

## 4 Ergebnisse

Die Grundlage für die Analyse der Sekundärstruktur des Glucosetransporters GLUT1, bildeten funktionelle Transportuntersuchungen an unterschiedlichen Mutanten des cysteinfreien Transporters, bei denen jeweils an einer bestimmten Position durch Punktmutation ein Cysteinrest eingeführt wurde (Cystein-Scanning-Mutagenese). Als Grundbaustein für diese Punktmutanten diente die im modifizierten Expressionsvektor pSP64T klonierte cDNS des cysteinfreien GLUT1. Dieser Transporter unterschied sich vom Wildtyp durch die sechs nativen Cysteinreste, die in Serin- bzw. Glycinreste mutiert wurden. Untersuchungen aus verschiedenen Arbeitsgruppen ergaben, dass sich die Transportaktivität des cysteinfreien Konstrukts und der Proteingehalt des mutierten Transporters in der Plasmamembran von *X. Oozyten* nicht wesentlich vom Wildtyp GLUT1 unterschieden (Due et al., 1995a; Wellner et al., 1995a; Mueckler & Makepeace, 1997). Nach einem von Deng und Nickoloff (Deng & Nickoloff, 1992) entwickelten Verfahren war es möglich, die Punktmutationen direkt im Expressionsvektor pSP64T zu erzeugen (siehe Kapitel 3.2.1.7.). Die Mutanten wurden nach der Mutagenese über eine Restriktionsfragmentanalyse und letztlich durch Sequenzierung der veränderten DNS verifiziert. Anschließend erfolgte die Synthese der mutierten cRNS mit Hilfe der *in vitro*-Transkription. Diese Ergebnisse werden im ersten Abschnitt dieses Kapitels dargestellt.

Im zweiten Teil des Kapitels werden die Ergebnisse zur funktionellen Testung der Transportproteine, die mit dem Oozyten-System von *Xenopus laevis* erzeugt wurden, beschrieben. Durch Injektion der *in vitro* transkribierten cRNS in einzelne isolierte Oozyten wurde sie in die Zelle gebracht und dort als mutiertes heterologes Glucosetransporterprotein exprimiert. Achtundvierzig bis 72 Stunden nach Injektion der mutierten cRNS wurden die Aufnahmeleistungen für Glucose von cRNS-injizierten Oozyten (Mutagenesegruppe) im Vergleich zu denen bei DEPC-H<sub>2</sub>O injizierten Oozyten (Shamgruppe) bestimmt. Die funktionelle Testung diente gleichzeitig auch als Nachweis für eine Translation der injizierten cRNS und dem Targeting der Fremdproteine zur Plasmamembran in *X. Oozyten*. Zeigten die Punktmutanten mit der Insertion eines Cysteinrestes eine sehr starke Reduktion der Transportaktivität im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1, wurde auch die Verteilung des mutierten Transportproteins innerhalb der Oozytenzelle analysiert.

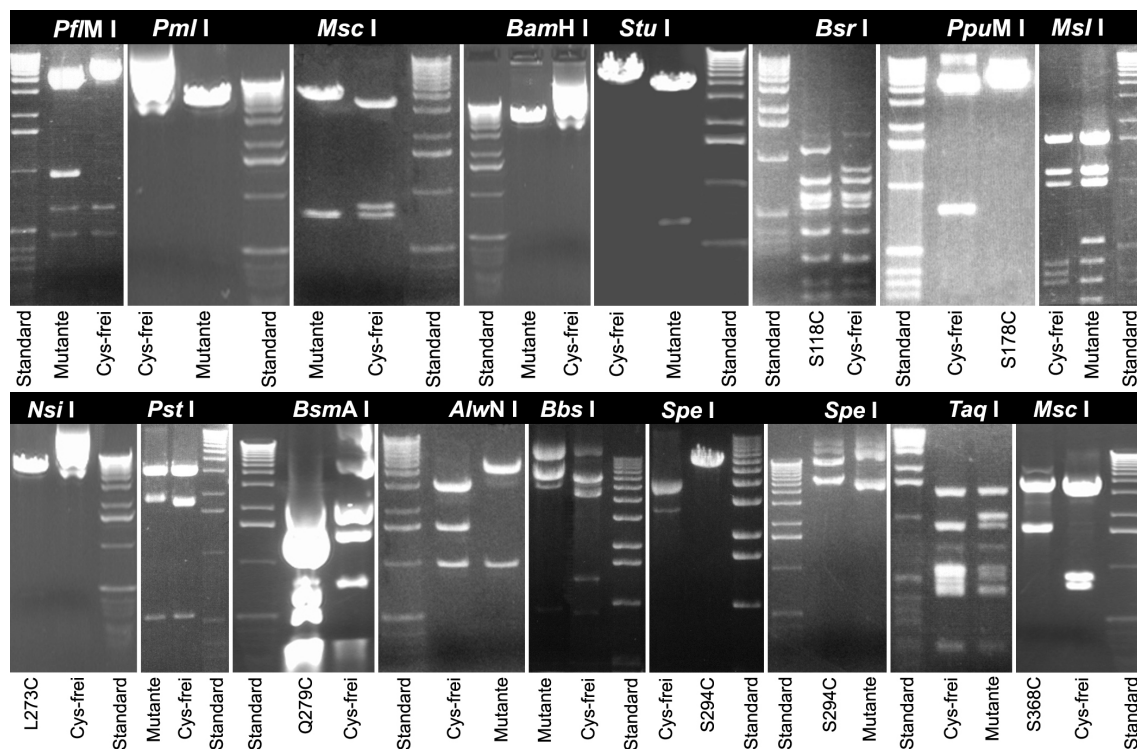
Die einzelnen durch die Cystein-Scanning-Mutagenese insertierten SH-Gruppen können mit Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen reagieren und dadurch die mutierten Transporter in ihrer Transportaktivität verändern. Dies wurde durch die funktionelle Testung überprüft; die gewonnenen Ergebnisse dienten als Grundlage für eine lokale strukturelle Analyse des GLUT1, die im dritten Abschnitt dieses Kapitels dargestellt wird.

### 4.1 Molekularbiologischer Teil - Verifizierung der Mutanten und *in vitro*-Transkription

#### 4.1.1 Vorstellung und Verifizierung der Mutanten

Für die Verifizierung der Mutanten bzw. der Änderung einer Restriktionserkennungssequenz wurde in der Regel zuerst die Restriktionsfragmentanalyse durchgeführt (siehe 3.2.1.6). Die geänderten Fragmentgrößen wurden im Vergleich zu einem nicht mutierten Klon und einer Kilobasen-DNS-Leiter visuell bestimmt und in Form von Fotos dokumentiert (siehe die gescannten Gelausschnitte verschiedener Fotos in der Abb. 7).

Anschließend erfolgte die eindeutige Bestätigung der Mutation durch die Sequenzierung der DNS (siehe 3.2.1.7.4). In beiden Verfahren wurden jene DNS-Präparationen verwendet, die letztlich auch in der RNS-Synthese eingesetzt wurden. Insgesamt wurden 60 verschiedene Punktmutationen durchgeführt, die jeweils für individuell mutierte Transportproteine kodierten. Aufgrund der Fülle der experimentellen Daten sind die Restriktionsfragmentanalysen nur exemplarisch dargestellt. Auf eine Präsentation der Analysedaten aus den Sequenzierungen wurde vollständig verzichtet, stattdessen sind die theoretischen Veränderungen angegeben, d.h. eine Darstellung der verwendeten Oligonukleotide mit den geänderten Erkennungssequenzen und der davon betroffenen Restriktionsenzyme (siehe Tab. 1, Kapitel 4.1.1). Alle in Tabelle 1 aufgeführten Mutanten wurden mit Hilfe der beschriebenen Analysen eindeutig verifiziert. Benannt sind die Mutanten mit der Position der Aminosäure in der Primärstruktur des GLUT1, wobei die Bezeichnung der nativen Aminosäure vor der Positionsangabe stattfindet. Nach der Positionsangabe folgt die Bezeichnung des Aminosäurerests, der eingeführt wurde. Die Angabe der Aminosäuren wird im Ein-Buchstaben Kode für Aminosäuren durchgeführt.



**Abb. 7:** Fotografierte Gelausschnitte verschiedener Restriktionsfragmentanalysen nach der Agarosegelelektrophorese. In den schwarz unterlegten Kopfzeilen ist über den entsprechenden Spuren das eingesetzte Restriktionsenzym angegeben.

Cys-frei = cysteinfreier GLUT1; Standard = 1 kB DNS-Molekulargewichts-Standard (Gibco, Gaithersburg) dessen angefärbte Banden 12,216; 11,198; 10,180; 9,162; 8,144; 7,126; 6,108; 5,090; 4,072; 3,054; 2,036; 1,636; 1,018; 0,506; 0,396; 0,344; 0,298 und 0,22 kB entsprechen (von oben - meist sind nur die Fragmente von 5,090 bis 0,506 kB unter den gewählten Versuchsbedingungen gut sichtbar).

**Tab. 1:** Zusammenstellung der erzeugten Punktmutanten im cysteinfreien GLUT1. Neben der Mutante sind die für die Mutagenese verwendeten Oligonukleotide mit Angabe des geänderten Basentriplets und der für die Selektion notwendigen Erkennungssequenz des eingesetzten Restriktionsenzym angegeben. Die dadurch bedingte Fragmentgrößenänderung, die in der Restriktionsfragmentanalyse zur Selektion des Klons führte, findet sich in der letzten Spalte.

Mutante <sup>a</sup>	eingesetztes Oligonukleotid in der Mutagenese <sup>b</sup>	Änderung des kodierenden Basentriplets	Restriktionsenzym <sup>c</sup> / Erkennungssequenz	geänderte Fragmentgröße nach Mutation der Erkennungssequenz (Angabe in Basen) <sup>d</sup>
	5' _____ 3' →			
Mutanten in der extrazellulären Schleife 1				
L61C	CTG CCC ACC ACG <b>tgC</b> ACT ACG CTC TGG	CTC → TGC	- PflM I / CCANNNNTGG	3983 zu 4952
T62C	TG CCC ACC ACG CTC <b>tgt</b> ACG CTC TGG TCC	ACC → TGT	- PflM I / CCANNNNTGG	3983 zu 4952
T63C	C ACC ACG CTC ACC <b>tgt</b> CTC TGG TCC CTC T	ACG → TGT	- PflM I / CCANNNNTGG	3983 zu 4952
L64C	CG CTC ACC ACG <b>tgC</b> TGG TCC CTC T	CTC → TGC	- Pml I / CACGTG	ungeschnitten zu linear
W65C	CC ACG CTC <b>TgC</b> TCC CTC TCA <b>Gta</b> GCC ATC T	TGG → TGC	- Msc I / TGGCCA	3990 zu 4893
S66C	G CTC TGG <b>TgC</b> CTC TCA <b>Gta</b> GCC ATC TT	TCC → TGC	- Msc I / TGGCCA	3990 zu 4893
Mutanten im Transmembransegment 2				
L67C	CTC TGG TCC <b>tgC</b> TCA <b>Gta</b> GCC ATC TTT	CTC → TGC	- Msc I / TGGCCA	3990 zu 4893
S68C	TGG TCC CTC <b>Tgt</b> <b>Gta</b> GCC ATC TT	TCA → TGT	- Msc I / TGGCCA	3990 zu 4893
V69C	C TGG TCC CTC TCA <b>tgt</b> GCC ATC TTT TCT GT	GTG → TGT	- Msc I / TGGCCA	3990 zu 4893
A70C	C CTC TCA GTG <b>tgC</b> ATC TTT TCT G	GCC → TGC	- Msc I / TGGCCA	3990 zu 4893
I71C	CTC TCA GTG GCC <b>tgC</b> TTT TCT GTT GG	ATC → TGC	- Msc I / TGGCCA	3990 zu 4893
F72C	CTC TCA GTG <b>Gca</b> ATC <b>Tgt</b> TCT GTT GGG	TTT → TGT	- Msc I / TGGCCA	3990 zu 4893
S73C	C TCA GTG <b>Gca</b> ATC TTT <b>Tgt</b> GTT GGG GG	TCT → TGT	- Msc I / TGGCCA	3990 zu 4893
V74C	C TCA GTG <b>Gca</b> ATC TTT TCT <b>tgt</b> GGG GGC ATG	GTT → TGT	- Msc I / TGGCCA	3990 zu 4893
G75C	TTT TCT GTT <b>tgt</b> GGC ATG ATT <b>Gga</b> TCC TTC TCT	GGG → TGT	+ BamH I / GGATCC	ungeschnitten zu linear
G76C	TCT GTT GGG <b>tGC</b> ATG ATT <b>Gga</b> TCC TTC TCT	GGC → TGC	+ BamH I / GGATCC	ungeschnitten zu linear
M77C	TCT GTT GGG GGC <b>tgt</b> ATT <b>Gga</b> TCC TTC TCT G	ATG → TGT	+ BamH I / GGATCC	ungeschnitten zu linear
I78C	TT GGG GGC ATG <b>tgT</b> <b>Gga</b> TCC TTC TCT	ATT → TGT	+ BamH I / GGATCC	ungeschnitten zu linear
G79C	GC ATG ATT <b>tGC</b> TCC TTC TCT <b>Gta</b> GGC CTT TT	GGC → TGC	+ Stu I / AGGCCT	linear (5716) zu 4948
S80C	TG ATT GGC <b>TgC</b> TTC TCT <b>Gta</b> GGC CTT TT	TCC → TGC	+ Stu I / AGGCCT	linear (5716) zu 4948
F81C	TG ATT GGC TCC <b>TgC</b> TCT <b>Gta</b> GGC CTT TTC G	TTT → TGT	+ Stu I / AGGCCT	linear (5716) zu 4948
S82C	GC TCC TTC <b>Tgt</b> <b>Gta</b> GGC CTT TTC	TCT → TGT	+ Stu I / AGGCCT	linear (5716) zu 4948
V83C	ATG ATT <b>Gga</b> TCC TTC TCT <b>tgC</b> GGC CTT TTC GTT	GTG → TGC	+ BamH I / GGATCC	ungeschnitten zu linear
G84C	ATG ATT <b>Gga</b> TCC TTC TCT GTG <b>tGC</b> CTT TTC	GGC → TGC	+ BamH I / GGATCC	ungeschnitten zu linear

Mutante <sup>a</sup>	eingesetztes Oligonukleotid in der Mutagenese <sup>b</sup> 5' → 3'	Änderung des kodierenden Basentriplets	Restriktionsenzym <sup>c</sup> / Erkennungssequenz	geänderte Fragmentgröße nach Mutation der Erkennungssequenz (Angabe in Basen) <sup>d</sup>
Mutanten im Transmembransegment 2				
L85C	ATG APT G <b>Ga</b> TCC TTC TCT GTG GGC <b>tgT</b> TTC GTT AAC	CTT → TGT	+ BamHI I / GGATCC	ungeschnitten zu linear
F86C	C TTC TCT G <b>Ta</b> GGC CTT <b>TgC</b> GTT AAC CGC	TTC → TGC	+ StuI I / AGGCCT	linear (5716) zu 4948
V87C	C TTC TCT G <b>Ta</b> GGC CTT TTC <b>tgT</b> AAC CGC TTT	GTT → TGT	+ StuI I / AGGCCT	linear (5716) zu 4948
Mutanten in der extrazellulären Schleife 2				
S118C	C TCG AAA C <b>Tc</b> GGC AAG <b>TgC</b> TTT GAG ATG	TCC → TGC	- BsrI I / ACTGGN	890 zu 1144
Mutanten in der extrazellulären Schleife 3				
S178C	GC CTG GAC <b>TgC</b> ATC ATG GGC AAC A <b>Aa</b> GAT CTG TGG	TCC → TGC	- PpuMI I / RGGWCCY	5121 zu linear (5716)
Mutanten im Transmembransegment 7				
I272C	C CGC CAG CCC <b>tgC</b> C <b>Ta</b> ATC GCT GTG	ATC → TGC	- MslI I / CAYNNNNRTG	396 zu 537
L273C	CGC CAG CCC A <b>Ta</b> <b>tgC</b> ATC GCT GTG G	CTC → TGC	+ NsiI I / ATGCAT	ungeschnitten zu linear
I274C	G CCC ATC C <b>Tc</b> <b>tgt</b> G <b>Ca</b> GTG GTG CTG	ATC → TGT	- MslI I / CAYNNNNRTG	396 zu 537
A275C	AG CCC ATC C <b>Ta</b> ATC <b>tgT</b> GTG GTG CTG C	GCT → TGT	- MslI I / CAYNNNNRTG	396 zu 537
V276C	ATC C <b>Tc</b> ATC GCT <b>tgC</b> GTG CTG CAG CTG	GTG → TGC	- MslI I / CAYNNNNRTG	396 zu 537
V277C	TC ATC GCT GTG <b>tgC</b> C <b>Ta</b> CAG CTG TCC C	GTG → TGC	- PstI I / CTGCAG	1645 zu 1756
L278C	ATC GCT GTG GTG <b>tgt</b> C <b>Aa</b> CTG TCC CAG C	CTG → TGT	- PstI I / CTGCAG	1645 zu 1756
Q279C	GCT GTG GTG CTG <b>tgt</b> C <b>Tc</b> TCC CAG CAG CTG	CAG → TGT	+ BsmAI I / GTCTC	2087 zu 523
L280C	GTG GTG CTG CAG <b>tgC</b> TCC C <b>Aa</b> CAG CTG TCT	CTG → TGC	- AlwNI I / CAGNNNCTG	3091 zu 4713
S281C	CTG CAG CTG <b>TgC</b> C <b>Aa</b> CAG CTG TCT	TCC → TGC	- AlwNI I / CAGNNNCTG	3091 zu 4713
Q282C	CTG CAG CTG TCC <b>tgC</b> CAG CTG TCT GGC	CAG → TGC	- AlwNI I / CAGNNNCTG	3091 zu 4713
Q283C	AG CTG TCC CAG <b>tgC</b> C <b>Ta</b> TCT GGC ATC A	CAG → TGC	- AlwNI I / CAGNNNCTG	3091 zu 4713
L284C	CTG TCC CAG CAG <b>tgC</b> TCT GGC ATC AAC	CTG → TGC	- AlwNI I / CAGNNNCTG	3091 zu 4713
S285C	TCC CAG CAG C <b>Ta</b> <b>TgT</b> GGC ATC AAC	TCT → TGT	- AlwNI I / CAGNNNCTG	3091 zu 4713
G286C	C CAG CAG C <b>Ta</b> TCT <b>tgC</b> ATC AAC GCT	GGC → TGC	- AlwNI I / CAGNNNCTG	3091 zu 4713
I287C	C CAG CAG C <b>Ta</b> TCT GGC <b>tgC</b> AAC GCT GTC	ATC → TGC	- AlwNI I / CAGNNNCTG	3091 zu 4713
N288C	CAG CAG C <b>Ta</b> TCT GGC ATC <b>tgC</b> GCT GTC TTC	AAC → TGC	- AlwNI I / CAGNNNCTG	3091 zu 4713
A289C	CAG CAG C <b>Ta</b> TCT GGC ATC AAC <b>tgT</b> GTC TTC TAT	GCT → TGT	- AlwNI I / CAGNNNCTG	3091 zu 4713
V290C	C ATC AAC GCT <b>tgC</b> TTC TAT TAC T	GTC → TGC	- BbsI I / GAAGAC	4399 zu 4826
F291C	AAC GCT GTC <b>TgC</b> TAT TAC TCC	TTC → TGC	- BbsI I / GAAGAC	4399 zu 4826
Y292C	C AAC GCT G <b>Ta</b> TTC <b>TgT</b> TAC TCC AC	TAT → TGT	- BbsI I / GAAGAC	4399 zu 4826

Mutante <sup>a</sup>	eingesetztes Oligonukleotid in der Mutagenese <sup>b</sup>	Änderung des kodierenden Basentriplets	Restriktionsenzym <sup>c</sup> / Erkennungssequenz	geänderte Fragmentgröße nach Mutation der Erkennungssequenz (Angabe in Basen) <sup>d</sup>
	5' → 3' →			
	Mutanten in der extrazellulären Schleife 4			
Y293C	C AAC GCT <b>Gta</b> TTC TAT <b>TgC</b> TCC ACG AG	TAC → TGC	- <i>Bbs</i> I / GAAGAC	4399 zu 4826
S294C	C TTC TAT TAC <b>TgC</b> ACT AGT ATC TTC GAG	TCC → TGC	+ <i>Spe</i> I / ACTAGT	ungeschnitten zu linear
T295C	C TTC TAT TAC <b>TcC</b> <b>tgT</b> AGT ATC TTC <sup>e</sup>	ACG → TGT	- <i>Spe</i> I / ACTAGT	linear zu ungeschnitten
S296C	TTC TAT TAC TCC ACG <b>tgT</b> ATC TTC GAG <sup>e</sup>	AGC → TGT	- <i>Spe</i> I / ACTAGT	linear zu ungeschnitten
I297C	C TTC TAT TAC TCC ACG AGT <b>tgC</b> TTC GAG AAG GC <sup>e</sup>	ATC → TGC	- <i>Spe</i> I / ACTAGT	linear zu ungeschnitten
F298C	C ACG AGC ATC <b>Tgt</b> GAG AAG GCG GG	TTC → TGT	- <i>Taq</i> I / TCGA	486 zu 1024
E299C	ACG AGC ATC TTC <b>tgC</b> AAG GCG GGG GTG	GAG → TGC	- <i>Taq</i> I / TCGA	486 zu 1024
	Mutanten in der extrazellulären Schleife 5			
S368C	TCC TAT CTG <b>tgC</b> ATC <b>Gta</b> GCC ATC TT	AGC → TGC	- <i>Msc</i> I / TGGCCA	823 zu 1726
	Alaninmutanten			
F72A	CTC TCA GTG <b>Gca</b> ATC <b>gct</b> TCT GTT GGG	TTT → GCT	- <i>Msc</i> I / TGGCCA	3990 zu 4893
G286A	C CAG CAG <b>Cta</b> TCT <b>GcC</b> ATC AAC GCT	GGC → GCC	- <i>Alw</i> I / CAGNNCTG	3091 zu 4713
	Selektionsoligonukleotid			
	GAC TCT AGA GGA TCC <b>gCG GcC</b> GAG CTC GAA TTC GT	-	- <i>Sma</i> I / CCCGGG	-

<sup>a</sup> Die Bezeichnung der Mutante erfolgt im Ein-Buchstaben Kode für Aminosäuren. Alle Mutanten basieren auf der 5716 Basen umfassenden Plasmidsequenz des pSP64T-GLUT1 (siehe Kapitel 3.2.1.1), die kein Triplet zur Kodierung nativer Cysteinreste mehr enthielt (cysteinfreier GLUT1).

<sup>b</sup> Die im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1 geänderten Basen der mutagenen Oligonukleotide sind in fettgedruckten Kleinbuchstaben gedruckt. Das fettgedruckte Basentriplett kennzeichnet die gesetzte Mutation, welche zu einem Austausch der Aminosäure führte.

<sup>c</sup> Das für die Selektion eingesetzte Restriktionsenzym ist mit einem Vorzeichen versehen, welches auf die Einführung bzw. Zerstörung der Erkennungssequenz hindeutet.

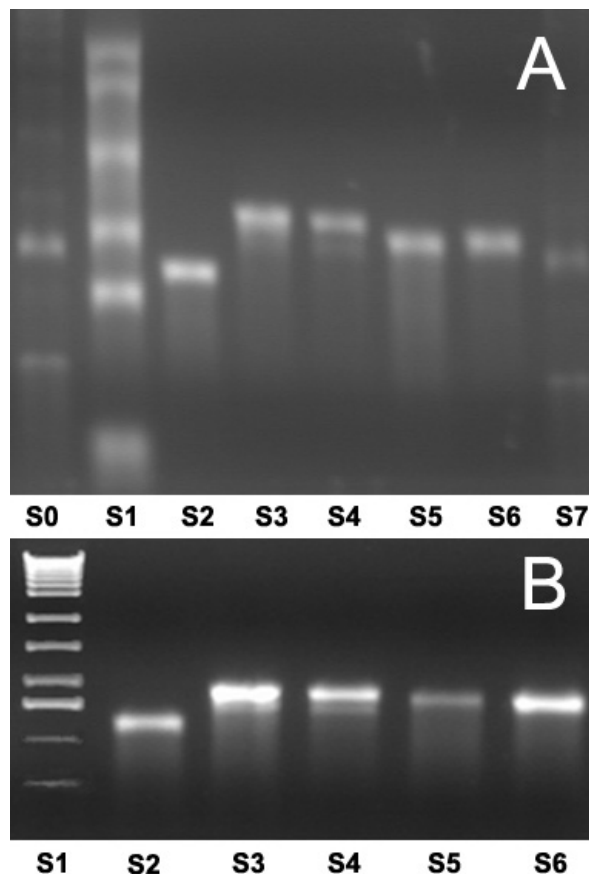
<sup>d</sup> Sofern die Änderung dieser Sequenz nicht durch die Mutation selbst betroffen war, wurde sie im Vergleich zur Sequenz des Basiskonstrukt als stille Mutation gesetzt.

<sup>e</sup> Als linear ist ein einmalig geschnittenes ringförmiges Plasmid zu verstehen, das nach der Agarosegelelektrophorese im Vergleich zu einem ungeschnittenen Plasmid deutlich als scharfe Bande zu unterscheiden ist (siehe Abb. 7, als Beispiel die Restriktion mit *Pml* I, *Bam*HI oder *Spe* I).

<sup>e</sup> Das Mutationsoligonukleotid entsprach gleichzeitig dem Selektionsoligonukleotid. Als Vorlagensequenz diente das Template der Mutante S294C.

### 4.1.2 Beurteilung und Größenbestimmung der synthetisierten RNS

Bevor die synthetisierte RNS der verschiedenen Transportermutanten des GLUT1 in die Oozyten injiziert wurde, erfolgte neben einer quantitativen eine qualitative Analyse durch eine nicht denaturierende Agarosegelelektrophorese. Dabei wurde die RNS im Vergleich zu einem Größenstandard für DNS analysiert (siehe Abb. 8B). Diese Form der qualitativen Analyse der synthetisierten RNS diente in dieser Arbeit als Standardmethode. Um aber einen konkreten Anhaltspunkt für die Größe der synthetisierten RNS zu erhalten, erfolgte für die Größendefinition der Basiskonstrukte eine denaturierende Agarosegelelektrophorese. Diese einmalige Definition war notwendig, da die sekundäre Struktur der Transkripte eine fehlerhafte Migration in einer nicht denaturierenden Agarosegelelektrophorese bewirken kann und multiple Banden auftreten (Ambion-Incorporation, 1997). Die Abbildung 8A zeigt das Foto dieser denaturierenden Agarosegelelektrophorese im Formaldehydgel. In Abb. 8B ist die RNS derselben Konstrukte im Vergleich zu einem DNS-Standard in einem nicht denaturierenden Agarosegel zu sehen.

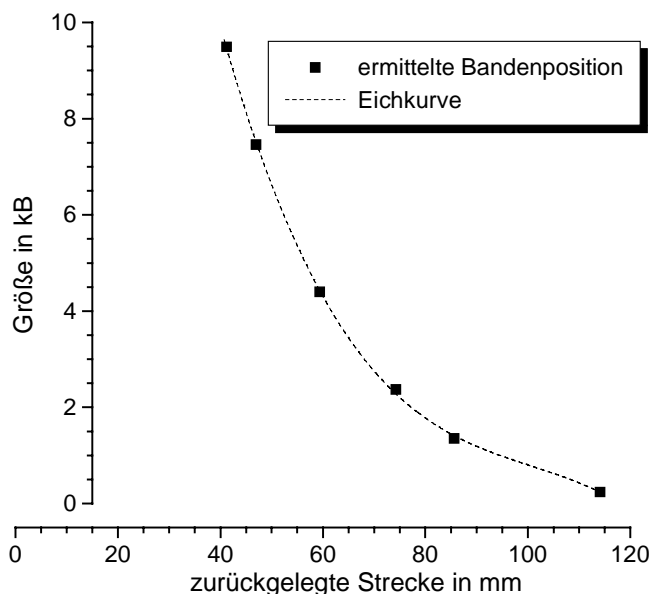


**Abb. 8: A)** Das Foto zeigt die RNS nach der in vitro-Transkription und Linearisierung des Templates mit dem Restriktionsenzym Xba I im 1%igen Formaldehydagarosegel. In Spur 1 (S1) ist der RNS-Molekulargewichts-Standard (Gibco, Gaithersburg) zu sehen, dessen angefärbte Banden 9,49; 7,46; 4,40; 2,37; 1,35 und 0,24 kB entsprechen (von oben). Spur 2 (S2) enthält die RNS des gekürzten GLUT1 (GLUT1-k), Spur 3 (S3) die RNS des GLUT1, Spur 4 (S4) die RNS des cysteinfreien GLUT1, Spur 5 (S5) die RNS des GLUT4, die Spur 6 (S6) RNS des cysteinfreien GLUT4 und die Spuren 0 und 7 (S0 und S7) ribosomalen Standard aus *Saccharomyces cerevisiae* (untere Bande 18S-RNS und obere Bande 28S-RNS).

**B)** Foto einer nicht denaturierenden Agarosegelelektrophorese. Die Spuren 2 bis 6 (S2 bis S6) enthalten die gleiche RNS wie in Abb. 8A beschrieben (siehe oben). Spur 1 zeigt einen 1 kB DNS-

Molekulargewichtsstandard (Gibco, Gaithersburg) und ist unter Abb. 7 detailliert beschrieben.

Auf Basis des in Abbildung 8A dargestellten Fotos wurde mit der Software Origin (Version 5.0, MicroCal, Northampton) eine Eichkurve erstellt und die entsprechenden Größenverhältnisse der RNS kalkuliert (siehe Abb. 9). Die Abstände der Banden zum jeweiligen Startpunkt der RNS, die für eine Eichkurve notwendig sind, wurden vorher mit der Software CorelDraw (Version 8.0, Corel, Ottawa) ermittelt.



**Abb. 9:** Eichkurve abgeleitet aus dem RNS-Standard im Formaldehydagarosegel. Es ergab sich bei einer polynomischen Regression (Formel:  $y = a + b_1 \cdot x + b_2 \cdot x^2 + b_3 \cdot x^3$ ) eine Eichkurve mit dem Regressionskoeffizienten  $R^2$  von 0,99976 und einem Standardfehler von 0,08948.

Anhand der in Abbildung 9 dargestellten Eichkurve wurde für die RNS des GLUT1 eine Molekulargröße von 2575 Basen und des cysteinfreien GLUT1 von 2465 Basen ermittelt. Dies entspricht einer RNS, die aus dem kodierenden Bereich des Gens vom GLUT1 (1479 Basen) und dem nicht kodierenden Bereich (994 Basen) zusammengesetzt ist. Entsprechend geringer wird das Molekulargewicht der RNS, das mit 1650 Basen beim gekürzten GLUT1 ermittelt wurde. Der Fehler bei der Bestimmung der Bandengröße wurde aus dem Vergleich der ermittelten Daten von zwei Proben eines 18S-28S RNS-Standard errechnet. Dieser Standard ist in der Abbildung 8A in den Spuren 0 und 7 zu sehen. Ein Vergleich der ermittelten Bandengrößen dieser beiden Proben, ergab einen relativen Fehler von 10 % und ist bei allen Werten als Fehler anzusetzen. Als Auffälligkeit muss erwähnt werden, dass bei der RNS des ungekürzten GLUT1 sowie des cysteinfreien GLUT1 knapp unterhalb der Hauptbande immer eine schwache Bande zu sehen war. Dieses Phänomen konnte bisher nicht erklärt werden, es liegt aber nahe, dass diese Struktur mit dem nichtkodierenden Bereich des Gens vom GLUT1 zu tun haben muss, da beim gekürzten GLUT1 diese Bande nicht nachzuweisen war.

## 4.2 Funktioneller Teil - Transportaktivitäten und Expression der Mutanten in Oozyten von *Xenopus laevis*

### 4.2.1 Mathematische Definition der basalen Transportaktivität bzw. der Transportaktivität unter Einfluss von Sulfhydrylreagenzien und die zelluläre Verteilung ausgewählter Mutanten in Oozyten von *Xenopus laevis*

Die durch in-vitro-Transkription gewonnene RNS wurde in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert und nach einer Expressionsphase die Änderung der Glucoseaufnahme in diese Oozyten bestimmt. Unter Verwendung von 2-Desoxy-D-Glucose (2-DOG) als Substrat wurde als basale Transportaktivität die Transportleistung definiert, die sich nach Subtraktion des endogenen Transports (Shamwert) von der Gesamtaktivität ergab. Der Vergleich zwischen der basalen Transportaktivität einer Mutante und dem zugrunde

liegenden Ausgangskonstrukt ist ein Maß für den Einfluss der Mutagenese auf die Transportaktivität.

Die Berechnung der relativen basalen Transportaktivität einer einzelnen Oozyte erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität}_{\text{Basal}} = \frac{\left( \text{Messwert}_{\text{Mutante}} - \bar{X}_{\text{Shamwert}} \right) [\text{cpm}]}{\left( \frac{\sum \left( \text{Messwert}_{\text{Ausgangskonstrukt}} - \bar{X}_{\text{Shamwert}} \right)}{n} \right) [\text{cpm}]} \cdot 100 [\%]$$

Werte, die nach Subtraktion des Shamwertes in den negativen Zahlenbereich fielen, wurden gleich 0 gesetzt (Nullwerte). Nach der Formel ergeben sich aus einem Experiment Einzelwerte, die mit dem jeweiligen Mittelwert des Shamwertes verrechnet und in eine relative Beziehung zur Vergleichsgruppe gesetzt wurden. Durch die relative Transportaktivitätsangabe konnte letztlich ein gemeinsamer Mittelwert mit Standardabweichung aus den Einzelwerten mehrerer unabhängig voneinander durchgeführter Versuche berechnet werden. Den mittleren Shamwert eines Experimentes lieferten Oozyten, denen DEPC-H<sub>2</sub>O statt RNS injiziert wurde (Shamgruppe). Sie besaßen eine 4- bis 100-fach geringere Transportkapazität gegenüber Oozyten, denen RNS des Ausgangskonstruktes injiziert wurde. Die mittlere Transportrate eines Experiments für den cysteinfreien GLUT1 lag je nach RNS und Qualität der Oozyten zwischen 0,55 und 4,14 pmol 2-DOG•min<sup>-1</sup>•Oozyte<sup>-1</sup> (ohne Abzug des Shamwertes). Diese Werte entsprachen den von Wellner et al. (Wellner et al., 1995a), Mueckler und Makepeace (Mueckler & Makepeace, 1999) sowie Hruz und Mueckler (Hruz & Mueckler, 1999) veröffentlichten Ergebnissen.

Die Bestimmung der Transportaktivitäten der Mutanten unter Einfluss von Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen wurde ebenfalls nach oben genannter Formel durchgeführt. Die Variable Messwert<sub>Ausgangskonstrukt</sub> wurde durch den Messwert, der ohne Zusatz von Sulfhydrylreagenzien ermittelt wurde, ersetzt. Für die Variable Messwert<sub>Mutante</sub> wurde dagegen der ermittelte Messwert unter Einfluss der eingesetzten Sulfhydrylreagenzien eingetragen. So konnten, wie oben beschrieben, Daten verschiedener Experimentdurchläufe zusammengefasst werden. Dass die nicht transportierenden Oozyten der unbehandelten Gruppen für die Ermittlung des Einflusses der Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen auf die Transportaktivität der Mutanten berücksichtigt wurden, führte nur bei den Mutanten mit einer sehr geringen Basalaktivität zu Verzerrungen in der Transportaktivitätsdarstellung. Dieser Umstand wird in den entsprechenden Kapiteln dieser Arbeit ausführlich diskutiert.

Die örtlich determinierte Einführung eines Cysteinrestes in Verbindung mit der funktionellen Testung dieser Mutanten durch den Einsatz von Sulfhydrylreagenzien, die unterschiedliche physikochemische Eigenschaften besaßen, ermöglichte die Identifikation der Position einer Aminosäure im Protein auf Sekundärstrukturebene. Als Schwefelwasserstoffgruppen sensitive Substanzen wurden p-Chloromercuribenzolsulphonat (pCMBS) und N-Ethylmaleimid (NEM) eingesetzt, wobei die Zellmembran für pCMBS äußerst gering, für NEM dagegen sehr gut permeabel ist (D'Amore & Lo, 1986). In Vorversuchen wurden die Inkubationszeiten und Konzentrationen dieser Sulfhydrylreagenzien mit Bezug auf den endogenen Glucosetransport (Shamwert) und den Transport des cysteinfreien GLUT1 ermittelt. Eine Vorinkubationszeit von 1 h bei



Einsatz einer Konzentration von 2 mM für pCMBS bzw. 10 mM für NEM führte bei mit DEPC-H<sub>2</sub>O injizierten Oozyten zu einer fast vollständigen Hemmung des endogenen Glucosetransports. Beim cysteinfreien GLUT1 wurde unter dem Einfluss von pCMBS keine wesentliche Änderung der Transportaktivität festgestellt ( $110 \pm 40$  % ermittelt aus 39 Versuchen mit insgesamt 630 Oozyten), während NEM die Transportaktivität beeinträchtigt hatte ( $65 \pm 28$  % verbleibende Transportaktivität ermittelt aus 27 Versuchen mit insgesamt 506 Oozyten). Als Substrat wurde in diesen Versuchen statt 2-DOG 3-O-Methyl-D-Glucose (3-OMG) eingesetzt, da NEM eine hemmende Wirkung auf die Hexokinase hat (D'Amore & Lo, 1986). Die Transportraten des cysteinfreien GLUT1 für 3-OMG lagen um das 4- bis 40-fache über dem Shamwert. Das Ausgangskonstrukt transportierte je nach Qualität der Oozyten zwischen 9,80 bis 44,96 pmol 3-OMG $\cdot$ min<sup>-1</sup> $\cdot$ Oozyte<sup>-1</sup> (bei 1 mM 3-OMG, kein Abzug des Shamwertes) und lag damit etwas höher als bei dem von Due et al. untersuchten cysteinfreien GLUT1 (Due et al., 1995a). Due et al. räumen jedoch in ihrer Arbeit ein, dass die präparierten Oozyten nur 20 % der üblich beobachteten Aktivität aufwiesen.

Die zelluläre Verteilung der Transportermutanten, die eine starke Reduktion der Basalaktivität zeigten, wurde durch einen immunologischen Nachweis in fixierten Oozyten mittels konvokaler Lasermikroskopie analysiert (siehe 3.2.2.4). Dieses Verfahren ermöglichte eine visuelle, semiquantitative Beurteilung der Gesamtexpression des Transportproteins in der Zelle und des Targetings zur Plasmamembran. So konnte ermittelt werden, ob die Abnahme der Transportaktivität auf einen veränderten Gehalt an Glucosetransportprotein in der Plasmamembran zurückzuführen ist oder durch eine Änderung der katalytischen Aktivität bedingt wird.

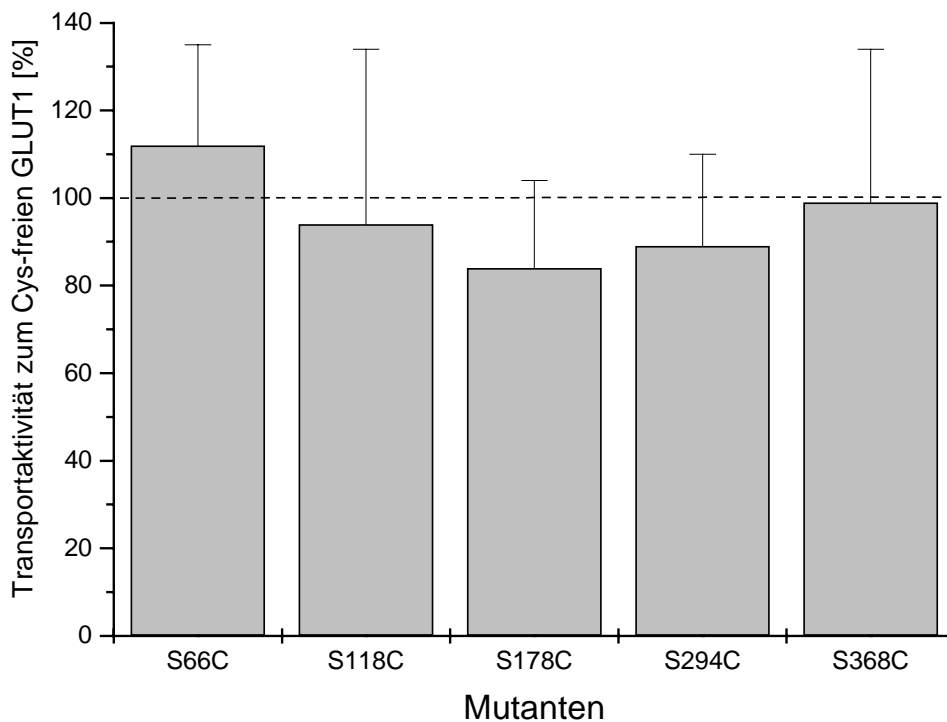
#### **4.2.2 Lokalisierung extrazellulär exponierter Serinreste im cysteinfreien GLUT1 nach Mutation zu Cystein**

Als Voraussetzung für die Cystein-Scanning-Mutagenese mussten Cysteinmutanten gefunden werden, die einerseits keine starke Veränderung der Basalaktivität zeigten, aber andererseits eine Aktivitätsänderung unter Einfluss von Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen aufwiesen. Diese Transportmodifikation war wichtig, da nur auf diese Weise definiert werden konnte, ob eine Reaktion mit diesen Substanzen stattgefunden hat. In einem ersten Schritt wurden einzelne Serinreste in externen Schleifen mit Cystein substituiert. Dieses Vorgehen bot sich an, weil der Aminosäurerest des Serins dem des Cysteins strukturell sehr ähnlich ist und zumindest in dieser Hinsicht durch eine dementsprechende Mutation keine Transportaktivitätsänderung zu erwarten war. Andererseits war davon auszugehen, dass auf der externen Seite der Zellmembran appliziertes pCMBS aufgrund seiner fehlenden Membrangängigkeit ausschließlich mit einer extrazellulär exponierten SH-Gruppe reagieren würde.

##### **4.2.2.1 Basale Transportaktivität der Cysteinmutanten**

Zunächst wurden die in Plasmamembrannähe befindlichen Serinreste der Positionen 66, 118, 178, 294 und 368 jeweils durch einen Cysteinrest mittels gerichteter Mutagenese ersetzt. Nach dem 12erTM-Modell (siehe Abb. 1, Kapitel 1.4) sind diese in der ersten, zweiten, dritten vierten und fünften externen Schleife von insgesamt sechs äußeren Schleifen lokalisiert. Die Ermittlung der Basalaktivität der 5 Mutanten erfolgte aus jeweils 1 bis 2 Experimenten und basierte auf 29 bis 60 Oozyten. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 10 zusammengefasst und zeigen, dass die Transportaktivitäten der 5 Cysteinmutanten im Bereich der katalytischen Aktivität des cysteinfreien GLUT1 lagen. Nur die Mutante in Position 178 hatte mit  $84 \pm 20$  % eine signifikant ( $p = 0,01$ )

geringere Transportaktivität als das Ausgangskonstrukt.

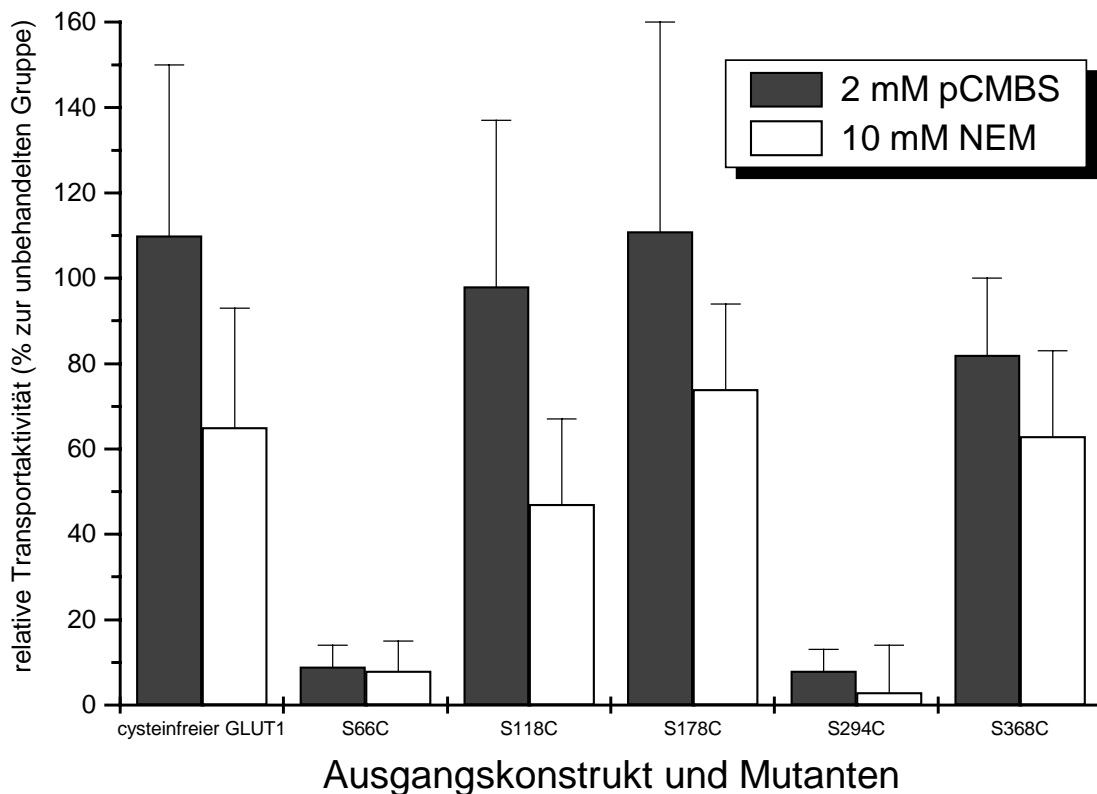


**Abb. 10:** Basale Transportaktivitäten von Cysteinmutanten mit extrazellulärer Lokalisation nach dem 12erTM-Modell (siehe Abb. 1, Kapitel 1.4) im Vergleich zur Aktivität des cysteinfreien GLUT1. Die Daten wurden aus 1 - 2 Experimenten mit je 30 Oozyten gewonnen. Als Substrat diente 2-DOG. Die gestrichelte Linie symbolisiert die Transportaktivität des Ausgangskonstruktes (cysteinfreier GLUT1). Angegeben sind die  $\bar{x} \pm s$ .

Aus den Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass eine Einführung von Cystein auf die Aktivität der mutierten Transporter so gut wie keinen Einfluss hatte.

#### 4.2.2.2 Transportaktivität der Cysteinmutanten unter Einfluss von Sulfhydrylreagenzien

Nach Bestimmung der Basalaktivität wurde eine Analyse der Transportaktivitäten in Anwesenheit von pCMBS und NEM durchgeführt, wobei als Vergleichsgruppe der cysteinfreie GLUT1 diente. Abbildung 11 fasst die Ergebnisse dieser Versuchsreihe graphisch zusammen. In dieser Abbildung ist die Transportaktivität des cysteinfreien GLUT1 aus allen Versuchen, in denen dieses Konstrukt als Vergleich eingesetzt wurde, zusammengefasst wiedergegeben.



**Abb. 11:** Relative Transportaktivitäten der Cysteinmutanten unter dem Einfluss von Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen in Relation zu den jeweils unbehandelten Kontrollgruppen. Die Ergebnisse wurden aus 4 Versuchen nach pCMBS Applikation und 2 - 3 Versuchen nach NEM Zugabe ermittelt. Je 20 - 30 Oozyten wurden pro Gruppe und Versuch eingesetzt. Die Angaben für den cysteinefreien GLUT1 basieren auf 39 unabhängigen Versuchen für pCMBS bzw. 27 für NEM. Als Substrat wurde bei den pCMBS-Gruppen 2-DOG, bei den NEM-Gruppen 3-OMG eingesetzt. Angegeben sind die  $\bar{x} \pm s$ .

Die Transportaktivitäten des cysteinefreien GLUT1 nach Zugabe von pCMBS ermittelt aus 39 Versuchen und unter Einfluss von NEM ermittelt aus 27 Versuchen betragen  $110 \pm 40$  % (pCMBS) bzw.  $65 \pm 28$  % (NEM) in Relation zur Kontrollgruppe. Unter der Einwirkung von NEM war somit eine Reduktion der Transportaktivität des Ausgangskonstruktes festzustellen, die nicht in direktem Zusammenhang mit den Cysteinresten des Glucosetransporters steht. Diese Aktivitätsänderung ist bei der Beurteilung der Transportaktivitäten der Mutanten zu berücksichtigen.

Unter dem Einfluss der Sulphydrylreagenzien waren die Transportaktivitäten der Mutanten S66C ( $9 \pm 5$  % pCMBS bzw.  $8 \pm 7$  % NEM) und S294C ( $8 \pm 5$  % pCMBS bzw.  $3 \pm 11$  % NEM) im Vergleich zum Ausgangskonstrukt stark reduziert. Eine leichte Reduktion der Transportaktivität war mit  $82 \pm 18$  % unter dem Einfluss von pCMBS bei der Mutante S368C festzustellen. Unter NEM-Einfluss nahm die Aktivität dieser Mutante im gleichen Maße wie beim cysteinefreien GLUT1 auf  $63 \pm 20$  % ab. Die Transportaktivitäten der Transporter nach Mutation der Positionen 118 ( $98 \pm 39$  % pCMBS bzw.  $47 \pm 20$  % NEM) und 178 ( $111 \pm 49$  % pCMBS bzw.  $74 \pm 20$  % NEM) wiesen keine wesentlichen Unterschiede zum cysteinefreien GLUT1 auf. Aufgrund ihrer normalen Basalaktivität und der starken Reduktion ihrer Transportaktivität unter dem Einfluss von beiden Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen konnten mit den Mutanten S66C und S294C in der ersten und der vierten extrazellulären Schleife

zwei Positionen identifiziert werden, die einen idealen Ausgangspunkt für die Durchführung der Cystein-Scanning-Mutagenese darstellen.

### **4.2.3 Cystein-Scanning-Mutagenese im cysteinfreien GLUT1**

Die Cystein-Scanning-Mutagenese mit dem kombinierten Einsatz von Sulfhydrylreagenzien war Voraussetzung für die strukturelle Analyse eines Proteins auf Sekundärstrukturebene. Es werden jeweils verschiedene native Aminosäuren eines bestimmten Bereichs nacheinander durch Cystein ersetzt, so dass jede Mutante nur eine potentiell reaktive SH-Gruppe aufweist. Anschließend werden die funktionellen Eigenschaften der Transportermutanten unter dem Einfluss von Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen untersucht. Die in Abhängigkeit von den physikochemischen Eigenschaften dieser eingesetzten Substanzen (lipophile vs hydrophile Eigenschaften, die eine Membranpermeabilität bestimmen) gewonnenen Daten, erlauben Rückschlüsse auf die Struktur des untersuchten Proteins.

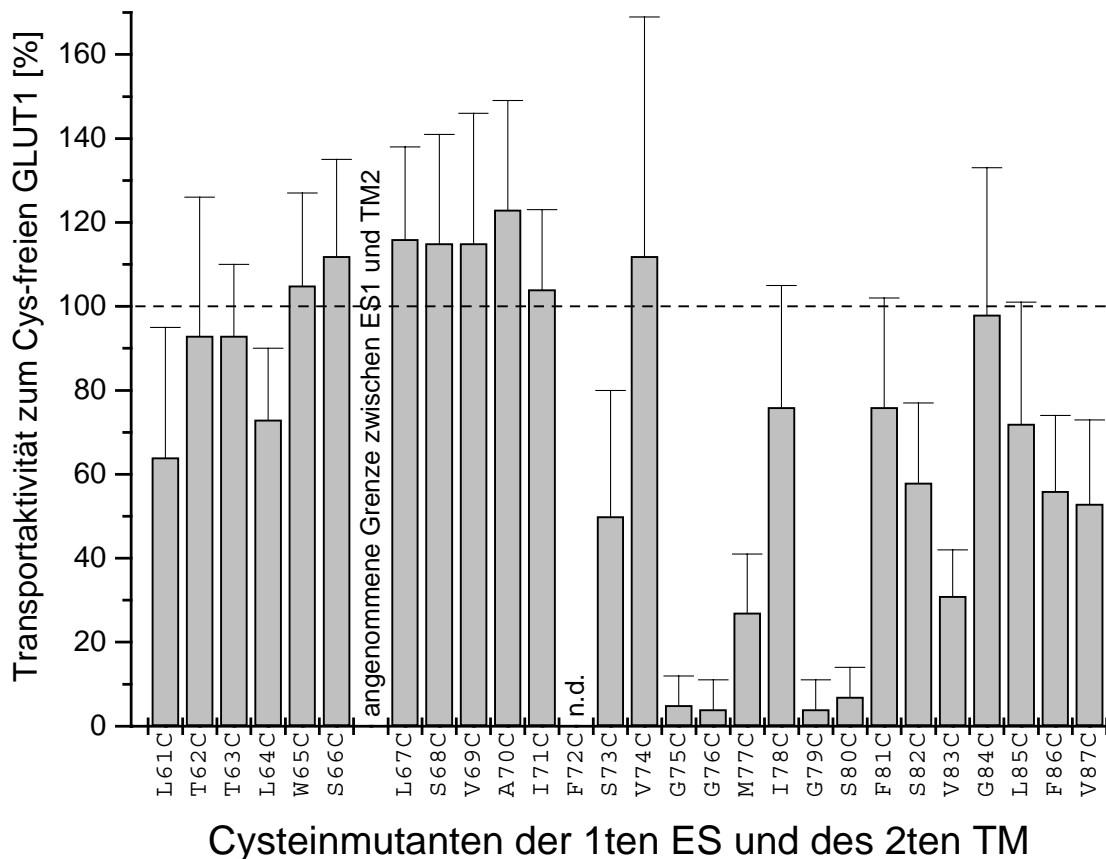
Wie unter 4.2.2.2 dargelegt, wiesen die Cysteinmutanten S66C und S294C die notwendigen Eigenschaften auf, um in diesen Regionen erfolgversprechend die Cystein-Scanning-Mutagenese in Kombination mit Sulfhydrylreagenzien durchführen zu können. Es wurden zunächst von den Positionen 66 und 294 ausgehend weitere Cysteinmutanten in N- und C-terminaler Richtung hergestellt.

#### **4.2.3.1 Die erste Region - Aminosäuren aus der ersten extrazellulären Schleife und des gesamten putativen zweiten Transmembransegments**

Mit Bezug auf die untersuchten extrazellulären Schleifen des cysteinfreien GLUT1, konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Mutante S66C durch pCMBS und NEM stark gehemmt wird. Daher wurde die Cystein-Scanning-Mutagenese auf die nativen Aminosäuren der Positionen 61 bis 87 ausgedehnt und anschließend die mutierten Transportproteine funktionell getestet. Nach dem 12erTM-Modell (Abb. 1, Kapitel 1.4) umfasste die untersuchte Region Teile der ersten extrazellulären Schleife (Aminosäurepositionen 61 - 66) und das komplette zweite Transmembransegment (Aminosäurepositionen 67 - 87).

##### **4.2.3.1.1 Basale Aktivitäten der Cysteinmutanten**

Zunächst wurden die Cysteinmutanten im Hinblick auf ihre Basalaktivität getestet. Die basalen Transportaktivitäten der mutierten Transporter geben Auskunft darüber, welche Bedeutung einer individuellen nativen Aminosäure in einer bestimmten Position des Proteins zukommt und/oder welche Konsequenz die Insertion eines Cysteinrestes an dieser Stelle für die katalytische Aktivität des Transporters hat. In Abbildung 12 wird ein Überblick über die Untersuchungsergebnisse dieser Region gegeben. Die Mittelwerte einschließlich der Streuungen sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.



**Abb. 12:** Basale Transportaktivitäten der Cysteinmutanten in der ersten Region (Teile der ersten extrazellulären Schleife (ES) und das komplette zweite Transmembransegment (TM)) im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1. Die Mutanten sind im Einbuchstaben-Kode für Aminosäuren angegeben. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die 100 %-Aktivität des Ausgangskonstrukts (cysteinfreier GLUT1), zu der die Transportaktivitäten der Mutanten rechnerisch in Beziehung gesetzt wurden. Angegeben sind die  $\bar{x} \pm s$ ; n. d. = nicht detektierbar.

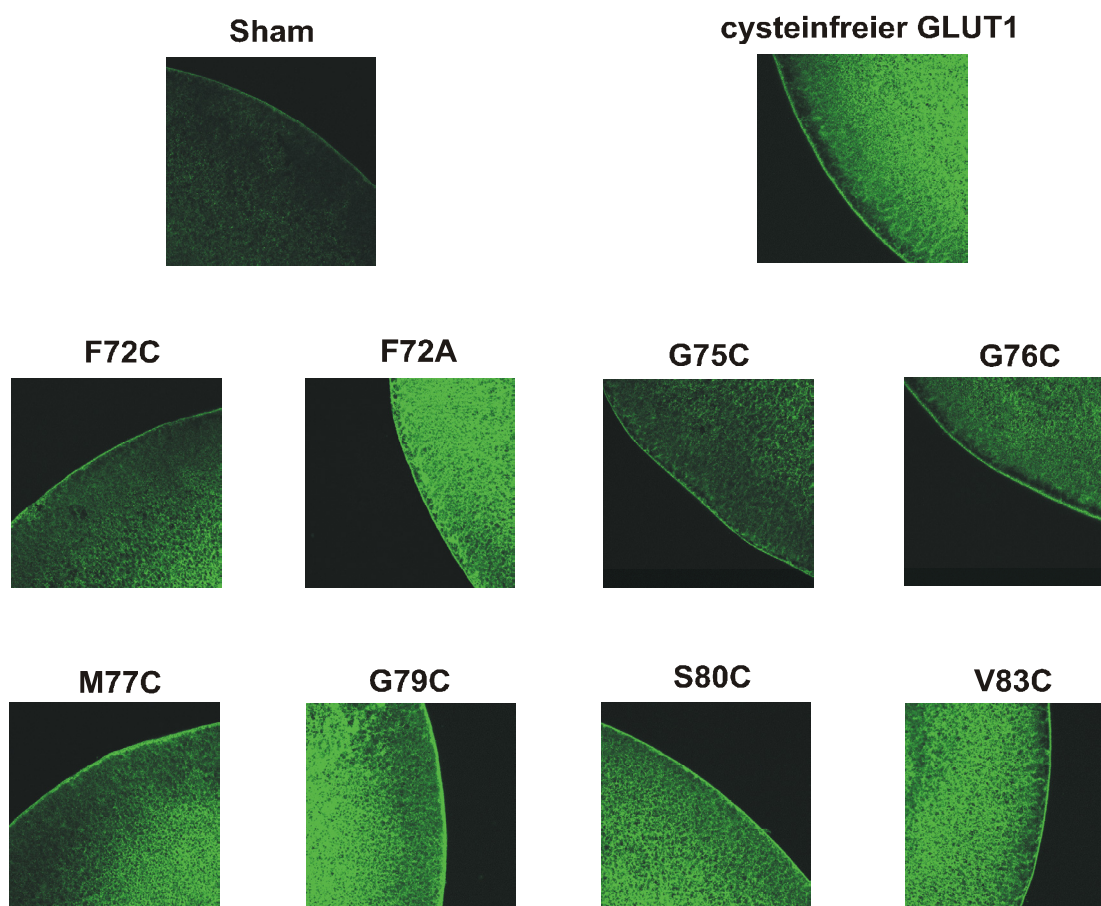
In dieser untersuchten Region wurden von den 27 Mutanten 5 ermittelt, die allein aufgrund der Einführung eines Cysteinrestes eine Abnahme der basalen Transportaktivität von über 90 % im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1 zeigten. Die Aktivitätsabnahme war zum Teil so stark, dass die Messergebnisse im Fehlerbereich der Methode lagen und Aussagen über die Transportaktivitäten dieser Mutanten nicht mit der gewohnten Sicherheit gemacht werden konnten. So lagen die Transportwerte der Mutante F72C bei 63 von 115 gemessenen Oozyten im negativen Zahlenbereich. Auffällig war, dass zu dieser Gruppe neben dem Phenylalanin in Position 72 und dem Serin in Position 80 (von 98 Oozyten wiesen 17 einen rechnerischen Transportwert unter Null auf) auch eine Häufung von 3 Glycinresten (in den Positionen 75, 76 und 79) vertreten war (gesetzte Nullwerte siehe Tab. 2).

Weiterhin wurde festgestellt, dass die Mutanten M77C und V83C einen Transportaktivitätsverlust von über 50 % aufwiesen. Alle anderen Cysteinmutanten aus der untersuchten Region, bis auf das Serin in Position 73 ( $50 \pm 30$  % basale Transportaktivität), hatten deutlich höhere basale Transportaktivitäten mit mehr als 50 % des Ausgangskonstrukts. Bei der Mehrzahl der Punktmutanten führte die Einführung eines Cysteinrestes nicht zu einer Transportänderung. Trat sie auf, schien dieser Effekt nicht auf die betreffende individuelle Aminosäureposition beschränkt zu

sein, sondern war auch in der unmittelbaren Umgebung dieser Position nachweisbar (d. h. benachbarte Cysteinmutanten zeigen auch eingeschränkte Transportaktivitäten).

#### 4.2.3.1.2 Expression und intrazelluläre Verteilung der mutierten Transportproteine

Diejenigen Mutanten, die eine deutlich geringere Basalaktivität als 50 % des cysteinfreien GLUT1 aufwiesen, wurden hinsichtlich ihrer zellulären Verteilung in X. Oozyten analysiert. Dies betraf in der ersten Region die Mutanten F72C, G75C, G76C, M77C, G79C, S80C und V83C. Zusätzlich zu diesen Cysteinmutanten wurde für jene, die nach der Einführung des Cysteinrestes die geringste basale Aktivität in dieser Region aufwiesen (F72C), eine Alaninmutante an dieser Position erzeugt. Der immunologische Nachweis in der Zelle erfolgte mit Hilfe der konvokalen Laserlichtmikroskopie. In Abbildung 13 sind die fluoreszenzmarkierten Transporteremutanten unter Einsatz der konvokalen Laserlichtmikroskopie dargestellt.



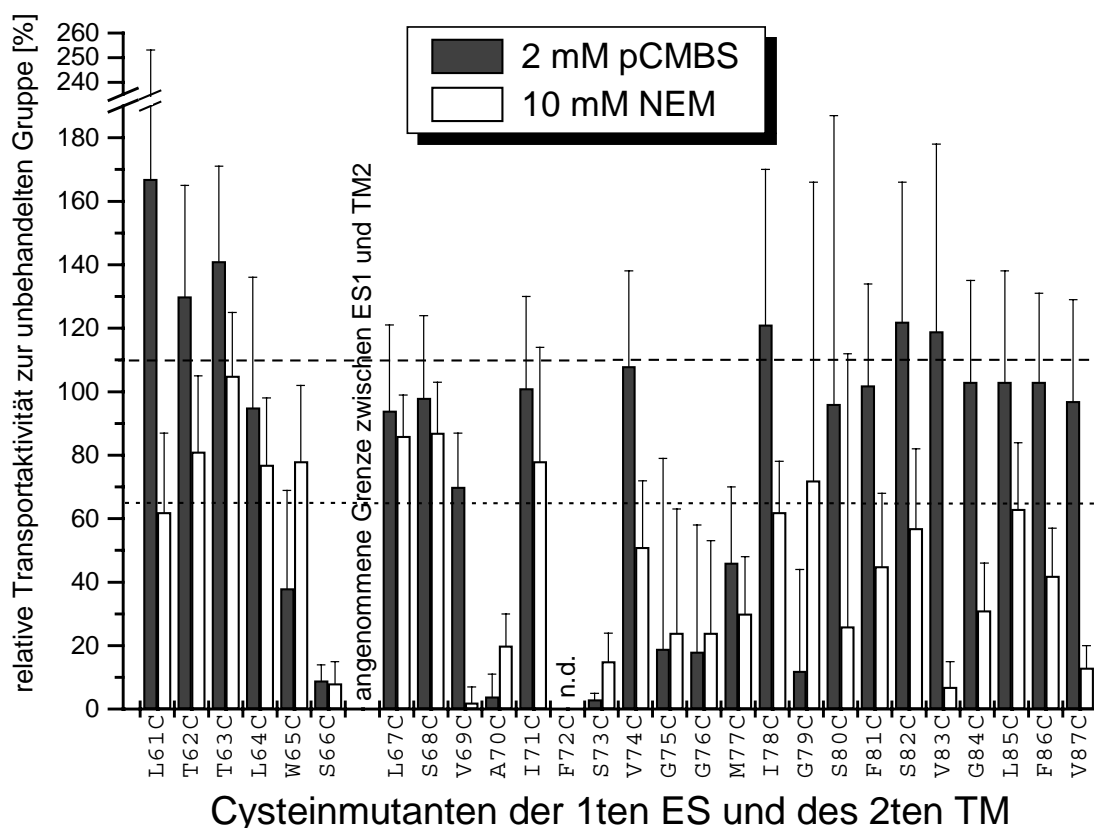
**Abb. 13:** Exemplarische Bildausschnitte der digitalen Daten aus der konvokalen Laserlichtmikroskopie von der Oberfläche halbierter X. Oozyten. Dargestellt sind die Cysteinmutanten der ersten untersuchten Region des GLUT1, deren basale Transportaktivitäten im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1 deutlich unter 50 % lagen sowie die erzeugte Alaninmutante auf Position 72. Grün eingefärbte Regionen spiegeln die Anregung des zweiten FITC-konjugierten Antikörpers wieder. Dieser ist gegen den primären Peptidantikörper AK1462 des GLUT1 gerichtet. Die ermittelten Basalaktivitäten der Transporter zu den abgebildeten Oozyten lagen im Rahmen der in Tabelle 2 angegebenen Daten (siehe Kapitel 4.2.3.3).

Die grüne Einfärbung in den Bildern stellt die Fluoreszenz des FITC-konjugierten Antikörpers dar. Er bindet an den primären Peptidantikörper des GLUT1, der gegen die letzten 15 Aminosäuren des C-terminalen Endes des GLUT1 gerichtet ist. Bei einem Vergleich der Aufnahmen zwischen dem cysteinfreien GLUT1 und der DEPC-H<sub>2</sub>O injizierten Gruppe sind deutliche quantitative Unterschiede in Dichte und Verteilung der Glucosetransportproteine auszumachen. So ist die Verteilung des cysteinfreien GLUT1 sowohl in der Plasmamembran als auch in zellulären Vesikeln als grünes Band deutlich sichtbar im Gegensatz zur Verteilung in DEPC-H<sub>2</sub>O injizierten Oozyten (Shamgruppe). Tendenziell kann dies auch für alle anderen Transportermutanten gesagt werden. Die Mutanten F72C, G75C und G76C zeigten zwar im Vergleich zur Shamgruppe eine erhöhte Anfärbung im Zellinneren und in der Plasmamembran, wiesen allerdings eine deutlich geringere Anfärbung verglichen mit dem cysteinfreien GLUT1 auf. Daher kann für diese Mutanten angenommen werden, dass der Rückgang der Transportaktivität nicht allein auf strukturelle und/oder funktionelle Änderungen durch die Mutation zurückzuführen ist, sondern auch, zumindest zum Teil, durch eine verringerte Expression des Transporters bedingt wird.

Eine besonders starke Anfärbung, die jene des cysteinfreien GLUT1 an Intensität übersteigt, zeigten die Mutanten G79C und F72A. Da die durchschnittliche Transportaktivität dieser Mutanten mit  $4 \pm 7\%$  bzw.  $1 \pm 4\%$  (für F72A) Restaktivität erheblich unterhalb der des Ausgangskonstruktes liegt, ist die Annahme gerechtfertigt, dass durch eine einzelne Punktmutation die Struktur und dadurch die Funktionseigenschaft des Transporters stark beeinträchtigt wird. Selbst bei erhöhter Expression des Proteins kann nur eine geringe zelluläre Glucoseaufnahme erreicht werden. Die anderen Transportermutanten liegen hinsichtlich der Expressionsstärke nach Beurteilung der Anfärbeintensität im Bereich derjenigen des Basiskonstruktes. Hier ist davon auszugehen, dass durch die Punktmutation die für den Transport wichtigen Eigenschaften wie z. B. eine schnelle Konformationsänderung mit Einführung des Cysteinrestes stark beeinträchtigt werden.

#### **4.2.3.1.3 Extrazelluläre Applikation von pCMBS und NEM**

Die Cysteinmutanten der ersten extrazellulären Schleife und des zweiten Transmembransegments wurden unter Einfluss der beiden Sulfhydrylreagenzien pCMBS und NEM funktionell getestet. Zur Auswertung wurden die ermittelten Transportraten zu den Ergebnissen eines parallel durchgeführten Ansatz in Beziehung gesetzt, der ohne Einfluss dieser Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen stattfand. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 14 dargestellt. Die Werte einschließlich der Streuungen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.



**Abb. 14:** Relative Transportaktivitäten der Cysteinmutanten aus der ersten extrazellulären Schleife (ES) und dem zweiten Transmembransegment (TM) unter dem Einfluss von pCMBS bzw. NEM in Relation zum unbehandelten Ansatz. Die gestrichelte Linie entspricht der Restaktivität des cysteinfreien GLUT1 unter Einfluss von pCMBS, die gepunktete Linie derjenigen unter Einfluss von NEM. Die Transportsubstrate waren 2-DOG (pCMBS) bzw. 3-OMG (NEM). Pro Aminosäureposition wurden Daten aus 3 - 6 Versuchen mit insgesamt 49 - 159 Oozyten für pCMBS und aus 2 - 3 Versuchen mit insgesamt 44 - 88 Oozyten für NEM gewonnen. Angegeben sind die  $\bar{x} \pm s$ ; n. d. = nicht detektierbar.

Die meisten der 27 untersuchten Mutanten aus der ersten Region zeigten unter dem Einfluss von pCMBS wie der cysteinfreie GLUT1 ( $110 \pm 40\%$ ) keine Einbuße hinsichtlich der Transportaktivität. Die Transportmodifikation unter Einfluss von NEM lag ebenfalls bei den meisten Mutanten im Bereich der des Ausgangskonstruktes ( $65 \pm 28\%$ ).

Starke Reduktionen in der Transportrate wurden bei den Mutanten S66C ( $9 \pm 5\%$  pCMBS bzw.  $8 \pm 7\%$  NEM), A70C ( $4 \pm 7\%$  bzw.  $20 \pm 10\%$ ), S73C ( $3 \pm 2$  bzw.  $15 \pm 9\%$ ) und M77C ( $46 \pm 24$  bzw.  $30 \pm 18\%$ ) unter Einfluss beider Sulphydrylreagenzien pCMBS und NEM beobachtet.

Die Mutanten G75C und G76C waren für beide Substanzen empfindlich, die Mutante G79C dagegen nur für pCMBS und die Mutante S80C nur für NEM. Die vier letztgenannten Glucosetransporter stellen allerdings Spezialfälle dar, deren Besonderheiten zusammen mit der nicht detektierbaren Mutante F72C weiter unten diskutiert werden.

Gravierende Unterschiede in ihrer Wirkung auf den Transport zeigten die Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen in bezug auf die Mutanten V69C, V83C und V87C, die unter Einfluss von NEM sehr starke Transportreduktionen aufwiesen ( $2 \pm 5\%$  für V69C;  $7 \pm 8\%$  für V83C;  $13 \pm 7\%$  für V87C) unter pCMBS-Einfluss aber nicht ( $70 \pm 17\%$  für V69C;  $119 \pm 59\%$  für V83C;  $97 \pm 32\%$  für V87C).



Den umgekehrten Fall zeigte die Mutante W65C, die mit  $38 \pm 31$  % Restaktivität eine starke Transportreduktion unter pCMBS-Einfluss aufwies, aber mit  $78 \pm 24$  % Restaktivität unter NEM-Einfluss im Bereich des cysteinfreien GLUT1 lag. Eine Zunahme der Transportaktivität unter dem Einfluss von pCMBS wurde bei den Mutanten L61C, T62C und T63C mit  $167 \pm 86$  %,  $130 \pm 35$  % und  $141 \pm 30$  % beobachtet.

Besonders hervorzuheben sind die Transportraten derjenigen Cysteinmutanten, die weniger als 10 % Basalaktivität aufwiesen. Wie aus den Ausführungen des Abschnitts 4.2.3.1.1 deutlich wird, lagen die Basalaktivitäten der Mutanten F72C, G75C, G76C, G79C und S80C an der Nulllinie. Die rechnerischen Werte für die Mutante F72C waren dabei so gering, dass eine Aussage zur Transportaktivität nicht sinnvoll erschien. Da schon die Punktmutationen zu Transportproteinen mit einer erheblich reduzierten Transportaktivität führte, waren rechnerisch geringe oder negative Transportwerte unter dem Einfluss der eingesetzten Sulfhydrylreagenzien zu erwarten. Bei der Mutante G75C fielen unter Verwendung von pCMBS die Werte von 38 der gemessenen 79 Oozyten nach Subtraktion des Shamwertes unter den Nullwert, beim NEM-Ansatz waren es 28 von 60 Oozyten. Mit 30 von 74 (pCMBS) bzw. 22 von 60 Oozyten (NEM) lagen ebenfalls knapp 50 % der Werte der untersuchten Oozyten der Mutante G76C im negativen Bereich. Ähnliche Verteilungen ergaben sich für die Mutanten G79C (33 von 88 Oozyten für pCMBS bzw. 23 von 57 für NEM). Demzufolge war eine gesicherte Aussage über die Transportaktivitäten der betroffenen Mutanten unter dem Einfluss der Sulfhydrylreagenzien nicht möglich.

Auf der Grundlage des 12erTM-Modells (siehe Abb. 1, Kapitel 1.4) lassen sich die Transportmodifikationen durch pCMBS folgendermaßen interpretieren: Cysteinmutationen in Schleifenpositionen in unmittelbarer Nähe zur Membrangrenze sind in Kombination mit Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen an einem hemmenden Effekt auf die Transportaktivität beteiligt. Die Sensitivität der Cysteinmutanten für pCMBS nimmt mit Abstand von der Membran ab bzw. lässt sogar eine geringfügige Erhöhung des Glucosetransports erkennen. Die geringe Transporthemmung durch pCMBS bei der Mutante V69C ( $70 \pm 17$  % Restaktivität) im zweiten Transmembransegment steht im Gegensatz zu der deutlichen Hemmung durch das membrangängige NEM ( $2 \pm 5$  % Restaktivität). Die experimentellen Daten stützen die Annahme, dass die Grenze zwischen externer Schleife und Transmembransegment durch die Aminosäuren in den Positionen 66 und 67 definiert wird. Aufgrund der membranimpermeablen Eigenschaften von pCMBS sollten Cysteinmutanten, die nach dem Sekundärstrukturmodell im zweiten Transmembransegment liegen, entsprechend der Arbeitshypothese nach extrazellulärer Applikation dieser Substanz keine Transportaktivitätsänderung zeigen. Im Bereich des Transmembransegments, das in der externen Membranhälfte liegt, konnten aber 3 Cysteinmutanten (Positionen) identifiziert werden, die nach Inkubation mit pCMBS mit einer deutlichen Abnahme der Transportaktivität reagierten. Die Anordnung der pCMBS-sensitiven Positionen verteilt sich über den Bereich der Aminosäurepositionen 70 bis 77. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass bestimmte Aminosäuren (Positionen) des putativen zweiten Transmembransegments für in Wasser gelöste, hydrophile Stoffe zugänglich sind.

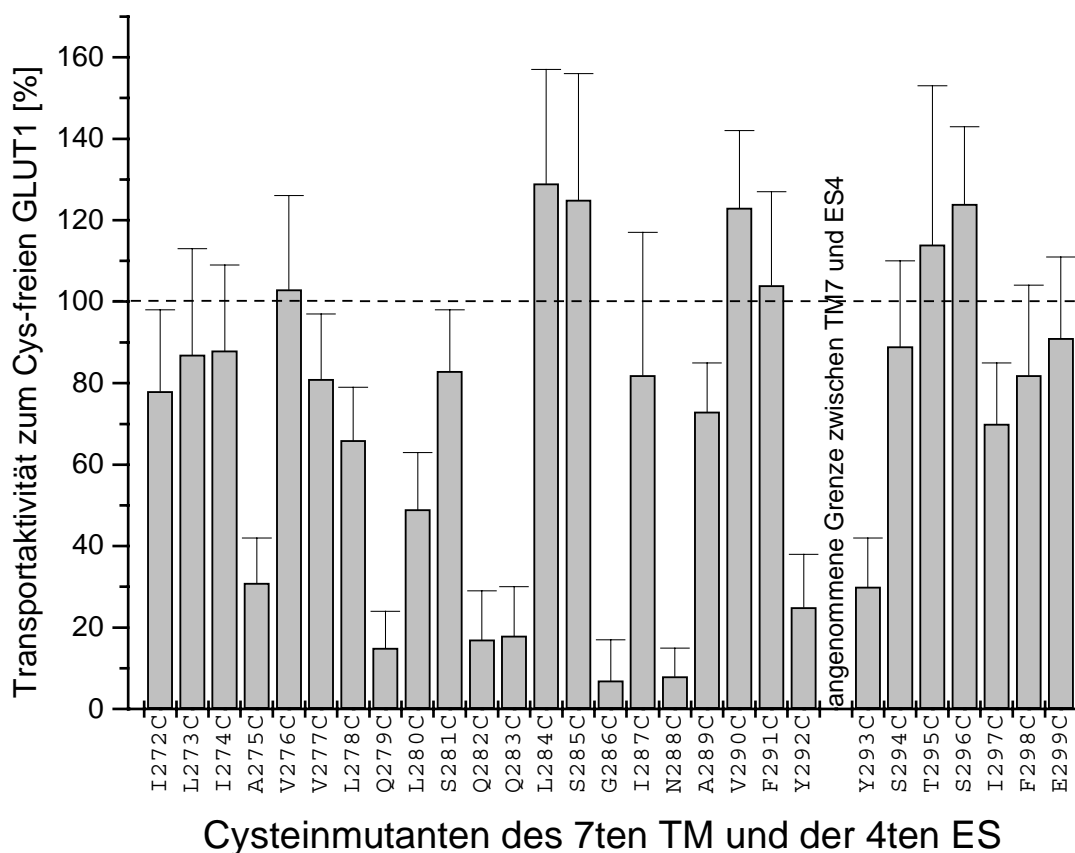
#### **4.2.3.2 Die zweite Region - Aminosäuren des gesamten putativen siebenten Transmembransegments und der vierten extrazellulären Schleife**

Mit der Aminosäure in Position 294 wurde auch in der vierten extrazellulären Schleife ein Serinrest nachgewiesen, der nach Mutation in ein Cystein zu einem Transportprotein führte, das eine starke Transportreduktion unter Einfluss von Sulfhydrylreagenzien

zeigte. Die von dieser Position ausgehende Cystein-Scanning-Mutagenese betraf die nativen Aminosäuren der Positionen 272 bis 299. Diese zweite untersuchte Region umfasst nach dem 12erTM-Modell (Abb. 1, Kapitel 1.4) ebenfalls ein komplettes Transmembransegment (Aminosäurepositionen 272 - 292) und einen Teil der vierten extrazellulären Schleife (Aminosäurepositionen 293 - 299). Die Cysteinmutanten wurden analog zu den Mutanten der ersten Region funktionell charakterisiert.

#### 4.2.3.2.1 Basale Aktivität der Cysteinmutanten

Zunächst wurden wie in der ersten untersuchten Region die Cysteinmutanten im Hinblick auf ihre Basalaktivität getestet. In Abbildung 15 sind die Daten grafisch dargestellt, während die zugrunde liegenden Werte einschließlich der Streuungen der Tabelle 2 (siehe 4.2.3.3) zu entnehmen sind.



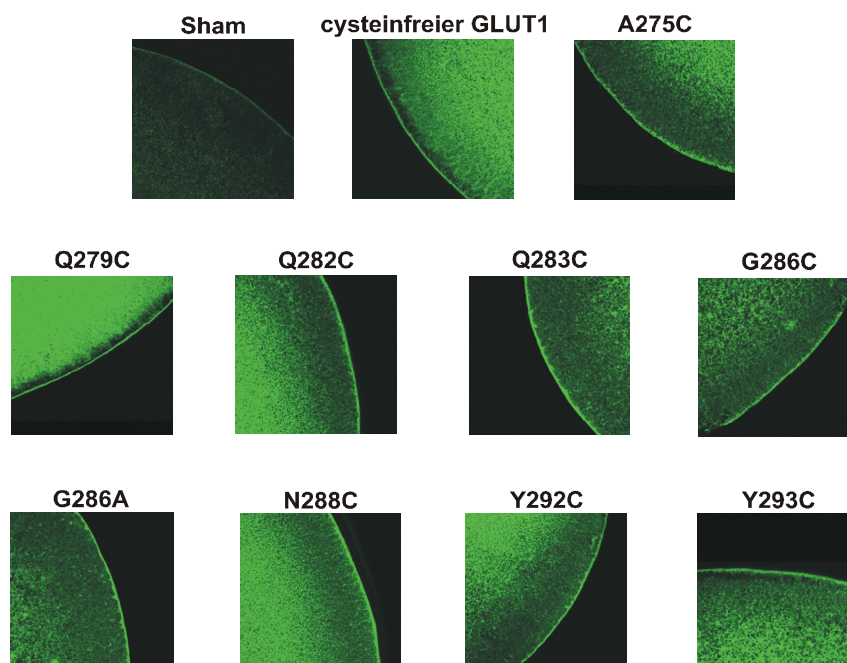
**Abb. 15:** Basale Transportaktivitäten der Cysteinmutanten in der Region des siebten Transmembransegments (Aminosäurepositionen 272 bis 292) und Teilen der vierten extrazellulären Schleife (Aminosäurepositionen 293 bis 299) im Vergleich zum Ausgangskonstrukt, dem cysteinfreien GLUT1. Die Mutanten sind im Ein-Buchstaben-Kode für Aminosäuren angegeben. Die gestrichelte Linie symbolisiert die 100 %ige Aktivität des Ausgangskonstrukt, die für die Berechnung der relativen Transportaktivitäten der Mutanten zugrunde gelegt wurde. Angegeben sind die  $\bar{x} \pm s$ .

Insgesamt wurden für die zweite Region 28 Mutanten erzeugt, in denen jeweils eine native Aminosäure nach der anderen in Cysteinreste verändert wurde. Während in der ersten Region 5 Cysteinmutanten eine relative basale Transportaktivität von weniger als 10% in Relation zum cysteinfreien GLUT1 aufwiesen, waren es in dieser Region nur zwei Mutanten: G286C mit  $7 \pm 10$  % und N288C mit  $8 \pm 7$  %. Eine Beurteilung der Transportaktivität der Mutante G286C ist nicht mit Sicherheit abzugeben, da 38 von 80

ausgewerteten Oozyten, die diese Mutante exprimierten, rechnerisch in den negativen Zahlenbereich fielen. Bei der Mutante N288C ist die basale Aktivität zwar sehr gering, liegt jedoch in mehreren Versuchen mehrheitlich über dem endogenen Glucosetransport (nur 10 von 70 ausgewerteten Oozyten mussten in der Auswertung auf 0 gesetzt werden). Sechs weitere Cysteinmutanten wurden identifiziert, die eine basale Aktivität aufwiesen, die weniger als 50 % in Relation zu der des cysteinfreien GLUT1 betrug. Diese Mutationen betrafen die beiden Tyrosine in Position 293 und 292, die nach dem 12erTM-Modell den Membranübergang zur zytoplasmatischen Schleife definieren, und darüber hinaus die im Transmembransegment 7 liegenden Glutamine Q283, Q282 und Q279 sowie das Alanin in Position 275. Analog zu den mutierten nativen Glycinen in der ersten Region sind es in dieser zweiten Region drei eng beieinander liegende native Glutaminreste, deren Transportermutanten eine deutliche Abnahme der Basalaktivität nach Ersatz durch Cystein aufwiesen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der individuelle Ersatz der meisten Aminosäuren mit einem Cysteinrest zu keiner Transportänderung führt. Wenn sie nachweisbar war, blieb sie nicht auf diese einzelne Aminosäureposition beschränkt, sondern wurde auch durch ersetzte Aminosäuren in benachbarten Positionen hervorgerufen. Diese allgemeine Aussage konnte auch schon für die erste untersuchte Region getroffen werden (siehe 4.2.3.1.1).

#### 4.2.3.2.2 Expression und intrazelluläre Verteilung der mutierten Transportproteine

Auch in dieser Region wurden die Cysteinmutanten in Bezug auf ihre zelluläre Verteilung in X. Oozyten analysiert. Als Auswahlkriterium für die zu exprimierenden Transportproteine galt ebenfalls die deutliche Abnahme der basalen Transportaktivität unter 50 % in Relation zum cysteinfreien GLUT1. Dementsprechend wurden in der zweiten Region die Mutanten A275C, Q279C, Q282C, Q283C, G286C, N288C, Y292C und Y293C untersucht. Ebenso wie in der ersten Region wurde auch hier eine Alaninmutante auf der Position erzeugt, die nach der Einführung des Cysteinrestes die geringste basale Aktivität innerhalb der untersuchten Region aufwies (G286C). Die Abbildung 16 stellt die mit Hilfe der konvokalen Laserlichtmikroskopie aufgenommenen Bilder der fluoreszenzmarkierten Transportermutanten in halbierten Oozyten dar.



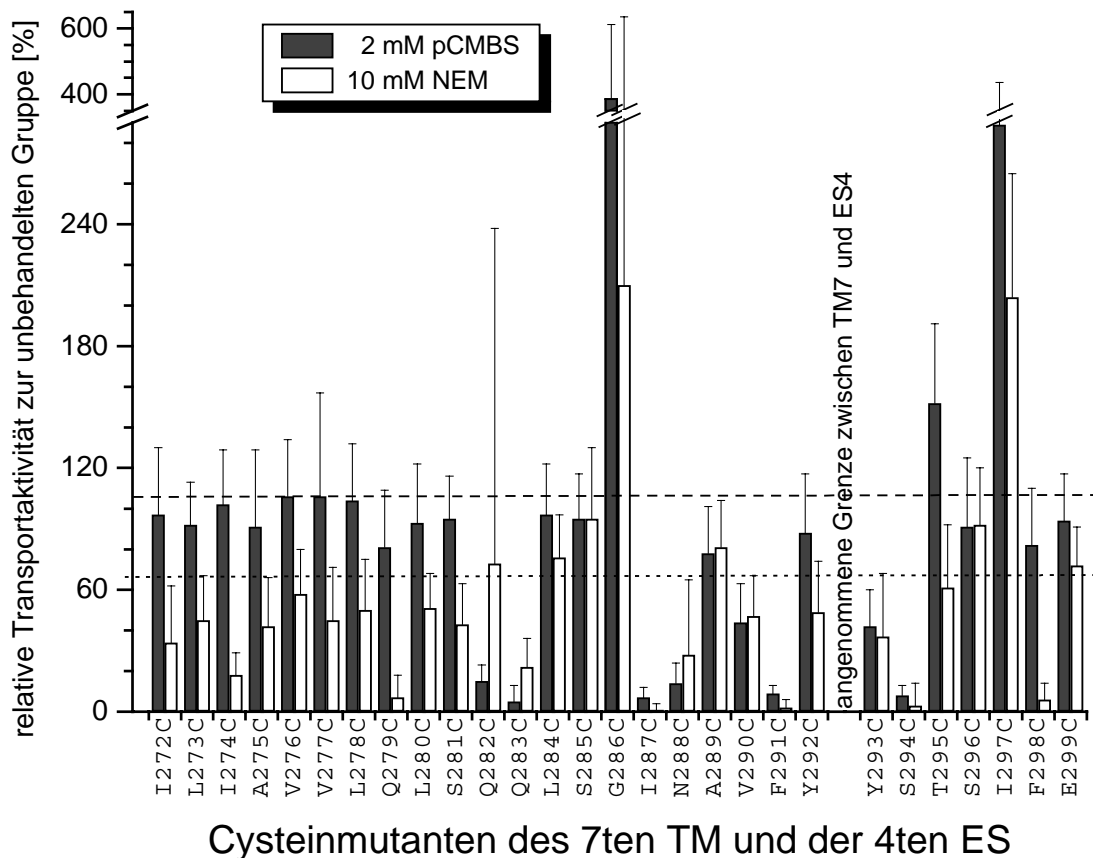
**Abb. 16:** Exemplarische Bildausschnitte digitaler Daten aus der konvokalen Laserlichtmikroskopie von der Oberfläche halbierter X. Oozyten. Dargestellt sind die Cysteinmutanten der zweiten untersuchten Region des GLUT1, deren basale Transportaktivitäten deutlich unter 50 % des cysteinfreien GLUT1 lagen, sowie die erzeugte Alaninmutante auf Position 286. Grün eingefärbte Regionen spiegeln die Anregung des FITC-konjugierten sekundären Antikörpers wieder. Dieser ist gegen den primären Peptidantikörper AK1462 des GLUT1 gerichtet. Die ermittelten Basalaktivitäten der Transporter zu den abgebildeten Oozyten lagen im Rahmen der unter Tabelle 2 angegebenen Daten (siehe 4.2.3.3).

Die grüne Einfärbung in den Bildern spiegelt die Fluoreszenz des FITC-konjugierten zweiten Antikörpers wieder und dient als Nachweis des cysteinfreien GLUT1. Die Plasmamembran der untersuchten Oozyten ist entsprechend des Gehaltes an cysteinfreiem GLUT1 angefärbt. Die DEPC-H<sub>2</sub>O injizierten Oozyten weisen eine vergleichsweise geringere Anfärbung sowohl in der Plasmamembran als auch im Zellinneren der Oozyte auf. Die intrazellulären Vesikel der Mutanten Q283C, G286C und G286A zeigen einen leicht geringeren Gehalt im Vergleich zum Ausgangskonstrukt. Interessanterweise ist die basale Aktivität der Alaninmutante im Vergleich zur entsprechenden Cysteinmutante nicht um soviel geringer ( $7 \pm 10$  bei G286C zu  $55 \pm 26$  bei G286A), wie dies die Intensität und Verteilung der Anfärbungen in den markierten Zellen vermuten lassen würde. Dies kann als Hinweis dafür gedeutet werden, dass nicht die Position der Mutation an sich, sondern vielmehr die Art des eingeführten Aminosäurerestes in diesem Bereich für die Änderung der Transportaktivität von Bedeutung ist. Zwischen den anderen Mutanten können keine markanten Unterschiede in der zellulären Anfärbung ausgemacht werden. Lediglich bei der Cysteinmutante Q279C sind im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1 höhere Glucosetransporterichten innerhalb der Zelle festzustellen. Ihre relative basale Transportaktivität beträgt aber nur  $15 \pm 9$  %.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Einführung eines Cysteinrestes mehrheitlich zu keiner dramatischen Änderung in der zellulären Expression und im „Plasmamembran-Targeting“ geführt hat. Die Abnahme der basalen Transportaktivitäten bestimmter Cysteinmutanten (sie variieren von  $7 \pm 10$  % bei G286C bis zu  $31 \pm 11$  % bei A275C) ist wahrscheinlich auf lokal begrenzte Änderungen der Sekundär- und/oder Tertiärstrukturstruktur zurückzuführen, die eine konformelle Flexibilität des Transportproteins innerhalb der Plasmamembran beeinträchtigen und so zu einer Verminderung des Glucosetransports pro Zeiteinheit führen.

#### 4.2.3.2.3 Extrazelluläre Applikation von pCMBS und NEM

Auch die Cysteinmutanten der zweiten Region wurden hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber den Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen pCMBS und NEM untersucht. Die Auswertung der funktionellen Testung erfolgte wiederum mit Bezug auf eine Vergleichsgruppe ohne die extrazelluläre Applikation dieser Substanzen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 17 als Balkendiagramm dargestellt, während die genauen Zahlenwerte einschließlich der Streuungen in der Tabelle 2 (siehe 4.2.3.3) gelistet sind.



### Cysteinmutanten des 7ten TM und der 4ten ES

**Abb. 17:** Relative Transportaktivitäten der Cysteinmutanten aus dem siebten Transmembransegment (TM) und der vierten extrazellulären Schleife (ES) unter Einfluss von pCMBS bzw. NEM in Relation zum unbehandelten Ansatz. Die gestrichelte Linie symbolisiert die Transportaktivität des cysteinfreien GLUT1 unter pCMBS-Einfluss, die gepunktete Linie den Einfluss unter NEM. Transportsubstrat der pCMBS-Versuchsreihe war 2-DOG und in der NEM-Gruppe 3-OMG. Die Ergebnisse repräsentieren die  $\bar{x} \pm s$ , die aus 3 - 4 Versuchen mit insgesamt 49 - 99 Oozyten je Mutante für pCMBS und aus 2 - 3 Versuchen mit insgesamt 43 - 90 Oozyten je Mutante für NEM gewonnen wurden.

Die meisten der 28 Cysteinmutanten in dieser Region zeigten keine Veränderung der Transportaktivität unter dem Einfluss von pCMBS oder NEM. Insgesamt wurden aber in diesem Bereich mehr Mutanten als in der ersten Region identifiziert, die nach Einwirkung von pCMBS mit einer starken Transportmodifikation reagierten. Die Transportermutanten Q282C und Q283C zeigten nach Inkubation mit pCMBS eine Restaktivität von  $15 \pm 8 \%$  bzw.  $5 \pm 8 \%$ . Die Empfindlichkeit der beiden Mutanten gegenüber NEM war geringer (Q282C  $73 \pm 165 \%$ ; Q283C  $22 \pm 14 \%$ ). Für die Mutante Q282C war somit eine Transportreduktion durch NEM im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1 nicht gegeben, doch bestand auch hier wieder das Problem (siehe auch Kapitel 4.2.3.1.3), dass die Oozyten in den Versuchen nur eine gering höhere Transportaktivität als die DEPC-H<sub>2</sub>O injizierte Oozyten erreichten. Damit befanden sich die Ergebnisse der Messungen im Fehlerbereich der Nachweismethode und relativ viele Werte in der Kalkulation gruppierten sich um den Nullwert (15 von 58 Oozyten aus der Gruppe ohne NEM bzw. 25 von 57 Oozyten aus der Gruppe mit NEM unterschritten den Nullwert). Ein weiteres benachbartes Mutantenpaar, die Cysteinmutanten I287C und N288C, zeigten Restaktivitäten von  $7 \pm 5 \%$  bzw.  $14 \pm 10 \%$  nach Applikation von pCMBS und

$1 \pm 3 \%$  bzw.  $28 \pm 37 \%$  unter dem Einfluss von NEM. Auch hier ist Zurückhaltung bei der Interpretation der NEM-Daten der Cysteinmutante N288C geboten, da die Transportraten in 13 von 59 bzw. in 25 von 57 Oozyten rechnerisch dem Nullwert entsprachen. Die Mutanten V290C und F291C wiesen eine Reduktion der Transportrate von  $44 \pm 19 \%$  bzw.  $9 \pm 4 \%$  nach Behandlung mit pCMBS auf und  $47 \pm 20 \%$  bzw.  $2 \pm 4 \%$  nach Inkubation mit NEM. Hervorzuheben ist, dass die Mutante V290C relativ unempfindlich auf NEM reagierte, vergleicht man ihre Restaktivität von  $47 \pm 20 \%$  mit der des cysteinfreien GLUT1 von  $65 \pm 28 \%$ . Ein weiteres Mutantenpaar, das eine Beeinträchtigung im Glucosetransport durch pCMBS aufwies, war Y293C mit  $42 \pm 18 \%$  und S294C mit  $8 \pm 5 \%$  Restaktivität. Die Unterschiede in der Abnahme der Transportaktivität waren ebenfalls unter Einfluss von NEM sichtbar; die Restaktivitäten betragen  $37 \pm 31 \%$  bei der Mutante Y293C im Gegensatz zu S294C mit  $3 \pm 11 \%$ .

Aus den bisher beschriebenen Daten lassen sich eindeutige Unterschiede in der Wirksamkeit zwischen pCMBS und NEM auf die Transportaktivitäten der Mutanten Q282C, V290C und Y293C erkennen. Dieser Gruppe kann auch die Mutante N288C zugerechnet werden, sofern der NEM-Einfluss mit der Einschränkung betrachtet wird, dass die Transportaktivitäten vieler Oozyten in diesem Versuchsansatz auf 0 gesetzt werden mussten. Insgesamt betrachtet kann gesagt werden, dass vier Aminosäurepaare existieren, bei denen die Mutation der nativen Aminosäure in Cystein zu Transportproteinen führte, bei denen eine Transportreduktion durch pCMBS nachzuweisen ist. Für die Transporthemmung durch NEM gilt die Einschränkung, dass eine Cysteinmutante pro Mutantenpaar relativ unempfindlich gegenüber diesem Hemmstoff war.

In der zweiten Region gab es 3 Mutanten, die nur eine marginale Transportmodifikation unter dem Einfluss von pCMBS aufwiesen, jedoch eine deutliche Transporthemmung durch NEM zeigten. So betrug die verbleibende Transportaktivität bei der Mutante I274C mit Einfluss von NEM  $18 \pm 11 \%$  aber unter pCMBS-Einfluss  $102 \pm 27 \%$ ; bei der Mutante Q279C  $7 \pm 11 \%$  mit NEM aber  $81 \pm 28 \%$  mit pCMBS; bei der Mutante F298C  $6 \pm 8 \%$  unter Einfluss von NEM aber  $82 \pm 28 \%$  nach Inkubation mit pCMBS.

Eine Zunahme der Transportaktivität durch Schwefelwasserstoffgruppen sensitive Substanzen war für die Mutanten G286C und I297C mit  $388 \pm 224 \%$  bzw.  $289 \pm 147 \%$  unter Einfluss von pCMBS und mit  $210 \pm 425 \%$  bzw.  $204 \pm 61 \%$  unter Einfluss von NEM zu beobachten. Der stimulierte Transport ließ sich durch den spezifischen Glucosetransporterhemmstoff Cytochalasin B vollständig hemmen (Daten nicht gezeigt). Damit ist insbesondere aufgrund der geringen Basalaktivität die Cysteinmutante auf Position 286 als zugänglich für pCMBS zu definieren. Eine leichte Zunahme der Transportaktivität nach Applikation von pCMBS war mit  $152 \pm 39 \%$  auch bei der Mutante T295C und nach Applikation von NEM mit  $92 \pm 28 \%$  bei der Mutante S296C im direkten Vergleich zum cysteinfreien GLUT1 festzustellen, dessen Transportaktivität unter Einfluss von pCMBS nur  $110 \pm 40 \%$  und unter NEM  $65 \pm 28 \%$  betrug.

Auf der Basis des 12erTM-Modells (siehe Abb. 1, Kapitel 1.4) kann für die zweite untersuchte Region angenommen werden, dass die Grenze zwischen Membran und extrazellulären Raum im Bereich der Aminosäurepositionen 292 und 293 liegt. Zwischen diesen beiden Mutanten gibt es keine großen Unterschiede in der Transportaktivität unter Einfluss von NEM ( $49 \pm 25 \%$  vs  $37 \pm 31 \%$ ), jedoch unter der Einwirkung des membranimpermeablen pCMBS ( $88 \pm 29 \%$  vs  $42 \pm 18 \%$ ). Darüber hinaus kommt es, wie schon für die erste Region gezeigt, mit Entfernung von der Membrangrenze in den extrazellulären Raum zu einer Abnahme der hemmenden pCMBS-Wirkung auf den Transport. Die hemmende Wirkung ändert sich in eine

Stimulierung. Innerhalb des Transmembransegments finden sich benachbarte Cysteinmutanten, die in ihrer Transportaktivität durch pCMBS gehemmt wurden. Die betreffenden Positionen sind nur in der Membranhälfte zu finden, die dem extrazellulären Raum zugewandt ist. Analog zum zweiten Transmembransegment kann vermutet werden, dass auch das siebte Transmembransegment eine Spalte bildet, die bestimmten Aminosäuren in der Membran den Kontakt zu extrazellulären hydrophilen Stoffen ermöglicht.

#### **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 Sulphydrylreagenzien**

Alle Ergebnisse, die sich auf die funktionelle Charakterisierung einzelner Cysteinmutanten beziehen, sind der Vergleichbarkeit halber in einer Tabelle zusammengefasst. Dies sind die basalen Aktivitäten der Mutanten in Relation zum cysteinfreien GLUT1 und die relativen Transportaktivitäten nach Applikation von pCMBS oder NEM in Relation zum Ansatz ohne Inkubation mit einer dieser Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen. Die absoluten Transportraten der verschiedenen Transportproteine hingen von der Qualität der Oozyten und der injizierten RNS ab (siehe Kapitel 4.2.1). Sie betragen für den cysteinfreien GLUT1 unter Verwendung des Substrates 2-DOG zwischen 0,55 und 4,14 pmol 2-DOG•min<sup>-1</sup>•Oozyte<sup>-1</sup> (ohne Abzug des Shamwertes) bzw. für das Substrat 3-OMG 9,80 bis 44,96 pmol 3-OMG•min<sup>-1</sup>•Oozyte<sup>-1</sup>. Die Transportraten des cysteinfreien GLUT1 für 2-DOG lagen um das 4- bis 100-fache und für 3-OMG um das 4- bis 40-fache über den Transportraten der mit DEPC-H<sub>2</sub>O injizierten Oozyten (Shamwert).

**Tab. 2:** Zusammenstellung der basalen Transportaktivitäten von verschiedenen Mutanten des humanen GLUT1 nach heterologer Expression in *Xenopus laevis* Oozyten und Zusammenstellung der Transportaktivitäten, die unter Einfluss von Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen gewonnen wurden,

Mutante	Basalaktivität <sup>a</sup>			Transportaktivität unter Einfluss von pCMBS <sup>a,d</sup>			Transportaktivität unter Einfluss von NEM <sup>a,e</sup>													
	Aktivität zum Ausgangskonstrukt [%]	Oozytenanzahl	Experimente	- pCMBS <sup>b</sup> X ± s	+ pCMBS <sup>c</sup> X ± s	- pCMBS n < 0	+ pCMBS n < 0	- NEM <sup>b</sup> X ± s	+ NEM <sup>c</sup> X ± s	- NEM n < 0	+ NEM n < 0	p-Wert	n							
Mutanten in der extrazellulären Schleife 1																				
L61C	64 ± 31	30	<0,001	100 ± 42	167 ± 86	97	-	98	-	0,001	4	100 ± 35	62 ± 25	60	-	58	-	<0,001	3	
T62C	93 ± 33	58	<0,238	100 ± 32	130 ± 35	85	-	85	-	<0,001	3	100 ± 25	81 ± 24	87	-	88	-	<0,001	3	
T63C	93 ± 17	50	0,009	100 ± 26	141 ± 30	80	-	79	-	<0,001	4	100 ± 18	105 ± 20	57	-	55	-	0,137	2	
L64C	73 ± 17	29	<0,001	98 ± 45	95 ± 41	83	2	83	-	0,673	3	100 ± 29	77 ± 21	61	-	59	-	<0,001	3	
W65C	105 ± 22	29	0,435	100 ± 29	38 ± 31	67	-	69	-	<0,001	4	100 ± 31	78 ± 24	58	-	59	-	<0,001	3	
S66C	112 ± 23	30	0,049	100 ± 36	9 ± 5	95	-	95	6	<0,001	4	100 ± 35	8 ± 7	76	-	78	1	<0,001	3	
Mutanten im Transmembransegment 2																				
L67C	116 ± 22	28	0,011	100 ± 33	94 ± 27	66	-	66	-	0,270	4	100 ± 14	86 ± 13	57	-	60	-	<0,001	2	
S68C	115 ± 26	50	0,008	100 ± 28	98 ± 26	100	-	95	-	0,664	4	100 ± 22	87 ± 16	89	-	88	-	<0,001	3	
V69C	115 ± 31	56	0,008	100 ± 25	70 ± 17	69	-	71	-	<0,001	3	100 ± 16	2 ± 5	78	-	79	23	<0,001	3	
A70C	123 ± 26	15	0,007	100 ± 26	4 ± 7	58	-	70	4	<0,001	3	100 ± 33	20 ± 10	40	-	44	-	<0,001	2	
I71C	104 ± 19	30	0,499	100 ± 27	101 ± 29	106	-	96	-	0,866	4	100 ± 36	78 ± 36	44	-	58	-	0,003	2	
F72C	---	115	63	---	---	58	33	51	18	---	3	---	---	59	33	56	25	---	2	
S73C	50 ± 30	88	4	<0,001	100 ± 43	3 ± 2	59	-	49	3	<0,001	3	100 ± 36	15 ± 9	86	-	88	3	<0,001	3
V74C	112 ± 57	58	0,230	100 ± 40	108 ± 30	58	-	69	-	0,212	3	100 ± 28	51 ± 21	60	-	56	-	<0,001	2	
G75C	5 ± 7	119	66	<0,001	39 ± 73	19 ± 60	79	48	79	38	0,057	3	60 ± 82	24 ± 39	60	24	60	28	0,003	2
G76C	4 ± 7	89	51	<0,001	65 ± 80	18 ± 40	79	28	74	30	<0,001	3	78 ± 66	24 ± 29	59	13	60	22	<0,001	2
M77C	27 ± 14	58	-	<0,001	100 ± 30	46 ± 24	65	-	67	-	<0,001	3	100 ± 36	30 ± 18	58	-	57	-	<0,001	2
I78C	76 ± 29	20	-	0,009	100 ± 35	121 ± 49	69	-	63	-	0,005	3	100 ± 38	62 ± 16	60	-	60	-	<0,001	2
G79C	4 ± 7	96	50	<0,001	65 ± 95	12 ± 32	85	30	88	33	<0,001	3	59 ± 105	72 ± 94	59	26	57	23	0,486	2
S80C	7 ± 7	98	17	<0,001	86 ± 63	96 ± 91	147	20	159	4	0,282	6	93 ± 68	26 ± 86	58	4	75	34	<0,001	3
F81C	76 ± 26	67	-	<0,001	100 ± 34	102 ± 32	67	-	70	-	0,666	3	100 ± 49	45 ± 23	57	-	58	-	<0,001	2
S82C	58 ± 19	49	-	<0,001	100 ± 35	122 ± 44	68	-	63	-	0,002	3	100 ± 42	57 ± 25	59	-	59	-	<0,001	2



Mutante	Basalaktivität <sup>a</sup>			Transportaktivität unter Einfluss von pCMBS <sup>a,d</sup>			Transportaktivität unter Einfluss von NEM <sup>a,e</sup>						
	Aktivität zum Ausgangskonstrukt [%] $\bar{X} \pm s$	Oozytenanzahl n	p-Wert	- pCMBS <sup>b</sup> $\bar{X} \pm s$	+ pCMBS <sup>c</sup> $\bar{X} \pm s$	Experimente	- NEM <sup>b</sup> $\bar{X} \pm s$	+ NEM <sup>c</sup> $\bar{X} \pm s$	Experimente				
Mutanten im Transmembransegment 2													
V83C	31 ± 11	67	<0,001	100 ± 34	119 ± 59	3	100 ± 37	7 ± 8	56	60	15	<0,001	2
G84C	98 ± 35	20	0,847	100 ± 35	103 ± 32	1	100 ± 40	31 ± 15	60	60	-	<0,001	2
L85C	72 ± 29	40	<0,001	100 ± 34	103 ± 35	2	100 ± 44	63 ± 21	60	58	-	<0,001	2
F86C	56 ± 18	68	<0,001	100 ± 29	103 ± 65	3	100 ± 33	42 ± 15	60	60	-	<0,001	2
V87C	53 ± 20	68	<0,001	100 ± 36	97 ± 32	3	100 ± 47	13 ± 7	60	60	-	<0,001	2
Mutanten in der extrazellulären Schleife 2													
S118C	94 ± 40	29	0,593	96 ± 52	98 ± 39	1	100 ± 41	47 ± 20	59	59	-	<0,001	2
Mutanten in der extrazellulären Schleife 3													
S178C	84 ± 20	29	0,003	99 ± 53	111 ± 49	1	100 ± 26	74 ± 20	60	59	-	<0,001	2
Mutanten im Transmembransegment 7													
I272C	78 ± 20	58	<0,001	100 ± 27	97 ± 33	2	100 ± 50	34 ± 28	42	43	-	<0,001	2
L273C	87 ± 26	49	0,016	100 ± 28	92 ± 21	2	100 ± 30	45 ± 22	79	67	-	<0,001	3
I274C	88 ± 21	42	0,025	100 ± 19	102 ± 27	2	100 ± 19	18 ± 11	51	54	1	<0,001	2
A275C	31 ± 11	41	<0,001	100 ± 32	91 ± 38	2	100 ± 35	42 ± 24	52	46	-	<0,001	2
V276C	103 ± 23	50	0,580	100 ± 21	106 ± 28	2	100 ± 20	58 ± 22	83	81	-	<0,001	3
V277C	81 ± 16	29	<0,001	100 ± 42	106 ± 51	1	100 ± 27	45 ± 26	81	83	2	<0,001	3
L278C	66 ± 13	49	<0,001	100 ± 23	104 ± 28	2	100 ± 27	50 ± 25	84	86	-	<0,001	3
Q279C	15 ± 9	68	<0,001	99 ± 43	81 ± 28	3	100 ± 40	7 ± 11	59	59	23	<0,001	2
L280C	49 ± 14	28	<0,001	100 ± 33	93 ± 29	1	100 ± 30	51 ± 17	87	90	-	<0,001	3
S281C	83 ± 15	60	<0,001	100 ± 17	95 ± 21	2	100 ± 19	43 ± 20	89	89	-	<0,001	3
Q282C	17 ± 12	99	<0,001	97 ± 51	15 ± 8	4	74 ± 105	73 ± 165	58	15	24	0,953	2
Q283C	18 ± 12	70	<0,001	99 ± 47	5 ± 8	3	100 ± 20	22 ± 14	59	59	-	<0,001	2
L284C	129 ± 28	59	<0,001	100 ± 21	97 ± 25	2	100 ± 22	76 ± 21	88	89	-	<0,001	3
S285C	125 ± 31	65	<0,001	100 ± 24	95 ± 22	2	100 ± 22	95 ± 35	87	88	-	0,024	3
G286C	7 ± 10	80	<0,001	62 ± 76	388 ± 224	4	61 ± 64	210 ± 425	74	29	73	0,003	3
I287C	82 ± 35	29	0,087	88 ± 64	7 ± 5	2	100 ± 44	1 ± 3	61	60	40	<0,001	3
N288C	8 ± 7	70	<0,001	94 ± 73	14 ± 10	2	78 ± 74	28 ± 37	59	13	25	<0,001	2

Mutante	Basalaktivität <sup>a</sup>			Transportaktivität unter Einfluss von pCMBS <sup>a,d</sup>			Transportaktivität unter Einfluss von NEM <sup>a,e</sup>		
	Aktivität zum Ausgangskonstrukt [%] $\bar{X} \pm s$	Oozytenanzahl n ; ; <0	Experimente p-Wert	- pCMBS <sup>b</sup> $\bar{X} \pm s$	+ pCMBS <sup>c</sup> $\bar{X} \pm s$	Experimente p-Wert	- NEM <sup>b</sup> $\bar{X} \pm s$	+ NEM <sup>c</sup> $\bar{X} \pm s$	Experimente p-Wert
Mutanten im Transmembransegment 7									
A289C	73 ± 12	29	<0,001	100 ± 26	78 ± 23	88	100 ± 26	81 ± 23	61
V290C	123 ± 19	28	<0,001	100 ± 29	44 ± 19	77	100 ± 29	47 ± 20	63
F291C	104 ± 23	42	0,304	100 ± 26	9 ± 4	79	100 ± 32	2 ± 4	43
Y292C	25 ± 13	118	<0,001	99 ± 38	88 ± 29	76	100 ± 27	49 ± 25	89
Mutanten in der extrazellulären Schleife 4									
Y293C	30 ± 12	77	<0,001	95 ± 49	42 ± 18	81	100 ± 47	37 ± 31	60
S294C	89 ± 21	30	0,120	100 ± 46	8 ± 5	94	100 ± 34	3 ± 11	76
T295C	114 ± 39	40	0,111	100 ± 40	152 ± 39	69	100 ± 47	61 ± 31	90
S296C	124 ± 19	30	<0,001	98 ± 42	91 ± 34	98	100 ± 28	92 ± 28	72
I297C	70 ± 15	56	<0,001	97 ± 49	289 ± 147	74	100 ± 41	204 ± 61	59
F298C	82 ± 22	59	<0,001	100 ± 30	82 ± 28	78	100 ± 53	6 ± 8	59
E299C	91 ± 20	49	0,043	100 ± 27	94 ± 23	78	100 ± 59	72 ± 19	60
Mutanten in der extrazellulären Schleife 5									
S368C	99 ± 35	60	0,888	100 ± 27	82 ± 18	105	100 ± 18	63 ± 20	60
Alaninmutanten									
F72A	1 ± 4	47	<0,001						
G286A	55 ± 26	37	<0,001						
cysteinfreier Glut1				100 ± 33	110 ± 40	705	100 ± 32	65 ± 28	506

<sup>a</sup> Für die Ermittlung der Daten wurde der Transport DEPC-H<sub>2</sub>O injizierter Oozyten (Shamwerte) subtrahiert (Berechnung siehe Kapitel 4.2.1).

<sup>b</sup> Liegt der Wert unter 100 % ist dies ein Hinweis auf diejenigen Transportwerte, die nach Subtraktion des Shamwertes in den negativen Wertebereich fielen und auf den Nullwert gesetzt wurden.

<sup>c</sup> Die Ermittlung der Transportaktivitäten unter dem Einfluss der Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen in Relation zum hemmstofffreien Versuchsansatz bezieht die Nullwerte des hemmstofffreien Versuchsansatzes mit ein.

<sup>d</sup> Das Substrat war 2-Desoxy-D-Glucose

<sup>e</sup> Das Substrat war 3-O-Methyl-D-Glucose

## 4.2.4 Untersuchungen zur Zugänglichkeit der Transmembransegmente von der zytoplasmatischen Seite und zum Nachweis potentieller Substratbindungsstellen

### 4.2.4.1 Intrazelluläre Applikation von pCMBS bei ausgewählten Cysteinmutanten aus der ersten und zweiten Region

Aus den unter 4.2.3.1.3 und 4.2.3.2.3 dargestellten Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die putativen externen Hälften des Transmembransegments 2 und Transmembransegments 7 für wasserlösliche Substanzen zugänglich sein müssen. Eine mechanistische Theorie des Glucosetransports, vermittelt durch die Familie der GLUT-Transporter, geht davon aus, dass das Transportprotein nach Bindung des Substratmoleküls eine Konformationsänderung erfährt und dann die Bindungsstelle zur jeweils entgegengesetzten Seite exponiert wird („alternierendes Konformationsmodell“ - siehe Kapitel 1.4.2). Sollte die mittels Cystein-Scanning-Mutagenese untersuchte Region in diesen dynamischen Prozess eingebunden sein oder sich in unmittelbarer Nähe der Substratbindungsstelle befinden, wäre die Annahme gerechtfertigt, dass intrazellulär gelöstes pCMBS eine transportmodifizierende Wirkung ausübt. Daher erschien es sinnvoll, diejenigen Mutanten nach Injektion von pCMBS in X. Oozyten zu untersuchen, die eine erhebliche Beeinflussung der Transportaktivität durch extrazellulär appliziertes membranlösliches NEM und/oder pCMBS aufwiesen. Es wurden verschiedene hohe pCMBS-Konzentrationen in die Oozyten injiziert. Mit Annahme eines durchschnittlichen Verteilungsvolumen von 500 nl in den Oozyten (Keller et al., 1989) entsprach dies Endkonzentrationen von 1 oder 3 mM pCMBS innerhalb der Zellen. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Versuche zusammengestellt.

**Tab. 3:** Relative Transportaktivitäten ausgewählter Cysteinmutanten nach Expression in X. Oozyten unter dem Einfluss von intrazellulär appliziertem pCMBS, verglichen mit Transportraten DEPC-H<sub>2</sub>O injizierter X. Oozyten. Als Substrat wurde 50 µM 2-DOG eingesetzt. Angegeben sind die  $\bar{X} \pm s$ ; n. d. = nicht detektierbar; --- = kein Versuch durchgeführt.

Mutante	*Transportaktivität [%]		Oozyten				Experimente	
	1 mM pCMBS $\bar{X} \pm s$	3 mM pCMBS $\bar{X} \pm s$	1 mM pCMBS n	< 0	3 mM pCMBS n	< 0	1 mM pCMBS n	3 mM pCMBS n
cysteinfreier GLUT1	105 ± 28	55 ± 21	70	-	54	-	3	2
W65C	124 ± 18	---	26	-	---	---	1	---
S66C	49 ± 19	17 ± 14	26	-	25	1	1	1
V69C	104 ± 22	---	28	-	---	---	1	---
A70C	96 ± 17	34 ± 13	50	-	56	-	2	2
S73C	86 ± 15	43 ± 30	26	-	29	1	1	1
M77C	133 ± 36	81 ± 25	28	-	30	-	1	1
S80C	115 ± 39	25 ± 32	22	-	30	13	1	1
V83C	109 ± 16	62 ± 24	28	-	28	1	1	1
V87C	117 ± 13	68 ± 32	21	-	57	-	1	2
I274C	105 ± 31	24 ± 7	21	-	25	-	1	1
Q279C	---	52 ± 39	---	---	22	3	---	1
Q282C	---	80 ± 67	---	---	18	2	---	1
Q283C	---	45 ± 24	---	---	25	-	---	1
G286C	---	125 ± 117	---	---	25	4	---	1
I287C	---	44 ± 16	---	---	23	-	---	1
N288C	20 ± 63 (n. d.)	---	29	28	---	---	1	---
V290C	114 ± 22	---	28	-	---	---	1	---
F291C	90 ± 15	---	30	-	---	---	1	---
Y293C	56 ± 34	---	23	-	---	---	1	---
S294C	109 ± 29	---	21	-	---	---	1	---

\* Die absoluten Werte der Transportaktivitäten können aus den unter Kapitel 4.2.3.3 angegebenen Daten abgeleitet werden.

Die hohe intrazelluläre Konzentration von 3 mM pCMBS bewirkte schon beim cysteinfreien GLUT1 eine Reduktion der Transportaktivität auf  $55 \pm 21$  %. Im Vergleich zu diesem Wert waren nach Anwendung von 3 mM pCMBS an den verschiedenen Mutanten der ersten und zweiten Region nur bei den Mutanten S66C mit  $17 \pm 14$  %, S80C mit  $25 \pm 32$  % und I274C mit  $24 \pm 7$  % deutliche Transportreduktionsraten nachzuweisen.

Im Gegensatz zur 3 mM Konzentration führte 1 mM intrazellulär appliziertes pCMBS zu keiner Veränderung des Glucosetransports beim cysteinfreien GLUT1 ( $105 \pm 28$  % im Vergleich zur mit DEPC-H<sub>2</sub>O injizierten Gruppe). Zwei der drei Mutanten, die nach Applikation der hohen intrazellulären pCMBS-Konzentration noch eine deutliche Aktivitätsabnahme in Relation zum cysteinfreien GLUT1 aufwiesen, zeigten diesen Unterschied bei der geringen Konzentration nicht mehr (S80C mit  $115 \pm 39$  % und I274C mit  $105 \pm 31$  %). Eine durch diese vergleichsweise geringe pCMBS-Konzentration bedingte Abnahme des Transports, konnte in der ersten Region nur für die Mutante S66C ( $49 \pm 19$  % Restaktivität) und in der zweiten Region nur für die Mutante Y293C ( $56 \pm 34$  %) nachgewiesen werden. Bei beiden Mutanten wurde eine Untersuchung mit 3 mM appliziertem pCMBS nicht vorgenommen. Die rechnerisch ermittelte relative Aktivität von  $20 \pm 63$  % der Mutante N288C, die eine Hemmung durch pCMBS impliziert, ist äußerst kritisch zu bewerten, da in diesem Versuchsansatz von den 29 nicht mit pCMBS injizierten Oozyten 28 unterhalb des Nullwertes lagen.

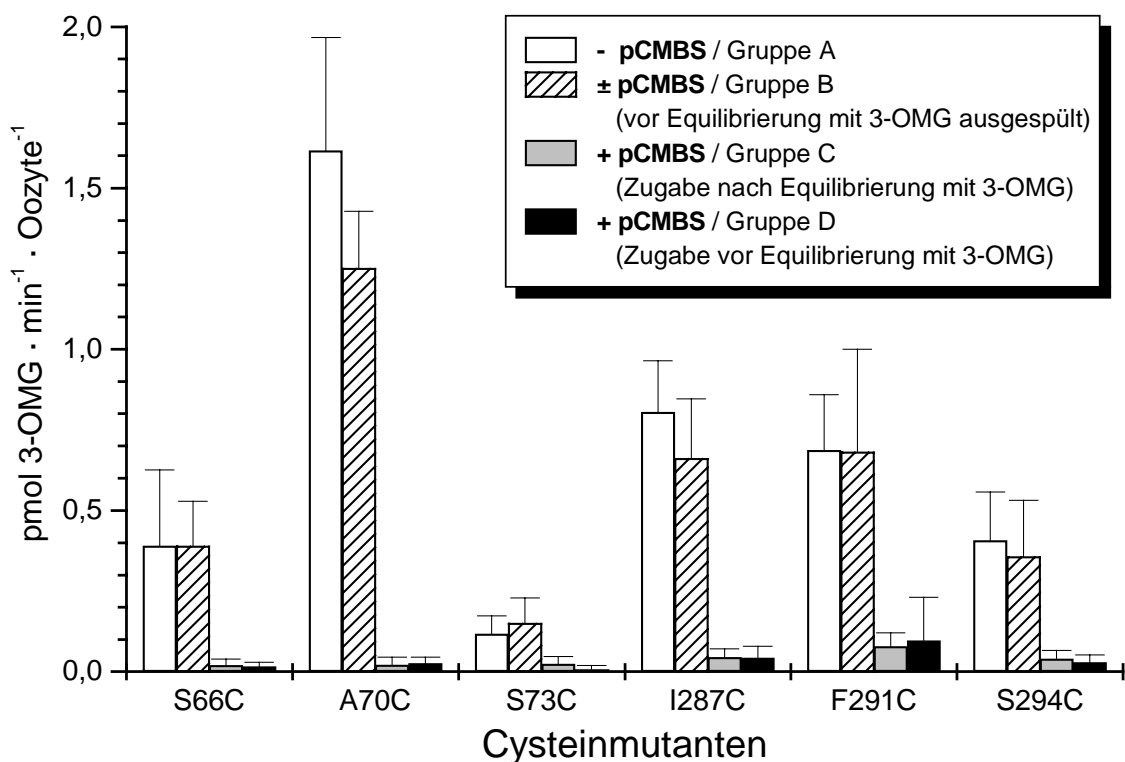
Damit war die Transportaktivität bei keiner der ausgewählten Mutanten, die entweder in der endofazialen Hälfte des putativen Transmembransegmentes 2 oder 7 lokalisiert sind, deutlich durch Sulphydrylreagenzien beeinflussbar.

Nach den vorliegenden Ergebnissen können die erste und zweite untersuchte Region als Bereiche identifiziert werden, die von der extrazellulären Seite her partiell für wasserlösliche Substanzen zugänglich sind (siehe 4.2.3.1.3 und 4.2.3.2.3). Mit der Methode der intrazellulären Injektion von pCMBS wurde dagegen nachgewiesen, dass hydrophile Substanzen, die im Zytoplasma der Oozyten gelöst sind, Aminosäuren des GLUT1, die in zentralen Bereichen der Plasmamembran innerhalb der untersuchten Regionen lokalisiert sind (endofaziale Membranhälften der putativen Transmembransegmente 2 und 7), nicht erreichen.

#### **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**

Die Tatsache, dass einige der Cysteinmutanten eine Basalaktivität von mehr als 50 % aufwiesen und dabei eine extreme Transportreduktion (unter 10 % Restaktivität) nach Inkubation mit pCMBS zeigten (die Mutanten S66C, A70C, S73C für die erste untersuchte Region und I287C, F291C, S294C für die zweite untersuchte Region), könnte verschiedene Ursachen haben. So ist denkbar, dass Aminosäuren der betreffenden Position an der Domäne, welche die Substratbindungsstelle des Transportproteins definiert, beteiligt sind. Durch die Bindung von pCMBS an den neu eingeführten Cysteinrest könnte es zu einer Behinderung der Interaktion zwischen Substrat und Substratbindungsstelle kommen. Mit Protektionsversuchen kann gezeigt werden, ob durch Substratüberschuss die Wirkung des parallel einwirkenden Hemmstoffs gemindert oder aufgehoben werden kann. Dieser Ansatz wurde schon von Jung et al. und Wu und Kaback an Punktmutanten der Laktose-Permease von *Escherichia Coli* versucht (Jung et al., 1994; Wu & Kaback, 1994). Die gleichzeitige Präsenz von Substrat und Hemmstoff sollte eine Wechselwirkung zwischen

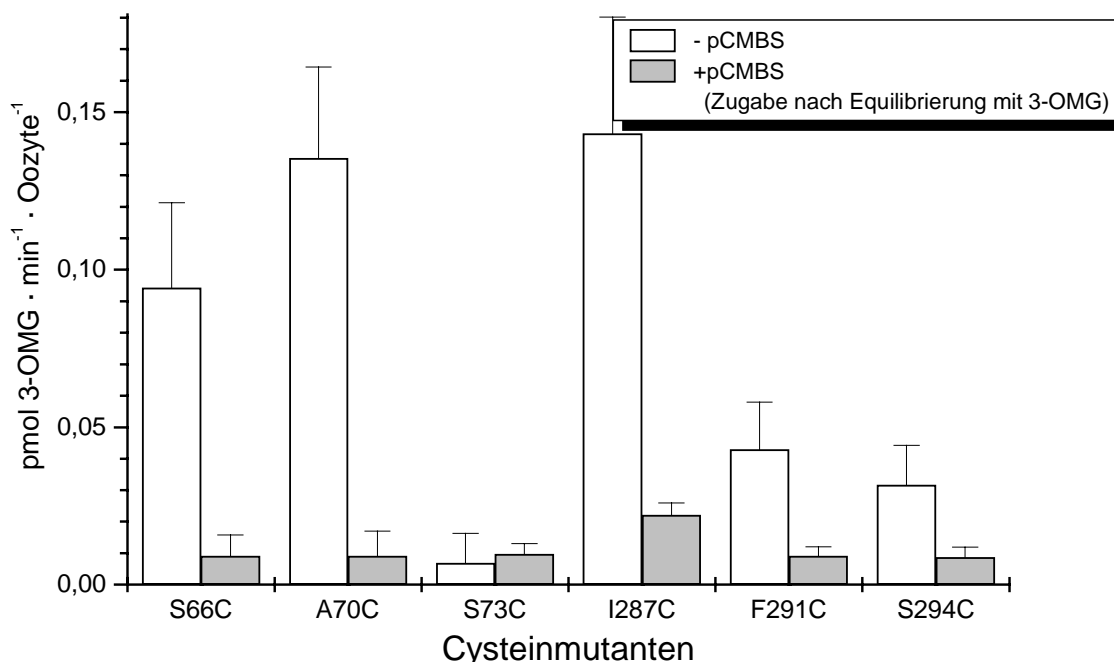
Transportsubstrat und Transportprotein auslösen, die als Reduktion der pCMBS-induzierten Transporthemmung (= Protektion des Transporters) erkennbar wäre. Die Bedingung für diesen Versuchsansatz ist, dass die Hemmung der Transportaktivität kompetitiv erfolgt. Riordan und ValleeLienhard berichteten, dass pCMBS eine langsam reversible Bindungscharakteristik aufweist (Riordan & ValleeLienhard, 1972) und in einem Vorversuch zu diesem Experiment wurde unter „Equilibrium Exchange“ Bedingungen gezeigt, dass pCMBS reversibel an den Glucosetransporter bindet. Das folgende Experiment mit der Transportmessung wurde in der Art und Weise durchgeführt wie es unter 3.2.2.3.3 beschrieben ist. Dabei wurde eine Substratkonzentration von 10 mM (3-OMG) und eine Hemmstoffkonzentration (pCMBS) von 2 mM eingesetzt. Die Ergebnisse finden sich als graphische Darstellung in Abbildung 18.



**Abb. 18:** Protektionsversuch mit 10 mM 3-OMG als Substrat und 2 mM pCMBS als Inhibitor. Cysteinmutanten exprimierende Oozyten, die eine basale Transportaktivität von mehr als 50% des cysteinfreien GLUT1 aufwiesen und zusätzlich gegenüber pCMBS empfindlich waren, wurden mindestens 10 h vor der Transportmessung mit 3-OMG equilibriert (Gruppe A, □). Für die Ermittlung der Wirkung von pCMBS wurde einem Teil der Oozyten 1 h vor dem Transportstart pCMBS zugesetzt (Gruppe C, ▒). Als Vergleichsgruppen dienten 2 Ansätze, denen 1 h vor der Substratequilibration pCMBS zugesetzt wurde (Gruppen B und D, ▨), wobei einem dieser Ansätze direkt vor Beginn der Equilibrierung das pCMBS durch Spülen wieder entzogen wurde (Gruppe B, ▨). Die Daten entsprechen den  $\bar{x} \pm s$  von 18 bis 20 Oozyten pro Ansatz. Die Transportaktivität der DEPC-H<sub>2</sub>O injizierten Gruppe betrug  $0,0417 \pm 0,0072$  pmol 3-OMG·min<sup>-1</sup>·Oocyte<sup>-1</sup> und wurde in der Aktivitätsberechnung der Transportermutanten berücksichtigt.

Die Zugabe von 2 mM pCMBS 1 Stunde vor Equilibrierung der Oozyten mit dem Transportsubstrat führte zu einer Hemmung der Aufnahme radioaktiv markierter

3-OMG (Gruppe D). Diese Transporthemmung lag in der gleichen Größenordnung wie diejenige, die durch Zugabe von pCMBS nach Abschluss der Equilibrierung des Transportsubstrats eine Stunde vor Beginn der Transportmessung mit radioaktiv markierter 3-OMG erzielt werden konnte (Gruppe C). Die Werte im Vergleich zwischen den Gruppen D und C sind  $4 \pm 4$  % (Gruppe D) vs  $5 \pm 5$  % (Gruppe C) bei der Mutante S66C,  $2 \pm 1$  % vs  $1 \pm 2$  % bei A70C,  $8 \pm 8$  % vs  $20 \pm 21$  % bei S73C  $5 \pm 5$  % vs  $6 \pm 3$  % bei 287C,  $14 \pm 20$  % vs  $11 \pm 6$  % bei F291C und  $7 \pm 6$  % vs  $10 \pm 6$  % bei der Mutante S294C. Damit wurde bei allen 6 untersuchten Mutanten gezeigt, dass eine Konzentration von 2 mM pCMBS die gleiche Transporthemmung bewirkte, unabhängig davon, ob Hemmstoff in der Vorinkubation vorhanden war oder dem Versuchsansatz 1 h vor Versuchsstart zugesetzt wurde. Diejenigen Oozyten, die nach Inkubation mit pCMBS mehrmals gewaschen wurden, hatten im Vergleich zum Versuchsansatz ohne pCMBS (Gruppe A) eine relative Transportaktivität von  $100 \pm 35$  % für die Mutante S66C,  $77 \pm 11$  % für A70C,  $129 \pm 66$  % für S73C,  $82 \pm 23$  % für die Mutante I287C,  $99 \pm 46$  % für F291C und  $88 \pm 43$  % für die Cysteinmutante S294C (Gruppe B zu Gruppe A). Die katalytische Aktivität der Transporter konnte also weitgehend durch die Entfernung von pCMBS mittels Spülen der Oozyten zurückgewonnen werden, womit bestätigt wurde, dass pCMBS ein reversibel bindender Hemmstoff des GLUT1 ist. Da mit den anfänglich eingesetzten Konzentrationen von 10 mM 3-OMG unter den dargestellten Versuchsbedingungen keine Protektion der pCMBS-induzierten Transporthemmung erreicht werden konnte, wurden die Versuchsparameter zugunsten des Transportsubstrats modifiziert. Es erfolgte eine Equilibrierung mit 100 mM 3-OMG und nur eine 15 minütige statt 1 stündige Vorinkubation mit pCMBS in einer Endkonzentration von 0,025 mM. Die Ergebnisse dieser Versuche konnten ebenfalls keine Protektion der durch pCMBS hervorgerufenen Transporthemmung nachweisen und sind in der Abbildung 19 dargestellt.



**Abb. 19:** Protektionsversuch mit 100 mM 3-OMG als Substrat und 0,025 mM pCMBS als Inhibitor. Cysteinmutanten exprimierende Oozyten, die gegenüber pCMBS empfindlich waren, wurden mindestens 10 h mit 3-OMG equilibriert (□). Zur Ermittlung der Wirkung von pCMBS wurde 15 min vor Transportstart einem Teil der Oozyten pCMBS zugesetzt (■). Die Daten repräsentieren die  $\bar{x} \pm s$  aus 17 bis 20 einzelnen Oozyten.

Die Transportaktivität DEPC-H<sub>2</sub>O injizierter Oozyten betrug  $0,0268 \pm 0,0086$  pmol 3-OMG•min<sup>-1</sup>•Oozyte<sup>-1</sup> und wurde in der Aktivitätsberechnung der Transportermutanten mit einbezogen.

In beiden Versuchsreihen wurden die Cysteinmutanten aus der ersten untersuchten Region S66C, A70C und S73C trotz Vorinkubation mit 10 bzw. 100 mM 3-OMG durch die Einwirkung von pCMBS in ihrer Transportaktivität stark gehemmt. Dabei war es auch ohne Bedeutung, ob eine Inkubation von 2 mM pCMBS für 1 h oder 0,025 mM pCMBS für 15 min stattgefunden hatte. Sie lag für S66C bei  $7 \pm 6$  % und für A70C bei  $4 \pm 5$  %, wenn die Daten, die den Abbildungen 18 und 19 zugrunde liegen, zusammengefasst werden. Da wahrscheinlich die Expression bei der Mutante S73C nach Abzug des endogenen Transports im zweiten Versuch zu schwach war, kann für eine Aussage nur der erste Versuch herangezogen werden. Hier hatte die Mutante unter Einfluss von pCMBS eine Restaktivität von nur  $20 \pm 21$  %. Somit konnte in keiner Position der ersten Region eine Aminosäure identifiziert werden, die mit der Substratbindungsstelle für Glucose im cysteinfreien GLUT1 interagiert und durch 3-OMG vor der hemmenden Transportwirkung des pCMBS geschützt wird. Die Cysteinmutanten I287C, F291C und S294C zeigten, wie die entsprechend untersuchten Mutanten der ersten Region, trotz der Vorinkubation mit 10 bzw. 100 mM 3-OMG eine starke Reduktion der Transportaktivität nach Einwirkung von pCMBS. In beiden Versuchsanordnungen wurde eine deutliche Verminderung der Transportaktivität nachgewiesen, die für I287C bei  $10 \pm 6$  %, für F291C bei  $16 \pm 8$  % und für S294C bei  $18 \pm 12$  lag. Zusammenfassend erlauben die Versuche die gleiche Aussage wie für die erste untersuchte Region: Die insertierten Sulfhydrylgruppen in den untersuchten Positionen, die zu einer starken Hemmung der Transportaktivität beitrugen, liegen nicht in der unmittelbaren Nähe der Substratbindungsstelle für Glucose und treten nicht mit der Substratbindungsstelle in Wechselwirkung.

### 4.3 Struktureller Teil - Beitrag der Cystein-Scanning-Mutagenese zur Strukturaufklärung des GLUT1

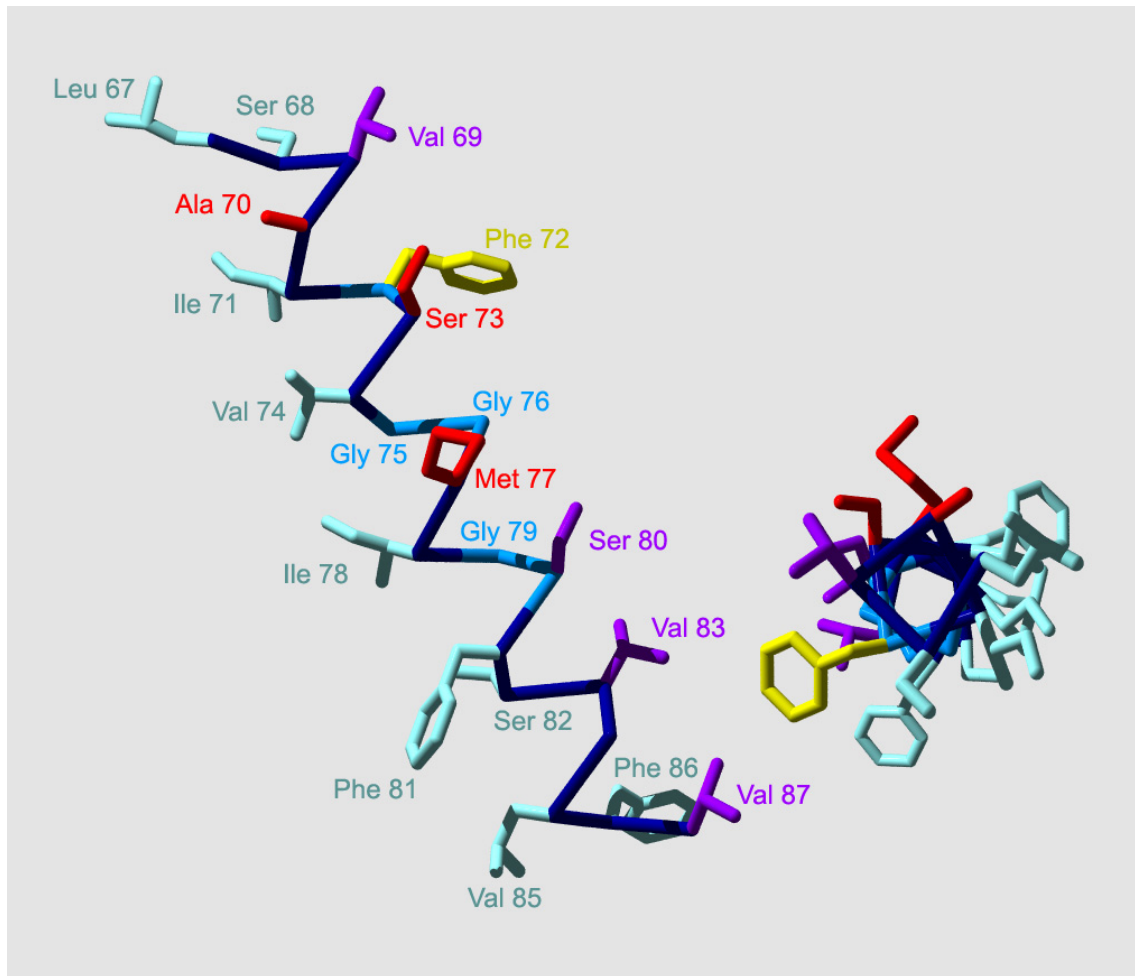
Für Domänen, in denen die Cystein-Scanning-Mutagenese in Verbindung mit der Applikation von Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen durchgeführt werden kann, ist eine Analyse der Sekundärstruktur des Transporters möglich. Damit gehört die Cystein-Scanning-Mutagenese derzeit mit zu den bevorzugten methodischen Ansätzen für die Untersuchung struktureller Eigenschaften von Proteinen, bei denen eine Röntgenstrukturanalyse bisher nicht möglich ist. Von besonderer Bedeutung sind die physikochemischen Unterschiede der eingesetzten Sulfhydrylreagenzien, die sich in unterschiedlichen Membranpermeabilitäten manifestieren. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften kann pCMBS die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran nicht permeieren, so dass ein Kontakt mit Aminosäuren innerhalb der Membran mittels passiver Diffusion weitgehend ausgeschlossen werden kann. Sind jedoch Änderungen der katalytischen Aktivität des GLUT1 nachweisbar, muss ein Kontakt mit extrazellulärem oder Hydratwasser stattgefunden haben. Ein Ausbleiben der erwarteten Transporthemmung lässt den Schluss zu, dass die Position einer insertierten SH-Gruppe keinen Kontakt zum Hemmstoff hat oder dass trotz der Interaktion mit dem Hemmstoff dieser Bereich für den Transport nicht essentiell ist. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten („accessibility“ vs „reactivity“) zu unterscheiden, wird neben dem nicht durch die Membran permeierenden Hemmstoff als Gegenspieler ein Membran permeierender Transportinhibitor wie NEM eingesetzt. Entsprechend dem Sekundärstrukturmodell des GLUT1, das 1985 von Mueckler et al. (Mueckler et al., 1985) vorgestellt wurde (siehe Abb. 1), bestehen die Transmembransegmente 2 und 7 des GLUT1 aus jeweils 21 Aminosäuren (Positionen 67 - 87 bzw. 272 - 292), die nach Analyse der Hydropathieplots wahrscheinlich eine  $\alpha$ -helikale Struktur bilden (Mueckler et al., 1985).

#### 4.3.1 Strukturvorhersagen für das Transmembransegment 2

Um aus den Ergebnissen der Cystein-Scanning-Mutagenese Schlussfolgerungen auf die Struktur des Transporters zu ziehen, müssen verschiedene Bedingungen erfüllt sein. Dazu gehört der Nachweis einer transportmodifizierenden Wirkung des Membran permeierenden Hemmstoffs als Beleg dafür, dass diese Substanz überhaupt mit der eingeführten freien SH-Gruppe reagiert (siehe obigen Abschnitt 4.3).

Geht man bei dem Einsatz mit der nicht durch die Membran permeierenden Substanz pCMBS von einer Wirkung aus, die eine Reduktion der Transportaktivität von mindestens 50 % bewirkt, finden sich im zweiten Transmembransegment drei Aminosäurepositionen, die dieses Kriterium erfüllen (A70C, S73C und M77C, siehe auch Abb. 14 und Tab. 2). Die experimentellen Daten lassen sich am besten in Form einer  $\alpha$ -helikalen Struktur graphisch darstellen. Dabei wird von einer idealen Helix ausgegangen, in der sich eine horizontale Position im dreidimensionalen Raum über eine durch Peptidbindung verbundene Aminosäurekette alle 3,6 Aminosäuren wiederholt (Karlson et al., 1994).





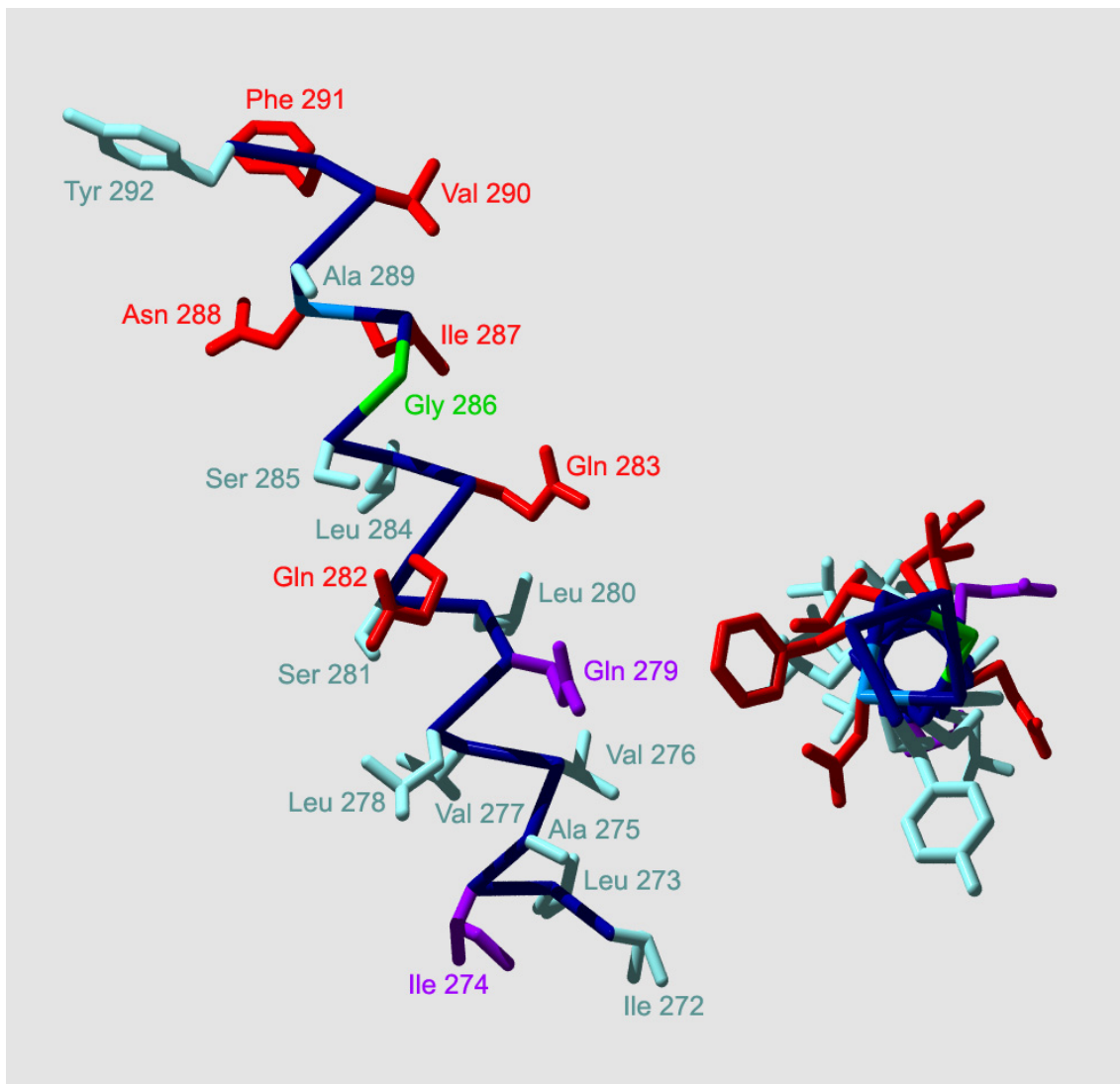
**Abb. 20:** Seitenansicht (linke Bildhälfte) und Aufsicht (rechte Bildhälfte) des putativen zweiten Transmembransegments des GLUT1 in einer  $\alpha$ -helikalen Projektion. Die Cysteinmutanten der rot eingefärbten Aminosäurereste wurden mindestens zu 50 % durch pCMBS, die violett eingefärbten nicht durch pCMBS aber zu mindestens 70 % durch NEM in ihrer Aktivität gehemmt. Die hellblau markierten Mutanten zeigten keinerlei Transportmodifikation. Die gelb markierte Mutante besaß keine Basalaktivität. Die dunkelblau und blau markierten Teile der Helix bilden das aus der Peptidbindung resultierende Grundgerüst (backbone) der Aminosäurekette, wobei die mit der dunkelblauen Farbe gekennzeichneten Transportermutanten eine normale Basalaktivität hatten, während die blau gekennzeichneten eine sehr geringe Basalaktivität aufwiesen.

Wie aus der Aufsicht auf die Helix deutlich wird, befinden sich die Positionen der pCMBS empfindlichen Cysteinmutanten in einem vertikalen Korridor auf einer Seite dieser Helix und könnte strukturell als Spalte („crevice“) definiert werden. Eine solche Membranspalte muss mit dem extrazellulären Raum in Verbindung stehen. Eine vergleichbare Anordnung in einer etwas breiteren Ausdehnung lässt sich für die Aminosäuren erkennen, deren Mutagenese zu Cystein mit einem sehr hohen Verlust an Transportaktivität verbunden ist (F72C, G75C, G76C, G79C und S80C - siehe Kapitel 4.2.3.1.1). Es bleibt die Frage offen, ob die betreffenden Aminosäuren für den Transport essentiell sind oder aber ihre Änderungen zu Cystein mit einem Verlust an katalytischer Aktivität des Transporters einhergeht. Auch die Aminosäuren, die eine Transportveränderung durch Inkubation mit NEM nicht jedoch mit pCMBS ausweisen (V69C, S80C, V83C und V87C), liegen in der Aufsicht betrachtet in einer vertikalen Linie zueinander,

wobei jedoch als Besonderheit die sehr geringe Basalaktivität der Mutante S80C zu erwähnen ist.

#### 4.3.2 Strukturvorhersagen für das Transmembransegment 7

Eine Analyse der Versuchsergebnisse, wie sie für das zweite Transmembransegment vorgenommen wurde, kann in gleicher Weise für die Cysteinmutanten erfolgen, die in der zweiten untersuchten Region hergestellt wurden und das siebte putative Transmembransegment bilden. Ausgegangen wird ebenfalls von einer idealen  $\alpha$ -Helix.



**Abb. 21:** Seitenansicht (linke Bildhälfte) und Aufsicht (rechte Bildhälfte) des putativen siebten Transmembransegments des GLUT1 in einer  $\alpha$ -helikalen Projektion. Die Cysteinmutanten der rot eingefärbten Aminosäurereste wurden mindestens zu 50 % durch pCMBS, die violett eingefärbten nicht durch pCMBS aber zu mindestens 70 % durch NEM in ihrer Aktivität gehemmt. Die hellblau markierten Mutanten zeigten keinerlei Transportmodifikation. Die grün markierte Mutante besaß nur eine sehr geringe Transportaktivität, die sich aber unter dem Einfluss der Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen deutlich steigerte. Die dunkelblau und blau markierten Teile der Helix bilden das aus der Peptidbindung resultierende Grundgerüst (backbone) der Aminosäurekette, wobei die mit der dunkelblauen Farbe gekennzeichneten

Transportermutanten eine normale Basalaktivität hatten, während die blau gekennzeichneten eine sehr geringe Basalaktivität aufwiesen (nur Position 288).

Im Vergleich zum zweiten Transmembransegment sind aus dem siebten Transmembransegment wesentlich mehr Cysteinmutanten in dem Maße gegenüber pCMBS empfindlich, so dass die Transportaktivitäten um mehr als 50 % abnahmen. Ein besonderer Unterschied zum zweiten Transmembransegment besteht in einer Paarbildung hemmbarer Cysteinmutanten. So zeigen die Paare Q282C und Q283C, I287C und N288C (wenn die äußerst geringe Basalaktivität von N288C unberücksichtigt bleibt) sowie das Paar V290C und F291C eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber pCMBS. Wie im zweiten Transmembransegment, können 3 Positionen innerhalb der Helix 7 identifiziert werden, die mit pCMBS interagieren. Da es sich jedoch um benachbarte Aminosäuren handelt, ist die horizontale Ausdehnung größer als beim zweiten Transmembransegment und die Aminosäuren liegen in der vertikalen Betrachtung weiter verteilt auf den Seiten der Helix als beim zweiten Transmembransegment. In der zum extrazellulären Raum ausgerichteten Plasmamembranhälfte der Helix existieren SH-Gruppen in Positionen, die einen schmalen Korridor bilden und nach Gabe von pCMBS zu keiner Hemmung der Transportaktivität führen (hellblau gefärbte Aminosäurereste der Positionen 292 bis 284 in der Abb. 21).

Als Besonderheit kann mit G286C eine Mutante identifiziert werden, die aufgrund der Mutagenese ihre katalytische Aktivität einbüßt, nach Inkubation mit pCMBS jedoch eine teilweise Reaktivierung ihrer katalytischen Aktivität zeigt. Ein weiterer Unterschied zum zweiten Transmembransegment besteht in der geringeren Anzahl an Transportern, die durch die Mutation selbst eine starke Reduktion der Transportaktivität erfahren, so dass deren Messergebnisse im Fehlerbereich der Nachweismethode liegen. Dies betrifft im wesentlichen nur die Mutanten auf den Positionen 286 und 288, die in Bezug auf die Aktivitätsbestimmung Besonderheiten zeigen. Wie schon erwähnt, wird bei der Mutante G286C eine sehr starke "Aktivierung" durch Schwefelwasserstoffgruppen sensitive Substanzen erreicht, wie sie in ähnlicher Weise nur noch bei der Schleifenmutante I297C beobachtet werden kann (siehe 4.2.3.2.3). Die Mutante N288C dagegen zeigt im Vergleich zu den anderen schwach transportierenden Mutanten eine stabile, oberhalb des endogenen Glucosetransport liegende Transportaktivität (siehe 4.2.3.2.1). Es ist davon auszugehen, dass der ermittelte Wert dieser Mutante nicht exakt die realen Transportraten unter Einfluss der Sulfhydrylreagenzien widerspiegelt; jedoch ist die Aussage zulässig, dass die Einwirkung dieser Substanzen einen stark hemmenden Einfluss auf die Transportaktivität ausübt.

---