

## 5 Diskussion

Für die vorliegende Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, die Aufklärung über verschiedene Bereiche der Sekundärstruktur des humanen Glucosetransporters GLUT1 liefern sollten. Im Vordergrund stand dabei (1.) die Identifizierung von Aminosäuren, die Endpunkte von putativen externen Schleifen und Transmembransegmenten bilden und (2.) die Analyse der Sekundärstruktur von zwei Transmembransegmenten (TM 2 und TM 7). Aufgrund des Arbeitsprinzips der verwendeten Untersuchungsmethoden wurde dafür eine Mutante eingesetzt, deren sechs native Cysteinreste in Serin bzw. Glycin verändert wurden (Wellner et al., 1995a).

### 5.1 Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem

Im Jahre 1971 veröffentlichten Gurdon et al. (Gurdon et al., 1971) die ersten molekularbiologischen Studien, die mit Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* durchgeführt wurden. Hediger et al. (Hediger et al., 1987) konnten 1987 den ersten Na<sup>+</sup>-abhängigen Glucosetransporter in X. Oozyten darstellen, während drei unabhängigen Arbeitsgruppen erstmals 1989 die heterologe Expression und funktionelle Analyse des humanen GLUT1 in diesem Expressionssystem gelang (Gould & Lienhard, 1989; Keller et al., 1989; Vera & Rosen, 1989). Es folgten viele weitere experimentelle Analysen der verschiedenen passiven Glucosetransporter in diesem Expressionssystem, die Aufschluss über die Struktur und Funktion der Transporter gaben (Übersichten: Baldwin, 1993; Gould & Holman, 1993; Baldwin, 1994; Mueckler, 1994; Hruz & Mueckler, 2001). Dabei erwies sich als ein ganz besonderer Vorteil dieses Expressionssystems, dass die Oozyten aufgrund ihrer Größe leicht zu manipulieren waren. Einen Überblick über die Vor- und Nachteile dieser Oozyten als Expressionssystem ist in einem Review von Keller und Olsowski (Keller & Olsowski, 1999) zu finden und im unten abgebildeten Schema wiedergegeben.

*The advantages:*

Large size (~ 0.5 µl volume of distribution)  
 - Simple microinjection of cRNA or protein into the cell  
 - Investigation on single cells

High ratio of heterologous to endogenous protein expression

Efficient functional analysis of  
 - novel gene products within the family  
 - isoform mutants and chimeric transporters  
 - mutant transporter with a disease-specific point missense mutation in the gene

Reconstitution system for signaling cascades

*Potential limitations due to:*

Amphibian cell processing machinery

Membrane environment distinct from mammalian prototype

X. oocyte-specific signaling pathways and intracellular trafficking

Schema (aus Keller & Olsowski, 1999): Vor- und Nachteile von Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* als Expressionssystem.

Neben der Injektion von cRNS eignen sich die Oozyten auch zur in vivo-Transkription und Replikation von heterogener DNS, die durch Mikroinjektion in den Nukleus gelangt. Aufgrund einer großen Anzahl freier und an das endoplasmatische Retikulum gebundener Ribosomen haben die X. Oozyten eine hohe translationale Kapazität und besitzen eine Zytoplasmamembran (Oolemma), die durch einen dichten Mikrovillibusatz auf das 4-fache der eigentlichen Oberflächengröße gesteigert wird (Dick et al., 1970; Steinacker et al., 2000). So sind Untersuchungen an Einzelzellen (z. B. Transportmessungen) relativ leicht möglich. Ebenso kann die Plasmamembran einzelner Oozyten manuell isoliert werden, wodurch im Vergleich zu anderen Zellsystemen eine relativ reine

Plasmamembranfraktion zu erhalten ist (Wellner et al., 1993). Die spezifischen Nachteile dieses Zellsystems ergeben sich aus den jahreszeitlichen Schwankungen in der „Qualität“ der Oozyten, ein Phänomen das von vielen Arbeitsgruppen beschrieben, aber bis heute noch nicht systematisch untersucht wurde. Die Qualitätsschwankungen äußern sich in einer verringerten Expressionsrate von heterogenen Proteinen und einer Abnahme der Endozytose von Nährsubstanzen. Die Lebensfähigkeit der Oozyten kann sich auf 1 bis 2 Tage, verbunden mit drastischen morphologischen Veränderungen, reduzieren (Hilken et al., 1997). Aufgrund dieser Tatsachen und wegen der Arbeit an einzelnen Zellen, muss für eine statistisch abgesicherte Untersuchung ein sehr hoher experimenteller Aufwand betrieben werden.

In Experimenten haben Keller et al. (Keller et al., 1989) und Due et al. (Due et al., 1995b) gezeigt, dass die Höhe der Expression des menschlichen GLUT1 in Oozyten des Krallenfrosch *Xenopus laevis* in weiten Bereichen linear von der injizierten Menge an cRNS abhängt. Ein weiterer Faktor, der die Translation injizierter cRNS in den Oozyten begünstigt, ist das „Capping“ der cRNS durch Einsatz von 7mGpppG. Diese Cap-Struktur am 5' Ende der cRNS des GLUT1 führte zu einer erhöhten Stabilität und damit zu einer effektiveren Translation der cRNS. Mit dem Einsatz von 500  $\mu$ M 7mGpppG während der cRNS-Synthese konnte eine sechsfache Steigerung der 2-DOG Aufnahme erreicht werden (Keller et al., 1989). In Arbeiten von Gould und Lienhard (Gould & Lienhard, 1989) und Vera und Rosen (Vera & Rosen, 1989) wurde mit immunologischen Methoden nachgewiesen, dass der Einbau der heterologen Glucosetransportproteine in die Plasmamembran von X. Oozyten innerhalb der ersten 48 h nach Injektion der cRNS zunimmt.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde eine Expressionszeit bis zur Transportmessung von 48 bis 72 h nach Injektion der cRNS festgelegt. Dies entsprach einem Kompromiss zwischen der Expressionshöhe des Proteins und einer intakten Morphologie der Oozyten in Kultur.

## **5.2 Methodische Probleme der Mutagenese und der Expression der entstandenen Mutanten**

Das Verfahren von Deng und Nickoloff (Deng & Nickoloff, 1992) zur Herstellung der Mutationen ist sehr effektiv, beinhaltet aber einige Prozeduren, die zu Fehlern führen können. Erforderliche Kontrollen wurden im notwendigen Umfang durchgeführt.

Zu den wichtigsten Fehlermöglichkeiten gehören:

### **1. Ein fehlerhaft synthetisiertes Oligonukleotid.**

Je länger die gewünschte Nukleotidsequenz des Oligonukleotids ist, desto größer wird die statistische Wahrscheinlichkeit eines Basensequenzfehlers bei der synthetischen Herstellung des Oligonukleotids. Deshalb wurde schon während des Designs der Nukleotidsequenzen darauf geachtet, diese nicht unnötig lang zu definieren. Nachdem ein Klon nach positiver Restriktionsfragmentanalyse (Nachweis eines veränderten Bandenmusters) selektiert wurde, erfolgte die Sequenzierung der DNS im Bereich der gesetzten Mutation. Diese setzte ca. 100 Basen vor dem Sequenzbeginn der eingeführten Oligonukleotide ein und konnte je nach Quantität und Qualität der Sequenzierung bis zu 200 Basen hinter der gesetzten Mutation umfassen. Diese Prozedur wurde mit jeder Mutante, die in dieser Arbeit vorgestellt wurde, durchgeführt, denn der falsche Baseneinbau aufgrund eines fehlerhaft synthetisierten Oligonukleotids konnte nur auf diese Weise festgestellt werden.

## 2. Die Komplementierung des mutagenen Stranges in der Mutagenese.

Nach Verschmelzung der Oligonukleotide mit dem parentalen DNS-Strang erfolgte die Komplementierung der gesamten Plasmid-DNS über eine Polymerase. Dafür wurde eine T4-DNS-Polymerase (Kunkel et al., 1984) eingesetzt. Dieser Polymerasentyp zeigt unter definierten Versuchsbedingungen im Vergleich zu verschiedenen anderen Typen die mit Abstand geringste Fehlerrate (weniger als ein Basenfehler pro 1.000.000 replizierte Nukleotide (Kunkel et al., 1987)). Da mit einer Sequenzierung nur ein ca. 300 bis 400 Basen langer Teilbereich der DNS erfasst werden konnte, blieb der übrige Teil (zwischen 5300 bis 5400 Basen) des mutierten Plasmids ungeprüft. Es ist nicht mit absoluter Sicherheit auszuschließen, dass eine in Bezug auf die gesetzte Mutation positiv analysierte Transportermutante einen Basenfehler besitzt, der während der Komplementierung aufgetreten ist und irgendwo im nicht sequenzierten Bereich der cDNS-Sequenz liegt. Dies könnte dann dazu führen, dass diese Mutante keine oder nur eine geringe basale Transportaktivität aufweist. Eine äußerst aufwendige Methode dies auszuschließen, wäre die Sequenzierung der kompletten cDNS dieser Mutante. Aufgrund des hohen zeitlichen und finanziellen Aufwandes wurde dies jedoch nur mit den parentalen Plasmidpräparationen durchgeführt, die als Vorlage für die Mutagenese dienten (cysteinfreier GLUT1 und GLUT1-k). Eine andere Methode einen solchen Fehler auszuschließen, ist das Ausschneiden der positiven Mutation mit Restriktionsenzymen und der anschließenden Ligation dieses Fragmentes in ein entsprechendes Plasmid, das vorher mit den gleichen Restriktionsenzymen geöffnet und dessen cDNS-Bereich vollständig sequenziert wurde. Nach der Ligation musste nur noch das eingesetzte Stück DNS über die Ligationsstellen hinweg durch Sequenzierung geprüft werden. Dieses Verfahren wurde bei allen Alaninmutanten, die auf der Wildtypvariante GLUT1-k (siehe 3.2.1.1) basierten und in begleitende Untersuchungen eingesetzt wurden, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in dieser Arbeit nicht dargestellt, dienten aber zum Teil als Kontrolle für hier besprochene Cysteinmutanten (siehe Kapitel 5.4.3).

## 3. Die Übersetzung der cDNS in cRNS durch in vitro-Transkription.

Genau wie bei der Komplementierung der Plasmid-DNS kann es bei der Translation der cDNS in die cRNS zu Fehlern kommen. Das einzige Fehlerausschlussverfahren ist eine mehrfache unabhängige Übersetzung der cDNS in cRNS mit anschließender Expression und funktioneller Analyse in *X. Oozyten*. Auch diese Methode ist arbeitsintensiv und erfordert einen hohen finanziellen Aufwand. In dieser Arbeit wurde darauf geachtet, dass die funktionellen Daten der Mutanten auf mindestens zwei unabhängige in vitro-Transkriptionen und die Translation in unterschiedliche Oozytenpräparationen zurückzuführen sind. Dies galt ganz im Besonderen für jene Mutanten, die eine starke Reduktion der basalen Transportaktivität aufwiesen,

## 5.3 Der cysteinfreie GLUT1

### 5.3.1 Allgemeine Bedeutung von Cysteinresten in Proteinen

Cysteine sind wichtige Aminosäuren für die Struktur von Proteinen, da durch die freie SH-Gruppe die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten möglich wird. Diese Disulfidbrücken können die Tertiär- bzw. Quartärstruktur eines Proteins bestimmen, wodurch sie letztlich auch für die Funktion von außerordentlicher Bedeut-

ung sind. Des Weiteren können Cysteinreste phosphoryliert oder durch Fettsäuren acyliert werden. Es gibt eine Fülle von Untersuchungen, die belegen, dass Cysteinreste für die Ausbildung bzw. Aufrechterhaltung proteingestützter Funktionen notwendig sind. Die Spannweite an Funktionalitäten reicht dabei vom kompletten Processing von Proteinen innerhalb von Zellen bis zur eigentlichen Funktion eines Proteins (Gaedigk-Nitschko et al., 1990; Dahl et al., 1991; Meins et al., 1993; Preston et al., 1993).

Es existieren aber auch Beispiele, in denen die Cysteinreste im exprimierten Protein nicht die primär funktionsbestimmenden Eigenschaften aufweisen. So zeigt bei der Laktose-Permease von *Escherichia coli* der individuelle Austausch der acht nativen Cysteinreste zu Serin bzw. Glycin keinen negativen Transporteffekt (van Iwaarden et al., 1991; Frillingos et al., 1998). Ein ähnliches Ergebnis lieferten Untersuchungen am Glucose-6-Phosphat/Phosphat Antiporter (UhpT) aus *Escherichia coli* (Yan & Maloney, 1993) und dem Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Anionenaustauscher aus Erythrozyten (Casey et al., 1995).

### 5.3.2 Die Rolle der Cysteinreste im humanen Glucosetransporter GLUT1

Ausgehend von der Nukleotidsequenz des humanen GLUT1 enthält das native Protein sechs Cysteinreste, die auf den Aminosäurepositionen 133, 201, 207, 347, 421 und 429 lokalisiert sind (Mueckler et al., 1985). Die Bedeutung dieser nativen Cysteinreste für den Glucosetransport und die Proteinstruktur wurden von verschiedenen Forschergruppen bearbeitet und kontrovers diskutiert (Walmsley, 1988; Carruthers, 1990; Silverman, 1991; Hebert & Carruthers, 1992). Ein Schwerpunkt in den Untersuchungen war die Analyse der möglichen Ausbildung von Schwefelbrücken zwischen den SH-Gruppen der nativen Cysteinreste. Im Vordergrund stand dabei die Frage, ob die funktionelle Einheit des GLUT1 ein monomeres Protein ist oder durch einen multimeren Proteinkomplex dargestellt wird. Ausgehend von den Bestimmungen und Ergebnissen der kinetischen Parameter zum Glucosetransport, wurde die These formuliert, dass der passive Transport der Glucose durch den GLUT1 wesentlich komplexer sein muss, als dies durch ein einfaches Carrier-Modell zu erklären wäre (siehe 1.4.2). Es wurde ein Modell für einen Transportmechanismus postuliert, bei dem ein Komplex aus vier GLUT1-Proteinen gebildet wird (= Homotetramer), dessen Zusammenhalt durch nicht kovalente Bindungen stabilisiert wird. Dabei bildet das Homotetramer aus zwei Dimeren, die jeweils pro Dimer gleichzeitig eine extra- und intrazelluläre Glucosebindungsstelle exponieren, eine funktionelle Einheit (Helgerson & Carruthers, 1987; Carruthers & Helgerson, 1991; Hebert & Carruthers, 1991). Im Gegensatz zum „einfachen asymmetrisch alternierenden Konformationsmodell“ (Geck, 1971; Eilam & Stein, 1974), kann daher die extern und die intern lokalisierte Substratbindungsstelle eines Dimers gleichzeitig mit je einem Glucosemolekül besetzt sein, das wiederum gleichzeitig transportiert wird. Diese Form des Transporters ist gut über einen multimeren Proteinkomplex zu erklären, der durch Disulfidbrücken stabilisiert wird (Hebert & Carruthers, 1991). Zu diesem Thema existieren zahlreiche Beiträge aus der Arbeitsgruppe von Carruthers. Eingesetzt wurden dabei verschiedene Untersuchungsmethoden wie Chimären zwischen unterschiedlichen Isoformen der Glucosetransporter (Pessino et al., 1991; Zottola et al., 1995), Immunreaktionen mit verschiedenen Antikörpern zur Identifizierung multimerer Proteinkomplexe (Hebert & Carruthers, 1992), Grössenausschluss-Chromatographie mit Saccharosegradienten-Zentrifugation (Hebert & Carruthers, 1992) und Hemmstoffbindungsstudien (Coderre et al., 1995). Als Ergebnis wurden daraus die Vorstellungen entwickelt, dass in verschiedenen Mammaliazellen der GLUT1 abhängig von seinem Redoxstatus als Oligomer vorliegt und ein relativ schneller Glucosetransport über einen multimeren

Proteinkomplex realisiert werden kann (Coderre et al., 1995). Im Gegensatz dazu zeigten Untersuchungen an *X. Oozyten*, dass die funktionelle Einheit des Glucosetransporters GLUT1 ohne Disulfidbrücken auskommt und demnach auch als funktionell aktives Monomer definiert werden kann, wie es auch für die Laktose-Permease beschrieben wurde (van Iwaarden et al., 1991; Frillingos et al., 1998). Erstmals wurde diese Frage 1994 von Wellner et al. (Wellner et al., 1994) systematisch untersucht. Die Autoren bestimmten die Transportaktivität von Mutanten, in denen die einzelnen nativen Cysteinreste durch gerichtete Mutagenese individuell verändert wurden. Es zeigte sich, dass keiner der nativen Cysteinreste für die katalytische Aktivität des GLUT1 essentiell war. Da die Wechselzahlen und Halbsättigungskonstanten des cysteinfreien GLUT1 für 2-DOG in *X. Oozyten* in derselben Größenordnung liegen wie die für menschliche Erythrozyten (Stein, 1986; Nishimura et al., 1993), kann die funktionelle Einheit des GLUT1 durchaus als Monomer definiert werden (Burant & Bell, 1992). Diese Annahme wurde darüber hinaus durch Ergebnisse unterstützt, die zeigten, dass keine Unterschiede im  $K_m$  und  $V_{max}$  für 2-DOG unter Einfluss der Schwefelwasserstoffbrücken brechenden Reduktionsmittel DTT und BME an GLUT1 exprimierenden *Oozyten* nachweisbar waren (Keller & Olsowski, 1999).

Ausgehend von den Ergebnissen von Wellner et al. (1994) war es ein konsequenter Schritt, einen cysteinfreien GLUT1 zu konstruieren. Die funktionellen Eigenschaften dieses Proteins wurden 1995 von Due et al. (Due et al., 1995a) bzw. Wellner et al. (Wellner et al., 1995a) unabhängig voneinander beschrieben. In beiden Studien zeigte das Konstrukt des cysteinfreien GLUT1 im Vergleich hinsichtlich der Transportaktivität keine starken Abweichungen zum Wildtyp. Wellner et al. (1995) konnten nachweisen, dass die relative intrinsische Aktivität ( $\triangleq$  Transportaktivität pro Mol des mutierten Transportproteins in der Plasmamembran im Verhältnis zum Wildtyp) im Vergleich zum Wildtyp 85 % betrug. In beiden Arbeiten wurde der  $K_i$ -Wert des cysteinfreien GLUT1 für Ethylidenglucose, eines ausschließlich extern wirksamen und nicht transportierten Liganden, bestimmt. Er unterschied sich nicht vom  $K_i$ -Wert des Wildtyp-GLUT1. In Experimenten von Due et al. (1995) war auch der  $K_i$ -Wert von Cytochalasin B, einem intrazellulär angreifenden Inhibitor, nicht verschieden zum Wildtyp. Wellner et al. (1995) beobachteten dagegen eine 5- bis 6-fach höhere Affinität von Cytochalasin B beim cysteinfreien GLUT1 im Vergleich zum Wildtyp. Aufgrund der erhobenen Daten diskutierten die Autoren die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen bisher nicht bestimmten Cysteinresten des GLUT1. Dieses Ergebnis entspricht den Daten von Zottola et al. (Zottola et al., 1995), die eine zweifach höhere Bindungskapazität von Cytochalasin B unter Einfluss von DTT beim GLUT1 in Erythrozyten nachwies. Jedoch ziehen diese Autoren eine gänzlich andere Schlussfolgerung aus den Ergebnissen im Vergleich zu Wellner et al. und vermuteten eine externe Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten in Position 347 und 421 zweier monomerer Transporter. Diese könnte eine „stabilisierende“ Wirkung auf die Untereinheit eines tertiären Proteinkomplexes ausüben (Zottola et al., 1995).

Es bleibt zu klären, ob in den Plasmamembranen der verschiedenen Zellgattungen Unterschiede auf molekularer Ebene (z. B. Redoxzustand) ein unterschiedlich konfiguriertes Glucosetransportprotein bedingen oder ob ein aktiver Proteinkomplex über andere Mechanismen realisiert wird als durch die Ausbildung von Schwefelbrücken.

Inzwischen wurde außer den cysteinfreien Konstrukten des GLUT1 der Arbeitsgruppen von Keller und May noch ein weiterer cysteinfreier humaner GLUT1 durch die Arbeitsgruppe von Mueckler publiziert. Er zeigte weitgehend identische Transportakti-

vitäten im Vergleich zum Transportprotein der Arbeitsgruppe von Keller (Mueckler & Makepeace, 1997).

Der Besitz des cysteinfreien GLUT1 und die Tatsache, dass der exprimierte Transporter eine vergleichbare Transportaktivität wie der Wildtyp aufweist, war die Voraussetzung für die Durchführung der Cystein-Scanning-Mutagenese zur Analyse der Sekundärstruktur.

## 5.4 Cystein-Scanning-Mutagenese und der Einsatz von Sulfhydrylreagenzien

### 5.4.1 Die Cystein-Scanning-Mutagenese in der Strukturanalyse

Unter dem Begriff Cystein-Scanning-Mutagenese ist eine potente Methode zur Strukturanalyse zu verstehen mit der aufeinanderfolgende Aminosäuren eines Proteins durch gerichtete Mutagenese eine nach der anderen individuell in Cysteinreste verändert werden. Jede veränderte Aminosäure definiert ein eigenes Protein, das nach der Einführung des Cysteinrestes eine einzige, freie SH-Gruppe enthält. Die Mutation einer einzelnen nativen Aminosäure in einen Cysteinrest kann aber nur sehr wenig über die Struktur eines Proteins preisgeben. Erst die konsequente funktionelle Analyse der aufeinanderfolgenden Punktmutanten in Kombination mit Sulfhydrylreagenzien macht strukturelle Zusammenhänge deutlich. Potentiell reagieren die Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen mit der eingeführten SH-Gruppe und können zu Veränderungen führen, die Funktionen des Proteins beeinflussen. Die strukturellen Veränderungen können speziell bei Transportproteinen durch die Bestimmung der katalytischen Aktivität funktionell nachgewiesen werden. Als Voraussetzung dafür muss aber die Mutante ohne den Einfluss von Sulfhydrylreagenzien eine ausreichend messbare basale Aktivität aufweisen, d. h. die funktionelle Beeinträchtigung durch die Einführung des Cysteinrestes darf nicht zu gravierend sein. In den vorliegenden Untersuchungen wurden spezifische Eigenschaften der eingesetzten Sulfhydrylreagenzien ausgenutzt, wie z. B. die Fähigkeit zur kovalenten bzw. zur reversiblen Bindung (an die SH-Gruppe) und die unterschiedliche Permeabilität der Zellmembran gegenüber diesen Substanzen. So sind Schwefelwasserstoffgruppen sensitive Substanzen, die aufgrund ihrer Eigenschaften die Zellmembran passieren können, in der Lage eingeführte SH-Gruppen zu erreichen, die sich innerhalb der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran in bestimmten Positionen der Transmembransegmente befinden.

Für die Beantwortung struktureller Fragestellungen bei integralen Membranproteinen wurde diese Methode in der Vergangenheit schon sehr erfolgreich eingesetzt. So hat die Arbeitsgemeinschaft von Kaback alle 417 nativen Aminosäuren der Laktose-Permease von *Escherichia coli* jeweils in einen Cysteinrest verändert und die Mutanten unter Einsatz von NEM funktionell untersucht (Dunten et al., 1993; Sahin-Toth & Kaback, 1993; Frillingos et al., 1994; Weitzman & Kaback, 1995; He et al., 1996; Frillingos & Kaback, 1997; Frillingos et al., 1997; Frillingos et al., 1998). Ebenso wurden im Na<sup>+</sup>/Glucose Co-Transporter (SGLT1) des Kaninchens die Aminosäuren auf den Positionen 162 - 173, welche die Transmembransegmente 4 und 5 miteinander verbinden, mit der Cystein-Scanning-Mutagenese analysiert. Als Schwefelwasserstoffgruppen sensitive Substanzen wurden hier Methanthiosulfonat und Ethylamin eingesetzt (Lo & Silverman, 1998). Ein weiteres Beispiel findet sich in der Arbeit von Yan und Maloney (Yan & Maloney, 1995) am bakteriellen Glucose 6-Phosphat-Phosphat Antiporter (UhpT). Bei diesem Antiporter wurden das komplette Transmembranseg-

ment 7 und Teile der angeschlossenen Schleifen mit der Cystein-Scanning-Mutagenese und dem Einsatz des Sulphydrylreagenzes pCMBS untersucht. Im Cl/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Anionenaustauscher von Erythrozyten wurden die Aminosäuren in den Positionen 643 bis 690 gegen Cysteinreste ausgetauscht und durch die Cystein-Scanning-Mutagenese in Kombination mit dem Sulphydrylreagenz 3-(N-maleimidyl-propionyl)biocytin untersucht (Tang et al., 1998). In dieser Arbeit wurde in besonderer Weise auf die Unterschiedlichkeit der eingesetzten Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen in bezug auf die Permeabilität der Zellmembran eingegangen. Das frei durch die Zellmembran diffundierende 3-(N-maleimidylpropionyl)biocytin wurde mit „lucifer yellow iodoacetamide“ verbunden, so dass es keine SH-Gruppen mehr innerhalb der Zellmembran erreichen konnte.

Allen hier genannten Beispielen gingen Mutanten voraus, die nach Veränderung aller nativen Cysteinreste in andere Aminosäurereste als cysteinfreie Konstrukte ein funktionelles Protein ausbildeten.

#### 5.4.2 Die Sulphydrylreagenzien pCMBS und NEM

Schwefelwasserstoffgruppen sensitive Substanzen wie Maleimide und quecksilberhaltige organische Verbindungen können durch die Reaktion mit SH-Gruppen Einfluss auf die Funktion von Proteinen wie z. B. Enzyme oder Carrier ausüben. Aus der Fülle der Sulphydrylreagenzien wurden für die Untersuchung von Transportproteinen bevorzugt das Maleimid N-Ethylmaleimid (NEM) (van Iwaarden et al., 1992) und die quecksilberhaltige organische Substanz para-Chloromercuribenzol-sulphonat (pCMBS) eingesetzt (van Steveninck et al., 1965; Abbott & Schachter, 1976; Batt et al., 1976; May, 1985). Unterstützt wurde der Einsatz des pCMBS durch Untersuchungen mit der Deuterium- und der Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass der GLUT1 in großem Umfang für Wasser zugänglich ist (Jung et al., 1986; Alvarez et al., 1987). Deshalb verspricht die experimentelle Analyse der Sekundärstruktur des GLUT1 durch das wasserlösliche pCMBS neben dem NEM, verwertbare Informationen zu liefern.

Die Sensitivität der SH-Gruppen von Proteinen wird bestimmt durch die räumliche Zugänglichkeit für diese Sulphydrylreagenzien und deren Reaktivität. Beides sind komplexe Vorgänge wie Untersuchungen zeigten, in denen verschiedene Sulphydrylreagenzien innerhalb eines Proteins mit einer unterschiedlichen Anzahl von SH-Gruppen reagierten (Webb, 1966). Diese Differenz in der Reaktivität könnte auf eine unterschiedliche Zugänglichkeit der SH-Gruppen zurückzuführen sein. Diese sterischen Hinderungen sind vermutlich lokale dreidimensionale Strukturen oder sperrige Seitenketten benachbarter Aminosäuren. Ebenso kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die kovalente Bindung einer sperrigen Gruppe (z. B. NEM) bzw. der Einbau einer starken negativen Ladung (z. B. pCMBS) strukturelle Veränderungen erzeugt werden, die strukturelle und funktionelle Konsequenzen nach sich ziehen. Untersuchungen am GLUT1 in Erythrozyten ergaben eine Inkorporation von 5 Mol NEM pro Mol mit SDS solubilisiertem Transportprotein, aber nur 3 Mol NEM pro Mol des nicht denaturierten GLUT1 (Deziel et al., 1985), während die Primärsequenz auf der Basis der Basensequenz des GLUT1 jedoch 6 Cysteinreste kodiert. In diesen Untersuchungen wurde auch nachgewiesen, dass ein tryptisches Fragment des GLUT1 nach vorheriger Behandlung intakter Erythrozyten mit pCMBS eine Bindung von NEM verhinderte.

Quecksilberhaltige organische Verbindungen haben eine chemische Spezifität für SH-Gruppen von Cysteinresten. Zu diesen Substanzen gehört pCMBS. Para-Chloromercuri-

benzolsulphonat wird als wirksamer Hemmstoff des Glucosetransports beschrieben, der kaum die Plasmamembran von intakten Zellen passieren kann (Batt et al., 1976). Zudem reagiert pCMBS mit der SH-Gruppe und kann durch intensive Waschkvorgänge wieder entfernt werden (siehe 4.2.4.2). Verglichen mit der verwandten para-Chloromercuri-Benzoessäure (pCMB), besitzt pCMBS statt einer schwach sauren Carbonylgruppe (pKa ~ 4,0) eine sehr saure Sulfongruppe (pKa ~ 1,5) (Yan & Maloney, 1993). Dies bedingt eine stark erhöhte Hydrophilie des pCMBS (Velick, 1953) im Vergleich zur pCMB, die letztlich bewirkt, dass pCMBS nur Zugang zu SH-Gruppen erhält, die innerhalb einer wasserlöslichen Phase liegen.

NEM dagegen ist eine Substanz, die frei durch Membranen der Lipiddoppelschicht diffundieren kann. Somit kann NEM Bereiche von membranständigen Transportern erreichen, die innerhalb der Plasmamembran oder im zytosolischen Grenzbereich zur Plasmamembran liegen. Ein weiterer wichtiger Unterschied zum pCMBS besteht in der Art der Bindung an die SH-Gruppe. Sie wird zwischen einer Kohlenstoffdoppelbindung des NEM und der SH-Gruppe des Cysteinrestes ausgebildet und ist irreversibel. Obwohl NEM als eine Substanz definiert wird, die spezifisch mit SH-Gruppen von Cysteinresten reagiert, kann NEM auch mit anderen Schwefelgruppen reagieren (Ellis, 1966). Ein besonderes Merkmal ist die Tatsache, dass NEM bei langen Inkubationszeiten die Struktur der Plasmamembran von X. Oozyten zu verändern scheint. In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt), in denen der zeitliche Einfluss von 10 mM NEM auf den endogenen Glucosetransport von X. Oozyten getestet wurde, stieg die Aufnahme der radioaktiv markierten Glucosemenge in die Oozyte nach 90 Minuten an und erreichte ein Maximum nach ca. 3 Stunden. Die aufgenommene Glucosemenge erreichte dabei Werte, wie sie bei Oozyten, die den cysteinfreien GLUT1 exprimiert hatten, festgestellt wurden. Diese Steigerung der Glucoseaufnahme in die unbehandelten X. Oozyten war jedoch nicht durch den spezifischen Transporthemmstoff Cytochalasin B zu inhibieren. Die Oozyten zeigten selbst nach tagelanger Inkubation mit NEM keine lichtmikroskopisch feststellbaren Veränderungen der Zelloberfläche. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass NEM nach langen Inkubationszeiten die Zellmembran auf molekularer Ebene in bisher unbekannter Art und Weise verändert. Vergleichbare Effekte konnten unter Einfluss von pCMBS nicht festgestellt werden.

### **5.4.3 Die basalen Transportaktivitäten der Cysteinmutanten aus der ersten (Aminosäurepositionen 61-87) und zweiten (Aminosäurepositionen 272-299) untersuchten Region**

Nach Substitution der einzelnen Serinreste in den postulierten externen Schleifen und anschließender Testung der Cysteinmutanten mit pCMBS wurde deutlich, dass nur die in den extrazellulären Schleifen 1 und 4 gelegenen Mutationen eine Wechselwirkung mit pCMBS eingingen, die sich direkt auf die Transportaktivität auswirkte (siehe 4.2.2.2). Dieses Ergebnis stimmt mit einer Untersuchung überein, in der die Glykosylierung-Scanning-Mutagenese als Methode eingesetzt wurde (Hresko et al., 1994). Die Experimente zeigten, dass die Einführung von 41 Aminosäuren, die eine Glykosylierungssequenz des GLUT4 enthielt, keine dramatische Änderung der Transportaktivität des GLUT1 erzeugte, wenn diese Aminosäurekette in die externen Schleifen 2, 3 oder 5 eingeführt wurde. Aufgrund der Tatsache, dass nur die Cysteinmutanten aus der ersten und vierten extrazellulären Schleife eine Transportmodifikation unter dem Einfluss von pCMBS zeigten, beschränkte sich die vorliegende Untersuchung auf Teile der extrazellulären Schleifen 1 und 4 sowie die Transmembransegmente 2 und 7.



Die meisten der nachfolgend in Cysteinreste mutierten Aminosäuren konnten verändert werden, ohne dass dies zu dramatischen Konsequenzen auf die Transportaktivitäten führte. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit einigen publizierten Arbeiten, in denen die gerichtete Mutagenese als Untersuchungswerkzeug eingesetzt wurde. So waren z. B. keine nennenswerten Veränderungen der Transportaktivität nachzuweisen, wenn das Tryptophan in der ersten extrazellulären Schleife auf Position 65 durch Glycin bzw. Leucin ersetzt wurde (Garcia et al., 1992). Die Autoren gehen davon aus, dass diese Aminosäure noch durch weitere ersetzt werden kann, ohne dabei einen Effekt auf die Transportaktivität zu bewirken.

Jene Cysteinmutanten, die in dieser Arbeit eine starke Reduktion ihrer basalen Transportaktivität aufwiesen, befanden sich nach dem Sekundärstrukturmodell von Mueckler et al. (Mueckler et al., 1985) bis auf die Mutante in der vierten extrazellulären Schleife in Position 293 innerhalb der Transmembransegmente.

Die Substitution des Phenylalanins in Position 72 im zweiten Transmembransegment, ergab eine Cysteinmutante mit einem dramatischen Rückgang in der Transportaktivität. Es war eine von 5 Cysteinmutationen aus der ersten Region, welche in Relation zum cysteinfreien GLUT1 weniger als 10 % Transportaktivität erreichte. Aus diesem Ergebnis könnte geschlossen werden, dass die Aktivitätsabnahme auf einen Verlust des aromatischen Restes in dieser Position zurückzuführen ist. Der Ersatz dieses Phenylalanins durch Alanin im cysteinfreien GLUT1 definierte ebenfalls eine Mutante, die praktisch keine Aktivität zeigte (siehe Tab. 2). Die Untersuchung der Expression und der zellulären Verteilung beider Mutanten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie führte zu differierenden Ergebnissen. Die farbliche Markierung des Glucosetransportproteins in der Plasmamembran bei der Cysteinmutante war im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1 deutlich geringer, während die Anfärbung des Proteins der Alaninmutante dem des cysteinfreien GLUT1 entsprach (siehe 4.2.3.1.2). Aufgrund der äußerst geringen Transportaktivität der Transporter bedeutet dies, dass das Ausmaß der Transportstörung nicht durch eine Veränderung des Targetings des Transportproteins bedingt ist. Diese Schlussfolgerung wird gestützt durch eine weitere Alaninmutante in dieser Position, die in der Wildtypvariante GLUT1-k (siehe 3.2.1.1) erzeugt wurde. Das resultierende Transportprotein zeigte mit  $27 \pm 8\%$  ( $n = 4$ ; 95 Oozyten) im Vergleich zum Ausgangskonstrukt eine wesentlich geringere Transportaktivität, war aber in gleichem Maße in der Plasmamembran nachweisbar (Transportdaten und Fluoreszenzbilder nicht gezeigt).

Für den Verlust der Transportaktivität scheint neben der Veränderung des Phenylalaninrestes zu Cystein auch die Position der Mutation dafür verantwortlich zu sein, wie weitere Mutanten vermuten lassen. Die Phenylalaninreste in den Positionen 81 und 86 im Transmembransegment 2 wurden ebenfalls durch Cysteinreste ersetzt, besaßen aber im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1 über 50 % der Transportaktivität (siehe 4.2.3.1.1 bzw. Tab. 2) und damit eine wesentlich höhere Basalaktivität als die Cysteinmutante auf Position 72. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass für die Transportaktivität neben der Änderung des Aminosäurerestes auch die Position der Seitenkette im Transmembransegment eine entscheidende Rolle spielt. Gestützt wird diese Vorstellung durch die Betrachtung weiterer Cysteinmutanten im Transmembransegment 2, die mit einem großen Verlust der Transportaktivität einhergingen (neben der Position 72 noch die Positionen 75, 76, 79, und 80). Sie sind der Aminosäurekette folgend alle im mittleren Bereich des Transmembransegments 2 lokalisiert. Die betroffenen Aminosäuren wurden in der Wildtypvariante GLUT1-k durch Alanin ersetzt

und funktionell getestet. Interessanterweise zeigte neben der oben schon besprochenen Alaninmutante auf Position 72 nur die Mutante auf Position 76 eine starke Transportreduktion (für G76A:  $10 \pm 4 \%$ ,  $n = 3$ ; 80 Oozyten), wobei die zelluläre Verteilung dieser Mutante in der Größenordnung des Wildtyps lag (Transportdaten und Fluoreszenzbilder nicht gezeigt). Dadurch wird andererseits deutlich, dass neben der Position auch die Art des eingeführten Aminosäurerestes für die Transportaktivität von Bedeutung ist.

Die Cysteinmutanten, bei denen die Glycinreste in den Positionen 75 und 76 (und auch 286) durch Cystein ersetzt wurden, zeigten bei der Untersuchung in der Fluoreszenzmikroskopie eine schwächere Expression als der cysteinfreie GLUT1, während die Expression der Mutante mit Ersatz des Glycins in Position 79 in gleicher Höhe lag, wie die des cysteinfreien GLUT1 (siehe 4.2.3.1.2). Die Gründe für diese Diskrepanz in Bezug auf die Expressionshöhe sind unbekannt, sie könnte aber auf unterschiedliche Halbwertszeiten der translatierten cRNS zurückzuführen sein. Das Arrangement der drei Glycinreste im Transmembransegment 2 auf einer Helixseite (siehe Abb. 20), die gegenüber den Mutanten liegt, die ihrerseits eine Sensitivität zum pCMBS aufwiesen, führt zu der Spekulation, dass diese Glycinreste Raum schaffen für Seitenketten der in der Membran befindlichen Fettsäuren und dadurch die notwendige Flexibilität des Transporters gewahrt wird. Dieses strukturelle Detail erinnert an ein ähnliches Detail in der heterotrimeren, kristallinen Struktur des Bakteriorhodopsins (Haupts et al., 1999). Die Präsenz mehrerer Glycinreste unterstützt dabei die Interaktion mit anderen Helices oder Fettsäureresten der Plasmamembran. Analog zu den im Transmembransegment 2 des GLUT1 angeordneten Glycinresten, findet sich hier ein Cluster aus ebenfalls drei Glycinen auf einer Seite der Helix D des Bakteriorhodopsins, der eine lokale Lipid/Protein-Interaktion ermöglicht.

In der zweiten untersuchten Region wurden sieben Cysteinmutanten identifiziert, die im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1 eine erheblich geringere basale Transportaktivität aufwiesen. Zu diesen Mutanten gehören auch die Cysteinmutationen der Tyrosinreste in den Positionen 292 und 293. Dass diese Aminosäuren eine aktive Rolle im Glucosetransport einnehmen, zeigten schon Untersuchungen, bei denen diese Tyrosinreste im Wildtyp durch Phenylalanin ersetzt wurden. In diesen Experimenten hatten die Mutanten einen Verlust der relativen intrinsischen Aktivität von 50 % bzw. 80 % (Mueckler et al., 1994). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Mutante Y293I zu einer deutlichen Abnahme der  $V_{\max}$  von 2-DOG führte und eine dramatische Reduktion (300-fach) der Affinität des endogenen spezifischen Glucosetransportinhibitors Cytochalasin B erfolgte (Mori et al., 1994). Im cysteinfreien GLUT1 führte die individuelle Substitution dieser Tyrosinreste mit Cystein zu Mutanten mit einer Transportreduktion von ca. 76 % (siehe 4.2.3.2.1 bzw. Tab. 2). Wie die oben genannten Experimente belegen reicht die Substitution dieser Tyrosinreste durch eine andere aromatische Aminosäure nicht aus, um eine vergleichbare Transportaktivität aufrechtzuerhalten. Verglichen damit ist die Verringerung der Transportaktivität durch die Einführung von Cysteinresten mit einer moderaten Transportaktivitätsabnahme gleichzusetzen. Dass die externe Schleife 4, in der das Tyrosin 293 lokalisiert ist, für den Transport wichtig ist, zeigten Untersuchungen am GLUT4 (Doerge et al., 1998). Die Aminosäuren Serin 310 und Threonin 311 des GLUT4, die dem Serin 294 und Threonin 295 des GLUT1 entsprechen, zeigten nach Substitution durch Alanin eine verminderte Transportaktivität. Bindungsexperimente führten zu dem Schluss, dass die mutierten Transporter in einer nach außen gerichteten Konformation arretiert werden. Im

cysteinfreien GLUT1 konnten diese Aminosäuren durch Cysteinreste substituiert werden, mit der Konsequenz, dass dadurch die Transportaktivität nicht beeinflusst (für T295) bzw. nur leicht gedämpft (S294) wurde.

Die stärkste Reduktion der Transportaktivität zeigten die Mutanten mit der Einführung eines Cysteinrests der Positionen 286 und 288 im siebten Transmembransegment. Obgleich, wie weiter unten nochmals angesprochen, der Ersatz des Asparagins 288 in Isoleucin im Wildtyp zu keinen funktionellen Veränderungen führte (Hashiramoto et al., 1992), wurden die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse für diese Cysteinmutanten durch andere Autoren bestätigt. Die spezifische Aktivität der Mutante G286C ging im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1 auf knapp 25 % zurück, während die Mutante N288C nicht einmal mehr 10 % der Ausgangsaktivität erreichte (Hruz & Mueckler, 1999). Obwohl Untersuchungen über die Expression und zelluläre Verteilung einer Alaninmutante auf Position 286 (G286A) im cysteinfreien GLUT1 keinen Unterschied zur entsprechenden Cysteinmutante zeigte, steigerte sich die Aktivität von 7 % (für G286C) auf 55 % (für G286A) in Relation zum cysteinfreien GLUT1. Dies kann als ein Indiz dafür gewertet werden, dass durch die Einführung des Cysteinrestes eine räumliche Störung erzeugt wird, die direkte Konsequenzen für den Glucosetransport mit sich bringt.

Analog zu den drei Glycinresten des Transmembransegments 2 befinden sich unter den Aminosäuren des Transmembransegments 7 drei Glutaminreste (Positionen 279, 282 und 283), die in ähnlicher Weise ebenfalls in der Mitte des Transmembransegments angeordnet sind. Die Transportaktivität der zu diesen Positionen gehörenden Cysteinmutanten betrug jeweils weniger als ein Fünftel in Relation zum cysteinfreien GLUT1. Eine im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1 schwache spezifische Transportaktivität der Mutanten Q282C und Q283C wurde ebenfalls von Hruz und Mueckler nachgewiesen (Hruz & Mueckler, 1999). Die spezifische Aktivität der Mutante Q279C lag dagegen bei etwas mehr als 50 %. Dass das Glutamin in Position 282 für die Transportaktivität von Bedeutung ist, wurde schon von Hashiramoto et al. (Hashiramoto et al., 1992) nachgewiesen. Die Autoren erzeugten Mutanten nach Substitution des Q282 und N288 durch Leucin bzw. Isoleucin. Beide Mutanten hatten mit dem Wildtyp eine vergleichbare Transportaktivität im Gegensatz zu den in dieser Arbeit vorgestellten Cysteinmutanten in Relation zum cysteinfreien GLUT1. Jedoch nahm bei der Mutante Q282L die Bindungsfähigkeit für die Liganden 4,6-*O*-Ethylidenglucose und 2-*N*-4-(1-azi-2,2,2-trifluoroethyl)benzoyl-1,3-bis(D-mannose-4-yloxy)-2-propylamine (ATB-BMPA), die für die Identifizierung der externen Bindungsstelle des Glucosetransporters eingesetzt werden, stark ab. Der Vergleich des Motivs der Aminosäurekette von der Position 278 bis 286 (LQLSQQLSG) mit einer Proteinstruktur Datenbank (PDB), lässt im Hinblick auf die Glutaminreste des Transmembransegments 7 eine deutliche Homologie zur Helix  $\alpha$ 1 der kristallinen Struktur des HFE, ein nicht klassifiziertes wichtiges Haupthistokompatibilitätskomplex I-assoziiertes Protein (Lebron et al., 1998), erkennen. Die kristalline Struktur des HFE zeigt ein Homodimer. Der interessante Aspekt hierbei ist, dass ein Glutaminrest, der mit dem Glutamin auf Position 282 des Transmembransegments 7 des GLUT1 korrespondiert, daran beteiligt ist, das Dimer über die Interaktion mit seinem Gegenpart auszubilden. Die Verbindung des Homodimers über die beiden Glutaminreste wird auch Glutamin-Finger genannt. Obwohl es keine funktionelle Beziehung zwischen den beiden Proteinen gibt, wäre eine Dimerisierung des GLUT1 über solch eine „Glutaminphase“ denkbar. Diese Vorstellung ist ein neuer Aspekt in der Diskussion um die mögliche Oligomerisierung des GLUT1. Zumindest demonstriert die angenommene Struktur, dass die „Glutaminphase“ des

Transmembransegment 7 das Potential zu einer hydrophilen Helix besitzt und geeignet ist, Helix-Helix Interaktionen aufzubauen.

#### **5.4.4 Der Einfluss von pCMBS und NEM auf die Cysteinmutanten nach extrazellulärer Applikation bei Oozyten von *Xenopus laevis***

Für eine Bewertung des Einflusses der Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen auf die Transportaktivitäten der in den Oozyten exprimierten Cysteinmutanten, musste auch deren basale Transportaktivität berücksichtigt werden. Sie ermittelte sich aus der gemessenen Transportaktivität ohne den Einfluss der Sulphydrylreagenzien. Erfahrungsgemäß war eine basale Transportaktivität im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1 von ca. 10 % notwendig, um eine sichere Bewertung der Daten durchführen zu können. Dementsprechend war dies bei den Mutanten, deren basale Aktivität unterhalb von ca. 10 % lag (F72C, G75C, G76C, G79C, S80C, G286C und N288C) zunächst einmal nicht möglich, selbst wenn in den Auswertungen der funktionellen Tests eine tendenzielle Veränderung der Transportaktivität unter Einfluss der Sulphydrylreagenzien erkennbar bzw. abzuleiten war. In der Betrachtung bzw. Analyse der gesamten untersuchten Regionen durch die Cystein-Scanning-Mutagenese fielen diese „unsicheren“ Aminosäurepositionen aber nicht ins Gewicht, da ihre Anzahl im Verhältnis zur Gesamtzahl der mutierten Aminosäuren gering war.

##### **5.4.4.1 Der putative Membranübergang zwischen extrazellulärer Schleife 1 und Transmembransegment 2 in der ersten untersuchten Region**

In der ersten untersuchten Region, wurde eine dramatische Reduktion der Transportaktivität durch pCMBS und NEM am angenommenen C-terminalen Ende der ersten extrazellulären Schleife nachgewiesen (Position 66). Die Mutation der nächst folgenden Aminosäure, die nach dem Topologiemodell von Mueckler et al. (12erTM-Modell) als erste Aminosäure des Transmembransegment 2 innerhalb der Membran liegt (Position 67), zeigte dagegen keine Transportbeeinflussung durch die Sulphydrylreagenzien. Erwartungsgemäß hätte dies aber durch NEM aufgrund seiner Membranlöslichkeit geschehen können. Dann wäre es möglich gewesen, die vorhergesagten Membrangrenzen zwischen extrazellulärer Schleife 1 und Transmembransegment 2 experimentell zu bestätigen. Statt dessen lässt sich zunächst nur folgern, dass Leucin 67 keine wichtige Funktion für die Transportaktivität einnimmt.

Bei der Betrachtung der Transportdaten der anderen Cysteinmutanten aus der ersten extrazellulären Schleife fällt auf, dass die Sensitivität für pCMBS mit zunehmender Distanz von der Membrangrenze abnimmt und die letzten untersuchten Cysteinmutanten (T63C bis L61C) in N-terminaler Richtung sogar eine Transportstimulation unter Einfluss von pCMBS zeigten. Dieses Ergebnis führte zu der Vorstellung, dass die zum Transmembransegment hin gelegenen Aminosäuren eine wichtigere Funktion für die Transportaktivität einnehmen als diejenigen, die weiter von der Membrangrenze entfernt sind. Die Begründung könnte darin liegen, dass die vornehmliche Funktion der die Transmembransegmente verbindenden Aminosäuren darin besteht, für eine ausreichende Flexibilität in der Anordnung der Helices zu sorgen und somit die notwendige Konformationsänderung des Proteins beim Transportprozess ermöglicht. Aus welchem Grund eine Aktivitätszunahme unter Einfluss von Sulphydrylreagenzien stattgefunden hat, bleibt eine offene Frage und bedarf weitergehender Untersuchungen.

Ausgehend von der angenommenen Membrangrenze fand sich drei Positionen weiter in C-terminaler Richtung eine Cysteinmutante (V69C), die eine sehr starke Transportmodifikation durch NEM, aber nur eine vergleichsweise schwache durch

pCMBS aufwies. Eine vollständige helikale Drehung platziert dieses Valin auf Position 69 vermutlich in der Weise, dass die eingeführte SH-Gruppe nur teilweise oder sehr schwierig für pCMBS zugänglich ist, für NEM dagegen sehr gut, was die unterschiedliche Hemmbarkeit der Transportaktivität dieser Cysteinmutante durch die Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen erklären könnte (NEM 2 % vs pCMBS 70 % Restaktivität). Diese Hemmcharakteristik weist dieser Mutante eindeutig den Status einer membranständigen Aminosäure zu. Interessanterweise zeigte die darauffolgende Mutante (S70C) wieder eine große Empfindlichkeit gegenüber beiden eingesetzten Sulphydrylreagenzien. Wie aus den Transportdaten der Tabelle 2 zu entnehmen ist, fanden sich in der Folge der eingeführten SH-Gruppen zwei weitere Mutanten (Positionen 73 und 77), die uneingeschränkt für pCMBS und NEM zugänglich waren. Unter der Annahme, dass das Transmembransegment 2 eine  $\alpha$ -helikale Struktur ausbildet, liegen die für pCMBS zugänglichen SH-Gruppen auf einer Helixseite (siehe Abb. 20) innerhalb der Membran. Im Hinblick auf den exakten Übergang zwischen extrazellulärer Schleife 1 und dem Transmembransegment 2 stimmt unter diesem Gesichtspunkt die aus dem Hydropathieplot für den GLUT1 (Mueckler et al., 1985) abgeleitete Grenze mit den experimentellen Daten überein. Die unterschiedliche Sensitivität der Mutanten mit dem eingeführten Cysteinrest in den Positionen 66 und 67 für pCMBS muss unter der Bedingung bewertet werden, dass SH-Gruppen innerhalb der Membran durchaus mit pCMBS reagieren können, dabei aber keine Veränderung der Transportaktivität zeigen. Die Transportdaten, die für die Mutanten in der angenommenen extrazellulären Schleife 1 ermittelt wurden, ergaben kein charakteristisches Muster, das zweifelsfrei einer helikalen oder  $\beta$ -Faltblattstruktur zuzuordnen wäre. Somit ergibt sich unter Berücksichtigung aller bisher ermittelten Daten ein wahrscheinlicher Übergang von extrazellulären Raum in die Membran im Bereich der Positionen 66 und 67.

Als einzige Cysteinmutante der beiden untersuchten Regionen zeigte nur W65C eine Sensitivität gegenüber pCMBS (38 % Restaktivität) aber nicht für NEM (78 % Restaktivität). Diese Differenz ist vermutlich auf die durch pCMBS in diesen Bereich eingeführte negative Ladung zurückzuführen. Dies könnte auch bei den Mutanten G79C und Q282C der Fall sein. Hier zeigten die Ergebnisse in den einzelnen Versuchen unter dem Einfluss von NEM jedoch starke Schwankungen, so dass keine eindeutige Tendenz zu erkennen war, aber eine Transportaktivitätsbeeinflussung durch NEM nicht ausgeschlossen werden konnte.

#### **5.4.4.2 Der Bereich der Aminosäuren in Position 67-87, das putative Transmembransegment 2**

Die Aminosäuren derjenigen Cysteinmutanten, die sehr empfindlich auf den Einsatz von pCMBS reagierten, stehen in einer  $\alpha$ -helikalen Projektion jener Helixseite gegenüber, in der sich Aminosäuren positionieren, die durch Austausch mit einem Cysteinrest eine starke Reduktion der Basalaktivität zeigten (siehe Abb. 20). Damit wird die Ansicht bestätigt, dass die Einführung eines Cysteinrests in diese Positionen die Flexibilität des Transporters beeinträchtigt. Ein Cluster aus drei Glycinresten könnte dabei für einen entsprechend großen oder hydrophoben Partner eines anderen helikalen Transmembransegments (als Helix-Helix Interaktion) bzw. Lipidschwanzes (als Helix-Lipid Interaktion) den notwendigen Raum liefern (siehe 5.4.3). Aus dem Transmembransegment 2 sind die gegenüber NEM sensitiven Mutanten, die keine oder nur eine geringe Transportaktivitätsbeeinflussung durch pCMBS zeigten, ausnahmslos mutierte Valinreste (Position 69, 83 und 87). Auch sie liegen auf derselben Seite einer Helix, auf

der auch die Cysteinreste liegen, die zu einer schwachen basalen Aktivität der Mutanten führen (siehe Abb. 20). Es scheint aufgrund der vergleichbaren Größe der Aminosäureseitenketten, dass der Ersatz des Valins durch das Cystein toleriert aber durch die Reaktion mit der großen Gruppe NEM die Flexibilität des Transporters gestört wird. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass Teile der Helix des Transmembransegments 2 sehr dicht gepackt sein könnten.

Wie schon erwähnt, ist für eine Beurteilung der Transportmodifikation, die durch die Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen hervorgerufen wurde, eine ausreichende Basalaktivität der Cysteinmutanten erforderlich. Im Prinzip sind alle Mutanten, deren basale Aktivität unterhalb von ca. 10 % der Aktivität des cysteinfreien GLUT1 lag, in bezug auf eine Transportmodifikation durch die Sulphydrylreagenzien nur begrenzt auswertbar. Dies betraf im Transmembransegment 2 die Mutanten F72C, G75C, G76C, G79C und S80C. Die für die Mutante S80C gemessenen Daten weisen aber eine Besonderheit auf, die es ermöglicht, den Einfluss der eingesetzten Sulphydrylreagenzien zumindest qualitativ zu beurteilen. Die ermittelte Transportaktivität dieser Mutante betrug unter Einfluss von pCMBS  $96 \pm 91$  % und nach Inkubation mit NEM  $26 \pm 86$  %. Die große Streuung verdeutlicht, dass diese Daten nicht zweifelsfrei auszuwerten sind; sie sind im Zusammenhang mit der geringen Basalaktivität dieser Mutante zu sehen. Wird aber in die Beurteilung dieser Daten eine Betrachtung derjenigen Oozyten mit einbezogen, die in der Auswertung auf den Wert Null gesetzt wurden (siehe Tab. 2), ist eine Tendenz in der Wirkung der eingesetzten Sulphydrylreagenzien erkennbar. Der Anteil der Oozyten mit rechnerisch negativen Werten stieg von 7 % (ohne NEM) auf 45 % unter dem Einfluss von NEM, während nur ein Anteil von 3 % der getesteten Oozyten unter dem Einfluss von pCMBS rechnerisch korrigiert werden musste. Dies entspricht bei der mit NEM inkubierten Gruppe einer sechsfachen Zunahme gegenüber der Kontrollgruppe. Somit ist von einem Einfluss des NEM auf die Transportaktivität dieser Mutante auszugehen, durch pCMBS aber nicht. Damit steht diese Mutante in einer Reihe mit den zuvor besprochenen Mutanten V69C, V83C und V87C und ordnet sich in Bezug auf die räumliche Anordnung hervorragend in dieselbe vertikale Linie einer Helix ein (siehe Abb. 20).

Insgesamt lassen sich mit den bisherigen Ergebnissen drei verschiedene Teile im Transmembransegment 2 beschreiben: Der erste definiert einen Bereich, der mit wasserlöslichen Substanzen in Kontakt treten kann. Er beschränkt sich auf die Seite einer  $\alpha$ -Helix, die in der externen Hälfte Kontakt zum extrazellulären Raum hält. Es schließt sich ein benachbarter Teil in der Helix an, dessen Cysteinmutanten eine Sensitivität gegenüber dem lipidlöslichen NEM zeigen und die nicht von wasserlöslichen Stoffen erreicht werden können. Dieser Bereich reicht über das gesamte Transmembransegment. Der dritte Teil besteht aus einer kompakten Region in der extrazellulär zugewandten Helixhälfte, in der die Einführung von Cysteinen zu jeweils nicht funktionsfähigen Transportern führt.

#### **5.4.4.3 Der putative Membranübergang zwischen Transmembransegment 7 und extrazellulärer Schleife 4 in der zweiten untersuchten Region**

Bezogen auf die zweite Region wurden hemmende Effekte durch pCMBS und NEM auf die Transportaktivität der Cysteinmutanten in N-terminaler Richtung der vierten extrazelluläre Schleife beobachtet. Ebenso wie in der ersten untersuchten Region ließ sich ein Muster der Transportaktivitäten unter Einfluss der eingesetzten Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen bezüglich der Aktivitätshöhe erkennen. Nahe der angenommenen Membrangrenze gelegene Mutationen (Positionen 293 und 294)

führen zu einer Abnahme der Transportaktivität. Mit zunehmender Entfernung der Mutationen von dieser Grenze ist eine Transportstimulation erkennbar. Vermutlich wird auch in dieser extrazellulären Schleife die Flexibilität des Transmembransegments durch die Bindung der Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen nahe der Membrangrenze gestört. Dies wurde schon für die extrazelluläre Schleife 1 diskutiert. Analog zu den Ergebnissen der ersten extrazellulären Schleife ergab sich eine Stimulation des Transports durch die Insertion eines Cysteins wenige Positionen von der Grenze zum angenommenen Transmembransegment 7 entfernt. Besonders auffällig ist hierbei die hohe Aktivitätssteigerung (Faktor 3) bei der Cysteinmutante in Position 297. Die Identifikation dieses erhöhten Glucosetransports nach Inkubation mit pCMBS oder NEM erfolgte durch Kontrollversuche, in denen Cytochalasin B als spezifischer Glucosetransporthemmstoff eingesetzt wurde. In diesen Ansätzen reduzierte sich die Transportaktivität nahezu auf Null (Daten nicht gezeigt), womit eindeutig nachgewiesen wurde, dass die Transportzunahme auf das Glucosetransportprotein zurückzuführen ist. In Bezug auf diese Schleifenpositionen kann spekuliert werden, dass die Sulfhydrylreagenzien in der Lage sind, durch ihre Bindung strukturelle Änderungen zu bewirken, die günstig für den Konformationswechsel des Transporters sind.

Für die Bestimmung des exakten Überganges zwischen der extrazellulären Schleife und dem Transmembransegment in dieser Region ergibt sich die Schwierigkeit, dass die Transportaktivität der Cysteinmutanten in den Positionen, die eine angenommene Grenze markieren (Positionen 292 und 293), bemerkenswert gering ist. Die basale Transportaktivität dieser Mutanten liegt zwischen 25 % und 30 % im Vergleich zu der des cysteinfreien GLUT1. Trotz dieser Problematik ist die Sensitivität für pCMBS im N-terminalen Endpunkt der vierten extrazellulären Schleife (Mutante Y293C) feststellbar, während eine Sensitivität in der benachbarten Position des Transmembransegments 7 (Mutante Y292C) nicht vorliegt (Restaktivität von 88 % gegenüber 42 %). Im Gegensatz dazu ist die Transportaktivitätsbeeinflussung durch NEM bei diesen Mutanten vergleichbar (49 % Restaktivität für Y292C und 37 % für Y293C). Diese unterschiedliche Beeinflussung der Transportaktivität durch die beiden Sulfhydrylreagenzien passt zu dem aus der Hydropathieanalyse (Mueckler et al., 1985) abgeleiteten Membranübergang zwischen den Aminosäuren Y292 und Y293. Aufgrund der Wirkung von pCMBS und NEM auf die Transportaktivität erhält die Mutante mit dem eingeführten Cysteinrest in Position 292 einen ähnlichen Status wie die Mutante V69C aus der ersten untersuchten Region (siehe 5.4.4.1) und kann mit großer Wahrscheinlichkeit als membranständige Aminosäure definiert werden.

Von allen extrazellulär lokalisierten Cysteinpositionen, die untersucht wurden, zeigte die Mutante mit dem eingeführten Cysteinrest in Position 298 als einzige eine starke Transporthemmung durch NEM und keine durch pCMBS. Diese Reaktion ist ungewöhnlich, da aufgrund der extrazellulären Lokalisation von einer Bindung des pCMBS an diese exponierte Sulfhydrylgruppe auszugehen ist. Vom Standpunkt der bisherigen strukturellen Betrachtung gibt es zur Zeit noch keine plausible Erklärung für diesen Befund. Es wird weitere Mutationen in C-terminaler Richtung und verschiedene Punktmutationen anders geladener Aminosäurereste auf dieser Position erfordern, um einer Erklärung näher zu kommen.

#### **5.4.4.4 Der Bereich der Aminosäuren in Position 272-292, das putative Transmembransegment 7**

Ähnlich wie im Transmembransegment 2 fanden sich nur in der extrazellulär zugewandten Hälfte des siebten Transmembransegments Cysteinmutanten, die durch

pCMBS oder NEM eine Änderung in ihrer Transportaktivität zeigten (Cysteinmutationen in den Positionen 282, 283, 287, 288, 290 und 291). Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen Hruz und Mueckler (Hruz & Mueckler, 1999). Sie setzten allerdings nur pCMBS ein und bewerteten die Mutanten mit dem eingeführten Cysteinrest in den Positionen 288 bzw. 289 anders. So blieb die Transportaktivität der Cysteinmutante in Position 288 nach Inkubation mit pCMBS unverändert, während die Mutation auf Position 289 eine Mutante bewirkte, die in ihrer Transportaktivität durch pCMBS gehemmt wurde. Allerdings erhielten Hruz und Mueckler bei der Mutante N288C eine in der Relation zum cysteinfreien GLUT1 äußerst geringe spezifische Aktivität. Sie konnten weder durch Immunoblotanalysen noch durch Fluoreszenzuntersuchungen Glucosetransportprotein in der Oozytenmembran nachweisen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den in dieser Arbeit vorgestellten Fluoreszenzuntersuchungen (siehe Abb. 16). Dass die Mutante N288C eine geringe Basalaktivität aufwies, zeigten auch unsere Daten (siehe Tab. 2), was unbedingt in der Beurteilung der Transportaktivität unter dem Einfluss von Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen berücksichtigt werden musste. Aufgrund unserer Messdaten aus mehreren unabhängigen Versuchen war jedoch eindeutig eine Transportbeeinflussung durch pCMBS erkennbar. Interessant ist in diesem Zusammenhang der Aspekt, dass in den Versuchen von Hruz und Mueckler pCMBS vor der Transportmessung aus dem Ansatz durch Spülen entfernt wurde. Wie in dieser Arbeit nachgewiesen (siehe 4.2.4.2), wird damit jedoch auch die Transportbeeinflussung abgeschwächt. Gerade bei einer sehr gering transportierenden Mutante sind hemmende Effekte dann überhaupt nicht mehr nachzuweisen. Der Unterschied der differierenden Ergebnisse bei der Mutante mit der Cysteinmutation in Position 289 kann dagegen nicht so einfach erklärt werden. Vielleicht liegt die Diskrepanz in den unterschiedlichen Versuchsmethoden begründet, da in den Versuchsansätzen von Hruz und Mueckler als Lösungsmittel für pCMBS auch stets Dimethylsulfid (DMSO) enthalten war, von dem die Fähigkeit bekannt ist, Substanzen zu lösen und z. B. durch die Haut in den Körper zu transportieren (McGrady, 1973).

Einen interessanten Fall stellt die Cysteinmutation in Position 286 dar. Die resultierende Mutante zeigte eine vergleichbar starke Transportzunahme unter dem Einfluss der Sulfhydrylreagenzien wie die Mutante aus der extrazellulären Schleife 4 in Position 297. Allerdings war die basale Transportaktivität dieser Mutante im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1 sehr schwach ( $< 7\%$ ). Eine Erklärungsmöglichkeit für die Aktivitätszunahme der Mutante G286C unter Einfluss der Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen könnte in einer teilweisen Kompensation des transportmindernden Effektes, der nach Einführung des Cysteinrests auftritt, zu sehen sein. Diese Erklärung kann aber nicht für die Mutante I297C in der extrazellulären Schleife gelten, denn die Anhebung der Transportaktivität überschritt hier aufgrund der wesentlich höheren Basalaktivität ( $> 70\%$ ) bei weitem die absoluten Transportraten, wie sie vom cysteinfreien GLUT1 unter Einfluss von pCMBS erreicht wurden. Wie für die Mutante in Position 297 erfolgte auch bei der Cysteinmutante G286C die Identifizierung eines erhöhten Transports von Glucose mit dem für den Glucosetransporter spezifischen Hemmstoff Cytochalasin B, der den Glucosetransport in diesen Experimenten nahezu zum Erliegen brachte (Daten nicht gezeigt).

Die Mutanten Q279C und I274C waren anlog zu den Mutanten V69C, S80C, V83C und V87C des zweiten Transmembransegments sensitiv gegenüber NEM, nicht aber gegenüber pCMBS. Als Folge der Einbettung in die Membran, ist die Position 279 wahrscheinlich von der wasserlöslichen Phase ausgeschlossen und somit nicht zugänglich für pCMBS. Die Aminosäure I274 dagegen ist, wie das Asparagin in



Position 288, auf der gegenüberliegenden Helixseite lokalisiert, und die Reaktion der Cysteinmutante mit NEM auf dieser Position führt zu einer Störung der dichten hydrophoben Faltung der zur zytoplasmatischen Seite gewandten Helixhälfte. Die Tatsache, dass diese Mutanten eine Transportmodifikation nur mit dem durch die Membran diffundierenden NEM zeigten und die mutierten Aminosäuren in der endofazialen Hälfte der Plasmamembran lokalisiert sein sollen, machten sie auch für eine Untersuchung mit intrazellulär appliziertem pCMBS interessant (siehe auch 4.2.3.1.3 und 4.2.3.2.3 und 5.4.5.1). Denn dieser Fakt kann als Hinweis gewertet werden, dass diese Aminosäuren an einer inneren Substratbindungsstelle beteiligt sind. Sie müssten dann für zytoplasmatisch gelöstes pCMBS zugänglich sein. Seatter et al. (Seatter et al., 1998) vermuteten demgegenüber, dass die Aminosäuren auf den Positionen 279 bis 281 an der Bildung einer äußeren Substratbindungsstelle beteiligt sind und mit dem C1-Atom der Glucose interagieren, wodurch dieses Motiv (QLS) zusätzlich zur Ausbildung einer Substratspezifität dient. Zu diesem Schluss kamen die Autoren nach Analyse verschiedener Chimären, hergestellt aus den humanen Glucosetransportern GLUT2 und GLUT3.

Im Vergleich zum Transmembransegment 2 erscheinen die Mutanten des Transmembransegments 7, welche mit den Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen reagierten und in ihrer Transportaktivität gehemmt waren, paarweise angeordnet (siehe Abb. 21). Auf eine Helixstruktur bezogen verteilen sie sich fast über den gesamten Umfang, während im Transmembransegment 2 die sensitiven Mutanten nahezu auf einer vertikalen Linie zueinander liegen. Zu einer ähnlichen Beurteilung ihrer Versuchsdaten in Bezug auf die Lokalisation der sensitiven Cysteinmutanten im Transmembransegment 7 kommen auch Hruz und Mueckler (Hruz & Mueckler, 1999).

#### **5.4.5 Untersuchungen zum Nachweis der inneren und äußeren Substratbindungsstelle des GLUT1**

##### **5.4.5.1 Der Einfluss von pCMBS an der endofazialen Plasmamembranseite bei Oozyten von *Xenopus laevis***

In den Transmembransegmenten 2 und 7 zeigten nur einige der Cysteinmutanten eine Sensitivität gegenüber der von außen zugeführten, nicht durch die Zellmembran permeierenden pCMBS. Diese Mutationen befinden sich ausschließlich in der zum extrazellulären Raum ausgerichteten Membranhälfte (siehe Abb. 22, Kapitel 5.5). Diese Tatsache entspricht zunächst einmal der Vorstellung eines alternierenden Konformationsmodells für den Glucosetransporter, wie es von Widdas (Widdas, 1952) postuliert wurde. Im Einklang mit diesem Modell wäre der Nachweis einer Mutante, die von der inneren Seite der Zellmembran mit pCMBS erreicht werden könnte, von großem Interesse. Untersuchungsgegenstand sind diejenigen Mutanten, die eine Transportmodifikation durch äußerlich appliziertes NEM, jedoch nicht durch pCMBS aufzeigten, und in der zytoplasmatischen Membranhälfte lokalisiert sind (V83, V87, I274 und Q279).

Wellner et al. hatten 1994 (Wellner et al., 1994) demonstriert, dass in *X. Oozyten* injiziertes pCMBS in einer Konzentration von 3 mM den Glucosetransport negativ beeinflusst, wobei nicht ausgeschlossen werden konnte, dass bei hohen pCMBS-Konzentrationen eine unspezifische Hemmung auftritt. Die Autoren stellten fest, dass verschiedene Punktmutanten auf den Positionen der nativen Cysteinreste 201 und 207, die nicht für extern appliziertes pCMBS zugänglich sind, eine unterschiedliche Reaktion nach Injektion von pCMBS zeigten. So verhielt sich der mutierte Transporter C201G wie der Wildtyp GLUT1. Die Mutante mit der Mutation des C207 in Serin zeigte

dagegen keine Hemmung in der Transportaktivität. Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis, dass die native SH-Gruppe in Position 207 durch endoplasmatisch appliziertes pCMBS erreicht wird. Diese Befunde zeigen ebenfalls, dass Untersuchungen mit Injektion von pCMBS in die Oozyten sinnvoll sein können. In den hier durchgeführten Versuchen war festzustellen, dass mit der injizierten Endkonzentration von 3 mM pCMBS eine deutliche unspezifische Transportbeeinflussung stattfand (knapp 50 %, siehe 4.2.4.1). Dieses Ergebnis wurde von Hruz und Mueckler (Hruz & Mueckler, 1999) bestätigt, wobei aus der Veröffentlichung nicht ersichtlich ist, in welcher Konzentration und mit welchem Lösungsmittel pCMBS injiziert wurde.

Mit Ausnahme der Mutation in Position 66 in der ersten externen Schleife, wies keine der in der vorliegenden Arbeit getesteten Mutanten eine Sensitivität der Transportaktivität gegenüber intern appliziertem pCMBS bei einer Konzentration von 1 mM und 3 mM auf. Das Ausmaß der Transporthemmung bei der Mutante S66C war bei weitem nicht so groß wie die Hemmung nach äußerlich appliziertem pCMBS (9 % vs 49 % Restaktivität). Diese vergleichsweise geringe Hemmung könnte auf pCMBS zurückzuführen sein, das von außen einwirkte, hervorgerufen durch eine geringe Kontamination des Mediums bei der Injektion von pCMBS. Denkbar ist auch die unspezifische Diffusion des pCMBS von Innen nach Außen während der Einwirkzeit, da der GLUT1 als multifunktionaler Transporter auch als Wasserkanal funktioniert (Fischbarg et al., 1989; Fischbarg et al., 1990). Diese Möglichkeit ist auch trotz aller experimenteller Sorgfalt nicht völlig auszuschließen. In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) wurde nachgewiesen, dass äußerlich appliziertes pCMBS bei sensitiven Mutanten (F291C) schon ohne jegliche Vorinkubation eine vollständige Transporthemmung im mikromolaren Konzentrationsbereich bewirken konnte.

Neben der Mutante S66C, besitzt I274C eine ausreichende Basalaktivität und wird durch injiziertes pCMBS in einer Konzentration von 3 mM jedoch nicht durch 1 mM gehemmt. Diese Cysteininsertion ist auf der endofazialen Seite der Plasmamembran lokalisiert. Wäre diese Aminosäure an einer inneren Substratbindungsstelle beteiligt, dürfte ein viel größerer Rückgang der Transportaktivität zu erwarten sein und sollte schon bei einer Konzentration von 1 mM pCMBS sichtbar werden. Auch Hruz und Mueckler gelang es nicht, eine Cysteinmutante im Transmembransegment 7 nachzuweisen, die durch injiziertes pCMBS zu beeinflussen war (Hruz & Mueckler, 1999). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass keine der untersuchten Cysteininsertionen der inneren Membranseite für pCMBS zugänglich sind. Andererseits ist es vielleicht auch möglich, dass nach Diffusion des pCMBS im Zytoplasma aufgrund der Reaktion mit einer Vielzahl von anderen SH-Gruppen relativ weniger pCMBS-Moleküle mit dem Glucosetransporter reagieren. Um zu der Frage der inneren Substratbindungsstelle gesicherte Aussagen liefern zu können, bedürfte es noch weit eingehender und empfindlicherer Versuchsverfahren als diejenigen, die hier eingesetzt wurden.

#### **5.4.5.2 Protektionsversuche: Hexosen in Konkurrenz zu pCMBS an der äußeren Substratbindungsstelle**

Theoretisch könnte die Hemmung der Transportaktivität einer Mutanten durch von außen appliziertes pCMBS auch als Hinweis auf eine Substratbindungsstelle oder als eine Interaktion mit der Substratbindungsstelle gedeutet werden. Um solchen Interpretationen Substanz zu geben, können sogenannte Protektionsversuche mit den entsprechenden Mutanten durchgeführt werden. Dabei wird analysiert, ob die Bindung des hemmenden Reagenzes und die daraus resultierende Transporthemmung durch eine entsprechend hohe Substratkonzentration verhindert werden kann. Handelt es sich um

eine kompetitive Hemmung, dürfte durch hohen Substratüberschuss im Verhältnis zur hemmenden Substanz der transportmodifizierende Effekt vermindert werden oder ausbleiben, wenn eine Konkurrenz um die Substratbindungsstelle stattfindet.

Alle getesteten Mutanten der Transmembransegmente 2 und 7, für die eine Sensitivität gegenüber äußerlich appliziertem pCMBS nachgewiesen wurde und die zudem eine ausreichend große Basalaktivität aufwiesen, zeigten kein positives Ergebnis in den Protektionsversuchen (siehe 4.2.4.2). Dass dieses methodische Vorgehen aussagekräftig ist und zu positiven Ergebnissen führen kann, zeigten u. a. Untersuchungen an der Laktose-Permease von *Escherichia coli*. Die Arbeitsgruppe von Kaback hatte 1998 nach über zehnjähriger Forschungsarbeit fast alle 417 Aminosäuren der Laktose-Permease individuell in Cysteine verändert und die jeweiligen Mutanten funktionell charakterisiert. Eine Protektion vor dem hemmenden Effekt des NEM konnte dabei für das native Cystein auf der Position 148 im putativen Transmembransegment 5 nachgewiesen werden, ferner für die Cysteinmutanten M145C (TM 5), V264C, G268C, N272C (TM 8) (Jung et al., 1994; Wu & Kaback, 1994; Frillingos & Kaback, 1997; Frillingos et al., 1998). Eine vollständige Protektion gelang allerdings nur bei dem nativen Cystein 148. Diese Aminosäure wird als eine von vier Aminosäuren angesehen, die direkten Kontakt zum Substrat hat.

In der Literatur existiert für den cysteinfreien GLUT1 ein Beispiel für eine positiv verlaufene Protektion (Mueckler & Makepeace, 1997). Die pCMBS sensitive Mutante V165C, die im putativen Transmembransegment 5 lokalisiert ist, konnte durch hohe 2-DOG Konzentrationen, erstaunlicherweise aber nicht durch hohe D-Glucose Konzentrationen, vor pCMBS geschützt werden. Die Autoren diskutierten auf der Basis ihrer Ergebnisse eine Beteiligung des Valins an der äußeren Substratbindungsstelle bzw. des Durchtrittskanals für die Glucose, da sich in dem angenommenen Transmembransegment 5 eine weitere Aminosäure (Q161) fand, von der die Autoren annehmen, dass sie an der Bildung einer Substratbindungsstelle beteiligt sein könnte (Mueckler et al., 1994).

#### **5.4.6 Die Vorstellung einer Helixanordnung des GLUT1 im Licht der experimentellen Ergebnisse**

Die meisten Modelle für das Arrangement der Helices im GLUT1 sehen das Transmembransegment 7 als Teil jener Struktur, die am Transfer der Glucose durch die Zellmembran beteiligt ist (Baldwin, 1993; Gould & Holman, 1993; Mueckler, 1994; Zeng et al., 1996; Widdas, 1998; Hruz & Mueckler, 2001; Zuniga et al., 2001). Schlussfolgerungen aus der Analyse von 65 verschiedenen Transportern der großen Superfamilie der passiven Transporter stützen die Annahme, dass neben anderen auch das Transmembransegment 2 ein möglicher Kandidat für die Beteiligung an einem Kanal für lösliche Substanzen ist (Goswitz & Brooker, 1995). Diese Annahme wurde kürzlich durch eine von Widdas veröffentlichte Arbeit unterstützt und um die Idee erweitert, dass das Transmembransegment 2 an der Porenengrenze für die Glucose beteiligt ist (Widdas, 1998). In der hypothetischen Darstellung des Helixarrangements des GLUT1 umgibt das Transmembransegment 2 mit 8 weiteren Helices einen offenen Spalt. Dabei wird das Transmembransegment 2 von den Helices 3, 4 und 11 umgeben (siehe auch Abb. 2). In einem weiteren Modell basierend auf 5 Helices ist das Transmembransegment 2 ebenfalls an der Bildung eines Kanals für Glucose beteiligt (Zeng et al., 1996). Zuniga et al. halten in ihrer dreidimensionalen Darstellung des GLUT1, die sich auf verschiedene Protein-Modelling Verfahren stützt, einen zweiten Durchtrittskanal für wahrscheinlich, an dem das zweite Transmembransegment

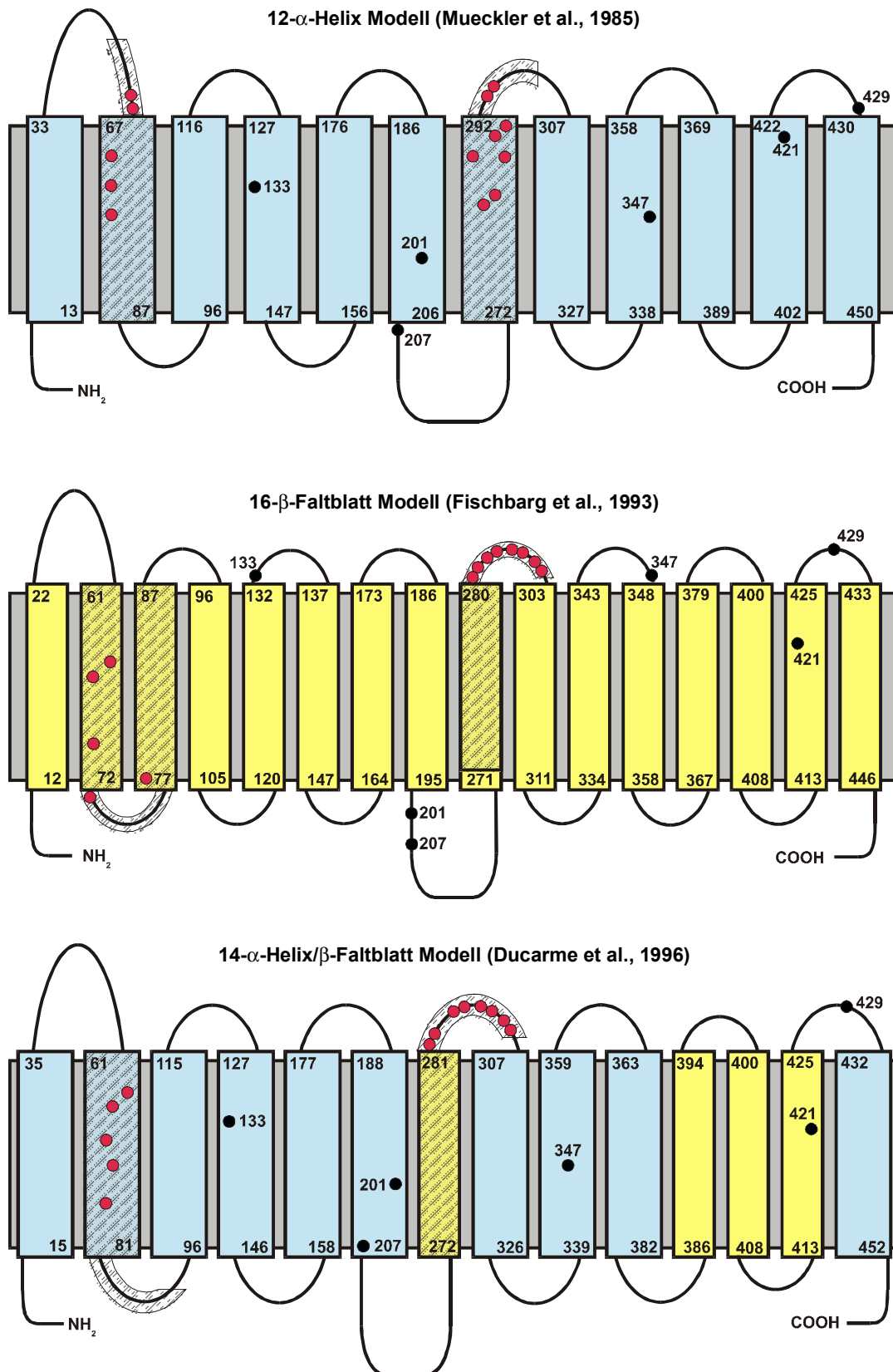
maßgeblich beteiligt ist (Zuniga et al., 2001). Er überlappt sich mit dem Durchtrittskanal für Glucose im endogenen Teil des Proteins, in dem wiederum das Transmembransegment eine zentrale Rolle einnimmt. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten unter Einsatz von pCMBS und NEM stützen die Schlussfolgerung, dass die Helices 2 und 7 Spalten („crevices“) bilden, die für wasserlösliche Substanzen zugänglich sind. Die Vorstellung, dass das Transmembransegment 2 und das Transmembransegment 7 an der Bildung einer Durchtrittspore beteiligt sein könnten, wurde durch unsere Arbeiten unterstützt und findet ihren Ausdruck in den derzeit neuesten Strukturmodellen (Hruz & Mueckler, 2001; Zuniga et al., 2001). Ähnliches kann auch für das Transmembransegment 5 angenommen werden, da auch für dieses Transmembransegment Cysteinmutanten gefunden wurden, die eine Änderung der Transportaktivität durch pCMBS zeigten (Mueckler & Makepeace, 1999). Diese drei Regionen (TM 2, TM 5 und TM 7) haben in Übereinstimmung miteinander keine zur zytoplasmatischen Membranseite gerichteten Teilbereiche, die durch extrazellulär gelöste Substanzen erreicht werden könnten. Zudem hat pCMBS keinen Zugang zu intrazellulär ausgerichteten Aminosäuren, selbst wenn es in die Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert wurde. Der einzige Unterschied des Transmembransegments 5 zu den Transmembransegmenten 2 und 7 ist der positive Nachweis einer Protektion vor pCMBS durch 2-DOG bei der Cysteinmutante in der Position 165, die eine Spekulation zur Beteiligung dieser Aminosäure an einer Substratbindungsstelle ermöglicht (Mueckler & Makepeace, 1997). Dabei ist aber die Tatsache zu berücksichtigen, dass es neben dem Kanal für Glucose noch eine weitere Durchtrittspore im GLUT1 zu geben scheint. Im GLUT1 konnte der passive Transport von Wasser (Fischbarg et al., 1989; Fischbarg et al., 1990) bzw. Dehydroascorbinsäure (Vera et al., 1993; Rumsey et al., 1999) nachgewiesen werden, so dass die verschiedenen Helices an unterschiedlichen Poren-bildenden-Strukturen beteiligt sein könnten. Interessant erscheint hierbei die Diskussion von Ducarme et al., welche die N-terminale Hälfte des GLUT1 als Wasserkanal erörtern und dabei dem zweiten Transmembransegment eine wichtige Rolle zusprechen (Ducarme et al., 1996).

## 5.5 Die verschiedenen Topologiemodelle des GLUT1

Mit der Klonierung und der Sequenzierung des humanen GLUT1 im Jahr 1985 erfolgte auch die Analyse der Sekundärstruktur mittels Hydropathieplots. Diese Analyse identifizierte Segmente mit je 21 Aminosäureresten über einem durchschnittlichen Schwellenwert der Hydropathie (entspricht einem Wert  $> 0,42$  einer normalisierten Skala für Hydropathiewerte), die letztlich zu einem Modell führte, bei dem das Protein aus zwölf  $\alpha$ -helikalen Transmembransegmenten (12erTM-Modell - siehe Abb. 22) aufgebaut ist (Mueckler et al., 1985). Fischbarg et al. entdeckten 1993, dass ein Antipeptid-Antikörper gerichtet gegen die Aminosäuresequenz I386 - A405 des GLUT1 diese Sequenz nur extrazellulär erreichen konnte. Nach dem 12erTM-Modell wird aber aus dieser Aminosäuresequenz u. a. die komplette intrazellulär gelegene Schleife 5 gebildet, welche die Transmembransegmente 10 und 11 miteinander verbindet. Aufgrund dieser Diskrepanz zum 12erTM-Modell und den Ergebnissen aus Untersuchungen mit den physikalischen Methoden Circular-Dichroismus und Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie, in denen ein geringer Teil des GLUT1-Proteins mit  $\beta$ -Strukturen ausgewiesen wurde (Alvarez et al., 1987; Chin et al., 1987), reevaluierten die Autoren die Primärsequenz des GLUT1 unter Benutzung eines Algorithmus, der speziell für  $\beta$ -Faltblattstrukturen geeignet war. Aus den Ergebnissen postulierten sie für den GLUT1 ein Sekundärstrukturmodell, bei dem das Protein aus sechzehn

$\beta$ -Faltblättern (16erTM-Modell - siehe Abb. 22) gebildet wird. Diese stehen in ihrer dreidimensionalen Struktur antiparallel zueinander, wie dies für verschiedene Porine nachgewiesen wurde (Fischbarg et al., 1993; Fischbarg et al., 1994). Dieses 16erTM-Modell konnte jedoch nicht mit anderen experimentellen Daten in Einklang gebracht werden. So postulierten Wellner et al., dass die nativen Cysteinreste auf Position 133 und 347 des GLUT1 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht extrazellulär lokalisiert sein können (Wellner et al., 1992; Wellner et al., 1994) und Hresko et al. wiesen nach, dass die Aminosäurepositionen 119 und 363 extrazellulär lokalisiert sind (Hresko et al., 1994). Diese Ergebnisse stimmten nicht mit der entwickelten Topologie von Fischbarg et al. (1993) überein.

Auf dieser Basis entwickelten Ducarme et al. (Ducarme et al., 1996) ein ganz neues Sekundärstrukturmodell, das die  $\alpha$ -Helix und das  $\beta$ -Faltblatt als Strukturmerkmale berücksichtigte. Die Stärke dieses Modells ist die Einbeziehung aller bis zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten Daten zur Struktur des GLUT1. Nach den Vorstellungen der Autoren besteht der GLUT1 aus zehn  $\alpha$ -Helices und vier  $\beta$ -Faltblättern (14erTM-Modell - siehe Abb. 22). Diese Topologie war das Ergebnis einer Berechnung, bestehend aus zwei verschiedenen Algorithmen in Kombination mit einer Kalkulation, die das Bestreben von Aminosäuren zur Bildung einer helikalen Drehung berücksichtigte. Im einzelnen entsprach dies der Methode von Jahnić zur Ermittlung der mittleren Hydrophobizitätswerte für Aminosäureketten bestehend aus 19 bzw. 7 Aminosäuren. Mit diesem Algorithmus werden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Strukturen definiert (Jahnić, 1990). Der zweite Algorithmus stammte von Eisenberg und ist eine Methode, die neben der Kalkulation der durchschnittlichen Hydrophobizität auch die Bestimmung des hydrophoben Moments erlaubt, welches ein Maß für die Homogenität der Hydrophobizität in einem Segment darstellt (Eisenberg et al., 1984). Dabei definiert ein hohes Moment, dass die hydrophoben Aminosäuren auf derselben Helixseite liegen. Kombiniert wurden diese Methoden jeweils mit der Bestimmung der Wahrscheinlichkeit eines vier Aminosäuren umfassenden Segments zur Ausbildung einer vollständigen Drehung (Chou & Fasman, 1978). Um die Validität der kombinierten Kalkulationen zu überprüfen, wendeten Ducarme et al. sie zunächst auf das Bakteriorhodopsin an, das in Bezug auf seine Proteinstruktur schon zu diesem Zeitpunkt sehr gut untersucht war und von dem auch Proteinkristalle gezüchtet wurden, die eine Röntgenstrukturanalyse ermöglichten. Die Analyse fiel positiv aus, so dass zumindest auf das Bakteriorhodopsin bezogen, mit dieser Art und Weise der computergestützten Berechnungen Sekundärstrukturen vorhersagbar sind.



**Abb. 22:** Vorgeschlagene Membrantopologien des GLUT1 in skizzierter Form. Die Positionen der nativen Cysteinreste sind durch schwarz gefüllte Kreise dargestellt. Blau eingefärbte Segmente markieren  $\alpha$ -Helices, während gelb eingefärbte Segmente  $\beta$ -Faltblätter darstellen. Die schraffierten Bereiche kennzeichnen die Aminosäureposi-

tionen, die in die Cystein-Scanning-Mutagenese und die funktionelle Testung mit den Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen einbezogen wurden. Rot gefüllte Kreise definieren jene Aminosäurepositionen, deren Cysteinmutanten mindestens zu 50 % in ihrer Transportaktivität durch pCMBS gehemmt wurden. Dies sind vom N-Terminus zum C-Terminus gelesene folgende Mutanten: W65C, S66C, A70C, S73C, M77C, Q282C, Q283C, I287C, N288C, V290C, F291C, Y293C und S294C.

In jedem Modell markieren N- und C-Terminus jeweils die intrazelluläre Seite der Plasmamembran.

Vor dem Hintergrund dieser konkurrierenden Modellvorstellungen über die Sekundärstruktur des GLUT1 bietet die Cystein-Scanning-Mutagenese eine gute Möglichkeit, die Übereinstimmung zwischen experimentellen Daten und den theoretischen Vorstellungen zu prüfen. In dieser Arbeit wurden zwei Regionen untersucht. Sie betreffen die Aminosäuren in den Positionen 61 bis 87 (Region 1) bzw. 272 bis 299 (Region 2) und sind in den Topologiemodellen der Abbildung 22 als schraffierte Flächen gekennzeichnet. Entscheidende Argumente bei der Beurteilung der verschiedenen Topologiemodelle lieferten die Transportaktivitätsuntersuchungen mit der nicht durch die Zellmembran permeierenden Substanz pCMBS. Deshalb sind diejenigen Positionen in den Modellen rot gekennzeichnet, auf denen die Mutationen jeweils zu Mutanten mit einer mindestens 50 %igen Transporthemmung unter dem Einfluss von pCMBS führten. Die Mutanten wiesen dabei aber mindestens eine 10 %ige Basalaktivität im Vergleich zum cysteinfreien GLUT1 auf. Einzige Ausnahme ist die Mutante mit dem eingeführten Cysteinrest in Position 288, die weniger als 10 % Basalaktivität zeigte, aber einen eindeutigen Trend unter Einfluss von pCMBS erkennen ließ (siehe 5.4.4.4).

### **5.5.1 Die Ergebnisse der ersten untersuchten Region (Aminosäurepositionen 61-87) vor dem Hintergrund der verschiedenen Sekundärstrukturmodelle**

Die Aminosäurepositionen der ersten untersuchten Region bilden im 16erTM-Modell vollständig die Transmembransegmente 2 und 3 und im 14erTM-Modell das Transmembransegment 2 einschließlich fast der gesamten Hälfte der intrazellulären Schleife 1. In beiden Sekundärstrukturmodellen werden in dieser Region, im Gegensatz zum 12erTM-Modell, keine Aminosäurepositionen mit extrazellulärer Lokalisation vorhergesagt. Die gegenüber pCMBS empfindlichsten Mutanten (Restaktivität nach Einfluss von pCMBS < 10 %) fanden sich auf den Positionen S66, A70 und S73. Auch wird die Mutante W65C, die gemeinsam mit der Mutante S66C im 12erTM-Modell Positionen am C-terminalen Ende der extrazellulären Schleife 1 markiert, durch pCMBS gehemmt. Das Ergebnis der Hemmung von benachbarten Mutanten (siehe 4.2.3.2.3 und Tab. 2) spricht gegen eine Sekundärstruktur des GLUT1, wie sie für die Porine bestimmt wurde, denn es ist davon auszugehen, dass in einem „ $\beta$ -barrel“ jeweils eine Seite der sechzehn  $\beta$ -Faltblätter in die Membran integriert ist. Demnach ist es aufgrund der Struktur von  $\beta$ -Faltblättern sehr unwahrscheinlich, dass zwei benachbarte Cysteinreste durch pCMBS gehemmt werden. Dies wäre nur vorstellbar, wenn sie in einer extrazellulären Schleife liegen und damit alle Positionen für pCMBS zugänglich sein würden, was nach der Vorstellung von Fischbarg et al. (Fischbarg et al., 1993) jedoch nicht zutrifft. Die ebenfalls für extern appliziertes pCMBS sensitive Cysteinmutante in Position 73 liegt nach dem 16erTM-Modell in der intrazellulären Schleife 1. In mehreren Versuchen (Wellner et al., 1994) konnte jedoch experimentell nachgewiesen werden, dass pCMBS nicht in der Lage ist, die Zellmembran zu passieren

und dementsprechend kann die Position 73 nicht im intrazellulären Raum lokalisiert sein. Gleiches gilt für die pCMBS sensitive Mutante mit dem eingeführten Cysteinrest auf Position 77, die nach dem 16erTM-Modell von Fischbarg et al. (1993) den N-terminalen Endpunkt des Transmembransegments 3 definiert und direkt an den intrazellulären Raum grenzt. Bezogen auf das 12erTM-Modell endet der Nachweis von pCMBS sensitiven Mutanten in der Mitte des Transmembransegments 2 (siehe 4.3.1), was auch für das Transmembransegment 7 (siehe 4.3.2) und das Transmembransegment 5 (Mueckler & Makepeace, 1999) des GLUT1 gezeigt werden konnte. Würden diese experimentellen Daten in einer helikalen Abbildung nach dem 12erTM-Modell dargestellt, ergibt sich wie für die in dieser Arbeit untersuchten Transmembransegmente ein Muster, bei dem die Aminosäurepositionen der Mutationen auf einer vertikalen Linie im Raum einer Helixstruktur angeordnet sind. Dies ist völlig unvereinbar mit einem Strukturmodell, das ausschließlich aus  $\beta$ -Faltblättern besteht.

Im 14erTM-Modell definiert die Aminosäure auf Position 61 das N-terminale Ende des Transmembransegments 2. Das Muster der Transportaktivität nach den Versuchen mit pCMBS zeigte bei den Cysteinmutanten auf den Aminosäurepositionen 61 bis 64 eine leichte bzw. keine Aktivitätsbeeinflussung (siehe 4.2.3.1.3), die durch eine zunehmende Transporthemmung in Richtung der nachfolgenden Aminosäurepositionen zum endofazialen Ende des Transmembransegments 2 hin abgelöst wird (Cysteinmutanten mit der Mutation in Position 65 bzw. 66). Eine eindeutige Entscheidung zugunsten des 12erTM-Modell oder des 14erTM-Modell ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen für die erste Region allerdings nicht möglich. Es erscheint jedoch nicht besonders wahrscheinlich, dass im N-terminalen Bereich des Proteins Transportermutanten innerhalb einer Helix gefunden werden, die eine Stimulierung durch pCMBS zeigen, welche gefolgt werden von solchen, die dann eine Transporthemmung aufweisen. Gestützt wird die Vorhersage einer  $\alpha$ -helikalen Struktur durch die experimentellen Daten der Cysteinmutante auf Position 69. Diese Mutante wird nur wenig durch pCMBS, aber sehr stark durch NEM beeinflusst. Dies spricht sehr für eine membranständige Position und in Kombination mit den Versuchsdaten der Mutanten auf den Positionen 65 bis 68 wird ein Membranübergang in diesem Bereich sehr wahrscheinlich. Das 12erTM-Modell sieht genau diesen Bereich für einen Membranübergang vor und definiert ihn zwischen den Positionen 66 und 67, während die anderen beiden Topologiemodelle einen ganz anderen Bereich vorhersagen (Positionen 60 und 61).

### **5.5.2 Die Ergebnisse der zweiten untersuchten Region (Aminosäurepositionen 272-299) vor dem Hintergrund der verschiedenen Sekundärstrukturmodelle**

Die untersuchten Aminosäurepositionen der zweiten Region, die nach dem 12erTM-Modell das Transmembransegment 7 und die Hälfte der extrazellulären Schleife 4 bilden, umfassen im wesentlichen ähnliche strukturelle Bereiche in den anderen beiden Strukturmodellen. So werden im 14erTM-Modell (wie im 12erTM-Modell) durch die untersuchten Aminosäurepositionen das Transmembransegment 7 und die extrazelluläre Schleife 4 markiert. Im 16erTM-Modell wird das Transmembransegment 9 und fast die komplette extrazelluläre Schleife 5 aus diesen Positionen gebildet. Ein charakteristischer Unterschied der beiden anderen Sekundärstrukturmodelle zum 12erTM-Modell ergibt sich aus der Sekundärstruktur des in der untersuchten Region enthaltenen Transmembransegments. In den beiden anderen Topologien wird es aus einem  $\beta$ -Faltblatt aufgebaut und benötigt nur halb so viel Aminosäurepositionen, um die



Membran zu durchqueren. Dies liegt in dem Bindungswinkel der Aminosäuren zueinander begründet, der die Aminosäuren bei einem  $\beta$ -Faltblatt wesentlich raumgreifender anordnet als bei einer  $\alpha$ -Helix. Da in den anderen beiden Strukturmodellen die Anfangspositionen des darauffolgenden Transmembransegments nahezu identisch mit dem 12erTM-Modell sind, ergibt sich daraus eine längere extrazelluläre Schleife zwischen den beiden Transmembransegmenten. Das N-terminale Ende dieser Schleife wird durch die Position 281 (16erTM-Modell) bzw. 282 (14erTM-Modell) definiert (siehe Abb. 22). Die für pCMBS sensitiven Mutanten lagen zwischen den Aminosäurepositionen 282 und 292 und zeigten eine Anordnung, welche auf eine helikale Struktur schließen lässt (siehe Abb. 21). Im 16erTM- und 14erTM-Modell liegen diese Mutationen ausschließlich in der beschriebenen extrazellulären Schleife. Eine helikale Struktur in extrazellulären Bereichen, quasi als extrazellulär liegendes Segment, ist möglich, jedoch würde sie nach den vorliegenden Daten in den anderen beiden Topologien an das Transmembransegment 7 bzw. 9 direkt anschließen und diese entsprechend verlängern. Damit wäre eine verbindende Struktur in Form einer externen Schleife nicht gegeben. Zudem haben weder Fischbarg et al. (Fischbarg et al., 1993) noch Ducarme et al. (Ducarme et al., 1996) diesen Bereich als extrazellulär gelegene helikale Struktur vorhergesagt.

Vom Standpunkt des 16erTM- und 14erTM-Modells aus betrachtet, müssten die Cysteinmutationen, die im 12erTM-Modell positionell die extrazelluläre Schleife 4 bilden, in gleichem Maße für pCMBS zugänglich sein, wie diejenigen, die tatsächlich eine Beeinflussung erkennen lassen. Jedoch zeigen die Cysteinmutanten, die auf die Position 294 folgen, keine Transporteinschränkung. Da sie aber nach den anderen beiden Strukturmodellen extrazellulär lokalisiert sind, stellt sich die Frage warum die Transportmodifikation durch Sulphydrylreagenzien ab Position 295 abbricht.

Wie erklärt sich, ausgehend vom Standpunkt des 16erTM- und 14erTM-Modells, die Änderung der Transportmodifikation durch Sulphydrylreagenzien mit Entfernung der Mutation von der angenommen Membrangrenze, wie dies auch beim Transmembransegment 2 gezeigt wurde? Auch dieser Umstand wird mit den vorliegenden Ergebnissen nur von der Modellvorstellung des 12erTM-Modells erfüllt. Hier besteht eine Ähnlichkeit zur ersten untersuchten Region und es liegt nahe zu spekulieren, dass reaktive SH-Gruppen in den extrazellulär gelegenen segmentverbindenden Schleifen eine Beschränkung der Flexibilität von Transmembransegmenten erzeugen. Diese Beschränkung erreicht eine höhere Effektivität, je näher sich die eingeführte SH-Gruppe an der Membrangrenze befindet. Ein wichtiges Argument liefern die Mutanten mit dem eingeführten Cysteinrest in den Positionen 292 und 293, die unterschiedlich durch pCMBS, nicht aber unterschiedlich durch NEM beeinflusst werden. Dies steht in Übereinstimmung mit einer im 12erTM-Modell vorhergesagten Transmembrangrenze und findet ihr Pendant in der ersten untersuchten Region im Bereich der Aminosäurepositionen 66 bis 69. Somit ist es nicht möglich alle unter Einfluss von pCMBS gewonnenen Transportdaten aus der zweiten untersuchten Region mit den beiden anderen Topologiemodellen in Einklang zu bringen. Darüber hinaus lässt das Muster der Transporthemmung durch pCMBS in Bezug auf das 16erTM- und 14erTM-Modell keinerlei Gesetzmäßigkeit erkennen, da alle sensitiven Mutationen bei diesen Strukturmodellen innerhalb einer extrazellulären Schleife liegen.

Alle Daten aus der Cystein-Scanning-Mutagenese in Kombination mit der funktionellen Untersuchung durch Einsatz von Schwefelwasserstoffgruppen sensitiven Substanzen ergaben substantielle Erkenntnisse, die perfekt mit dem 12erTM-Modell übereinstim-

men. Einige Ergebnisse waren mit der Struktur eines „ $\beta$ -barrels“ nicht in Einklang zu bringen. Auch das Modell der gemischten Sekundärstruktur von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstrukturen lässt Widersprüche zwischen den aktuellen experimentellen Ergebnissen dieser Arbeit und der aus den Algorithmen abgeleiteten Vorstellung zur Sekundärstruktur erkennen, so dass eine eindeutige Präferenz zum 12erTM-Modell besteht. An dieser Stelle ist ebenfalls auf die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Mueckler hinzuweisen, deren Untersuchungen die Transmembransegmente 5, 10 und 11 des GLUT1 im 12erTM-Modell als  $\alpha$ -helikale Struktur ausweisen (Mueckler & Makepeace, 1999; Hruz & Mueckler, 2000; Mueckler & Makepeace, 2002).