



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



ANÁLISIS FUNCIONAL DEL EFECTO DE QUERCETINA EN
MUTANTES EXOFACIALES DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA
GLUT1

Seminario de Título presentado a la

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Para optar al título de Biólogo

Noemi Candia González

Concepción, Mayo de 2013

1. RESUMEN

El transporte facilitado de glucosa es mediado principalmente por el transportador GLUT1, proteína expresada en forma ubicua en los tejidos celulares humanos. Si bien su funcionalidad es independiente de la hidrólisis de ATP, se sabe que su actividad intrínseca se ve afectada por la presencia de este nucleótido. GLUT1 posee alta afinidad por D-glucosa ($K_m \sim 2-3 \text{ mM}$), transportando además otros sustratos como galactosa, manosa, glucosamina y 2-desoxi-D-glucosa. La capacidad que tiene GLUT1 de unir moléculas que no tienen relación estructural con su sustrato también ha sido ampliamente utilizada para dilucidar su estructura y función. 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. Sobre esta base se realizó el reemplazo mutagénico de residuos 354-361 correspondientes a un dominio adicional del transportador GLUT1 para corroborar que el reemplazo impide la unión del inhibidor quercetina en su sitio de unión. Se prepararon 6 mutantes puntuales: L355A, L357A, L358A, E359A, Q360A y L361A. Los cDNA codificantes para estas proteínas fueron transfectados en células embrionales de riñón humano (HEK-293). En estas células transfectadas se realizaron algunos ensayos preliminares de transporte de 2-desoxi-D-glucosa y de la regulación del transportador por quercetina en condiciones trans-cero de entrada.

Nuestros resultados muestran que las mutantes se expresan eficientemente en estos sistemas de expresión y que todas son funcionales. Sus propiedades de eficiencia catalítica y de afinidad por sustrato demuestran que las mutantes L355A y L358A presentan mayor afinidad por sustrato que la proteína silvestre, pero la velocidad de transporte es similar. La captación de sustrato de las mutantes L357A, E359A, Q360A y L361A es similar al de la proteína silvestre, pero la velocidad de transporte es menor. Asimismo, la interacción con quercetina demuestra que las mutantes L355A y L358A no son sensibles a la flavona en condiciones trans-cero de entrada. Por otra parte, L357A, E359A, Q360A y L361A presentan sensibilidad frente al inhibidor Quercetina. Estos antecedentes nos permiten sugerir que el dominio adicional de GLUT1 forma parte de un sitio de unión exofacial para Quercetina y los cambios aminoacídicos pueden comprometer en la estabilidad del equilibrio de unión del inhibidor al transportador.