

## A Study on the Inhibition of 2-deoxy-D-Glucose Transport of the Endogenous Glucose Transporters in *Spodoptera frugiperda* Clone 21-AE Cells by Using Hexoses

Chong-Kee Lee<sup>†</sup>

Department of Immunology, School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu 705-718, Korea

The baculovirus/insect cell expression system is of great value in the study of structure-function relationships in mammalian glucose-transport proteins by site-directed mutagenesis and for the large-scale production of these proteins for mechanistic and biochemical studies. *Spodoptera frugiperda* Clone 21 (Sf21) cells grow well on TC-100 medium that contains 0.1% D-glucose as the major carbon source, strongly suggesting the presence of endogenous glucose transporters. However, very little is known about the properties of the endogenous sugar transporter(s) in Sf21 cells, although a saturable transport system for hexose uptake has been previously revealed in the Sf cells. In order to further examine the substrate and inhibitor recognition properties of the Sf21 cell transporter, the ability of hexoses to inhibit 2-deoxy-D-glucose (2dGlc) transport was investigated by measuring inhibition constants ( $K_i$ ). The  $K_i$ 's for reversible inhibitors were determined from plots of uptake versus inhibitor concentration. Transport was effectively inhibited by D-mannose and D-glucose. Of the hexoses tested, L-glucose had the least effect on 2dGlc transport in the Sf21 cells, indicating that the transport is stereoselective. Unlike the human HepG2 type glucose transport system, D-mannose had a somewhat greater affinity for the Sf21 cell transporter than D-glucose, implying that the hydroxyl group at the C-2 position is not necessary for strong binding. However, epimerization at the C-4 position of D-glucose (D-galactose) resulted in a dramatic decrease in affinity of the hexose for the Sf21 cell transporter. Such a lowering of affinity might be the result of the involvement of the C-4 hydroxyl in hydrogen bonding. It is therefore suggested that Sf21 cells were found to contain an endogenous sugar transport activity that in several aspects resembles the human HepG2 type glucose transporter, although the insect and human transporters do differ in their affinity for cytochalasin B.

**Key Words:** Hexose transport, Sf21 cells, Hexose inhibition

### 서 론

세포막을 통한 당 (sugar)의 수동적 확산 (passive 또는 facilitated diffusion)은 거의 모든 포유동물 세포에서 일어나며 대조적으로 당의 능동적 수송 (active transport)은 흡수적이며 재흡수성의 다세포성 진핵세포 (eukaryotes)의 상피세포에 특이적이다. 또한 효모와 원핵세포 (prokaryotes)의 당 수송도 능동적 수송이 일반적 특성이다 (Wheeler and Hinkle, 1985; Stein, 1986). 최근에는 유전공학을 이용한 염기서열의 비교분석이 가능해져서 박테리아를 포함한 미생물과 포유

동물들에 존재하는 당 수송단백질 (sugar transporter)들의 염기서열에 상동성이 있으며, 이들은 커다란 당수송체 집단 (sugar transporter family)을 형성하고 있음을 보여 주었다 (Mueckler et al., 1985; Baldwin and Henderson, 1989; James et al., 1989; Baldwin SA, 1993; Seatter and Gould, 1999; Joost and Thorens, 2001; Wood and Trayhurn, 2003). 이러한 사실들은 당수송체들이 공동의 조상으로부터 진화되었음을 암시하고 있으며 따라서 이들 중 어느 한 수송체 단백질의 당 수송 기전이나, 삼차원적 구조를 정확히 밝혀 낼 수 있다면 당수송체 집단 모두에 관한 귀중한 연구 자료가 될 뿐 아니라 당뇨병 예방 및 치료에도 유용한 정보가 될 수 있을 것이다.

포도당 (glucose)은 모든 포유동물 세포의 주요 대사에너지원이며 이들의 세포내 영입은 수동적 포도당 수송체인 (passive glucose transporters) GLUT1-7에 의해 이루어진다 (Wood and Trayhurn, 2003). 특히 사람의 뇌, 적혈구 등에서의 포도당 수송은 사람 적혈구형 포도당 수송체인 GLUT1에 의

\*논문 접수: 2005년 10월 27일

수정 접수: 2005년 11월 22일

<sup>†</sup>교신저자: 이종기, (우) 705-718 대구광역시 남구 대명4동 3056-6, 대구가톨릭대학교 의과대학 면역학교실  
Tel: 053-650-4477, Fax: 053-650-4477  
e-mail: leeck@cu.ac.kr

해 이루어진다 (Bell et al., 1993; Vannucci et al., 1997). GLUT1의 구조와 기능의 상관관계를 위한 유전공학적 연구, 삼차원적 구조 분석을 위한 결정화와 같은 생물물리학적 연구에는 비교적 많은 양의 단백질이 필요하나 이들은 세포막내에 적은 양으로 존재하고 있으며 nucleoside 수송체와 같은 물질들로 오염 (Jarvis and Young, 1981)되기 쉬워 순수한 GLUT1 수송체만을 분리, 정제하기가 쉽지 않다. 이러한 이유로 당 수송체들을 유전공학적 방법을 이용하여 많은 양을 생산하고자 하는 노력들이 꾸준히 진행되고 있으며, 그 예로서 *E. coli* (Sarkar et al., 1988; Thorens et al., 1988), *Xenopus* oocytes (Gould and Lienhard, 1989; Keller et al., 1989), mammalian cells (Asano et al., 1989; Gould et al., 1989; Harrison et al., 1990), transgenic mice (Liu et al., 1992) 등을 이용한 이성질적 발현 노력들이 있었다. 그러나 막 단백질들이 갖는 특성으로 인해 단지, 소량의 기능성 있는 단백질 발현만을 보여주었을 뿐이다.

최근 이러한 어려움을 극복하기 위한 노력의 일환으로 baculovirus와 곤충세포를 이용한 GLUT1 단백질 발현 노력이 있었으며, 결과는 매우 고무적이었다 (Yi et al., 1992; Cope et al., 1994, Lee, 2002). 그러나 곤충세포에 발현된 GLUT1 단백질이 포도당을 수송할 수 있다는 직접적인 증거는 이성질적 발현을 허용한 숙주세포에 내재하는 당수송체의 왕성한 활동으로 인하여 보여주지 못했다. Baculovirus의 복제와 단백질 합성을 허용하는 Sf21 세포는 주 탄소 원소로 0.1% D-glucose가 함유된 배지에서 잘 자라며 (Summers and Smith, 1987), 이는 Sf21 세포에 포도당 수송체가 존재하고 있다는 사실을 암시하고 있다. 그러나 포유동물의 당수송체와는 달리 Sf21 세포 당 수송체 특성에 관해서는 아직까지 별로 알려진 바가 없다 (Lee, 2005). 따라서 포유동물 당수송체의 곤충세포에서의 발현이 효율적이기 위해서는 반드시 Sf21 세포에 내재하는 당수송체의 생물학적 특성에 관한 보다 많은 연구가 선행되어야 한다. 사람 적혈구형 포도당 수송체의 단순 당을 포함한 넓은 기질에 관한 특이성은 이미 잘 알려져 있다 (LeFevre, 1961). 그러나 Sf21 세포 당수송체의 기질과 억제제의 특이성에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 mannose, glucose, galactose 등의 육탄당들을 이용하여 Sf21 세포의 2-deoxy-D-glucose transport 억제 능력을 측정함으로써 Sf21 세포 당수송체가 이들 육탄당에 대해 가지는 affinity를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 곤충 세포의 배양

Sf21 세포는 27~28°C에서 CO<sub>2</sub> 없이 배양하였다. 배양은 Summers와 Smith (1987)의 방법을 변형하여 TC-100 medium

(Gibco)에 10% FCS, 1% of antibiotics (penicillin 5,000 units/ml + streptomycin 5,000 µg/ml, Gibco-BRL)를 첨가한 완전 배지를 사용하였다. 곤충세포의 생존 능력은 0.1 ml trypan blue (0.4% stock, pH 3.0)를 1 ml 세포에 첨가하여 현미경 아래서 관찰하여 이용하였다.

### 2. Sf21 세포의 plasma membrane 준비

위와 같은 방법으로 배양된 Sf21 세포는 배양 4~5일 후 수거하여 세 번 10 mM-sodium phosphate/150 mM-NaCl, pH 7.2가 함유된 세척액으로 씻었다. 그 후 protease inhibitors (2 mM-iodoacetamide, 0.2 mM-phenylmethanesulphonyl fluoride, pepstatin A (10 g/ml)들을 함유하는 부양액 (10 mM-Tris/5 mM-MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4)으로 0°C에서, 1분간 sonication하여 117,000 g<sub>av</sub>로 1시간 동안 원심 분리하여 soluble fraction으로부터 membrane fraction을 분리하였다.

### 3. Hexose transport assay

Hexose transport assay는 전에 보고한 바와 같이 실행하였다 (Lee, 2005). 간략히 설명하면 1 ml 세포 현탁액 (1×10<sup>6</sup> cells/ml PBS)을 6,000 × g에서 15초 동안 원심 분리하여 150 µl의 PBS 용액에 다시 현탁시킨 후 28°C에서 2분간 배양하였다. Transport에 사용된 tritiated sugars들은 2-(1,2-<sup>3</sup>H)-deoxy-D-glucose (30.2 Ci/mmol, 2dGlc)와 L-[1-<sup>3</sup>H(N)]-glucose (10.7 Ci/mmol, NEN)였다. Sf21 세포의 2dGlc uptake 측정을 위해서는 측정 전 두 번 phosphate-buffered saline (PBS, 10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4)으로 곤충세포를 씻어 배양액 속에 잔류된 포도당을 제거하였고 필요할 때까지 얼음에 보관하였다가 사용하였다. Transport는 최종 당 농도 1 mM 주기 위해 1 µCi tritiated sugar를 함유하는 2.5 mM 2dGlc 100 µl를 첨가하면서 시작되었다. 28°C에서 1분간 배양 후 강력한 glucose transport 저해제인 10 µM cytochalasin B와 0.1 mM phloretin을 함유한 얼음에 차게 한 1 ml PBS를 첨가하고 2,000 × g에서 20초간 원심 분리하여 transport assay를 끝마쳤다. 세포들은 위와 같은 방법으로 두 번 더 세척하여 150 µl의 용해된 세포를 Microman pipette을 이용하여 4 ml의 scintillant 용액이 담긴 용기에 넣고 liquid scintillation counter (Bookman LS 5,000 CE)를 이용하여 방사능을 측정하였다. 모든 결과들은 세 번 측정치의 (평균보다 10% 이하의 차이) 평균값으로 표시하였다.

### 4. Cytochalasin B binding assay

Sf21 세포에 내재하는 glucose transporter를 위한 functional assay로서 cytochalasin B binding을 측정하였다. Zoccoli 등의 방법에 따라 (1978) 평형투석법 (equilibrium dialysis)으로 농

도 40 nM의 [ $^3\text{H}$ ] cytochalasin B를 사용하여 측정하였다.

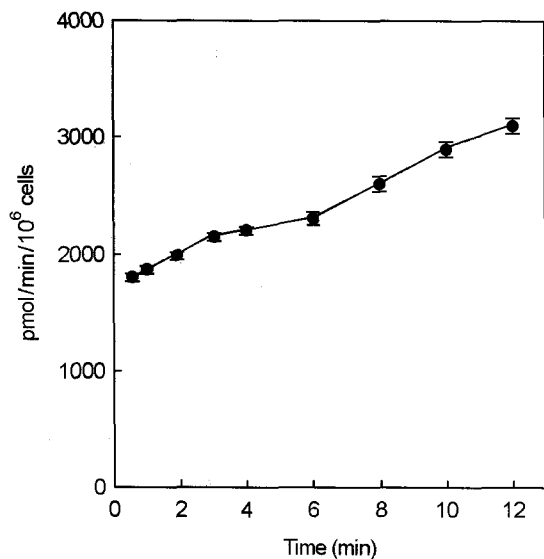
## 결 과

### 1. 2-deoxy-D-glucose uptake에 대한 time course

Transport assay를 Sf21 세포의 2dGlc 섭취가 일직선 (linear) 상에 있는 기간 동안에 진행하기 위해서 10 mM extracellular 농도에서 2dGlc의 섭취를 30초에서 30분에 걸친 기간 동안 측정하였다 (Fig. 1). Fig. 1에서 볼 수 있듯이 10 mM의 높은 농도에서 적어도 2분 동안은 당 섭취가 linear 하였다. 따라서 1분간에 걸친 당 섭취 측정 (uptake measurement)은 세포의 육탄당 초기 섭취율을 반영하는 것임을 입증하였다.

### 2. 육탄당을 이용한 Sf21 세포에서의 2dGlc transport 억제

Sf21 세포에 내재하는 수송체의 기질과 억제제 (inhibitor) 인식 특성을 알아보기 위해서 만노스 (mannose), 포도당 (glucose), 젓당 (galactose)과 같은 육탄당의 inhibition constants ( $K_i$ )를 측정함으로써 2dGlc transport를 억제하는 능력을 조사하였다. Transport assay는 재료 및 방법에서 언급한 대로 실행하였다. 수송은 Sf21 세포에 방사능 표지된 기질 (radiolabeled substrate)을 함유하는 100  $\mu\text{l}$  PBS 용액과 적절한 농도의 억제제를 더함으로써 시작하였다. 1분 후 수송은 중



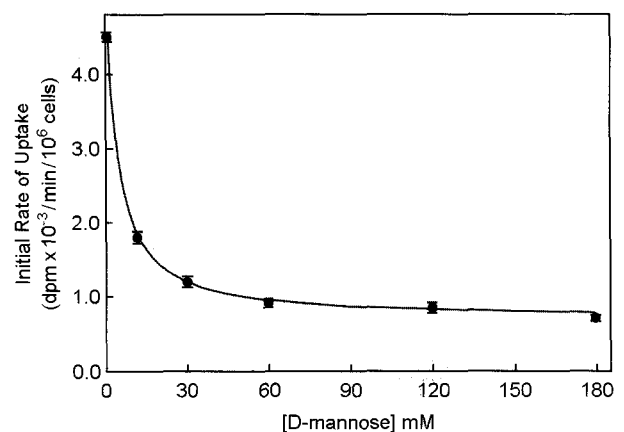
**Fig. 1.** Time course of 2-deoxy-D-glucose uptake by Sf21 cells from a high extracellular concentration of sugar. Transport was carried out in the presence of 10 mM 2dGlc, as described in the Materials and methods. After the times indicated, uptake was terminated and the radioactivity accumulated was determined by scintillation counting. Each data point on the graph represents the mean of triplicate estimations. The data was corrected for the zero time uptake and converted into pmol/min/ $10^6$  cells.

지되었고 이어서 방사능을 측정하였다. 2dGlc uptake에 대한 경쟁적인 억제제의 효과는 다음 방정식에 의해 설명되어질 수 있다:

$$V_I = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m \cdot (1 + I/K_i) + S} + M \cdot S \quad (1)$$

$V_I$  = inhibitor 존재 하에서 uptake 속도,  $V_{\max}$  (the maximum velocity),  $S$  = 기질 농도,  $M$  = uptake process의 non-saturable component를 설명하는 상수,  $K_m$  (the half-saturation concentration),  $I$  = inhibitor 농도,  $K_i$  = inhibition 상수이며 transport에 대한  $K_m$ 과  $V_{\max}$ 는 non-linear regression program을 사용하여 평가하였다.

가역적 억제제 (reversible inhibitors)들의  $K_i$ 는 흡수에 대한 억제제 농도의 plots에서 결정되었으며 Fig. 2~5는 각 억제제에 대한 데이터의 점들을 연결하는 방정식 (1)에 대한 최적의 그래프들이다. 이러한 접근 방법으로 시험된 육탄당 중에서는 D-mannose가  $K_i$ 가  $1.22 \pm 0.21$  mM 로 Sf21 당수송체에 대해 가장 높은 apparent affinity를 나타내었다 (Fig. 2). 또한 Sf21 당수송체의 D-glucose에 대한 apparent affinity ( $K_i = 1.43 \pm 0.25$  mM)는 C-2 epimer의 apparent affinity와 비슷하였다 (Fig. 3). 이는 사람 적혈구형 포도당 수송 체계에서는 D-mannose에 대한  $K_d$ 가 D-glucose에 대한  $K_d$  보다 다소 큰 것과는 달리 곤충세포 당수송체에 대한 C-2 epimer인 mannose의 apparent affinity는 D-glucose에 대한 apparent affinity

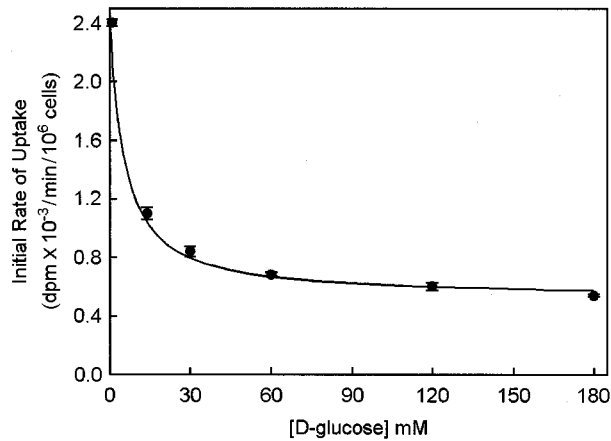


**Fig. 2.** Effect of D-mannose on 2-deoxy-D-glucose transport. Transport assay was carried out essentially as described in Materials and Methods. Transport was initiated by the addition of 100  $\mu\text{l}$  of PBS buffer containing [ $^3\text{H}$ ] 2dGlc and an appropriate concentration of D-mannose. After 1 min, the transport was terminated by addition of ice-cold stop solution. Cells were then solubilized and radioactivity was determined as described in Materials and Methods. The data were analyzed with the help of a non-linear regression program. The curve represents the best-fit of the data to equation 1. Each data point represents the mean of triplicates.

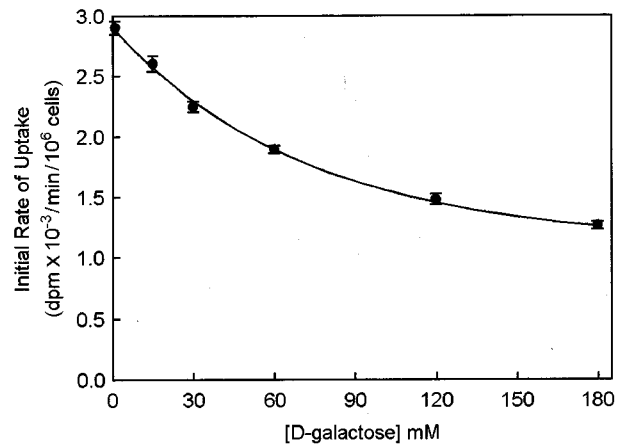
( $K_i = 1.43 \pm 0.25$  mM)와 비슷하였다 (Fig. 3). 그러나 Sf21 당수송체의 D-galactose에 대한 apparent affinity ( $K_i = 23.7 \pm 5.2$  mM)는 급격한 감소를 초래하였다 (Fig. 4). 반면에 L-glucose는 Sf21에 내재하는 당수송체의 2dGlc transport에 대해서 가장 적은 영향을 ( $K_i = 49.5 \pm 0.27$  mM) 나타내었다 (Fig. 5).

### 3. Cytochalasin B binding to Sf21 cell membranes

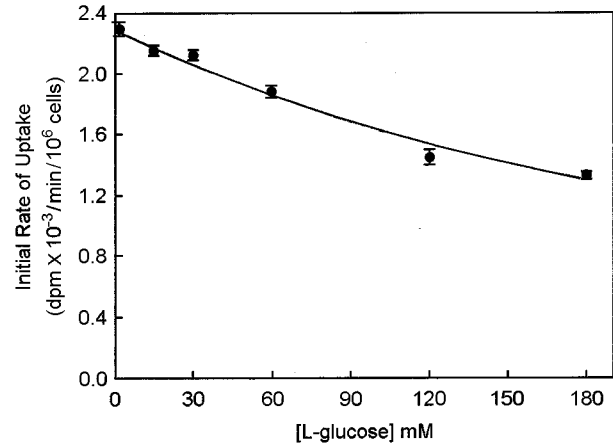
Cytochalasin B는 사람 적혈구형 당수송체에  $K_d$  약 0.12  $\mu$ M로 결합하는 강력한 억제제이다 (Baldwin et al., 1982). Bound cytochalasin B에 대한 Free cytochalasin B의 비율 (B/F)은 생물학적 활성이 있는 당수송체 농도 측정에 좋은 척도가 될 수 있다 (Gorga and Lienhard, 1981; Baldwin et al., 1982). 따라서 Zoccoli 등 (1978)의 평형투석 방법 (equilibrium dialysis)을 이용하여 농도 40 nM의 [ $^3$ H] cytochalasin B를 사용하여 3번씩 측정하였다. Table 1에 요약된 바와 같이 Sf21 세포에 대한 cytochalasin B 결합 활성은 1 mg/ml 시료 당 0.001이었으나 GLUT1을 발현한 대조군에서는 1.028로 나타났다.



**Fig. 3.** Effect of D-glucose on 2-deoxy-D-glucose transport. Transport assay was carried out essentially as described in Materials and Methods. The ability of D-glucose to inhibit the uptake of 2dGlc was determined as described in the legend to Fig. 2. The curve represents the best fit of the data to equation 1. Each data point is the mean of triplicate estimations.



**Fig. 4.** Effect of D-galactose on the initial rate of 2-deoxy-D-glucose uptake. Transport assay was carried out essentially as described in Materials and Methods. The ability of D-galactose to inhibit the uptake of 2dGlc was determined as described in the legend to Fig. 2. The curve represents the best fit of the data to equation 1. Each data point is the mean of triplicate estimation.



**Fig. 5.** Effect of L-glucose on 2-deoxy-D-glucose transport. Transport assay was carried out essentially as described in Materials and Methods. The ability of L-glucose to inhibit the uptake of 2dGlc was determined as described in the legend to Fig. 2. The curve represents the best fit of the data to equation 1. Each data point is the mean of triplicate estimations.

**Table 1.** Cytochalasin B binding to Sf21 cell membranes

Sample (1 mg/ml)	Cytochalasin B (B/F)		
	(-) D-glucose	(+) D-glucose	*Specific B/F
Sf21 cell membranes	0.052	0.051	0.001
Sf21 cell membranes with recombinant virus $\Delta$	1.188	0.160	1.028

Membranes of Sf21 cells were prepared as described in the Materials and Methods. The assay for cytochalasin B binding activity of membrane samples was performed by equilibrium dialysis using 40 nM- [ $^3$ H]cytochalasin B, in the absence (-) or presence (+) of 400 mM D-glucose, as described in Zoccoli et al., (1978). Cytochalasin B binding activity (\*) was calculated as described previously (Gorga and Lienhard, 1981). B/F = [bound cytochalasin B] / [free cytochalasin B].  $\Delta$ : Preparation from the Sf21 cells infected with the recombinant baculovirus containing GLUT1 gene (AcNPV-GT).

## 고 찰

Sf21 세포는 baculovirus의 단백질 합성과 증식을 허용하는 숙주세포로서 주 탄소 원으로 0.1% D-glucose가 함유된 TC-100과 같은 배양액에서 잘 자랄 수 있다 (Summers and Smith, 1987). 이는 Sf 세포에도 당의 세포내 영입을 주도하는 sugar transport system이 내재하고 있다는 사실을 암시하고 있다. 그러나 지금까지도 사람의 당수송체와는 달리 Sf21과 같은 곤충세포의 당수송체 특성에 관해서는 알려진 바가 별로 없다. 따라서 GLUT의 단백질 결정화와 같은 생물리화학적 방법을 이용한 구조적 연구나 유전공학적 방법을 이용한 당수송체의 구조와 기능의 상관관계에 관한 연구 등을 위한 다량의 이성질적 GLUT 단백질 발현 가능성을 보여준 (Yi et al., 1992; Cope et al., 1994, Lee, 2002) baculovirus와 Sf 세포 발현체계의 성공적 구축을 위해서 Sf21 당수송체 특성에 관한 연구는 매우 중요하다.

사람 적혈구형 포도당 수송체는 단순 당을 포함하는 넓은 기질 특이성을 가지고 있으며, apparent affinity가 가장 큰 당은 2-deoxy-D-glucose (2dGlc), D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-xylose, L-glucose 등의 순이다 (LeFevre, 1961). 그러나 Sf21 세포의 당수송체의 기질과 억제제의 특이성에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 따라서 Sf21 세포의 당수송체가 여러 육탄당에 대해 가지는 affinity를 Sf21 세포의 2dGlc transport를 억제하는 육탄당의 능력을 측정함으로써 조사하였다. 같은 기질, 즉 2dGlc가 모든 실험에 사용되었기 때문에 각 당에 대한 apparent  $K_m$ 는 각 당의 상대적인 affinity의 척도를 제공할 수 있었다. Sf21 세포의 2dGlc transport는 적어도 2분간은 시간에 따라 linear 하였고 D-mannose, D-glucose에 의해서 저지되었다. Sf 수송체의 D-glucose에 대한 apparent affinity는 D-glucose의 C-2 epimer인 D-mannose의 apparent affinity 보다 다소 작았다. 이는 D-glucose의 apparent affinity가 D-mannose 보다 큰 사람 적혈구형 포도당 수송 체계 (LeFevre, 1961)와는 차이점을 나타내었다. 또한 Sf21 당수송체가 D-glucose 보다 2-deoxy-D-glucose에 훨씬 강하게 결합하는 사실과 함께 기질의 C-2 위치에 있는 hydroxyl group이 Sf21 수송체의 강력한 결합에는 크게 중요하지 않음을 암시하고 있다. 그러나 D-galactose, 즉 D-glucose의 C-4 위치에서의 epimerization 결과물인 D-galactose에 대한 Sf21 수송체의 apparent affinity는 급격히 감소하였다. 이는 glucose와 mannose의 C-4 위치에 있는 hydroxyl group이 C-2 위치에서와는 달리 Sf21 수송체의 강력한 결합에 중요한 역할을 하고 있음을 암시하고 있다. 아울러 L-glucose는 D-glucose와는 달리 Sf21 세포의 2dGlc transport에 큰 영향을 주지 못하였다. 따라서 Sf21 수송체의 당 수송

도 사람 적혈구형 당수송체처럼 (LeFevre, 1961) 당의 D-stereoisomer에 대해 특히 강한 특이성을 나타내고 있다.

결론적으로 Sf21 당수송체의 기질 인식 특성 중 몇 가지는 사람 HepG2형 당수송체의 그것과 유사점을 보여주고 있으며 또한 이러한 활동이 Sf21 세포에 발현시킬 포유동물 당수송체의 kinetic 특성을 측정하는 데에 방해가 될 수도 있다. 그러나 발현된 단백질을 정제하여 lipid vesicle에 재구성한다면 발현된 포유동물 당수송체의 Kinetic 특성 측정에는 별 어려움이 없을 것이며 사람 HepG2형 포도당 수송체의 강력한 억제제인 cytochalasin B에 대한 Sf21 당수송체의 매우 낮은 친화성은 발현된 당수송체의 생물학적 활성을 확인하는 데에 유용한 marker로 사용될 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구의 수행에 도움이 된 영국 NERC의 연구지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Asano T, Shibasaki Y, Ohno S, Taira H, Lin JL, Kasuga M, Kanazawa Y, Akanuma Y, Takaku F, Oka Y. Rabbit brain glucose transporter responds to insulin when expressed in insulin-sensitive Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1989. 264: 3416-3420.
- Baldwin SA. Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1993. 1154: 17-49.
- Baldwin SA, Baldwin JM, Lienhard GE. Monosaccharide transporter of the human erythrocyte: Characterization of an improved preparation. *Biochemistry* 1982. 21: 3836-3842.
- Baldwin SA, Henderson PJF. Homologies between sugar transporters from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Physiol.* 1989. 51: 459-471.
- Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem.* 1993. 268: 19161-19164.
- Cope DL, Holman GD, Baldwin SA, Wolstenholme AJ. Domain assembly of the GLUT1 glucose transporter. *Biochem J.* 1994. 300: 291-294.
- Gorga FR, Lienhard GE. Equilibria and kinetics of ligand binding to the human erythrocyte glucose transporter. Evidence for an alternating conformation model for transport. *Biochemistry* 1981. 20: 5108-5113.
- Gould GW, Derechin V, James DE, Tordjiman K, Ahern S, Gibbs EM, Lienhard GE, Mueckler M. Insulin-stimulated translo-

- cation of the HepG2/erythrocyte-type glucose transporter expressed in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 1989. 264: 2180-2184.
- Gould GW, Lienhard GE. Expression of a functional glucose transporter in *Xenopus* oocytes. *Biochemistry* 1989. 28: 9447-9452.
- Harrison SA, Buxton JM, Clancy BM, Czech MP. Insulin regulation of hexose transport in mouse 3T3-L1 cells expressing the human HepG2 glucose transporter. *J Biol Chem.* 1990. 265: 20106-20116.
- James DE, Strobe M, Mueckler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 1989. 338: 83-87.
- Jarvis SM, Young JD. Extraction and partial purification of the nucleoside-transport system from human erythrocytes based on the assay of nitrobenzylthioinosine-binding activity. *Biochem J.* 1981. 194: 331-339.
- Keller K, Strube M, Mueckler M. Functional expression of the human HepG2 and rat adipocyte glucose transporters in *xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 1989. 32: 18884-18889.
- Lee CK. Photoaffinity labelling of the human erythrocyte glucose transporters expressed in *Spodoptera frugiperda* clone 9 cells. *J Biomed Lab Sci.* 2002. 8: 211-215.
- Lee CK. Hexose Uptake and Kinetic Properties of the Endogenous Sugar Transporter(s) in *Spodoptera frugiperda* Clone 21-AE Cells. *J Exp Biomed Sci.* 2005. 11: 327-332.
- LeFevre PG. Sugar transport in the red blood cell: structure-activity relationships in substrates and antagonists. *Pharmacol Rev.* 1961. 13: 39-70.
- Liu ML, Olson AL, Moye-Rowley WS, Buse JB, Bell GI, Pessin JE. Expression and regulation of the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter gene in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1992. 267: 11673-11676.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 1985. 229: 941-945.
- Sarker HK, Thorens B, Lodish HF, Kaback HR. Expression of the human erythrocyte glucose transporter in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988. 85: 5463-5467.
- Seatter MJ, Gould GW. The mammalian facilitative glucose transporter (GLUT) family. *Pharm Biotechnol.* 1999. 12: 201-228.
- Stein WD. Transport and diffusion across cell membranes. *New York Academy* 1986. pp. 231-305.
- Summers MD, Smith GE. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Tex Agric Exp Stn Bull.* 1987. No. 1555.
- Thorens B, Sarker HK, Kaback HR, Lodish HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and  $\beta$ -pancreatic islet cells. *Cell* 1988. 55: 281-290.
- Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 1997. 21: 2-21.
- Wheeler TJ, Hinkle PC. The glucose transporter of mammalian cells. *Annu Rev Physiol.* 1985. 47: 503-517.
- Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): Expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr.* 2003 89: 3-9.
- Yi CK, Charalambous BM, Emery VC, Baldwin SA. Characterization of functional human erythrocyte-type glucose transporter expressed in insect cells using a recombinant baculovirus. *Biochem J.* 1992. 283: 643-646.
- Zoccoli MA, Baldwin SA, Lienhard GE. The monosaccharide transport system of the human erythrocyte. Solubilization and characterization on the basis of cytochalasin B binding. *J Biol Chem.* 1978. 253: 6923-6930.