

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Bedeutung und der Transport von Glucose

Zucker gehört zur Naturstoffklasse der Kohlenhydrate und ist einer der wichtigsten Grundstoffe für die Erzeugung von Energie in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen bzw. Zellsystemen. Der in der Natur mit am häufigsten vorkommende Zucker wird in seiner monomeren Form als Glucose bezeichnet. Sie wird aus dem atmosphärischen Kohlenstoff über verschiedene bio- und physikochemische Reaktionen in der Photosynthese der Pflanzen gebildet und in höheren molekularen Strukturen wie z. B. Zellulose gebunden.

Mit der Aufnahme von Nahrung werden Kohlenhydrate wieder über verschiedene Stoffwechselreaktionen in ihre monomere Form überführt. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Zellmembranen können die hydrophilen Zuckermoleküle diese nicht durchdringen. Sie müssen in die Zellen transportiert werden, um dort als Substrat für die Energiegewinnung und bestimmte Synthesewege vorzuliegen. Dieser Transport in das Zytosol wird durch Transportsysteme realisiert, die nach der Definition in der Stoffwechselphysiologie aktiv oder passiv arbeiten und in der Zellmembran lokalisiert sind.

Der aktive Zuckertransport erfolgt auf vielfältige Art und Weise. Ein ubiquitär verteiltes Transportsystem unter den Pro- und Eukaryonten wird durch die sogenannten Symporter dargestellt. Sie schleusen ein Molekül Glucose mit einem Molekül eines anderen Stoffes oder Ions gegen den Glucosekonzentrationsgradienten durch die Zellmembran in das Zytosol. Diese Form des Transportes wird als Co-Transport bezeichnet und basiert auf dem vorhandenen Gradienten des zur Glucose co-transportierten Moleküls. Es handelt sich per Definition um einen sekundär aktiven Transport, da der Konzentrationsgradient des co-transportierten Moleküls über die Zellmembran unter Energieverbrauch aufgebaut wird.

Der passive Glucosetransport beruht auf der Funktion eines Proteins, das einer spezifischen Pore ähnlich, der Glucose erlaubt, die Zellmembran zu durchdringen. Dieser Vorgang wird im Allgemeinen als erleichterte Diffusion bezeichnet. Die Glucose folgt ihrem Konzentrationsgradienten und erreicht je nach Konzentrationsgefälle das Zellinnere bzw. diffundiert aus der Zelle in den extrazellulären Raum. Es handelt sich somit um einen bidirektionalen Transport. Die Diffusion aus der Zelle kann durch die Phosphorylierung der Glucose im Zytosol durch die Hexokinase verhindert werden, da die Glucose dem Konzentrationsgradienten entzogen wird und sich keine Konzentration an freier Glucose innerhalb der Zelle aufbaut. Diese Phosphorylierung dient gleichzeitig zur Aktivierung des Glucosemoleküls, die notwendig ist, um sie in den Energiegewinnungskreislauf einzuschleusen.

### 1.1.1 Der aktive Glucosetransport bei Pro- und Eukaryonten

Bakterien sind einem großen Konzentrationsbereich verschiedener Zucker ausgesetzt und nutzen die Mannigfaltigkeit der aktiven Zuckertransportsysteme. In höheren Organismen werden diese Transportsysteme und -proteine hauptsächlich in Geweben gefunden, in denen der transepitheliale Transport gegen einen Konzentrationsgradienten erfolgt. Einige der Transporter sind von anderen Proteinen abhängig, die freie Energie der ATP-Hydrolyse (Ames et al., 1992) oder der Phosphoenolpyruvat-Hydrolyse, welche im Phosphotransferase-System stattfindet, für den Glucosetransport ausnutzen (Lengeler et al., 1990).

Eines der häufigsten Glucosetransportsysteme bei Pro- und Eukaryonten ist der unter 1.1 angesprochene Symport. Einer der bekanntesten Vertreter dieser Symporter ist der Natrium-Glucose-Transporter 1 (SGLT1). Er findet sich u. a. im Bürstensaum von Darm- und Nierenepithelien und sorgt für eine Resorption von Glucose und anderen Monosacchariden. Treibende Kraft für diesen Co-Transport sind  $\text{Na}^+$ -Ionen, die zusammen mit den Zuckermolekülen in die Zellen transportiert werden. Dieses Transportprotein zeigt eine viel höhere Affinität für Glucose in Anwesenheit von  $\text{Na}^+$ -Ionen als in deren Abwesenheit. Häufig werden auch  $\text{H}^+$ -Ionen als Co-Substrat für den Zuckertransport benutzt, wobei die Transportrichtung durch einen Protonengradienten bestimmt wird. Ein bekanntes Transportprotein hierfür ist eine Permease von *Escherichia coli*, die Laktose-Permease.

Der SGLT1, der ein aktives Transportsystem für Glucose darstellt, weist keinerlei Sequenzhomologien mit den passiven Glucosetransportern von Säugern und Bakterien auf. Im Gegensatz dazu existieren viele Sequenzhomologien zwischen den passiven Glucosetransportern und den bakteriellen Zucker/ $\text{H}^+$  Co-Transportern bzw. den Zuckertransportern aus der Hefe (Maiden et al., 1987).

### 1.1.2 Der passive Glucosetransport bei den Mammalia

Die meisten Säugerepithelien nehmen die Glucose nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion durch einen passiven Transport auf. Er wird, wie anfangs schon beschrieben, nur durch den Konzentrationsgradienten angetrieben, der für einen Nettotransport über die Plasmamembran von Zellen existieren muss. Die Ergebnisse vieler Studien ergaben Unterschiede in den Kinetiken, der hormonellen Regulation und der differenzierten Wirkung von Inhibitoren auf den Glucosetransport in den verschiedenen Geweben und führten zu der These, dass der Glucosetransport durch unterschiedliche Glucosetransportproteine realisiert wird.

Die verschiedenen Glucosetransporter (GLUT) besitzen eine mehr oder weniger große Gewebsspezifität, die letztlich ihre funktionellen Eigenschaften definiert. Andererseits variieren die Isoformen stark in der Verteilung und in ihrer Expressionshöhe. Häufig sind mehrere Isoformen im gleichen Gewebetyp vertreten. Sicher ist, dass diese Proteine integrale Membranproteine sein müssen, damit die Glucose die Membran passieren kann.

## 1.2 Die passiven Glucosetransporter des Menschen

In der Klasse der Mammalia besteht ein komplexer Mechanismus, der die Glucosekonzentration im Blut in einem engen Rahmen hält. Sie liegt bei ca. 5 mM und wird u. a. von Zellen im Blutplasma mit beeinflusst, die eine große Menge an Glucosetransportprotein besitzen. Beim Menschen sind dies die Erythrozyten, deren Membranprotein aus bis zu 6 % Glucosetransportprotein besteht (ca.  $5 \cdot 10^5$  Moleküle pro Zelle, (Allard & Lienhard, 1985)). Kasahara und Hinkle konnten 1977 dieses Protein in seiner funktionellen Form aus menschlichen Erythrozyten isolieren und anreichern (Kasahara & Hinkle, 1977). Im Jahre 1985 gelang es in einem Gemeinschaftsprojekt unter Leitung von H. F. Lodish, die Aminosäuresequenz dieses Proteins über die cDNS aufzuklären und eine Hydrophathieanalyse der Aminosäuresequenz durchzuführen. Sie führte zu einem ersten Sekundärstrukturmodell des Proteins (Mueckler et al., 1985). Damit war das erste Glucosetransportprotein (GLUT1) schon umfangreich analysiert und das Tor für die molekularbiologische Untersuchung der Glucosetransporter aufgestoßen. Sie

ermöglichte u. a. die Entdeckung mehrerer Isoformen des passiven Glucosetransporters und wird in Zukunft wahrscheinlich zur Identifikation weiterer Transporter führen.

Bis zum Ende der achtziger Jahre wurden neben dem GLUT1 vier weitere passive Glucosetransporter und ein Pseudogen eines Glucosetransporters nachgewiesen, die nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung für die Nomenklatur durchnummeriert wurden (GLUT1-6, Fukumoto et al., 1989). Die primäre Aminosäuresequenz dieser Isoformen ist zu vierzig und mehr Prozent identisch miteinander (GLUT1-5). Ebenso ähneln sich die einzelnen Hydropathieplots in einzigartiger Weise, so dass diese Transporter in ihrer Sekundär- und wahrscheinlich auch Tertiärstruktur dem von Mueckler et al. (Mueckler et al., 1985) klonierten GLUT1 sehr ähnlich sein müssen.

Die Möglichkeit der molekularbiologischen Bearbeitung der Glucosetransporter führte aber auch zu Irritationen wie am Beispiel des GLUT7 deutlich wird. Diese Isoform wurde 1992 durch das Screening einer cDNA-Bank aus Rattenleberzellen postuliert und als Glucosetransporter beschrieben, der speziell in der Membran des endoplasmatischen Retikulums von Leberzellen vorkommt (Waddell et al., 1992). Jedoch ergaben weiterführende Studien unter Einsatz verschiedenster molekularbiologischer Methoden, dass keine cRNS aus der cDNA gebildet wurde. Demnach scheint es sich bei dem beschriebenen GLUT7 statt um einen funktionierenden Glucosetransporter um einen Klonierungsartefakt zu handeln (Burchell, 1998).

Zu den bisher angesprochenen Isoformen kamen in den letzten zwei Jahren fünf weitere Glucosetransporter dazu, die durch das Screenen von humanen Gendatenbanken und Anwendung molekularbiologischer Methoden ebenfalls isoliert wurden. Sie werden zum Teil abweichend von der alten Konvention mit der Bezeichnung GLUTX1 (Ibberson et al., 2000), GLUT8 (Carayannopoulos et al., 2000) (aus der Blastozyste) bzw. (Doege et al., 2000b) (vornehmlich im Hoden vorkommend), GLUT9 (Doege et al., 2000a; Phay et al., 2000), GLUT10 (McVie-Wylie et al., 2001) und GLUT11 (Doege et al., 2001) geführt. Kürzlich sind ein Review und ein Konsensuspapier erschienen, die eine Erweiterung und Neu- bzw. Umordnung der Nomenklatur dieser Glucosetransporter versuchen (Joost & Thorens, 2001; Joost et al., 2002). Die Inhalte dieser Veröffentlichungen sind in dieser Arbeit nicht berücksichtigt und es bleibt abzuwarten, ob sich diese Änderungen durchsetzen und anerkannt werden. Zumindest ist durch die Initiative des Konsensuspapiers ein Anfang dafür gemacht worden.

### 1.2.1 Der Glucosetransporter GLUT1

Der passive Glucosetransporter GLUT1 wird auch als HepG2 bzw. Erythrozyten-Gehirn-Transporter bezeichnet, weil die ersten Klone, die das vollständige Gen des Proteins enthielten, aus einer humanen, hepatozellulären Karzinomzelllinie bzw. aus dem Rattenhirn stammten. Seit 1989 ist bekannt, dass der GLUT1 des Menschen mit dem aus Ratten (Birnbaum et al., 1986), Mäusen (Kaestner et al., 1989), Kaninchen (Asano et al., 1988) und Schweinen (Weiler-Guttler et al., 1989) zu über 97 % in der Aminosäuresequenz übereinstimmt und diese Transportproteine alle aus 492 Aminosäuren aufgebaut sind. Das gereinigte Protein ist stark glykosyliert und migriert als eine breite Bande im SDS-Polyacrylamidgel mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 55 kDa (Kasahara & Hinkle, 1977).

Der GLUT1 besitzt eine breite Substratspezifität und transportiert eine ganze Reihe von Hexosen (LeFevre, 1961). Er ist weit verbreitet und wird sehr zahlreich im fötalen Gewebe des Herzens, der Leber und dem braunen Fettgewebe des Menschen nachgewiesen. Bei Adulten zeigen diese Gewebetypen eher einen niedrigen Gehalt an GLUT1-Protein (Asano et al., 1988; Santalucia et al., 1992). Hier sind neben den

Erythrozyten die Regionen, die mit einem zahlreichen Auftreten von GLUT1-Molekülen charakterisiert sind, in den Endothel- bzw. Epithelzellen zu finden, die jene Bereiche ausbilden, die als Blut-Gewebe-Schranken fungieren, wie z. B. die Blut-Hirn-Schranke (Dick et al., 1984; Kasanicki et al., 1987; Bagley et al., 1989), die Blut-Nerven-Schranke (Froehner et al., 1988; Gerhart & Drewes, 1990), verschiedene Blut-Augen-Schranken (Harik et al., 1990; Takata et al., 1990), der Chorioid plexus (Bagley et al., 1989) und der plazentale Synzytiotrophoblast (Takata et al., 1990; Barros et al., 1992). Als physiologische Aufgabe wird dem GLUT1 in der Hauptsache der konstitutive Glucosefluss im Körper zugeschrieben. Er ist somit auch für die Verteilung der Glucose in die einzelnen Kompartimente des Körpers verantwortlich, die durch die verschiedenen Gewebeschränken ausgebildet werden. Dabei hängt die Regulation des GLUT1 sehr stark vom Gehalt der Glucose im Körper ab (Baldwin, 1993). Es gibt Hinweise, dass die GLUT1 vermittelte Glucoseaufnahme durch Insulin beeinflusst wird (Holman et al., 1990; Laybutt et al., 1997).

Das Glucosetransporterprotein-Typ1-Defizienz-Syndrom (GTPS) (De Vivo et al., 1991) unterstreicht die physiologische Bedeutung dieser Isoform, denn Insertionen, längerstreckige Deletionen, Nonesense- und Missense-Mutationen im Gen dieses Proteins führen zu einer unterschiedlichen Beeinflussung des Glucosetransports, der auf einer Erniedrigung der maximalen Transportgeschwindigkeit bei unveränderter Substrataffinität beruht (Klepper et al., 1998).

## 1.2.2 Der Glucosetransporter GLUT2

Der GLUT2 ist charakteristisch für Lebergewebe und wurde bisher aus einer humanen Gendatenbank (Fukumoto et al., 1988), der Ratte (Thorens et al., 1988) und der Maus (Asano et al., 1989; Suzue et al., 1989) kloniert. Die Glucosetransporter der unterschiedlichen Lebergewebe sind aus 522, 523 bzw. 524 Aminosäuren aufgebaut und die Sequenzhomologie zueinander liegt bei über 80 %. Sie beträgt zum GLUT1 noch über 55 % (Silverman, 1991). Der GLUT2 transportiert mit einem fünffach höherem  $K_m$  gegenüber der Glucose auch Fructose (Okuno & Gliemann, 1986). Er ist unter den passiven Glucosetransportern GLUT1-4 das Protein mit dem höchsten  $K_m$ -Wert für Glucose und hat damit die niedrigste Affinität zu diesem Substrat. Immunozytochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass der GLUT2 in allen Hepatozyten exprimiert wird aber auf die sinusoidale Plasmamembran begrenzt ist. Dabei wird ein Gradient des Glucosetransportproteins durch eine hohe Expression in den Periportalfeldern zu einer niedrigen im perivenösen Bereich aufgebaut (Thorens et al., 1990; Hacker et al., 1991). Die physiologische Rolle des Glucosetransports in der Leber differiert im Vergleich zu der in anderen Geweben, denn hier wird sowohl Glucose aufgenommen als auch wieder abgegeben. Je nachdem wie der Blutzuckerspiegel dies erfordert.

Ferner nachgewiesen wurde der GLUT2 in den Langerhanschen  $\beta$ -Zellen des Pankreas, die Insulin produzieren (Thorens et al., 1988; Orci et al., 1989). Ein weiterer Expressionsort sind die basolateralen Membranen der Zellen des voll differenzierten, absorptiven Darmepithels und die Zellen des proximalen Tubulus der Niere (Thorens et al., 1990). Die Lokalisation im Dünndarm und der Niere legt die Vermutung nahe, dass der GLUT2 in Kooperation mit dem sekundär aktiven  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glucosesymporter für eine transepitheliale Absorption bzw. Resorption von Glucose sorgt. Weiterhin konnte der GLUT2 über Antikörperbindungsstudien auch in der Retina von Ratten nachgewiesen werden und sorgt dort wahrscheinlich für eine intraretinale Glucosehomöostase (Watanabe et al., 1994).

Mutationen dieses Gens, wie Nonsense-, Frameshift- oder Spleißstellenmutationen, führen zum Fanconi-Bickel-Syndrom und werden über einen autosomal-rezessiven Erbgang weitergegeben (Santer et al., 1997).

### 1.2.3 Der Glucosetransporter GLUT3

Der GLUT3 ist ein neuronaler Glucosetransporter. Diese Schlussfolgerung ist aus den hohen Expressionsraten der mRNA zu schließen, die bei Affen, Kaninchen, Ratten und Mäusen im Gehirn nachgewiesen wurden (Yano et al., 1991; Maher et al., 1992; Nagamatsu et al., 1992). Beim Menschen wird der GLUT3 ebenfalls mit der höchsten Expressionsrate im Gehirn nachgewiesen, wird aber auch in vielen anderen Geweben exprimiert (Kayano et al., 1988). Bei der Ratte ist 1996 der GLUT3 zusätzlich in der Retina (Watanabe et al., 1996) und 1999 in den Faserzellen der Augenlinsehornhaut entdeckt worden (Merriman-Smith et al., 1999).

Klone, die zur Entdeckung des Gens vom GLUT3 führten, stammten aus einer humanen (Kayano et al., 1988) und einer Mäuse Genbank (Nagamatsu et al., 1992). Das dekodierte Protein dieser Klone besteht aus 496 bzw. 493 Aminosäuren, die in ihrer Sequenz zu 83 % identisch sind. Verglichen mit dem GLUT1 ergibt sich eine Übereinstimmung von 64 % zur entsprechend verwandten Spezies. Die Isolation des GLUT3 Gens gelang auch bei Hühnern (White et al., 1991), wobei das Transportprotein aber nicht näher charakterisiert wurde.

Eine wesentliche physiologische Bedeutung des GLUT3 besteht in der Versorgung der parenchymalen Zellen des Gehirns mit Glucose. Da der GLUT3 einen deutlich niedrigeren  $K_m$  für 3-O-Methyl-D-Glucose (3-OMG) als der GLUT1 besitzt (Gould et al., 1991), könnte die damit verbundene höhere Affinität für Glucose im Vergleich zum GLUT1 als eine entwicklungsphysiologische Adaptation des GLUT3 an geringe extrazelluläre Glucosekonzentrationen des Gehirns angesehen werden (Lund-Andersen, 1979). Unter normalen Transportbedingungen ist im Gehirn die Kapazität der Hexokinase für Glucose größer als die Aktivität der Glucosetransporter. Unter Bedingungen von hohem Glucoseverbrauch oder Hypoglykämie kann die Expression des GLUT3 im Gehirn mit niedrigem  $K_m$ -Wert notwendig sein, um erfolgreich niedrige Blutzuckerkonzentrationen zu nutzen (Gould & Holman, 1993).

### 1.2.4 Der Glucosetransporter GLUT4

Der GLUT4 ist ein insulinregulierter Glucosetransporter und somit hormonell gesteuert. Er wird in Geweben gefunden, in denen die Glucoseaufnahme durch Insulin geregelt ist. Dies sind die Skelettmuskeln und der Herzmuskel sowie das braune und weiße Fettgewebe (James et al., 1988; James et al., 1989). Die Aufnahme der Glucose in diese Gewebe ist von äußerster Wichtigkeit für die Glucosehomöostase. So bilden die Skelettmuskeln einen wichtigen Faktor in der Glucoseverteilung direkt nach der Nahrungsaufnahme, da sie das größte Körperkompartiment darstellen (Ferrannini et al., 1985).

Klone, die für GLUT4 kodieren, stammten vom Mensch (Fukumoto et al., 1989), der Ratte (Birnbaum, 1989; Charron et al., 1989; James et al., 1989) und der Maus (Kaestner et al., 1989). Das Protein besteht aus 509 Aminosäuren bei Mensch und Ratte bzw. 510 Aminosäuren bei der Maus. Die Proteine ähneln sich zu 95 % in der Primärsequenz untereinander und zu 65 % zum GLUT1 der entsprechenden Spezies (Baldwin, 1993). Der GLUT4 unterscheidet sich in der Kinetik des Transportes deutlich vom GLUT1. Sie erscheint symmetrisch, während der Transport beim GLUT1 in Erythrozyten (Lowe & Walmsley, 1986) asymmetrisch verläuft, bei dem Glucose von

der inneren Membran zur äußeren unter zero-trans Bedingungen mit einer geringeren Geschwindigkeit transportiert wird als umgekehrt. Diese Asymmetrie des Transportes wird höchstwahrscheinlich durch einen reversibel bindenden Faktor (wahrscheinlich ATP) erzeugt (Carruthers & Helgerson, 1989; Helgerson et al., 1989). Ebenso wird beim GLUT4 keine Stimulation des unidirektionalen Influxes von Glucose festgestellt, der im Gegensatz zum GLUT1 in Erythrozyten zunimmt, wenn Glucose auf der gegenüberliegenden Seite der Membran vorhanden ist (Transaktivierung) (Whitesell & Gliemann, 1979; Taylor & Holman, 1981).

In Normalfall ist die GLUT4-vermittelte Glucoseaufnahme innerhalb der entsprechenden Gewebe recht gering. Durch Insulingabe steigt der Glucosetransport pro Zelle jedoch bis um den Faktor 40 innerhalb von 10 min an (Baldwin, 1993). Durch verschiedene Arbeiten, die mit den Methoden der subzellulären Fraktionierung und immunozytochemischen Behandlungen durchgeführt wurden (Cushman & Wardzala, 1980; Suzuki & Kono, 1980; Clark et al., 1991; Rodnick et al., 1992), zeigte sich, dass der insulingesteuerte Glucosetransport auf den schnellen Einbau von GLUT4-Transportermolekülen in die Plasmamembran zurückzuführen ist. Dabei wechselt normalerweise das Transportprotein in einem ständigen Fluss zwischen der Zelloberfläche und einem intrazellulärem Pool, der sich in Form von Coated Pits und frühen Endosomen unterhalb der Zellmembran im Zytosol darstellt (Slot et al., 1991; Jhun et al., 1992; Yang & Holman, 1993). Dieser ständige Strom sorgt dafür, dass nur ein kleiner Teil der Transportproteine in der Plasmamembran gehalten wird. Der massive Einbau von GLUT4 in die Membran ist auf ein spezielles Kompartiment zurückzuführen, das sich aus verschiedenen Biosynthesewegen und dem endosomalen Kompartiment entwickelt. Derzeit existieren Beweise, dass GLUT4 enthaltende Vesikel (GLUT4 storage vesicles - GSVs) unterhalb der Plasmamembran vorhanden sind, die dieses Kompartiment bilden. Der Einbau dieser Vesikel in die Membran wird über einen komplizierten Mechanismus einer Signalkette gelenkt, deren Ursprung auf der Reaktion des Insulinrezeptors mit seinem Liganden beruht (Rea & James, 1997; Fletcher & Tavare, 1999; Subtil et al., 2000).

### 1.2.5 Der Glucosetransporter GLUT5

Das Substrat mit der höchsten Affinität zum GLUT5 ist D-Fructose (Burant et al., 1992). Der GLUT5 ist mit 40 %iger Übereinstimmung der stärkste divergierende Glucosetransporter im Vergleich zu den passiven GLUT1-4 (Kayano et al., 1990). Kloniert wurde er aus einer Genbank des Menschen, der Ratte und des Kaninchens. Der menschliche GLUT5 umfasst eine 501 lange Aminosäureprimärsequenz, während der Rattenklon für 502 Aminosäuren kodiert und zu 82 % zum menschlichen Transporter identisch ist (Rand et al., 1993). Die cDNS des Kaninchens umfasst dagegen 487 Aminosäuren, deren Sequenz zu ca. 70 % mit der des Menschen bzw. der Ratte identisch ist (Miyamoto et al., 1994). Der GLUT5 wird hauptsächlich in den absorptiven Epithelzellen des Dünndarms gefunden und nimmt dort die Fructose aus dem Darmlumen auf (Davidson et al., 1992). Die absorbierte Fructose wird dann durch den GLUT2, der in den basolateralen Membranen dieser Zellen lokalisiert ist, in den Blutstrom freigesetzt (Thorens et al., 1990). Dazu passt der Nachweis, dass der GLUT5 in humanen Erythrozyten zu finden ist, wo er der Fructoseaufnahme dient (Concha et al., 1997). Der GLUT5 ist auch in größeren Mengen in den Plasmamembranen ausgereifter menschlicher Spermatozoen und Spermatozoen zu finden, die Fructose als Energiequelle nutzen (Burant et al., 1992). Geringe Expressionsraten dieses Proteins

sind noch in vielen anderen Geweben nachzuweisen, u. a. im Herz, den Skelettmuskeln, in Fettgeweben, der Niere und dem Gehirn (Shepherd et al., 1992).

### **1.2.6 Der Glucosetransporter GLUT6 - ein Pseudogen**

Das Gen des GLUT6 entspricht einem 11 kB umfassenden Transkript, das auch in allen Geweben gefunden wurde, in denen der GLUT5 nachzuweisen war. Ein Teil der cDNS-Sequenz entspricht einer Insertion von 3,4 kB, die wiederum eine Region enthält, welche über eine Länge von 1,5 kB zu 80 % identisch ist mit der cDNS des humanen GLUT3 aus dem Gehirn. Da jedoch die Sequenz mehrere Stopcodons und Leserahmverschiebungen enthält, kann sie für kein funktionsfähiges Glucosetransportprotein kodieren. Die Homologie der cDNS des GLUT6 zu den anderen passiven GLUTs könnte auf die Insertion eines revers transkribierten GLUT3-Transkripts zurückzuführen sein, das in die untranslatierte Region eines anderen Gens eingebaut wurde (Kayano et al., 1990).

### **1.2.7 Der Glucosetransporter GLUTX1 (GLUT8)**

Die cDNS des GLUTX1 wurde aus den Hoden der Ratte isoliert, in denen auch die höchsten Expressionsraten von mRNA dieses Transporters nachgewiesen wurden. Schwächere Expressionsraten waren noch im Gehirn und der Nebenniere nachweisbar (Ibberson et al., 2000). Die cDNS kodiert für ein Protein aus 478 Aminosäuren, die eine Sequenzähnlichkeit zwischen 29 bis 32 % zu den verschiedenen GLUT1-5 aufweist. Als eklatanter Unterschied zu allen bisher beschriebenen passiven Glucosetransportern, besitzt der GLUTX1 eine lange extrazelluläre Schleife zwischen den Transmembransegmenten 9 und 10. In dieser Schleife befindet sich auch die einzige Glykosylierungssequenz, die bei den anderen Glucosetransportern zwischen den Transmembransegmenten 1 und 2 in der extrazellulären Schleife 1 lokalisiert ist. Ein weiterer Unterschied zu den humanen GLUT1-5 ist die Länge des C-terminalen Endes. Es wird beim GLUTX1 nur aus 20 Aminosäuren gebildet, während es bei den anderen Transportern 42 - 45 Aminosäuren sind. Dieselbe Isoform dieses Glucosetransporters wurde noch von zwei anderen Arbeitsgruppe entdeckt und beschrieben. Sie ermittelten dabei hohe Expressionsraten in der Blastozyste der Maus und im Hoden der Ratte, während im Herz, in den Skelettmuskeln und im Gehirn nur schwache Expressionsraten nachgewiesen wurden (Carayannopoulos et al., 2000; Doege et al., 2000b).

Da der GLUTX1 erst vor kurzer Zeit entdeckt wurde, ist über seine physiologische Bedeutung bisher wenig bekannt. Aufgrund der gewebsspezifischen und zellulären Lokalisation wird vermutet, dass dieser Transporter nicht an einer basalen Glucoseaufnahme beteiligt ist. Durch das Dilucin-Internalisierungsmotif, das ebenso beim GLUT4 nachgewiesen wird und bei diesem Transporter als Signal für die re-Endozytose nach dem Einbau des Proteins in die Plasmamembran dient (Corvera et al., 1994; Verhey & Birnbaum, 1994), kann spekuliert werden, dass der GLUTX1 durch einen Stimulus zu einer erhöhten intrazellulären Glucoseaufnahme dient. Somit könnte dieser Transporter hormonell gesteuert sein.

### **1.2.8 Der Glucosetransporter GLUT9**

Unter dieser Bezeichnung sind vor sehr kurzer Zeit zwei weitere Isoformen entdeckt worden, von denen bisher nur sehr wenig bekannt ist. Nachgewiesen wurden Transkripte einer dieser Isoformen in der Milz, den peripheren Leukozyten und dem Hirn (Doege et al., 2000a), während die Transkripte der anderen Isoform hauptsächlich

in der Leber und der Niere lokalisiert sind (Phay et al., 2000). Diese Isoform besteht aus 540 Aminosäuren und hat eine Sequenzähnlichkeit zum GLUT5 von 44 % und zum GLUT1 von 38 %, während der andere Transporter eine Sequenzähnlichkeit zum GLUTX1 von 45 % aufweist. Von beiden Glucosetransportern werden unterschiedliche Genloci beschrieben. So wurde der GLUT9 von Doege et al. auf dem Chromosom 9q34 entdeckt, während Phay et al. das Chromosom 4p15.3-p16 als Ursprungsort identifizierten.

Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob es sich bei diesen Transportern um dieselbe Isoform handelt. In dem unter Kapitel 1.2 angesprochenen Konsensuspapier wurde dem GLUT9 von Doege et al. die Bezeichnung des oben beschriebenen Pseudogens GLUT6 zugesprochen, während dem von Phay et al. veröffentlichten Protein die Bezeichnung GLUT9 erhalten blieb.

### 1.2.9 Der Glucosetransporter GLUT10

Der passive Glucosetransporter GLUT10 wurde bei einem Screening der humanen DNS entdeckt und auf dem Chromosom 20q12-q13.1 lokalisiert. Der Transporter besteht aus 541 Aminosäuren und enthält typische Sequenzmotive und essentielle Aminosäuren der passiven Glucosetransporter, die wichtig für ihre Funktionalität sind. Die Gewebesanalyse der Expressionsraten von Transkripten ergaben die höchsten Anteile in Leber und Pankreas und es wird vermutet, dass ein wie auch immer gearteter Gendefekt des GLUT10 einen wichtigen Auslöser für den nicht insulinabhängigen Diabetes mellitus darstellt (McVie-Wylie et al., 2001).

### 1.2.10 Der Glucosetransporter GLUT11

Der derzeit jüngste Vertreter der passiven Glucosetransporter ist der GLUT11, der wie der GLUT10 beim Screening der humanen DNS entdeckt und die cDNS durch PCR isoliert wurde (Doege et al., 2001). Das Gen vom GLUT11 ist auf dem Chromosom 22q11.2 lokalisiert. Er ähnelt am stärksten dem Fructosetransporter GLUT5 (41,7 % Aminosäuregleichheit mit dem GLUT11) und enthält seine Glykosylierungssequenz wie die meisten anderen passiven Glucosetransporter innerhalb der ersten extrazellulären Schleife. RNS-Transkripte dieses Transporters wurden im menschlichen Gewebe ausschließlich im Herzen und in den Skelettmuskeln nachgewiesen. Eine Expression der cDNS des GLUT11 gelang in COS-7 Zellen und Transportaktivitätsuntersuchungen zeigten, dass er nur eine geringe Affinität für Glucose besitzt. Diese Transportaktivität war merklich durch Fructose hemmbar.

## 1.3 Die evolutionäre Beziehung der passiven Glucosetransporter zu anderen Transportproteinen

Die Mitglieder aus der Familie der passiven Glucosetransporter von Säugern zeigen keine Ähnlichkeit in der Primärsequenz zum aktiven Natrium abhängigen Glucosetransporter aus dem Dünndarm und der Niere. Im Gegenteil, sie gleichen eher den aktiven Protonen abhängigen Glucosetransportern aus dem Bakterium *Escherichia coli*. Es handelt sich hierbei um den H<sup>+</sup>/L-Arabinose- und den H<sup>+</sup>/D-Xylose-Symporter, die zu 23 % bzw. 27 % in der Sequenz des humanen GLUT1 identisch sind (Maiden et al., 1987). Der H<sup>+</sup>/D-Xylose-Symporter erreicht zum GLUTX1 sogar eine Ähnlichkeit von 35 % (Ibberson et al., 2000).

Es wurde eine große Zahl verschiedener aktiver und passiver Glucosetransporter aus Bakterien, Cyanobakterien, Pilzen, grünen Algen, Protozoen und Pflanzen identifiziert



und sequenziert. Obwohl die translatierten Proteine stark in der Länge ihrer Primärsequenz differieren (von 884 Aminosäuren bei SNF3 in *Saccharomyces cerevisiae* (Celenza et al., 1988) bis 396 Aminosäuren bei TetC in *Escherichia coli* (Peden, 1983)), zeigen die Hydropathieplots dieser Proteine in den Bereichen, bei denen eine Sequenzähnlichkeit besteht, eine große Ähnlichkeit zu den passiven Glucosetransportern der Säuger. Demnach bestehen diese Transporter im einzelnen aus zwei Hälften, die jeweils aus einer Gruppe von sechs membrandurchdringenden hydrophoben Transmembransegmenten gebildet werden. Die Transmembransegmente nehmen allesamt nach vorherrschender Meinung eine  $\alpha$ -helikale Struktur ein. Daraus ist abzuleiten, dass diese Proteine eine sehr ähnliche Sekundär- bzw. Tertiärstruktur haben dürften. Besonders in Anbetracht der Sequenzgleichheit zwischen den passiven Glucosetransportern der Säuger und den aktiven Glucosetransportern der Bakterien könnte aus dem Homologievergleich geschlossen werden, dass diese aktiven Transporter mit den passiven Glucosetransportern auf molekularer Ebene viele Gemeinsamkeiten besitzen und dazu beitragen, die Aufgaben der Transporter zu bewältigen. Allein aus der Kenntnis der Aminosäureprimärsequenz kann jedoch nicht unterschieden werden, ob es sich um einen aktiven oder passiven Transporter handelt (Baldwin, 1993).

Auch die computergestützte Analyse einer Vielzahl verschiedenartiger bakterieller Transporter zeigt, dass sie als entfernte Verwandte zu den Mitgliedern der Familie der Zuckertransporter gezählt werden können (Griffith et al., 1992). Dies schließt solche Transporter, die Carboxylsäuren wie Zitrat, Ammoniumsalz, Antiseptika und Tetracyclin transportieren, mit ein. Einige dieser Transporter zeigen ein ähnliches Motiv zwischen den Transmembransegmenten 2 und 3 verglichen mit den Glucosetransportern (Baldwin, 1993). Die Tetracyclin transportierenden Transporter stellen dabei noch einen ganz besonderen Fall dar, da sie nicht als Symporter, sondern als Antiporter arbeiten und im Austausch für einen antibiotischen oder divalenten Kationenkomplex aus der Zelle ein Proton in die Zelle aufnehmen (Yamaguchi et al., 1990; Yamaguchi et al., 1991).

Weniger sicher ist die Einordnung des Protonen abhängigen Laktosetransporters bei *Escherichia coli* zu der Familie der Glucosetransporter (Buchel et al., 1980). Obwohl dieses Protein keine besondere Ähnlichkeit zur Primärsequenz der anderen Glucosetransporter aufweist, scheinen sich sehr stark die angenommenen Sekundärstrukturen zu ähneln, denn auch bei der Laktose-Permease wird angenommen, dass sie aus zwölf  $\alpha$ -helikalen Transmembransegmenten aufgebaut ist. Dies wurde inzwischen durch die Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Kaback experimentell belegt (als Literaturlauswahl: Kaback et al., 1993; Kaback & Wu, 1997; Frillingos et al., 1998; Wang & Kaback, 1999). Obwohl nur 14 % der Aminosäuren der Laktose-Permease mit denen des GLUT1 identisch sind, kann deren Sequenz benutzt werden, um konservierte Regionen zu bestimmen. So ähnelt z. B. die Sequenz D-K-L-G-L-R der Laktose-Permease, die sich zwischen den angenommenen Helices 2 und 3 befindet, sehr dem Motiv D-R/K-X-G-R-R/K der Glucosetransporter, welches ebenfalls zwischen den putativen Helices 2 und 3 lokalisiert ist. Ein weiteres ähnliches Motiv wurde auch zwischen den Transmembransegmenten 8 und 9 bei den diskutierten Transportern gefunden (Baldwin, 1993).

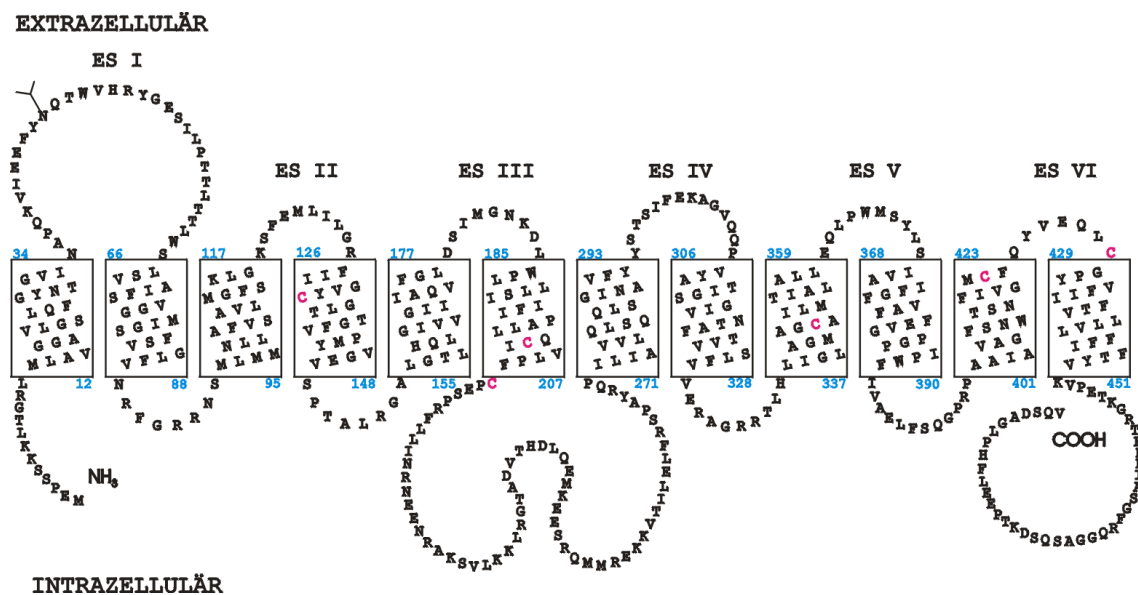
Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass die Homologen zu den GLUTs der Säuger keineswegs alle Monosaccharide, sondern einige auch Inositol (Nikawa et al., 1991) und Chinat/Chininsulfat (Hawkins et al., 1988; Geever et al., 1989) transportieren. Diese Substanzen ähneln den Pyranosen der Monosaccharide und werden

vermutlich analog zu diesen transportiert. Die Transporter des Weizens MAL6T (Yao et al., 1989) und LAC12 (Chang & Dickson, 1988) transportieren die Disaccharide Maltose bzw. Laktose.

Im Jahre 1993 postulierten Marger und Saier aufgrund der evolutionären Beziehung zwischen den verschiedenen Transportproteinen fünf große Familien, die zusammengekommen die allumfassende Superfamilie der Transporter des erleichterten Transports bilden. Diese Superfamilie enthält die verschiedenen Transporter, die als Uniporter, Symporter oder Antiporter arbeiten. Die zweite der fünf großen Familien umfasst die in Bakterien lokalisierten Hexose transportierenden Symporter, sowie die Zuckersymporter aus Pilzen und Pflanzen und die passiven Glucosetransporter der Säuger (Marger & Saier, 1993; Goswitz & Brooker, 1995).

### 1.4 Strukturelle Daten und die Topologie des GLUT1

Mit der Identifizierung des genetischen Kodes von GLUT1 war ebenso die Primärsequenz der Aminosäuren des Proteins bekannt. Auf dieser Basis konnte durch computergestützte Analyse ein theoretisches zweidimensionales Sekundärstrukturmodell entworfen werden (Mueckler et al., 1985), das die Hydropathie der einzelnen Aminosäuren nach Kyte und Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) bzw. Eisenberg et al. (Eisenberg et al., 1984) berücksichtigte (siehe Abb. 1). Die Analyse der Sequenz ergab die Sekundärstruktur eines Proteins, dass aus zwölf Transmembransegmenten aufgebaut ist, die aus 21 Aminosäuren bestehen und wahrscheinlich allesamt eine  $\alpha$ -helikale Struktur aufweisen. Durch die Möglichkeiten der Molekularbiologie konnte neben den bis zu diesem Zeitpunkt sehr intensiv eingesetzten klassischen biochemischen Methoden dieses Modell besonders im Detail experimentell untersucht werden. Dabei lieferten Punkt- und Deletionsmutationen erste Hinweise über funktionell wichtige Regionen. Die gerichtete Mutagenese in Verbindung mit der heterologen Expression in verschiedenen Expressionssystemen diente dazu, die Rolle bestimmter Aminosäuren im Protein zu untersuchen und erreichte dabei eine gute Auflösung auf Sekundärstrukturebene. Durch die Kombination der verschiedenen Untersuchungsmethoden wurden wichtige strukturelle Erkenntnisse über den GLUT1 gewonnen.



**Abb. 1:** Die durch Hydropathieplot ermittelte Sekundärstruktur des GLUT1 nach Mueckler et al. (1985) im Ein-Buchstaben-Kode für Aminosäuren. Die rot gedruckten Buchstaben stellen die Positionen der nativ vorhandenen Cysteinreste dar. Die Aminosäuren an den Transmembransegmenten (Rechtecke) sind durch eine fortlaufende Nummerierung anhand der Aminosäuresequenz beziffert. Das Asparagin auf Position 45 markiert die einzige Glykosylierungsstelle des Proteins. Die extrazellulären Schleifen sind durch ES I - VI gekennzeichnet.

#### **1.4.1 N- und C-Terminus, große zytoplasmatische Schleife und Glykosylierungssequenz des GLUT1**

Die zytosolische Lokalisation des N- und C-Terminus sowie der großen zytoplasmatischen Schleife wurde 1987 von Cairns et al. und Davies et al. nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte über spezifische Peptidantikörper in Kombination mit tryptischer Verdauung. Die Antikörper waren gegen einen Teil des jeweiligen untersuchten Aminosäurebereichs gerichtet und eine Reaktion mit ihren Epitopen erfolgte nur nach der Permeabilisierung von Erythrozyten. Demnach müssen diese Bereiche intrazellulär ausgerichtet sein (Cairns et al., 1987; Davies et al., 1987).

Weiterhin wurde demonstriert, dass das Fehlen der letzten 37 Aminosäuren des C-Terminus zu einer vollständigen Blockade des Glucosetransports in CHO-Zellen führte, obwohl der Transporter nach wie vor in die Plasmamembran eingebaut wurde. Bindungsstudien mit dieser Deletionsmutante ergaben, dass die fehlenden Aminosäuren nicht an einer Substratbindungsstelle beteiligt sind, aber dafür sorgen, dass eine Konformationsänderung des Transporters in die nach außen gerichtete Form stattfindet. Die Deletion bewirkt anscheinend eine Fixierung in diese nach außen gerichtete Stellung (Oka et al., 1990).

Mit Entschlüsselung der DNS-Sequenz des GLUT1 wurden auch zwei mögliche Erkennungssequenzen für eine Glykosylierung des Proteins beschrieben (Mueckler et al., 1985) von denen aber nur eine experimentell bestätigt werden konnte. Durch Mutation des Asparagins in Position 45 zu Aspartat, Tyrosin oder Glutamin und der nachfolgenden experimentellen Analyse wurde gezeigt, dass diese Aminosäure die einzige Stelle im GLUT1 ist, an der ein Oligosaccharid gebunden wird. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Glykosylierung für den Glucosetransport von Bedeutung ist, da sie für die Aufrechterhaltung einer strukturellen Integrität des Proteins und damit für eine hohe Transportaktivität des Proteins sorgt (Asano et al., 1991).

#### **1.4.2 Weitere wichtige Untersuchungen zur Lokalisation der Substratbindungsstelle des GLUT1**

Die generellen kinetischen Verhältnisse des Glucosetransports deuten darauf hin, dass der Transporter nicht als einfache Pore funktionieren kann, durch die Glucose in kontinuierlicher Weise die Membran passiert. Im Jahre 1952 entwickelte Widdas ein Transportmodell, das als „symmetrisches alternierendes Konformationsmodell“ bezeichnet wird (Widdas, 1952). Dieses Modell, das den Glucosetransport schon sehr gut beschreibt, wurde zum „einfachen asymmetrischen alternierenden Konformationsmodell“ weiterentwickelt (Geck, 1971; Eilam & Stein, 1974), welches gewisse Eigenheiten des Glucosetransports in Erythrozyten (siehe 1.2.4) erklären konnte. In diesem Modell besitzen die Glucosetransporter eine zur Außen- bzw. Innenseite zugängliche Substratbindungsstelle, die je nach Konformationszustand des Proteins wechselseitig exponiert werden und damit niemals gleichzeitig zugänglich sind. Alternativ zu diesem Modell wurde das „Seitenfixierte Transportmodell“ entwickelt. Es

geht von der Vorstellung aus, dass beide Substratbindungsstellen gleichzeitig zugänglich sind. Während des Transports bildet sich durch eine Art Pore ein ternärer Komplex zwischen der innerhalb und außerhalb der Zelle lokalisierten Glucose und dem Transportprotein aus. Dieser Komplex tritt beim alternierenden Konformationsmodell nicht auf (Baker & Widdas, 1973; Carruthers, 1990). In jedem Fall ist aber beim Glucosetransport von zwei verschiedenen Substratbindungsstellen auszugehen.

Weitere Studien mit Anwendung spezifischer Hemmstoffe des Glucosetransports führten zu einer Eingrenzung des Aminosäurebereichs für die Substratbindungsstelle bzw. Substratbindungsstellen. Zu den Hemmstoffen gehören die Substanzen Cytochalasin B und 2-N-4(1-azi-2,2,2-trifluoroethyl)benzoyl-1,3bis(D-mannos-4-yloxy)-2-propylamine (ATB-BMPA). Cytochalasin B ist ein von Pilzen produziertes Gift und diffundiert durch Zellmembranen. Durch Studien mit proteolytischer Spaltung des Glucosetransporters und Punktmutationen an den Tryptophanen auf den Positionen 388 und 412 ließ sich der Bindungsort für Cytochalasin B auf diesen Bereich eingrenzen. D-Glucose verdrängt Cytochalasin B und deshalb wird vermutet, dass in dieser Region die innere Substratbindungsstelle für Glucose liegt (Holman & Rees, 1987; Katagiri et al., 1991; Garcia et al., 1992). Das ATB-BMPA kann im Gegensatz zum Cytochalasin B die Zellmembran nicht durchdringen. Durch den Einsatz verschiedener Proteasen wurde der extrazelluläre Aminosäurebereich zwischen Helix 9 und 10 als Angriffspunkt des ATB-BMPA beim GLUT1 identifiziert. Wie Cytochalasin B wird das ATB-BMPA durch D-Glucose verdrängt und gilt als Hinweis für die extrazelluläre Bindungsstelle von Glucose für diesen Bereich (Holman & Rees, 1987; Clark & Holman, 1990).

Aufgrund der verschiedenen Ergebnisse dieser Studien mit den Erkenntnissen aus dem Protein-Modelling, welche die Helices 7, 8 und 11 als diejenigen mit der größten Amphilie ausweisen, wird heute angenommen, dass in der tertiären Struktur der bidirektionale Transport der Glucose in der C-terminalen Hälfte des Transporters lokalisiert ist. Die N-terminale Hälfte ist aber für den Transport essentiell (Baldwin, 1993), was auch durch Komplementierungsexperimente (Cope et al., 1994) gezeigt werden konnte. Gestützt werden diese Annahmen durch weitere Punktmutationen:

- So führt die Mutation des Asparagins auf Position 415 in Aspartat zu einer Ladungsänderung im Transportprotein, die eine Bindung von Cytochalasin B moduliert und den Transport auf 20 % im Vergleich zum Wildtyp senkt bzw. den  $K_m$  um das 1,5-fache erhöht (Ishihara et al., 1991).
- Die Mutation des Prolins auf Position 385 zu Isoleucin im Zellsystem von CHO-Zellen führt zu einem reduzierten Transport trotz vergleichbarer Expressionshöhe in der Plasmamembran zum Wildtyp. Der Transporter reagiert nicht mehr mit externen Liganden (Tamori et al., 1994). Wellner et al. konnten in *X. Oozyten* nachweisen, dass dieser Effekt durch die Substitution mit einem polaren Aminosäurerest erzielt werden kann und nicht auf der cis/trans-Isomerie des Prolins beruht. Weitere Untersuchungen erbrachten das Ergebnis, dass keines der nativen Proline der putativen Helices 6 und 10 von essentieller Bedeutung für die katalytische Aktivität des Glucosetransports ist (Wellner et al., 1995b).
- Die Mutante mit der Mutation des Tyrosins auf Position 293 zu Isoleucin verhält sich in der Transportfunktion wie die Mutante mit der Mutation des Prolins auf Position 385 zu Isoleucin und senkt die Bindungsfähigkeit von Cytochalasin B um das 300-fache. Es wird vermutet, dass diese Transportermutante in einer auswärts gerichteten Konformation fixiert wird (Mori et al., 1994).

- Der Transporter mit der Mutation des Glutamin in der Position 282 zu Leucin zeigt zwar einen normalen Transport, die Affinität extrazellulärer Liganden ist jedoch stark herabgesetzt (Hashiramoto et al., 1992).
- Wird das Glutamin auf Position 161 zu Leucin bzw. Asparagin mutiert, nimmt die Transportaktivität und die Affinität extrazellulärer Liganden beim Transportprotein stark ab. Dies war der erste Nachweis, dass eine einzelne Aminosäure im N-terminalen Bereich für die Transportfunktion von Bedeutung ist (Mueckler et al., 1994).

### 1.4.3 Extrazelluläre Bereiche des GLUT1

Neben dem extrazellulären Bereich der ersten externen Schleife, in der das Asparagin in Position 45 eindeutig als einzige Glykosylierungsstelle im GLUT1 nachgewiesen werden konnte (siehe 1.4.1), befindet sich auch das Cystein auf Position 429 außerhalb der Zelle. Bindungsstudien mit Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen in Kombination mit der gerichteten Mutagenese bestätigten die angenommene externe Lokalisation des Cysteinrestes auf Position 429 als einzigem extrazellulär exponierten Cysteinrest im GLUT1 (May et al., 1990; Wellner et al., 1992).

In einer anderen Arbeit wurde die Glykosylierung-Scanning-Mutagenese zur Strukturaufklärung beim GLUT1 eingesetzt (Hresko et al., 1994). Dabei erfolgte in einer A-Glyko-GLUT1-Mutante, bei der die N-Glykosylierungsstelle durch Punktmutation ersetzt wurde, die Insertion einer unterschiedlich langen Nukleotidsequenz (variierte in der Länge zwischen 14 bis zu 41 Aminosäuren). Diese Insertion wurde nacheinander in die angenommenen externen und internen Schleifen und die beiden Termini-Sequenzen des GLUT1 (vergleiche Abb. 1) eingeführt und ergab dementsprechend viele Mutanten. Die Insertion selbst enthielt die Sequenz der Glykosylierungsstelle des GLUT1 bzw. des GLUT4. In dieser Studie wurde bei den exprimierten Mutanten eine Glykosylierung nur dann nachgewiesen, wenn die Insertion in die angenommene extrazellulär ausgerichtete Schleife aber nicht in dem jeweiligen Terminus bzw. in der intrazellulär ausgerichteten Schleife stattgefunden hatte.

Beide Untersuchungen stützen das von Mueckler et al. vorgestellte Sekundärstrukturmodell des GLUT1.

### 1.4.4 Die nativen Cysteinreste im GLUT1

Abgeleitet aus der Nukleotidsequenz des GLUT1, enthält das Protein sechs Cysteinreste. Sie befinden sich auf den Positionen 133, 201, 207, 347, 421 und 429 (siehe auch Abb. 1). Verschiedene Arbeiten haben die Rolle dieser nativen Cysteinreste für den Glucosetransport untersucht (Literatur siehe Abschnitt 5.3.2). Hierin ist die Fähigkeit der Schwefelwasserstoffgruppen (SH-Gruppen), Disulfidbrücken untereinander auszubilden, ein sehr wichtiger Aspekt und führte zu einer kontroversen Diskussion unter den Arbeitsgruppen. Die formulierte Streitfrage war letztendlich, ob die transportierende Einheit des GLUT1 als Monomer oder Di- bzw. Tetramer organisiert und als solche funktionell aktiv ist. Diese Einheit könnte durch Disulfidbrücken ausgebildet werden. Eine eindeutige Beantwortung dieser Frage ist bis heute nicht gelungen. Die bisherigen Ergebnisse und die getroffenen Aussagen können auf die Position reduziert werden, dass der transportierende GLUT1 im Experiment in Amphibienmembranen als Monomer und in Erythrozytenmembranen als Di- bzw. Tetramer aktiv ist.

Die Substitution der einzelnen Cysteinreste im GLUT1 erbrachte keinen Hinweis darauf, dass eines der nativen Cysteine für den Transport der Glucose essentiell wäre (Wellner et al., 1992; Wellner et al., 1994). Ganz im Gegenteil zeigte ein ohne native Cysteinreste ausgestattetes Protein (cysteinfreier GLUT1), das heterolog in X. Oozyten

exprimiert wurde, ähnliche Transportaktivitäten wie der Wildtyp (Due et al., 1995a; Wellner et al., 1995a; Mueckler & Makepeace, 1997). Weitere Untersuchungen unterstützten die Annahme, dass durch den Verlust der nativen Cysteinreste keine strukturellen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp auftreten (Due et al., 1995a; Wellner et al., 1995a). Ebenso zeigen Untersuchungen zur Transportaktivität des GLUT1 unter Einfluss der SH-Gruppen reduzierenden Substanzen  $\beta$ -Mercaptoethanol (BME) und Dithiothreitol (DTT) keine Veränderung der Transportaktivität (Keller & Olsowski, 1999).

Damit sind sehr wichtige Voraussetzungen erfüllt, um an diesem Transportprotein eine Strukturanalyse durch die Cystein-Scanning-Mutagenese in Verbindung mit der funktionellen Testung unter Einsatz von Sulfhydrylreagenzien durchzuführen. Diese Cystein-Scanning-Mutagenese stellt einen wesentlichen Bestandteil dieser Arbeit dar und wird im Kapitel 1.5 genauer beschrieben und detailliert in 5.4.1 diskutiert. Eine ausgiebige Diskussion zur Rolle der nativen Cysteinreste des GLUT1 ist im Kapitel 5.3.2 zu finden.

#### 1.4.5 Alternative Modelle zur Sekundärstruktur des GLUT1

Die Reinigung des GLUT1 nach der Methode, wie sie von Baldwin und Lienhard in *Methods of Enzymology* beschrieben wurde (Baldwin & Lienhard, 1989), ergab ausreichende Mengen des Proteins und ermöglichte so die Untersuchung der Sekundärstruktur durch biophysikalische Methoden. Zu diesen Methoden gehören der Circular-Dichroismus (CD) und die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie. Durch den CD wurden 82 % des Transportproteins des GLUT1 als  $\alpha$ -helikale, 10 % als  $\beta$ -helikale und 8 % als random coil Struktur in rekonstituierten Lipidvesikeln determiniert (Chin et al., 1987). Ähnliche Ergebnisse lieferte die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (Alvarez et al., 1987), mit der auch gezeigt werden konnte, dass die  $\alpha$ -Helices vornehmlich senkrecht innerhalb der Lipidschicht ausgerichtet sind (Chin et al., 1986). Diese Untersuchungen erbrachten erste experimentelle Hinweise, dass der GLUT1 nicht ausschließlich aus  $\alpha$ -helikalen Strukturen zu bestehen scheint.

Experimente mit einem Antikörper gegen die Aminosäuresequenz Ile386 - Ala405 des GLUT1 ergaben Hinweise, dass dieser Bereich extrazellulär ausgerichtet sein musste (Fischbarg et al., 1993). Dies war aber unvereinbar mit der bis dahin vorhergesagten Sekundärstruktur des GLUT1. Aufgrund dieser Hinweise reevaluierten Fischbarg et al. die Sekundärstruktur und führten eine neue computergestützte Analyse durch. Dafür benutzten sie einen Algorithmus, der in der Lage war,  $\beta$ -Faltblattstrukturen zu erkennen. Als Ergebnis erhielten sie eine Topologie des GLUT1 mit sechzehn Transmembransegmenten (siehe Abb. 22, Kapitel 5.5), die allesamt aus  $\beta$ -Faltblättern gebildet werden.

Doch auch dieses Modell konnte mit neueren wichtigen experimentellen Befunden nicht in Einklang gebracht werden. Ducarme et al. schlugen 1996 eine andere Topologie vor. In diesem Modell wird der GLUT1 aus vierzehn Transmembransegmenten aufgebaut. Vier der vierzehn Transmembransegmente bestehen dabei aus einer  $\beta$ -Faltblattstruktur, während die anderen Transmembransegmente  $\alpha$ -Helices bilden (Ducarme et al., 1996). Entwickelt wurde dieses Modell auf der Basis der bis zu diesem Zeitpunkt bekannten experimentellen Daten zur Struktur des GLUT1 und durch die Kombination und variable Nutzung verschiedener Algorithmen der computergestützten Strukturanalyse (siehe Abb. 22, Kapitel 5.5).

Somit existieren derzeit drei unterschiedliche Modellvorstellungen zur Sekundärstruktur des GLUT1, wobei das 1985 vorgestellte Modell bis heute in der Fachwelt die meiste

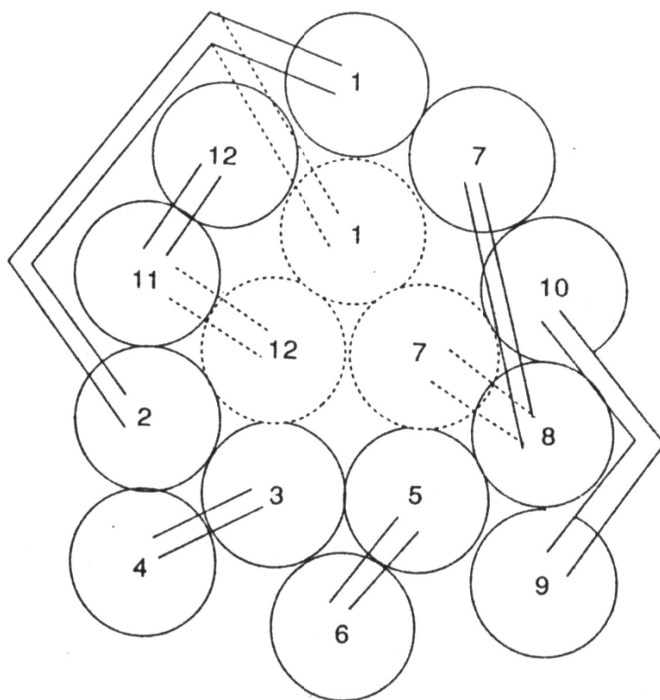
Akzeptanz erfährt. Eine der Aufgaben in dieser Arbeit war, die Evaluierung der verschiedenen Topologien des GLUT1 auf experimenteller Ebene durchzuführen.

#### 1.4.6 Die Tertiär- bzw. Quartärstruktur des GLUT1

Die Familie der passiven Glucosetransporter der Säuger gehört zu einer divergierenden Gruppe von integralen Membranproteinen, die den erleichterten Transfer von wasserlöslichen Substanzen durch die Lipiddoppelschicht von Zellmembranen ermöglicht. Hervorgebracht durch die computergestützte Analyse teilen diese integralen Membranproteine die Gemeinsamkeit, in ihrer strukturellen Erscheinung aus zwölf Transmembransegmenten zu bestehen. Wie in Kapitel 1.3 schon angesprochen, wurden diese Transportproteine, aufgrund ihrer evolutionär bedingten Verwandtschaftsbeziehung zueinander, in fünf große Familien unterteilt. Sie bilden zusammengenommen die Superfamilie der Uniporter, Symporter und Antiporter (Marger & Saier, 1993; Goswitz & Brooker, 1995). Fünfundsechzig Kandidaten aus dieser Superfamilie wurden für eine Untersuchung ausgewählt, die gezielt darauf ausgerichtet war, die mittlere Hydrophobizität und Amphiphilie für jedes der zwölf postulierten Transmembransegmente zu bestimmen (Goswitz & Brooker, 1995). Ziel dieser statistischen Evaluierung war die Entwicklung einer Basis, die zur Ableitung eines generellen Modells für das dreidimensionale Arrangement der Transmembransegmente diene. Dabei sollte dieses Modell für alle Mitglieder der Superfamilie gültig sein. Die Unterschiede in der mittleren Hydrophobizität zwischen den einzelnen Transmembransegmenten ergaben, dass die Transmembransegmente 3, 6, 9 und 12 wahrscheinlich keine Struktur ausbilden, die wasserlöslichen Substanzen den Transfer durch die Membran ermöglicht. Im Gegensatz dazu trifft diese Eigenschaft auf die Transmembransegmente 2, 4, 5, 10 und 11 zu, wobei speziell in der Familie der passiven Glucosetransporter das putative Transmembransegment 7 den geringsten Hydrophobizitätsindex besitzt und somit dieser Gruppe zuzuordnen ist. Die Analyse der Transmembransegmente in Bezug auf ihre Amphiphilie, identifizierte die Transmembransegmente 2, 4 und 11 als diejenigen mit den höchsten Indexwerten. Diese Daten zusammengenommen ergaben, dass die meisten Transmembransegmente (die TM 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 11) jene Proportionen besitzen, die notwendig sind, um an der Ausbildung eines Durchgangs wasserlöslicher Substanzen durch die Membran mitzuwirken. Dies gilt für alle Mitglieder der Superfamilie (Goswitz & Brooker, 1995). Wie in Kapitel 1.2 und folgende schon angesprochen, ist die Primärsequenz der ersten fünf Isoformen des passiven Glucosetransporters der Säuger (GLUT1-5) sehr ähnlich (Silverman, 1991). Die Hydrophobizitätsanalyse der verschiedenen Isoformen des Glucosetransporters nach Kyte und Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) zeigt ein nahezu deckungsgleiches Profil in ihrer Hydropathie (Carruthers, 1990). In der Bewertung der Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Aminosäureresten im Hydropathieplot des GLUT1 sind die Transmembransegmente 3, 5, 7, 8 und 11 die Helices mit der höchsten Amphiphilie (Mueckler et al., 1985). Basierend auf diesen Proportionen entwarfen Lienhard et al. das dreidimensionale Modell einer Membrantopologie, in der ein Transfer der Glucose durch einen polaren Spalt, der durch amphipathische  $\alpha$ -Helices ausgekleidet wird, stattfindet (Mueckler et al., 1985; Lienhard et al., 1992).

Da ein eindeutiges Wissen über die tertiäre Struktur der passiven Glucosetransporter nicht existiert, sind weitere spekulative Modelle unter Einbeziehung einer  $\alpha$ -helikalen Struktur der Transmembransegmente entworfen worden (Baldwin, 1993; Gould & Holman, 1993; Mueckler, 1994; Zeng et al., 1996; Widdas, 1998; Hruz & Mueckler, 2001; Zuniga et al., 2001). Basierend auf der helikalen Topologie des GLUT1 mit zwölf

Transmembransegmenten, entwickelte Widdas ein aktuelles und interessantes Helixarrangement des GLUT1, das sowohl die Bildung des Durchtrittswegs in der Membran als auch die Porenbarriere berücksichtigt (Widdas, 1998). Nach Widdas Vorstellung ist es möglich, dass nur drei Transmembransegmente gebraucht werden (Helices 1, 7 und 12) die aufgrund ihrer Beweglichkeit einen geschlossenen Spalt öffnen können und zwar alternativ auf jeder Seite der Membran, dies jedoch nicht gleichzeitig. Im geöffneten Zustand des Spaltes bilden neben den drei beweglichen Helices sechs weitere Transmembransegmente den Durchtrittsweg aus (neben TM 1, 7 und 12 noch 2, 3, 5, 8, 10 und 11). Für eine Beschreibung und Funktionsweise des Modell siehe die Abbildungen 2 und 3.

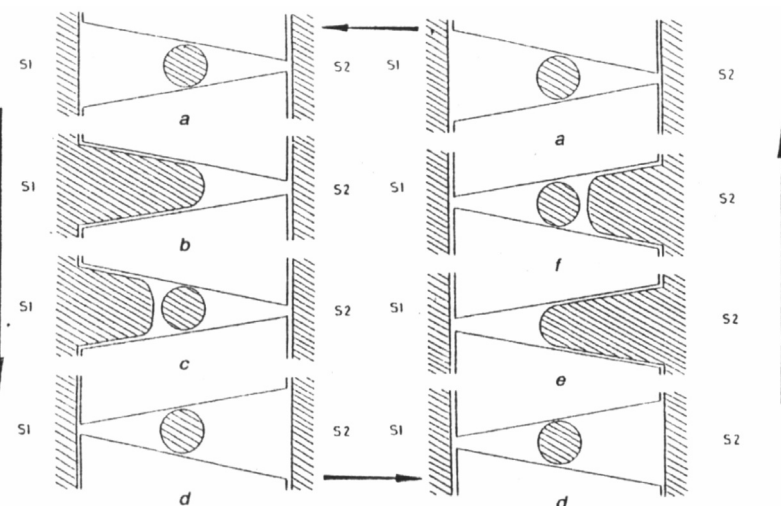


**Abb. 2 (aus Widdas, 1998):** Der neunteilige (enneagonale) Spalt des Glucosetransporters, betrachtet mit Blick von oben auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran. Die zwölf Transmembransegmente (Ziffern 1-12) sind  $\alpha$ -helikale Strukturen und könnten in der dargestellten Form zueinander angeordnet sein. Neun Segmente kleiden den offenen Spalt aus, der über ein bewegliches Hexagon geschlossen wird. Die Positionen der Segmente und verbindenden Schleifen im geschlossenen Zustand sind durch gepunktete Linien dargestellt. Nur die Segmente 1, 7 und 12 werden für die substantielle

Bewegung benötigt, die den Spalt auf einer Seite öffnet, während er auf der gegenüberliegenden Seite geschlossen wird. Diese alternierende Bewegung formt einen zu einer Seite geöffneten konischen Spalt, der auf der anderen Seite geschlossen ist (siehe Abb. 3).

**Abb. 3 (aus Widdas, 1998):** Vollständiger Arbeitszyklus des Glucosetransporters in einer schematischen Darstellung der verschiedenen Zustände.

Die zentrale wasserzugängliche Region mit dem offenen Spalt S1 wird in a auf der linken Seite gezeigt. Im Gegenurzeigersinn ist im folgenden Schritt die





Auffüllung des offenen Spaltes mit Wasser durch Evaporation und Kondensation dargestellt (b). Ein Glucosemolekül kann binden. Die Kraft der Oberflächenspannung des Wassers führt zu einer Separation und Taschenbildung zwischen der zentralen und äußeren Zone (c). Die große Kraft des Zusammenschlusses der Wände des sich schließenden Spaltes S1, wie er in d auf der linken Seite des Schemas dargestellt ist, stemmt den gegenüberliegenden Spalt S2 in sehr heftiger Weise auf, so dass nahezu ein Vakuum in dem neu erzeugten Raum produziert wird. Die Arbeit wird durch die Oberflächenspannung des in der Bewegung entstehenden Konusses und durch den Ausstoß mit dem nahezu vollständigen Verschluss des sich schließenden Areal geleistet.

## 1.5 Die Cystein-Scanning-Mutagenese

Für membranständige Proteine ist eine Reinigung und vor allem die Züchtung von Proteinkristallen, die für eine dreidimensionale Darstellung in der Röntgenstrukturanalyse notwendig sind, äußerst schwierig. Obwohl dieser Ansatz beim GLUT1 schon seit mindestens 10 Jahren versucht wird, ist es noch keiner Arbeitsgruppe gelungen, verwendbare Ergebnisse aus Mangel an einer ausreichenden Menge an hochgereinigtem und aktiven Transportprotein zu produzieren. Der einzige greifbare Fortschritt besteht in einer genügenden und guten Aufreinigung des Proteins vom GLUT1. Es ist davon auszugehen, dass noch längere Zeit vergehen wird, bis die notwendigen Verfahren entwickelt worden sind, mit denen es gelingen kann auch den GLUT1 in Form von Proteinkristallen in ausreichend hoher Auflösung darzustellen (Howard et al., 2000).

Dementsprechend wird versucht Fragen zur Struktur des GLUT1 durch alternative Methoden zu beantworten. Eine davon ist das in Kapitel 1.4.3 erwähnte Screening heterolog exprimierter Proteine durch den Einbau von Glykosylierungssequenzen in die cDNS des Proteins. Ein großer Nachteil bei dieser Methode besteht jedoch darin, dass verhältnismäßig große Insertionen in die cDNS kloniert werden müssen und es deshalb zu Störungen in der Struktur des exprimierten Proteins kommen kann. Jede alternative Methode hat gewisse Nachteile, die definierten Aussagen zur Struktur der untersuchten Proteine entgegenstehen. Der wohl größte Nachteil der alternativen Untersuchungsmethoden ist das geringe Auflösungsvermögen auf molekularer Ebene. Dabei ist das erwähnte Screening mittels Einbau von Glykosylierungssequenzen eher den hoch auflösenden Methoden zuzuordnen. Strukturelle Aussagen z. B. durch proteolytische Spaltung des zu untersuchenden Transporters sind dagegen nur in einem sehr begrenzten Maße aussagekräftig.

Über die letzten beiden Jahrzehnte wurde eine wesentlich höher auflösende Methode entwickelt, die sogenannte Cystein-Scanning-Mutagenese. Eine Form dieser Methode, die man auch als „substituted-cysteine accessibility method“ (SCAM) bezeichnet, wird bevorzugt zur Analyse von Rezeptoren und Kanälen eingesetzt (Karlin & Akabas, 1998). Mit Entwicklung des routinemäßigen Einbaus von Punktmutationen in die cDNS erfuhren diese Methoden in den letzten Jahren eine sehr große Beachtung. Das Prinzip der Cystein-Scanning-Mutagenese besteht in dem sukzessiven Austausch nativer Aminosäuren durch Cysteinreste, wobei jeder Austausch eine eigene Mutante bildet. Aufgrund der Eigenschaften des eingeführten Cysteinrestes, sind nachfolgende Untersuchungen möglich, die auf biochemischer bzw. physikalischer Ebene funktionieren. Da der Austausch jeweils immer nur eine einzelne Aminosäure betrifft und die nachfolgenden Untersuchungen an der erzeugten Mutante erfolgen, ist durch das Experiment in Bezug auf die strukturelle Darstellung eines Proteins eine relativ hohe Auflösung möglich (auf Aminosäureebene bzw. Primärebene von Proteinen).

Dem entgegen steht, dass die SH-Gruppe des Cysteinrests sehr gut mit anderen Cysteinresten Disulfidbrücken ausbilden kann. Somit ist es zu Beginn der Strukturanalyse wichtig, gewisse Voraussetzungen für diese Analyseform zu schaffen (siehe auch Kapitel 5.4.). So ist es essentiell, eine cDNS des Proteins zu erzeugen, die ohne die ursprünglichen nativ vorkommenden Cysteinreste für ein funktionsfähiges Transportprotein kodiert. Dadurch ist gewährleistet, dass es zwischen dem eingeführten und den nativen Cysteinresten zu keiner Schwefelbrückenbindung kommt, die wiederum Einfluss auf die Struktur ausüben könnte. Daraus folgt weiterhin, dass, wenn ein Untersuchungsnachweis auf funktionelle Art erfolgen soll, das cysteinfreie Protein durch die Substitution der nativen Cysteinreste in seiner Struktur als Wildtyp erhalten bleibt. Es muss also im Vorfeld gezeigt werden, dass gleiche oder zumindest sehr ähnliche Eigenschaften des cysteinfreien Proteins zum Wildtyp bestehen. Dies wurde in den Arbeiten von Due et al. und Wellner et al. schon 1995 für den GLUT1 gezeigt (Due et al., 1995a; Wellner et al., 1995a). Mit dieser Methode wurde auch die Laktose-Permease von *Escherichia coli* vollständig und sehr erfolgreich analysiert (Frillingos et al., 1998)