

## Functional Assessments of *Spodoptera* Cell-expressed Human Erythrocyte-type Glucose Transport Protein with a Site-directed Mutagenesis

Chong-Kee Lee<sup>†</sup>

*Department of Immunology, School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu 705-718, Korea*

The baculovirus/insect cell expression system is of great value in the study of structure-function relationships in mammalian glucose-transport proteins by site-directed mutagenesis and for the large-scale production of these proteins for mechanistic and biochemical studies. In order to exploit this, the effects of substitution at the highly conserved residue glutamine 282 of the human erythrocyte-type glucose transporter have been examined by in vitro site-directed mutagenesis. The modified human transport protein has been expressed in *Spodoptera frugiperda* 21 cells by using the recombinant baculovirus AcNPV-GTL. To assess the functional integrity of the expressed transporter, measurements of the transport inhibitor cytochalasin B binding were performed, involving the membranes prepared from 4 days post infection with no virus, with wild-type virus or AcNPV-GTL virus. Data obtained showed that there was little or no D-glucose-inhibitable binding in cells infected with the wild type or no virus. Only the recombinant virus infected cells exhibited specific binding, which is inhibitable by D- but not by L-glucose. However, there was a notable reduction in the affinity for the potent inhibitor cytochalasin B when binding measurements of AcNPV-GTL were compared with those of AcNPV-GT, which has no substitution. It is thus suggested that although the modified and unmodified human transporters differed slightly in their affinity for cytochalasin B, the glutamine substitution did not interfere the heterologous expression of the human transporter in the insect cells.

**Key Words:** Baculovirus, Sf21 cells, Mutagenesis

모든 포유동물 세포의 주요 대사 에너지원은 포도당이다. 세포막을 통한 포도당의 세포 내 영입은 수동적 포도당 수송 단백질 (passive glucose transporters)들에 의해 이루어진다 (Wood and Trayhurn, 2003). 염기서열의 비교분석을 통한 연구에서는 박테리아를 포함한 미생물들의 당수송체와 포유동물 당 수송 단백질 사이에는 염기서열의 상동성이 있음이 입증되었고, 또한 이들은 커다란 당수송체 집단 (sugar transporter family)을 이루고 있음을 보여 주었다 [(Mueckler et al., 1985; Wheeler and Hinkle, 1985; Baldwin and Henderson, 1989; James et al., 1989; Baldwin SA, 1993; Seatter and Gould, 1999; Joost and Thorens, 2001; Wood and Trayhurn, 2003)]. 이러한 사실들은 당수송체들이 공동의 조상으로부터 진화되었음을 암시하고 있다.

일반적으로 포도당과 같은 hexose의 수송은 결합부위가 번갈아 가며 안쪽과 바깥쪽 용액에 노출되어 일어나는 'alternative conformation change' 기전에 따르는 것으로 알려져 있다 (Gorga and Linehard, 1981; Baldwin and Henderson, 1989). 따라서 site-directed mutagenesis는 이러한 안과 밖의 수송에 관여하는 부위와 수송 시 일어나는 'alternative conformation change' 기전과의 상관관계를 분석하는데 유용하게 사용될 수 있다. 아울러 보존된 당수송체 집단의 염기서열 비교분석은 asparagine과 glutamine residues가 진화 속에서도 매우 잘 보존되어 있음을 보여 주었다 (Baldwin and Henderson, 1989). 특히 이러한 형태의 아미노산은 당의 수소결합에 참여할 수 있으므로 당수송체 수송채널의 일부를 형성할 수도 있다 (Mueckler et al., 1985). Hasiramoto 등 (1992)은 사람 HepG2형 당수송체의 helix 7에 위치하는 glutamine 치환으로 ATB-BMPA와 같은 exofacial ligand binding 수준이 wild type의 5%에 해당하는 결과를 초래하였다고 보고한 바 있다. 그러므로 이 부위는 적혈구형 포도당 수송체의 구조와 기능의 상관관계를 연구하는 데에 있어 site-directed mutagenesis

\*논문 접수: 2008년 5월 6일

수정재접수: 2008년 6월 20일

<sup>†</sup>교신저자: 이종기, (우) 705-718 대구광역시 남구 대명4동 3056-6, 대구가톨릭대학교 의과대학 면역학교실

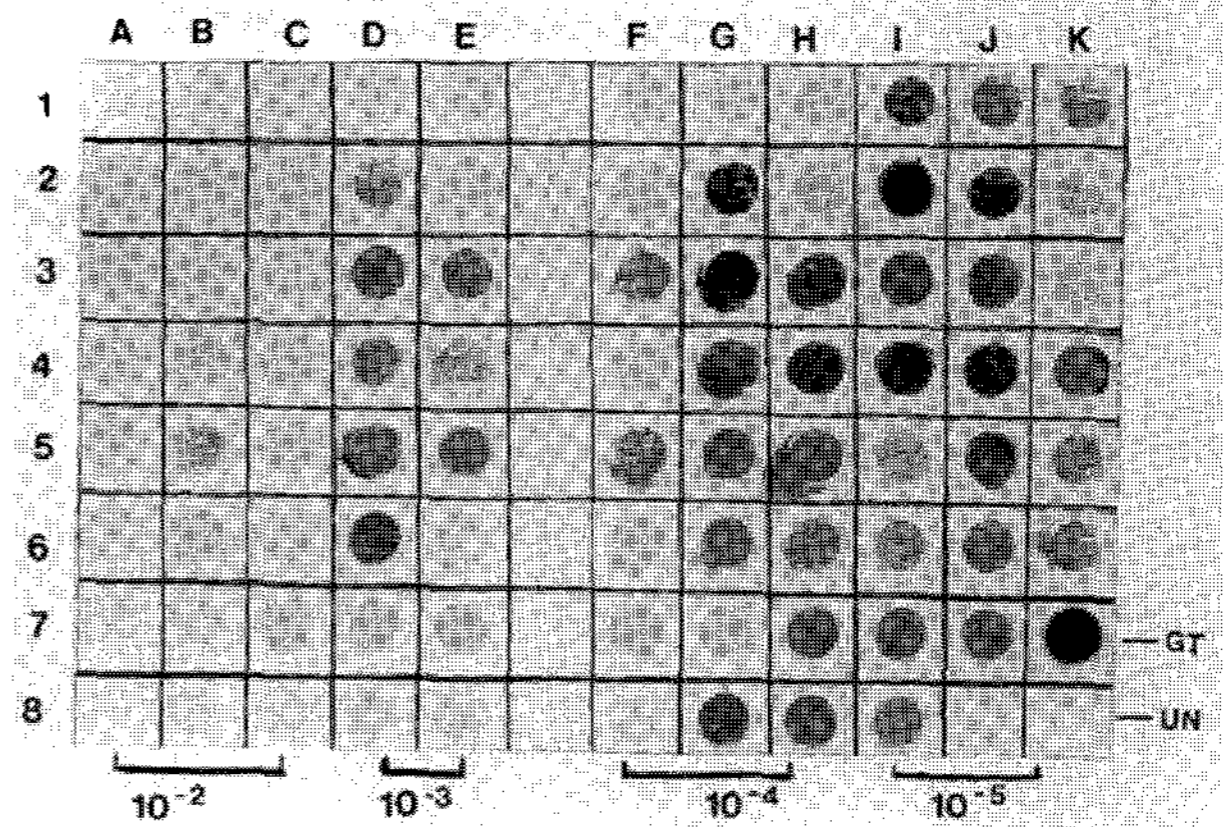
Tel: 053-650-4477, Fax: 053-650-4477

e-mail: leeck@cu.ac.kr

를 적용하기 좋은 위치 중 하나임을 또한 의미한다.

적혈구형 포도당 수송체는 사람의 뇌, 적혈구 등에서의 포도당 수송에 관여한다 (Bell et al., 1993; Vannucci et al., 1997). 이 수송체의 구조와 기능의 상관관계를 위한 유전공학적 연구, 삼차원적 구조 분석을 위한 결정화 (crystallization)와 같은 생물리학적 연구를 위해서는 비교적 많은 양의 단백질이 필요하나 이들은 세포막내에 적은 양으로 존재하고 있으며 nucleoside 수송체와 같은 물질들로 오염 (Jarvis and Young, 1981)되기 쉬워 순수한 당수송체만을 분리, 정제하기가 쉽지 않다. 이러한 연유로 당수송체들을 유전공학적 방법을 이용하여 많은 양 생산하고자 하는 노력들이 꾸준히 진행되어 왔으며, 그 예로서 *E. coli* (Sarkar et al., 1988; Thorens et al., 1988), *Xenopus* oocytes (Gould and Lienhard, 1989; Keller et al., 1989), mammalian cells (Asano et al., 1989; Gould et al., 1989; Harrison et al., 1990), transgenic mice (Liu et al., 1992) 등을 이용한 이성질적 발현 노력들이 있었다. 그러나 막 단백질 (membrane proteins)들이 갖는 특성으로 인해 단지, 소량의 기능성 있는 단백질 발현만을 보여주었을 뿐이다. 최근 이러한 어려움을 극복하기 위한 노력의 일환으로 baculovirus와 곤충세포 (Summers and Smith, 1987)를 이용한 GLUT1 단백질 발현 노력이 있었으며, 결과는 고무적이었다 (Yi et al., 1992; Cope et al., 1994). 따라서 변형된 당수송체를 곤충세포에서 다량 발현시키고 그 기능을 시험해 볼 수 있는 체계를 구축할 수 있다면 이는 당수송 단백질의 당수송 기전뿐 아니라, 특히 결정화가 어려운 당수송체와 같은 막 단백질의 삼차원적 구조 분석에 매우 유용한 도구가 될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 적혈구형 사람 당수송체의 glutamine residue (282)를 leucine으로 치환시킨 후, 염기치환이 사람 당수송체의 *Spodoptera frugiperda* 21-AE 세포에서의 이성질적 발현에 미치는 영향을 확인하였고, 발현시킨 변이된 사람 당수송체의 기능적 특성을 조사하였다. 282 glutamine을 leucine으로 치환하는 점 변이는 사람 적혈구형 당수송체의 cDNA에 oligonucleotide-directed 돌연변이법을 이용 도입하였다. 점 변이를 위한 template로는 적혈구형 당수송체의 전체 coding region을 포함하는 pSGT Bam HI-Hind III 분절 (Yi et al., 1992), 1922 base를 M13mp 18에 cloning하여 사용하였다. 돌연변이는 5'-CAGCTGT-CCCTGCAGCTGTCT-3' primer를 사용하여 알려진 방법으로 진행하였고, 적절한 clone은 sequencing 또는 절단효소 법으로 선정하였다. 그 후 변이된 적혈구형 당수송



**Fig. 1.** Detection of recombinant viruses by limiting dilution and immunostaining. Sf21 cells were infected with 50  $\mu$ l of 10-fold dilutions of (AcNPV-GTL) virus prepared from the eight individual plaques, ranging from  $10^{-2}$  to  $10^{-5}$ . Viruses expressing the human erythrocyte-type glucose transport protein were detected by western blotting using antibodies against the C-terminus of GLUT1 and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG. GT: infected with AcNPV-GT UN: uninfected Sf21 cells.

단백질을 발현하는 recombinant baculovirus를 최종적으로 생산하기 위해, 변이된 적혈구형 당수송체의 coding region을 포함하는 BamHI 분절을 pAcYM1 expression vector에 cloning하여 pAcYM1-GTL을 얻은 후, wild-type AcNPV DNA와 함께 Sf21 세포를 co-transfection 시켜 사람 적혈구형 당수송체 cDNA를 포함하는 recombinant baculovirus (AcMPV-GTL)를 plaque assay를 통해 선발하였다 (Summers and Smith, 1987). Fig. 1은 affinity-purified erythrocyte transporter C-terminus 항체와 alkaline phosphatase conjugate된 goat anti-rabbit IgG (Bio-rad) 2차 항체를 이용하여, 선발된 바이러스가 Sf21 세포에서 사람 당수송 단백질을 발현시킴을 확인한 limiting dilution assay 결과이다. 이 결과는 선택된 recombinant virus AcMPV-GTL이 적혈구형 당수송체 cDNA를 포함하고 있을 뿐만 아니라 사람 당수송체를 곤충세포에서 합성할 수 있음을 잘 보여 주고 있다. 또한 이 사실은 glutamine (282)의 leucine으로의 점 변이가 사람 당수송체의 곤충세포에서의 이성질적 발현에는 큰 영향을 미치지 않았음을 나타내고 있다.

Cytochalasin B는 사람 적혈구형 당수송체에  $K_d$  약 0.12  $\mu$ M로 결합하는 강력한 억제제이다 (Baldwin et al., 1982). Bound cytochalasin B에 대한 Free cytochalasin B의 비율 (B/F)은 생물학적 활성이 있는 당수송체 농도 측정에 좋은 척도가 될 수 있다 (Gorga and Lienhard, 1981; Baldwin et al., 1982). 따라서 Zoccoli 등 (1978)의 평형투석 방법 (equilibrium dialysis)을 이용하여 농도 40 nM의 [ $^3$ H]

**Table 1.** Assay of cytochalasin B binding to non-infected and baculovirus-infected cells with D-glucose

Sample (1 mg/ml)	Cytochalasin B Binding (B/F)		
	(-) D-glucose	(+) D-glucose	*Specific B/F
Sf 21 cells infected with			
- no virus	0.053	0.052	0.001
- wild-type virus	0.054	0.053	0.001
- recombinant virus (AcNPV-GT) <sup>△</sup>	1.163	0.140	1.028
- recombinant virus (AcNPV-GTL) <sup>□</sup>	0.954	0.125	0.829

The assay for cytochalasin B binding activity of membrane samples was performed by equilibrium dialysis using 40 nM-[<sup>3</sup>H] cytochalasin B, in the absence (-) or presence (+) of 400 mM D-glucose, as described in Zoccoli et al (1978). Cytochalasin B binding activity (\*) was calculated as described previously (Gorga and Lienhard, 1981). B/F = [bound cytochalasin B] / [free cytochalasin B]. <sup>△</sup>: preparation from the Sf21 cells infected with AcNPV-GT virus containing the entire human erythrocyte transporter gene without modification. <sup>□</sup>: preparation from the Sf21 cells infected with AcNPV-GTL virus containing the entire human transporter gene with the site-directed mutagenesis

cytochalasin B를 사용하여 3번씩 측정하였다. Assay에 이용한 Sf membrane 준비로 배양된 Sf21 세포를 배양 4~5 일 후 수거하여 세 번 10 mM-sodium phosphate/150 mM-NaCl, pH 7.2가 함유된 세척 액으로 씻었다. 그 후 protease inhibitors (2 mM-iodoacetamide, 0.2 mM-phenylmethanesulphonyl fluoride, pepstatin A (10 g/ml)들을 함유하는 부양액 (10 mM-Tris/5 mM-MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4)으로 0°C에서, 1분간 sonication하여 117,000 g<sub>av</sub>로 1시간 동안 원심 분리하여 soluble fraction으로부터 membrane fraction을 분리하여 사용하였다. 그 결과는 Table 1과 2에 요약된 바와 같이, Sf21 세포에 대한 cytochalasin B 결합 활성은 1 mg/ml 시료 당 0.001이었으나 적혈구형 당수송체를 발현하는 대조군에서는 0.829와 1.028로 나타났다. 즉, 바이러스로 감염시키지 않은 세포에서나 wild-type으로 감염시킨 세포에서는 D-glucose로 억제할 수 있는 결합은 없었으나, AcNPV-GT나 AcNPV-GTL로 감염시킨 세포들에서만 L-glucose가 아닌 D-glucose로 억제할 수 있는 특이한 binding을 보여주었다. 그러나 glutamine이 변이된 당수송체는 변이되지 않은 수송체에 비해 cytochalasin B 결합 활성이 다소 저하되었다. 이는 cytoplasmic 표면에 특이하게 노출된 육탄당 결합부위의 cytochalasin B에 대한 affinity가 glutamine 치환의 영향으로 다소 저하되었음을 의미하고 있다. 그럼에도 불구하고 사람 적혈구형 포도당 수송체의 강력한 억제제인 cytochalasin B에 대한 Sf21

**Table 2.** Assay of cytochalasin B binding to non-infected and baculovirus-infected cells with L-glucose

Sample (1 mg/ml)	Cytochalasin B Binding (B/F)		
	(-) L-glucose	(+) L-glucose	*Specific B/F
Sf 21 cells infected with			
- no virus	0.053	0.051	0.002
- wild-type virus	0.054	0.053	0.001
- recombinant virus (AcNPV-GT) <sup>△</sup>	1.163	1.143	0.020
- recombinant virus (AcNPV-GTL) <sup>□</sup>	0.954	0.944	0.010

The assay for cytochalasin B binding activity of membrane samples was performed as described in Table 1 in the absence (-) or presence (+) of 400 mM L-glucose. B/F = [bound cytochalasin B] / [free cytochalasin B]

당수송체의 매우 낮은 친화성은 mutant 사람 당수송체의 생물학적 활성을 확인하는 데에는 매우 유용한 도구로 사용될 수 있을 것이다. 따라서 baculovirus/insect cell을 이용한 발현체계는 site-directed mutagenesis를 이용한 당수송체의 구조와 기능의 상관관계 연구 뿐만 아니라 결정화 (crystalization)와 같은 생물리화학적 방법을 위한 포도당 수송체의 이성질적 발현체계로서의 가능성을 확인시켜주었다.

감사의 글

본 연구의 수행에 도움이 된 영국 NERC에 감사 드립니다.

## REFERENCES

- Asano T, Shibasaki Y, Ohno S, Taira H, Lin JL, Kasuga M, Kanazawa Y, Akanuma Y, Takaku F, Oka Y. Rabbit brain glucose transporter responds to insulin when expressed in insulin-sensitive Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1989. 264: 3416-3420.
- Baldwin SA. Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1993. 1154: 17-49.
- Baldwin SA, Baldwin JM, Lienhard GE. Monosaccharide transporter of the human erythrocyte: Characterization of an improved preparation. *Biochemistry* 1982. 21: 3836-3842.
- Baldwin SA, Henderson PJF. Homologies between sugar transporters from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Physiol.* 1989. 51: 459-471.
- Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem.*



1993. 268: 19161-19164.
- Cope DL, Holman GD, Baldwin SA, Wolstenholme AJ. Domain assembly of the GLUT1 glucose transporter. *Biochem J*. 1994. 300: 291-294.
- Gorga FR, Lienhard GE. Equilibria and kinetics of ligand binding to the human erythrocyte glucose transporter. Evidence for an alternating conformation model for transport. *Biochemistry* 1981. 20: 5108-5113.
- Gould GW, Derechin V, James DE, Tordjiman K, Ahern S, Gibbs EM, Lienhard GE, Mueckler M. Insulin-stimulated translocation of the HepG2/erythrocyte-type glucose transporter expressed in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 1989. 264: 2180-2184.
- Gould GW, Lienhard GE. Expression of a functional glucose transporter in *Xenopus* oocytes. *Biochemistry* 1989. 28: 9447-9452.
- Harrison SA, Buxton JM, Clancy BM, Czech MP. Insulin regulation of hexose transport in mouse 3T3-L1 cells expressing the human HepG2 glucose transporter. *J Biol Chem*. 1990. 265: 20106-20116.
- Hashiramoto M, Kadowaki T, Clark AV, Muraoka A, Momomura K, Sakura H, Tobe K, Akanuma Y, Yazaki Y, Holman GD, Kasuga M. Site-directed mutagenesis of GLUT1 in helix 7 residue 282 results in perturbation of exofacial ligand binding. *J Biol Chem*. 1992. 267: 17502-17507.
- James DE, Strobe M, Mueckler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 1989. 338: 83-87.
- Jarvis SM, Young JD. Extraction and partial purification of the nucleoside-transport system from human erythrocytes based on the assay of nitrobenzylthioinosine-binding activity. *Biochem J*. 1981. 194: 331-339.
- Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol Membr Biol*. 2001. 18: 247-56.
- Keller K, Strube M, Mueckler M. Functional expression of the human HepG2 and rat adipocyte glucose transporters in *xenopus* oocytes. *J Biol Chem*. 1989. 32: 18884-18889.
- Liu ML, Olson AL, Moye-Rowley WS, Buse JB, Bell GI, Pessin JE. Expression and regulation of the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter gene in transgenic mice. *J Biol Chem*. 1992. 267: 11673-11676.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 1985. 229: 941-945.
- Sarker HK, Thorens B, Lodish HF, Kaback HR. Expression of the human erythrocyte glucose transporter in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988. 85: 5463-5467.
- Seatter MJ, Gould GW. The mammalian facilitative glucose transporter (GLUT) family. *Pharm Biotechnol*. 1999. 12: 201-228.
- Summers MD, Smith GE. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Tex Agric Exp Stn Bull*. 1987. No. 1555.
- Thorens B, Sarker HK, Kaback HR, Lodish HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and  $\beta$ -pancreatic islet cells. *Cell* 1988. 55: 281-290.
- Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 1997. 2: 2-21.
- Wheeler TJ, Hinkle PC. The glucose transporter of mammalian cells. *Annu Rev Physiol*. 1985. 47: 503-517.
- Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): Expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*. 2003. 89: 3-9.
- Yi CK, Charalambous BM, Emery VC, Baldwin SA. Characterization of functional human erythrocyte-type glucose transporter expressed in insect cells using a recombinant baculovirus. *Biochem J*. 1992. 283: 643-646.
- Zoccoli MA, Baldwin SA, Lienhard GE. The monosaccharide transport system of the human erythrocyte. Solubilization and characterization on the basis of cytochalasin B binding. *J Biol Chem*. 1978. 253: 6923-6930.