



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

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

**INTERACCIONES DE LISINA 117 Y LISINA 229
CON INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE
HEXOSAS EN GLUT1**

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

MAURICIO NICOLÁS VARGAS URIBE

VALDIVIA – CHILE

2007

*....a mi madre Angélica por tu siempre incondicional amor y tu gran apoyo para llegar hasta esta gran meta que estoy cumpliendo. Eres la gran responsable de este éxito.
A mi Padre José por aceptarme, cuidarme y amarme siempre como a tu hijo, lo que me llena el corazón de orgullo.
Y a mis Abuelos Aldo y Gloria que me han acompañado cuando más los he necesitado...*

AGRADECIMIENTOS

Para empezar quisiera agradecer al Dr. Alejandro Reyes por su apoyo, la confianza brindada y la oportunidad de haberme integrado a su grupo de laboratorio para realizar mi tesis de pregrado.

Quiero agradecer también a mis compañeros de laboratorio Ximena, Paola, Alejandra, Patricia, Pablo y Alejandro, quienes me apoyaron desinteresadamente en mi estadía en el laboratorio y me apoyaron con su amistad y alegría.

Quiero también agradecer a algunos profesores que influyeron bastante en mi formación como Bioquímico, como lo son: Dra. Margarita Concha, Dr. Ricardo Ugarte, Prof. José Jara y por supuesto Dr. Alejandro Reyes.

Por último quisiera agradecer a toda mi familia por su apoyo y cariño y por siempre creer en el proyecto que emprendí cuando comencé mi formación profesional.

El presente 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
1.1	SUMMARY	2
2	INTRODUCCIÓN	3
2.1	El transporte de glucosa	3
2.2	La familia GLUT/SLC2: similitudes y clasificación	4
2.3	La familia GLUT/SLC2: descripción de las proteínas	5
2.4	GLUT1: Estructura y función	10
2.5	GLUT1: Interacción con inhibidores y dominios de unión de ATP	14
3	MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1	Materiales	19
3.2	Generación de las mutantes K117Q, K117R y K229Q en GLUT1	20
3.2.1	Mutagénesis sitio dirigida	20
3.2.2	Transformación a células competentes	20
3.2.3	Purificación y secuenciación del DNA mutado	21
3.3	Síntesis de mRNA e inyección en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	21
3.3.1	Preparación del mRNA de GLUT1 y de las mutantes	21
3.3.2	Obtención e inyección de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	22
3.4	Análisis mediante western blot	23
3.4.1	Obtención de las membranas totales de ovocitos	23
3.4.2	SDS-PAGE y western blot	23
3.5	Ensayos de transporte y análisis cinéticos	24

3.5.1	Ensayos de captación de 3-O-metilglucosa y 2-desoxiglucosa en condiciones trans-cero de entrada	24
3.5.2	Ensayos de inhibición en condiciones trans-cero de entrada	24
3.6	Análisis bioinformático	25
3.7	Análisis estadísticos	25
4	RESULTADOS	26
4.1	Mutaciones sitio dirigidas en los residuos K117 y K229 de GLUT1	26
4.2	Expresión de la proteína silvestre y mutantes K117R, K117Q y K229Q en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	26
4.3	Caracterización del transporte de 2-desoxiglucosa y 3-O-metilglucosa para GLUT1 silvestre y las mutantes en condiciones de entrada	28
4.4	Efecto de los inhibidores sobre GLUT1 silvestre y las mutantes	34
4.4.1	Citocalasina B	34
4.4.2	Tirfostina A-47	36
4.4.3	Quercetina	39
4.4.4	Pentoxifilina	42
4.5	Análisis bioinformático de lisina 117	45
5	DISCUSIÓN	50
5.1	Expresión de GLUT1 en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	50
5.2	Análisis funcional de GLUT1 silvestre y las proteínas mutantes	52
5.3	Sitios de unión de inhibidores	53
5.3.1	Citocalasina B	53
5.3.2	Tirfostina A-47	54
5.3.3	Quercetina	54

5.3.4 Pentoxifilina	57
5.4 Conclusiones y proyecciones	57
6 BIBLIOGRAFÍA	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alineamiento de las secuencias de GLUT1 silvestre y las mutantes generadas	27
Figura 2. Expresión de GLUT1 wt y mutantes en membranas de ovocitos de <i>X. laevis</i>	29
Figura 3. Saturación del transporte de DOG en GLUT1 silvestre y las mutantes K117Q, K117Q y K229Q	31
Figura 4. Saturación del transporte de OMG en GLUT1 silvestre y las mutantes K117Q, K117Q y K229Q	32
Figura 5. Estructura de los inhibidores	35
Figura 6. Inhibición del transporte de OMG en GLUT1 silvestre (A) y mutantes K229Q (B), K117R (C) y K117Q (D) por citocalasina B	37
Figura 7. Inhibición del transporte de OMG en GLUT1 silvestre (A) y mutantes K117R (B), K117Q (C) y K229Q (D) por Tirfostina A-47	41
Figura 8. Inhibición del transporte de OMG en GLUT1 silvestre (A) y mutantes K229Q (B), K117R (C) y K117Q (D) por quercetina	43
Figura 9. Inhibición del transporte de OMG en GLUT1 silvestre (A) y mutantes K229Q (B), K117R (C) y K117Q (D) por pentoxifilina	46
Figura 10: Análisis bioinformático del la Lisina 117 en el modelo propuesto por Salas-Burgos	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos obtenidos para GLUT1 silvestre y sus mutantes	33
Tabla 2. Valores de IC50 obtenidos con citocalasina B para GLUT1 y las mutantes analizadas	38
Tabla 3. Valores de IC50 obtenidos con tirfostina A-47 para GLUT1 y las mutantes analizadas	40
Tabla 4. Valores de IC50 obtenidos con quercetina para GLUT1 y las mutantes analizadas.....	44
Tabla 5. Valores de IC50 obtenidos con pentoxifilina para GLUT1 y las mutantes analizadas.....	47
Tabla 6. Tabla resumen de valores de IC50 obtenidos con los inhibidores para GLUT1 y las mutantes analizadas.....	48

LISTADO DE ABREVIATURAS

ATP	adenosin trifostato
cDNA	ácido desoxiribonucleico complementario
DAB	diaminobencidina
DOG	2-deoxiglucosa
DMSO	dimetil sulfóxido
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
GLUT	transportador facilitativo de hexosas.
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
OMG	3-O-metilglucosa
OR1	solución Ringer para ovocitos 1
OR2	solución Ringer para ovocitos 2

1. RESUMEN

GLUT1 es el principal transportador envuelto en el transporte facilitativo de glucosa a través de la membrana plasmática, el cual puede ser inhibido por un variado número de moléculas. Estudios cinéticos de transporte con diversos inhibidores de la actividad funcional de GLUT1 han mostrado que existen sitios accesibles por la cara externa (exofacial) e interna (endofacial) del transportador que participan en la unión de estos ligandos. En este trabajo nosotros mutamos dos residuos de lisina ubicados en segmentos del transportador que muestran homología con sitios de unión de nucleótidos en otras proteínas; uno de orientación exofacial (residuo 117) y otro de orientación endofacial (residuo 229) y las analizamos funcionalmente en ensayos trans-cero de entrada en ovocitos de *Xenopus laevis*. Las mutantes K117R, K117Q y K229Q mostraron niveles de expresión y constantes cinéticas semejantes a la de la proteína silvestre expresada en el mismo sistema, así como su sensibilidad frente a citocalasina B y pentoxifilina. Sin embargo, K117Q perdió parcialmente mientras K117R perdió completamente su capacidad de ser inhibidas por la flavona quercetina, una molécula que se liga a un sitio accesible por la cara exofacial. Además Lys117 presentó varias características en su entorno químico que permiten proponer que el grupo amino de su cadena lateral se encontraría disociado en la proteína silvestre. Por otra parte, K229Q fue insensible frente a tirfostina A-47, un inhibidor sintético de proteínas tirosinas quinasas. Estos antecedentes nos permiten sugerir que el dominio I participa en la unión de flavonas, mientras el dominio II formaría parte del sitio alostérico de unión de tirfostina A-47 en GLUT1.

1.1 SUMMARY

GLUT1 is the major transporter involved in the facilitative transport of glucose across the plasmatic membrane, and it can be inhibited by a varied number of molecules. Transport kinetic studies with various inhibitors of the functional activity of GLUT1 have shown that there are sites accessible from the external (exofacial) and internal face (endofacial) of the carrier that participate in the binding of these ligands. In this work, we mutated two lysine residues located in transporter segments that show homology with nucleotide binding sites in other proteins; one of exofacial orientation (residue 117) and other of endofacial orientation (residue 229), and we analyzed them functionally in zero-trans uptake assays in *Xenopus laevis* oocytes. Mutants K117R, K117Q and K229Q showed levels of expression and kinetic constants similar to that of the wild-type protein expressed in the same system, as well as their sensibility to cytochalasin B and pentoxyfylline. However, K117Q lose partially whereas K117R lose completely their capability of being inhibited by the flavone quercetin, a molecule that binds to an accessible site of the exofacial face. Besides, Lys117 presented several characteristics in its chemical ambient that permit us to propose that the ϵ -amino group should to be dissociated in the wild-type protein. Additionally, K229Q was insensitive to tyrphostin A-47, a synthetic inhibitor of protein tyrosine kinases. These data allowed us to suggest that the domain I participates in the binding of the flavone, whereas the domain II would form part of the allosteric binding site of tyrphostin A-47 on GLUT1.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El transporte de glucosa.

Las membranas biológicas son una barrera semipermeable y altamente especializada que debido a sus características fisicoquímicas no permite el libre paso de solutos a través de ellas. La glucosa, una pequeña molécula de sólo 180 Dalton, es la principal fuente de energía de los seres vivos y forma parte de importantes macromoléculas tales como glicógeno, celulosa o almidón. Los requerimientos de glucosa por parte de la célula son enormes y esta ha debido adaptarse y generar un sistema para transportar glucosa hacia el interior celular (Elbrink y Bihler, 1975; Lieb y Stein, 1971).

El transporte de glucosa a través de la membrana plasmática está mediado por dos familias de proteínas pertenecientes a la superfamilia principal de facilitadores (MFS, *Major Facilitator Superfamily*): la familia *SGLT* (*Sodium Glucose Linked Transporter*) y la familia *GLUT/SLC2* (*Glucose Transporter/Solute carrier family 2*) (Bell et al., 1990; Wood y Trayhurn, 2003). La familia *SGLT* se caracteriza por ser un grupo de proteínas capaces de transportar glucosa en contra del gradiente de concentración, aprovechando el gradiente electroquímico formado por el ión Na^+ . Estos cotransportadores juegan un rol esencial en la absorción de glucosa a nivel intestinal y en la reabsorción de glucosa en el riñón, para lo cual requieren la hidrólisis de ATP a través de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATPasa}$ que mantiene el gradiente de ión sodio y permite así el simporte de glucosa/ Na^+ (Wood y Trayhurn, 2003). Por otro lado la familia *GLUT/SLC2* es un grupo de proteínas (tradicionalmente llamadas GLUT) que facilitan el transporte de glucosa a través de la membrana plasmática a favor de un gradiente de concentración, por lo cual el transporte es independiente de la hidrólisis de ATP (Uldry y Thorens, 2004).

2.2 La familia GLUT/SLC2: similitudes y clasificación

El modelo más aceptado para la estructura de los miembros de la familia GLUT/SLC2, consiste en 12 segmentos de transmembrana en estructura secundaria α -hélice, unidos por cortos lazos extracelulares y citoplasmáticos, a excepción del gran lazo intracelular que une las hélices 6 y 7. Este hecho ha llevado a muchos investigadores a formular la hipótesis que estas proteínas serían el resultado de una duplicación génica de un antiguo miembro de 6 segmentos de transmembrana. Además presentan la región N-terminal y C-terminal orientados intracelularmente (Barrett et al., 1999; Burant et al., 1991; Hruz y Mueckler, 2001).

Debido a que algunos tejidos presentaban bajos niveles de expresión de los isotipos conocidos hasta principios de los años 90 (GLUT1-5), era sugerente la idea de la existencia de otros miembros no descritos pertenecientes a esta familia. Sin embargo, los intentos de identificarlos mediante hibridación o PCR con partidores degenerados fueron en vano. Muchos años después fueron descubiertas algunas secuencias presentes en las bases de datos EST (*Expression Sequence Tag*) con importante similitud a GLUT1 (>28% de identidad en la secuencia aminoacídica), que permitieron el clonamiento de los nuevos miembros de la familia mediante PCR y RACE (Doerge et al., 2000a; Doerge et al., 2001; Doerge et al., 2000b; Ibberson et al., 2000; Jarvis et al., 1986; Li et al., 2004; McVie-Wylie et al., 2001; Phay et al., 2000; Rogers et al., 2002).

En la actualidad se han descrito 14 miembros de esta familia, los cuales difieren en sus propiedades cinéticas, especificidad de sustrato y en su expresión tisular, celular y subcelular. Trece de estos miembros han sido clasificados en tres clases (Clase I, II y III) de acuerdo su disposición estructural predicha a partir de sus secuencias aminoacídicas, y en comparación a los isotipos tradicionalmente descritas (Joost et al., 2002; Joost y Thorens, 2001). La clase I está

compuesta por los más profundamente caracterizados GLUT1-4, quienes presentan una identidad por sobre el 51% entre ellos. Poseen un motivo QL en la hélice 5 (en GLUT1 corresponde a Q161) y un motivo STSIF en el loop extracelular 7. La clase II está formada por GLUT5 y las proteínas relacionadas GLUT7, GLUT9 y GLUT11. La mayor característica de esta clase es que carecen de un residuo de triptófano a continuación del motivo GPXXXP de la hélice 10, el cual estaría implicado en la unión de ligandos como citocalasina B y forsfolina. A la clase III pertenecen GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 y el transportador de mioinositol HMIT. La característica de este grupo es el menor tamaño del lazo extracelular que une los segmentos transmembrana 1 y 2 que además carece de sitio de glicosilación. En los miembros de esta clase, el sitio para glicosilación se encuentra ubicada en el lazo extracelular que une las hélices 9 y 10, lazo que además es de mayor tamaño que su análogo en la clase I y II. El miembro restante de la familia SLC2 no ha sido incluido en alguna de las tres clases de la familia, sin embargo la gran identidad que posee con GLUT3 (>90%) lo posicionaría en la clase I (Jarvis et al., 1986).

2.3 La familia GLUT/SLC2: descripción de las proteínas

Aunque la expresión de GLUT1 es baja en hepatocitos normales, la proteína fue clonada de una librería de cDNA de células de hepatoma HepG2 (Mueckler et al., 1985). Esta proteína es la más estudiada cinética y estructuralmente de todos los miembros de la familia debido a su gran abundancia en eritrocitos humanos y a su expresión ubicua en tejidos humanos, la cual aumenta sus niveles durante la transformación oncogénica (Macheda et al., 2005). El sustrato preferido de GLUT1 es glucosa ($K_M \sim 3\text{mM}$), aunque también son sustratos galactosa, manosa y el ácido dehidroascórbico, la forma oxidada de la vitamina C (Vera et al., 1994). Es inhibido por una gran variedad de compuestos, entre ellos citocalasina B ($IC_{50} 0,44 \mu\text{M}$), floretina ($IC_{50} 49 \mu\text{M}$),

flavonas, isoflavonas, tirfostinas y metilxantinas (Baldwin y Lienhard, 1989; Challiss et al., 1980; Sato et al., 1990a; Vera et al., 2001). Algunas mutaciones en esta proteína conducen a una enfermedad denominada síndrome de deficiencia del transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1DS) caracterizada por deficiencia de captación eritrocitaria de glucosa, hipoglucorragia, epilepsia infantil, microcefalia, espasticidad y retraso mental (De Vivo et al., 2002; Pascual et al., 2004a; Pascual et al., 2004b; Wong et al., 2007).

GLUT2 es un transportador de baja afinidad para glucosa ($K_M \sim 17\text{mM}$), galactosa, manosa y fructosa (Thorens et al., 1988), aunque es un transportador de alta afinidad para glucosamina ($K_M \sim 0,8\text{mM}$), un sustrato utilizado para la síntesis de glicoproteínas y glucosaminoglicanos en cartílago (Lachaal et al., 2001; Uldry et al., 2002). GLUT2 también es inhibido por diferentes moléculas como flavonoides, floretina, florizina y citocalasina B ($IC_{50} 1,9 \mu\text{M}$) (Kwon et al., 2007). Se expresa en altas cantidades en membrana sinusoidal de hepatocitos, células β pancreáticas, membrana basolateral de epitelio intestinal y en membrana basolateral en epitelio de túbulos renales (Thorens et al., 1988). Se cree que juega un rol esencial como sensor de glucosa para la secreción de insulina, en la absorción intestinal de hexosas y en la secreción de glucosa por parte de los hepatocitos (Gouyon et al., 2003; Johnson et al., 1990; Kwon et al., 2007; Mueckler, 1993; Takeda et al., 1993; Thorens et al., 1988).

GLUT3 es un transportador de alta afinidad para glucosa ($K_M \sim 1,4\text{mM}$), pero que también tiene como sustratos a galactosa, manosa, maltosa, xilosa y ácido dehidroascórbico. Como los demás miembros de la clase I, es inhibido por citocalasina B (IC_{50} de $0,4 \mu\text{M}$), floretina y florizina. Aunque fue clonado inicialmente de una librería de cDNA de músculo fetal humano, es expresado principalmente en neuronas (Kayano et al., 1988; Mantych et al., 1992; Stuart et al., 1999) y en testículo (Haber et al., 1993). Subcelularmente se ubica en membrana plasmática, pero

una pequeña fracción se encuentra en vesículas citoplasmáticas distintas a vesículas sinápticas (Thoidis et al., 1999). GLUT3 también está presente en gránulos α de plaquetas humanas, de allí se transloca a la membrana plasmática bajo la inducción con trombina, hecho que podría estar relacionado con los requerimientos de energía de las plaquetas para su activación (Heijnen et al., 1997).

Por su parte GLUT4 fue clonado inicialmente de músculo esquelético. Constituye el principal transportador expresado en tejido adiposo, músculo esquelético y cardíaco (Fukumoto et al., 1989; Tejero et al., 2004). Tiene afinidad por glucosa ($K_M \sim 5\text{mM}$), glucosamina ($K_M \sim 3,9\text{mM}$) y ácido dehidroascórbico, siendo inhibido por citocalasina B ($IC_{50} 0,1-0,2 \mu\text{M}$), floretina ($IC_{50} 10 \mu\text{M}$), florizina ($IC_{50} 140 \mu\text{M}$) y genisteína ($IC_{50} 20 \mu\text{M}$) (Bazuine et al., 2005; Kasahara y Kasahara, 1997). GLUT4 es un transportador que se transloca desde vesículas hacia la membrana plasmática en respuesta a insulina, aumentando de 10 a 20 veces su concentración en la superficie celular. Este hecho lo envuelve en la regulación de la concentración sanguínea de glucosa (Abel et al., 2001; Hansen et al., 1998; Thurmond y Pessin, 2001).

GLUT5 es un transportador que en ovocitos de *X.laevis* evidencia transporte de glucosa ($K_M \sim 0.36 \text{mM}$) (Manolescu et al., 2007) y de fructosa ($K_M \sim 6\text{mM}$) (Burant et al., 1992). No es inhibido por citocalasina B, floretina o florizina (Mate et al., 2001), aunque en ratas se ha descrito la inhibición por citocalasina B (Manach et al., 2005). Es expresado principalmente en intestino delgado, participando en la absorción intestinal de fructosa (Blakemore et al., 1995; Kayano et al., 1990). También ha sido descrita su expresión en barrera hematoencefálica (Mantych et al., 1993) y cáncer mamario (Zamora-Leon et al., 1996).

GLUT6 que en un comienzo fue denominado GLUT9, tiene una baja afinidad por glucosa, no evidencia transporte de galactosa, fructosa o manosa (Doege et al., 2000a). Su mRNA es

expresado principalmente en bazo, cerebro y leucocitos, pero la expresión de la proteína no ha sido detectada. La transfección de GLUT6 en adipocitos exhibe acumulación de la proteína en compartimientos intracelulares, pero cuando el motivo de internalización dileucina ubicado en el extremo amino terminal es mutado o la proteína es coexpresada con un dominante negativo de dinamina, GLUT6 es detectado en membrana citoplasmática (Doege et al., 2000a; Lisinski et al., 2001).

GLUT7 fue clonado de una librería de cDNA de intestino, mostrando alto grado de identidad a GLUT5 y expresión en intestino delgado, colon, testículo y próstata (Li et al., 2004). Transporta glucosa ($K_M \sim 0,3\text{mM}$) (Li et al., 2004) y fructosa ($K_M \sim 0,1\text{mM}$) (Manolescu et al., 2005) con alta afinidad.

GLUT8 es ha detectado en cerebro, adipocitos y en altos niveles en testículo y en blastocisto (Ibberson et al., 2002; Ibberson et al., 2000; Lisinski et al., 2001; Scheepers et al., 2001), donde jugaría un rol esencial en el metabolismo, ya que la supresión de esta proteína lleva a un fuerte aumento en la apoptosis en estas células. Tiene alta afinidad por glucosa ($K_M \sim 2\text{mM}$), y es inhibido por citocalasina B. Cuando es transfectado en ovocitos, este se recluta completamente en compartimientos intracelulares, aunque es expresado en membrana plasmática al mutar el motivo dileucina del extremo amino terminal o bajo la estimulación con insulina (Carayannopoulos et al., 2000; Doege et al., 2000b).

En el caso de GLUT9, la expresión de su mRNA se ha detectado en hígado, placenta y riñón, siendo la proteína detectada en la fracción microsomal de túbulo renal (Augustin et al., 2004; Phay et al., 2000). Se ha descrito además su expresión en condroblastos y condrocitos de origen ovino (Mobasherri et al., 2005; Mobasherri et al., 2002). Transporta glucosa y fructosa (Manolescu et al., 2007), no siendo inhibido por citocalasina B (Augustin et al., 2004).

GLUT10 transporta desoxiglucosa con alta afinidad ($K_M \sim 0,3\text{mM}$), describiéndose además competencia con glucosa y galactosa e inhibición por floretina (Dawson et al., 2001). Su mRNA es detectado en corazón, pulmón, cerebro, páncreas, músculo esquelético, hígado, placenta y riñón. Se cree podría estar implicado en la diabetes tipo II debido a que el gen que codifica la proteína se ubica en un loci asociado a esta enfermedad (McVie-Wylie et al., 2001).

GLUT11 posee tres variantes de corte y empalme alternativos que difieren en el primer exón codificando para GLUT11-a b y c. GLUT11-c incluye un motivo de internalización en su extremo amino terminal que no se encuentra en las otras variantes de la proteína (Doege et al., 2001; Jarvis et al., 1986). Para las tres isoformas se ha descrito transporte de glucosa y fructosa (Manolescu et al., 2007), siendo inhibidas débilmente por citocalasina B (Doege et al., 2001). GLUT11-a es encontrado en corazón, placenta y músculo esquelético, mientras que GLUT11-b ha sido encontrado en hígado, placenta, cerebro y pulmón y GLUT11-c es detectado en páncreas, corazón y músculo esquelético (Scheepers et al., 2005). Subcelularmente se ubican todos en la superficie de la membrana citoplasmática (Scheepers et al., 2005).

GLUT12 fue descrito inicialmente en cáncer mamario (Rogers et al., 2002), pero se ha descrito además expresión en músculo esquelético (Stuart et al., 2006), placenta (Gude et al., 2005), cancer renal (Suganuma et al., 2007), tejido adiposo (Wood et al., 2003) e intestino delgado (Rogers et al., 2002). Posee dos motivos de internalización en sus extremos amino y carboxilo terminal y una alta homología con GLUT10 y GLUT4 (Rogers et al., 2002). Transporta desoxiglucosa y tiene afinidad por glucosa, fructosa y galactosa (Rogers et al., 2003). No es claro el rol que podría cumplir esta proteína, pero se relaciona con los grandes requerimientos de glucosa por parte de células cancerígenas y por los tejidos que responden a insulina, así como con la diabetes tipo II (Macheda et al., 2003).

HMIT es un cotransportador de mioinositol/H⁺ expresado predominantemente en cerebro (Uldry et al., 2001). El transporte de mioinositol se realiza con una K_M de 0,1mM y en proporción mayor de una molécula de sustrato por protón transportado (Bourgeois et al., 2005). Subcelularmente es encontrado en vesículas distintas a las vesículas sinápticas, pero se expresa en membrana tras la despolarización, activación de PKC o incremento intracelular de Ca²⁺ (Uldry et al., 2004). Aunque ha sido detectada su inhibición por floretina, florizina y citocalasina B (Uldry et al., 2001), no se ha demostrado el transporte de glucosa.

La última proteína de la familia en ser identificada fue GLUT14, la cual posee dos variantes de corte y empalme expresadas exclusivamente en testículo (Jarvis et al., 1986). La variante corta (GLUT14-S) posee gran identidad con GLUT3 (> 94%). Los genes que codifican para GLUT14 y GLUT3 se ubican a sólo 10Mb de distancia en el cromosoma 12p13.3, por lo que se cree que GLUT14 sería un duplicón de GLUT3 (Jarvis et al., 1986). Su función es aun desconocida.

2.4 GLUT1: Estructura y función.

El transportador más estudiado de los 14 miembros de la familia es GLUT1, debido a su gran abundancia en eritrocitos humanos (~5%) y a sus altos niveles de expresión en una gran cantidad de tejidos, constituyéndose en el principal transportador de glucosa conocido (Hruz y Mueckler, 2001). La existencia de un transportador de glucosa fue descrita inicialmente en eritrocitos humanos (Baker et al., 1978), donde se han estudiado ampliamente las propiedades cinéticas (Carruthers y Zottola, 1996; Jones y Nickson, 1982; Nickson y Jones, 1977; Taverna y Langdon, 1973; Zoccoli et al., 1978), demostrando que la proteína transporta glucosa a favor del

gradiente de concentración, en forma bidireccional y asimétrica (Baker et al., 1978; Carruthers, 1990; Gould y Holman, 1993).

GLUT1 fue clonado varias décadas después a partir de una librería de cDNA de la línea celular de hepatoma humano HepG2 (Mueckler et al., 1985). El gen de GLUT1 se encuentra en el cromosoma 1p35-p31.3, tiene 35 kb de extensión y está formado por 10 exones (Shows et al., 1987). Codifica para una proteína de 492 aminoácidos con una masa molecular calculada de 54,2 kDa, pero que genera una amplia banda de 45-65 kDa en un SDS-PAGE (Baldwin y Lienhard, 1989; Deziel y Rothstein, 1984), debido a la N-glicosilación en asparagina 45 (Klip et al., 1984).

El análisis de la estructura primaria muestra una gran cantidad de residuos hidrofóbicos (>60%), lo cual es consistente con una proteína integral de membrana, calculándose 12 segmentos de transmembrana al realizar el perfil de hidropatía (Mueckler et al., 1985). El transportador posee un 82% de estructura α -hélice, un 10% de giros β y el restante 8% de estructura aleatoria (Chin et al., 1987; Garcia-Alvarez et al., 2007). Se han propuesto otros modelos alternativos acerca de la estructura secundaria del transportador (Fischbarg et al., 1993), sin embargo los datos experimentales existentes sostienen el esquema de 12 hélices de transmembrana. Estudios de la topología del transportador en la membrana arrojan que el extremo amino y carboxilo terminal se ubican intracelularmente al igual que el gran lazo hidrofílico que une los segmentos de transmembrana 6 y 7 (Davies et al., 1990; Hresko et al., 1994a). Además se ha comprobado que el lazo que une los segmentos de transmembrana 1 y 2 se ubica hacia la cara extracelular del transportador, donde se ubica la glicosilación en Asn45 (Asano et al., 1991; Hresko et al., 1994a). Si bien no es conocida la estructura terciaria de la proteína, existen abundantes datos que llevaron a proponer un modelo acerca de la disposición tridimensional de las hélices en la membrana. Se plantea que la hélice 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 y 11,

todas anfipáticas, formarían un “poro” a través del cual se translocaría el azúcar a través de la membrana (Heinze et al., 2004; Hruz y Mueckler, 1999; Hruz y Mueckler, 2000; Mueckler y Makepeace, 1999; Mueckler y Makepeace, 2002; Mueckler y Makepeace, 2004; Mueckler y Makepeace, 2005; Olsowski et al., 2000), mientras que las hélices 3, 6, 9 y 12 rodearían este “poro” y no participarían directamente en el transporte de glucosa, sino que estabilizarían la correcta inserción de la proteína en la membrana (Mueckler y Makepeace, 2006; Mueckler et al., 2004). Este modelo además es consistente con la estructura descrita por cristalografía de rayos X para los transportadores bacterianos Lac permeasa y el transportador de glicerol 3-fosfato (Abramson et al., 2003; Huang et al., 2003), también miembros de la superfamilia principal de facilitadores. En cuanto a una posible estructura cuaternaria que poseería GLUT1, algunos investigadores sugieren la existencia de un homotetrámero formado por dos homodímeros del transportador, con alternancia en cuanto a la exposición facial de los sitios de unión a glucosa y cooperatividad entre ambos dímeros (Carruthers y Zottola, 1996; Hebert y Carruthers, 1992), lo que se contradice con las evidencias de que el transportador forma sólo monómeros en la membrana celular (Baldwin et al., 1981; Burant y Bell, 1992; Jacobs et al., 1987).

El modelo más aceptado acerca del mecanismo de transporte de glucosa por la proteína consiste en la existencia de dos sitios de unión a glucosa: uno en la cara intracelular y el otro en la cara extracelular del transportador (Baker et al., 1978; Carruthers, 1990). Ambos sitios no pueden ser utilizados simultáneamente, debido a la exposición de sólo un sitio de unión a glucosa. Cuando el azúcar se une a uno de los dos sitios, se induce un cambio conformacional que provoca la translocación de la hexosa a través de la membrana, quedando así expuesto el otro sitio de unión de glucosa que previamente se encontraba desocupado (Baker et al., 1978; Carruthers, 1990; Gorga y Lienhard, 1981). Este modelo explica una propiedad que ha sido

descrita para el transporte de glucosa por GLUT1, la aceleración por contratransporte, en el cual la captación de glucosa es bastante más rápida cuando hay azúcar presente en el lado citoplasmático que cuando no lo hay (Carruthers, 1990; Liu et al., 2001; Mueckler, 1994; Naftalin et al., 1985; Wilbrandt, 1972).

Estudios con mutagénesis sitio dirigida han revelado algunos residuos de aminoácidos que son importantes tanto en la función como en la estructura del transportador. Han sido identificados residuos en la hélice 5 que se encontrarían en el sitio de unión de glucosa exofacial o muy cerca de él, ya que mutantes de Gln161 y Val165 impiden la unión de glucosa al sitio exofacial, así como de realizar el ciclo de transporte (Mueckler et al., 1994a; Mueckler y Makepeace, 1997; Mueckler y Makepeace, 1999; Mueckler et al., 1994b). En la hélice 7, las mutantes de Gln282 alteran el sitio de unión exofacial (Hashiramoto et al., 1992), mientras que mutantes de Tyr293 lo hacen con el endofacial (Hruz y Mueckler, 1999; Mori et al., 1994). Gln282 forma parte del motivo QLS, encontrado en todos los GLUTs que transportan glucosa, que al ser mutado confiere una mayor afinidad por fructosa y menor afinidad por glucosa (Seatter et al., 1998). El segmento transmembrana 10 es una hélice rica en prolinas y glicinas, por lo que se ha postulado que estaría implicada en los cambios conformacionales sufridos mediante el ciclo de transporte (Gould y Holman, 1993), sin embargo las mutaciones de estos aminoácidos no alteran significativamente la actividad del transportador (Tamori et al., 1994; Wellner et al., 1995). Trp388 en la hélice 10 y Trp412 en la hélice 11 han sido implicados en la unión del inhibidor citocalasina B (Deziel y Rothstein, 1984; Inukai et al., 1994). La estabilización que necesita el carbono 1 de glucosa (Barnett et al., 1973) podría ser realizada por Trp412 mediante interacciones hidrofóbicas (Garcia-Alvarez et al., 2007; Hruz y Mueckler, 2000). Además de los residuos presentes en las hélices, se ha descrito que Ser294 y Thr295, ubicados entre las hélices 7

y 8, estarían implicados en el cambio conformacional del ciclo de transporte, tal cual ocurre con Tyr293 (Doege et al., 1998). Algo similar ocurriría con Glu345, Glu409 y Arg416 en GLUT4 (Schurmann et al., 1997), que corresponden a Glu329, Glu393 y Arg400 en GLUT1 (Hruz y Mueckler, 2001). El motivo RXGRR encontrado entre las hélices 2-3 y 8-9 es postulado para la correcta inserción de la proteína en la membrana (Sato y Mueckler, 1999), mientras que el extremo carboxilo terminal es esencial para conservar la actividad del transportador (Oka et al., 1990). Otros residuos descritos como importantes para la estructura-función del transportador son Glu380 en hélice 10 (Mueckler y Makepeace, 2002); Thr310, Ile311, Asn317 y Thr318 en hélice 8 (Mueckler y Makepeace, 2004); Tyr143 y Asp146 en hélice 4 (Mueckler y Makepeace, 2005); y Gln283 en la hélice 7 (Mueckler y Makepeace, 2006). Algunos de estos residuos de aminoácidos han sido detectados como posibles sitios de interacción con glucosa o inhibidores mediante estudios de modelamiento y acoplamiento molecular (Bulnes, 2006; Cunningham et al., 2006; Holyoake et al., 2006; Salas-Burgos et al., 2004). Algunas de estas mutaciones han sido documentadas en el síndrome de deficiencia de GLUT1, entregando un antecedente más acerca de la importancia de estos residuos en la estructura y función de la proteína (Zhou et al., 2007).

2.5 GLUT1: Interacción con inhibidores y dominios de unión de ATP.

Es conocido hace mucho tiempo que GLUT1 interactúa con moléculas estructuralmente no relacionadas con glucosa, pero que modulan su actividad. La más estudiada es citocalasina B (CCB), un metabolito de origen fúngico que exhibe una gran diversidad de efectos sobre mecanismos celulares (Carter, 1967), al unirse a un extremo de la subunidad de actina e impedir su polimerización (Cooper, 1987). La inhibición del transporte facilitativo de glucosa por CCB fue informada inicialmente como una inhibición de tipo no competitiva (Bloch, 1973) y

reversible (Taverna y Langdon, 1973), sin embargo otros estudios demostraron que la inhibición es no competitiva en ensayos de entrada y ensayos de Sen-Widdas (Baker et al., 1978), mientras que en ensayos de salida la inhibición es de tipo competitiva (Deves y Krupka, 1978b; Lin y Spudich, 1974). Con estos resultados se propuso la idea que CCB interactúa con el transportador en un sitio ubicado en la cara citoplasmática del transportador (Deziel y Rothstein, 1984; Klip et al., 1984). Un estudio utilizando CCB marcada y mutagénesis sitio específica reveló que el sitio de unión de citocalasina B se ubica entre las hélices 10 y 11 del transportador donde Trp388 y Trp412 estarían implicados en la interacción con el inhibidor (Inukai et al., 1994). La inhibición se produce con un IC_{50} de 0,1-1 μ M, valor que fluctúa de acuerdo a la técnica utilizada (Baker et al., 1978; Baldwin y Lienhard, 1989; Bloch, 1973; Carruthers y Helgerson, 1991; Deves y Krupka, 1978a; Taverna y Langdon, 1973).

Un grupo muy amplio de moléculas reconocidas como inhibidoras de tirosinas quinasas se han sido descrito además como inhibidores del transporte de glucosa en eritrocitos humanos y variadas líneas celulares (Vera et al., 1996; Vera et al., 2001). Estos compuestos inhiben el transporte de glucosa de una manera dosis dependiente y por unión directa al transportador debido a su capacidad de desplazamiento de citocalasina B de la proteína (Vera et al., 2001). Se desprende de este trabajo que aquellos compuestos que compiten con la unión de ATP en tirosinas quinasas son capaces de inhibir el transporte de glucosa de una manera competitiva, mientras que aquellos compuestos que compiten con la unión de tirosina, no son inhibidores de GLUT1 o lo hacen de una manera no competitiva (Vera et al., 2001). Estos resultados son consistentes con la idea que el transportador es una proteína que une ATP (Carruthers et al., 1989; Hebert y Carruthers, 1986; Helgerson et al., 1989). Dentro de los inhibidores estudiados se incluyen flavonas e isoflavonas, compuestos polifenólicos presentes en una gran variedad de

vegetales ingeridos en la dieta, absorbidos a nivel intestinal y con una gran variedad de efectos a nivel celular y molecular (Erlund et al., 2006; Murota y Terao, 2003; Rice-Evans, 2004; Scalbert y Williamson, 2000; Walle, 2004; Williams et al., 2004), donde destacan quercetina, miricetina y genisteína entre otros. Otro grupo de compuestos corresponde a las tirfostinas, compuestos sintéticos inhibidores de tirosinas quinasas, también con un amplio espectro de efectos a nivel celular (Gazit et al., 1991; Gazit et al., 1989; Levitzki y Gazit, 1995).

Otro grupo de compuestos que son conocidos como inhibidores del transporte facilitativo de glucosa son las metilxantinas, compuestos bicíclicos sustituidos con cadenas alifáticas de distintos tamaños (Challiss et al., 1980; Yasuhara y Levy, 1988). Poseen una gran homología estructural con purinas, siendo encontrados en vegetales comestibles y en distintas bebidas como café, té y cola (Daly y Fredholm, 1998). Los efectos sobre la función celular son amplios, destacando la relajación de la fibra muscular lisa, estimulación de la actividad cardíaca y del sistema nervioso central, aumento de la diuresis, reducción de la agregación eritrocitaria y plaquetaria y reducción de la viscosidad de la sangre (Sato et al., 1990a; Sato et al., 1990b; Sato et al., 1991). La presencia de estas moléculas potencia los signos clínicos del síndrome de deficiencia de GLUT1 (Ho et al., 2001). Las metilxantinas mejor estudiadas en cuanto a sus efectos sobre GLUT1 son pentoxifilina, cafeína y teofilina. Datos de nuestro laboratorio demuestran que la inhibición es por unión directa al transportador debido a su capacidad de desplazar citocalasina B y de tipo competitiva con el transporte de glucosa en ensayos de entrada, sugiriendo que interactúa con la proteína por la cara exofacial. Además, ensayos en eritrocitos apuntan a que la flavona quercetina y las metilxantinas se unirían a GLUT1 en sitios distintos (Ojeda, 2005).

La unión de estos compuestos al transportador y extensos estudios realizados anteriormente por otros grupos aluden a que GLUT1 es modulado por ATP, sin embargo la hidrólisis del nucleótido no ha podido ser demostrada (Carruthers et al., 1989; Cloherty et al., 2001; Hebert y Carruthers, 1986; Helgerson et al., 1989; Jarvis et al., 1986; Levine et al., 2001). Un análisis de la estructura primaria del transportador reveló que GLUT1 presenta tres putativos dominios con homología de secuencia a sitios de unión de ATP en otras proteínas (Carruthers y Helgerson, 1989; Fry et al., 1986; Levine et al., 1998; Walker et al., 1982). Estos cortos segmentos de aminoácidos corresponden al dominio I ubicado entre los residuos 111-118 (Gly-Phe-Ser-Lys-Leu-Gly-Lys-Ser), abarcando parte de la hélice 3 y del lazo extracelular que une los segmentos de transmembrana 3 y 4; el dominio II ubicado entre los residuos 225-229 (Lys-Ser-Val-Leu-Lys), en el gran lazo intracelular que une las hélices 6 y 7; y el dominio III que se encuentra entre los residuos 332-338 (Gly-Arg-Arg-Trp-Leu-His-Leu), en el lazo intracelular que une los segmentos de transmembrana 8 y 9. Mutagénesis sitio dirigida en residuos pertenecientes a estos motivos, reveló que la integridad de estos sitios es trascendental para mantener las propiedades cinéticas del transporte, indicando que estos sitios estarían envueltos en la unión y transporte de glucosa a través de la membrana plasmática (Liu et al., 2001). Aunque se ha demostrado la unión de ATP o sus análogos no hidrolizables a GLUT1, no se conoce como ATP podría modular la actividad del transportador, ni cual sería la labor que cumplirían estos dominios.

Con el fin de demostrar una relación entre citocalasina B e inhibidores de tirosinas quinasas con los dominios de unión de ATP, ya existen algunos datos en nuestro laboratorio revelando que algunos inhibidores de tirosinas quinasas pierden su capacidad de inhibir el transporte de glucosa al ser mutados los dominios de unión de ATP. Es el caso del dominio I que pierde la inhibición por quercetina (Gly116→Ala) y en el dominio III con citocalasina B

(Thr335→Leu). Es por ello que esta tesis propone investigar el rol que cumplirían los residuos de lisina (Lys117 y Lys229) en la inhibición del transporte de glucosa por citocalasina B, quercetina, tirfostina A-47 y pentoxifilina, realizando para ello las mutaciones sitio dirigidas Lys117→Arg y Lys117→Gln en el dominio I, y la mutación Lys229→Gln en el dominio II, y evaluando sus propiedades cinéticas y la inhibición por las moléculas ya mencionadas mediante la expresión de las mutantes en ovocitos de *X.laevis*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3-O-metilglucosa, 2-desoxiglucosa, citocalasina B, pentoxifilina, quercetina, tirfostina A-47 y benzocaína fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. [³H]3-O-metilglucosa y [³H]2-desoxiglucosa fueron adquiridos de American Radiolabeled Chemicals Inc, USA, mientras que el NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, HEPES, Tris-HCl, Tris-acetato, acrilamida, bisacrilamida, Hepes, dimetilsulfoxido, fueron obtenidos de J.T.Baker, USA. Colagenasa Tipo I se adquirió de United States Biological Inc. Triptona o peptona, extracto de lavadura, fueron adquiridos de Mo Bio Laboratories Inc. SDS, agarosa y bromuro de etidio fueron obtenidos de Winkler Ltda., mientras que el líquido de centelleo EcoScynt fue adquirido de National Diagnostic Inc. Por su parte EDTA fue adquirido de UCB Bioproducts. El TEMED se adquirió de Bio-Rad Laboratories. Además, los kit Qiagen Plasmid Midi y Qiagen Plasmid Mini, fueron obtenidos de Qiagen company. El kit de mutagénesis, Quickchange Site-Directed fue obtenido de Stratagene Corporation USA. El kit de transcripción mMESSAGING 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. Las hembras de *X.laevis* fueron obtenidas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, Santiago.

3.2 Generación de las mutantes K117Q, K117R y K229Q en GLUT1

3.2.1 Mutagénesis sitio dirigida

Para la construcción de las mutantes K117Q, K117R y K229Q se utilizó el kit de mutagénesis QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene usando como templado 50ng de GLUT1 silvestre clonado en el vector pGEM. La reacción de PCR consistió en una denaturación inicial de 30 segundos a 95°C seguido de 12 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 55°C y 5 minutos a 58°C. Los partidores utilizados para la realizar las mutaciones fueron:

K117Q Sen 5`-TTCTCGAAACTGGGCCCAGTCCCTTTGAGATGCTG-3`
 As 5`-CAGCATCTCAAAGGACTGGCCCAGTTTCGAGAA-3`

K117R Sen 5`-GGCTTCTCGAAACTGGGCAGGTCCCTTTGAGATGCTG-3`
 As 5`-CAGCATCTCAAAGGACCTGCCCAGTTTCGAGAAGCC-3`

K229Q Sen 5`-CGGGCCAAGAGTGTGCTACAGAAAGCTGCGCGGGACAGC-3`
 As 5`-GCTGTCCCGCGCAGCTTCTGTAGCACACTCTTGGCCCCG-3`

Para la digestión de la hebra parental se utilizó *DpnI* que fue proporcionada en el kit de mutagénesis y el producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 1,5% en TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 10mM, pH 8,0).

3.2.2 Transformacion a células competentes

El DNA mutado fue transformado en las células supercompetentes XL1-blue, para lo cual se incubó 1µL del producto de PCR tratado con *DpnI* (10U/µL) con 50µL de las bacterias proporcionadas por el kit a 42°C por 45 segundos, y luego en hielo por 2 minutos. Se agregaron 0,5 mL de medio SOC (Extracto de levadura 5%, NaCl 5%, MgCl₂ 12,5mM, MgSO₄ 12,5mM, Glucosa 20mM, pH 7,5) y se incubó a 37°C por una hora con agitación constante (250rpm).

3.2.3 Purificación y secuenciación del DNA mutado

Las bacterias transformadas fueron sembradas en Agar-LB conteniendo 10mg/mL de ampicilina y crecidas por 16horas a 37°C. Tres colonias fueron seleccionadas y sembradas en 5mL de medio LB-Ampicilina y crecidas por 8 horas a 37°C a 250rpm de agitación. Se realizó una extracción de DNA plasmidial por ebullición sedimentando las células y resuspendiéndolas en tampón STET (Tris-HCl 10mM, SDS 1%, EDTA 1mM, pH 8); se llevó a ebullición por 1 minuto y luego se centrifugó a 12000rpm. El sobrenadante fue precipitado con 1/20 volumen de NH₄OAc 5M y dos volúmenes de etanol absoluto, lavado con etanol 75% y resuspendido en agua desionizada. El DNA obtenido fue utilizado para realizar un análisis de restricción con la enzima *HindIII*. Además se creció un cultivo de 250mL que fue utilizado para realizar una extracción de DNA plasmidial con el kit Qiagen Midi prep, el cual que fue cuantificado por espectrofotometría a 260nm. Este DNA fue empleado para comprobar el cambio mutagénico mediante su secuenciación automática y utilizado como templado para la síntesis de mRNA.

3.3 Síntesis de mRNA e inyección en ovocitos de *Xenopus laevis*.

3.3.1 Preparación del mRNA de GLUT1 y de las mutantes.

El vector conteniendo GLUT1 y las mutantes K117Q, K117R y K229Q fue digerido con *XbaI* a 37°C por 2 horas. Para purificarlo luego de la reacción, el DNA lineal se incubó por 30 minutos a 50 °C con SDS 5%, proteinasa K (10mg/mL) y agua desionizada en un volumen final de 30µL. A continuación se realizó una extracción fenólica del DNA agregando a la mezcla 1 volumen de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico 24:25:1 y agitando vigorosamente en vortex. Después de centrifugar a 4000rpm por 1minuto a temperatura ambiente se separó la fase acuosa y se precipitó. Se agregó 1 volumen de NH₄OAc 5M y dos volúmenes de etanol absoluto y se

incubó a -20°C por al menos 30 minutos. Finalmente se centrifugó a 12000rpm por 20 minutos a 4°C , se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado a 37°C . El DNA lineal fue resuspendido en $20\mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas y cuantificado midiendo su absorbancia a 260nm .

A continuación se procedió a la síntesis del mRNA con el kit de transcripción T7-mMessage mMachine (Ambion) utilizando $1\mu\text{g}$ del DNA lineal correspondiente como sustrato. El mRNA resultante fue precipitado con 1 volumen de LiCl 7,5M e incubado por al menos 30 minutos a -20°C . Luego se procedió a centrifugar a 13000rpm por 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con 1mL de etanol 70% seguido de una nueva centrifugación a 13000rpm por 5 minutos. El mRNA fue secado y resuspendido en $20\mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas. Posterior a esto se verificó la integridad del RNA obtenido a través de una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La cuantificación se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 260nm tomando en cuenta que RNA $40\mu\text{g}/\text{mL}$ presenta una absorbancia de 1.

3.3.2 Obtención e inyección de ovocitos de *Xenopus laevis*.

Hembras adultas de *X. laevis* fueron anestesiadas sumergiéndolas en una solución de benzocaína 0,8% y NaHCO_3 0,5%. Luego se le realizó una incisión en el abdomen y fueron tomados aproximadamente 3g de tejido ovárico, el cual fue seccionado manualmente y mantenido por 2 horas a temperatura ambiente en una solución de colagenasa tipo I $1,3\text{mg}/\text{mL}$ en medio ORII (NaCl 82,5 mM, KCl 1,8 mM, MgCl_2 1 mM, Hepes 5 mM, pH 7,5). Posteriormente los ovocitos en estado V y VI fueron seleccionados y mantenidos toda la noche a 15°C en medio ORI (NaCl 82,5 mM, KCl 1,8 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 2mM, Hepes 5 mM, pH 7,5). Al día siguiente los ovocitos fueron inyectados con 40ng del mRNA correspondiente y mantenidos a 15°C en medio ORI durante 48 horas para lograr su máxima expresión.

3.4 Análisis mediante western blot

3.4.1 Obtención de las membranas totales de ovocitos

Un grupo de 20 ovocitos inyectados con mRNA de GLUT1 y/o las mutantes del transportador fueron homogeneizados con tampón de homogeneización (HEPES 10 mM; sacarosa 250 mM, DTT 3mM, PMSF 1mM, EDTA 1mM, pestatina A 1µg/ µL, aprotinina 1µg/µL, leupeptina 1µg/µL, pH 7,5) y centrifugados a 1000rpm por 30 segundos. El sobrenadante fue recentrifugado 3 a 4 veces y mantenido a -20°C hasta su utilización.

3.4.2 SDS-PAGE y western blot

La fracción de membranas totales fue sujeta a una electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 10% y luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas en solución de bloqueo (leche descremada al 5%, tween 0,03% y BSA al 1%) por 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante. Luego, se procedió a la incubación por un periodo de 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante, con el primer anticuerpo 1:1000, anti-GLUT1 de ratón dirigido contra los últimos quince aminoácidos de la región carboxilo terminal de la proteína, el cual fue previamente purificado por afinidad desde conejo (Alpha Diagnostic Internacional). Una vez finalizada la incubación con el primer anticuerpo las membranas fueron lavadas en solución fosfato salino (PBS), 3 veces por 5 minutos cada vez, después de los cual, se procedió a incubar con el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo unido a HRP por 1 hora en agitación constante y a temperatura ambiente. Finalmente la membrana se lavó 3 veces con PBS y se reveló con DAB (diaminobencidina) al 0,05% en PBS pH 7,4 y 0,03% de peróxido de hidrógeno por 10 minutos en oscuridad.

3.5 Ensayos de transporte y análisis cinéticos.

3.5.1 Ensayos de captación de 3-O-metilglucosa y 2-desoxiglucosa en condiciones trans-cero de entrada.

Para determinar los parámetros cinéticos de transporte de GLUT1 y cada una de sus mutantes, grupos de 3 ovocitos fueron separados y mantenidos en medio ORI hasta el momento del ensayo. El ensayo se realizó en triplicado colocando los ovocitos en una mezcla radiactiva que contenía 1 μ Ci de [³H]3-O-metilglucosa o [³H]2-desoxiglucosa por ensayo y distintas concentraciones de OMG (0-50mM) y DOG (0-40mM) en medio ORI. La mezcla de transporte fue incubada por 3 minutos a temperatura ambiente y detenida con tampón de detención frío (ORI, HgCl₂ 10 μ M) y lavada 3 veces con el mismo tampón. Los ovocitos fueron lisados con tampón de lisis (Tris-HCl 10mM, SDS 2%, pH 8,5) y puestos en viales con 2mL de líquido de centelleo para la cuantificación de la radiactividad. Los resultados se expresaron en pmoles incorporados por minuto y por ovocito y graficados en función de la concentración de sustrato no radiactivo para la obtención de los valores de K_M y V_{Max} . Como control se realizó el mismo ensayo con ovocitos no inyectados y el transporte obtenido fue restado al observado con ovocitos inyectados.

3.5.2 Ensayos de inhibición en condiciones trans-cero de entrada.

Para los ensayos de inhibición, grupos de tres ovocitos inyectados fueron incubados en una mezcla radiactiva conteniendo 1 μ Ci de [³H]3-O-metilglucosa, OMG 0,25mM y distintas concentraciones de inhibidor en medio ORI. Las concentraciones de inhibidor fueron variadas de 0-100 μ M para quercetina, 0-300 μ M para tirfostina A-47, 0-10 μ M de CCB y de 0-30mM de pentoxifilina. El ensayo por triplicado fue incubado por 3 minutos a temperatura ambiente y detenido y lavado con tampón de detención. Posteriormente se procedió a la cuantificación

mediante centelleo líquido. Los resultados fueron expresados como % del transporte, en donde el ensayo en ausencia de inhibidor fue tomado como 100% del transporte, y graficados en función de la concentración del inhibidor correspondiente para la obtención del IC_{50} mediante una regresión no lineal de decaimiento hiperbólico. Como control se utilizaron ovocitos no inyectados y los valores resultantes fueron restados a los obtenidos con los ovocitos inyectados.

3.6 Análisis bioinformático

Los cálculos de distancia entre residuos aminoacídicos fueron realizados con el programa ICM-pro 3.4 utilizando el modelo de GLUT1 propuesto por Salas-Burgos y publicado en la base de datos de proteínas (PDB 1SUK). Los análisis de superficie electrostática fueron realizados también con el programa ICM-pro 3.4, utilizando el mismo modelo presente en la base de datos.

3.7 Análisis estadísticos

Para la determinación estadística de las diferencias obtenidas en los datos, estos fueron sometidos a un t-test de student, utilizando un límite de confianza de un 95%.

4. RESULTADOS

4.1 Mutaciones sitio dirigidas en los residuos K117 y K229 de GLUT1.

Con el fin de averiguar el rol que cumplirían los residuos de lisina 117 y lisina 229, se realizaron mutaciones sitio dirigidas en la proteína. En el caso de lisina 117, se realizó un sutil cambio por arginina, en donde sólo existe una pequeña variación en el tamaño y movilidad de la cadena lateral del aminoácido y un cambio por glutamina, en donde el cambio es un poco mayor, ya que además de tener una cadena lateral más corta, glutamina no posee la carga neta positiva. En el caso de lisina 229, se optó por la mutación por glutamina, ya que el dominio II no ha sido descrito como importante para la función de la proteína (Liu et al., 2001). Las tres mutaciones fueron realizadas como se describe en materiales y métodos, confirmando la mutación por secuenciación automática. En la figura 1 se muestra un alineamiento del resultado de la secuenciación de la región mutada, en donde se puede observar la efectividad de las mutaciones realizadas, no existiendo presencia de otras mutaciones en la secuencia de la proteína. Es así que resultados funcionales distintos entre la proteína silvestre y las mutantes sólo se explican por la presencia de la mutación generada.

4.2 Expresión de la proteína silvestre y mutantes K117R, K117Q y K229Q en ovocitos de *Xenopus laevis*

Luego de confirmar las mutaciones por secuenciación automática, los cDNA fueron utilizados para realizar la síntesis *in vitro* de los mRNA tanto del transportador silvestre, como de las respectivas mutantes. Estos fueron inyectados en ovocitos de *Xenopus laevis* evaluando su

```

GLUT1  GAACCTGCTG  GCCTTCGTGT  CCGCCGTGCT  CATGGGCTTC  TCGAAACTGG  350
K117Q  GAACCTGCTG  GCCTTCGTGT  CCGCCGTGCT  CATGGGCTTC  TCGAAACTGG
K117R  GAACCTGCTG  GCCTTCGTGT  CCGCCGTGCT  CATGGGCTTC  TCGAAACTGG
K229Q  GAACCTGCTG  GCCTTCGTGT  CCGCCGTGCT  CATGGGCTTC  TCGAAACTGG

GLUT1  GCAAGTCCTT  TGAGATGCTG  ATCCTGGGCC  GCTTCATCAT  CGGTGTGTAC  400
K117Q  GCCAGTCCTT  TGAGATGCTG  ATCCTGGGCC  GCTTCATCAT  CGGTGTGTAC
K117R  GAGGTCCTT  TGAGATGCTG  ATCCTGGGCC  GCTTCATCAT  CGGTGTGTAC
K229Q  GCAAGTCCTT  TGAGATGCTG  ATCCTGGGCC  GCTTCATCAT  CGGTGTGTAC

//

GLUT1  TCAACCGCAA  CGAGGAGAAC  CGGGCCAAGA  GTGTGCTAAA  GAAGCTGCGC  700
K117Q  TCAACCGCAA  CGAGGAGAAC  CGGGCCAAGA  GTGTGCTAAA  GAAGCTGCGC
K117R  TCAACCGCAA  CGAGGAGAAC  CGGGCCAAGA  GTGTGCTAAA  GAAGCTGCGC
K229Q  TCAACCGCAA  CGAGGAGAAC  CGGGCCAAGA  GTGTGCTACA  GGAAGCTGCGC

GLUT1  GGGACAGCTG  ACGTGACCCA  TGACCTGCAG  GAGATGAAGG  AAGAGAGTCG  750
K117Q  GGGACAGCTG  ACGTGACCCA  TGACCTGCAG  GAGATGAAGG  AAGAGAGTCG
K117R  GGGACAGCTG  ACGTGACCCA  TGACCTGCAG  GAGATGAAGG  AAGAGAGTCG
K229Q  GGGACAGCTG  ACGTGACCCA  TGACCTGCAG  GAGATGAAGG  AAGAGAGTCG

```

Figura 1. Alineamiento de las secuencias de GLUT1 silvestre y las mutantes generadas. El alineamiento se realizó en el programa Vector NTI, entre las secuencias obtenidas mediante secuenciación automática. Se muestran sólo las regiones mutadas. No se observó mutaciones adicionales en el resto de la secuencia nucleotídica de la proteína silvestre o de las mutantes K117R, K117Q y K229Q. Los codones mutados se muestran en negrita y subrayados.

expresión en membrana y las propiedades funcionales del transportador mediante Western blot y ensayos de transporte respectivamente.

La expresión de GLUT1 silvestre y de las mutantes se examinó en membranas totales de ovocitos, las cuales fueron sometidas a una electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa para realizar la inmunodetección con un anticuerpo dirigido a la porción carboxilo terminal del transportador. El análisis revela que los ovocitos inyectados, expresan una proteína de una masa molecular de aproximadamente 55 kDa, no observada en ovocitos no inyectados. Además, se puede establecer que las proteínas mutadas son expresadas en la membrana de ovocitos de *Xenopus* en niveles similares al GLUT1 silvestre (Fig. 2). En contraste con el control realizado con membranas de células CHO y con ovocitos no inyectados, una segunda y tercera banda es observada en el caso de los ovocitos inyectados con RNA, las cuales presentan un tamaño aproximado de 50 y 45kDa. Al parecer estas bandas corresponden a la proteína en distintos estados de glicosilación presente en membranas intracelulares, situación que había sido informada en este sistema de expresión (Hresko et al., 1994b). Una cuarta banda se observa en todas las membranas provenientes de ovocitos, incluidos aquellos no inyectados, bandas que podrían ser el producto de una reacción cruzada del anticuerpo con alguna proteína intrínseca de la membrana de ovocitos, la cual aún no ha sido identificada.

4.3 Caracterización del transporte de 2-deoxiglucosa y 3-O-metilglucosa para GLUT1 silvestre y las mutantes en condiciones de entrada.

2-deoxiglucosa (DOG) y 3-O-metilglucosa (OMG) son dos moléculas análogas a la molécula de D-glucosa que son transportados por GLUT1 con una afinidad y eficiencia similar a

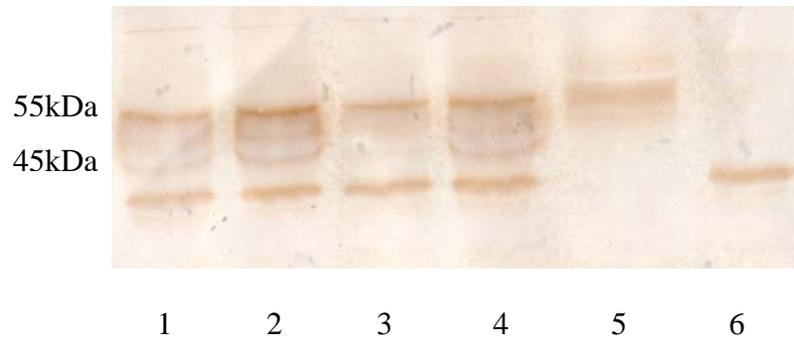


Figura 2. Expresión de GLUT1 wt y mutantes en membranas de ovocitos de *X. laevis*.

Membranas de ovocitos inyectados con 40ng de mRNA de GLUT1 silvestre o de las mutantes K117Q, K117R y K229Q fueron purificadas y sometidas a un SDS-PAGE. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa para realizar la inmunodetección que se muestra en esta figura. Los carriles indican (1) GLUT1 silvestre, (2) K117Q, (3) K117R, (4) K229Q, (5) GLUT1 de células CHO y (6) ovocitos no inyectados.

glucosa. OMG a diferencia de DOG y de D-glucosa no es metabolizado al interior celular, por lo que se acumula y a medida que es transportado hacia el interior celular, la velocidad de transporte disminuye hasta alcanzar el equilibrio químico. En nuestro laboratorio y en otros laboratorios se ha demostrado que el transporte de OMG se mantiene en velocidad inicial por sobre los 10 minutos de transporte medido en ovocitos de *X.laervis* (Keller et al., 1989; Raddatz, 2006). Para realizar la determinación de las constantes cinéticas del transportador silvestre y sus mutantes en los ovocitos, se utilizó un tiempo de transporte de 3 minutos. En la figura 3 y figura 4 se muestran las curvas de saturación obtenidas para el transporte de DOG y OMG respectivamente mediado por GLUT1 y las mutantes K117Q, K117R y K229Q. Las curvas obtenidas tanto para el transporte de DOG como para el de OMG se acomodan a una función de tipo hiperbólica, y responden a la ecuación de Michaelis-Menten, por lo que se calcularon los parámetros cinéticos para medir la afinidad (K_M) y velocidad del transporte (V_{MAX}), mediante regresión no lineal. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y no fueron significativamente distintos entre GLUT1 y las mutantes, tanto para DOG como para OMG, aunque se observa que la afinidad de las proteínas por DOG es significativamente mayor que para OMG.

Si bien la afinidad que presentaron las proteínas por sus sustratos tuvieron baja variación entre ensayo y ensayo, los valores de V_{MAX} fueron muy variables entre un ensayo y otro. La cantidad de proteína expresada fue dependiente del individuo del que se obtenían los ovocitos y en gran medida de la época del año en la que se realizó el ensayo.

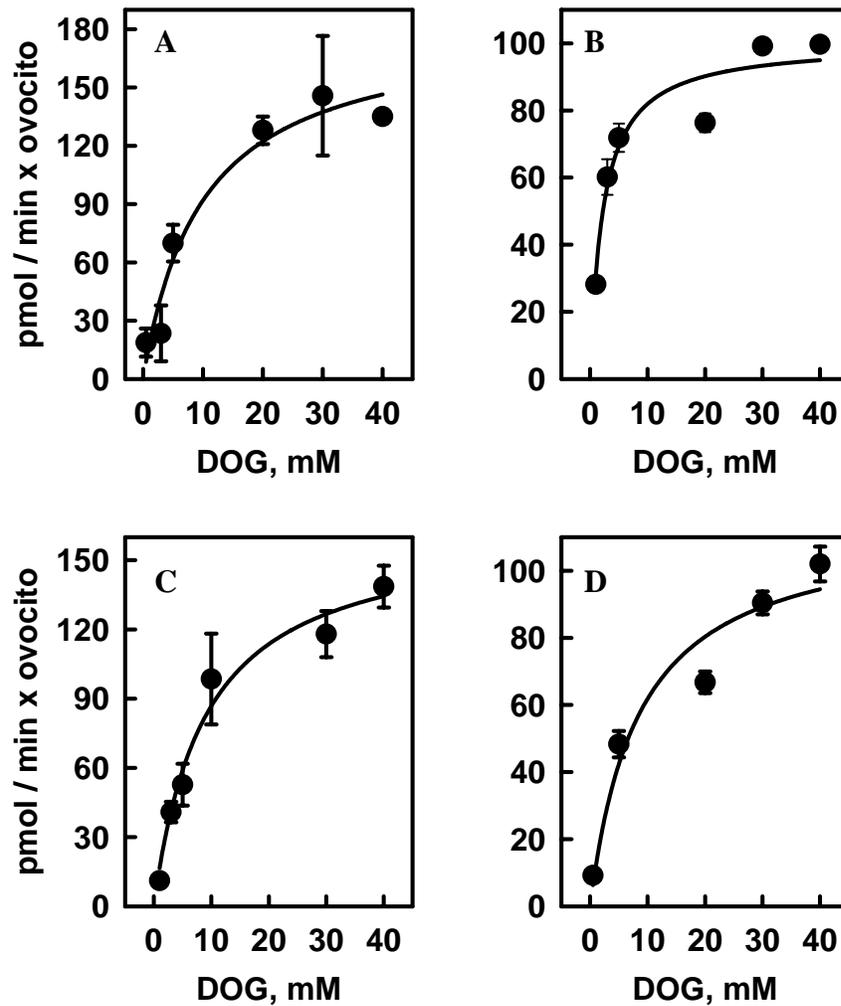


Figura 3. Saturación del transporte de DOG en GLUT1 silvestre y las mutantes K117Q, K117R y K229Q. El transporte de H^3 -DOG fue medido en un grupo (n) de 3 ovocitos inyectados con 40ng del mRNA con un total de 3n por punto. El resultado mostrado es el representativo de 3 experimentos distintos, en donde las barras indican la desviación estándar del ensayo y donde se ha restado la curva obtenida con ovocitos no inyectados. Las curvas presentadas corresponden a (A) GLUT1 silvestre, (B) K117R, (C) K117Q y (D) K229Q.

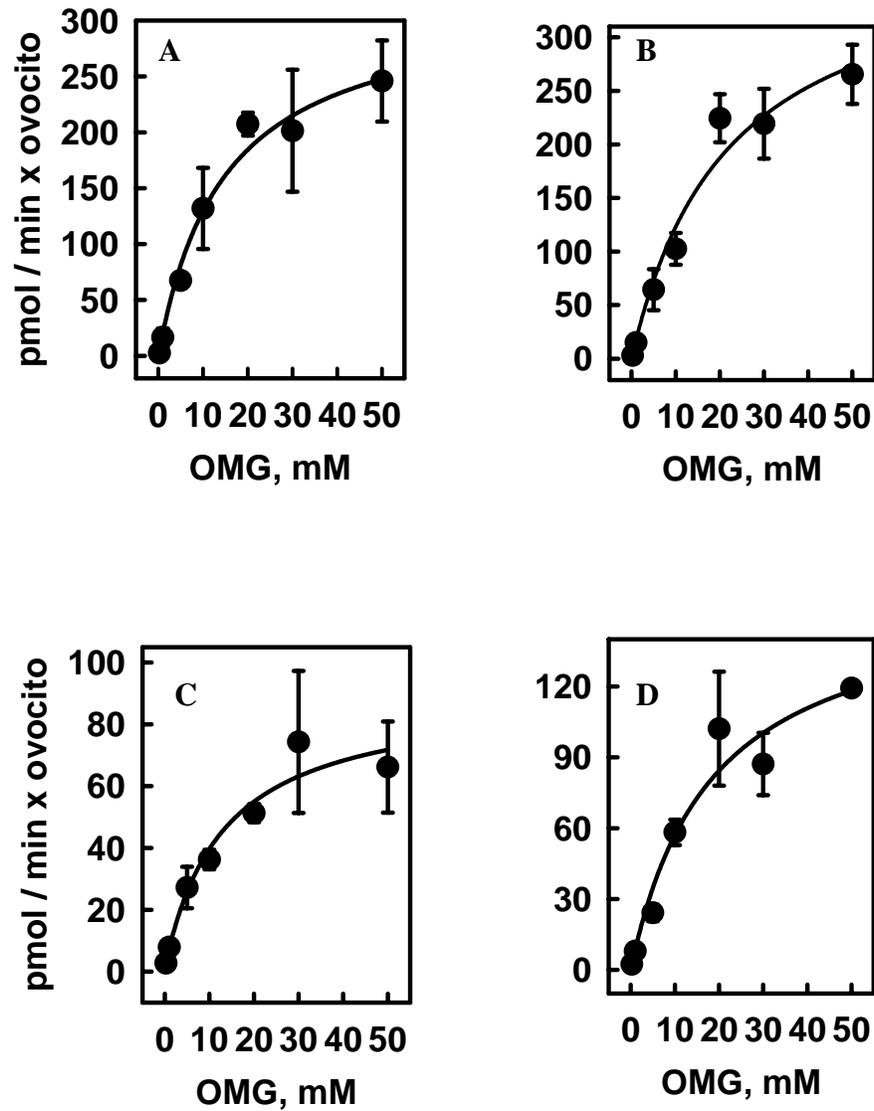


Figura 4. Saturación del transporte de OMG en GLUT1 silvestre y las mutantes K117Q, K117R y K229Q. El transporte de H^3 -OMG fue medido en un grupo (n) de 3 ovocitos inyectados con 40ng del mRNA con un total de 3n por punto. El resultado mostrado es el representativo de 3 experimentos distintos, en donde las barras indican la desviación estándar del ensayo y donde se ha restado la curva obtenida con ovocitos no inyectados. Las curvas presentadas corresponden a (A) GLUT1 silvestre, (B) K229Q, (C) K117R y (D) K117Q.

Tabla 1. Parámetros cinéticos obtenidos para GLUT1 silvestre y sus mutantes

	Sustratos			
	2-deoxiglucosa		3-O-metilglucosa	
	K_M , mM (*)	V_{MAX} , pmol/min x ovocito	K_M , mM (*)	V_{MAX} , pmol/min x ovocito
GLUT1	9 ± 2	155 ± 40	18 ± 5	250 ± 90
K117R	5 ± 3	125 ± 25	13 ± 1	130 ± 50
K117Q	8 ± 1	160 ± 10	16 ± 3	145 ± 25
K229Q	8 ± 1	136 ± 30	19 ± 4	230 ± 90

Se observan los valores de las constantes cinéticas obtenidas para el transporte de DOG y OMG en ovocitos de *X. laevis* inyectados con 40ng del mRNA correspondiente. Los valores representan el promedio y la desviación estándar de los valores obtenidos en tres experimentos distintos. Los datos fueron evaluados mediante un t-test, en donde (*) indica un valor $P < 0,05$ entre ambas columnas.

4.4 Efecto de los inhibidores sobre GLUT1 silvestre y las mutantes

Cuatro inhibidores fueron elegidos para evaluar el efecto que producirían las mutaciones de la proteína sobre la inhibición de estos compuestos. Existen datos de la literatura y otros obtenidos en el laboratorio que sugieren que algunos utilizarían la cara endofacial y otros la cara exofacial para unirse al transportador, pero en cada caso la cantidad de sitios es desconocida. Dentro de los inhibidores elegidos se encuentra el clásico inhibidor de GLUT1 citocalasina B, el cual al parecer posee un sitio de unión intracelular, al igual que el compuesto sintético tirfostina A-47. La flavona quercetina y la metilxantina pentoxifilina fueron elegidos para la evaluación de la cara exofacial. Estos compuestos no están relacionados estructuralmente con glucosa (Fig. 5), sin embargo cabe destacar que datos de este y otros laboratorios indican que estos compuestos inhiben el transporte de glucosa por unión directa al transportador (Inukai et al., 1994; Ojeda, 2005; Vera et al., 2001).

4.4.1 Citocalasina B

Un conocido inhibidor de GLUT1 es citocalasina B, para el cual se ha descrito que existe un sitio de unión ubicado por la cara intracelular del transportador. Para evaluar el efecto de las mutaciones sobre la inhibición por citocalasina B, se realizaron ensayos de transporte de OMG en condiciones de entrada con los ovocitos inyectados. Los ensayos se realizaron a una concentración constante de OMG y variable del inhibidor entre 0 a 10 μ M.

Como era esperado, en el caso de GLUT1 silvestre la inhibición fue dosis-dependiente observando que a medida que se aumentaba la concentración de inhibidor, disminuía el transporte de OMG. Se pudo lograr una inhibición de casi un 100% con la proteína silvestre. Esta inhibición se ajustó a una función de decaimiento hiperbólico (Fig. 6A) pudiendo determinar así que en nuestras manos la concentración necesaria de citocalasina B para lograr la mitad de la inhibición

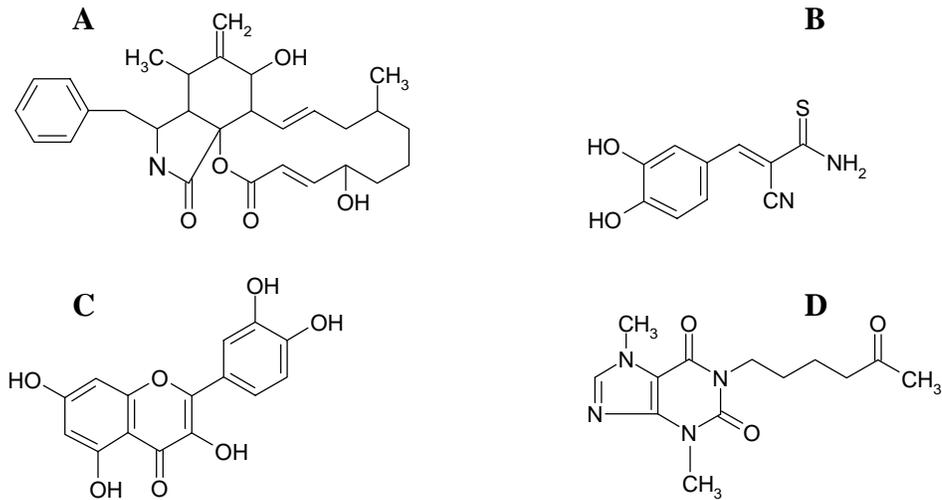


Figura 5. Estructura de los inhibidores. Se presentan las estructuras en dos dimensiones de los inhibidores de GLUT1 utilizados para la evaluación de las mutantes generadas. Se observa (A) citocalasina B, (B) tirfostina A-47, (C) quercetina y (D) pentoxifilina.

(IC₅₀), corresponde a 1,0μM.

En el caso de las mutantes K117Q, K117R y K229Q los resultados no fueron significativamente distintos para citocalasina B (Fig. 6B, C y D), mostrando en cada caso también una inhibición dosis-dependiente y presentando valores en los IC₅₀ de 1,1μM para K117R, 2,2μM para K117Q y 3,5μM para K229Q. El valor de IC₅₀ obtenido para la inhibición de K229Q por citocalasina B fue el más distante al silvestre, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa (P = 0,08). La inhibición lograda fue mayor a 80% para las tres mutantes analizadas en el rango de concentraciones evaluadas. Los valores de IC₅₀ obtenidos para GLUT1 silvestre y las mutantes son presentados en la tabla 2.

4.4.2 Tirfostina A-47

Tirfostina A-47 es un compuesto sintético inhibidor de tirosinas quinasas y del transporte de glucosa mediado por GLUT1. En tirosinas quinasas la inhibición se realiza por competencia con tirosina, y en GLUT1 sólo se sabe que la inhibición es de tipo competitiva con glucosa en ensayos de salida. A fin de averiguar el efecto de las mutaciones sobre la inhibición de GLUT1 por tirfostina A-47, se realizaron ensayos de inhibición del transporte de OMG en condiciones de entrada. Los ovocitos fueron incubados en una solución que contenía OMG 0,25mM en presencia de concentraciones variables del inhibidor entre 0 y 300μM. Mayores concentraciones de tirfostina A-47 no pudieron medirse con este sistema experimental debido a que la absorbancia del compuesto interfería con la mezcla de centelleo para medir OMG radiactivo. Como era de esperarse, el transporte de la hexosa en ovocitos inyectados con RNA de la proteína silvestre fue disminuyendo a medida que se incrementaba la concentración del inhibidor de una manera que se ajusta a una función hiperbólica. La inhibición no fue total en el intervalo de concentraciones medidas, pero se logró una disminución de al menos un 60% del transporte a las concentraciones

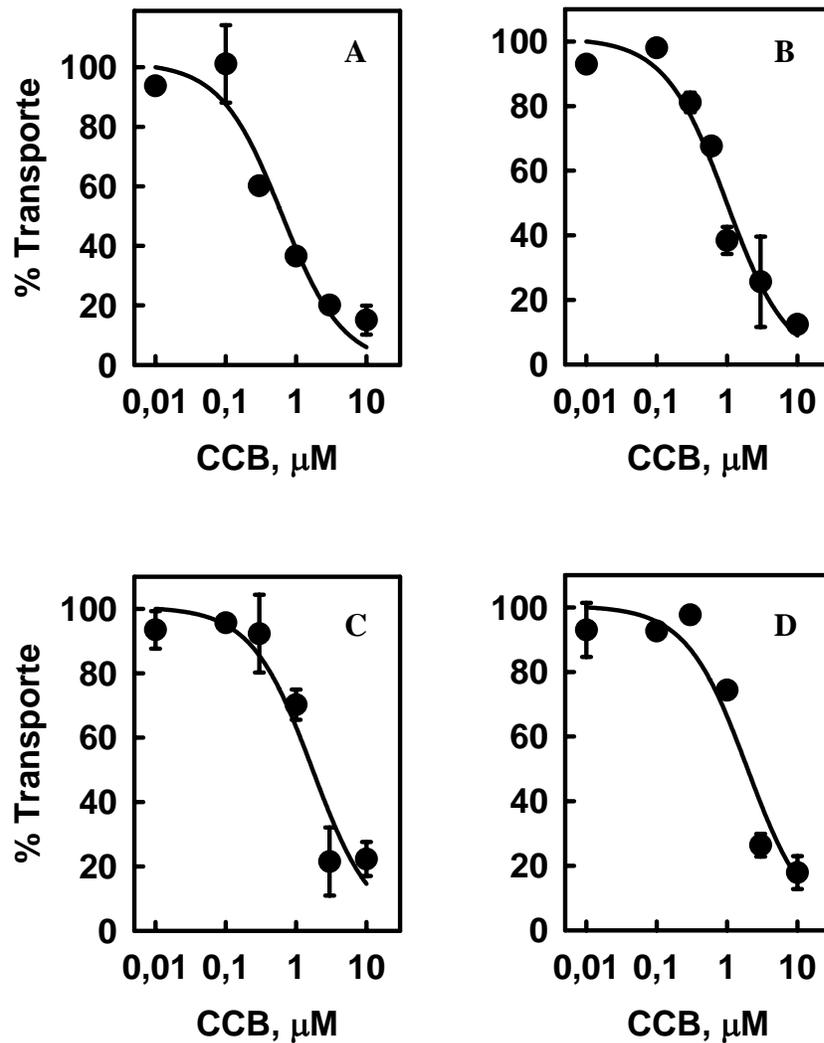


Figura 6. Inhibición del transporte de OMG en GLUT1 silvestre (A) y mutantes K229Q (B), K117R (C) y K117Q (D) por citocalasina B. La inhibición del transporte de OMG 0,25mM se midió en el rango de concentraciones de 0 a 10 μM de citocalasina B. Las curvas mostradas son representativas de un total de 3 ensayos distintos. El transporte es expresado como el porcentaje de transporte, el cual fue calculado utilizando el transporte en ausencia de citocalasina B como el 100%. Las barras indican la desviación estándar de los datos obtenidos con 3''n'' por punto, en donde cada ''n'' representa a tres ovocitos inyectados con RNA.

Tabla 2. Valores de IC₅₀ obtenidos con citocalasina B para GLUT1 y las mutantes analizadas.

Mutantes	GLUT1	K117R	K117Q	K229Q
IC₅₀ citocalasina B, μM	1,0 ± 0,4	1,1 ± 0,8	2,2 ± 0,4	3,5 ± 1,0

Los valores se presentan como el promedio y la desviación estándar de tres distintos ensayos realizados. Los valores se analizaron mediante un student t-test, no siendo significativamente distintos entre ellos.

más altas (Fig. 7A). El IC_{50} calculado para el transporte de OMG mediado por GLUT1 fue de $175\mu\text{M}$.

En el caso de los ovocitos inyectados con RNA de las mutantes K117R y K117Q, la situación observada fue muy similar, alcanzando una inhibición de aproximadamente 50% y 60% en el transporte de OMG, respectivamente, con tirfostina A-47 $300\mu\text{M}$ (Fig. 7B y C). El IC_{50} calculado para las mutantes fue de $157\mu\text{M}$ para K117Q y $337\mu\text{M}$ para K117R. Si bien el IC_{50} obtenido para K117R es de casi el doble del obtenido para la proteína silvestre, la diferencia es estadísticamente no significativa ($P = 0,07$). Sorpresivamente cuando se analizó el efecto de la mutación del residuo perteneciente al dominio II en la inhibición del transporte de OMG por tirfostina A-47, no se logró observar sensibilidad de la proteína al inhibidor en el intervalo de concentraciones ensayadas (Fig. 7D), observando incluso en muchos de los ensayos una pequeña activación del transporte cuando se aumentaban las concentraciones por sobre los $300\mu\text{M}$ (datos no mostrados). Los valores obtenidos de IC_{50} con su respectiva desviación estándar son mostrados en la Tabla 3.

4.4.3 Quercetina

Otro de los inhibidores ensayados fue la flavona quercetina, el cual también es inhibidor del tirosinas quinasas aunque esta vez compite por la unión del nucleótido. En este caso, las concentraciones de inhibidor ensayadas fueron entre 0 y $100\mu\text{M}$. De igual modo a lo realizado con tirfostina A-47 y citocalasina B, se realizaron ensayos de entrada de OMG a una concentración de $0,25\text{mM}$ en ovocitos inyectados con el RNA de GLUT1 y las mutantes de lisina 117 y 229. Cuando los ovocitos inyectados con la proteína silvestre fueron puestos bajo distintas concentraciones del flavonoide, el transporte de OMG fue inhibido hasta en un 80% de una forma

Tabla 3. Valores de IC₅₀ obtenidos con tirfostina A-47 para GLUT1 y las mutantes analizadas.

Mutantes	GLUT1	K117R	K117Q	K229Q
IC₅₀ Tirfostina A-47, μM	175 ± 30	337 ± 40	157 ± 50	NS

Los valores se presentan como el promedio y la desviación estándar de tres distintos ensayos realizados. Los datos fueron analizados mediante un t-test, no siendo significativamente distintos entre ellos. NS, corresponde a no sensible.

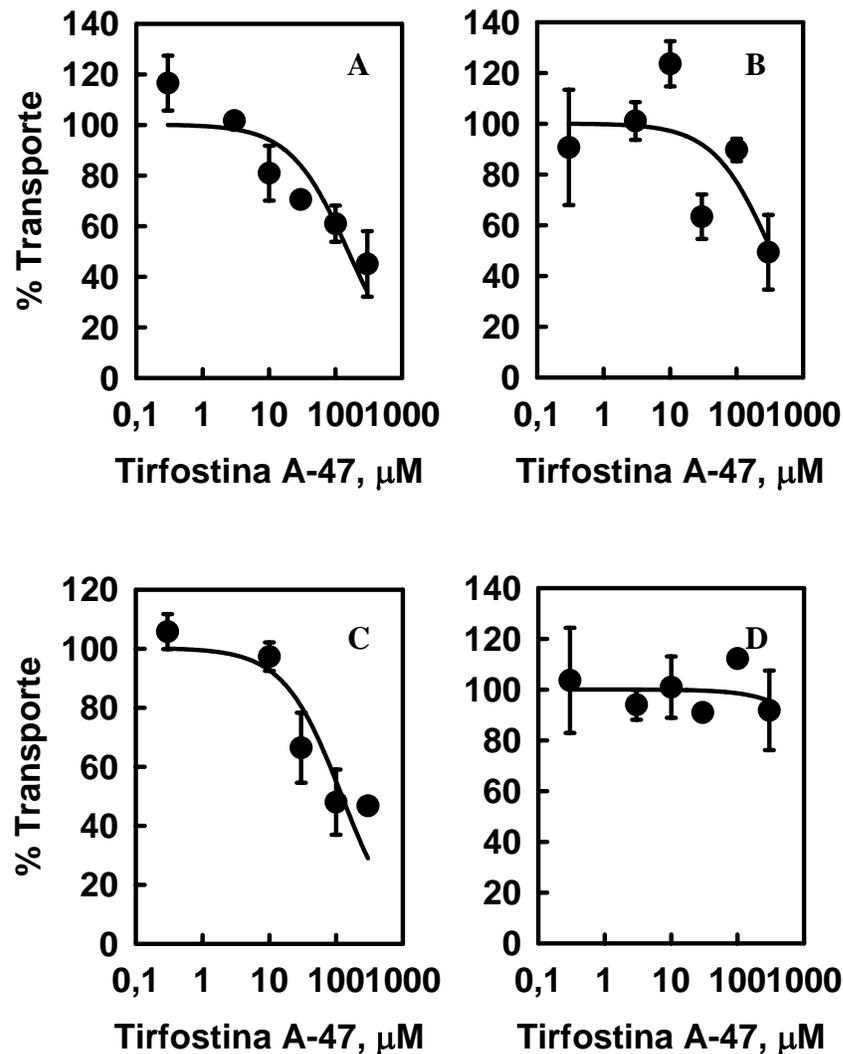


Figura 7. Inhibición del transporte de OMG en GLUT1 silvestre (A) y mutantes K117R (B), K117Q (C) y K229Q (D) por Tirfostina A-47. La inhibición del transporte de OMG 0,25mM se midió en el intervalo de concentraciones de tirfostina A-47 entre 0 y 300 μM . Los experimentos mostrados son representativos de un total de 3 ensayos distintos. El transporte es expresado como porcentaje, el cual fue calculado utilizando el transporte en ausencia de tirfostina A-47 como 100%. Las barras indican la desviación estándar de los datos obtenidos con 3''n'' por punto, en donde cada ''n'' representa a tres ovocitos inyectados con RNA.

dosis-dependiente (Fig. 8A). La inhibición fue ajustada a una función hiperbólica y fueron calculados los parámetros de inhibición en donde el IC_{50} obtenido fue de $16\mu M$. Algo similar ocurrió con la mutante de lisina 229, en donde la inhibición total superó el 80% a la concentración de quercetina más alta que se ensayó (Fig. 8B). El IC_{50} obtenido en esta mutante fue de $15\mu M$.

El análisis de las mutantes de GLUT1 generadas en el dominio I arrojó algunos resultados importantes en cuanto a la sensibilidad del transporte a quercetina. En el caso de la inhibición del transporte sobre la mutante K117Q se obtuvo una inhibición de alrededor de 55% (Fig. 8D), de manera dosis-dependiente al igual que en la proteína silvestre. Sin embargo la concentración necesaria del inhibidor para llegar al 50% de la inhibición fue de $46\mu M$, en donde la diferencia con GLUT1 silvestre fue estadísticamente significativa ($P = 0,008$). Mucho más notable fue el resultado obtenido en el caso de la mutación del mismo residuo por arginina, en donde no fue posible observar inhibición del transporte de OMG en las condiciones experimentales ensayadas (Fig. 8C). En ambas situaciones se logró llegar hasta una concentración de $100\mu M$ de quercetina, pero no fueron posibles los ensayos a una concentración mayor del inhibidor debido a la baja solubilidad de quercetina. Los valores de IC_{50} obtenidos se muestran en la tabla 4.

4.4.4 Pentoxifilina

El último inhibidor en ser probado fue la pentoxifilina. En este caso las concentraciones de inhibidor medidas fueron de 0 a 30mM. Los ensayos se realizaron de igual manera que con los demás inhibidores, utilizando 3 ovocitos por ensayo. Como era de esperarse, los ovocitos inyectados con RNA de la proteína silvestre sufrieron la inhibición del transporte de OMG de una manera dosis-dependiente (Fig. 9A), alcanzando cerca de un 90% de la inhibición a la concentración más alta de la metilxantina. El IC_{50} obtenido fue de 5mM.

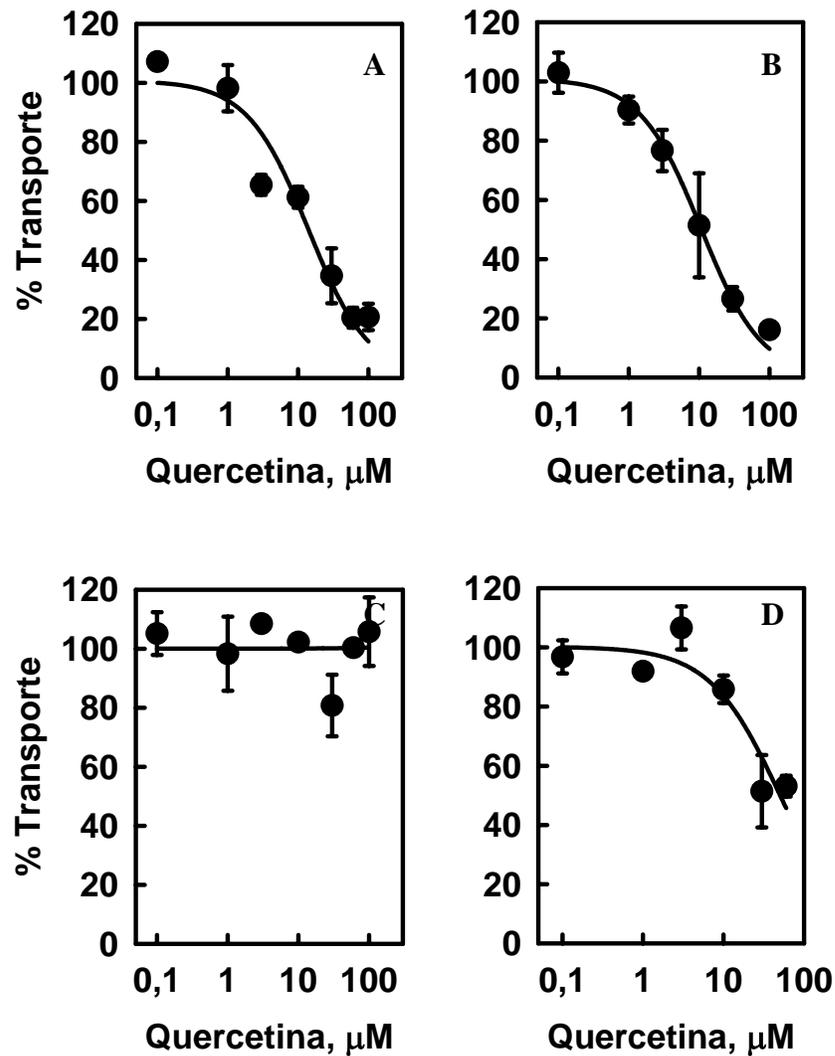


Figura 8. Inhibición del transporte de OMG en GLUT1 silvestre (A) y mutantes K229Q (B), K117R (C) y K117Q (D) por quercetina. La inhibición del transporte de OMG 0,25mM se midió en el intervalo de concentraciones de quercetina entre 0 y 100 μM . Las curvas mostradas son representativas de un total de 3 ensayos distintos. El transporte es expresado como el porcentaje de transporte, el cual fue calculado utilizando el transporte en ausencia de inhibidor como el 100%. Las barras indican la desviación estándar de los datos obtenidos con 3"n" por punto, en donde cada "n" representa a tres ovocitos inyectados con RNA.

Tabla 4. Valores de IC₅₀ obtenidos con quercetina para GLUT1 y las mutantes analizadas.

Mutantes	GLUT1	K117R	K117Q (*)	K229Q
IC₅₀ quercetina, μM	16 \pm 3	NS	46 \pm 6	15 \pm 6

Los valores se presentan como el promedio y la desviación estándar de tres distintos ensayos realizados. Los datos fueron analizados mediante un t-test, donde (*) indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (GLUT1). NS, corresponde a no sensible.

En el caso de lo ocurrido con las mutantes de lisina 117 y lisina 229, el resultado fue similar, superando el 80% de inhibición en todas ellas (Fig 9B, C y D), con IC_{50} que no fueron distintos al obtenido sobre la proteína silvestre (Tabla 5).

4.5 Análisis bioinformático de lisina 117

Con el fin de averiguar cuál es el ambiente químico que rodea a la cadena lateral de lisina 117, se exploró el microambiente y los residuos presentes en la cercanía de lisina 117. Debido a la ausencia de un cristal de la proteína que entregue información acerca de la estructura terciaria, se utilizó el modelo de GLUT1 propuesto por Salas-Burgos (código PDB 1SUK) presente en la base de datos para proteínas (*Protein Data Bank*)(Salas-Burgos et al., 2004). En la figura 10A se muestra el modelo tridimensional propuesto por Salas-Burgos, en donde el recuadro indica el sitio en donde se ubica el dominio extracelular de unión a nucleótidos. Con el programa computacional ICM-pro 3.4 se determinaron los residuos de aminoácidos ubicados a una distancia menor a 5Å. Estos residuos son mostrados en la figura 10B y son Ile40, Met110, Met121, Leu122, Trp186, Pro187 y Leu187. Notablemente corresponden en su mayoría a residuos con carácter hidrofóbico, formando un bolsillo en el cual se encontraría lisina 117. El único residuo ubicado a esta corta distancia que posee un carácter polar corresponde a Ser118, aunque la cadena lateral de este residuo se ubica en el sentido contrario a la cadena lateral de Lys117, sugiriendo que no afecta directamente las propiedades químicas de la cadena lateral de Lys117. El bolsillo en el cual se ubica lisina117 cierra en su parte exterior con Lys114, que si bien se ubica a una distancia mayor que 5Å, tiene el extremo de su cadena lateral a 4,9Å de la cadena lateral de Lys117 (Fig. 10C). Debido al carácter hidrofóbico del bolsillo en donde se ubica el residuo de lisina 117, se simularon las condiciones para calcular el potencial electrostático en la superficie del residuo, arrojando un potencial que se acerca a cero (Fig. 10D).

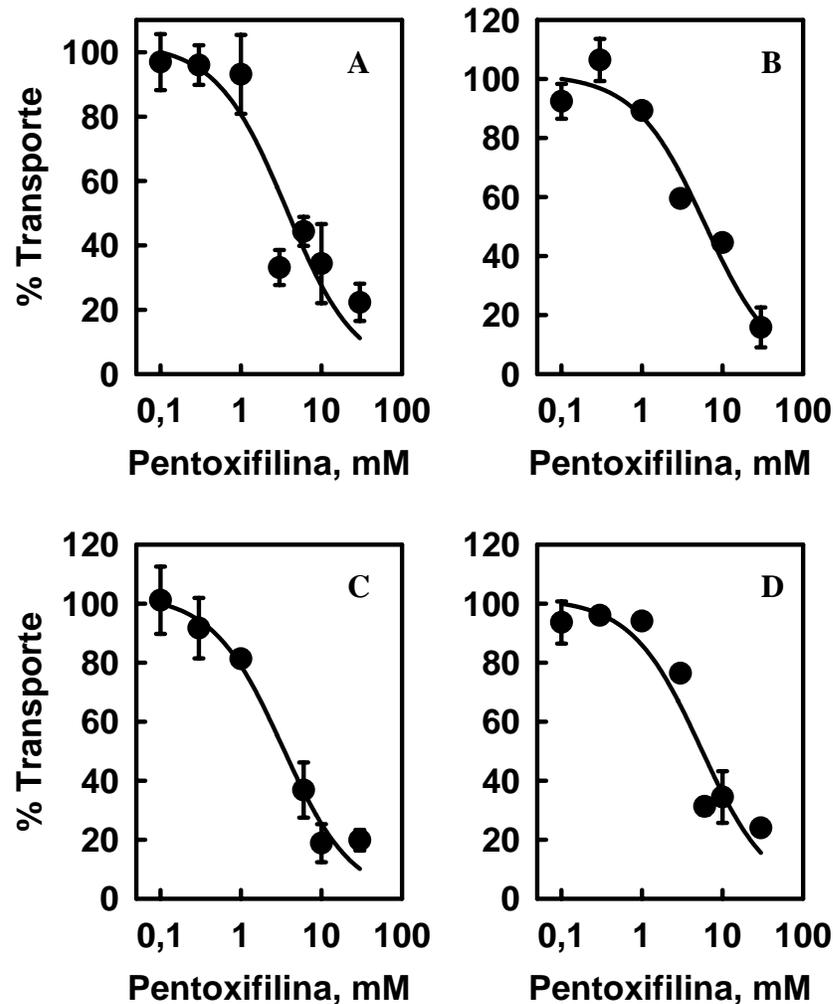


Figura 9. Inhibición del transporte de OMG en GLUT1 silvestre (A) y mutantes K229Q (B), K117R (C) y K117Q (D) por pentoxifilina. La inhibición del transporte de OMG 0,25mM se midió en el rango de concentraciones de 0 a 30mM de pentoxifilina. Las curvas mostradas son representativas de un total de 3 ensayos distintos. El transporte es expresado como el porcentaje de transporte, el cual fue calculado utilizando el transporte en ausencia de inhibidor como el 100%. Las barras indican la desviación estándar de los datos obtenidos con 3”n” por punto, en donde cada “n” representa a tres ovocitos inyectados con RNA.

Tabla 5. Valores de IC₅₀ obtenidos con pentoxifilina para GLUT1 y las mutantes analizadas.

Mutantes	GLUT1	K117R	K117Q	K229Q
IC₅₀ pentoxifilina, mM	5 ± 2	3 ± 1	3 ± 2	7 ± 1

Los valores se presentan como el promedio y la desviación estándar de tres distintos ensayos realizados. Los datos fueron analizados mediante un t-test, donde las diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto al control (GLUT1).

Tabla 6. Tabla resumen de valores de IC₅₀ obtenidos con los inhibidores para GLUT1 y las mutantes analizadas.

Mutantes	GLUT1	K117R	K117Q	K229Q
IC₅₀ citocalasina B, μM	1,0 \pm 0,4	1,1 \pm 0,8	2,2 \pm 0,4	3,5 \pm 1,0
IC₅₀ Tirfostina A-47, μM	175 \pm 30	337 \pm 40	157 \pm 50	NS
IC₅₀ quercetina, μM	16 \pm 3	NS	46 \pm 6	15 \pm 6
IC₅₀ pentoxifilina, mM	5 \pm 2	3 \pm 1	3 \pm 2	7 \pm 1

Los valores se presentan como el promedio y la desviación estándar de tres distintos ensayos realizados. NS corresponde a no sensible.

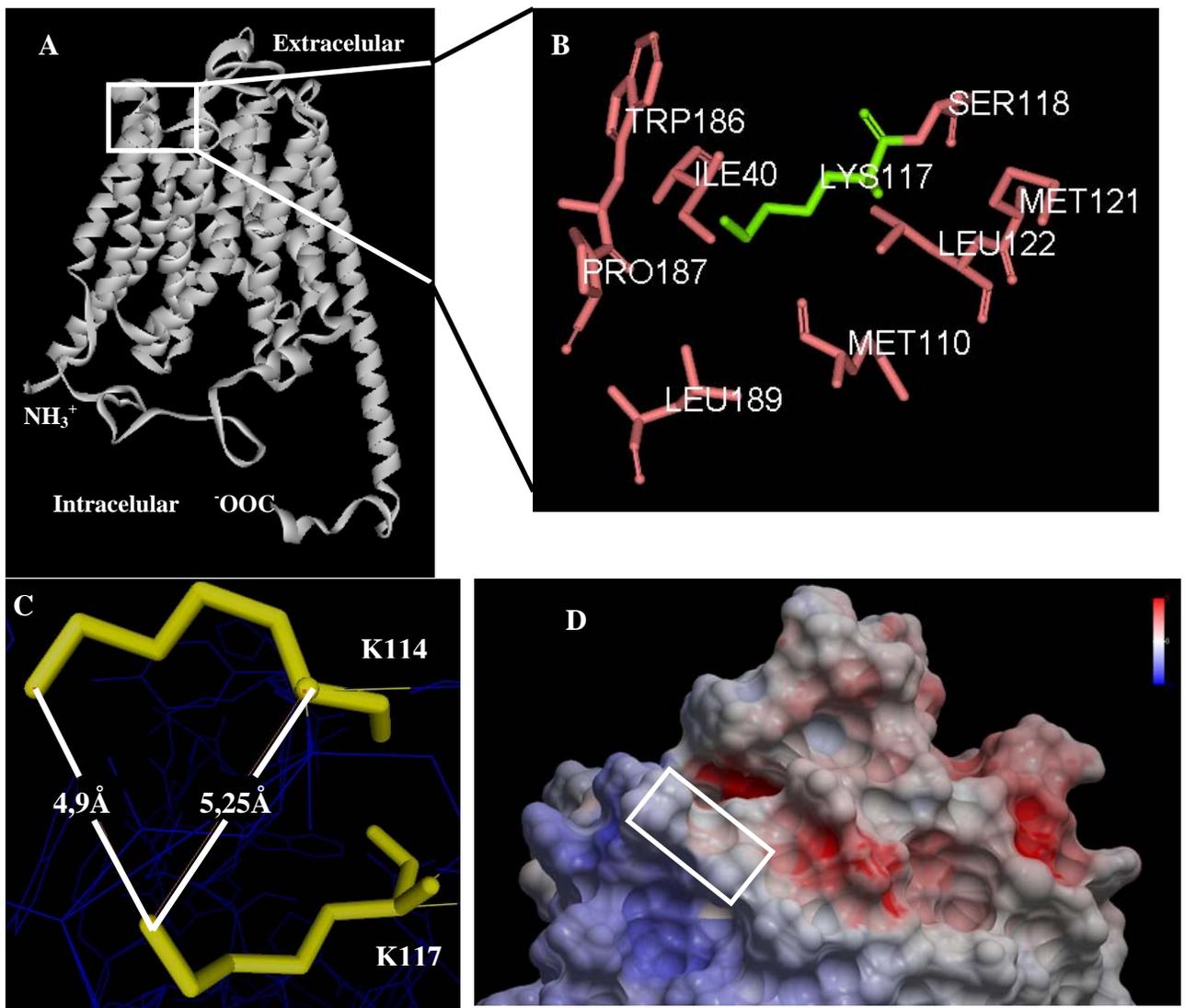


Figura 10: Análisis bioinformático del la Lisina 117 en el modelo propuesto por Salas-Burgos. (A) Modelo de GLUT1_1SUK, en el recuadro se observa la localización del dominio I. (B) Residuos de aminoácidos que rodean a la Lisina 117 a 5Å de distancia. (C) Esquema de distancias calculadas entre Lys117 y Lys114. (D) Simulación de potencial electrostático que presenta Lys117 (recuadro), en donde el color rojo corresponde a positivo, color azul a negativo y color blanco a cero. Los cálculos y figuras fueron realizados con el programa ICM-pro 3.4.

5. DISCUSIÓN

Una manera de aproximarse al rol que cumple cada residuo aminoacídico en una proteína, ya sea en su disposición estructural como para su función, es realizar cambios individuales por otros residuos y evaluar los efectos producidos. Este método, conocido como mutagénesis sitio dirigida, ha sido ampliamente usado en el estudio de GLUT1 y otras proteínas de membrana entregando información que en su conjunto ha sido de vital importancia al momento de generar modelos de estas proteínas. En este trabajo, dos residuos aminoacídicos, correspondientes a Lys117 y Lys229, fueron mutados por residuos relacionados en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas para probar la interacción que ellos pudiesen tener con algunos ligandos de la proteína. Las mutaciones generadas en Lys117 por arginina y glutamina se pueden clasificar como sutiles en cuanto al tamaño de la cadena lateral. Asimismo, ambas sustituciones fueron por residuos polares, sin embargo, el grupo $\epsilon\text{-NH}_2$ de lisina se puede protonar y disociar reversiblemente (pKa en péptidos modelos $\sim 9,0$), en cambio glutamina posee una cadena lateral polar sin carga. La idea fue no generar cambios conformacionales que empantallaran los efectos locales producidos por las mutaciones y se pudiese evaluar sólo la interacción de la cadena lateral con las moléculas inhibitoras.

5.1 Expresión de GLUT1 en ovocitos de *Xenopus laevis*.

La expresión de la proteína tipo silvestre y de sus tres mutantes fue evaluada a través de western blot de las proteínas totales de membranas de ovocitos, usando un anticuerpo dirigido al C-terminal de GLUT1. Con esta metodología, se encontró que la expresión no fue alterada por las mutaciones generadas (Fig. 2). Sin embargo, dada la utilización de membranas totales de

ovocitos en este ensayo, esta metodología no asegura que GLUT1 (silvestre y mutante) haya sido destinado subcelularmente a la membrana plasmática, sino que podrían encontrarse en otro tipo de membrana de ubicación intracelular. Debido al similar nivel de expresión mostrada por las proteínas silvestre y mutantes en el western blot, fue crucial determinar la presencia de actividad transportadora en ovocitos inyectados con RNA codificante para las proteínas tipo silvestre y mutantes. Los parámetros cinéticos mostraron ser similares entre ellas, con sólo pequeñas diferencias no significativas en la velocidad máxima de transporte. Este hecho nos hace pensar que las mutaciones generadas no alteraron la llegada de las proteínas hasta la membrana plasmática, en donde mantuvieron sus características funcionales, lo cual las hace totalmente comparables si analizamos la interacción con inhibidores.

Más aún, el western blot reveló una serie de bandas de menor peso molecular que la proteína funcional, una situación que ya había sido descrita previamente por otros grupos (Hresko et al., 1994b). Según estos autores estas bandas corresponden a la proteína en distintos estados de glicosilación y se ubicarían en membranas intracelulares durante el proceso de destinación a membrana plasmática. Este es un punto que nos ayuda a comprender el procesamiento que tuvo la proteína silvestre y las proteínas mutantes al ser expresadas en ovocitos de *X. laevis*, en donde la banda de mayor peso molecular corresponde a la banda que alcanzó la totalidad de su procesamiento y por ende que se situó en membrana plasmática en similares cantidades entre las mutantes.

La realización de una biotinylación de los ovocitos previa a la inmunodetección sería una prueba más convincente acerca de la localización subcelular de las proteínas silvestre y mutantes en la superficie de la membrana plasmática. En este caso los ovocitos inyectados con mRNA codificante para las proteínas silvestre o mutantes se incuban con un compuesto que no atraviesa

la membrana plasmática y que se une covalentemente a grupos funcionales presentes en las proteínas. Sólo las moléculas biotiniladas pueden ser purificadas a través de una columna de streptavidina, por lo que el posterior SDS-PAGE y la inmunodetección se realizarán sólo sobre proteínas presentes en la superficie de la membrana citoplasmática, descartando a las proteínas ubicadas en compartimientos intracelulares.

5.2 Análisis funcional de GLUT1 silvestre y las proteínas mutantes.

A fin de dilucidar las características funcionales del transporte en GLUT1 y en las mutantes de K117 y K229, se realizaron ensayos de transporte en condiciones de entrada de OMG y DOG, dos compuestos análogos a glucosa, pero que presentan algunas diferencias estructurales y reactivas. En el caso de DOG, se encuentra reducido el carbono 2 de la hexosa, mientras que en OMG, el oxígeno del carbono 3 se encuentra metilado, lo que produce un impedimento estérico que disminuye su afinidad por GLUT1. Estos resultados de transporte, revelaron que ambos fueron sustratos para GLUT1 y sus mutantes, y además la afinidad por los sustratos no fue alterada. Es evidente la mayor afinidad que se presenta por DOG, dado que la K_M es de casi la mitad de la determinada para el transporte de OMG. Esta diferencia ha sido ampliamente descrita en la literatura (Gould y Holman, 1993; Joost y Thorens, 2001; Keller et al., 1989; Uldry y Thorens, 2004) y tiene su explicación en que DOG tiene características estructurales y químicas más parecidas al sustrato natural de GLUT1 que es glucosa.

5.3 Sitios de unión de inhibidores.

5.3.1 Citocalasina B

El compuesto proveniente de hongos citocalasina B es el inhibidor más ampliamente estudiado del transporte de glucosa mediado por GLUT1. Estudios anteriores probaron la unión directa de citocalasina B a GLUT1 en un sitio ubicado intracelularmente (Klip et al., 1984; Lin y Spudich, 1974; Taverna y Langdon, 1973), específicamente entre las hélices 10 y 11. En esta región estarían W388 y W412, residuos que se han identificado como implicados en la unión de este inhibidor (Inukai et al., 1994). Al ser así, era de esperar que se produjera una pérdida de sensibilidad por citocalasina B en las mutantes generadas, esta ocurriera en la mutante del dominio de unión a nucleótidos II, dada su orientación endofacial, aunque la distancia entre el gran loop intracelular y el loop que une los segmentos 10 y 11 pudiera ser bastante grande. No obstante, la mutación en K229 no produjo efecto alguno sobre la sensibilidad de la proteína al inhibidor, demostrando que este residuo aminoacídico no estaría implicado en la unión del inhibidor. Se puede especular que esta región intracelular no forma parte de un eventual sitio de unión endofacial para citocalasina B. De hecho, algunos datos del laboratorio nos llevan a sugerir que residuos ubicados en el dominio III (loop que une los segmentos transmembrana 8 y 9) participarían en la unión del citocalasina B al transportador. La mutación realizada en Thr335 por una leucina, volvió a la proteína insensible a CCB en el intervalo de concentraciones ensayadas (0-10 μ M), por lo que se cree estaría involucrada en la unión de este inhibidor. Algo similar ha resultado con una mutante de histidina 337, en donde la sensibilidad al inhibidor es menor (datos no publicados).

Con respecto a lo ocurrido con las mutantes de K117 y la unión de citocalasina B, los resultados obtenidos eran totalmente esperados, debido a que K117 se ubicaría en un lazo

extracelular, mientras que citocalasina B se une a un sitio intracelular, por lo que la interacción del residuo aminoacídico con el inhibidor es improbable.

5.3.2 Tirfostina A-47

Tirfostina A-47 es un compuesto sintético diseñado como inhibidor de tirosinas quinasas por competencia a la unión de tirosina. De este modo era de esperar que no ocurriera una interacción de la molécula con alguno de los sitios de unión a nucleótidos. Datos previos nos indican que tirfostina A-47 se une directamente al transportador por un sitio accesible intracelularmente (Monsalve, 2001; Pérez, 2003; Vera et al., 2001). Según los resultados obtenidos, tanto la proteína silvestre como las proteínas mutantes de lisina 117 fueron inhibidas por tirfostina A-47 de una manera dosis dependiente, mientras que la mutante K229Q fue insensible al inhibidor bajo el intervalo de concentraciones de inhibidor ensayadas (0-300 μ M). Es perfectamente explicable que las mutaciones realizadas en K117 no afectaran la inhibición del transporte por esta molécula (Figura 7), debido a que este residuo se ubicaría en la cara exofacial. Sin embargo, fue una sorpresa observar que la mutación en K229Q alteró completamente la sensibilidad de GLUT1 frente a tirfostina A-47. Proponemos que es probable que este residuo esté implicado de manera directa en la interacción de la proteína con el inhibidor. Este resultado se complementa con otros resultados no publicados del laboratorio, que muestran que ocurre un cambio en la sensibilidad a tirfostina A-47 al probar otras mutaciones realizadas en residuos pertenecientes al dominio II de unión a nucleótidos. Incluso algunas de ellas (K225Q y S226A) son insensibles en las condiciones en que se han realizado los ensayos (datos no publicados).

5.3.3 Quercetina

La flavona quercetina es un compuesto natural ampliamente estudiado pues produce una gran variedad de efectos sobre los sistemas vivos. Dentro de estos efectos se encuentra la

inhibición del transporte mediado por GLUT1 (Vera et al., 2001). Estudios de nuestro laboratorio indican que quercetina interactúa con el transportador a través de un sitio ubicado en la cara extracelular de la proteína y de manera competitiva con la unión de glucosa y pentoxifilina (Ojeda, 2005; Pérez, 2003; Saldivia, 2003; Vera et al., 2001). En complemento con lo anterior, observamos la inhibición del transporte de OMG por quercetina en ovocitos inyectados con el transportador silvestre, de manera similar a lo obtenido en otros sistemas experimentales, como eritrocitos humanos. En el caso de la mutante intracelular K229Q, los resultados fueron similares al silvestre, lo cual no es una sorpresa si tomamos en cuenta que postulamos que la flavona se uniría a un sitio extracelular, por lo que una mutación intracelular no debiera afectar la propiedad de unir quercetina por parte de la proteína.

Sin embargo algo muy distinto ocurrió con las mutantes extracelulares del dominio I, K117Q y K117R, pues la sensibilidad de la proteína a quercetina fue claramente menor, siendo la mutación por glutamina menos efectiva que la mutación por arginina. Esta última perdió totalmente la sensibilidad al inhibidor. Es por ello que postulamos que lisina 117 estaría directa o indirectamente implicada en la unión de este inhibidor. El dominio I de unión a nucleótidos se encuentra en la cercanía de un sitio de unión a glucosa (Bulnes, 2006; Salas-Burgos et al., 2004), lo que explicaría la inhibición de tipo competitiva observada en ensayos de entrada utilizando eritrocitos humanos y otras líneas celulares (Saldivia, 2003; Vera et al., 2001).

Un punto que se debe mencionar es el hecho que la mutación mas conservada, K117R, fue la que sufrió un mayor efecto sobre la sensibilidad de la proteína al transportador. Esta situación es explicable en el caso que en la proteína silvestre este residuo de lisina no posea una carga formal. Para que esto ocurra, la cadena lateral de lisina 117 debería tener un pKa bastante menor que lo normal (pKa 10,5) y lo suficientemente baja para que a pH fisiológico esta se encuentre

disociada. Esto puede ser plausible si tomamos en cuenta el fuerte ambiente hidrofóbico que rodea a lisina 117 y a la cercanía de la cadena lateral de lisina 114 (probablemente cargada por encontrarse expuesta al medio extracelular), vale decir, se dan las condiciones para que esta lisina se encuentre disociada, dado que el pKa de la cadena lateral debe ser bastante bajo ($pK_a < 7,4$). Incluso el análisis electrostático de la superficie de la proteína arrojó que esta lisina no posee una carga formal positiva.

Estos resultados sugieren fuertemente que la interacción de quercetina con el transportador ocurriría en el bolsillo hidrofóbico en donde se ubica lisina 117, interacción que probablemente esté estabilizada con algún puente de hidrogeno formado entre el grupo amino de la cadena lateral de lisina y alguno de los hidroxilos de la molécula de quercetina. Es así que al introducir una mutación en la posición 117 por arginina, el bolsillo se vería severamente alterado, dado que la cadena lateral de este aminoácido presenta un pKa mucho mayor al de lisina ($pK_a 12,5$). Es posible entonces que el carácter apolar del bolsillo no sea lo suficientemente hidrofóbico para lograr que arginina se encuentre disociada. La introducción de una carga formal positiva impediría la formación de puentes de hidrogeno y alteraría la forma y tamaño del bolsillo, por lo que quercetina ya no podría unirse. En el caso de la mutación por glutamina, la carga formal se mantiene (cero), sin embargo la cadena lateral de glutamina es de menor tamaño que la cadena lateral de lisina, por lo que en el caso de que exista la formación de un puente de hidrógeno con quercetina, este sería más débil al ser un puente de hidrogeno de una longitud de enlace mayor. Este hecho es apoyado por nuestros resultados que muestran que la sensibilidad por quercetina sigue existiendo en K117Q, pero la inhibición es más débil que en la proteína silvestre. Es posible que si se aumenta la concentración de quercetina en el medio se logre una inhibición total

del transporte, sin embargo esto se hace técnicamente muy complicado debido a la baja solubilidad de la flavona.

5.3.4 Pentoxifilina

La metilxantina pentoxifilina ha sido bastante estudiada en nuestro laboratorio por su capacidad de inhibir el transporte de glucosa mediado por GLUT1. Esta propiedad inhibitoria ha sido observada con varias metilxantinas estudiadas, sin embargo, pentoxifilina ha sido un caso especial pues existen datos que sugieren que ella compite con quercetina por un sitio de unión al transportador y no así el resto de las metilxantinas (Ojeda, 2005). Es por ello que una propuesta presentada en estos trabajos fue que las metilxantinas y las flavonas interactuarían con el transportador a través de distintos sitios pero estructuralmente cercanos entre ellos, siendo la cadena alifática de pentoxifilina (que no está presente en otras metilxantinas) la cuál competiría con la unión de quercetina. Esta propuesta se ve fuertemente apoyada por los resultados obtenidos en esta tesis, ya que si bien la mutación del residuo 117 afecta la unión de la flavona, no lo hace con la unión de pentoxifilina. Por ello concluimos que pentoxifilina no interactúa con el bolsillo hidrofóbico en el cual se une quercetina. Es bastante probable que la cadena alifática de pentoxifilina impida el libre acceso de la flavona al bolsillo en el cuál esta ejercería la inhibición y sea por ello que en ensayos de competencia realizados con eritrocitos humanos en trabajos previos, se haya observado la competencia entre ambos compuestos.

5.4 Conclusiones y proyecciones

En esta tesis se ha realizado un trabajo que puede entregar varias conclusiones con respecto a la interacción de la proteína con inhibidores. Dentro de estas se encuentran que lisina 117 y lisina 229 no están implicadas en la unión de OMG, DOG, citocalasina B y pentoxifilina, lo cual

se desprende a que no se observaron efectos de las mutaciones sobre las mediciones funcionales de la proteína sobre estos compuestos. Lisina 117 se ubica en un bolsillo hidrofóbico que probablemente provocaría la disociación de la cadena lateral del residuo. Lisina 117 estaría implicado en la directa interacción del transportador con quercetina. Metilxantinas y flavonas tendrían distintos sitios de unión al transportador. El dominio II de unión a nucleótidos estaría implicado en la interacción con Tirfostina A-47. Para probar estas conclusiones será necesario efectuar una mayor cantidad de estudios, quizás también con mutagénesis sitio dirigida que demostró ser un buen método para realizar este tipo de análisis. Es de este modo que podrían introducirse cargas positivas o negativas en el bolsillo en donde se encuentra lisina 117 y evaluar la unión de quercetina. Estas mutaciones podrían realizarse en los mismos residuos hidrofóbicos que rodean a lisina 117 como son W186, P187 o L189. Una cuarta mutación para evaluar la formación de un puente de hidrogeno sería una mutante K117M, en donde el tamaño de la cadena lateral es casi idéntico, pero con una probabilidad casi nula de formar un puente de hidrogeno por las propiedades fisicoquímicas de metionina. Con respecto a lisina 229, se hace complicada una evaluación del sitio y residuos que la rodean debido a que el modelo teórico que actualmente existe para la proteína, posee una muy baja resolución en esta zona. Se podrían realizar ensayos de fotomarcage para delimitar el sitio de interacción de este inhibidor (tirfostina A-47) con la proteína. De igual modo queda pendiente la evaluación de muchos otros inhibidores conocidos de GLUT1 y en donde a través de esta estrategia podrían dilucidarse nuevos sitios alostéricos en el transportador. Un caso es el putativo sitio de unión de metilxantinas que se mantiene desconocido.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abel, E.D., Peroni, O., Kim, J.K., Kim, Y.B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G.I., Kahn, B.B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, 409, 729-33
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R., Iwata, S. (2003). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*, 301, 610-5
- Asano, T., Katagiri, H., Takata, K., Lin, J.L., Ishihara, H., Inukai, K., Tsukuda, K., Kikuchi, M., Hirano, H., Yazaki, Y., et al. (1991). The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem*, 266, 24632-6
- Augustin, R., Carayannopoulos, M.O., Dowd, L.O., Phay, J.E., Moley, J.F., Moley, K.H. (2004). Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): alternative splicing alters trafficking. *J Biol Chem*, 279, 16229-36
- Baker, G.F., Basketter, D.A., Widdas, W.F. (1978). Asymmetry of the hexose transfer system in human erythrocytes. Experiments with non-transportable inhibitors. *J Physiol*, 278, 377-88
- Baldwin, J.M., Gorga, J.C., Lienhard, G.E. (1981). The monosaccharide transporter of the human erythrocyte. Transport activity upon reconstitution. *J Biol Chem*, 256, 3685-9
- Baldwin, S.A., Lienhard, G.E. (1989). Purification and reconstitution of glucose transporter from human erythrocytes. *Methods Enzymol*, 174, 39-50
- Barnett, J.E., Holman, G.D., Munday, K.A. (1973). Structural requirements for binding to the sugar-transport system of the human erythrocyte. *Biochem J*, 131, 211-21

- Barrett, M.P., Walmsley, A.R., Gould, G.W. (1999). Structure and function of facilitative sugar transporters. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 496-502
- Bazuine, M., van den Broek, P.J., Maassen, J.A. (2005). Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 326, 511-4
- Bell, G.I., Kayano, T., Buse, J.B., Burant, C.F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H., Seino, S. (1990). Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*, 13, 198-208
- Blakemore, S.J., Aledo, J.C., James, J., Campbell, F.C., Lucocq, J.M., 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
- Bloch, R. (1973). Inhibition of glucose transport in the human erythrocyte by cytochalasin B. *Biochemistry*, 12, 4799-801
- Bourgeois, F., Coady, M.J., Lapointe, J.Y. (2005). Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMIT2 and HMIT. *J Physiol*, 563, 333-43
- Bulnes, P.A. (2006). Interacciones moleculares entre el transportador facilitativo de glucosa tipo 1 y algunos inhibidores. Tesis, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Univ. Austral de Chile, 100pp
- Burant, C.F., Bell, G.I. (1992). Mammalian facilitative glucose transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins. *Biochemistry*, 31, 10414-20

- Burant, C.F., Sivitz, W.I., Fukumoto, H., Kayano, T., Nagamatsu, S., Seino, S., Pessin, J.E., Bell, G.I. (1991). Mammalian glucose transporters: structure and molecular regulation. *Recent Prog Horm Res*, 47, 349-87; discussion 87-8
- Burant, C.F., Takeda, J., Brot-Laroche, E., Bell, G.I., Davidson, N.O. (1992). Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J Biol Chem*, 267, 14523-6
- Carayannopoulos, M.O., Chi, M.M., Cui, Y., Pingsterhaus, J.M., McKnight, R.A., Mueckler, M., Devaskar, S.U., 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, 7313-8
- Carruthers, A. (1990). Facilitated diffusion of glucose. *Physiol Rev*, 70, 1135-76
- Carruthers, A., Helgerson, A.L. (1989). The human erythrocyte sugar transporter is also a nucleotide binding protein. *Biochemistry*, 28, 8337-46
- Carruthers, A., Helgerson, A.L. (1991). Inhibitions of sugar transport produced by ligands binding at opposite sides of the membrane. Evidence for simultaneous occupation of the carrier by maltose and cytochalasin B. *Biochemistry*, 30, 3907-15
- Carruthers, A., Helgerson, A.L., Hebert, D.N., Tefft, R.E., Jr., Naderi, S., Melchior, D.L. (1989). Effects of calcium, ATP, and lipids on human erythrocyte sugar transport. *Ann N Y Acad Sci*, 568, 52-67
- Carruthers, A., Zottola, R.J. (1996). Erythrocyte Sugar Transport. En: Konings, W.N., Kaback, H.R., and Lolkema, J.S. *Handbook of Biological Physics*: 311-42. Elsevier Science B.V., Worcester, USA
- Carter, S.B. (1967). Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature*, 213, 261-4

- Cloherty, E.K., Hamill, S., Levine, K., Carruthers, A. (2001). Sugar transporter regulation by ATP and quaternary structure. *Blood Cells Mol Dis*, 27, 102-7
- Cooper, J.A. (1987). Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *J Cell Biol*, 105, 1473-78
- Cunningham, P., Afzal-Ahmed, I., Naftalin, R.J. (2006). Docking studies show that D-glucose and quercetin slide through the transporter GLUT1. *J Biol Chem*, 281, 5797-803
- Challiss, J.R., Taylor, L.P., 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, 155-66
- Chin, J.J., Jung, E.K., Chen, V., Jung, C.Y. (1987). Structural basis of human erythrocyte glucose transporter function in proteoliposome vesicles: circular dichroism measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 4113-6
- Daly, J.W., Fredholm, B.B. (1998). Caffeine--an atypical drug of dependence. *Drug Alcohol Depend*, 51, 199-206
- Davies, A., Ciardelli, T.L., Lienhard, G.E., Boyle, J.M., Whetton, A.D., Baldwin, S.A. (1990). Site-specific antibodies as probes of the topology and function of the human erythrocyte glucose transporter. *Biochem J*, 266, 799-808
- Dawson, P.A., Mychaleckyj, J.C., Fossey, S.C., Mihic, S.J., Craddock, A.L., Bowden, D.W. (2001). Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab*, 74, 186-99
- De Vivo, D.C., Wang, D., Pascual, J.M., Ho, Y.Y. (2002). Glucose transporter protein syndromes. *Int Rev Neurobiol*, 51, 259-88

- Deves, R., 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, 339-48
- Deves, R., Krupka, R.M. (1978b). A new approach in the kinetics of biological transport. The potential of reversible inhibition studies. *Biochim Biophys Acta*, 510, 186-200
- Deziel, M.R., Rothstein, A. (1984). Proteolytic cleavages of cytochalasin B binding components of band 4.5 proteins of the human red blood cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, 776, 10-20
- Doege, H., Bocianski, A., Joost, H.G., 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, 771-6
- Doege, H., Bocianski, A., Scheepers, A., Axer, H., Eckel, J., Joost, H.G., Schurmann, A. (2001). Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem J*, 359, 443-9
- Doege, H., Schurmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A., Joost, H.G. (2000b). GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem*, 275, 16275-80
- Doege, H., Schurmann, A., Ohnimus, H., Monser, V., Holman, G.D., Joost, H.G. (1998). Serine-294 and threonine-295 in the exofacial loop domain between helices 7 and 8 of glucose transporters (GLUT) are involved in the conformational alterations during the transport process. *Biochem J*, 329 (Pt 2), 289-93

- Elbrink, J., Bihler, I. (1975). Membrane transport: its relation to cellular metabolic rates. *Science*, 188, 1177-84
- Erlund, I., Freese, R., Marniemi, J., Hakala, P., Alfthan, G. (2006). Bioavailability of quercetin from berries and the diet. *Nutr Cancer*, 54, 13-7
- Fischbarg, J., Cheung, M., Czegledy, F., Li, J., Iserovich, P., Kuang, K., Hubbard, J., Garner, M., Rosen, O.M., Golde, D.W., et al. (1993). Evidence that facilitative glucose transporters may fold as beta-barrels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 11658-62
- Fry, D.C., Kuby, S.A., Mildvan, A.S. (1986). ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 907-11
- Fukumoto, H., Kayano, T., Buse, J.B., Edwards, Y., Pilch, P.F., Bell, G.I., Seino, S. (1989). Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J Biol Chem*, 264, 7776-9
- Garcia-Alvarez, I., Garrido, L., Fernandez-Mayoralas, A. (2007). Studies on the Uptake of Glucose Derivatives by Red Blood Cells. *ChemMedChem*, 2, 496-504
- Gazit, A., Osherov, N., Posner, I., Yaish, P., Poradosu, E., Gilon, C., 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, 1896-907
- Gazit, A., Yaish, P., Gilon, C., Levitzki, A. (1989). Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem*, 32, 2344-52

- Gorga, F.R., Lienhard, G.E. (1981). Equilibria and kinetics of ligand binding to the human erythrocyte glucose transporter. Evidence for an alternating conformation model for transport. *Biochemistry*, 20, 5108-13
- Gould, G.W., Holman, G.D. (1993). The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J*, 295 (Pt 2), 329-41
- Gouyon, F., Caillaud, L., Carriere, V., Klein, C., Dalet, V., Citadelle, D., Kellett, G.L., Thorens, B., Leturque, A., Brot-Laroche, E. (2003). Simple-sugar meals target GLUT2 at enterocyte apical membranes to improve sugar absorption: a study in GLUT2-null mice. *J Physiol*, 552, 823-32
- Gude, N.M., Stevenson, J.L., Murthi, P., Rogers, S., Best, J.D., Kalionis, B., King, R.G. (2005). Expression of GLUT12 in the fetal membranes of the human placenta. *Placenta*, 26, 67-72
- Haber, R.S., Weinstein, S.P., O'Boyle, E., Morgello, S. (1993). Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter. *Endocrinology*, 132, 2538-43
- Hansen, P.A., Wang, W., Marshall, B.A., Holloszy, J.O., Mueckler, M. (1998). Dissociation of GLUT4 translocation and insulin-stimulated glucose transport in transgenic mice overexpressing GLUT1 in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 273, 18173-9
- Hashiramoto, M., Kadowaki, T., Clark, A.E., Muraoka, A., Momomura, K., Sakura, H., Tobe, K., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Holman, G.D., et al. (1992). Site-directed mutagenesis of GLUT1 in helix 7 residue 282 results in perturbation of exofacial ligand binding. *J Biol Chem*, 267, 17502-7
- Hebert, D.N., Carruthers, A. (1986). Direct evidence for ATP modulation of sugar transport in human erythrocyte ghosts. *J Biol Chem*, 261, 10093-9

- Hebert, D.N., Carruthers, A. (1992). Glucose transporter oligomeric structure determines transporter function. Reversible redox-dependent interconversions of tetrameric and dimeric GLUT1. *J Biol Chem*, 267, 23829-38
- Heijnen, H.F., Oorschot, V., Sixma, J.J., Slot, J.W., James, D.E. (1997). Thrombin stimulates glucose transport in human platelets via the translocation of the glucose transporter GLUT-3 from alpha-granules to the cell surface. *J Cell Biol*, 138, 323-30
- Heinze, M., Monden, I., Keller, K. (2004). Cysteine-scanning mutagenesis of transmembrane segment 1 of glucose transporter GLUT1: extracellular accessibility of helix positions. *Biochemistry*, 43, 931-6
- Helgerson, A.L., Hebert, D.N., Naderi, S., Carruthers, A. (1989). Characterization of two independent modes of action of ATP on human erythrocyte sugar transport. *Biochemistry*, 28, 6410-7
- Ho, Y.Y., Yang, H., Klepper, J., Fischbarg, J., Wang, D., De Vivo, D.C. (2001). Glucose transporter type 1 deficiency syndrome (Glut1DS): methylxanthines potentiate GLUT1 haploinsufficiency in vitro. *Pediatr Res*, 50, 254-60
- Holyoake, J., Caulfeild, V., Baldwin, S.A., Sansom, M.S. (2006). Modeling, docking, and simulation of the major facilitator superfamily. *Biophys J*, 91, L84-6
- Hresko, R.C., Kruse, M., Strube, M., Mueckler, M. (1994a). Topology of the Glut 1 glucose transporter deduced from glycosylation scanning mutagenesis. *J Biol Chem*, 269, 20482-8
- Hresko, R.C., Murata, H., Marshall, B.A., Mueckler, M. (1994b). Discrete structural domains determine differential endoplasmic reticulum to Golgi transit times for glucose transporter isoforms. *J Biol Chem*, 269, 32110-9

- Hruz, P.W., Mueckler, M.M. (1999). Cysteine-scanning mutagenesis of transmembrane segment 7 of the GLUT1 glucose transporter. *J Biol Chem*, 274, 36176-80
- Hruz, P.W., Mueckler, M.M. (2000). Cysteine-scanning mutagenesis of transmembrane segment 11 of the GLUT1 facilitative glucose transporter. *Biochemistry*, 39, 9367-72
- Hruz, P.W., Mueckler, M.M. (2001). Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol Membr Biol*, 18, 183-93
- Huang, Y., Lemieux, M.J., Song, J., Auer, M., Wang, D.N. (2003). Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science*, 301, 616-20
- Ibberson, M., Riederer, B.M., Uldry, M., Guhl, B., Roth, J., Thorens, B. (2002). Immunolocalization of GLUTX1 in the testis and to specific brain areas and vasopressin-containing neurons. *Endocrinology*, 143, 276-84
- Ibberson, M., Uldry, M., Thorens, B. (2000). GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem*, 275, 4607-12
- Inukai, K., Asano, T., Katagiri, H., Anai, M., Funaki, M., Ishihara, H., Tsukuda, K., Kikuchi, M., Yazaki, Y., Oka, Y. (1994). Replacement of both tryptophan residues at 388 and 412 completely abolished cytochalasin B photolabelling of the GLUT1 glucose transporter. *Biochem J*, 302 (Pt 2), 355-61
- Jacobs, D.B., Berenski, C.J., Spangler, R.A., Jung, C.Y. (1987). Radiation inactivation target size of rat adipocyte glucose transporters in the plasma membrane and intracellular pools. *J Biol Chem*, 262, 8084-7

- Jarvis, S.M., Young, J.D., Wu, J.S., Belt, J.A., Paterson, A.R. (1986). Photoaffinity labeling of the human erythrocyte glucose transporter with 8-azidoadenosine. *J Biol Chem*, 261, 11077-85
- Johnson, J.H., Newgard, C.B., Milburn, J.L., Lodish, H.F., 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, 6548-51
- Jones, M.N., Nickson, J.K. (1982). The human erythrocyte monosaccharide transporter in bilayer lipid membranes. *Biochem Soc Trans*, 10, 5-6
- 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., Thorens, B. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282, E974-6
- Joost, H.G., Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol*, 18, 247-56
- Kasahara, T., Kasahara, M. (1997). Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Glut1 glucose transporter. *Biochim Biophys Acta*, 1324, 111-9
- Kayano, T., Burant, C.F., Fukumoto, H., Gould, G.W., Fan, Y.S., Eddy, R.L., Byers, M.G., Shows, T.B., Seino, S., Bell, G.I. (1990). Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an

- unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J Biol Chem*, 265, 13276-82
- Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R.L., Fan, Y.S., Byers, M.G., Shows, T.B., Bell, G.I. (1988). Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem*, 263, 15245-8
- Keller, K., Strube, M., Mueckler, M. (1989). Functional expression of the human HepG2 and rat adipocyte glucose transporters in *Xenopus* oocytes. Comparison of kinetic parameters. *J Biol Chem*, 264, 18884-9
- Klip, A., Deziel, M., Walkert, D. (1984). Chemical identity of the glucose transporter with the [3H]cytochalasin B-photolabelled component of human erythrocyte membranes. Equal sensitivity to trypsin and endoglycosidase F. *Biochem Biophys Res Commun*, 122, 218-24
- Kwon, O., Eck, P., Chen, S., Corpe, C.P., Lee, J.H., Kruhlak, M., Levine, M. (2007). Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *Faseb J*, 21, 366-77
- Lachaal, M., Spangler, R.A., Jung, C.Y. (2001). Adenosine and adenosine triphosphate modulate the substrate binding affinity of glucose transporter GLUT1 in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 1511, 123-33
- Levine, K.B., Cloherty, E.K., Fidyk, N.J., Carruthers, A. (1998). Structural and physiologic determinants of human erythrocyte sugar transport regulation by adenosine triphosphate. *Biochemistry*, 37, 12221-32
- Levine, K.B., Hamill, S., Cloherty, E.K., Carruthers, A. (2001). Alanine scanning mutagenesis of the human erythrocyte glucose transporter putative ATP binding domain. *Blood Cells Mol Dis*, 27, 139-42

- Levitzki, A., Gazit, A. (1995). Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*, 267, 1782-8
- Li, Q., Manolescu, A., Ritzel, M., Yao, S., Slugoski, M., Young, J.D., Chen, X.Z., Cheeseman, C.I. (2004). Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287, G236-42
- Lieb, W.R., Stein, W.D. (1971). New theory for glucose transport across membranes. *Nat New Biol*, 230, 108-9
- Lin, S., Spudich, J.A. (1974). Biochemical studies on the mode of action of cytochalasin B. Cytochalasin B binding to red cell membrane in relation to glucose transport. *J Biol Chem*, 249, 5778-83
- Lisinski, I., Schurmann, A., Joost, H.G., Cushman, S.W., Al-Hasani, H. (2001). Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem J*, 358, 517-22
- Liu, Q., Vera, J.C., Peng, H., Golde, D.W. (2001). The predicted ATP-binding domains in the hexose transporter GLUT1 critically affect transporter activity. *Biochemistry*, 40, 7874-81
- Macheda, M.L., Rogers, S., Best, J.D. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol*, 202, 654-62
- Macheda, M.L., Williams, E.D., Best, J.D., Wlodek, M.E., Rogers, S. (2003). Expression and localisation of GLUT1 and GLUT12 glucose transporters in the pregnant and lactating rat mammary gland. *Cell Tissue Res*, 311, 91-7
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*, 81, 230S-42S

- Manolescu, A., Salas-Burgos, A.M., Fischbarg, J., Cheeseman, C.I. (2005). Identification of a hydrophobic residue as a key determinant of fructose transport by the facilitative hexose transporter SLC2A7 (GLUT7). *J Biol Chem*, 280, 42978-83
- Manolescu, A.R., Augustin, R., Moley, K., Cheeseman, C. (2007). A highly conserved hydrophobic motif in the exofacial vestibule of fructose transporting SLC2A proteins acts as a critical determinant of their substrate selectivity. *Mol Membr Biol*, 24, 455-63
- Mantych, G.J., James, D.E., Chung, H.D., Devaskar, S.U. (1992). Cellular localization and characterization of Glut 3 glucose transporter isoform in human brain. *Endocrinology*, 131, 1270-8
- Mantych, G.J., James, D.E., Devaskar, S.U. (1993). Jejunal/kidney glucose transporter isoform (Glut-5) is expressed in the human blood-brain barrier. *Endocrinology*, 132, 35-40
- Mate, A., de la Hermosa, M.A., Barfull, A., Planas, J.M., Vazquez, C.M. (2001). Characterization of D-fructose transport by rat kidney brush-border membrane vesicles: changes in hypertensive rats. *Cell Mol Life Sci*, 58, 1961-7
- McVie-Wylie, A.J., Lamson, D.R., Chen, Y.T. (2001). Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics*, 72, 113-7
- Mobasher, A., Dobson, H., Mason, S.L., Cullingham, F., Shakibaei, M., Moley, J.F., Moley, K.H. (2005). Expression of the GLUT1 and GLUT9 facilitative glucose transporters in embryonic chondroblasts and mature chondrocytes in ovine articular cartilage. *Cell Biol Int*, 29, 249-60

- Mobasheri, A., Neama, G., Bell, S., Richardson, S., Carter, S.D. (2002). Human articular chondrocytes express three facilitative glucose transporter isoforms: GLUT1, GLUT3 and GLUT9. *Cell Biol Int*, 26, 297-300
- Monsalve, R.A. (2001). Inhibición del transportador de hexosas GLUT1 por tirfostina A47. Seminario de Titulación, Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Univ. Austral de Chile, 40pp
- Mori, H., Hashiramoto, M., Clark, A.E., Yang, J., Muraoka, A., Tamori, Y., Kasuga, M., Holman, G.D. (1994). Substitution of tyrosine 293 of GLUT1 locks the transporter into an outward facing conformation. *J Biol Chem*, 269, 11578-83
- Mueckler, M. (1993). Glucokinase, glucose sensing, and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 784-5
- Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem*, 219, 713-25
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E., Lodish, H.F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*, 229, 941-5
- Mueckler, M., Kruse, M., Strube, M., Riggs, A.C., Chiu, K.C., Permutt, M.A. (1994a). A mutation in the Glut2 glucose transporter gene of a diabetic patient abolishes transport activity. *J Biol Chem*, 269, 17765-7
- Mueckler, M., Makepeace, C. (1997). Identification of an amino acid residue that lies between the exofacial vestibule and exofacial substrate-binding site of the Glut1 sugar permeation pathway. *J Biol Chem*, 272, 30141-6

- Mueckler, M., Makepeace, C. (1999). Transmembrane segment 5 of the Glut1 glucose transporter is an amphipathic helix that forms part of the sugar permeation pathway. *J Biol Chem*, 274, 10923-6
- Mueckler, M., Makepeace, C. (2002). Analysis of transmembrane segment 10 of the Glut1 glucose transporter by cysteine-scanning mutagenesis and substituted cysteine accessibility. *J Biol Chem*, 277, 3498-503
- Mueckler, M., Makepeace, C. (2004). Analysis of transmembrane segment 8 of the GLUT1 glucose transporter by cysteine-scanning mutagenesis and substituted cysteine accessibility. *J Biol Chem*, 279, 10494-9
- Mueckler, M., Makepeace, C. (2005). Cysteine-scanning mutagenesis and substituted cysteine accessibility analysis of transmembrane segment 4 of the Glut1 glucose transporter. *J Biol Chem*, 280, 39562-8
- Mueckler, M., Makepeace, C. (2006). Transmembrane segment 12 of the Glut1 glucose transporter is an outer helix and is not directly involved in the transport mechanism. *J Biol Chem*, 281, 36993-8
- Mueckler, M., Roach, W., Makepeace, C. (2004). Transmembrane segment 3 of the Glut1 glucose transporter is an outer helix. *J Biol Chem*, 279, 46876-81
- Mueckler, M., Weng, W., Kruse, M. (1994b). Glutamine 161 of Glut1 glucose transporter is critical for transport activity and exofacial ligand binding. *J Biol Chem*, 269, 20533-8
- Murota, K., Terao, J. (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys*, 417, 12-7

- Naftalin, R.J., Smith, P.M., Roselaar, S.E. (1985). Evidence for non-uniform distribution of D-glucose within human red cells during net exit and counterflow. *Biochim Biophys Acta*, 820, 235-49
- Nickson, J.K., Jones, M.N. (1977). Reconstitution of the monosaccharide-transport system of the human erythrocyte membrane. *Biochem Soc Trans*, 5, 147-9
- Ojeda, P.G. (2005). Interacción de las metilxantinas con el transportador de hexosas GLUT1. Tesis, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Univ. Austral de Chile, 83pp
- Oka, Y., Asano, T., Shibasaki, Y., Lin, J.L., Tsukuda, K., Katagiri, H., Akanuma, Y., Takaku, F. (1990). C-terminal truncated glucose transporter is locked into an inward-facing form without transport activity. *Nature*, 345, 550-3
- Olsowski, A., Monden, I., Krause, G., Keller, K. (2000). Cysteine scanning mutagenesis of helices 2 and 7 in GLUT1 identifies an exofacial cleft in both transmembrane segments. *Biochemistry*, 39, 2469-74
- Pascual, J.M., Lecumberri, B., Wang, D., Yang, R., Engelstad, K., De Vivo, D.C. (2004a). [Type 1 glucose transporter (Glut1) deficiency: manifestations of a hereditary neurological syndrome]. *Rev Neurol*, 38, 860-4
- Pascual, J.M., Wang, D., Lecumberri, B., Yang, H., Mao, X., Yang, R., De Vivo, D.C. (2004b). GLUT1 deficiency and other glucose transporter diseases. *Eur J Endocrinol*, 150, 627-33
- Pérez, A. (2003). Caracterización de la interacción de flavonas y tirfostinas con el transportador de hexosas GLUT1. Tesis, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Univ. Austral de Chile, 69pp

- Phay, J.E., Hussain, H.B., Moley, J.F. (2000). Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics*, 66, 217-20
- Raddatz, N.A. (2006). Analisis funcional de las mutantes G111A y G116A en el transportador de hexosas GLUT1. Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Univ. Austral de Chile, 90pp
- Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic Biol Med*, 36, 827-8
- Rogers, S., Chandler, J.D., Clarke, A.L., Petrou, S., Best, J.D. (2003). Glucose transporter GLUT12-functional characterization in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 308, 422-6
- Rogers, S., Macheda, M.L., Docherty, S.E., Carty, M.D., Henderson, M.A., Soeller, W.C., Gibbs, E.M., James, D.E., Best, J.D. (2002). Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282, E733-8
- Salas-Burgos, A., Iserovich, P., Zuniga, F., Vera, J.C., Fischbarg, J. (2004). Predicting the three-dimensional structure of the human facilitative glucose transporter glut1 by a novel evolutionary homology strategy: insights on the molecular mechanism of substrate migration, and binding sites for glucose and inhibitory molecules. *Biophys J*, 87, 2990-9
- Saldivia, M.A. (2003). Caracterización parcial de la inhibición del transportador de hexosas GLUT1 por las flavonas quercetina y miricetina. Seminario de Titulación, Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Univ. Austral de Chile, 36pp

- Sato, M., 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, 24721-5
- Sato, Y., Miura, T., Suzuki, Y. (1990a). Interaction of pentoxifylline with human erythrocytes. I. Interaction of xanthine derivatives with human erythrocyte ghosts. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 38, 552-4
- Sato, Y., Miura, T., Suzuki, Y. (1990b). Interaction of pentoxifylline with human erythrocytes. II. Effects of pentoxifylline on the erythrocyte membrane. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 38, 555-8
- Sato, Y., Miura, T., Suzuki, Y. (1991). Interaction of pentoxifylline with human erythrocytes. III. Comparison of fluidity change of erythrocyte membrane caused by S-adenosyl-L-methionine with that by pentoxifylline. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 39, 468-73
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*, 130, 2073S-85S
- Scheepers, A., Doege, H., Joost, H.G., Schurmann, A. (2001). Mouse GLUT8: genomic organization and regulation of expression in 3T3-L1 adipocytes by glucose. *Biochem Biophys Res Commun*, 288, 969-74
- Scheepers, A., Schmidt, S., Manolescu, A., Cheeseman, C.I., Bell, A., Zahn, C., Joost, H.G., Schurmann, A. (2005). Characterization of the human SLC2A11 (GLUT11) gene: alternative promoter usage, function, expression, and subcellular distribution of three isoforms, and lack of mouse orthologue. *Mol Membr Biol*, 22, 339-51

- Schurmann, A., Doege, H., Ohnimus, H., Monser, V., Buchs, A., Joost, H.G. (1997). Role of conserved arginine and glutamate residues on the cytosolic surface of glucose transporters for transporter function. *Biochemistry*, 36, 12897-902
- Seatter, M.J., De la Rue, S.A., Porter, L.M., 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, 1322-6
- Shows, T.B., Eddy, R.L., Byers, M.G., Fukushima, Y., Dehaven, C.R., Murray, J.C., Bell, G.I. (1987). Polymorphic human glucose transporter gene (GLUT) is on chromosome 1p31.3-p35. *Diabetes*, 36, 546-9
- Stuart, C.A., Wen, G., Jiang, J. (1999). GLUT3 protein and mRNA in autopsy muscle specimens. *Metabolism*, 48, 876-80
- Stuart, C.A., Yin, D., Howell, M.E., Dykes, R.J., Laffan, J.J., Ferrando, A.A. (2006). Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291, E1067-73
- Suganuma, N., Segade, F., Matsuzu, K., Bowden, D.W. (2007). Differential expression of facilitative glucose transporters in normal and tumour kidney tissues. *BJU Int*, 99, 1143-9
- Takeda, J., Kayano, T., Fukumoto, H., Bell, G.I. (1993). Organization of the human GLUT2 (pancreatic beta-cell and hepatocyte) glucose transporter gene. *Diabetes*, 42, 773-7
- Tamori, Y., Hashiramoto, M., Clark, A.E., Mori, H., Muraoka, A., Kadowaki, T., Holman, G.D., Kasuga, M. (1994). Substitution at Pro385 of GLUT1 perturbs the glucose transport function by reducing conformational flexibility. *J Biol Chem*, 269, 2982-6

- Taverna, R.D., Langdon, R.G. (1973). Reversible association of cytochalasin B with the human erythrocyte membrane. Inhibition of glucose transport and the stoichiometry of cytochalasin binding. *Biochim Biophys Acta*, 323, 207-19
- 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., Comuzzie, A.G. (2004). Quantitative genetic analysis of glucose transporter 4 mRNA levels in baboon adipose. *Obes Res*, 12, 1652-7
- Thoidis, G., Kupriyanova, T., Cunningham, J.M., Chen, P., Cadel, S., Foulon, T., Cohen, P., Fine, R.E., Kandrор, K.V. (1999). Glucose transporter Glut3 is targeted to secretory vesicles in neurons and PC12 cells. *J Biol Chem*, 274, 14062-6
- Thorens, B., Sarkar, H.K., Kaback, H.R., Lodish, H.F. (1988). Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell*, 55, 281-90
- Thurmond, D.C., Pessin, J.E. (2001). Molecular machinery involved in the insulin-regulated fusion of GLUT4-containing vesicles with the plasma membrane (review). *Mol Membr Biol*, 18, 237-45
- Uldry, M., Ibberson, M., Horisberger, J.D., Chatton, J.Y., Riederer, B.M., Thorens, B. (2001). Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *Embo J*, 20, 4467-77
- Uldry, M., Ibberson, M., Hosokawa, M., Thorens, B. (2002). GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett*, 524, 199-203

- Uldry, M., Steiner, P., Zurich, M.G., Beguin, P., Hirling, H., Dolci, W., Thorens, B. (2004). Regulated exocytosis of an H⁺/myo-inositol symporter at synapses and growth cones. *Embo J*, 23, 531-40
- Uldry, M., Thorens, B. (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch*, 447, 480-9
- 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., Slebe, J.C., et al. (1996). Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1. *J Biol Chem*, 271, 8719-24
- Vera, J.C., Reyes, A.M., Velasquez, F.V., Rivas, C.I., Zhang, R.H., Strobel, P., Slebe, J.C., Nunez-Alarcon, J., Golde, D.W. (2001). Direct inhibition of the hexose transporter GLUT1 by tyrosine kinase inhibitors. *Biochemistry*, 40, 777-90
- Vera, J.C., Rivas, C.I., Zhang, R.H., Farber, C.M., Golde, D.W. (1994). Human HL-60 myeloid leukemia cells transport dehydroascorbic acid via the glucose transporters and accumulate reduced ascorbic acid. *Blood*, 84, 1628-34
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., 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, 945-51
- Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, 36, 829-37
- Wellner, M., Monden, I., Mueckler, M.M., Keller, K. (1995). Functional consequences of proline mutations in the putative transmembrane segments 6 and 10 of the glucose transporter GLUT1. *Eur J Biochem*, 227, 454-8

- Wilbrandt, W. (1972). Coupling between simultaneous movements of carrier substrates. *J Membr Biol*, 10, 357-66
- Williams, R.J., Spencer, J.P., Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med*, 36, 838-49
- Wong, H.Y., Law, P.Y., Ho, Y.Y. (2007). Disease-associated Glut1 single amino acid substitute mutations S66F, R126C, and T295M constitute Glut1-deficiency states in vitro. *Mol Genet Metab*, 90, 193-8
- Wood, I.S., Hunter, L., Trayhurn, P. (2003). Expression of Class III facilitative glucose transporter genes (GLUT-10 and GLUT-12) in mouse and human adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 308, 43-9
- Wood, I.S., Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*, 89, 3-9
- Yasuhara, M., Levy, G. (1988). Caffeine as a potential risk factor for theophylline neurotoxicity. *J Pharm Sci*, 77, 745-7
- Zamora-Leon, S.P., Golde, D.W., Concha, II, Rivas, C.I., Delgado-Lopez, F., Baselga, J., Nualart, F., Vera, J.C. (1996). Expression of the fructose transporter GLUT5 in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1847-52
- Zhou, L., Yang, Y., Wang, X., Liu, S., Shang, W., Yuan, G., Li, F., Tang, J., Chen, M., Chen, J. (2007). Berberine stimulates glucose transport through a mechanism distinct from insulin. *Metabolism*, 56, 405-12
- Zoccoli, M.A., Baldwin, S.A., Lienhard, G.E. (1978). The monosaccharide transport system of the human erythrocyte. Solubilization and characterization on the basis of cytochalasin B binding. *J Biol Chem*, 253, 6923-30