

## 2 Aufgabenstellung

Der GLUT1 ist ein in den Plasmamembranen von Zellen lokalisiertes Transportprotein und gehört zur Familie der passiven Glucosetransporter. Innerhalb dieser Familie gilt er als das am besten charakterisierte Transportprotein. Ein Substrat des Transporters ist die für den Stoffwechsel sehr wichtige Glucose, aber auch andere Substanzen wie z. B. Dehydroascorbat können transportiert werden. Die wesentliche Aufgabe des GLUT1 besteht in der Beteiligung an einem stetigen Glucosestrom im gesamten Körper.

Einer der Forschungsbereiche zum passiven Glucosetransport befasst sich mit der Struktur und Funktionsweise des Proteins. Dabei wird seit mehreren Jahren erfolglos versucht den GLUT1 in kristalliner Form zu gewinnen, um eine Röntgenstrukturanalyse durchführen zu können. Diese würde einer dreidimensionalen Vorstellung über die Faltung des Transportproteins sehr weiter helfen. Da eine Herstellung von Proteinkristallen membranständiger Proteine äußerst schwierig oder in vielen Fällen nicht gelungen ist, werden auch alternative Methoden angewendet, um Fragen zur Struktur und Funktionsweise zu beantworten. In diesem Bereich ist die hier vorgelegte Arbeit anzusiedeln. In vorangegangenen Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass ein cysteinfreier GLUT1 nach heutigem Erkenntnisstand dem Wildtyp in Struktur und Funktionalität gleicht. Damit ist eine sehr wichtige Voraussetzung zur Durchführung dieser Arbeit erfüllt, in der erstmalig die Cystein-Scanning-Mutagenese an einem Glucosetransporter eukaryotischer Zellen angewendet werden soll. Durch gerichtete Mutagenese an einem cysteinfreien GLUT1 und der anschließenden Expression der Punktmutanten in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* sollen folgende Aufgaben und Fragestellungen bearbeitet werden:

- Die Detektion extern exponierter Bereiche des GLUT1. Diese sollen durch Cysteinmutanten kenntlich gemacht werden, die durch Schwefelwasserstoffgruppen sensitive Substanzen in ihrer Transportfähigkeit modifizierbar sind. Hierfür werden zunächst die nach dem Sekundärstrukturmodell von Mueckler et al. (siehe Abb. 1, Kapitel 1.4) extrazellulär lokalisierten nativen Serinreste (S66, S118, S178, S294 und S368) durch Cysteinreste ausgetauscht und funktionell getestet.
- Ausgehend von den extern lokalisierten Cysteinmutanten, die eine Interaktion mit den eingesetzten Sulphydrylreagenzien zeigen, erfolgt die Herstellung weiterer Cysteinmutanten in N- und C-terminaler Richtung der Aminosäuresequenz mit anschließender funktioneller Testung der Transportaktivitäten.
- Darstellung der basalen Aktivität (Transportaktivität im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1) und unter Einfluss von Sulphydrylreagenzien. Dabei soll bei allen Cysteinmutanten eine durch die Zellmembran permeierende bzw. eine nicht durch die Zellmembran permeierende Schwefelwasserstoffgruppen sensitive Substanz eingesetzt werden.
- Analyse der Verteilung von Transportprotein innerhalb der Oozyten derjenigen Transportermutanten, in denen der Austausch der nativen Aminosäure mit einem Cysteinrest zu einer kritischen Veränderung der Basalaktivität führt.
- Untersuchung verschiedener Cysteinmutanten auf die Beteiligung an einer inneren oder äußeren Substratbindungsstelle des GLUT1.
- Prüfung und Evaluierung der derzeit existierenden Sekundärstrukturmodelle des GLUT1 unter Berücksichtigung der gewonnenen Ergebnisse. Wenn möglich, sollen Aussagen zur dreidimensionalen Faltung des GLUT1 getroffen werden. Beides erfordert eine Betrachtung der erzielten Ergebnisse mit den erzeugten Punktmutanten als Einheit bzw. Ganzes und nicht nur für jede erzeugte Mutante allein.

---