

**Untersuchungen zur Sekundärstruktur des humanen  
Glucosetransporters GLUT1 durch Cystein-Scanning-Mutagenese in  
Verbindung mit der funktionellen Testung unter Einsatz von  
Sulphydrylreagenzien**

**Inauguraldissertation**  
zur Erlangung der naturwissenschaftlichen Doktorwürde  
des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Dipl.-Biol. Andreas Olsowski**  
aus Wolfsburg (Niedersachsen)

2002

**Gutachter:**                    **Prof. Dr. Konrad Keller**  
**Prof. Dr. Kai Graszynski**

**Tag der Disputation:**   **11.02.2003**

**Diese Arbeit wurde gefördert durch die DFG (Förderungsnummer 390/6-1).**



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	V
<b>Abkürzungen der DNS- und RNS-Bausteine</b> .....	VII
<b>Einbuchstabenkode der Aminosäuren</b> .....	VII
<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Die Bedeutung und der Transport von Glucose .....	1
1.1.1 Der aktive Glucosetransport bei Pro- und Eukaryonten .....	1
1.1.2 Der passive Glucosetransport bei den Mammalia .....	2
1.2 Die passiven Glucosetransporter des Menschen.....	2
1.2.1 Der Glucosetransporter GLUT1 .....	3
1.2.2 Der Glucosetransporter GLUT2 .....	4
1.2.3 Der Glucosetransporter GLUT3 .....	5
1.2.4 Der Glucosetransporter GLUT4 .....	5
1.2.5 Der Glucosetransporter GLUT5 .....	6
1.2.6 Der Glucosetransporter GLUT6 - ein Pseudogen.....	7
1.2.7 Der Glucosetransporter GLUTX1 (GLUT8) .....	7
1.2.8 Der Glucosetransporter GLUT9 .....	7
1.2.9 Der Glucosetransporter GLUT10 .....	8
1.2.10 Der Glucosetransporter GLUT11 .....	8
1.3 Die evolutionäre Beziehung der passiven Glucosetransporter zu anderen Transportproteinen.....	8
1.4 Strukturelle Daten und die Topologie des GLUT1.....	10
1.4.1 N- und C-Terminus, große zytoplasmatische Schleife und Glykosylierungs- sequenz des GLUT1 .....	11
1.4.2 Weitere wichtige Untersuchungen zur Lokalisation der Substratbindungsstelle des GLUT1 .....	11
1.4.3 Extrazelluläre Bereiche des GLUT1 .....	13
1.4.4 Die nativen Cysteinreste im GLUT1 .....	13
1.4.5 Alternative Modelle zur Sekundärstruktur des GLUT1 .....	14
1.4.6 Die Tertiär- bzw. Quartärstruktur des GLUT1 .....	15
1.5 Die Cystein-Scanning-Mutagenese.....	17
<b>2 Aufgabenstellung</b> .....	19
<b>3 Material, Methoden und Statistik</b> .....	21
3.1 Material .....	21
3.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Substanzen und Kleinmaterialien .....	21
3.1.1.1 Chemikalien.....	21
3.1.1.2 Radioaktive Substanzen.....	22
3.1.1.3 Reagenziensysteme.....	22
3.1.1.4 Restriktions- und andere Enzyme .....	23
3.1.1.5 Nukleotide .....	23
3.1.1.6 Antikörper.....	23
3.1.1.7 Sonstiges.....	23
3.1.2 Medien und Lösungen .....	24

3.1.2.1	Wachstumsmedien und Pufferlösungen für Bakterien.....	24
3.1.2.2	Pufferlösungen für Restriktionsendonukleasen .....	24
3.1.2.3	Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.....	24
3.1.2.4	Pufferlösungen für die Oozytenbehandlung.....	25
3.1.3	Geräte .....	25
3.1.4	Computer und Software .....	26
3.2	Methoden .....	26
3.2.1	Molekularbiologischer Teil.....	26
3.2.1.1	Das pSP64T-GLUT1 Plasmid.....	26
3.2.1.2	Bakterienstämme.....	27
3.2.1.3	Kompetente Bakterienzellen für die Hitzeschock-Transformation.....	28
3.2.1.4	Vermehrung, Gewinnung und Reinigung von Plasmid-DNS .....	28
3.2.1.4.1	Kultivierung der Bakterienzellen .....	28
3.2.1.4.2	Präparation von Plasmid-DNS.....	29
3.2.1.4.2.1	Kleine Plasmidpräparation - Plasmid-Minipräparation .....	29
3.2.1.4.2.1.1	Kleine Plasmidpräparation nach Promega .....	29
3.2.1.4.2.1.2	Kleine Plasmidpräparation nach Qiagen.....	30
3.2.1.4.2.2	Große Plasmidpräparation - Plasmid-Maxipräparation .....	30
3.2.1.4.3	Reinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen .....	31
3.2.1.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNS und RNS.....	31
3.2.1.6	Restriktionsfragmentanalyse, präparative DNS-Schnitte und Ligation .....	32
3.2.1.6.1	Restriktionsfragmentanalyse und präparative DNS-Schnitte.....	32
3.2.1.6.2	Agarosegelelektrophoresen.....	32
3.2.1.6.2.1	Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese .....	33
3.2.1.6.2.2	Denaturierende Agarosegelelektrophorese .....	33
3.2.1.6.3	Ligation .....	34
3.2.1.7	Gerichtete Mutagenese (Site-directed mutagenesis) mit synthetisch hergestellten Oligonukleotiden.....	34
3.2.1.7.1	Die Oligonukleotide.....	35
3.2.1.7.2	Phosphorylierung der Oligonukleotide .....	35
3.2.1.7.3	Mutagenese .....	36
3.2.1.7.4	Verifizierung der Mutationen durch Sequenzierung der Plasmid-DNS .....	37
3.2.1.7.4.1	Sequenzierungsreaktion .....	37
3.2.1.7.4.2	Sequenzierungsgel und -lauf.....	38
3.2.1.8	Transformation von DNS in Bakterien durch Hitzeschock .....	38
3.2.1.9	RNS-Synthese .....	39
3.2.1.9.1	Herstellung und Reinigung des Templates .....	40
3.2.1.9.2	In vitro Transkription und Reinigung der Transkriptionsprodukte.....	40
3.2.1.9.3	Bestimmung der RNS-Konzentration durch <sup>35</sup> S markiertes UTP.....	41
3.2.2	Biologische und biochemische Methoden .....	41
3.2.2.1	Haltung des südafrikanischen Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i> .....	41
3.2.2.2	Die Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> als Expressionssystem .....	42
3.2.2.2.1	Gewinnung und Defollikulation der Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....	43
3.2.2.2.2	Mikroinjektion und Kultivierung der Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....	44
3.2.2.3	Funktionelle Charakterisierung der Transportermutanten .....	44
3.2.2.3.1	“Zero-trans“-Influx-Messungen mit 2-Desoxy-D-Glucose in Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....	45
3.2.2.3.2	“Zero-trans“ Influx-Messungen mit 3-O-Methyl-D-Glucose in Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....	46

3.2.2.3.3	Influx-Messungen unter „equilibrium exchange“ Bedingungen mit 3-O-Methyl-D-Glucose in Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....	46
3.2.2.4	Immunfluoreszenz des GLUT1 in der konvokalen Laserlicht-Mikroskopie....	47
3.3	Statistik .....	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>51</b>
4.1	Molekularbiologischer Teil - Verifizierung der Mutanten und in vitro- Transkription .....	51
4.1.1	Vorstellung und Verifizierung der Mutanten .....	51
4.1.2	Beurteilung und Größenbestimmung der synthetisierten RNS.....	56
4.2	Funktioneller Teil - Transportaktivitäten und Expression der Mutanten in Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....	57
4.2.1	Mathematische Definition der basalen Transportaktivität bzw. der Transport- aktivität unter Einfluss von Sulfhydrylreagenzien und die zelluläre Verteilung ausgewählter Mutanten in Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....	57
4.2.2	Lokalisierung extrazellulär exponierter Serinreste im cysteinfreien GLUT1 nach Mutation zu Cystein .....	59
4.2.2.1	Basale Transportaktivität der Cysteinmutanten.....	59
4.2.2.2	Transportaktivität der Cysteinmutanten unter Einfluss von Sulfhydryl- reagenzien.....	60
4.2.3	Cystein-Scanning-Mutagenese im cysteinfreien GLUT1 .....	62
4.2.3.1	Die erste Region - Aminosäuren aus der ersten extrazellulären Schleife und des gesamten putativen zweiten Transmembransegments .....	62
4.2.3.1.1	Basale Aktivitäten der Cysteinmutanten .....	62
4.2.3.1.2	Expression und intrazelluläre Verteilung der mutierten Transportproteine ..	64
4.2.3.1.3	Extrazelluläre Applikation von pCMBS und NEM.....	65
4.2.3.2	Die zweite Region - Aminosäuren des gesamten putativen siebenten Transmembransegments und der vierten extrazellulären Schleife .....	67
4.2.3.2.1	Basale Aktivität der Cysteinmutanten .....	68
4.2.3.2.2	Expression und intrazelluläre Verteilung der mutierten Transportproteine ..	69
4.2.3.2.3	Extrazelluläre Applikation von pCMBS und NEM.....	70
4.2.3.3	Zusammenstellung der basalen Transportaktivitäten bei den Mutanten in der ersten und zweiten Region und der Transportaktivitäten unter dem Einfluss extrazellulär applizierter Sulfhydrylreagenzien.....	73
4.2.4	Untersuchungen zur Zugänglichkeit der Transmembransegmente von der zyto- plasmatischen Seite und zum Nachweis potentieller Substratbindungsstellen ...	77
4.2.4.1	Intrazelluläre Applikation von pCMBS bei ausgewählten Cysteinmutanten aus der ersten und zweiten Region .....	77
4.2.4.2	Protektion von der durch pCMBS bedingten Transporthemmung mittels 3-O- Methylglucose bei ausgewählten Cysteinmutanten aus der ersten und zweiten untersuchten Region .....	78
4.3	Struktureller Teil - Beitrag der Cystein-Scanning-Mutagenese zur Struktur- aufklärung des GLUT1 .....	82
4.3.1	Strukturvorhersagen für das Transmembransegment 2 .....	82
4.3.2	Strukturvorhersagen für das Transmembransegment 7 .....	84
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>87</b>
5.1	Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> als Expressionssystem.....	87

5.2	Methodische Probleme der Mutagenese und der Expression der entstandenen Mutanten .....	88
5.3	Der cysteinfreie GLUT1.....	89
5.3.1	Allgemeine Bedeutung von Cysteinresten in Proteinen.....	89
5.3.2	Die Rolle der Cysteinreste im humanen Glucosetransporter GLUT1.....	90
5.4	Cystein-Scanning-Mutagenese und der Einsatz von Sulphydrylreagenzien.....	92
5.4.1	Die Cystein-Scanning-Mutagenese in der Strukturanalyse.....	92
5.4.2	Die Sulphydrylreagenzien pCMBS und NEM.....	93
5.4.3	Die basalen Transportaktivitäten der Cysteinmutanten aus der ersten (Aminosäurepositionen 61-87) und zweiten (Aminosäurepositionen 272-299) untersuchten Region.....	94
5.4.4	Der Einfluss von pCMBS und NEM auf die Cysteinmutanten nach extrazellulärer Applikation bei Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....	98
5.4.4.1	Der putative Membranübergang zwischen extrazellulärer Schleife 1 und Transmembransegment 2 in der ersten untersuchten Region .....	98
5.4.4.2	Der Bereich der Aminosäuren in Position 67-87, das putative Transmembransegment 2 .....	99
5.4.4.3	Der putative Membranübergang zwischen Transmembransegment 7 und extrazellulärer Schleife 4 in der zweiten untersuchten Region.....	100
5.4.4.4	Der Bereich der Aminosäuren in Position 272-292, das putative Transmembransegment 7 .....	101
5.4.5	Untersuchungen zum Nachweis der inneren und äußeren Substratbindungsstelle des GLUT1 .....	103
5.4.5.1	Der Einfluss von pCMBS an der endofazialen Plasmamembranseite bei Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....	103
5.4.5.2	Protektionsversuche: Hexosen in Konkurrenz zu pCMBS an der äußeren Substratbindungsstelle .....	104
5.4.6	Die Vorstellung einer Helixanordnung des GLUT1 im Licht der experimentellen Ergebnisse .....	105
5.5	Die verschiedenen Topologiemodelle des GLUT1 .....	106
5.5.1	Die Ergebnisse der ersten untersuchten Region (Aminosäurepositionen 61-87) vor dem Hintergrund der verschiedenen Sekundärstrukturmodelle .....	109
5.5.2	Die Ergebnisse der zweiten untersuchten Region (Aminosäurepositionen 272-299) vor dem Hintergrund der verschiedenen Sekundärstrukturmodelle ..	110
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung / Summary.....</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>117</b>
	<b>Autorenindex .....</b>	<b>143</b>
	<b>Im Rahmen der Dissertation entstandene Publikationen .....</b>	<b>149</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>151</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>153</b>



**Abkürzungen**

2-DOG	2-Desoxy-D-Glucose
3-OMG	3-O-Methyl-D-Glucose
° C	Grad Celsius
μCi	Microcurie
μg	Microgramm
μl	Microliter
μm	Micrometer
ATB-BMPA	2-N-4(1-azi-2,2,2-trifluoroethyl)benzoyl-1,3bis(D-mannos-4-yloxy)- 2-propylamine
ATP	Adenosintriphosphat
BME	2-Mercaptoethanol
bzw.	beziehungsweise
CB	Cytochalasin B
CHO	Chinese hamster ovary
CD	Circular-Dichroismus
ca.	circa
cDNS	kodierende Desoxyribonukleinsäure
cpm	counts per minute
cRNS	kodierende Ribonukleinsäure
cys-less	cysteinfrei
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
d. h.	das heisst
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser destilliert
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DNase	Desoxyribonukleinas
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
et al.	et alii (lat., und andere)
ES	extrazelluläre Schleife
g	Gramm
g <sub>av</sub>	mittlere Erdbeschleunigung
GLUT	Glucosetransporter
GLUT1-k	passiver GLUT1 basierend auf der gekürzten DNS des Wildtyps
GSVs	GLUT4 storage vesicles
GTPS	Glucosetransporterprotein-Typ1-Defizienz-Syndrom
h	Stunde
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin)
HFE	nicht klassifiziertes wichtiges Haupthistokompatibilitätskomplex I-assoziiertes Protein
kB	Kilobasen (= 1000 Basen)
LAC12	Gen in <i>Kluyveromyces lactis</i> , kodiert für eine Laktose-Permease

LB	Luria-Bertini-Medium
M	molar
MAL6T	Gen in <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> , kodiert für eine Maltose-permease
Maxipräp	große Plasmidpräparation
min	Minute
Minipräp	kleine Plasmidpräparation
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
n. d.	nicht detektierbar
NEM	N-Ethylmaleimid
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PDB	Proteinstruktur Datenbank
pCMBS	p-Chloromercuribenzolsulphonat
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	negativ decadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Pikomol
RNase	Ribonukleinase
RNS	Ribonukleinsäure
RSA	Rinderserumalbumin
SCAM	substituted-cysteine accessibility method
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SGLT1	Sodium-Glucose-Transporter 1
SH-Gruppe	Schwefelwasserstoffgruppe
SNF3	Gen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , kodiert für einen Glucosetransporter
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TetC	Tetracyclintransporter, Typ C in <i>E. coli</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamid
TM	Transmembransegment
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-Acetat	Tris(hydroxymethyl)aminomethanacetat
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
U • min <sup>-1</sup>	Umdrehungen pro Minute
u. a.	unter anderem
UTP	Uraciltriphosphat
Vol	Volumen
vs	versus
v/v	"volume per volume"; entspricht Volumenanteilen der entsprechenden Substanz in 100 ml Flüssigkeit

w/v	"weight per volume"; entspricht den Gewichtsanteilen einer Substanz in 100 ml Lösungsmittel
X. Oozyten	Xenopus Oozyten
z. B.	zum Beispiel

### **Abkürzungen der DNS- und RNS-Bausteine:**

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanosin
T	Thymidin
U	Uracil

### **Einbuchstabenkode der Aminosäuren:**

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

---

## Autorenindex

- Aaij 32, 117  
 Abbott 93, 117, 118  
 Agre 135  
 Akabas 17, 129  
 Akanuma 117, 126, 130, 134  
 Allard 2, 117, 133  
 Alper 120  
 Alvarez 14, 93, 106, 117, 119  
 Ambion-Incorporation 33, 39, 41, 56, 117  
 Ames 1, 117  
 Andersson 126  
 Angulo 121  
 Arant 124  
 Asano 3, 4, 11, 117, 128, 130, 134  
 Ausubel 29, 117  
 Awni 137  
 Axer 123  
 Bagley 4, 118  
 Bahrenberg 123  
 Baker 12, 118, 126  
 Baldwin 4, 5, 6, 9, 12, 14, 15, 87, 105, 117, 118, 119, 121, 122, 125, 126, 130, 132, 133  
 Bambara 131  
 Barros 4, 118  
 Batt 93, 94, 118  
 Baum 125  
 Beaumont 118  
 Becker 137  
 Behmand 122  
 Bell 91, 119, 122, 125, 126, 129, 130, 134, 135  
 Ben Aziz 39, 118  
 Bennett 131  
 Best 129  
 Bhamra 121  
 Birnbaum 3, 5, 7, 118, 129, 134, 138  
 Birnboim 29, 119  
 Bjorkman 124, 131  
 Blench 133  
 Bocianski 122, 123  
 Borst 32, 117  
 Bradbury 122  
 Braiterman 129  
 Brasseur 123  
 Brauers 123  
 Brooker 10, 15, 105, 125  
 Brosius 120  
 Brot-Laroche 119  
 Brown 128, 138  
 Buchel 9, 119  
 Buchs 123, 132  
 Burant 6, 91, 119, 122, 130, 134, 135  
 Burchell 3, 119, 139  
 Buse 122, 125  
 Buxton 121, 134  
 Byers 125, 130  
 Cairns 11, 119, 122, 130  
 Camps 136  
 Carayannopoulos 3, 7, 119  
 Carlson 120  
 Carruthers 6, 12, 15, 90, 119, 120, 121, 127, 134, 141  
 Carter-Su 132  
 Caruso 133  
 Case 125  
 Casey 90, 120, 137  
 Castello 136  
 Celenza 9, 120  
 Chakrabarti 121  
 Chang 10, 120  
 Chapman 117, 119  
 Charron 5, 120, 129  
 Chater 126  
 Chawla 121  
 Chen 120, 129, 133  
 Cheng 138  
 Cheung 124  
 Chi 119  
 Chin 14, 106, 120, 129  
 Chirino 131  
 Chou 107, 120  
 Christy 129  
 Clancy 134  
 Clark 6, 12, 120, 126, 128, 133, 137  
 Cloherty 121, 141  
 Coady 127  
 Coderre 90, 121, 141  
 Cogdell 128  
 Cole 137  
 Colman 25, 121  
 Colville 42, 121  
 Concha 6, 121  
 Conley 35, 121  
 Cook 123  
 Cooney 131  
 Cope 12, 121  
 Cornelius 129  
 Corvera 7, 121  
 Coulson 135  
 Cremer 118  
 Crossman 135  
 Cui 119  
 Cunningham 118  
 Cushman 6, 121, 128  
 Czech 121, 134  
 Czegledy 124  
 Dahl 90, 121  
 D'Amore 45, 46, 58, 59, 121  
 Davidson 6, 119, 122, 135  
 Davies 11, 118, 122, 125, 130  
 Davis 132  
 De la Rue 136  
 De Vivo 4, 122, 131  
 Deng 34, 51, 88, 122  
 Depaoli 135  
 Devaskar 119  
 Deziel 93, 122

Dick 4, 42, 87, 122  
 Dickson 10, 120  
 Ding 120, 125  
 Doege 3, 7, 8, 96, 122, 123, 129  
 Doenecke 130  
 Doly 29, 119  
 Dombrowski 136  
 Donaldson 133  
 Doolittle 10, 15, 131  
 Drewes 4, 125  
 Driessen 138  
 Droppelmann 121  
 Ducarme 14, 106, 107, 111, 123  
 Due 14, 18, 39, 43, 51, 59, 88, 91, 113,  
 115, 123  
 Dumont 42, 43, 123  
 Dunten 92, 123  
 Eckel 123  
 Eddy 125, 130  
 Edwards 125  
 Eilam 11, 90, 123  
 Eisenberg 10, 107, 123  
 Ellis 94, 123  
 Erni 133  
 Ezaki 137  
 Fan 130  
 Fasman 107, 120  
 Feder 131  
 Ferrannini 5, 124  
 Fischbarg 14, 104, 106, 109, 111, 124,  
 138, 141  
 Fletcher 6, 123, 124  
 Flower 128  
 Flynn 141  
 Frey 139  
 Frillingos 9, 18, 90, 91, 92, 105, 124  
 Fritsch 135  
 Froehner 4, 125  
 Fujinaga 137  
 Fukumoto 3, 4, 5, 125, 130  
 Fukushima 125  
 Gaedigk-Nitschko 90, 125  
 Garcia 12, 47, 95, 125  
 Gardiner 130  
 Garner 124  
 Garraffo 135  
 Gassen 139  
 Ge 135  
 Geck 11, 90, 125  
 Geever 9, 125  
 Gerhart 4, 125  
 Geuze 135, 136  
 Gibbs 119, 136  
 Gigengack 136  
 Giles 125  
 Ginns 127  
 Glenn 137  
 Gliemann 4, 6, 134, 140  
 Golde 121, 124, 138  
 Gonzalez 124  
 Goodman 131  
 Goswitz 10, 15, 105, 125  
 Gotze 136  
 Gould 5, 15, 42, 87, 88, 105, 121, 122,  
 126, 130, 136  
 Griffith 9, 126  
 Grobholz 126  
 Gronenborn 119  
 Guggino 135  
 Gurdon 43, 87, 126  
 Habberfield 128  
 Hacker 4, 126  
 Haller 141  
 Hanpeter 135  
 Hansen 141  
 Harik 4, 122, 126  
 Harrison 134  
 Hashiramoto 13, 97, 126, 133, 137  
 Haspel 118  
 Haupts 96, 126  
 Hausman 122  
 Hawkins 9, 127  
 He 92, 127  
 Hebert 90, 127, 134, 141  
 Hediger 87, 127  
 Helgerson 6, 90, 119, 120, 127  
 Henderson 118, 126, 132  
 Hesse 137  
 Hilken 42, 43, 88, 127  
 Hilschmann 137  
 Hinkle 2, 3, 130  
 Hinokio 141  
 Hirano 117, 137  
 Hirosawa 139  
 Hirsch 124  
 Hitchcock 43, 127  
 Holbrook 117  
 Holman 4, 5, 6, 12, 15, 87, 105, 120, 121,  
 122, 126, 127, 128, 133, 137, 141  
 Hoshino 139  
 Howard 17, 128  
 Hresko 13, 94, 107, 128, 132  
 Hruz 15, 58, 87, 97, 102, 103, 104, 105,  
 112, 114, 115, 116, 128  
 Hubbard 124  
 Huiet 125  
 Hussain 135  
 Ibberson 3, 7, 8, 128  
 Ifkovits 122  
 Iglauer 127  
 Ikeda 127  
 Imura 125, 141  
 Inagaki 141  
 Inukai 117  
 Iserovich 124, 141  
 Ishihara 12, 117, 128, 130  
 Iwasaki-Ohba 141  
 Jacobson 122  
 Jahnig 107, 128  
 James 5, 6, 128, 129, 131, 135, 136  
 Jarvis 118  
 Jen0 133

- Jess 126  
Jhun 6, 129  
Joly 121  
Joost 3, 122, 123, 129  
Jung 78, 93, 105, 120, 122, 129, 135, 141  
Kaback 9, 78, 92, 105, 123, 124, 127, 129, 135, 138, 139, 140  
Kadowaki 126, 137  
Kaestner 3, 5, 129  
Kahn 136  
Kalaria 126  
Kanazawa 117  
Kaneko-Ohdera 141  
Karlin 17, 129  
Karlson 82, 130  
Kasahara 2, 3, 130, 137  
Kasanicki 4, 130  
Kasuga 117, 133, 137  
Katagiri 12, 117, 128, 130, 134  
Kayano 5, 6, 7, 125, 130  
Keller 14, 39, 43, 44, 47, 77, 87, 88, 91, 125, 130, 137, 139, 140  
Keyte 127  
Kikuchi 117  
Kirk 135  
Kistler 133  
Klepper 4, 131  
Klip 122  
Komaromy 123  
Konings 138  
Kono 6, 137  
Koolman 130  
Kopito 120, 137  
Kornhauser 134  
Kozka 120, 128  
Kraegen 131  
Kratzin 137  
Krieg 26, 39, 131  
Kruse 128, 133  
Kuang 124  
Kunkel 89, 131  
Kyte 10, 15, 131  
Lachaal 129  
Lamb 127  
Lampson 137  
Lamson 133  
Lane 126, 129  
Laybutt 4, 131  
Lebron 97, 131  
Lecuona 124  
Ledbetter 126  
Lee 117  
LeFevre 3, 131  
Leingang 125, 137, 138  
Lengeler 1, 131  
Levine 121, 135  
Levy 125  
Li 124  
Lienhard 2, 14, 15, 87, 88, 117, 118, 125, 126, 131, 133, 136  
Lin 117, 128, 130, 134  
Lindsay 118  
Lins 123  
Liu 129  
Lo 45, 46, 58, 92, 121, 132  
Lodish 2, 120, 129, 133, 134, 137, 138  
Loeb 131  
Loike 124  
Lowe 5, 132  
Lu 135  
Lundahl 126  
Lund-Andersen 5, 132  
Maher 5, 132  
Maiden 2, 8, 132  
Makepeace 14, 51, 58, 92, 105, 106, 110, 112, 133, 134  
Maloney 90, 92, 94, 141  
Maniatis 135  
Marbaix 126  
Marcus-Sekura 127  
Marger 10, 15, 132  
Marmur 141  
Marshall 47, 120, 132  
Marshall-Carlson 120  
Martinez 121  
Masuda 141  
Matsushima 139  
May 13, 91, 93, 123, 132  
Mayo 134  
Mcauley-Hecht 128  
McGrady 102, 132  
McGraw 137  
McKnight 119  
McLenithan 129  
McVie-Wylie 3, 8, 133  
Meeran 122  
Meins 90, 133  
Melton 26, 39, 131  
Merriman-Smith 5, 133  
Messing 28, 133  
Mierendorf 39, 136  
Mimura 117  
Minami 133  
Mintier 131  
Mio 139  
Miyamoto 6, 133  
Mockel 139  
Moley 119, 129, 135  
Momomura 126  
Monden 139, 140  
Monser 122  
Moore 132  
Mori 12, 96, 133, 137  
Morimoto 133  
Morris 119, 133, 137  
Morris-Wortmann 137  
Mueckler 2, 3, 10, 11, 13, 14, 15, 19, 26, 44, 51, 58, 82, 87, 90, 91, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 119, 125, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 137, 138, 139, 140

Muller 119, 133  
Muller-Hill 119  
Munoz 136  
Muraoka 126, 133, 137  
Murata 132  
Naderi 127  
Nagamatsu 5, 134, 139  
Nakabou 133  
Nakahara 139  
Navarro 128  
Nicklen 135  
Nickoloff 34, 51, 88, 122  
Nikawa 9, 134  
Nishimura 91, 134  
Nolan 118  
Nuel 136  
Oesterhelt 126  
Ohnimus 122  
Oka 11, 117, 128, 130, 133, 134  
Okazaki 139  
Okuno 4, 134  
Olsowski 14, 87, 91, 130  
Olsson 124  
Ono 141  
Orci 4, 134  
Page 126  
Palacin 136  
Pallardo 134  
Panico 119, 133  
Parthasarathy 141  
Pastore 138  
Patel 125  
Paulsen 126  
Peden 9, 134  
Pekala 129  
Perry 126  
Persson 124  
Pessino 90, 134  
Phay 3, 8, 135  
Pilch 125, 128  
Pilo 124  
Pingsterhaus 119  
Porter 136  
Powers 123  
Preston 90, 135  
Prive 129  
Qu 123  
Rabadan-Diehl 121  
Rahman 123  
Rall 140  
Rampal 129, 141  
Rand 6, 135  
Ravazzola 134  
Rea 6, 135  
Rees 12, 127  
Reichard 124  
Reyes 121  
Reymann 137  
Richter 127, 133  
Riordan 79, 135  
Rivas 138  
Roberts 127  
Robinson 135  
Rodnick 6, 135  
Rogers 129  
Rogozinski 124  
Ronen 122  
Rosen 87, 88, 118, 124, 138  
Rosenbusch 133  
Rothstein 122, 138  
Rouch 126  
Rubashkin 141  
Rumsey 106, 135  
Rutledge 125  
Sabatino 131  
Sachs 49, 135  
Sahin-Toth 92, 123, 124, 135  
Saier 10, 15, 132  
Sakura 126  
Saltis 128  
Sambrook 24, 28, 29, 31, 32, 33, 135  
Sanger 37, 135  
Santalucia 3, 136  
Santer 5, 136  
Sarkar 138  
Saunders 35, 121  
Sawai 140, 141  
Schachter 93, 117, 118  
Schaub 136  
Scheepers 123  
Schenborn 39, 136  
Schlesinger 125  
Schneppenheim 136  
Schurmann 122, 123, 129  
Schwarz 123  
Schwarzer 137  
Seatter 103, 136  
Seidner 134  
Seino 125, 129, 130, 134, 141  
Shepherd 7, 136  
Shi 141  
Shibasaki 117, 128, 130, 134  
Shows 125, 130  
Shyamala 117  
Silverman 4, 15, 90, 92, 132, 136  
Silverstein 124  
Simpson 128, 132, 134  
Skurray 126  
Slebe 121  
Slot 6, 131, 135, 136  
Smith 42, 127, 136  
Snow 131  
Sollitti 141  
Someya 141  
Sone 133  
Soreq 39, 118  
Stein 11, 90, 123, 136  
Steinacker 87, 137  
Steinmann 136  
Strube 125, 128, 129, 130  
Studelska 135  
Subtil 6, 137



- Sun 124, 127  
Suzue 4, 137  
Suzuki 6, 137  
Takaku 117, 130, 134  
Takata 4, 117, 137  
Takeda 119, 132, 133  
Taketani 133  
Tamori 12, 133, 137  
Tang 93, 137  
Tanner 47, 137  
Tatsumi 133  
Tavare 6, 124  
Taylor 6, 137  
Testar 136  
Thinnes 137  
Thomas 123, 126  
Thompson 131  
Thorens 3, 4, 6, 126, 128, 129, 134, 137, 138  
Thrasivoulou 118  
Titgemeyer 131  
Tittor 126  
Tobe 126  
Tordjman 47, 138  
Trifiletti 122  
Tsukagoshi 134  
Tsukuda 117, 128, 130, 134  
Tucker 118  
Tyler 125  
Uchimura 139  
Udagawa 140  
Uldry 128  
Valle 121  
ValleeLienhard 79, 135  
van Iwaarden 90, 91, 93, 138  
van Steveninck 93, 138  
Vannucci 132, 134  
Varnold 136  
Vaughn 131  
Velasquez 121  
Velick 94, 138  
Vera 87, 88, 106, 121, 124, 131, 138  
Verhey 7, 138  
Vogler 131  
Voice 139  
Waddell 3, 139  
Wahren 124  
Walker 122  
Wall 123  
Walmsley 5, 90, 132, 139  
Wang 9, 139  
Wardzala 6, 121  
Watanabe 4, 5, 139  
Webb 93, 139  
Weber 140  
Weed 138  
Weiler-Guttler 3, 139  
Weitzman 92, 139  
Welch 135  
Wellner 12, 13, 18, 26, 43, 51, 58, 87, 88, 91, 103, 107, 109, 113, 115, 139, 140  
Weng 133  
Werner 121  
Wesslau 136  
White 5, 140  
Whitesell 6, 140  
Whitney 126  
Wickens 43, 126  
Widdas 11, 15, 16, 103, 105, 114, 116, 118, 140  
Wohrl 131  
Wolstenholme 121  
Woodland 126  
Woon 134  
Wright 127  
Wu 9, 78, 105, 124, 129, 140  
Xu 136  
Yamaguchi 9, 140, 141  
Yamamoto 133, 141  
Yamashita 134  
Yan 90, 92, 94, 141  
Yang 6, 133, 141  
Yano 5, 141  
Yao 10, 141  
Yasuda 141  
Yazaki 117, 126, 128  
Young 118  
Yudilevich 118  
Zen 129  
Zeng 15, 105, 141  
Zinke 139  
Zomerschoe 139  
Zorzano 136  
Zottola 90, 91, 121, 141  
Zuniga 15, 105, 114, 116, 141

---

## **Im Rahmen der Dissertation entstandene Publikationen**

### **Publikationen in Zeitschriften (full papers)**

- Olsowski, A., Monden, I., and Keller, K. - (1998)  
Cysteine-scanning mutagenesis of flanking regions at the boundary between external loop I or IV and transmembrane segment II or VII in the GLUT1 glucose transporter. *Biochemistry* 37 (30), pp. 10738 – 10745
- Keller, K. and Olsowski, A. - (1999)  
Probing the local secondary structure and structure-function relationship of the glucose transporter GLUT1 by cysteine mutation and Cysteine-scanning mutagenesis (invited review).  
*Recent Res. Devel. Biochem. 1*, pp. 29-44
- Olsowski, A., Monden, I., Krause, G., and Keller, K. - (2000)  
Cysteine-scanning mutagenesis of helices 2 and 7 in GLUT1 identifies an exofacial cleft in both transmembrane segments.  
*Biochemistry* 39 (10), pp. 2469 – 2474

### **Kurzpublikationen (Abstracts)**

- Kurzaufsatz (Abstracts) in den Jahrbüchern 1995, 1996 und 1998 des Fachbereichs Humanmedizin der freien Universität Berlin in denen durch Gutachter ausgewählte Arbeiten präsentiert werden.
- A. Olsowski, I. Monden, and K. Keller - (1997)  
Evaluation of the secondary structure by localized cysteine-scanning mutagenesis at exofacial portions of the glucose transporter GLUT1.  
FASEB Summer Conference on Recent Advantages in Glucose Transporter Biology, Copper Mountain, CO, USA
- A. Olsowski, I. Monden, and K. Keller - (1997)  
Analysis of the secondary structure of the human facilitative glucose transporter GLUT1 by cysteine-scanning mutagenesis.  
*Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol R12*
- A. Olsowski, I. Monden, and K. Keller - (1999)  
Cysteine-scanning mutagenesis to address local secondary structure of GLUT1 glucose transporter and alternative membrane topology models in „Lipid-Protein interplay: mechanism and Implications for Cell Function“.  
BiomembranForum 1999, GBM Study Group Biomembranes and SFB 197 Biological and Model Membranes, Jena
- A. Olsowski, I. Monden, and K. Keller - (1999)  
Site-directed chemical modification of cysteine-scanning mutants at putative transmembrane segment II and its flanking exofacial loop to probe local secondary structure of GLUT1.  
FASEB Summer Conference on Recent Advantages in Glucose Transporter Biology, Snowmass, CO, USA

---

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Konrad Keller für die äußerst intensive und konsequente Betreuung dieser Arbeit bedanken. Ebenso danke ich ihm für seine praktische Mitarbeit, die Vergabe des Dissertationsthemas und das Vertrauen, das er in mich gesetzt hat.

Zu großem Dank bin ich auch Frau Ingrid Monden verpflichtet. Sie hat die Jahre der praktischen Arbeit mit großem und zuverlässigem Arbeitseinsatz begleitet und war mir eine liebe Arbeitskollegin.

Für die computergestützte Analyse der erhobenen Daten im Bereich des Proteinmodellierung und die Recherche in Proteindatenbanken möchte ich mich bei Herrn Dr. G. Krause vom Institut der molekularen Pharmakologie in Berlin bedanken.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. G. Schulz für die Möglichkeit, die praktischen Arbeiten am Institut für Pharmakologie der Freien Universität Berlin durchführen zu können. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. K. Graszynski für die Übernahme des Ko-Referats und die Organisation der Disputation.

Dank gebührt auch allen ehemaligen und heutigen Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts, die mir hilfsbereit in praktischen und theoretischen Fragen bzw. Arbeiten zur Seite standen. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. T. Schöneberg, Herrn Dr. M. Schäfer und Frau E. Glass erwähnen.

Dank gebührt auch meinen Freunden Dr. Kathrin Sbrzesny und Ingo Rose für die Korrektur dieser Arbeit.

Letztlich bedanke ich mich bei meiner Frau Helene und unseren Kindern Mora und Karl, die während der vergangenen Jahre etliche Stunden unserer familiären Freizeit für diese Arbeit geopfert haben.

---

## Lebenslauf

### Person

Andreas Olsowski, Diplom-Biologe  
geboren am 14.01.1964 in Wolfsburg, Niedersachsen  
verheiratet, zwei Kinder

### Berufserfahrung

seit September 2000	Angestellter der Universität Hannover im Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz
10/1995 – 09/1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. Keller am Institut für Pharmakologie der Freien Universität Berlin
05/1992 - 09/1995	Studentische Hilfskraft (Tutor) im Grund- und Hauptstudium im Institut für Tierphysiologie am Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin
03/1994 - 09/1994	Aushilfstätigkeit als TA im EDV-Bereich in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Graszynski, Institut für Tierphysiologie, Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin
10/1985 - 01/1987	Hilfs-Industriereiniger bei den Firmen „Merkur“ und „Uniputz“
06/1984 - 09/1985	Zivildienst im Krankenhaus Gliesmaroder- und Cellerstr. in Braunschweig, Niedersachsen
06/1983 - 05/1984	Hilfs-Industriereiniger, Firma „Merkur“ in Braunschweig, Niedersachsen

### Hochschulbildung

05/1995	Abschluss als Diplom-Biologe
06/1990	Vordiplom
04/1987	Immatrikulation an der Freien Universität Berlin im Fach Biologie (Diplomstudiengang)

### Schulbildung

1980 - 1983	Gymnasiale Oberstufe der Heinrich-Nordhoff Gesamtschule, Wolfsburg-Westhagen
1976 - 1980	Realschule 3, Wolfsburg-Westhagen
1970 - 1976	Grundschule und Orientierungsstufe, Wolfsburg-Detmerode

### Weiterbildungen

01.04.2000 - 31.08.2000	Umfangreiche Fortbildung im IT-Bereich
06.09.1999 - 08.09.1999	Windows NT - Administration eines NT-Netzwerks
29.05.1999	Bekanntmachen der eigenen Präsenz im Internet (Web-Announcing)
06.05.1999 - 08.05.1999	Literaturrecherche in Datennetzen (Internet)

