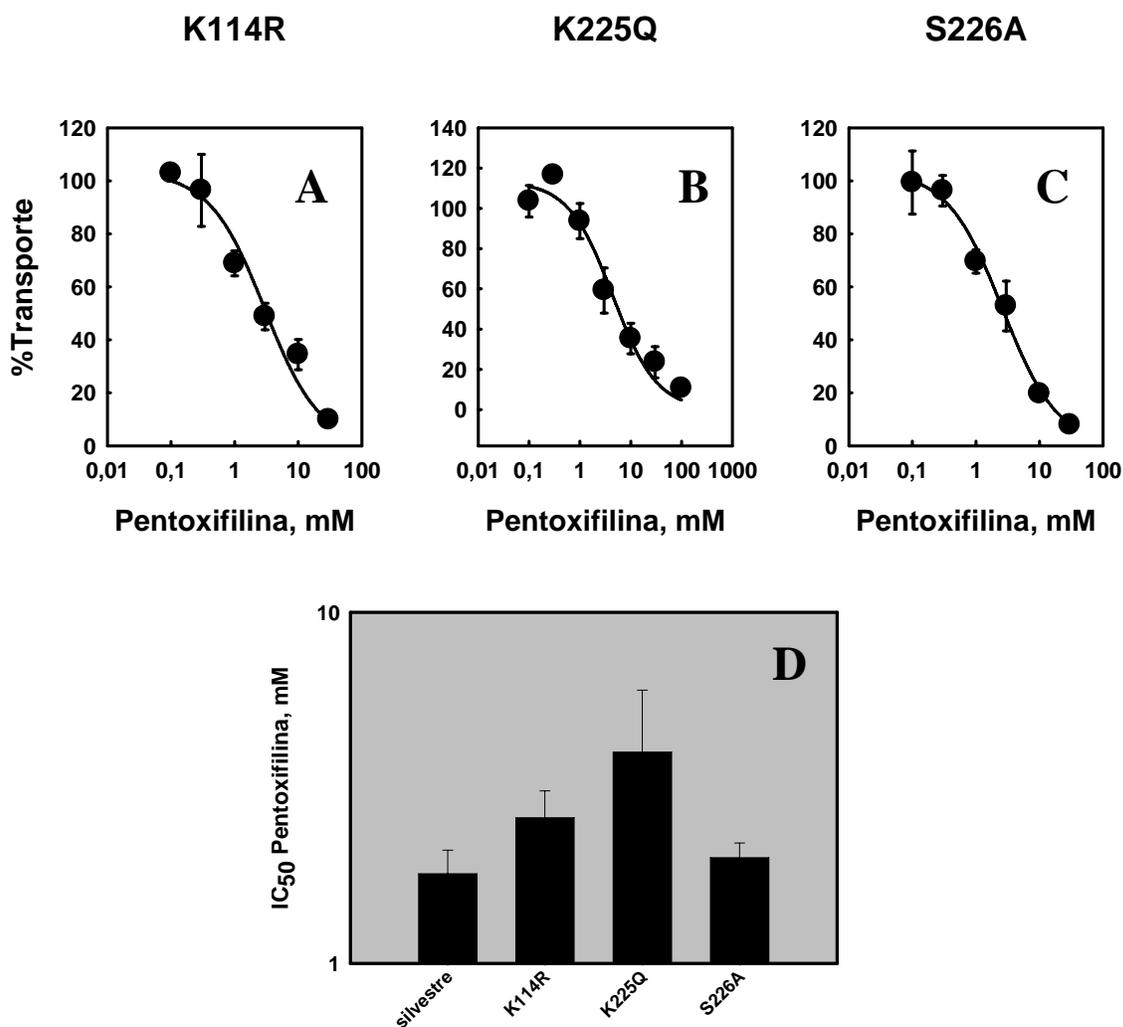


Figura 7. Ensayos de inhibición del transporte de metilglucosa por pentoxifilina en mutantes de GLUT 1. El transporte de 1 mM de metilglucosa se midió en presencia de concentraciones de 0 a 30 mM de pentoxifilina. Los valores de IC₅₀ se determinaron por el ajuste no lineal de los datos de inhibición por pentoxifilina a una función de decaimiento hiperbólico A) K114R, B) K225Q, C) S226A, D) Valores de IC₅₀ para GLUT 1 silvestre y sus mutantes. Los resultados corresponden al promedio \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente para determinar el grado de significancia de las diferencias respecto a la proteína silvestre ($p < 0,05$). No hay diferencias significativas entre estos valores.

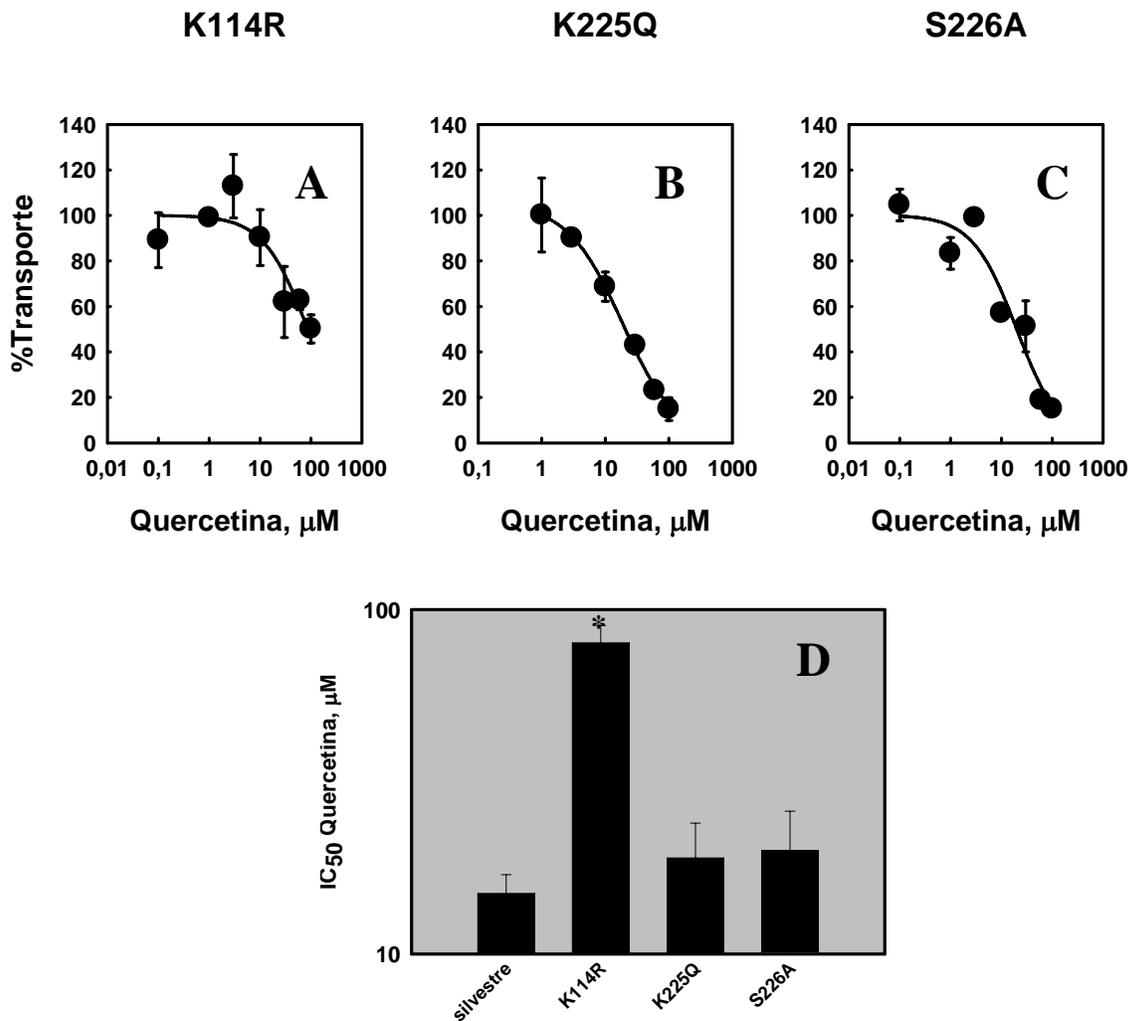


Figura 8. Ensayos de inhibición del transporte de metilglucosa por quercetina en mutantes de GLUT 1. El transporte de 1 mM de metilglucosa se midió en presencia de concentraciones de 0 a 100 μM de quercetina. Los valores de IC_{50} se determinaron por el ajuste no lineal de los datos de inhibición por quercetina a una función de decaimiento hiperbólico A) K114R, B) K225Q, C) S226A, D) Valores de IC_{50} para GLUT 1 silvestre y sus mutantes. Los resultados corresponden al promedio \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente para determinar el grado de significancia de las diferencias respecto a la proteína silvestre ($p < 0,05$). K114R mostró diferencia significativa respecto al valor de GLUT 1 silvestre (*).

4.5 Efecto de inhibidores de unión endofacial sobre mutantes de GLUT 1.

Se evaluó la actividad funcional de las mutantes frente a concentraciones variables de inhibidores de unión endofacial a GLUT 1. Para citocalasina B se utilizaron concentraciones desde 0 a 10 μM . La figura 9A muestra que la mutante K114R del dominio I (exofacial) alcanzó un 85 % de inhibición y las dos mutantes del dominio II (endofacial) K225Q y S226A un 70 % a la concentración más alta que se empleó. El valor de IC_{50} determinado para GLUT 1 fue de 1,1 μM , y para K114R, K225Q y S226A fueron de 1,9; 4,0 y 2,5 μM , respectivamente. Si bien el incremento del IC_{50} de la mutante K225Q a simple vista pudiera ser significativo, de acuerdo a sus valores de desviación estándar se puede deducir un comportamiento similar de todas las proteínas frente a este inhibidor. Esto se comprobó al analizar estadísticamente las diferencias (Figura 9 D)

El otro inhibidor de interacción endofacial que utilizamos fue tirfostina A 47. A concentraciones variables entre 0 a 500 μM , para K114R inhibió solo en un 50 % aproximadamente el transporte de 3-O-metilglucosa (Figura 10 A), obteniéndose un valor de IC_{50} de 285 μM . Para el caso de S226A hubo una pérdida de sensibilidad significativa ($P=0,0001$), la IC_{50} obtenida superó en algunos ensayos una concentración de 1500 μM ; además solo se alcanzó un 40 % de inhibición a la concentración más alta de inhibidor que se ensayó. Para esta mutante se utilizaron concentraciones que van desde 0 a 800 μM , concentraciones superiores no se pueden trabajar debido a la poca solubilidad del inhibidor.

El dato más notable se obtuvo con la mutante K225Q. Esta proteína perdió por completo la sensibilidad por tirfostina A 47 en el intervalo de concentraciones empleadas (Figura 10 B). A la concentración más elevada de inhibidor que se empleó, la inhibición

observada es marginal ($< 10\%$). El valor de IC_{50} que se puede deducir de estos datos es al menos superior a $10.000 \mu\text{M}$ (Figura 10 D)

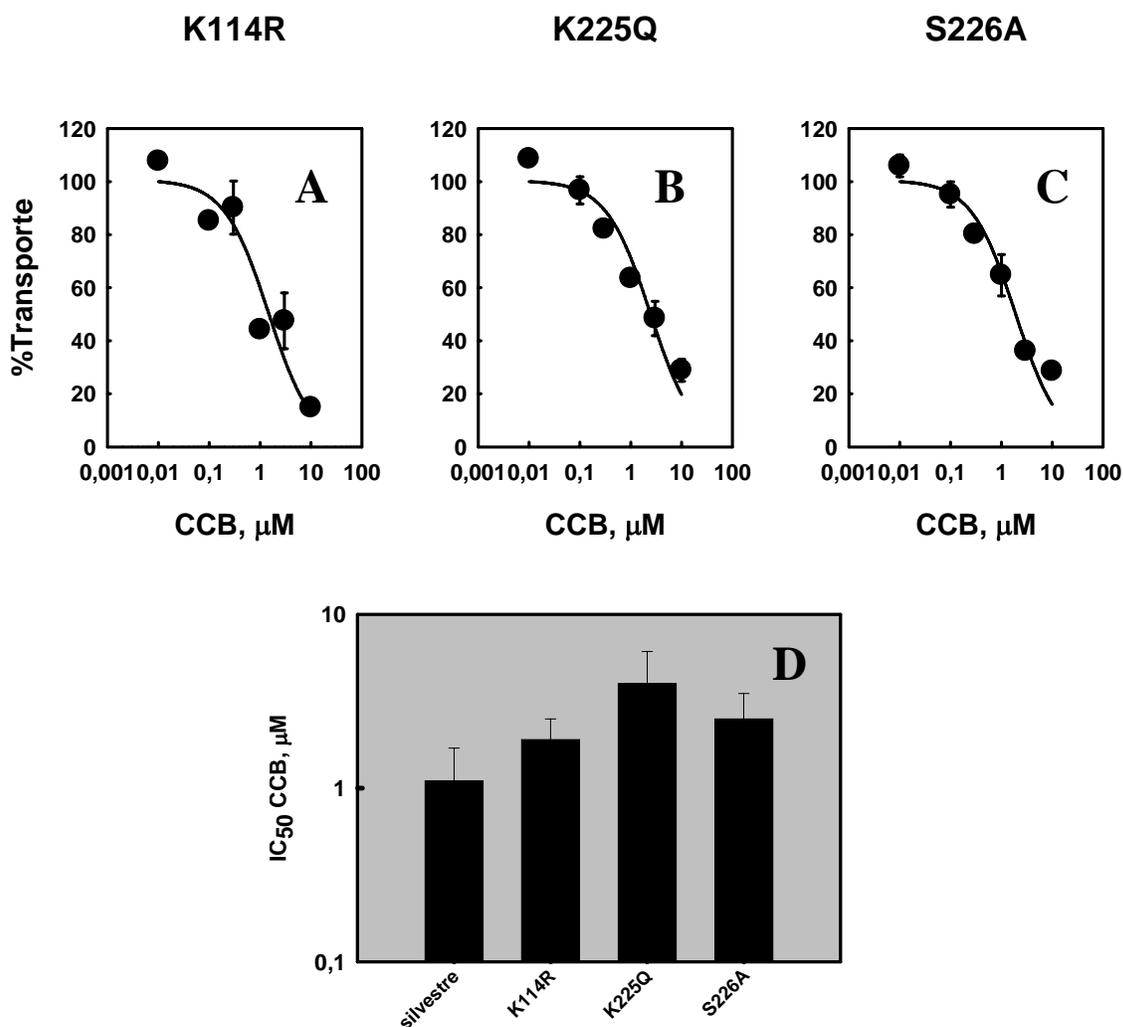


Figura 9. Ensayos de inhibición del transporte de metilglucosa por citocalasina B en mutantes de GLUT 1. El transporte de 1 mM de metilglucosa se midió en presencia de concentraciones de 0 a 10 μM de citocalasina B. Los valores de IC_{50} se determinaron por el ajuste no lineal de los datos de inhibición por citocalasina B a una función de decaimiento hiperbólico A) K114R, B) K225Q, C) S226A, D) Valores de IC_{50} para GLUT 1 silvestre y sus mutantes. Los resultados corresponden al promedio \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente para determinar el grado de significancia de las diferencias respecto a la proteína silvestre ($p < 0,05$). No hay diferencias significativas entre estos valores.

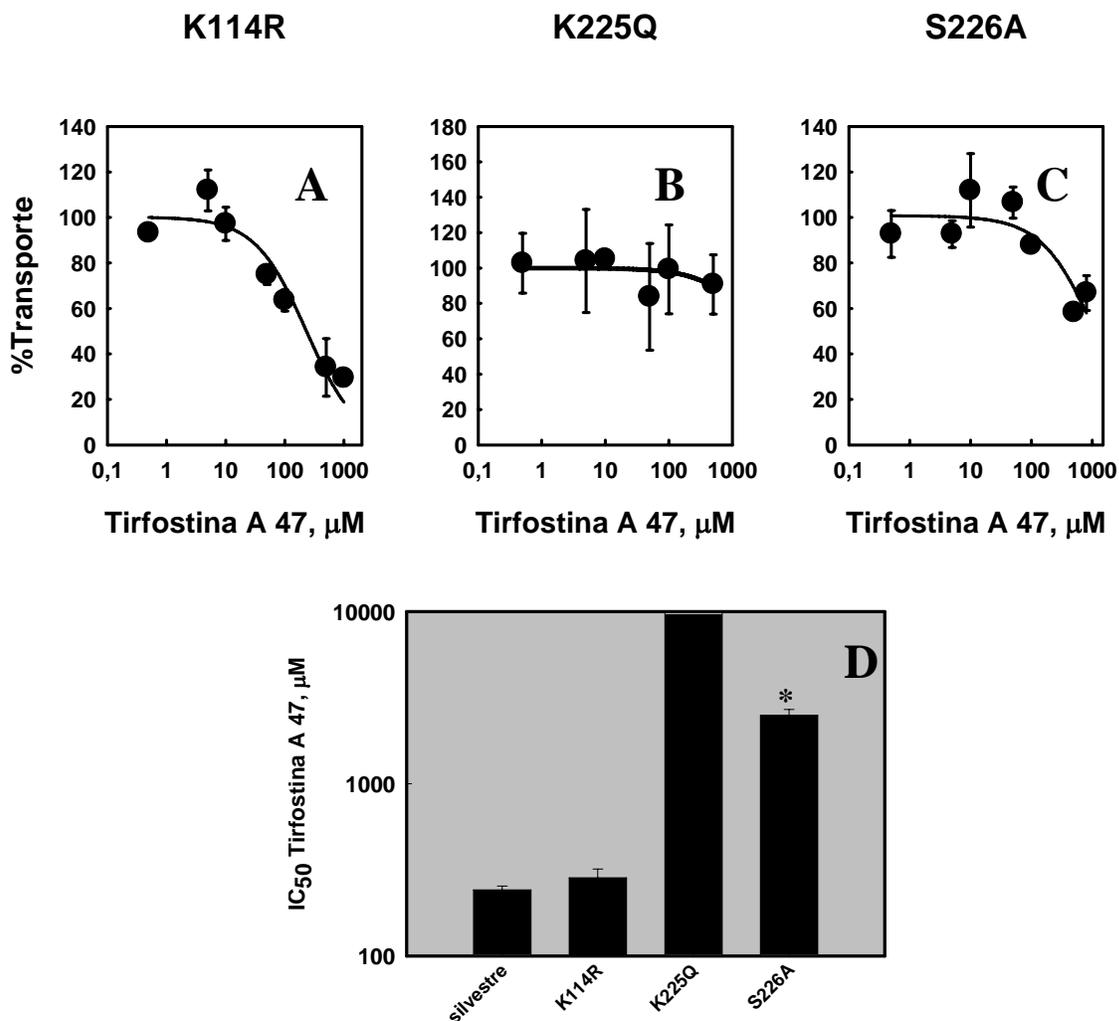


Figura 10. Ensayos de inhibición del transporte de metilglucosa por tirfostina A 47 en mutantes de GLUT 1. El transporte de 1 mM de metilglucosa se midió en presencia de concentraciones de 0 a 500 μM de tirfostina A 47. Los valores de IC₅₀ se determinaron por el ajuste no lineal de los datos de inhibición por tirfostina A 47 a una función de decaimiento hiperbólico A) K114R, B) K225Q, C) S226A, D) Valores de IC₅₀ para GLUT 1 silvestre y sus mutantes. Los resultados corresponden al promedio \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente para determinar el grado de significancia de las diferencias respecto a la proteína silvestre. (*) indica valor significativo ($p < 0,05$). El valor que escapa a la escala de IC₅₀ representa la insensibilidad de la mutante.

5. DISCUSION

En este trabajo el rol de los putativos dominios de unión a nucleótidos sobre la funcionalidad del transportador facilitativo de glucosa GLUT1, fue analizado con el uso de mutagénesis sitio dirigida y expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los resultados obtenidos de cada una de las mutantes estudiadas fundamenta la hipótesis de que estos dominios forman parte de sitios de unión a inhibidores.

De los tres dominios de unión a nucleótidos que se han descrito para GLUT 1, esta tesis se enfocó en el análisis de los dominios I y II. El dominio I presenta una orientación exofacial y abarca parte del segmento transmembrana 3 y del lazo que lo conecta con el segmento 4. Por su parte el dominio II es de orientación endofacial y se localiza en el gran lazo que une a los segmentos transmembranas 6 y 7.

Las tres mutantes generadas, K114R del dominio I y K225Q y S226A del dominio II lograron ser expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* y la determinación de sus constantes cinéticas demostraron que mantienen una afinidad y velocidad de transporte de metilglucosa similares a las obtenida para GLUT 1 silvestre.

Al evaluar la expresión por inmunodetección y por los valores de V_{max} tanto de la proteína silvestre como de las mutantes se puede concluir que todas ellas muestran niveles similares de expresión. Los resultados del transporte de metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada permiten afirmar que estos cambios individuales en los dominios no producen efecto sobre el sitio de unión externo de glucosa. Si bien, no entregan información sobre el sitio de unión interno para glucosa, pues para ello es necesario realizar ensayos en condiciones de equilibrio y de salida, esta condición de normalidad en el

transporte de entrada permitió validar el análisis de la función de los dominios de unión a nucleótidos presentes en GLUT 1.

5.1 GLUT 1 silvestre

Los valores de las constantes cinéticas para el transporte de metilglucosa obtenidos en este trabajo son comparables a los determinados con anterioridad en nuestro laboratorio (Monsalve, 2001; Andrade, 2001; Saldivia, 2003; Pérez, 2003; Ojeda, 2005) y con los descritos en otras investigaciones (Due *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2001). Si bien esto nos dice que el método de expresión en ovocitos es una buena herramienta para el estudio de la función de GLUT 1, tiene la desventaja de ser dependiente de la época del año en que se realizan los experimentos.

Antes de evaluar la actividad de las mutantes en presencia de los inhibidores fue necesario validar su uso en la proteína silvestre expresado en este sistema heterólogo. Se obtuvieron así los valores que servirían de referencia para el análisis. Todos los ensayos fueron realizados en condiciones trans-cero de entrada y los inhibidores seleccionados presentaron el mismo comportamiento que se ha informado para ellas en estudios previos. Citocalasina B, metabolito que se une a la cara citoplasmática de GLUT 1, exhibió un valor de 1,1 μM para inhibir el 50 % del transporte de metilglucosa, dato idéntico al publicado en otras investigaciones (Due *et al.*, 1995). Citocalasina B se sabe que interacciona con la cara intracelular del transportador y se cree podría interaccionar con el dominio III, debido a que se ha descrito que residuos cercanos, triptófano 388 y 412, participarían en su unión, (Garcia *et al.*, 1992). Por esta razón se utilizó como control de inhibición endofacial.

Pentoxifilina pertenece a un grupo de moléculas que en cuanto a los transportadores de glucosa han sido caracterizados como inhibidores de unión exofacial del transportador GLUT 1 (Ojeda, 2005). El valor obtenido en este trabajo concuerda con los resultados obtenidos para este inhibidor en ensayos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio, tanto en ovocitos como en eritrocitos, siendo GLUT 1 inhibido de manera dosis dependiente. Aunque todavía no se ha localizado un sitio de unión para esta molécula, concluimos que el dominio I no tiene implicancia en ello. El efecto sirvió entonces como control de inhibición exofacial.

El interés principal de este trabajo era ver respuestas frente a quercetina y tirfostina A 47, moléculas que comparten el hecho de ser reconocidos inhibidores de proteínas tirosina quinasa. Quercetina es una flavona que exhibe unión a dominios de unión a ATP presentes en estas proteínas (Kang y Liang, 1997) y que ha mostrado comportarse como inhibidor competitivo en ensayos de entrada realizados en eritrocitos (Saldivia, 2003). Contando con estos antecedentes evaluamos si el dominio I era un lugar posible para la unión de quercetina. Para GLUT 1 silvestre el comportamiento frente a quercetina fue el esperado, produciendo la inhibición del transporte de OMG de una manera dosis-dependiente, alcanzando aproximadamente un 90% de inhibición a la concentración más alta utilizada.

En ensayos previos, usando eritrocitos humanos, tirfostina A 47 se ha descrito como un inhibidor no competitivo para la entrada de glucosa (Monsalve, 2001), no obstante no se conocía hasta ahora algún residuo involucrado en su unión a GLUT 1. La proteína silvestre exhibió una IC_{50} de 242 μM valor que es semejante a los 157 μM obtenidos con

anterioridad en ovocitos, confirmando el efecto inhibitorio de tirfostina A 47 en una manera dosis dependiente.

5.2 Análisis de la mutante K114R del dominio I.

La mutante del dominio I K114R entregó el primer dato interesante. Con los inhibidores de unión endofacial citocalasina B y tirfostina A 47 esta proteína mostró valores de IC_{50} cercanos a los de GLUT 1 silvestre. Sin embargo con el inhibidor de unión exofacial quercetina, K114R perdió sensibilidad de manera significativa. Este resultado contrasta con el obtenido para el también inhibidor de unión externa pentoxifilina.

Lisina es un aminoácido que presenta una cadena lateral con carga positiva a pH fisiológico. Se sabe que las características de las cadenas laterales en los aminoácidos pueden variar bajo las condiciones del ambiente que las rodea, por ejemplo pueden disminuir su pK_a en un entorno hidrofóbico. El modelo tridimensional de Salas-Burgos sin embargo, muestra una localización para lisina 114 muy expuesta al medio extracelular (Figura 11). Como es que K114 estaría participando en la sensibilidad por quercetina no se puede determinar sin realizar análisis más acabados, como ser generar otra mutante de este residuo o bien modelar la estructura de la proteína mutada, no obstante, si se puede especular que rol juega. Como en este cambio se mantiene el carácter positivo de la cadena lateral del residuo, una de las posibilidades para explicar la pérdida de sensibilidad de la mutante K114R por quercetina es que se esté afectando estructuralmente el sitio de unión, debido principalmente a la cadena lateral de mayor tamaño del residuo de arginina, que se traduce en el aumento en el valor de IC_{50} . Un soporte a la presencia de un sitio de unión exofacial para quercetina es el hecho que en otras mutantes de esta región que se han

caracterizado en nuestro laboratorio (G116A, K117Q, K117R) también se verifica una perturbación en la unión de quercetina, lo cual permite inferir la unión exofacial de quercetina y además implicar a este dominio en su interacción. Por ejemplo los resultados de mutagénesis sobre el residuo lisina 117, nos indican que se pierde por completo la sensibilidad por quercetina al ser mutado por arginina y en forma parcial cuando se muta por el residuo polar neutro glutamina. En la figura 11 se muestra la disposición espacial de estos dos residuos (Lys 114 y Lys117) en que sus cadenas laterales se disponen una frente a la otra, de modo que se postula que lisina 117 se encontraría neutra, dado que es bastante improbable que dos residuos de lisina en esta disposición se encuentren cargados a la vez. El cambio de lisina 114 por arginina debido a su cadena lateral de mayor tamaño podría entonces afectar el carácter y disposición espacial que adquiere lisina 117 y que pareciera ser esencial para la unión del inhibidor quercetina. El efecto de inhibidor competitivo de quercetina en relación al transporte de glucosa entonces, no necesariamente implicaría que compite por el sitio de unión del sustrato, sino que puede ser consecuencia de un reordenamiento estructural, a causa de la unión a un sitio próximo.

Cunningham y colaboradores analizaron en detalle la interacción de quercetina con el transportador GLUT 1 mediante análisis de acoplamiento molecular (“docking”) y ensayos de transporte (Cunningham *et al.*, 2006). Ellos postulan que la unión de esta flavona al transportador es endofacial y además que su ingreso a la célula ocurriría a través de este transportador. Estos autores sometieron a la molécula a un análisis sobre el modelo tridimensional teórico para GLUT 1 (SUK 1, Salas-Burgos) encontrando posiciones de acoplamiento a lo largo de todo el canal central que se predice en este modelo, específicamente en la zona media e interna. Por lo anterior ellos discuten que la unión de

quercetina sería directa a un sitio central de aquel canal, no siendo necesario un sitio de reconocimiento externo. Sin embargo los datos obtenidos en nuestro laboratorio apuntan a que si existe un sitio de unión para quercetina y que este estaría localizado exofacialmente y que el dominio I de unión a nucleótidos, que incluye a lisina 114, estaría implicado de alguna manera en su configuración.

De haber sido cierta la propuesta de Cunningham que GLUT 1 facilita la entrada de quercetina (Cunningham *et al.*, 2006), no sería posible obtener una mutante de GLUT 1 insensible a este inhibidor. Nuestros resultados con las mutantes K114R y K117R rebaten de manera concluyente esta posibilidad. Se podrían interpretar los datos mostrados por Cunningham *et al.* (2006) postulando incluso que GLUT 1 presenta un sitio de unión interno para quercetina. No obstante, esta opción tampoco es apoyada por la existencia de una forma mutada de GLUT 1 insensible a esta flavona.

En cuanto a pentoxifilina nuestros datos apoyan claramente la idea que ella se está uniendo a un sitio distinto de quercetina. Como en trabajos anteriores se determinó que además no se une al sitio de reconocimiento de glucosa, entonces la existencia de otra región exofacial de unión a ligandos se hace patente. Salas-Burgos (2004) en su modelo presenta 3 cavidades exofaciales, una con localización central siendo una continuación del canal que se forma entre el medio extra e intracelular que correspondería al sitio de unión para glucosa, y dos localizadas en el exterior de la estructura, una de ellas con predominio de cargas positivas que incluye al dominio I de unión a nucleótido y otra larga cavidad lateral de función desconocida. Esta última podría ser otro sitio involucrado en la unión de ligandos, y no se descarta la posibilidad que pentoxifilina se una en esta región.

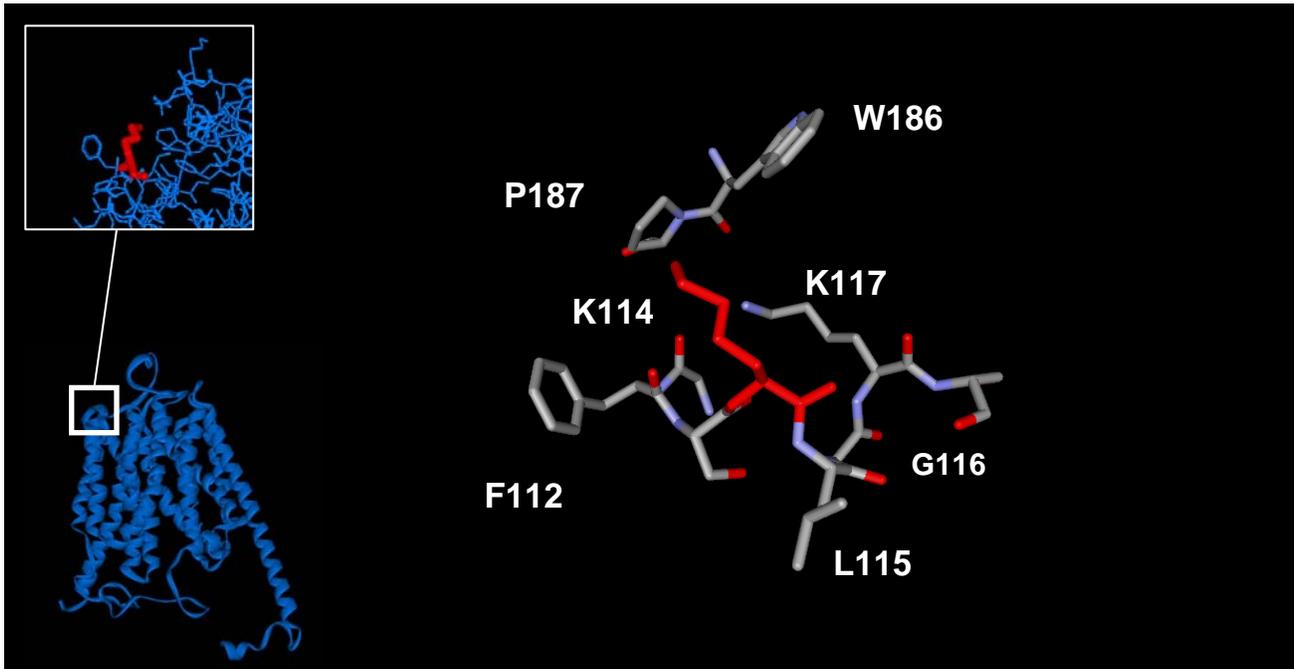


Figura 11. Localización del dominio I de unión a nucleótidos en el modelo tridimensional de GLUT 1. Las figuras fueron generadas a partir del modelo SUK 1 (Salas-Burgos, 2004). Se muestra la localización del dominio I en el transportador GLUT 1 y un acercamiento indicando en rojo al residuo K114, y en gris a los residuos que se encuentran en el entorno más cercano (5\AA). Las figuras tridimensionales se crearon con los programas ViewerLite y 3D mol viewer.

5.3 Análisis de las mutantes K225Q y S226A dominio II.

Al analizar las mutantes K225Q y S226A frente a los inhibidores quercetina y pentoxifilina, los resultados mostraron un efecto similar a los obtenidos para la proteína silvestre, que era lo que se esperaba debido a que tenemos datos que apuntan a que la interacción ocurre con la cara exofacial del transportador. Sin embargo, para el inhibidor tirfostina A 47 ambas mutantes, en distintos grados, vieron alteradas su sensibilidad frente a esta molécula. En el caso de S226A se determinó un incremento de alrededor de 7 veces en el valor de IC_{50} y para K225Q la pérdida de sensibilidad fue total en estos intervalos de concentraciones. La especificidad de este efecto se comprobó por el hecho que para citocalasina B, el otro inhibidor de unión endofacial que se ensayó, no se presentaron diferencias significativas.

La polaridad de serina 226 pareciera ser importante en darle estabilidad a la unión de este inhibidor, así lo indica el efecto que introduce su cambio por el residuo apolar alanina. Si bien la sensibilidad a tirfostina A 47 no se pierde por completo, se ve significativamente afectada, lo que podría ser causa de la pérdida de un enlace de hidrógeno o simplemente del cambio en la topología de este sitio (Figura 12).

En el caso de la mutante K225Q la pérdida total de sensibilidad es un resultado que indica que la presencia de lisina en la posición 225 es fundamental para la unión de tirfostina A 47 al dominio II. Es importante señalar que la pérdida de sensibilidad de una proteína por su inhibidor no significa necesariamente que la molécula deje de unirse, sino más bien que a los intervalos de concentración que es posible analizar no se logra determinar algún efecto. Este residuo se encuentra protonado a pH fisiológico por lo que se

puede postular que un cambio por un residuo polar, pero neutro como glutamina, produce la pérdida de una carga neta positiva, la cual al parecer es esencial en este sitio. Otra probable explicación para el efecto de este cambio aminoacídico, puede ser un posible efecto sobre la topología del dominio que se alteraría al cambiar el tamaño de la cadena lateral. Lisina 225 ha sido descrito como un residuo implicado en la interacción de citocalasina B en GLUT 1. Salas-Burgos y colaboradores (2004) basándose en un análisis de acoplamiento molecular para este inhibidor sobre el modelo tridimensional teórico de GLUT 1, concluyó que esta molécula se une a un lugar próximo a este dominio y que lisina 225 sería uno de los residuos que participan estabilizando esa unión. Los datos obtenidos en este trabajo no apoyan la participación de lisina 225 en la conformación de un sitio de unión para citocalasina B. Tomando en consideración que sus resultados se basan en un estudio teórico *in silico*, nosotros concluimos entonces que lisina 225 forma más bien parte de un sitio de unión endofacial para tirfostina A 47 que involucra al dominio II.

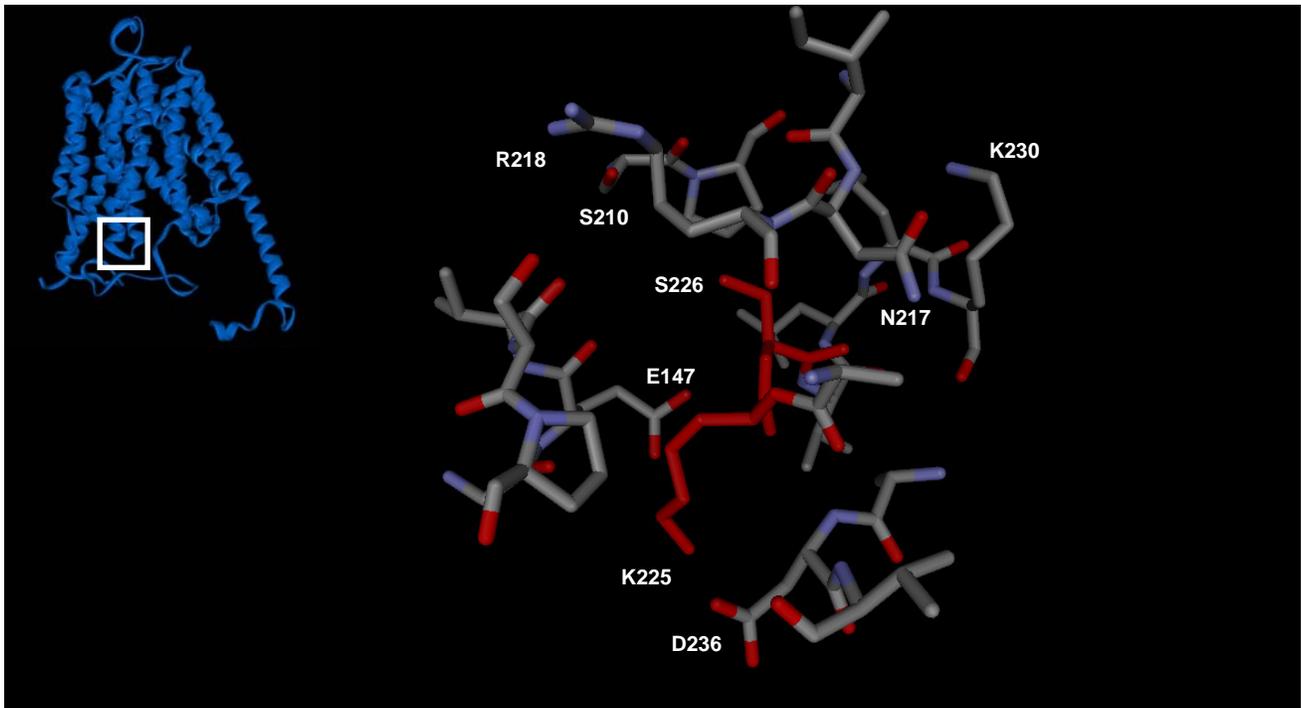


Figura 12. Localización del dominio II de unión a nucleótidos en el modelo tridimensional del transportador GLUT 1. La figura fue generadas a partir del modelo SUK 1 (Salas-Burgos, 2004). Se muestra localización del dominio II en el transportador GLUT 1 y un acercamiento indicando las ubicaciones relativas de los residuos K225 y S226 en rojo, y residuos que se encuentran en el entorno más cercano en gris (5Å). Las figuras tridimensionales se crearon con los programas ViewerLite y 3D mol viewer.

BIBLIOGRAFIA

- 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 (5633):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 (25):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 (23):11414-11420.
- Andrade, C. A. (2001). Inhibición del transportador de hexosas GLUT1 por genisteína. Seminario de Titulación de Tecnólogo Médico, Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Angulo, C., Rauch, M., Droppelmann, A., Reyes, A., Slebe, J., Delgado-Lopez, F., Guaiquil, V., Vera, J., y Concha, I. (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, J. L., Ishihara, H., Inukai, K., Tsukuda, K., Kikuchi, M., Hirano, H., y Yazaki, Y. (1991). The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem* 266 (36):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 letters* 298 (2-3):129-132.

- 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.
- Baldwin, S. A. (1993). Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim Biophys Acta* 1154 (1):17-49.
- Baldwin, S. A., y Lienhard, G. E. (1989). Purification and reconstitution of glucose transporter from human erythrocytes. *Methods Enzymol* 174:39-50.
- Barrett, M. P., Walmsley, A. R., y Gould, G. W. (1999). Structure and function of facilitative sugar transporters. *Curr Opin Cell Biol* 11 (4):496-502.
- Basketter, D. A., y Widdas, W. F. (1978). Asymmetry of the hexose transfer system in human erythrocytes. Comparison of the effects of cytochalasin B, phloretin and maltose as competitive inhibitors. *J Physiol* 278:389-401.
- 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 (9):5555-5562.
- Bell, G. I., Burant, C. F., Takeda, J., y Gould, G. W. (1993). Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem* 268 (26):19161-19164.
- Birnbaum, M. J. (1989). Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* 57 (2):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 (New York, N.Y)* 235 (4795):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.
- Brockmann, K., Wang, D., Korenke, C. G., von Moers, A., Ho, Y. Y., Pascual, J. M., Kuang, K., Yang, H., Ma, L., Kranz-Eble, P., Fischbarg, J., Hanefeld, F., y De Vivo, D. C. (2001). Autosomal dominant glut-1 deficiency syndrome and familial epilepsy. *Ann Neurol* 50 (4):476-485.
- Bryant, N. J., Govers, R., y James, D. E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (4):267-277.
- Burant, C. F., Sivitz, W. I., Fukumoto, H., Kayano, T., Nagamatsu, S., Seino, S., Pessin, J. E., y Bell, G. I. (1991). Mammalian glucose transporters: structure and molecular regulation. *Recent Prog Horm Res* 47:349-387; discussion 387-348.
- 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 (21):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 (10):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 (2):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 (1):179-188.
- Carayannopoulos, M. O., Chi, M. M., Cui, Y., Pingsterhaus, J. M., McKnight, R. A., Mueckler, M., Devaskar, S. U., y Moley, K. H. (2000). GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (13):7313-7318.
- Carruthers, A. (1986). ATP regulation of the human red cell sugar transporter. *J Biol Chem* 261 (24):11028-11037.
- Carruthers, A. (1990). Facilitated diffusion of glucose. *Physiol Rev* 70 (4):1135-1176.
- Carruthers, A., y Helgerson, A. L. (1989). The human erythrocyte sugar transporter is also a nucleotide binding protein. *Biochemistry* 28 (21):8337-8346.
- 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.
- Concha, I. I., Velasquez, F. V., Martinez, J. M., Angulo, C., Droppelmann, A., Reyes, A. M., Slebe, J. C., Vera, J. C., y Golde, D. W. (1997). Human Erythrocytes Express GLUT5 and Transport Fructose. *Blood* 89 (11):4190-4195.
- Cunningham, P., Afzal-Ahmed, I., y Naftalin, R. J. (2006). Docking studies show that D-glucose and quercetin slide through the transporter GLUT1. *J Biol Chem* 281 (9):5797-5803.

- Challiss, J. R., Taylor, L. P., y Holman, G. D. (1980). Sugar transport asymmetry in human erythrocytes--the effect of bulk haemoglobin removal and the addition of methylxanthines. *Biochim Biophys Acta* 602 (1):155-166.
- 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 (8):2535-2539.
- Daly, J. W., y Fredholm, B. B. (1998). Caffeine--an atypical drug of dependence. *Drug Alcohol Depend* 51 (1-2):199-206.
- 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 (3):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 (19):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 (1-2):186-199.
- De Vivo, D. C., Leary, L., y Wang, D. (2002). Glucose transporter 1 deficiency syndrome and other glycolytic defects. *J Child Neurol* 17 Suppl 3:3S15-23; discussion 13S24-15.
- De Vivo, D. C., Trifiletti, R. R., Jacobson, R. I., Ronen, G. M., Behmand, R. A., y Harik, S. I. (1991). Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of

- persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *N Engl J Med* 325 (10):703-709.
- Deves, R., y Krupka, R. M. (1978a). Cytochalasin B and the kinetics of inhibition of biological transport: a case of asymmetric binding to the glucose carrier. *Biochim Biophys Acta* 510 (2):339-348.
- Deves, R., y Krupka, R. M. (1978b). A new approach in the kinetics of biological transport. The potential of reversible inhibition studies. *Biochim Biophys Acta* 510 (1):186-200.
- 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 (22):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 (Pt 2):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 (21):16275-16280.

- Due, A. D., Cook, J. A., Fletcher, S. J., Qu, Z. C., Powers, A. C., y May, J. M. (1995). A "cysteineless" GLUT1 glucose transporter has normal function when expressed in *Xenopus oocytes*. *Biochem Biophys Res Commun* 208 (2):590-596.
- 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 (13):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 New York, N.Y* 235 (4795):1492-1495.
- Fry, D. C., Kuby, S. A., y 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* 83 (4):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 (14):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. *Proc Natl Acad Sci* 85 (15):5434-5438.
- Garcia, J. C., Strube, M., Leingang, K., Keller, K., y Mueckler, M. M. (1992). Amino acid substitutions at tryptophan 388 and tryptophan 412 of the HepG2 (Glut1) glucose

- transporter inhibit transport activity and targeting to the plasma membrane in *Xenopus oocytes*. *J Biol Chem* 267 (11):7770-7776.
- Gazit, A., Osherov, N., Posner, I., Yaish, P., Poradosu, E., Gilon, C., y Levitzki, A. (1991). Tyrphostins. 2. Heterocyclic and alpha-substituted benzylidenemalononitrile tyrphostins as potent inhibitors of EGF receptor and ErbB2/neu tyrosine kinases. *J Med Chem* 34 (6):1896-1907.
- Gazit, A., Yaish, P., Gilon, C., y Levitzki, A. (1989). Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 32 (10):2344-2352.
- 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.
- Gude, N. M., Stevenson, J. L., Murthi, P., Rogers, S., Best, J. D., Kalionis, B., y King, R. G. (2005). Expression of GLUT12 in the fetal membranes of the human placenta. *Placenta* 26 (1):67-72.
- Guillam, M. T., Dupraz, P., y Thorens, B. (2000). Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets. *Diabetes* 49 (9):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 (6):2538-2543.
- Hebert, D. N., y Carruthers, A. (1986). Direct evidence for ATP modulation of sugar transport in human erythrocyte ghosts. *J Biol Chem* 261 (22):10093-10099.
- 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 (15):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 (3):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 (32):20482-20488.
- Hruz, P. W., y Mueckler, M. M. (1999). Cysteine-scanning mutagenesis of transmembrane segment 7 of the GLUT1 glucose transporter. *J Biol Chem* 274 (51):36176-36180.
- Hruz, P. W., y Mueckler, M. M. (2001a). Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol Membr Biol* 18 (3):183-193.
- Hruz, P. W., y Mueckler, M. M. (2001b). Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol Membr Biol* 18 (3):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 (5633):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 (7):4607-4612.
- Jacquez, J. A. (1983). Modulation of glucose transport in human red blood cells by ATP. *Biochim Biophys Acta* 727 (2):367-378.
- James, D. E., Strube, M., y Mueckler, M. (1989). Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 338 (6210):83-87.

- Johnson, J. H., Newgard, C. B., Milburn, J. L., Lodish, H. F., y Thorens, B. (1990). 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 (12):6548-6551.
- 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 (4):E974-976.
- Joost, H. G., y Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol Membr Biol* 18 (4):247-256.
- 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 (6):757-764.
- Kanai, Y., Lee, W., You, G., D., B., y Hediger, M. A. (1994). The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J Clin Invest* 93 (1):397-404.
- Kang, T. B., y Liang, N. C. (1997). Effect of quercetin on activities of protein kinase C and tyrosine protein kinase from HL-60 cells. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 18 (4):374-376.

- Kasahara, T., y Kasahara, M. (1998). Tryptophan 388 in putative transmembrane segment 10 of the rat glucose transporter Glut1 is essential for glucose transport. *J Biol Chem* 273 (44):29113-29117.
- 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 (30):15245-15248.
- Klepper, J., Fischbarg, J., Vera, J. C., Wang, D., y De Vivo, D. C. (1999). GLUT1-deficiency: barbiturates potentiate haploinsufficiency in vitro. *Pediatr. Res* 46 (6):677-683.
- 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 (35):12221-12232.
- Levitzki, A., y Gazit, A. (1995). Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science (New York, N.Y)* 267 (5205):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 (1):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* 270 (5 Pt 1):E846-857.

- 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 (26):7874-7881.
- 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 (1):91-97.
- Mantych, G. J., Sotelo_Avila, C., y Devaskar, S. U. (1993). The blood-brain barrier glucose transporter is conserved in preterm and term newborn infants. *J Clin Endocrinol Metab* 77 (1):46-49.
- Matschinsky, F. M. (1996). Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45 (2):223-241.
- 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 (1):113-117.
- Monsalve, R. A. (2001). Inhibición del transportador de hexosas GLUT1 por tirfostina A-47. Seminario de Titulación de Tecnólogo Médico, Facultad de Medicina, Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219 (3):713-725.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S. A., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W. J., Lienhard, G. E., y Lodish, H. F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229 (4717):941-945.

- Mueckler, M., y Makepeace, C. (1997). Identification of an amino acid residue that lies between the exofacial vestibule and exofacial substrate-binding site of the Glut1 sugar permeation pathway. *J Biol Chem* 272 (48):30141-30146.
- 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 (5):3498-3503.
- Mueckler, M., Weng, W., y Kruse, M. (1994). Glutamine 161 of Glut1 glucose transporter is critical for transport activity and exofacial ligand binding. *J Biol Chem* 269 (32):20533-20538.
- Murota, K., y Terao, J. (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys* 417 (1):12-17.
- 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 (1):467-472.
- Ojeda, P. (2005). Interacción de las metilxantinas con el transportador de hexosas GLUT1. Tesis de Bioquímico, Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Olson, A. L., y Pessin, J. E. (1996). Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr* 16:235-256.
- 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 (10):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 (29):18035-18040.
- Pascual, J. M., Van Heertum, R. L., Wang, D., Engelstad, K., y De Vivo, D. C. (2002). Imaging the metabolic footprint of Glut1 deficiency on the brain. *Ann Neurol* 52 (4):458-464.
- Pérez, A. (2003). Caracterización de la interacción de flavonas y tirfostinas con el transportador de hexosas GLUT1, Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- 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. (2000). Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* 66 (2):217-220.
- Preston, R. A., y Baldwin, S. A. (1993). GLUT 1: identification of exofacial lysine-residues. *Biochem Soc Trans* 21 (2):309-312.
- Raddatz, N. A. (2006). Análisis funcional de las mutantes G111A y G116A en el transportador de hexosas GLUT1. Valdivia: Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Univ. Austral de Chile, 90.
- 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 (3):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 (2):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 (3):E733-738.
- Salas-Burgos, A., Iserovich, P., Zuniga, F., Vera, J. C., y 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 (5):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, Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Sato, M., y Mueckler, M. (1999). A conserved amino acid motif (R-X-G-R-R) in the Glut1 glucose transporter is an important determinant of membrane topology. *J Biol Chem* 274 (35):24721-24725.
- Schurmann, A., Axer, H., Scheepers, A., Doege, H., y Joost, H. G. (2002). The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. *Cell Tissue Res* 307 (2):237-242.

- Schurmann, A., Keller, K., Monden, I., Brown, F. M., Wandel, S., Shanahan, M. F., y Joost, H. G. (1993). Glucose transport activity and photolabelling with 3-[125I]iodo-4-azidophenethylamido-7-O-succinyldeacetyl (IAPS)-forskolin of two mutants at tryptophan-388 and -412 of the glucose transporter GLUT1: dissociation of the binding domains of forskolin and glucose. *Biochem J* 290 (Pt 2):497-501.
- Seatter, M. J., De la Rue, S. A., Porter, L. M., y Gould, G. W. (1998). QLS motif in transmembrane helix VII of the glucose transporter family interacts with the C-1 position of D-glucose and is involved in substrate selection at the exofacial binding site. *Biochemistry*. 37:1322-1326.
- Shanahan, M. F. (1982). Cytochalasin B. A natural photoaffinity ligand for labeling the human erythrocyte glucose transporter. *J Biol Chem* 257 (13):7290-7293.
- Shanahan, M. F. (1983). Characterization of cytochalasin B photoincorporation into human erythrocyte D-glucose transporter and F-actin. *Biochemistry* 22 (11):2750-2756.
- Shepherd, P. R., y Kahn, B. B. (1999). Glucose Transporters and Insulin Action -- Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* 341 (4):248-257.
- Stephens, J. M., Bagby, G. J., Pekala, P. H., Shepherd, R. E., Spitzer, J. J., y Lang, C. H. (1992). Differential regulation of glucose transporter gene expression in adipose tissue or septic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 183 (2):417-422.
- Stuart, C. A., Yin, D., Howell, M. E., Dykes, R. J., Laffan, J. J., y Ferrando, A. A. (2006). Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291 (5):E1067-1073.

- Suganuma, N., Segade, F., Matsuzu, K., y Bowden, D. W. (2007). Differential expression of facilitative glucose transporters in normal and tumour kidney tissues. *BJU Int* 99 (5):1143-1149.
- 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 (2):133-140.
- Tejero, M. E., Proffitt, J. M., Cole, S. A., Freeland-Graves, J. H., Cai, G., Peebles, K. W., Cox, L. A., Mahaney, M. C., Rogers, J., Vandeberg, J. L., Blangero, J., y Comuzzie, A. G. (2004). Quantitative genetic analysis of glucose transporter 4 mRNA levels in baboon adipose. *Obes Res* 12 (10):1652-1657.
- Thoidis, G., Kupriyanova, T., Cunningham, J. M., Chen, P., Cadel, S., Foulon, T., Cohen, P., Fine, R. E., y Kandrор, K. V. (1999). Glucose transporter Glut3 is targeted to secretory vesicles in neurons and PC12 cells. *J Biol Chem* 274 (20):14062-14066.
- Uldry, M., Ibberson, M., Horisberger, J. D., Chatton, J. Y., Riederer, B. M., y Thorens, B. (2001). Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J* 20 (16):4467-4477.
- Uldry, M., Ibberson, M., Hosokawa, M., y Thorens, B. (2002). GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett* 524 (1-3):199-203.
- Vera, J., Reyes, A., Velasquez, F., Rivas, C., Zhang, R., Strobel, P., Slebe, J., Nunez-Alarcon, J., y Golde, D. (2001). Direct inhibition of the hexose transporter GLUT1 by tyrosine kinase inhibitors. *Biochemistry* 40 (3):777-790.
- Vera, J. C., Reyes, A. M., Carcamo, J. G., Velasquez, F. V., Rivas, C. I., Zhang, R. H., Strobel, P., Iribarren, R., Scher, H. I., y Slebe, J. C. (1996). Genistein is a natural

- inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1. *J Biol Chem* 271 (15):8719-8724.
- Vera, J. C., Rivas, C. I., Velasquez, F. V., Zhang, R. H., Concha, II, y Golde, D. W. (1995). Resolution of the facilitated transport of dehydroascorbic acid from its intracellular accumulation as ascorbic acid. *J Biol Chem* 270 (40):23706-23712.
- Vera, J. C., Rivas, C. I., Zhang, R. H., Farber, C. M., y Golde, D. W. (1994). Human HL-60 myeloid leukemia cells transport dehydroascorbic acid via the glucose transporters and accumulate reduced ascorbic acid. *Blood* 84 (5):1628-1634.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., y Gay, N. J. (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.
- Wang, D., Kranz-Eble, P., y De Vivo, D. C. (2000). Mutational analysis of GLUT1 (SLC2A1) in Glut-1 deficiency syndrome. *Hum Mutat* 16 (3):224-231.
- Wheeler, T. J. (1989). ATP does not regulate the reconstituted glucose transporter. *Biochemistry* 28 (8):3413-3420.
- Wood, I. S., Hunter, L., y Trayhurn, P. (2003). Expression of Class III facilitative glucose transporter genes (GLUT-10 and GLUT-12) in mouse and human adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 308 (1):43-49.
- Wright, E. M. (1993). The intestinal Na⁺/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 (6):553-557.

Wu, X., Li, W., Sharma, V., Godzik, A., y Freeze, H. (2002). Cloning and characterization of glucose transporter 11, a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues. *Mol Genet Metab* 76 (1):37-45.

Yasuhara, M., y Levy, G. (1988). Caffeine as a potential risk factor for theophylline neurotoxicity. *J Pharm Sci* 77 (9):745-747.