

## 6 Zusammenfassung / Summary

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Glucosetransporter GLUT1 nach Mutation seiner 6 nativen Cysteine in Serin bzw. Glycin funktionell aktiv war (Due et al., 1995a; Wellner et al., 1995a), ergab sich die Möglichkeit für eine Analyse der Sekundärstruktur des GLUT1, die Methode der Cystein-Scanning-Mutagenese mit der funktionellen Testung der Mutanten unter Einsatz von transportmodifizierenden Sulfhydrylreagenzien zu kombinieren. Dies war von aktueller Bedeutung vor dem Hintergrund alternierender Modelle über die Membrantopologie und divergierender Vorstellungen über eine Anordnung der membranären Helices bei der Bildung der putativen Durchtrittspore für Glucose (siehe Kapitel 1.4.6).

Als Expressionssystem für die heterologe Expression des menschlichen GLUT1 dienten Oozyten der Froschart *Xenopus laevis*. Für die Transportanalyse in einzelnen Oozyten wurden die radioaktiv markierten Glucoseanaloga 2-Desoxy-D-Glucose und 3-O-methyl-D-Glucose eingesetzt. Als Prototyp des nicht durch die Membran permeierenden Transportinhibitors kam p-Chloromercuribenzolsulphonat (pCMBS) zum Einsatz, N-Ethylmaleimid (NEM) diente mit seiner membranlöslichen Eigenschaft in der Analyse als Gegenpart. Die Bestimmung der Transportaktivität der Mutanten unter dem Einfluss von pCMBS und NEM ergab sehr differenzierte Untersuchungsergebnisse. Es ist festzuhalten, dass der cysteinfreie Transporter durch pCMBS nicht wesentlich beeinflusst wird ( $110 \pm 40$  % im Vergleich zur Kontrolle nach 33 unabhängigen Versuchen), während NEM dessen Transportaktivität negativ beeinflusste ( $65 \pm 28$  % im Vergleich zur Kontrolle nach 27 unabhängigen Versuchen). Zwei Regionen des GLUT1 wurden durch Cystein-Scanning-Mutagenese mit anschließender funktioneller Testung analysiert. Entsprechend der von Mueckler et al. vorgeschlagenen Sekundärstruktur des GLUT1 (siehe Abb. 1, Kapitel 1.4), umfasste die erste untersuchte Domäne das gesamte Transmembransegment 2 und Teile der ersten extrazellulären Schleife, der zweite Bereich das gesamte Transmembransegment 7 und Teile der vierten extrazellulären Schleife. Weiterführende Untersuchungen durch Injektion von pCMBS in *Xenopus* Oozyten und Protektionsversuche ausgewählter Cysteinmutanten erbrachten keine konkreten Hinweise, dass eine der für pCMBS oder NEM sensitiven Mutanten an einer intrazellulär bzw. extrazellulär lokalisierten Substratbindungsstelle des GLUT1 beteiligt ist. Die wichtigsten Ergebnisse und Schlussfolgerungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Der Austausch der nativen Aminosäuren durch Cystein führte in der überwiegenden Anzahl zu Cysteinmutanten, die funktionell aktiv waren. Sieben der 55 mutierten GLUT1 Transporter (F72C, G75C, G76C, G79C, S80C, G286C und N288C) wiesen Transportaktivitäten auf, die in Relation zum cysteinfreien GLUT1 weniger als 10 % der katalytischen Aktivität betragen.
2. Die Ergebnisse, die durch den Einfluss der Sulfhydrylreagenzien NEM und pCMBS auf die Transportaktivität der Cysteinmutanten gewonnen wurden, bestätigten die auf Basis von Hydropathieplots postulierte Membranübergänge des 12erTM-Modells des GLUT1 in Position 66/67 (Übergang zwischen extrazellulärer Schleife 1 und Transmembransegment 2) sowie in Position 292/293 (Übergang zwischen Transmembransegment 7 und extrazellulärer Schleife 4).
3. Darüber hinaus machte die Analyse der funktionellen Daten  $\alpha$ -helikale Strukturen für beide Transmembransegmente wahrscheinlich. Einige der gewonnenen Daten waren mit neueren Modellen zur Membrantopologie des GLUT1 (siehe Abb. 22, Kapitel 5.5) nicht vereinbar. Somit bestätigen die Daten keines der neueren Sekundärstrukturmodelle des GLUT1 sondern eine Sekundärstruktur bestehend aus zwölf

Transmembransegmenten.

4. Erstmals konnte gezeigt werden, dass der GLUT1 Spalten in Membranregionen bildet, die für externe in Wasser gelöste hydrophile Substanzen zugänglich sind. Für das Transmembransegment 7 wurde dies auch später durch eine andere Arbeitsgruppe untersucht und bestätigt (Hruz & Mueckler, 1999). Der vorgestellte methodische Ansatz war jedoch nicht geeignet, einen strukturierten Membranspalt von der zytoplasmatischen Seite her zu identifizieren.
5. Durch auffällige Veränderungen der Basalaktivität verschiedener Cysteinmutanten im Transmembransegment 2 wurde ein Glycingerüst identifiziert, das Raum schaffen kann für mögliche lokale Interaktionen zwischen Polypeptidstrukturen und Lipiden in der Plasmamembran.
6. Ein neuer Aspekt in der Diskussion um eine mögliche Oligomerisierung des GLUT1 ergab sich aus der Analyse des Transmembransegments 7, das Strukturen aufweist, die einem Glutaminfinger entsprechen und, wie für andere Proteine gezeigt, theoretisch eine Oligomerisierung unterstützen.
7. Während alle bisher publizierten Konformationsmodelle eine Beteiligung des Transmembransegments 7 an der Porenbildung des GLUT1 vorsehen, wird durch diese Arbeit erstmalig nun auch auf experimenteller Basis eine Beteiligung des Transmembransegments 2 wahrscheinlich. Die vorliegenden Ergebnisse haben infolgedessen in neuester Zeit zu einer Modifizierung der Vorstellung über das Helixarrangement des Glucosetransporters GLUT1 geführt (Hruz & Mueckler, 2001; Zuniga et al., 2001) und sie unterstützen das von Widdas (Widdas, 1998) entwickelte dreidimensionale Strukturmodell (siehe Abb. 2, Kapitel 1.4.6).

## Summary

Independent scientific groups confirmed that the glucose transporter GLUT1 devoid of its six native cysteine residues after substitution of serine or glycine behaves as a functional transport protein (Due et al., 1995a; Wellner et al., 1995a). The cysteine-less (cys-less) construct made possible to analyse secondary structure of GLUT1 by means of cysteine-scanning mutagenesis in conjunction with sulfhydryl-specific reagents. This approach was particularly relevant with respect to the presently existing membrane topology models and the divergent proposals regarding the arrangement of helices forming the pore for glucose.

*Xenopus laevis* oocytes were used to heterologously express the multiple single cysteine mutants. Tritium-labelled glucose analogist, i.e. 2-deoxy-D-glucose or 3-O-methyl-D-glucose, were applied to assess transport activity. The transport-modifying sulfhydryl reagents were para-chloromercuribenzenesulfonate (pCMBS) and N-ethylmaleimide (NEM). The sulfhydryl reagents differ in that pCMBS is almost membrane impermeable whereas NEM easily penetrates the membrane lipid bilayer. It was demonstrated that pCMBS did not influence the catalytic activity of cys-less GLUT1. The average transport activity obtained from 33 separate experiments amounted to  $110 \pm 40$  % of that of untreated cys-less GLUT1. In contrast, NEM inhibited the cys-less GLUT1 activity to  $65 \pm 28$  % assessed in 27 independent experiments.

Two regions of the secondary structure of GLUT1 were investigated using cysteine-scanning mutagenesis in conjunction with pCMBS or NEM. According to the secondary structure of GLUT1 proposed by Mueckler et al. (see fig. 1, chapter 1.4) these domains cover the C-terminal end of the first extracellular loop and the full length transmembrane segment 2. This part of investigation was designated the first region. The second region of cysteine scanning contained the entire transmembrane segment 7 and seven adjacent amino acid residues at the N-terminal end of the fourth extracellular loop.

Injection of pCMBS into the cytoplasm of *Xenopus* oocytes or protection experiments were performed with negative results thus excluding the possibility that the investigated cysteine positions are at or near the exofacial or endofacial glucose binding side of GLUT1.

The major results and conclusions are as follows:

1. Cysteine-scanning mutagenesis led to GLUT1 mutants that in most cases were functionally active glucose transporters. In contrast, seven of the 55 cysteine mutants (F72C, G75C, G76C, G79C, S80C, G286C und N288C) exhibited transport activities of less than 10% compared with cys-less GLUT1.
2. The prediction with respect the putative boundaries between transmembrane segment and extracellular space at position 66/67 (transition between extracellular loop one and transmembrane segment 2) or 292/293 (transition between transmembrane segment 7 and extracellular loop four) was in line with the functional data obtained by use of pCMBS and NEM, respectively.
3. Moreover, the functional data supported an  $\alpha$ -helical structure with 12 transmembrane segments for both investigated domains. They disagreed in part with the recent alternative topology models (see fig. 22, chapter 5.5).
4. The presented data demonstrated for the first time that transmembrane 2 and 7 were able to form crevices that are accessible to external hydrophilic substances but failed to show such clefts from the cytoplasmic site of the plasma membrane. This finding was confirmed by another group (Hruz & Mueckler, 1999).

5. Functional tests identified a cluster of three functionally essential glycine residues within transmembrane segment 2. They were localized opposite to the pCMBS-accessible cysteine residues in the helix. This group of glycine residues may form a grove to give space to a lipid side chain and/or may facilitate interaction between helix 2 and other transmembrane helices or lipid side chains.
6. Analysis of transmembrane 7 revealed a structure named glutamine finger. This structure is known from other proteins to favour oligomerization thus adding a novel argument with regard to the importance and mechanisms of putative GLUT1 oligomerization.
7. All conformational models so far published consider transmembrane 7 of GLUT1 a part of the putative pore for glucose. The presented experimental results indicated that also transmembrane 2 could be involved in the pore formation. These data led to a modification of the helix arrangement for the 12 transmembrane helices of GLUT1 in the literature (Hruz & Mueckler, 2001; Zuniga et al., 2001) and, in addition, confirmed the theoretical concept of the three-dimensional structure of GLUT1 put forward by Widdas (Widdas, 1998; see fig. 2, chapter 1.4.6).