

Université de Montréal

**Étude des changements de conformation du
cotransporteur de Na⁺/glucose (SGLT1) à l'aide de
mesures électrophysiologiques et de marqueurs
fluorescents**

par

Dominique Gagnon

Département de physique
Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en physique
option biophysique et physiologie moléculaire

Octobre 2006

© Dominique Gagnon, 2006

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude des changements de conformation du
cotransporteur de Na⁺/glucose (SGLT1) à l'aide de
mesures électrophysiologiques et de marqueurs
fluorescents**

présentée par :
Dominique Gagnon

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Lucie Parent, président-rapporteur
Jean-Yves Lapointe, directeur de recherche
Rikard Blunck, membre du jury
Jean-Daniel Horisberger, examinateur externe
Jacques Bélair, représentant du doyen de la FES

Résumé

Dans cette thèse, nous avons étudié la structure et le mécanisme de fonctionnement du cotransporteur de Na⁺ et de glucose (SGLT1). Cette protéine membranaire effectue un transport secondairement actif de glucose grâce aux ions Na⁺. En guise d'introduction, nous avons passé en revue les récentes découvertes structurales et mécanistiques dans le domaine des protéines membranaires. Nous avons aussi résumé l'état des connaissances sur SGLT1 avant de présenter et de discuter nos plus récents travaux, sous forme de quatre articles.

Nous avons d'abord étudié la topologie de la boucle 13-14 du transporteur en appliquant la «*substituted cysteine accessibility method*» (SCAM). Nous avons observé que des réactifs MTS (chargés +/-) pouvaient s'attacher à des cystéines nouvellement insérées puisqu'ils produisaient un effet sur la fonction du mutant et qu'un fluorophore (TMR5M) pouvait se lier à certaines positions dans la boucle. Nous avons posé l'hypothèse que cette boucle, que nous prétendons ré-entrante, soit le senseur de voltage à l'origine des courants transitoires dans SGLT1. Dans un second temps, nous avons étudié le rôle des 15 cystéines endogènes de SGLT1. Nous avons constaté que plusieurs d'entre elles jouent un rôle essentiel soit pour l'acheminement correct à la membrane plasmique ou pour la stabilisation du senseur de voltage. Nous avons identifié un pont disulfure entre les cystéines C255 et C511, ce qui constitue la première contrainte dans la structure 3D de SGLT1. Ensuite, nous avons analysé les courants transitoires en présence de glucose pour les mutants C255A et C511A, dans lesquels le pont disulfure est absent, ainsi que pour SGLT1 sauvage. De façon intéressante, ces deux mutants présentent toujours ces courants en présence d'une concentration saturante de glucose, contrairement à ce qui est observé pour la protéine sauvage et la grande majorité des cotransporteurs en présence de leur substrat respectif. Nous avons proposé un modèle cinétique complet qui explique ce phénomène de façon quantitative. Finalement, nous avons étudié les changements de conformation à l'aide de quatre sondes fluorescentes attachées sur deux cystéines, les C255 et C511, avec la technique de spectrofluorométrie en condition de voltage imposé. Des changements de fluorescence ont été observés dans différentes conditions de transport. Nos résultats valident de façon élégante notre modèle cinétique présenté dans l'étude précédente et montrent que la liaison du glucose modifie l'environnement du pont disulfure.

Nous concluons que le pont disulfure C255-C511 stabilise le senseur de voltage, qui pourrait être constitué de la boucle 13-14, et facilite le changement de conformation du transporteur lié aux substrats. Il est localisé dans un endroit particulier du transporteur puisque des sondes fluorescentes sont capables de sentir les changements de conformation qui dépendent du voltage membranaire, du Na⁺ et du substrat à cette position.

Mots-clés : biophysique, protéine membranaire, famille SLC5, ovocyte de *Xenopus Laevis*, électrophysiologie, mutagenèse, SCAM, modèle cinétique, courants transitoires, pont disulfure

Abstract

In this thesis, we have studied the structure and mechanisms of action of the Na⁺/glucose cotransporter SGLT1. This membrane protein drives secondary active transport of glucose by using the electrochemical Na⁺ gradient. In the introduction, recent structural and mechanistic findings in the field of membrane proteins are presented, along with a review of the scientific literature concerning SGLT1 before presenting and discussing our results, presented as four separate publications.

First, the membrane topology of loop 13-14 of SGLT1 was studied using a combination of substituted cysteine accessibility method (SCAM) and fluorescent labeling. We observed that charged, thiol-reactive reagents produced effects on the activity of some site-directed, cysteine-inserted mutant forms of SGLT1 and that a fluorescent probe could be attached to some specific positions in this loop. We proposed a novel topology for this loop and hypothesized that it could indeed be the voltage sensor for this protein. Second, we have studied the roles of the 15 endogenous cysteine residues in SGLT1. We found that 12 of them play essential roles in trafficking or in the voltage-dependent reorientation of the free transporters. We identified a disulfide bridge between C255 and C511, which is the first known physical constraint in SGLT1's 3D structure. We then studied, experimentally and theoretically, presteady state currents measured, in the presence of glucose, with mutants C255A and C511A, which lack the disulfide bridge, and in wt SGLT1. Interestingly, these two mutants exhibit presteady state currents in the presence of a saturating glucose concentration, in contrast to what is observed in normal SGLT1 as well as in the majority of other cotransporters in the presence of their substrate. We proposed a simple, five-state kinetic model which quantitatively explains these results. Finally, we used voltage-clamp fluorometry to study conformational changes, with four different fluorescent probes attached to positions C255 and C511. Our observations of changes in fluorescence under different conditions indicate that glucose binding modifies the environment of C255 and C511 and provide support for our kinetic model.

We conclude that the C255-C511 disulfide bridge stabilizes the voltage sensor, which could include the loop 13-14, and facilitates the conformational change of the fully loaded cotransporter. This disulfide bridge is located in such a way that fluorescent dyes attached to one or the other cysteine experience conformational changes in response to membrane potential, Na^+ and substrate.

Keywords: biophysics, membrane protein, SLC5 family, *Xenopus Laevis* oocyte, electrophysiology, mutagenesis, SCAM, kinetic model, presteady state (transient) current, disulfide bridge

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xviii
Remerciements.....	xxii
1 Introduction.....	1
1.1 Les structure tridimensionnelles de canaux et de transporteurs.....	3
1.1.1 Les hélices α transmembranaires.....	3
1.1.2 Le site de liaison au substrat.....	6
1.1.3 Le site de liaison aux ions.....	9
1.2 Mécanisme de fonctionnement.....	11
1.2.1 Les canaux K^+ dépendant du voltage (K_v).....	12
1.2.2 Ca^{2+} ATPase, SERCA.....	16
1.3 Canal ou transporteur?.....	20
1.4 Le cotransporteur Na^+ /glucose (SGLT1).....	24
1.4.1 Bref survol historique.....	24
1.4.2 La topologie de SGLT1.....	29
1.4.3 Aspects moléculaires et physiologiques.....	29
1.4.4 Les cystéines endogènes.....	35
1.4.5 Les courants transitoires.....	37
1.4.6 Le modèle cinétique.....	42
1.4.7 Étude des changements de conformation à l'aide de sondes fluorescentes.....	44
1.4.8 À quoi pourrait ressembler la structure de SGLT1?.....	49
1.5 Justification du travail et objectifs de l'étude.....	51

2	Méthodologies.....	54
2.1	La mutagenèse dirigée	54
2.2	Ovocytes de grenouille <i>Xenopus Laevis</i>	55
2.3	SCAM et SCAM inverse.....	56
2.4	Électrophysiologie en voltage imposé à deux micro-électrodes.....	58
2.5	Préparation de fraction enrichie en membrane plasmique et immunobuvardage de type Western	59
2.6	Fluorescence.....	60
2.6.1	Fluorométrie en condition de voltage imposé.....	62
2.7	Modèle cinétique.....	64
2.7.1	Modèle de fluorescence.....	65
2.8	Analyse statistique des résultats.....	66
	Résultats	67
	Avant-propos.....	67
3	Membrane topology of loop 13-14 of the Na ⁺ /glucose cotransporter (SGLT1): a SCAM and fluorescent labelling study	70
	Résumé.....	70
	Abstract	71
	Introduction.....	72
	Materials and methods	76
	Results.....	79
	Discussion	90
	Acknowledgments.....	97
	References.....	99
4	Identification of a disulfide bridge linking the 4 th and the 7 th extracellular loops of the Na ⁺ /glucose cotransporter	105
	Résumé.....	105

Summary	107
Introduction.....	108
Material and method	110
Results.....	114
Discussion	130
Conclusion	137
Appendix.....	138
Acknowledgements.....	141
References.....	143
5 Effect of substrate on the presteady state kinetics of the Na ⁺ /glucose cotransporter.....	149
Résumé.....	149
Abstract.....	150
Introduction.....	151
Material and method	153
Results.....	155
Discussion	171
Conclusions.....	177
Acknowledgements.....	177
References.....	179
6 Voltage-clamp fluorometry in the local environment of the C255-C511 disulfide bridge of the Na ⁺ /glucose cotransporter.....	183
Résumé.....	183
Abstract.....	184
Introduction.....	185
Materials and methods	187
Results.....	191
Discussion	201
Conclusions.....	207
Acknowledgments.....	207

References.....	209
7 Discussion.....	212
7.1 Topologie et rôle de la boucle 13-14.....	213
7.1.1 SCAM.....	213
7.1.2 Accessibilité des résidus de la boucle 13-14.....	214
7.1.3 Topologie de l'extrémité C-terminale de SGLT1.....	216
7.1.4 Rôle de la boucle 13-14 dans la fonction de SGLT1.....	217
7.2 Le rôle des cystéines endogènes et l'identification du pont disulfure.....	220
7.2.1 Effet des agents oxydants et réducteurs sur wt SGLT1.....	221
7.2.2 SCAM inverse de SGLT1.....	222
7.2.3 Cystéines non-essentiels.....	225
7.2.4 Cystéines importantes pour l'acheminement correct à la membrane plasmique.....	225
7.2.5 Cystéines importantes pour la position du «senseur de voltage».....	227
7.3 Les courants transitoires en présence de substrat chez les mutants C255A et C511A et chez wt SGLT1.....	229
7.3.1 Le modèle cinétique de SGLT1.....	231
7.4 La fluorométrie en condition de voltage imposé.....	240
7.4.1 L'effet du Na ⁺ sur les ΔF.....	242
7.4.2 Modification de la sensibilité au V _m par l'αMG : cas du TMR5M-C511.....	243
7.4.3 Modèle de fluorescence.....	244
7.4.4 Améliorations de la technique de fluorométrie en condition de voltage imposé.....	247
Conclusions et perspectives.....	248
Bibliographie.....	252
Annexe I : Biologie moléculaire.....	I
Annexe II : Modèle cinétique.....	IX
Annexe III : Contribution personnelle, accord des coauteurs et permission des éditeurs.....	XV

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau I.I : Caractéristiques fonctionnelles de hSGLT1, hSGLT2 et pSGLT3. Tiré de (Wright, 2001).....	31
--	----

Chapitre 2

Tableau II.I : Transporteurs mutants de SGLT1 humain faits durant ce doctorat.	55
---	----

Chapitre 3

Table III.I: Fluorescent labelling of the mutants in loop 13-14 with a rhodamine based fluorophore (TMR5M).....	87
---	----

Chapitre 4

Table IV.I: Rate constant of the four-state kinetic model used for the calculations of time constants and transferred charges of wt SGLT1 and mutants.....	136
--	-----

Chapitre 5

Table V.I: Rate constants of a five-state kinetic model used for the presteady state current simulations of wt SGLT1 and mutants	165
--	-----

Chapitre 6

Table VI.II: Summary of the experimental maximal ΔF (from +75 to -175 mV) observed for the different dyes attached to C255 and C511.....	200
Table VI.II: Change in fluorescence values (Δf_i) attributed to each state (C_i) in the kinetic model.....	205

Chapitre 7

Tableau VII.I : Probabilités d'occupation, en pourcentage, des états C_1 à C_4 pour les modèles à un ion Na^+ et celui à 2 ions Na^+ , à -50 mV, pour le wt SGLT1 et pour les mutants.....	234
--	-----

Annexe I

Tableau AI.II : Oligonucléotides et enzymes de restriction des mutants de l'article 1
(Chapitre 3) VI

Tableau AI.III : Oligonucléotides et enzymes de restriction des mutants de l'article 2
(Chapitre 4) VII

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 : Schéma simplifié du mécanisme d'action d'un cotransporteur présentant ses sites de liaison soit du côté extracellulaire (la conformation de gauche) soit du côté intracellulaire (la conformation de droite).	2
Figure 1.2 : Structure de l'aquaporine 1 bovine à 2.2 Å de résolution.	4
Figure 1.3 : Structure du canal K ⁺ de rat (Kv1.2) à 2.9 Å de résolution.....	5
Figure 1.4 : Structure d'un monomère du transporteur de glutamate Glt _{ph}	5
Figure 1.5 : Structure de l'échangeur EcCIC à 3.0 Å de resolution.....	6
Figure 1.6 : Structure des sites de liaison des substrats de LacY, GltT et Leu _{TAA}	8
Figure 1.7 : Architecture des sites de liaison aux ions Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ et Cl ⁻ des transporteurs Leu _{TAA} , SERCA et CIC et du canal KcsA.	11
Figure 1.8 : Structure du canal K ⁺ de <i>Streptomyces lividans</i> (KcsA).	13
Figure 1.9 : Deux modèles illustrant le mécanisme de «gating» des canaux K _v lors d'une dépolarisation.	15
Figure 1.10 : Structures comparées de SERCA en présence de Ca ²⁺ (E ₁ -2Ca ²⁺) et sans Ca ²⁺ en présence de thapsigargine (E ₂ -TG).....	19
Figure 1.11 : Structures comparées de SERCA en présence de Ca ²⁺ (E ₁ -2Ca ²⁺) et en présence d'un analogue d'ATP (AMPPCP) (E ₁ -AMPPCP).	20
Figure 1.12 : Structure chimique du β-D-glucopyranosyl (Glc) et de la phlorizine (Pz). ...	26
Figure 1.13 : Topologie membranaire du cotransporteur Na ⁺ /glucose SGLT1.	27
Figure 1.14 : Courants transitoires sensibles à la Pz chez un ovocyte injecté à l'eau (A) et chez un ovocyte exprimant SGLT1 (B).	39
Figure 1.15 : Constantes de temps (rapide et lente) des courants transitoires de SGLT1 pour différentes concentrations de Na ⁺ extracellulaire.	39
Figure 1.16 : Courbe de charges transférées en fonction du voltage membranaire (Q-V) pour différentes concentrations extracellulaires de Na ⁺ chez hSGLT1 mesuré en <i>cut-open</i> ovocyte.	40
Figure 1.17 : Schéma de deux modèles cinétiques de SGLT1.....	43

Figure 1.18 : Effet du voltage membranaire sur la fluorescence du TRM6M attaché en position 457.....	46
Figure 1.19 : Effet du glucose sur la fluorescence du TMR6M attaché en position 457.....	47
Figure 1.20 : Effet du glucose sur la fluorescence du TMR6M en position 457 en fonction du voltage membranaire.....	47

Chapitre 2

Figure 2.1 : Résumé de la méthode de mutagenèse dirigée par PCR utilisée.....	54
Figure 2.2 : Structure de l'acide aminé cystéine.....	56
Figure 2.3 : Réaction de marquage de protéine avec les réactifs MTS (A) ou maléimide (B).	57
Figure 2.4 : Schéma électrique de l'électrophysiologie en deux micro-électrodes en condition de voltage imposé.	58
Figure 2.5 : Diagramme de Jablonski.	61
Figure 2.6 : Chemin optique de la lumière dans le montage de spectrofluorométrie en condition de voltage imposé.	63
Figure 2.7 : Schéma illustrant le principe de barrières d'énergies dépendantes du V_m et de transfert de charges.	64

Chapitre 3

Figure 3.1: Properties and topology of loop 13-14 of the Na^+ /glucose cotransporter.	74
Figure 3.2: Effect of MTSES and MTSET treatments on α MG-dependent currents (5 mM) and phlorizin-sensitive Na^+ leak currents of wild type hSGLT1.	80
Figure 3.3: Comparison of mutated SGLT1 activities to that of wtSGLT1.	81
Figure 3.4: Effects of MTSES and MTSET on maximal α MG cotransport and Na^+ leak currents of wild type and mutant SGLT1.....	83
Figure 3.5: Effect of MTSET treatment on maximal α MG (5 mM) cotransport and Na^+ leak currents for mutants E624C and A664C.	84
Figure 3.6: Excitation spectra of representative oocytes expressing wtSGLT1, K567C and E586C, labelled with TMR5M.....	86

Figure 3.7: Apparent affinity for α MG and apparent inhibition constant of Pz for some selected mutants, compared to wtSGLT1.	89
Figure 3.8: Summary of experimental results from the present study and from other labs for accessibility of the last 4 transmembrane segments.....	94

Chapitre 4

Figure 4.1: Effects of DTT exposure on steady-state parameters of wt Na ⁺ /glucose cotransporter (wt SGLT1).....	115
Figure 4.2: Effect of DTT exposure on presteady-state parameters of wt Na ⁺ /glucose cotransporter (wt SGLT1).....	116
Figure 4.3: A modified topological model of SGLT1.....	118
Figure 4.4: Western blot analysis of some selected mutants, compared to wild type SGLT1, detected with an anti-myc antibody.	119
Figure 4.5: Electrophysiological characteristics of mutants classified in Group A, as compared to wt SGLT1.....	120
Figure 4.6: Electrophysiological characteristics of mutants classified in Group B, as compared to wt SGLT1.....	122
Figure 4.7: Electrophysiological characteristics of mutants classified in Group C, as compared to wt SGLT1, with and without DTT.....	123
Figure 4.8: Apparent affinity for α MG ($K_m^{\alpha MG}$) for oocytes expressing mutants C255A, C511A and C _{255,511} A compared with wt SGLT1, with and without DTT.	124
Figure 4.9: Electrophysiological characteristics of the double mutants as compared to wt SGLT1.....	127
Figure 4.10: Fluorescent labeling of oocytes expressing mutants C255A, C511A and C _{255,511} A as compared to wt SGLT1.	129
Figure 4.11: Kinetic model of the Na ⁺ /glucose cotransporter states for the estimation of presteady-state currents.....	135

Chapitre 5

Figure 5.1: Presteady state currents of mutant C255A in the presence of different α MG concentrations.	156
--	-----

Figure 5.2: Presteady state currents of mutant C511A in the presence of different α MG concentrations.	157
Figure 5.3: Presteady state currents of wt SGLT1 in the presence of different α MG concentrations.	160
Figure 5.4: Effect of α MG on $V_{1/2}$ and estimation of $K_{mQ}^{\alpha MG}$ with the transferred charge.	162
Figure 5.5: Kinetic model of the Na^+ /glucose cotransporter for the estimation of presteady state currents.	163
Figure 5.6: Predictions of the kinetic model.	169
Figure 5.7: Occupancy probability (C_i) as a function of time as calculated by the five-state kinetic model for wt SGLT1.	173
Figure 5.8: Occupancy probability (C_i) as a function of time as calculated by the five-state kinetic model for the mutants.	175

Chapitre 6

Figure 6.1: SGLT1 membrane topology and probe structures.	189
Figure 6.2: Substrate and voltage effects on the fluorescence of TMR5M attached to C255.	193
Figure 6.3: Substrate and voltage effects on the fluorescence of Alexa488 attached to C511.	195
Figure 6.4: Substrate and voltage effects on the fluorescence of TMR6M attached to C511.	196
Figure 6.5: Effect of α MG on fluorescence of TMR5M attached to C511.	198
Figure 6.6: Estimates of the apparent affinity values.	199
Figure 6.7: Kinetic model of the cotransport mechanism used to simulate conformation-dependent fluorescence variations.	204

Chapitre 7

Figure 7.1 : Propriétés de la boucle 13-14 de hSGLT1.	220
Figure 7.2 : Analyse d'immunobuvardage de type Western de préparations de membranes totales et de membranes plasmiques isolées. Tiré de (Leduc-Nadeau <i>et al.</i> , 2006). ...	226

Figure 7.3 : Schéma des deux modèles cinétiques présentés dans les Chapitres 4 (en A), 5 et 6 (en B).....	232
Figure 7.4 : Effet du voltage et de l' α MG sur la fluorescence du TMR6M attaché en position 457 de SGLT1, tel que mesuré avec la lampe à arc au xénon et avec un PMT.	241

Annexe II

Figure AII.1 : Schéma des deux modèles cinétiques présentés dans les Chapitres 4 (en A), 5 et 6 (en B).....	IX
--	----

Liste des abréviations

Symboles latins

AA	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
Alexa488	alexa Fluor® 488 C ₅ maléimide
AMPPCP	5'-adénylyl méthylènediphosphate, un analogue de l'ATP
AQP	aquaporine
ARN (ARNm)	acide ribonucléique (messenger)
ATP	adénosine triphosphate
ATPase	enzyme qui fabrique et/ou hydrolyse l'ATP
BBMV	vésicules de membrane en bordure en brosse
Ca ²⁺	ion calcium
Cl ⁻	ion chlore
CIC	canal Cl ⁻
CIC-ec1	échangeur Cl ⁻ /H ⁺ de <i>Escherichia coli</i> 1
DTT	dithiothréitol
ECaC-TRPV5	canal sélectif pour les ions Ca ²⁺
EGTA	éthylène glycol-bis(beta-aminoéthyl éther)-N,N,N',N'- acide tétra-acétique (chélateur de Ca ²⁺)
FM	fluorescéine-5-maléimide
FRET	résonance de fluorescence par transfert d'énergie (« <i>fluorescence resonance energy transfer</i> »)
FRG	syndrome familial de glucosurie rénale
GABA	acide gamma-aminobutyrique
GGM	malabsorption du glucose et du galactose
GlpT	transporteur de glycérol-3-phosphate
Glt _{ph}	transporteur de glutamate
GLUT	transporteur facilité de sucre

hSGLT1	isoforme humain de SGLT1
H ⁺	proton
HCO ₃ ⁻	bicarbonate
HRP	«peroxidase <i>horseradish</i> »
I _{cotr}	courant de cotransport
IgG	immunoglobuline G
I _{leak}	courant de fuite du Na ⁺ («Na ⁺ leak»)
I-V	courbe de courant en fonction du V _m
K ⁺	ion potassium
KcsA	canal K ⁺ bactérien
K _i ^{Pz}	constante d'inhibition de la Pz
k _{ij}	(pseudo-) constante de vitesse de l'état <i>i</i> à l'état <i>j</i>
k _{ij0}	(pseudo-) constante de vitesse de l'état <i>i</i> à l'état <i>j</i> à 0 mV
K _m ^{αMG}	affinité apparente pour l'αMG
K _m ^{Na+}	affinité apparente pour le Na ⁺
K _v	canal K ⁺ dépendant du V _m
KvAP	canal K ⁺ dépendant du V _m d' <i>Aeropyrum Pernix</i>
LacY	lactose perméase
Leu _{TAA}	transporteur de leucine dépendant du Na ⁺
Li ⁺	ion lithium
LRET	résonance de luminescence par transfert d'énergie (« <i>luminescent resonance energy transfer</i> »)
MFS	superfamille de facilitateur (« <i>major facilitator superfamily</i> »)
MthK	canal K ⁺ activé par le Ca ²⁺ intracellulaire
MTS	méthanethiosulfonate
MTSEA	« <i>2-aminoethyl methanethiosulfonate hydrobromide</i> »
MTSES	« <i>sodium (2-sulfonatoethyl)methane thiosulfonate</i> »
MTSET	« <i>[2-(Trimethylammonium) ethyl]methanethiosulfonate bromide</i> »
Na ⁺	ion sodium
NEM	N-éthylmaléimide

NhaA	échangeur Na^+/H^+ bactérien
NHE	échangeur Na^+/H^+
NI	non-injecté
NMDG	N-méthyl-D-glucamine
O/N	toute une nuit (« <i>over night</i> »)
PCR	réaction en chaîne par la polymérase (« <i>polymerase chain reaction</i> »)
Pz	phlorizine
Q (Q_{\max})	charge transférée (maximale)
Q-V	courbe de charge transférée versus V_m
ROMK	canal K^+ à rectification entrante
rSGLT1	isoforme lapin de SGLT1
SCAM	« <i>substituted cysteine accessibility method</i> »
SDS	« <i>sodium dodecyl sulphate</i> »
SEM	erreur standard de la moyenne
SERCA	Ca^{2+} ATPase du réticulum sarcoplasmique
SGLT1	cotransporter Na^+ /glucose à haute affinité (« <i>sodium glucose transporter 1</i> »)
SGLT2	cotransporter Na^+ /glucose à faible affinité
SGLT3	senseur de glucose
SLC5	5 ^e famille de transporteurs de solutés dépendants du Na^+
SMIT	cotransporter Na^+ /myo-inositol
STM/TMS	segment transmembranaire (« <i>transmembrane segment</i> »)
TEA	tétraéthylammonium
TCEP	« <i>tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride</i> »
TG	thapsigargine
TBS	solution tampon tris (« <i>tris buffer solution</i> »)
TDG	D-galactopyranosyl-1-thio-D-galactopyranoside
TMR5(6)M	tétramethylrhodamine-5(or 6)-maléimide
TMR5M-C255	C255 marquée avec TMR5M
UhpT	homologue de GlpT d' <i>E. Coli</i>

VCF <i>clamp</i>	fluorométrie en condition de voltage imposé (« <i>voltage fluorometry</i> »)
V_m	potentiel membranaire
V_{rev}	V_m d'inversion, i.e. le courant y est nul
VSVG	protéine G du virus vésiculaire stomatitis
wt SGLT1	SGLT1 de type sauvage (« <i>wild type</i> »)
z_i	valence de la charge associé à l'étape i

Symboles grecs

α_l	paramètre d'asymétrie de la barrière d'énergie
α MG	α -méthyl-glucose
ΔC_i	variation de la probabilité C_i
$\Delta F-V_m$	changement de fluorescence versus V_m
Δf_i	changement de fluorescence associé à l'état i dans le modèle de fluorescence
τ_{slow}	constante de temps lente

Autres symboles

3D	tridimensionnel
----	-----------------

Remerciements

Avant tout, j'aimerais remercier du fond du cœur mon directeur de recherche, le professeur Jean-Yves Lapointe, pour sa disponibilité, sa patience, sa rigueur scientifique, son optimisme et sa compréhension. Il m'a accueillie dans son laboratoire alors que j'étais étudiante en deuxième année au baccalauréat en physique et que je n'avais aucune notion de biophysique. Il a su me transmettre, au fil des ans, sa passion pour son domaine de recherche. Après toutes ces années, j'aimerais bien que sa capacité à résister au stress m'ait été transmise mais je ne pourrai jamais atteindre son niveau. Non seulement nous avons fait une équipe scientifique du tonnerre mais nous avons aussi partagé d'inoubliables moments lors de parties de pool, de dîners ou soupers festifs et de voyages, tous scientifiques bien sûr, à Boston (mon baptême de l'air), à San Francisco, en Suisse, et sans oublier, au New Hampshire! Je pourrais le louer pendant des heures mais je ne saurai jamais comment le remercier précisément.

Je remercie aussi les personnes qui ont été des maîtres ou des collaborateurs. D'abord, je tiens à souligner la patience et la gentillesse d'Emmanuelle Brochiero qui m'a appris les bases de l'étude des canaux K^+ , de la fabrication de pipettes, à la dissection des ovocytes jusqu'à leur injection et leur étude avec l'électrophysiologie en deux micro-électrodes, lors de mon stage d'été dans le laboratoire de Jean-Yves. David Germain, Josette Noël et Mike surtout, m'ont grandement aidée dans mon apprentissage de la biologie moléculaire. Mike, je te remercie d'avoir pris le temps de me transmettre ton expérience et de m'avoir surveillée pour que je fasse toutes les étapes correctement. Je comprends maintenant pourquoi. Merci aussi d'avoir lu et corrigé avec autant de patience et de rigueur mes articles. Je veux remercier Bernadette pour m'avoir aidée dès mes débuts avec l'électrophysiologie ainsi que pour les mesures de K_m et de K_i . Merci aussi pour ta bonne humeur, ta radio et ton rire, qui me manqueront certainement. Je remercie les étudiants qui ont participé à mes projets lors de stages d'été ou du cours de projet de fin d'étude en physique, Francis, Andrea et Carole. Il est essentiel que je souligne l'excellent travail et le dévouement de Carole. Merci d'avoir été si patiente même après avoir refait la même analyse des milliers de fois... Merci aussi à Pierre Bissonnette pour m'avoir appris à faire les préparations de membranes d'ovocytes de *Xenopus*, et pour mon blot. Ha!

J'oubliais, merci d'avoir détecté l'erreur typographique dans une équation de mon annexe...

Je veux aussi remercier l'excellent enseignement de mes professeurs, particulièrement de Lucie Parent, Raynald Laprade, Rémy Sauvé, Jean-Louis Schwartz, Alfred Berteloot et Vincent Vachon, lors de mes cours gradués. Vous nous donnez envie de nous dépasser et d'apprendre toujours plus. Je dois aussi souligner la collaboration et le travail d'équipe avec les autres étudiants du GÉPROM durant cette période, merci à Martin Kirouac, Frédéric Girard, Jean-Frédéric Brunet.

Je dois aussi souligner l'excellent travail de Michel Brunette, tant pour la construction de pièces, que pour l'aide avec mon montage optique ou avec les circuits électroniques (PMT et photodiodes). Merci aussi à Julie Verner pour l'excellent entretien des grenouilles et des ovocytes.

Ces études de doctorat n'auraient pas été possibles sans les encouragements de mes proches. Merci Thomas pour ton support moral, ton amour et ton «précieux» durant les derniers mois. Je sais que je n'ai pas été toujours facile, particulièrement durant la dernière année... Marilène, tu es une amie précieuse, j'ai eu beaucoup de plaisir avec toi au labo, à San Francisco et encore maintenant lorsque nos horaires nous permettent de nous voir. Merci Simon pour ta bonne humeur et ton côté un peu psychiatre, mais aussi merci pour ton aide avec Matlab... Je remercie aussi chaleureusement mes parents, Gérard et Jeannine, ma sœur Vicky, et Hugo, son mari. Merci maman, je sais que tu aurais aimé lire mes articles, je t'en dispense, mais j'accepte une petite tape sur l'épaule. Merci de m'avoir encouragée dans mes moments d'hésitations à poursuivre mes études de doctorat, tu avais bien raison. Merci papa, tu m'as donné la curiosité, c'est la plus belle des qualités. Merci aussi à mes amis de physique Luc Stafford et Carolyne Dion, et à Sabrina Bédard ainsi qu'à Julie, Isabelle et Marie-Claude.

Je remercie Yolaine, Eugénie et Alexandra pour leur support et pour la motivation sportive. Merci à Jean-Philippe et Maxime pour les bons moments passés dans le pays des mormons. Merci aussi à Anouar pour ses conseils, pour les nombreuses discussions et les mémorables moments passés au Maroc! Je ne peux passer sous silence les bonnes pensées et les encouragements de José Luis Vázquez-Ibar, ni les discussions très stimulantes avec Pancho, Rikard, Baron et Clark durant la dernière année. J'espère que je n'oublie

personne...je remercie tous les membres du GÉPROM qui m'ont aidée et encouragée de près ou de loin.

Un gros merci aussi au club des LL : Louise Lefort du GÉPROM et à Louise Lafortune, Louis Lemay et Laurent Lewis du Département de physique. Vous tous, ainsi que Louise Grégoire, je vous remercie pour votre amabilité, votre sourire et votre soutien tout au long de mes longues études.

Les travaux de cette thèse ont été subventionnés par l'organisme suivant :
Les instituts de recherche en santé du Canada (IRSC/CIHR)

Je remercie également le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG/NSERC), le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), le Groupe de recherche en transport membranaire (GRTM) et le Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM), la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal, les organisations des *Gordon Research Conferences* (GRC) et de la *Canadian Society of Biochemistry and Molecular & Cellular Biology* (CSBMCB), et le Département de physique de l'Université de Montréal pour les bourses reçues lors de mes études supérieures et lors de congrès scientifiques.

En dernier lieu, je désire remercier les membres de mon comité d'évaluation Lucie Parent (présidente-rapporteuse), Jean-Daniel Horisberger (examineur externe), Rikard Blunck (membre du jury) et Jacques Bélair (représentant de la FES) pour avoir accepté d'évaluer ma thèse et de l'avoir fait dans des délais plutôt courts, disons-le.

1 Introduction

En 1965, lorsque Robert Crane a identifié le cotransport de Na^+ et de glucose, le premier transport secondairement actif, il a automatiquement lancé le défi d'identifier le mécanisme qui permet de coupler le transport de deux solutés de façon efficace. Il s'est écoulé un peu plus de 40 ans d'expérimentation depuis ce moment crucial, période durant laquelle notre conception du cotransport s'est constamment améliorée. Le principe de couplage entre le flux de différents solutés s'est depuis solidement imposé comme un des modes fondamentaux de transport membranaire. Le transport couplé au Na^+ a été identifié non seulement pour les sucres mais aussi pour les acides aminés, les neurotransmetteurs, les anions monovalents. Un ion ayant un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane plasmique, tels les ions Na^+ , H^+ (proton) ou Cl^- , peut activer le mécanisme de cotransport. Le transport de tous les substrats peut s'effectuer dans le même sens (cotransport) ou en sens opposé (échangeur) ou un mélange des deux. Le cotransporteur Na^+ /glucose SGLT1 a d'abord été étudié dans des tissus intacts à partir des années 1960, puis les vésicules de membrane en bordure en brosse ont été intensivement utilisées dans les années 1970 et 1980 et, depuis son clonage en 1987, il est exprimé dans différents systèmes d'expression, mais d'abord et avant tout, dans les ovocytes de *Xenopus laevis*.

En général, les cotransports qui ont été étudiés présentent un certain nombre de caractéristiques communes reliées aux mécanismes et aux modèles cinétiques qui les représentent. Les cotransporteurs ont une stoichiométrie fixe, le transport s'effectue toujours dans le sens prévu par la somme des gradients électrochimiques de chaque espèce transportée, les affinités pour un substrat peuvent dépendre de la présence des autres substrats et être différentes de chaque côté de la membrane, les énergies d'activation sont relativement élevées, i.e. de l'ordre de 10-20 kcal/mol. Pour rendre compte de ces caractéristiques, les modèles proposés impliquent un minimum de deux conformations différentes pour le cotransporteur, une dans laquelle les sites de liaison pour les substrats font face au côté intracellulaire et une autre dans laquelle ils font face au milieu extracellulaire, tel qu'illustré à la Figure 1.1. Le cycle du transport minimal implique donc la liaison des ions et du substrat, ce qui engendre un changement de conformation

modifiant l'orientation des sites de liaison et permet le relâchement des ions et du substrat de l'autre côté de la membrane plasmique.

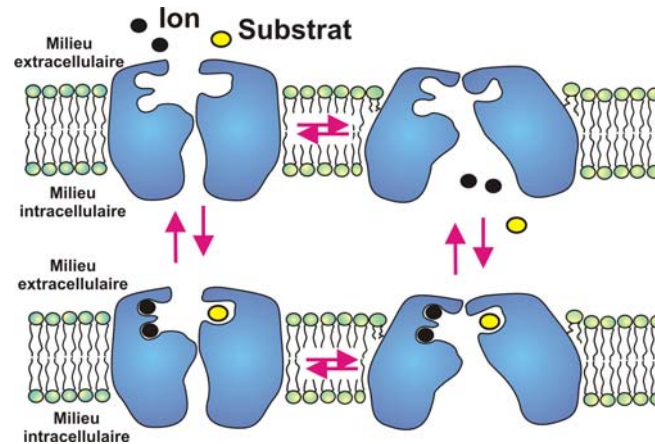


Figure 1.1 : Schéma simplifié du mécanisme d'action d'un cotransporteur présentant ses sites de liaison soit du côté extracellulaire (la conformation de gauche) soit du côté intracellulaire (la conformation de droite).

Plusieurs structures de canaux, pompes, échangeurs et transporteurs ont été élucidées depuis la publication de la structure tridimensionnelle (3D) du canal potassium KcsA en 1998. Nous pouvons maintenant nous créer une image un peu plus réaliste, par rapport au schéma de la Figure 1.1, de ce à quoi pourrait ressembler un cotransporteur. Ainsi, avant de présenter un résumé de ce qui est connu sur la structure et le mécanisme du cotransporteur Na^+ /glucose humain, nous pensons qu'il serait pertinent de passer en revue les nouvelles données structurales qui ont été publiées depuis 1998 sur différents types de protéines membranaires. Cette revue nous permettra d'identifier des caractéristiques physiques particulières que partagent les canaux, pompes et échangeurs avec les cotransporteurs. Nous présenterons les structures 3D qui composent les sites de liaisons pour les cations, les anions et différents substrats neutres. Nous nous attarderons aussi aux canaux ioniques sélectifs pour les ions K^+ qui dépendent du voltage membranaire et à la pompe à Ca^{2+} , les deux exemples les plus avancés du point de vue structural, pour décrire les changements de conformation qui expliquent les propriétés de ces deux types de protéines membranaires. Nous terminerons cette brève revue en abordant une question de principe : existe-t-il une distinction fondamentale entre un canal et un transporteur?

1.1 Les structure tridimensionnelles de canaux et de transporteurs

Les structures à résolution atomique des différentes protéines membranaires obtenues jusqu'à présent nous renseignent sur les caractéristiques générales des protéines membranaires et sur les caractéristiques particulières du type de transport effectué. Nous allons nous concentrer sur les aspects suivants : les caractéristiques des hélices transmembranaires et celles des sites de liaison aux substrats et aux ions.

1.1.1 Les hélices α transmembranaires

À l'exception des porines bactériennes, tous les canaux, transporteurs ou échangeurs dont nous connaissons la structure 3D présentent des hélices α transmembranaires, aussi appelées segments transmembranaires (STM). Le nombre d'hélices α varie d'une protéine à un autre, selon leur nombre d'acides aminés et la complexité du mécanisme de fonctionnement. Les aquaporines (canaux à eau, voir Figure 1.2), qui contiennent environ 240 à 260 acides aminés, comptent six hélices α (plus deux petites hélices ré-entrantes) tandis que les canaux Na^+ ou Ca^{2+} , les canaux K^+ dépendants du voltage membranaire (voir Figure 1.3) et le transporteur de glutamate couplé au Na^+ (voir Figure 1.4) en ont chacun 24.

Des algorithmes ont été développés dans les années 1980 et 1990 (Kyte et Doolittle, 1982; pour revue voir White, 1994) afin de prédire la topologie des protéines membranaires, c'est-à-dire les portions de la protéine qui forment des STM et celles qui forment des boucles intra- ou extracellulaires. Pour former un STM, ces algorithmes requièrent une certaine hydrophobicité minimum sur une séquence d'au moins 23 acides aminés. Malheureusement, ces algorithmes ont failli à prédire certaines particularités d'hélices retrouvées dans les structures de protéines membranaires actuellement connues. Par exemple certains STM sont plus courts que la limite, d'autres sont excessivement longs et inclinés par rapport au plan de la membrane. Certains STM sont composés d'hélices α interrompues au milieu de la membrane («*kinck*»), ou ré-entrantes («*hair pin*») i.e. qu'elles

commencent et se terminent du même côté de la membrane. La communauté scientifique a donc été très surprise par les structures de certaines protéines membranaires. Les structures du transporteur de glutamate (Glt_{Ph}), illustrée à la Figure 1.4, et de l'échangeur EcClC, à la Figure 1.5, en sont de bons exemples. En effet, les différentes longueurs et inclinaisons des hélices d'EcClC sont remarquables et l'hélice 5 de Glt_{Ph} est étonnement longue et brisée. Glt_{Ph} possède également deux hélices ré-entrantantes (HP1 et HP2 dans la Figure 1.4B). D'ailleurs, les hélices ré-entrantantes se retrouvent dans plusieurs structures : l'aquaporine, les canaux K^+ , le transporteur de glutamate et l'échangeur EcClC.



Figure 1.2 : Structure de l'aquaporine 1 bovine à 2.2 Å de résolution.

Monomère vu dans le plan de la membrane. La surface du pore est illustrée par des boules bleues. Tiré de (Sui *et al.*, 2001).

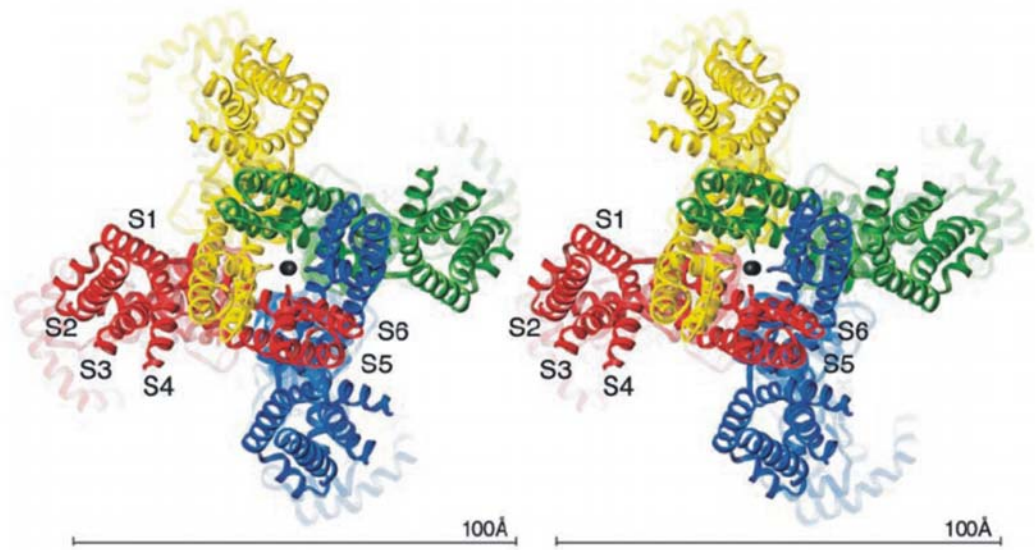


Figure 1.3 : Structure du canal K^+ de rat (Kv1.2) à 2.9 Å de résolution.

Vue de haut du tétramère dont chacune des sous-unités est colorée en une couleur différente. Tiré de (Long *et al.*, 2005).

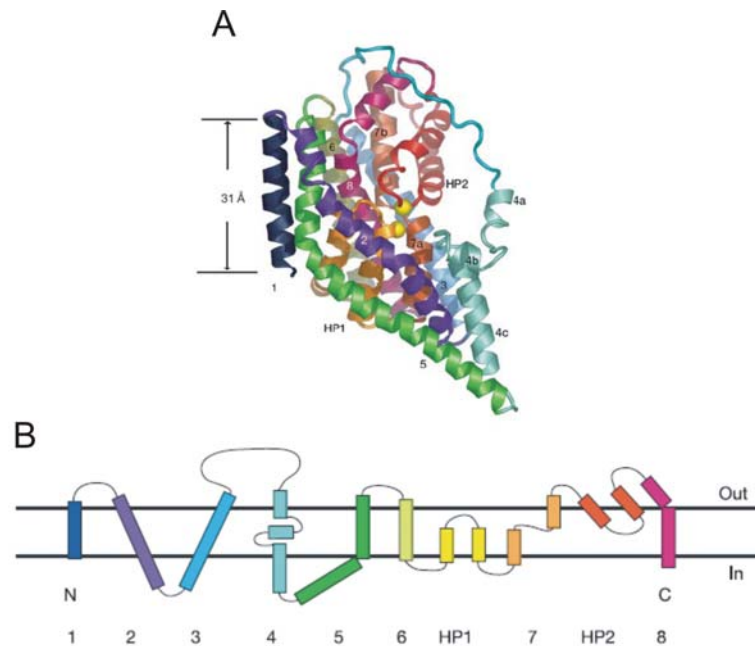


Figure 1.4 : Structure d'un monomère du transporteur de glutamate Glt_{ph} .

A) Schématisation en hélices α , vue de côté, dans le plan de la membrane. B) Topologie membranaire de Glt_{ph} basée sur sa structure 3D. Tiré de (Yernool *et al.*, 2004).

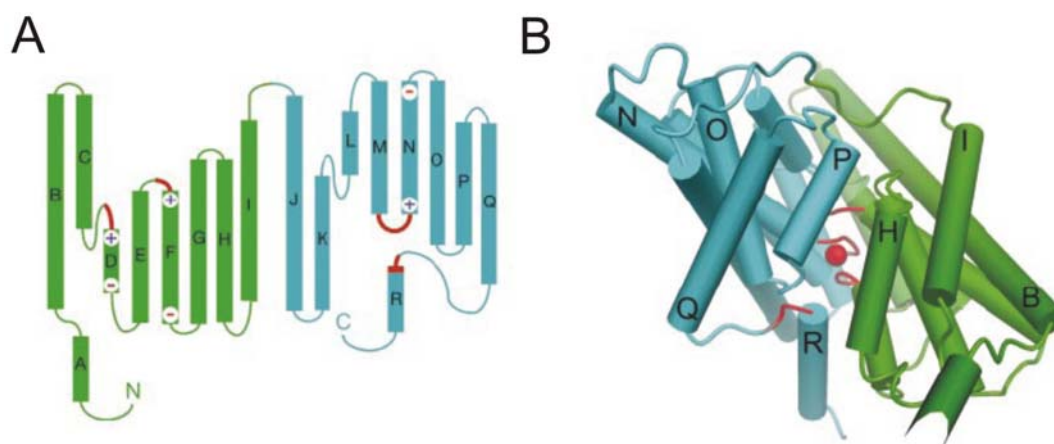


Figure 1.5 : Structure de l'échangeur EcClC à 3.0 Å de résolution.

A) Représentation schématique des hélices α en pseudo-topologie. B) Structure 3D où les hélices α sont illustrées en forme de cylindre. Tiré de (Dutzler *et al.*, 2002).

Une symétrie dans l'arrangement des hélices α chez l'aquaporine et l'échangeur EcClC a pu être observée (Sui *et al.*, 2001; Dutzler *et al.*, 2002). En effet, dans l'aquaporine, une symétrie est présente dans la séquence linéaire en acides aminés et se retrouve dans la topologie des STM. La topologie de la deuxième moitié de la protéine est en fait une répétition inversée de celle de la première moitié. Une pseudo-symétrie similaire est aussi observée dans la structure de l'échangeur EcClC où les deux moitiés de la protéine sont antiparallèles. La symétrie est évidente chez les canaux ioniques et chez le transporteur de glutamate. En effet, les quatre sous-unités α des canaux K^+ s'assemblent pour former un tétramère fonctionnel (Papazian *et al.*, 1987), un tétramère qui est codé par un seul polypeptide chez les canaux Na^+ et Ca^{2+} (Noda *et al.*, 1984; Zorzato *et al.*, 1990). Dans le cas du transporteur de glutamate, ce sont trois sous-unités identiques qui s'assemblent pour former un transporteur fonctionnel (Yernool *et al.*, 2004).

1.1.2 Le site de liaison au substrat

Évidemment, la structure du site de liaison au substrat d'une protéine membranaire se révèle une caractéristique importante qui dictera sa spécificité. Les transporteurs de

lactose (LacY), de glycérol-3-phosphate (GlpT) et de leucine (Leu_{TAA}) nous permettent d'en dégager les caractéristiques essentielles.

Le substrat de LacY est un sucre, le lactose. Le site de liaison est situé dans la cavité hydrophile formée par les 12 hélices α (Figure 1.6A). La caractéristique spécifique de son site de liaison à un analogue du lactose, le D-galactopyranosyl-1-thio-D-galactopyranoside (TDG) est sans doute la présence d'interactions hydrophobes avec un groupement indole du Trp151 (hélice 5). Un autre type d'interaction est aussi retrouvé, trois ponts hydrogènes stabilisent le TDG dans son site. Une interaction hydrophobe est aussi observée entre le TDG et la chaîne latérale d'une histidine dans la structure d'une entérotoxine d'*E. Coli* (Merritt *et al.*, 1997), ce qui pourrait donc être une forme d'interaction supplémentaire qui est possiblement impliquée dans un site de liaison pour les sucres.

Comme dans le cas de LacY, les hélices du transporteur de glycérol-3-phosphate forment une cavité accessible pour l'eau d'une côté de la membrane. Le substrat est cependant bien différent d'un sucre car il comporte un groupement phosphate qui est dibasique à pH physiologique (Huang *et al.*, 2003). Ce groupement phosphate détermine en fait la liaison du substrat au transporteur. Son site de liaison doit donc comporter des charges pour le stabiliser (Figure 1.6B). Les deux charges positives de l'Arg45 (hélice 1) et de l'Arg269 (hélice 7) forment sans doute un pont salin avec le substrat. Ces arginines sont conservées parmi les transporteurs bactériens GlpT et UhpT mais non dans les autres protéines de la superfamille des facilitateurs («*major facilitator superfamily*», MFS). Par contre, l'importance de l'Arg45 est démontrée dans le cas du transporteur humain de glucose-6-phosphate car la mutation de l'arginine équivalente en une cystéine ou une histidine est la cause d'une maladie héréditaire appelée glycogénose de type 1b («*glycogene storage disease type 1b*»).

La structure du transporteur de leucine dépendant du Na⁺ et du Cl⁻ a été obtenue en présence de son substrat, le L-leucine (Figure 1.6C). Les hélices 1 et 6 entrent en contact direct avec la leucine, au niveau des interruptions de l'hélice qui sont observées vers le centre de la membrane. La leucine est transportée comme un zwitterion mais ce n'est pas un résidu chargé qui est impliqué dans sa stabilisation mais plutôt le moment dipolaire de

certaines hélices α composant le site de liaison. Des interactions électrostatiques se produisent entre le groupement amine de la leucine et l'extrémité négative du dipole des hélices 1a et 6a tandis que le groupement carboxyl de la leucine interagit avec l'extrémité positive du dipole de l'hélice 1b. Aucune molécule d'eau n'est présente dans le site de liaison. De plus, la chaîne latérale de la leucine se situe dans une pochette hydrophobe créée par les chaînes latérales des acides aminés Val104 et Tyr108 de l'hélice 3, Phe253, Ser256 et Phe259 de l'hélice 6 et Ser355 et Ile359 de l'hélice 8. En analysant les séquences des différents homologues de Leu_{TAA}, il apparaît évident que ces acides aminés confèrent la spécificité au substrat puisqu'ils sont remplacés par de plus ou moins gros acides aminés pour accommoder des substrats de différentes tailles (glycine, GABA, sérotonine) (Yamashita *et al.*, 2005; Beuming *et al.*, 2006).

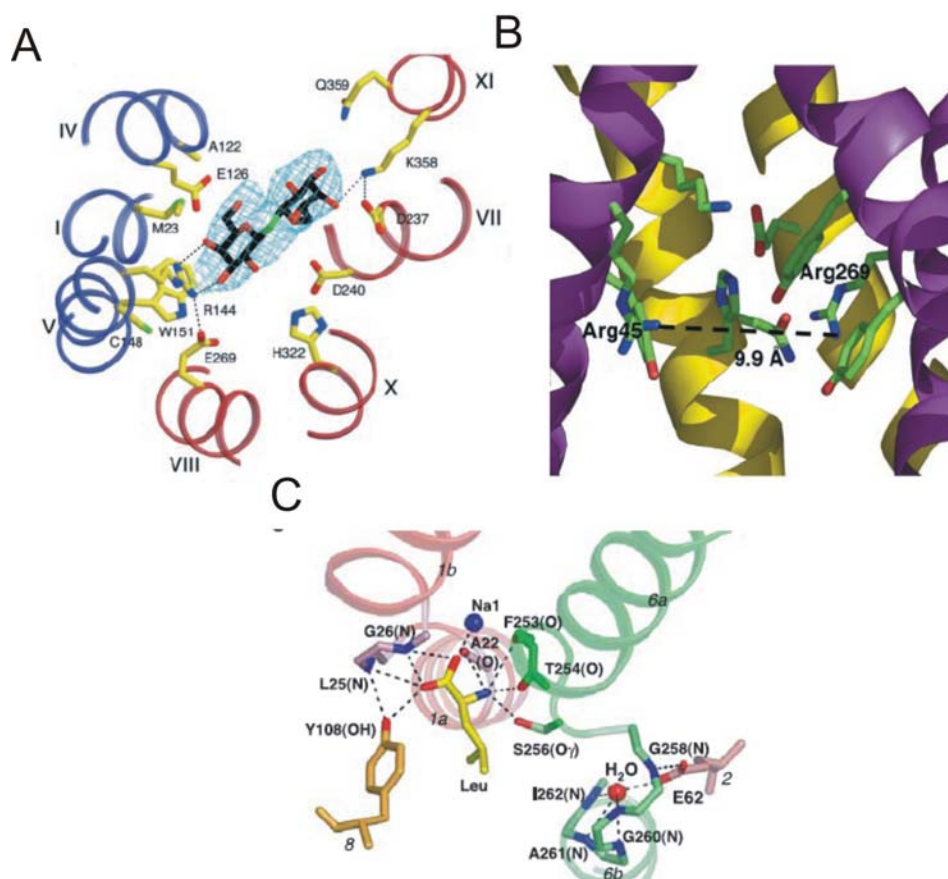


Figure 1.6 : Structure des sites de liaison des substrats de LacY, GlpT et Leu_{TAA}.

A) Structure du site de liaison du substrat de la lactose perméase (LacY) de *Escherichia coli* (3.5 Å de résolution) tiré de (Abramson *et al.*, 2004). B) Structure du site de liaison du

substrat du transporteur de glycerol-3-phosphate (GlpT) d'*Escherichia coli* (3.3 Å de résolution), tiré de (Huang *et al.*, 2003). C) Structure du site de liaison du substrat du transporteur de leucine dépendant du Na⁺ et du Cl⁻ d'*Aquifex aeolicus* (Leu_{TAA}) (résolution de 1.65 Å), tiré de (Yamashita *et al.*, 2005).

1.1.3 Le site de liaison aux ions

Les structures du canal K⁺ KcsA, de l'échangeur EcClC, de la pompe Ca²⁺ ATPase SERCA et du cotransporteur de leucine couplé aux ions Na⁺ et Cl⁻ Leu_{TAA} sont particulièrement intéressantes pour la comparaison des caractéristiques structurales des sites de liaisons aux ions (cations ou anions) (Doyle *et al.*, 1998; Toyoshima *et al.*, 2000; Dutzler *et al.*, 2002; Yamashita *et al.*, 2005). Aucun ion Na⁺ n'était visible dans la structure de NhaA, le site proposé pour l'ion est donc encore quelque peu spéculatif (Hunte *et al.*, 2005).

Une caractéristique fondamentale se dégage de ces différents canaux et pompes : tous comportent des interactions qui compensent pour l'état de déshydratation des ions lorsqu'ils sont liés dans la protéine. En effet, les ions sont hydratés dans les milieux extracellulaire ou intracellulaire et devront perdre leurs molécules d'eau pour traverser la bicouche lipidique, ce qui coûte extrêmement cher en énergie (environ 81 et 98 kcal/mol pour les ions K⁺ et Na⁺ respectivement) (Eisenman, 1975). La protéine, pour favoriser le transport de l'ion dans la membrane, doit minimiser ce coût énergétique. Afin d'accommoder les ions chargés positivement, des résidus comportant une charge négative y sont organisés de façon à entourer l'ion et à imiter les molécules d'eau normalement liées à l'ion dans un milieu aqueux. Dans le cas des ions chargés négativement, ce sont des résidus ayant une charge positive qui s'organisent pour former un site spécifique pour l'ion (voir Figure 1.7). Les charges qui stabilisent les ions peuvent être partielles et peuvent provenir de la chaîne latérale d'acides aminés chargés ou de la chaîne principale elle-même.

Dans le filtre de sélectivité des canaux K⁺ (séquence TVGYG), les charges partielles de huit atomes d'oxygène, provenant soit du carbonyl (CO) de la chaîne polypeptidique principale ou d'un groupement hydroxyle (OH) de la chaîne latérale d'un acide aminé, stabilisent chaque ion K⁺ (Doyle *et al.*, 1998). Dans la structure du transporteur de leucine, les deux sites pour les ions Na⁺ comportent chacun cinq ou six

atomes d'oxygènes en contact direct avec l'ion (Yamashita *et al.*, 2005) incluant la leucine qui est située très près des deux sites de liaison et qui peut contribuer à la coordination des ions Na^+ (grâce à son groupement carboxylate, COO^-). Dans le premier site, cinq atomes d'oxygène portent une charge négative partielle et proviennent du groupement carbonyle de la chaîne principale ou secondaire (résidus Ala22 et Asn27 du STM 1, Thr254 du STM 6 et Asn286 du STM 7), du groupement hydroxyle de la chaîne secondaire (Thr254 du STM 6). Dans le second site, tous les atomes d'oxygènes portent une charge partielle (du groupement carbonyle de la chaîne principale (Gly20 et Val23 du STM 1, Ala351 du STM 8) ou du groupement hydroxyle de la chaîne secondaire (Thr354 et Ser355 du STM 8)). Les sites de liaisons aux ions Ca^{2+} dans SERCA comportent quant à eux sept atomes d'oxygène provenant de la chaîne latérale (Asn768, Glu771 de l'hélice M5, Thr799, Asp800 de M6 et Glu908 de M8) ou de la chaîne principale également dans le cas du deuxième site (Val304, Ala305 et Ile307 de M4, Asn796 et Asp800 de M6 et Glu309 de M4) (Toyoshima *et al.*, 2000; Toyoshima et Nomura, 2002). Dans la conformation sans Ca^{2+} , les deux sites ne sont plus présents pour lier les cations puisque les hélices α (hélices M4, M5, M6 et M8) ont subi un réarrangement.

Les sites de liaison pour les ions K^+ , Na^+ et Ca^{2+} dans ces protéines comportent un nombre différent d'atomes d'oxygène pour les stabiliser, de la même façon que ces atomes hydratés porteront un nombre différent de molécules d'eau. Un second facteur influence aussi la sélectivité ionique d'un site. La dimension du site s'avère importante pour la sélectivité ionique puisque les atomes n'ont pas le même rayon. Le rayon de Pauling de l'ion Na^+ est de 0.95 Å, ce qui est plus petit que celui de l'ion K^+ (1.33 Å) et que de l'ion Ca^{2+} (1.69 Å) (Eisenman, 1975). La distance moyenne entre l'ion et l'atome d'oxygène du site de liaison est plus faible chez Leu_{TAA} (2.28 Å) que chez KcsA (2.84 Å) tandis que celle chez SERCA se situe entre les deux (de 2.2 à 2.6 Å) (Gouaux et Mackinnon, 2005).

Le site de liaison des ions Cl^- de l'échangeur EcCIC est quant à lui favorisé par un environnement électrostatique formé de charges partielles positives (Dutzler *et al.*, 2002). Elles proviennent de deux atomes d'azote provenant du groupement amide de la chaîne principale (Ile356 et Phe357) et de deux atomes d'oxygènes de la chaîne latérale (Ser107 et Tyr445). Ces acides aminés ont principalement des chaînes latérales hydrophobes.

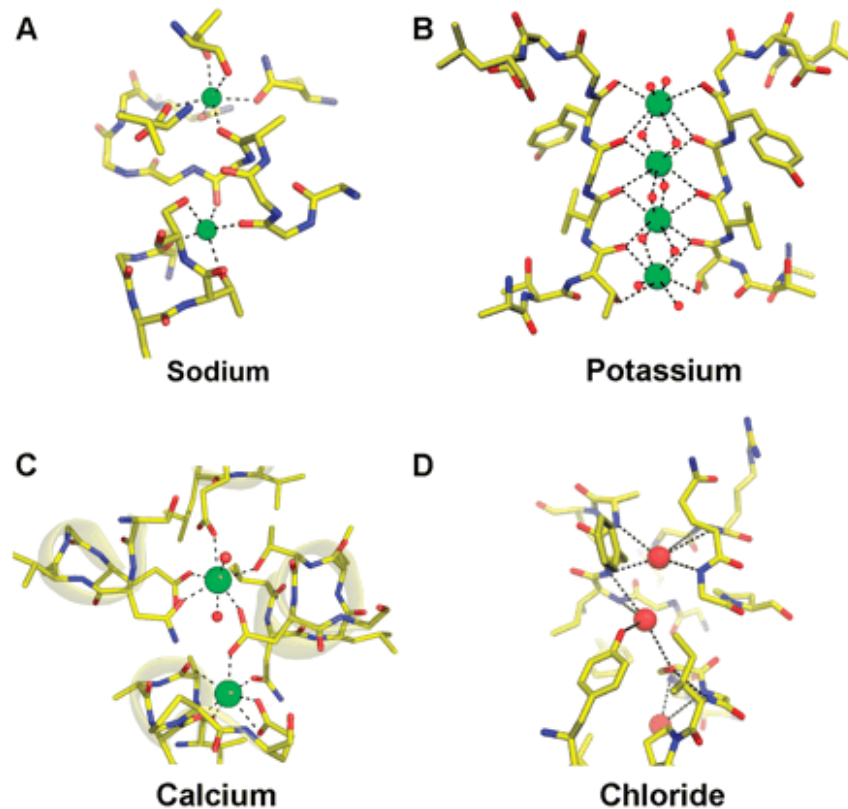


Figure 1.7 : Architecture des sites de liaison aux ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Cl^- des transporteurs Leu_{TAa} , SERCA et CIC et du canal KcsA.

Les ions sont représentés par des cercles, les cations en vert et les anions en rouge. Les atomes chargés positivement sont représentés en bleu tandis que ceux qui sont chargés négativement sont en rouge. Tiré de (Gouaux et Mackinnon, 2005).

1.2 Mécanisme de fonctionnement

Une structure 3D d'une protéine dans un état donné ne peut nous renseigner directement sur les mouvements qui se produisent lorsqu'elle effectue le transport des ions et/ou de son(es) substrat(s). Par contre, des structures d'une même protéine obtenues dans plusieurs conditions physiologiques peuvent nous éclairer sur son mécanisme de fonctionnement. Les deux cas qui ont été le mieux étudiés à cet égard sont ceux des canaux dépendants du voltage membranaire et de la pompe Ca^{2+} ATPase, SERCA. Nous allons résumer ici ce que nous savons de ces deux cas car ceci nous aide à imaginer ce que peut représenter un changement de conformation dans un cotransporteur.

1.2.1 Les canaux K⁺ dépendant du voltage (K_v)

Jusqu'à présent, les structures du canal K⁺ de *Streptomyces lividans* KcsA (3.2 Å et 2.0 Å) (Doyle *et al.*, 1998), du canal K⁺ activé par le Ca²⁺ intracellulaire de *Methanobacterium thermoautotrophicum* MthK (3.3 Å) (Jiang *et al.*, 2002a), du canal KirBac1.1 de *Burkholderia pseudomallei* (3.65 Å) (Kuo *et al.*, 2003), du canal à ions K⁺ dépendant du voltage de *Aeropyrum pernix* KvAP (3.2 Å) (Jiang *et al.*, 2003a) et du canal K⁺ dépendant du voltage membranaire Kv1.2 de rat (2.9 Å) (Long *et al.*, 2005) sont connues. La structure générale du pore de perméation des ions a la même architecture générale chez tous les canaux cristallisés. Les segments transmembranaires S5 et S6 des canaux K_v (S1 et S2 chez KcsA) adoptent une forme de tipi inversé (Figure 1.8B). Les quatre boucles P («*pore loop*») provenant des quatre sous-unités forment un canal étroit d'environ 12 Å de longueur formé par les résidus TVGYG, le filtre de sélectivité. Les petites hélices joignant les hélices S5 et S6 pointent en direction du centre de la cavité. Cet arrangement confère au canal une large cavité remplie d'eau, (entre 20 et 30 molécules) situé au centre de la membrane (Doyle *et al.*, 1998; Kuo *et al.*, 2003). Cinq sites de liaison pour les ions ont pu être identifiés dans le filtre de sélectivité (S₀ à S₄). La structure de KcsA représente un canal dans la conformation fermée et celle de MthK dans une conformation ouverte. En effet, dans KcsA, l'écart entre les hélices S2 du côté intracellulaire est d'au plus 4.5 Å (Jiang *et al.*, 2002a, b) tandis que celle des hélices correspondantes pour MthK est de 12 Å (Doyle *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2003a).

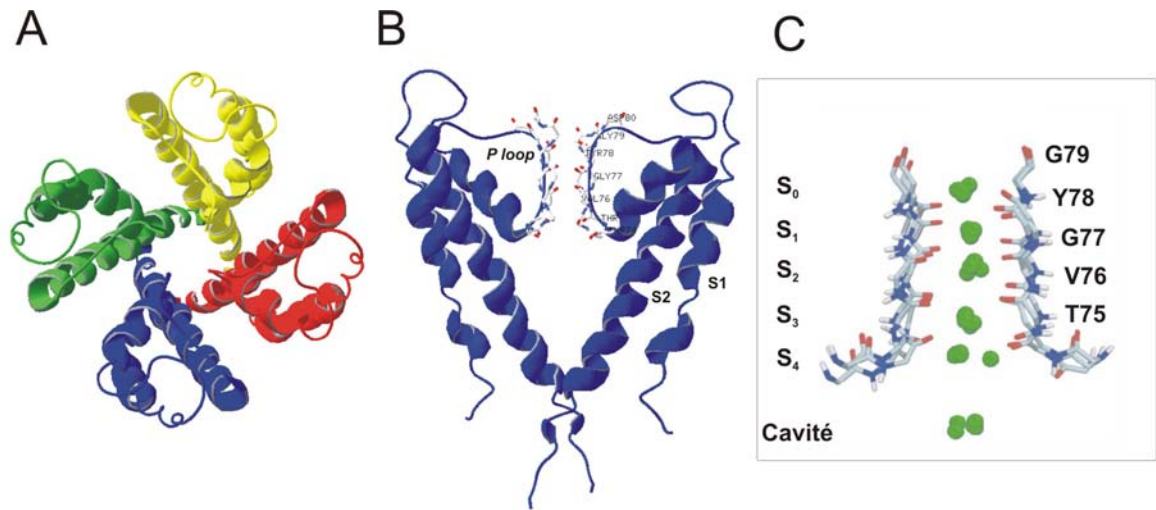


Figure 1.8 : Structure du canal K^+ de *Streptomyces lividans* (KcsA).

A) Vue de haut du tétramère. B) Vue latérale de deux sous-unités avec le filtre de sélectivité. A) et B) Faits à partir du fichier PDB 1BL8. C) Positions des sites de liaison aux ions dans le filtre de sélectivité. Tiré de (Roux *et al.*, 2000).

Si l'étude du mécanisme de perméation est intéressante, c'est le mécanisme de «gating» qui est le plus pertinent pour notre compréhension des cotransporteurs. En effet, les courants de «gate» (porte) s'apparentent aux courants transitoires des cotransporteurs et le changement de conformation qui suit le mouvement de la «gate» nous rappelle le changement de conformation qui suit l'application d'un voltage négatif et qui permet la liaison des ions et du substrat (voir section 1.4.5). Hodgkin et Huxley ont proposé un mécanisme de «gating» des canaux K^+ et Na^+ responsables de la propagation du potentiel d'action dans les cellules excitables, dans les années 1950 (Hodgkin et Huxley, 1952). Les courants de déplacement de charges, ou courants de «gating», ont été mesurés pour la première fois en 1973 (Armstrong et Bezanilla, 1973) mais leur description à l'échelle moléculaire ne s'est accélérée que depuis l'obtention de la séquence du canal *Shaker* et depuis les premières structures 3D de deux canaux dépendants du voltage en 2003 (KvAP) et 2005 (Kv1.2) (Jiang *et al.*, 2003a; Long *et al.*, 2005). Un modèle basé sur plusieurs types d'expériences [mutagenèse (Aggarwal et MacKinnon, 1996; Seoh *et al.*, 1996), SCAM (Larsson *et al.*, 1996; Yusaf *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 1998), mutations histidine (Starace *et al.*, 1997; Starace et Bezanilla, 2001, 2004), fluorométrie en condition de voltage imposé (Cha et Bezanilla, 1997; Mannuzzu *et al.*, 1996), «fluorescence resonance energy transfer»

(FRET) et «lanthanide based RET» (LRET) (Cha et Bezanilla, 1997; Chanda *et al.*, 2005; Posson *et al.*, 2005)] en a émergé. Quatre résidus arginines (R362, R365, R368 and R371, dans la séquence du *Shaker*) situés sur le segment S4 seraient principalement responsables de l'activation du canal lors d'une dépolarisation. Ces quatre charges seraient vraisemblablement situées dans une crevasse remplie d'eau faisant face au milieu intracellulaire aux V_m hyperpolarisants et se retrouveraient dans une autre crevasse faisant face au milieu extracellulaire aux V_m dépolarisants (voir Figure 1.9A). Le modèle est appelé le modèle du transporteur puisque l'introduction de résidus histidine en positions 365, 368 et 371 permet de voir un transport transmembranaire de H^+ si le canal est activé en présence d'un gradient de protons (Starace *et al.*, 1997; Starace et Bezanilla, 2001, 2004). Ceci indique que, comme le site de liaison pour le substrat dans les cotransporteurs, certains résidus du segment S4 sont exposés alternativement à l'un ou à l'autre côté de la membrane en fonction du voltage membranaire. Par analogie avec le mécanisme de fonctionnement des transporteurs, le canal transporte des charges lors d'une dépolarisation et cela entraîne un changement de conformation qui fait ouvrir la porte permettant le passage des ions (Bezanilla, 2000).

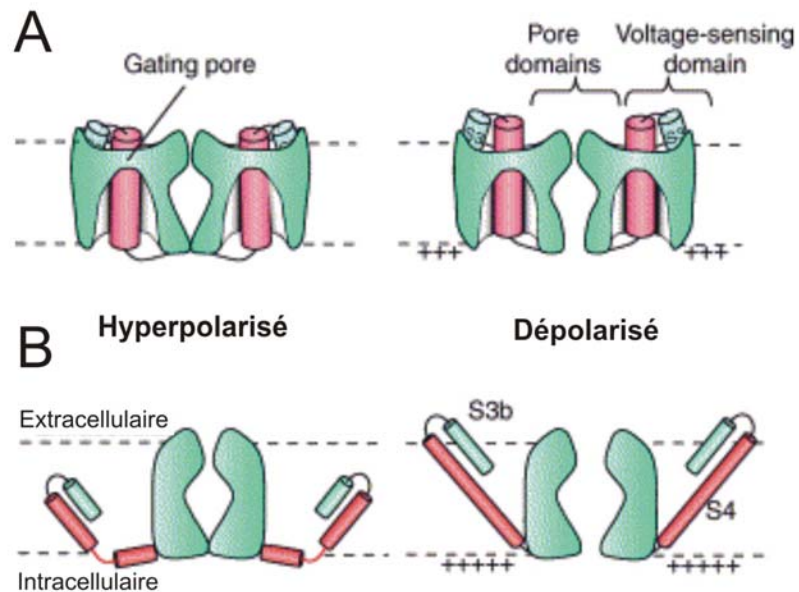


Figure 1.9 : Deux modèles illustrant le mécanisme de «gating» des canaux K_v lors d'une dépolarisation.

A) Le mouvement du segment S4 dans le modèle du transporteur de Bezanilla. B) Le mouvement de la rame électrosensible dans le modèle de MacKinnon. Tiré et modifié de (Ahern et Horn, 2004).

La structure de KvAP et le modèle d'activation proposé par MacKinnon ont suscité une grande controverse en 2003 puisqu'ils contredisaient nombre de résultats expérimentaux obtenus sur une période de 30 ans. Dans la structure du senseur de voltage, les hélices S3 et S4 forment une «rame électrosensible» («*voltage-paddle*»), une structure hélice-tour-hélice, située dans le périmètre externe du canal, de façon tangentielle à celui-ci. Selon MacKinnon, la rame électrosensible serait un domaine flexible à part des autres domaines et pourrait adopter des conformations variables. Le modèle d'activation du canal KvAP proposé par les auteurs (Jiang *et al.*, 2003b) différait passablement du modèle proposé par Bezanilla pour le *Shaker*. Dans celui-ci, la rame électrosensible effectue un large mouvement de plus de 15-20 Å à travers la bicouche lipidique (voir Figure 1.9B). Ce mouvement est thermodynamiquement improbable puisqu'il nécessite un coût énorme pour compenser l'énergie nécessaire pour que les arginines passent du milieu aqueux au milieu lipidique lors de la dépolarisation. Dans le modèle du transporteur de Bezanilla, le

mouvement du senseur de voltage est plus subtil et les arginines ne traversent pas la membrane comme telle mais ont plutôt accès à un chemin (une crevasse) qui est en contact avec un côté ou l'autre de la membrane. On dit alors que le champ électrique membranaire traverse la région où sont situées les charges de «gating».

Plus récemment, le même groupe publiait la structure du canal Kv1.2 de rat (Long *et al.*, 2005). Cette structure contrastait avec celle du KvAP et se rapprochait davantage de l'image émanant des nombreuses études ayant abouti au modèle de Bezanilla. La nature du mouvement effectué par cette rame électrosensible a encore été testée sur KvAP (Ruta *et al.*, 2005) et contredite (Chanda *et al.*, 2005). Encore une fois, les mesures du groupe de MacKinnon suggèrent que le segment S4 effectue un mouvement d'environ 15-20 Å lors d'une dépolarisation tandis que celle du groupe de Bezanilla suggère qu'un large mouvement ne se produit pas dans le *Shaker*. Aucun modèle ne fait encore consensus mais un modèle où le champ électrique est concentré sur une fraction étroite de l'épaisseur membrane semble constituer le compromis vers lequel les différents intervenants tendent de plus en plus.

1.2.2 Ca²⁺ ATPase, SERCA

SERCA est une Ca²⁺ ATPase de type P (i.e. qui implique une phosphorylation de la protéine à chaque cycle de transport) contenue dans le réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique (pour revue sur les ATPases, voir Horisberger, 2004). SERCA pompe, au coût d'une molécule d'ATP à chaque cycle, les ions Ca²⁺ qui s'accumulent dans les cellules musculaires après une contraction pour qu'ils retournent dans le réticulum sarcoplasmique afin de permettre la relaxation musculaire. L'énergie de l'hydrolyse de l'ATP permet à SERCA de transporter deux ions Ca²⁺ contre leur gradient de concentration, tandis que deux ou trois H⁺ sont transportés à contre-sens (Yu *et al.*, 1993).

Le processus de transport des ATPases est complètement réversible, cela veut dire que lorsque le ratio ATP/ADP de la cellule est faible, les ATPases peuvent effectuer la synthèse d'ATP grâce au gradient électrochimique des ions transportés (H⁺, Na⁺, Ca²⁺). Le principe de fonctionnement de cette pompe est illustré schématiquement dans les insertions

des Figure 1.10 et 1.11. La pompe adopte deux conformations principales, E_1 et E_2 , où les sites de liaison aux cations sont respectivement accessibles du côté cytoplasmique et du côté de la lumière du réticulum, dans le cas de SERCA, et chacune existe dans les états phosphorylés ou non (E_1P et E_2P). Les ions Ca^{2+} se lient à la conformation E_1 du côté cytoplasmique, ce qui permet la liaison de l'ATP puis son hydrolyse. L'hydrolyse d'ATP engendre un changement de conformation de la pompe, les ions Ca^{2+} sont relâchés dans la lumière et les H^+ peuvent se lier à leurs sites. Le phosphate est relâché à son tour dans le cytosol et l'enzyme peut recouvrer sa conformation E_1 en libérant les H^+ du côté cytoplasmique. Il existe des états où les ions sont attachés à la pompe mais n'ont pas accès aux milieux environnants. Il existerait deux portes qui bloqueraient le passage du côté cytoplasmique et du côté extracellulaire (ou de la lumière dans le cas de SERCA). L'existence de ces deux portes fut démontrée sur la Na^+/K^+ ATPase sur laquelle une toxine marine, la palytoxine peut se lier. La palytoxine confère à la pompe des propriétés d'un canal cationique non-sélectif tout en conservant certaines caractéristiques du mode d'accès alternatif des sites de liaisons aux ions (Artigas et Gadsby, 2002, 2003).

SERCA a été cristallisée avec ses ions Ca^{2+} (E_1) en 2000 (Toyoshima *et al.*, 2000). Ce qui est tout à fait exceptionnel dans le cas de SERCA, c'est que des structures 3D ont par la suite été trouvées dans différents états : sans Ca^{2+} (E_2) (Toyoshima et Nomura, 2002), avec l'inhibiteur (thapsigargine) (E_2 -TG) (Toyoshima et Nomura, 2002) et en présence d'un analogue de l'ATP, l'AMPPCP (E_1 -AMPPCP) (Toyoshima et Mizutani, 2004). Ces différentes structures ont permis d'identifier des changements de conformation majeurs à l'intérieur des différentes parties de cette ATPase lors de son cycle de transport.

SERCA possède trois domaines cytoplasmiques : le domaine d'attache (domaine A), le domaine de liaison aux nucléotides (domaine N) et le domaine de phosphorylation (domaine P). Elle comprend un domaine membranaire formé par dix hélices α (Figure 1.10, et 1.11). Trois longues hélices du domaine membranaire (M3, M4 et M5) rejoignent le domaine cytoplasmique catalytique. Les structures de SERCA sous différentes conditions physiologiques montrent que de larges changements de conformation se produisent tant dans les domaines cytoplasmiques que dans le domaine transmembranaire. Par exemple, d'importants mouvements des domaines cytoplasmiques se produisent lors de la liaison et

l'hydrolyse de l'ATP. Sans ATP, les domaines N et P sont séparés par ~ 50 Å mais ils entrent en contact direct lorsqu'un analogue de l'ATP est présent sans que la structure du domaine N elle-même soit grandement modifiée (voir Figure 1.11) (Toyoshima et Nomura, 2002). Celle du domaine P subit des modifications, notamment concernant son orientation par rapport à la longue hélice M5. Les mouvements dans les domaines P et N (domaines catalytiques), et celui de l'hélice M5, vont donc engendrer des mouvements dans les hélices transmembranaires qui vont ensuite permettre aux ions d'être transportés. La dissociation du Ca^{2+} engendre aussi de nombreux mouvements parmi les hélices transmembranaires (voir Figure 1.10) : non seulement les hélices qui forment les sites de liaison aux ions (M4, M5, M6 et M8) sont affectées par l'absence de Ca^{2+} , mais les hélices M1 à M3 également. Le mouvement de l'hélice M5 lors de la phosphorylation de l'ATPase éloigne les atomes d'oxygène qui formaient un des sites de liaison pour le Ca^{2+} ce qui a pour effet d'éliminer ce site et libérer le Ca^{2+} du côté de la lumière. On peut deviner un pore ouvert vers la lumière lorsque la pompe est en configuration $E_1(2\text{Ca}^{2+})$ (i.e. avec des ions Ca^{2+} liés avant la liaison de l'ATP). Par contre, en configuration E_2 (par exemple en présence de TG), le pore s'est refermé (voir cercle pointillé à la Figure 1.10) et les sites de liaison du Ca^{2+} ont disparu. On peut donc imaginer que la pompe avec ses deux ions Ca^{2+} liés ($E_1(2\text{Ca}^{2+})$ de la Figure 1.10 ou 1.11), attache l'ATP et connaît un premier changement de conformation (voir Figure 1.11, $E_1(\text{AMPPCP})$). Par la suite, la pompe se fait phosphoryler ce qui déclenche un changement de conformation majeur qui redresse l'hélice M5 qui relie le domaine catalytique au domaine membranaire.

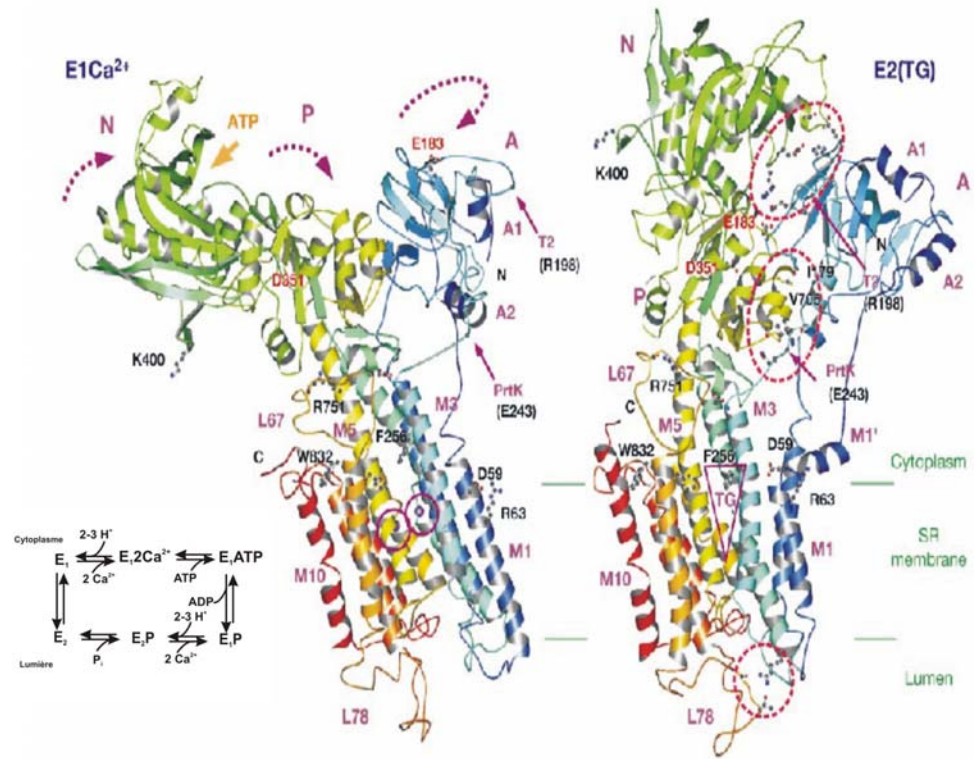


Figure 1.10 : Structures comparées de SERCA en présence de Ca^{2+} ($\text{E}_1\text{-}2\text{Ca}^{2+}$) et sans Ca^{2+} en présence de thapsigargine ($\text{E}_2\text{-TG}$).

Le médaillon représente son cycle d'activité. Tiré de (Toyoshima et Nomura, 2002).

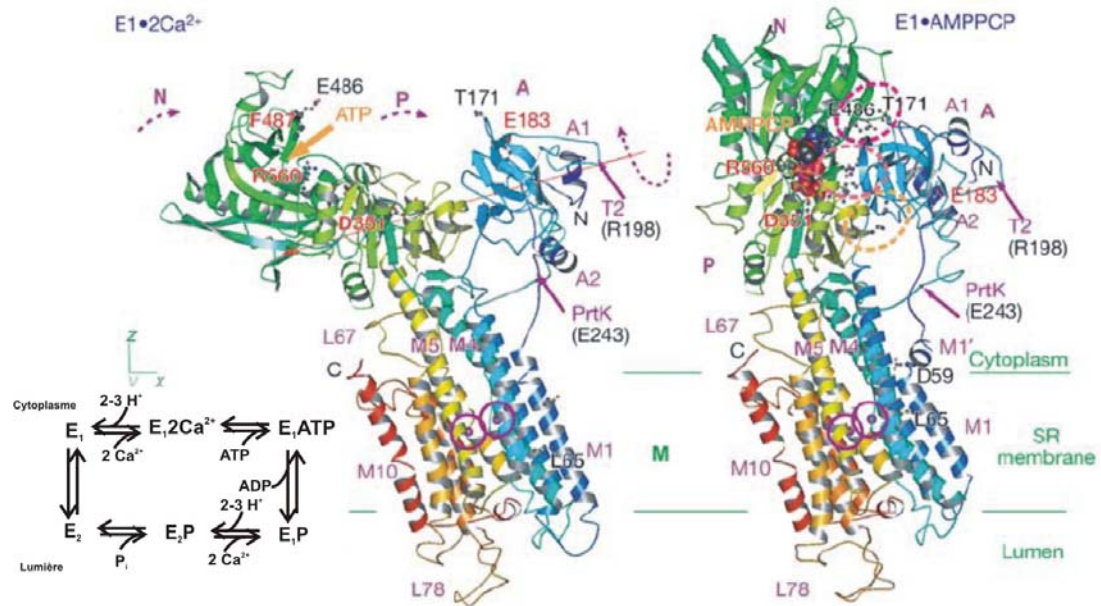


Figure 1.11 : Structures comparées de SERCA en présence de Ca^{2+} ($\text{E}_1\text{-}2\text{Ca}^{2+}$) et en présence d'un analogue d'ATP (AMPPCP) ($\text{E}_1\text{-AMPPCP}$).

Tiré de (Toyoshima et Mizutani, 2004).

Les sites pour le Ca^{2+} se détruisent en libérant le Ca^{2+} dans la lumière avant que le pore ne se referme et que la pompe n'adopte la conformation E_2 qui est possiblement similaire à la conformation cristallisée $\text{E}_2(\text{TG})$ (voir Figure 1.10).

La séquence de mouvement de la pompe qui est solidement appuyée par les différentes structures 3D montre de façon spectaculaire un mécanisme d'action qui peut avoir des points communs avec les changements de conformation d'un cotransporteur. On note surtout que des changements majeurs ont lieu dans le domaine catalytique cytosolique et que ces ceux-ci entraînent des changements plus modestes dans le domaine membranaire qui font ouvrir et fermer des pores d'accès et qui créent ou défont des sites de liaison.

1.3 Canal ou transporteur?

Cette revue des divers aspects fonctionnels et structuraux des protéines membranaires nous amène à une question fondamentale : existe-t-il une différence entre un canal et un

transporteur ou une pompe? Est-ce que leurs différences fonctionnelles nécessitent une différence dans les caractéristiques structurelles?

Les transporteurs, les pompes et canaux possèdent tous des sites sélectifs pour des espèces ioniques. Ces sites, tel que nous l'avons vu plus haut à la section 1.1.3, sont formés d'atomes de même nature et se ressemblent énormément, qu'ils fassent partie d'un canal, d'un transporteur ou d'une pompe. Une seule différence d'un point de vue structurel est notable : leur position par rapport au milieu aqueux (Gouaux et Mackinnon, 2005). En effet, dans le canal KcsA, le filtre de sélectivité est très rapproché du milieu aqueux de part et d'autre de la membrane lorsque le canal est ouvert tandis que chez les transporteurs ou les pompes (transporteur de leucine et SERCA), ils sont enfouis dans la membrane, quelques fois sans accès détectable à l'eau d'un côté ou de l'autre de la membrane plasmique. Ils sont par ailleurs partiellement enfouis dans le cas de l'échangeur H^+/Cl^- (EcCIC). Cet accès limité des sites de liaison des ions au milieu aqueux est probablement déterminant quant à l'amplitude du flux d'ions qui a lieu dans ces protéines (Miller, 2006). De plus, la nature et le nombre des sites de liaison aux ions et aux substrats dans les transporteurs et les pompes déterminent la stoichiométrie de transport et l'affinité des ions/substrats pour leur site. Par exemple, il n'est pas surprenant que l'affinité apparente du transporteur de leucine pour son substrat dépende de celle du Na^+ puisque le Na^+ fait partie du site de liaison pour la leucine.

Par ailleurs, la structure d'EcCIC avait d'abord été publiée en tant que canal Cl^- . Pourquoi n'a-t-on pas vu en cette structure celle d'un transporteur plutôt que celle d'un canal? Après la publication de la structure du canal Cl^- (EcCIC) en 2002 (Dutzler *et al.*, 2002), le canal CIC-ec1 a été purifié et des mesures d'électrophysiologie ont été faites en bicouche lipidique (Accardi et Miller, 2004). Ce canal transportait bel et bien des ions Cl^- mais le potentiel d'inversion mesuré suggérait que CIC-ec1 transporte un contre-ion qui s'est révélé être un H^+ . Une étude de mutagenèse sur cet échangeur a démontré l'importance toute particulière des acides aminés E148 et E203 (Accardi et Miller, 2004). En effet, la mutation E148A transforme l'échangeur Cl^-/H^+ en vrai canal Cl^- . De plus, le mutant E203Q semble n'avoir perdu que partiellement sa dépendance en pH (Accardi *et al.*, 2005) tandis que le mutant E148A/E203Q la perd complètement. Ces mesures expérimentales ont permis de suggérer que le chemin de perméation soit différent pour les

ions Cl^- et les H^+ dans l'échangeur (Accardi *et al.*, 2005) et révélé la différence structurelle entre les canaux Cl^- et les échangeurs H^+/Cl^- . La famille des CIC contient de vrais canaux Cl^- (CIC-0, CIC-1, CIC-2), qui possèdent tous une valine en position 203. En position 203, un résidu glutamate est retrouvé dans tous les autres membres de la famille, qui seraient donc plutôt des échangeurs Cl^-/H^+ (CIC-ec1) avec une stœchiométrie de 2 Cl^- : 1 H^+ . Il a été proposé que le glutamate en position 148 soit responsable du «gating» des canaux Cl^- (Miller, 2006).

Cela nous amène à la seconde différence notable qui distingue les structures des canaux et les transporteurs : la présence de portes qui empêchent le passage des ions. De façon simplifiée, nous pourrions dire que les canaux pourraient ne posséder qu'une porte et les transporteurs ou les pompes doivent en posséder au moins deux, une du côté intracellulaire et l'autre du côté extracellulaire (Gadsby, 2004). Parler de la présence de deux portes distinctes est une autre façon de parler du modèle alternatif où les sites sont accessibles du côté intracellulaire ou extracellulaire mais pas des deux côtés à la fois. Cela nécessite donc une suite de changements de conformation à chaque cycle de transport. La nécessité d'un modèle alternatif chez les transporteurs provient de l'observation classique des effets des substrats trans. Si un site était simultanément accessible des deux côtés de la membrane, la présence d'un substrat trans ne pourrait que générer un effet compétitif sur le flux de substrat marqué provenant du côté cis. Or, il est bien connu que les substrats trans peuvent en fait stimuler le transport des substrats cis (voir Semenza *et al.*, 1984). De plus, la présence de deux portes chez les pompes et les transporteurs est primordiale pour que le transport contre un gradient électrochimique puisse se produire de façon efficace. En effet, si un site de liaison était accessible des deux côtés de la membrane à la fois, le flux de cet ion ou substrat s'effectuerait dans le sens de son gradient de potentiel électrochimique. Chez les canaux ioniques, ce n'est pas si simple puisque quoi qu'il soit admis que l'hélice S6 agisse en quelque sorte comme une porte empêchant ou permettant le passage des ions (Doyle *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2002a; Jiang *et al.*, 2003a), le filtre de sélectivité peut lui-même agir comme une sorte de porte (Blunck *et al.*, 2006; Cordero-Morales *et al.*, 2006a; Cordero-Morales *et al.*, 2006b). Cet aspect du «gating» des canaux ioniques fait encore objet de débats. L'écartement de l'hélice S6 vers l'extérieur du canal ouvre un chemin de perméation et donc, le passage des ions. Dans un canal, lorsque la porte est ouverte, les ions

peuvent passer sans que tout autre changement de conformation ne se soit nécessaire comme c'est le cas chez les transporteurs, dans lesquels les portes doivent s'ouvrir et se fermer à chaque cycle de transport (à chaque «turnover»). Cela se traduit par une plus grande énergie d'activation chez ceux-ci que chez les canaux ($E_a \sim 25$ kCal/mol pour SGLT1 (Hazama *et al.*, 1997) vs. $\sim 2-7$ kCal/mol pour les canaux (Tseeb *et al.*, 1991; Berneche et Roux, 2001; Hille, 2001)). Cette caractéristique structurelle aura elle aussi certainement un effet sur une caractéristique fonctionnelle, la rapidité du flux ionique. Il est à noter que le flux a longtemps été considéré comme une caractéristique spécifique permettant de distinguer les canaux des transporteurs, les canaux laissent passer des millions d'ions par seconde tandis que les transporteurs ont des flux beaucoup moins importants (100 à 10000 molécules par seconde). Ce seul critère pose vraisemblablement un problème pour différencier les structures d'un canal dont le flux d'ions est faible, comme le mutant E166A de CIC-0 (10 000 000 ions/sec) (Dutzler *et al.*, 2003), d'un transporteur ayant un flux d'ions élevé, mutant E148A de CIC-ec1 (100 000 ions/sec) (Accardi *et al.*, 2004; Accardi et Miller, 2004).

Il est maintenant clair que la différence entre un canal et un transporteur est plus subtile qu'il n'y paraissait il y a 10 ou 20 ans. Leurs sites de liaison aux ions ont des caractéristiques communes mais leur accessibilité au solvant diffère. Les canaux peuvent ne posséder qu'une porte pour contrôler le flux ionique tandis que les transporteurs doivent en posséder deux, pour gérer l'accès aux sites de liaison des ions/substrats. Nous constaterons probablement qu'il existe un quasi-continuum entre ces deux catégories de protéines membranaires. La famille des CIC, canaux Cl^- et échangeurs H^+/Cl^- , est un bel exemple de ce continuum puisque la mutation d'un seul acide aminé suffit à transformer un échangeur en canal ionique.

Cette brève revue des données structurales publiées depuis 1998 sur les différents types de protéines membranaires permet de cerner l'influence des connaissances acquises sur d'autres protéines membranaires sur les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse de doctorat et de les aborder dans un contexte plus large qui est la compréhension des mécanismes de fonctionnement des protéines membranaires. Avant de présenter nos travaux, nous allons nous inspirer des concepts qui y ont été traités afin de nous créer une

image moléculaire de la structure de SGLT1. Mais d'abord, entrons dans le vif de notre sujet, le cotransporteur Na^+ /glucose SGLT1.

1.4 Le cotransporteur Na^+ /glucose (SGLT1)

Nous allons aborder dans cette section les aspects les plus fondamentaux concernant SGLT1 : sa topologie, ses aspects moléculaires et physiologiques, la nature des sites de liaison pour les ions Na^+ , le glucose et la phlorizine. Nous allons aussi aborder des sujets plus spécifiques qui nous aideront à mieux situer le travail effectué durant cette thèse dans leur contexte : le rôle des cystéines endogènes, les courants transitoires et le modèle cinétique. Ensuite, nous présenterons en détails les plus récentes études de fluorométrie en condition de voltage imposé sur les mutants Q457C et D454C. Nous commencerons d'abord par un bref survol historique.

1.4.1 Bref survol historique

Dans les années 1960, Crane a postulé que le gradient des ions Na^+ de part et d'autre de la membrane apicale des cellules épithéliales de l'intestin jouait un rôle dans le transport du D-glucose (Crane, 1965). Le transport de D-glucose couplé au Na^+ de l'intestin grêle fut le premier système reconnu en tant que transport secondairement actif.

De 1974 jusqu'au milieu des années 1980 (Murer et Hopfer, 1974; Semenza *et al.*, 1984), la majorité des études du cotransporteur de Na^+ /glucose se faisaient sur des vésicules de membranes de bordures en brosse (BBMV) provenant de l'intestin grêle ou du rein. De nombreux laboratoires ont développé des approches telles : 1) la solubilisation/reconstitution (Crane *et al.*, 1976), 2) le marquage semi-sélectif (Klip *et al.*, 1980), 3) la purification négative (Klip *et al.*, 1979), 4) le marquage par photo-affinité (Gibbs *et al.*, 1982), 5) la solubilisation et l'isolation utilisant les anticorps monoclonaux (Schmidt *et al.*, 1983) et 6) l'inactivation par radiation des membranes en bordure en brosse (Turner et Kempner, 1982). Leur but principal était l'identification moléculaire du transporteur de Na^+ et de glucose et la détermination de son poids moléculaire. La faible densité de transporteurs (de 7-30 pmol/mg protéines pour les membranes rénales à 50-250

pmol/mg protéines pour les membranes de l'intestin grêle), l'hétérogénéité des systèmes et le fait que les résultats étaient souvent non reproductibles furent autant de difficultés rencontrées pour la majorité des laboratoires. Les poids moléculaires estimés variaient donc de 52 kDa (Ducis et Koepsell, 1983) à 165 kDa (Malathi *et al.*, 1980; Malathi et Preiser, 1983), mais au moins deux méthodes établirent un poids moléculaire de 72 kDa (Hosang *et al.*, 1981; Schmidt *et al.*, 1983) pour le cotransporteur.

La compréhension complète du mécanisme de fonctionnement du cotransporteur Na^+ /glucose requiert l'identification des acides aminés formant les sites de liaison pour le Na^+ , le glucose, la Pz ainsi que celle des changements de conformation qui se produisent lors du transport des substrats. Certains groupes ont étudié l'effet d'agents pharmacologiques connus pour leurs propriétés réactives (spécifique aux thiols, aux résidus arginine, lysine, phénylalanine ou tyrosine) mais le glucose, la Pz ou même le Na^+ ont eu peu d'effets de protection. En effet, on peut penser que si un des substrats du cotransporteur protège contre un effet observé, le(s) acide aminé(s) affecté(s) par l'agent réactif ne peuvent être que dans le site de liaison lui-même ou être essentiel pour engendrer un changement de conformation qui protège ce site lorsque le(s) substrat(s) est présent. Malheureusement, ces essais n'ont pas fourni d'informations très précises sur la nature des résidus formant les sites de liaisons pour les substrats de SGLT1.

Certaines caractéristiques fonctionnelles du transporteur avaient aussi été évaluées. Par exemple, le transporteur discrimine entre le D-glucose versus le L-glucose. La valeur de l'affinité apparente pour le D-glucose a été mesurée entre 0.1 à 2 mM selon le système utilisé, indépendante du pH entre 6.5 et 9.5 mais 5 fois plus grande à pH 5.5 (Kessler *et al.*, 1978; Toggenburger *et al.*, 1978; Kessler et Semenza, 1983). La phlorizine (Pz), inhibiteur compétitif non transporté de ce système de transport du glucose, est également connu depuis les années 1960 (Giraldez et Larralde, 1960; Diedrich, 1961) et sa constante d'inhibition était évaluée à 4-10 μM . Par ailleurs, l'absence d'effet du voltage sur le taux de dissociation de la Pz sur le transporteur a emmené Toggenburger et ses collègues (Toggenburger *et al.*, 1978) à poser l'hypothèse que le complexe Pz-Na^+ -cotransporteur soit neutre.

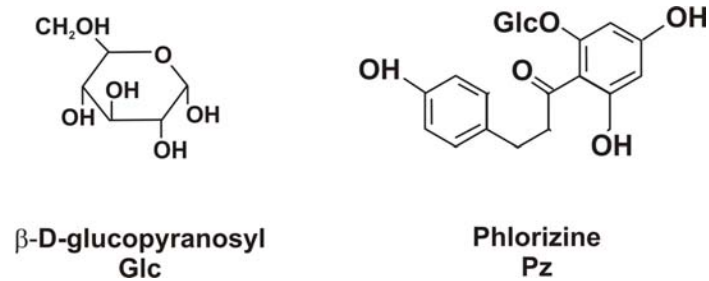


Figure 1.12 : Structure chimique du β -D-glucopyranosyl (Glc) et de la phlorizine (Pz).

Un des problèmes majeurs des systèmes de vésicules des BBMV était la possibilité de la coexistence de transporteurs ayant des caractéristiques différentes (telles que des stœchiométries Na^+ : glucose soit de 1:1 soit de 2:1) avec des proportions diverses dans les organes étudiés. En effet, dans l'intestin grêle, la dépendance en Na^+ extracellulaire de l'influx de glucose est hautement sigmoïdale ce qui suggère une stœchiométrie de $2 \text{Na}^+ : 1$ glucose. Pourtant, en présence d'un gradient de voltage, cette sigmoïdité n'était pas observée. L'existence de deux cotransporteurs ayant des stœchiométries distinctes, ainsi que des affinités pour le glucose et la Pz différentes pouvait expliquer la variabilité des résultats dans les différents laboratoires à cette époque.

Il fallut attendre la fin des années 1980 (Lapointe *et al.*, 1986) et le clonage de SGLT1 par expression dans les ovocytes de *Xenopus laevis* (Hediger *et al.*, 1987) pour que des premières études en électrophysiologie soient effectuées (Umbach *et al.*, 1990; Parent *et al.*, 1992a, b; Panayotova-Heiermann *et al.*, 1994; Panayotova-Heiermann *et al.*, 1995). Depuis le clonage, de nombreuses études de mutagenèse et de caractérisation en électrophysiologie ont eu pour but d'établir la nature moléculaire des sites de liaison des ions Na^+ et du glucose (Panayotova-Heiermann *et al.*, 1996; Panayotova-Heiermann *et al.*, 1997; Panayotova-Heiermann *et al.*, 1998; Panayotova-Heiermann *et al.*, 1999; Panayotova-Heiermann et Wright, 2001; Quick *et al.*, 2001) et seront abordés plus loin.

La topologie des 664 acides aminés de SGLT1 (donc un poids moléculaire d'environ 75 kDa) établissant les portions de la protéine enfouies dans la membrane ou exposées aux milieux extra- et intracellulaire, a d'abord été établie par le profil d'hydrophobicité dès le clonage (Hediger *et al.*, 1987) et fut modifiée par la suite (Hediger *et*

al., 1987; Hirayama et Wright, 1992; Turk *et al.*, 1994, 1996 ; Turk et Wright, 1997). La topologie avec 14 STM a été proposée en 1996 par Turk *et al.* et n'a été contestée (Lin *et al.*, 1999) que tout récemment. La structure tridimensionnelle de SGLT1 ainsi que l'assemblage des STM sont inconnus.

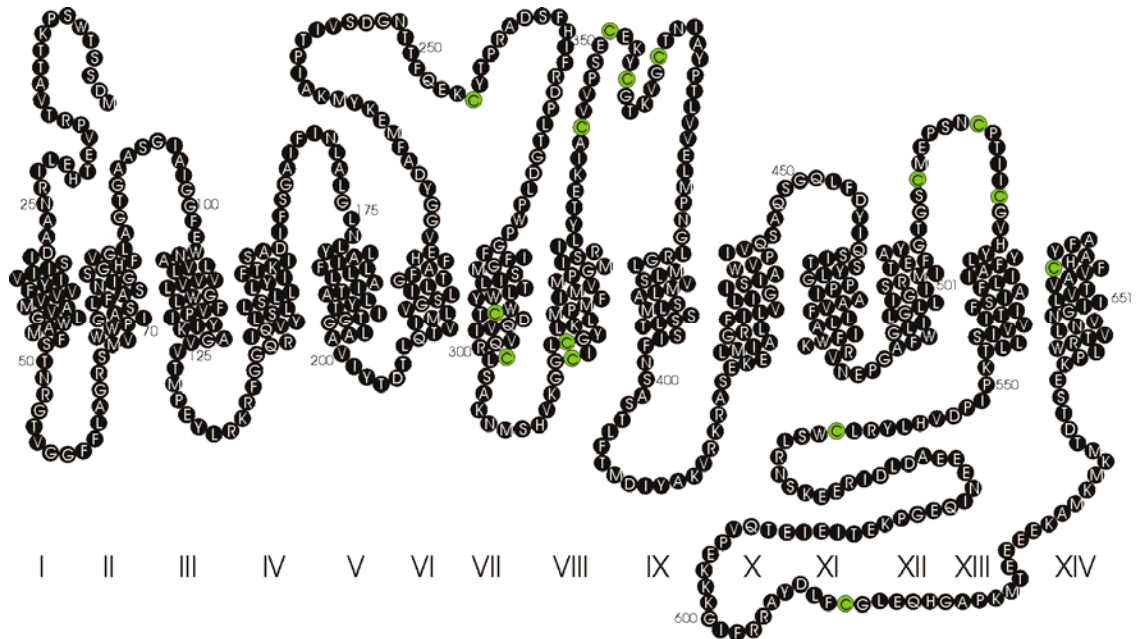


Figure 1.13 : Topologie membranaire du cotransporteur Na^+ /glucose SGLT1.

Des chiffres indiquent la position des acides aminés, qui sont représentés par des cercles noirs avec le symbole à une lettre des acides aminés. Les cystéines endogènes sont représentées par des cercles verts.

Dès 1992, un modèle cinétique de transport fut proposé pour expliquer les divers aspects du mécanisme de fonctionnement de SGLT1 (Parent *et al.*, 1992b), connus ou non avant son clonage. Plus tard, le modèle cinétique a évolué grâce à une technique électrophysiologique à résolution temporelle extrêmement précise par rapport au phénomène étudié ($0.2 \mu\text{s}$), le «cut-open» ovocyte (Chen *et al.*, 1996). Le modèle proposé par Chen et ses coauteurs comportait un état intermédiaire entre les états du transporteur vide faisant face au milieu intra- et extracellulaire tel que proposé par Parent et ses coauteurs (1992b). Cela fut confirmé par d'autres études sur l'isoforme de lapin par Krofchick et ses coauteurs (Krofchick et Silverman, 2003; Krofchick *et al.*, 2004) et plus récemment, sur l'isoforme humain (Loo *et al.*, 2005).

Par ailleurs, il convient de noter dans un bref historique de SGLT1 une idée originale de Loo et ses coauteurs (1996) qui a marqué le domaine du transport épithélial. L'idée était que SGLT1 effectuait un transport secondairement actif de 2 Na⁺ par molécule de glucose et que 250 molécules d'eau étaient entraînées dans le processus. C'est l'hypothèse de l'existence d'un transport secondairement actif d'eau. L'existence des aquaporines et leur rôle dans le transport de l'eau à travers les membranes lipidiques ont été démontrés brillamment depuis maintenant un peu plus d'une décennie (Zeidel *et al.*, 1992; Verkman et Mitra, 2000; Agre et Kozono, 2003; Verkman, 2005). Dans les années 1990, l'hypothèse du cotransport actif de l'eau par des protéines membranaires a été soulevée, puis a été appuyée par plusieurs articles concernant entre autre SGLT1 et d'autres cotransporteurs couplés au Na⁺ (Loo *et al.*, 1996; Meinild *et al.*, 1998; Meinild *et al.*, 2000; MacAulay *et al.*, 2001). Cette hypothèse venait briser un dogme bien établi en biologie, soit celui que l'eau ne puisse diffuser que passivement à travers une membrane i.e. sous l'effet d'un gradient osmotique ($\Delta\pi$) et/ou hydrostatique (ΔP). Les mesures expérimentales qui pouvaient corroborer l'hypothèse du cotransport actif étaient : 1) un gonflement cellulaire rapide sous l'effet du transport de soluté chez les cotransporteurs, plus rapide que celui engendré par des canaux ioniques tels la gramicidine ou les canaux K⁺ (ROMK), 2) la stœchiométrie du transport dépend du cotransporteur, 3) l'énergie d'activation du «cotransport d'eau» et du cotransport de Na⁺/glucose sont similaires et 4) le transport d'eau est possible contre un gradient osmotique. De plus, la phlorizine inhibe ce «cotransport». Pourtant, tous ces arguments peuvent être discutés et réinterprétés selon l'hypothèse d'accumulation locale de solutés engendrée par SGLT1 (Duquette *et al.*, 2001; Lapointe *et al.*, 2002; Gagnon *et al.*, 2004; Charron *et al.*, 2006). En effet, à chaque cycle de transport, SGLT1 enrichit le milieu intracellulaire de 2 ions Na⁺ et d'une molécule de glucose. Tous les résultats expérimentaux ont pu être expliqués par un modèle de diffusion intracellulaire des ions et du glucose. Le cotransport actif d'eau n'est pas nécessaire pour expliquer le gonflement cellulaire associé à l'activation de SGLT1.

1.4.2 La topologie de SGLT1

Après le clonage de SGLT1, un premier modèle topologique basé sur la méthode d'Eisenberg a été proposé : il comportait 12 segments transmembranaires et les extrémités amino et carboxy terminales se situaient respectivement du côté cytoplasmique et extracellulaire (Hediger *et al.*, 1987). Un site de glycosylation naturel et non-essentiel pour la fonction de SGLT1 fut identifié en position 248 (Hediger *et al.*, 1991), ce qui concordait avec la localisation extracellulaire de la boucle entre les STM 6 et 7 actuels où se trouve l'Asp248. En 1994, une étude sur les exons de SGLT1 a suggéré des modifications à ce modèle topologique : un segment transmembranaire a été ajouté et l'extrémité carboxy terminale fut placée du côté intracellulaire (Turk *et al.*, 1994). Une étude d'insertion de sites de glycosylation dans la séquence protéique de SGLT1 a aussi nécessité des modifications à ce modèle (Turk *et al.*, 1996). Les auteurs ont créé 13 mutants dans lesquels 42 acides aminés, qui contiennent un site de glycosylation, ont été insérés à différents endroits. Dix de ces 13 mutants étaient complètement non fonctionnels, ce qui soulève un doute quant à l'interprétation de certains de leurs résultats. Du moins, des trois mutants fonctionnels, deux portaient cette insertion tout près de l'extrémité amino terminale (en positions 2 et 23) et le troisième la portait près du STM 13 actuel (en position 518) et tous furent glycosylés. Ces résultats supportaient la position extracellulaire de ces trois positions. Le modèle fut donc modifié, deux STM ont été ajoutés, l'un près de l'extrémité amino terminale et l'autre près de l'extrémité carboxy terminale (Turk *et al.*, 1996). Il est actuellement accepté comme le meilleur modèle pour les transporteurs de la famille SGLT et comporte 14 STM, tel qu'illustré à la Figure 1.13 (Turk et Wright, 1997).

1.4.3 Aspects moléculaires et physiologiques

SGLT1 est exprimé dans les cellules de bordure en brosse des épithélia de l'intestin (Hediger *et al.*, 1987) et du rein (Coady *et al.*, 1990), principalement dans l'intestin grêle et dans tubule proximal. La présence de son ARNm (et hypothétiquement de la protéine active) est aussi détectable dans le cœur, la trachée, les testicules et la prostate (Zhou *et al.*, 2003). Dans l'intestin, son rôle principal reste l'absorption du glucose provenant de l'alimentation. Dans le rein, il effectue la réabsorption du glucose du sang, qui est filtré par

les néphrons et qui retournera dans l'organisme. Dans les autres types cellulaires, on croit que sa présence peut être importante afin d'absorber du milieu extracellulaire le glucose lorsqu'il n'est présent qu'en très petite quantité.

L'énergie du potentiel électrochimique du Na^+ , provenant du gradient de concentration et du potentiel membranaire, permet d'effectuer ce travail de façon très efficace. La concentration de glucose dans le plasma est régulé autour de 5 mM et comme sa sortie des cellules rénales ou intestinales est passive, le glucose intracellulaire doit être égal ou au dessus de 5 mM. La pompe Na^+/K^+ ATPase basolatérale maintient le gradient des ions Na^+ et le glucose est transporté passivement à travers la membrane basolatérale par des transporteurs facilités de glucose de la famille des GLUT vers le sang (pour revues voir Brown, 2000; Wood et Trayhurn, 2003).

1.4.3.1 SGLT1, SGLT2 et SGLT3

Il existe trois transporteurs de Na^+ et de glucose parmi la famille SLC5 : SGLT1, SGLT2 et SGLT3. SGLT1 et SGLT2 sont exprimés principalement dans le rein et l'intestin et se distinguent par leur stœchiométrie : SGLT1 utilise deux ions Na^+ par molécule de glucose et SGLT2 utilise un ion Na^+ par molécule de glucose. Leur affinité pour le substrat est très différente : SGLT1 a une haute affinité pour le glucose (~ 0.4 mM chez l'isoforme humain) tandis que SGLT2 a une faible affinité (2 mM). Ces deux membres de la famille SLC5 ont environ 75% d'identité dans leur séquence en acides aminés. Peu de travaux en électrophysiologie ont été faits sur SGLT2 puisque son expression dans les ovocytes de *Xenopus* est faible (Mackenzie *et al.*, 1996). SGLT3 a fait l'objet d'une controverse puisque sa fonction s'avère différente selon l'espèce, et le type cellulaire dans laquelle il se trouve, et ce, malgré sa forte identité avec SGLT1 (hSGLT3 est 70% identique à hSGLT1). L'isoforme du porc semble avoir une fonction similaire à SGLT1, celle de transporter du glucose (K_m^{glc} 6 mM, voir Tableau I.I) en utilisant le gradient électrochimique du Na^+ et ce, avec la même stœchiométrie que SGLT1 (Chen *et al.*, 1995; Diez-Sampedro *et al.*, 2001). Par contre, chez l'isoforme SGLT3 humain, il n'y a pas de transport de glucose, malgré que le transport de Na^+ soit toujours présent et stimulé par le glucose de façon dose-dépendante. L'affinité pour le glucose telle que mesurée par le déplacement du potentiel membranaire

causé par le glucose serait de 19 mM (hSGLT3) et la protéine semble s'exprimer dans les nerfs de l'intestin et du muscle squelettique où il agirait comme senseur de glucose afin de réguler l'activité musculaire.

Tableau I.I : Caractéristiques fonctionnelles de hSGLT1, hSGLT2 et pSGLT3. Tiré de (Wright, 2001).

	hSGLT1	hSGLT2	pSGLT3
$K_{0.5}^{\text{D-glucose}}$ (mM)	0.4	2	6
$K_{0.5}^{\text{Na}^+}$ (mM)	3	100	1.5
K_i^{Pz} (μM)	0.22	1	9
Couplage ($\text{Na}^+:\text{glucose}$)	2	(1)	2
Sélectivité des sucres	D-glc~D-gal	D-glc»D-gal	D-glc»D-gal
Na^+ leak	oui	non	oui
Nombre d'acides aminés	664	672	659

1.4.3.2 Syndrome de malabsorption du glucose et du galactose (GGM)

Le syndrome de malabsorption du glucose et du galactose (GGM) est une maladie génétique puisqu'il est dû à un mauvais fonctionnement du cotransporteur de Na^+ et de glucose SGLT1. Le syndrome GGM est un désordre génétique récessif associé à des symptômes graves tels la diarrhée et la déshydratation, qui peuvent causer la mort chez les patients atteints si le glucose et le galactose ne sont pas complètement éliminés de leur alimentation (pour revue voir, Wright *et al.*, 2002). Les sucres simples tels le glucose et le galactose proviennent de la dégradation du lactose du lait par un enzyme dans l'intestin. Ces sucres sont ensuite transportés dans les cellules par SGLT1 puis dans le sang via les GLUT et l'eau est absorbée parallèlement à l'absorption des sucres pour le maintien de

l'osmolarité des cellules. Lorsque SGLT1 ne fonctionne pas, les sucres et l'eau restent dans l'intestin et causent ainsi la diarrhée, c'est dire l'importance physiologique de SGLT1.

Le GGM chez l'homme a permis d'identifier des mutations dans SGLT1 qui engendrent une forte diminution de l'activité de la protéine souvent mais pas toujours associée à mauvais acheminement à la membrane plasmique (Turk *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1996a, b; Lam *et al.*, 1999; Wright *et al.*, 2002). Plus de 30 mutations ont été identifiées dans les gènes de plusieurs familles de patients atteints du syndrome. La majorité de ces mutations sont des mutations ponctuelles qui modifient la nature d'un acide aminé pour un autre (ex : D28N, A166T, C292Y, C255W, D273G, C355S, Q457R, pour ne nommer que celles-là). Il existe aussi un petit nombre de mutations qui modifient le cadre de lecture ou introduisent un codon stop et donc, engendrent une protéine incomplète et/ou qui n'est pas acheminée à la membrane plasmique par le système des vésicules de transport et/ou qui n'est pas fonctionnelle.

1.4.3.3 Syndrome familial de glucosurie rénale (FRG)

Le syndrome familial de glucosurie rénale est quant à lui associé au gène codant pour SGLT2 (Calado *et al.*, 2004, 2006; Francis *et al.*, 2004; Kleta *et al.*, 2004; Magen *et al.*, 2005). La glucosurie rénale se caractérise par une excrétion excessive de glucose dans l'urine malgré une glycémie normale. L'identification de patients atteints ayant des mutations dans ce gène (ex : K321R, A102V, T200K, N654S) a prouvé hors de tout doute l'importance du rôle de SGLT2 dans la physiologie rénale et son implication dans cette pathophysiologie.

Jusqu'à présent, aucun patient présentant une pathologie impliquant des mutations dans le gène de SGLT3 n'a été identifié. Nous pouvons parier quant à l'importance d'une telle découverte future pour la compréhension de son rôle exact.

1.4.3.4 Site de liaison pour le glucose, la Pz et les ions Na⁺

Nous en savons relativement peu sur les sites de liaison des ions Na⁺, du glucose et de la phlorizine. Panayotova-Heiermann et ses coauteurs (1996) ont d'abord remarqué

qu'une enzyme pouvait couper l'ADN de SGLT1 à peu près en son centre. Ils ont exprimé la portion carboxy terminale dans les ovocytes de *Xenopus* et ils ont remarqué de façon totalement inattendue que la perméabilité au glucose était très significativement augmentée par rapport à celle mesurée chez les ovocytes non-injectés (20 fois plus grande) avec une certaine sélectivité (α MG > D-glucose > D-galactose >> L-glucose \approx D-mannose). Le transporteur tronqué se comportait comme une perméase qui laissait passer le glucose mais aussi le mannitol (un composé neutre normalement non transporté par SGLT1) de façon indépendante des ions Na⁺. De plus, le transport de sucres dans ce pore était inhibé par la phlorétine (un inhibiteur des GLUT) tandis que l'inhibition par la Pz était totalement éliminée par cette troncation. Ces auteurs ont conclu que le site de liaison du glucose de SGLT1 était située dans la portion carboxy terminale de la protéine (Panayotova-Heiermann *et al.*, 1996, 1997). Ces caractéristiques fonctionnelles (l'absence de dépendance pour les ions Na⁺, la perméabilité au mannitol, l'inhibition par la phlorétine et non par la Pz) sont si différentes de celles de SGLT1 qu'un doute peut être soulevé sur la signification donnée par le groupe de Wright à ce résultat, notamment que le site de liaison du glucose se situe dans la portion carboxy terminale de la protéine. Par ailleurs, le résidu Q457 semble quant à lui important dans le transport de glucose car lorsqu'il est muté en arginine (mutant Q457R) il engendre le syndrome GGM quoique la protéine soit correctement acheminée à la membrane plasmique (Wright *et al.*, 2002). L'affinité pour le glucose du mutant Q457C est largement perturbée : elle serait de 6 mM selon les expériences en électrophysiologie (Loo *et al.*, 1998) et de 38 mM selon les expériences de fluorescence avec la sonde TMR6M (Meinild *et al.*, 2002) (sur lesquelles nous reviendrons plus loin dans la section 1.4.7) i.e. au moins un ordre de grandeur plus élevée que celle du wt SGLT1 humain. Les agents oxydants MTSET, MTSES et MTSEA abolissent le transport de glucose dans le mutant Q457C de même que le fluorophore TMR6M, ce qui indique que la présence d'un groupement d'atomes supplémentaire à cet endroit empêche le transport de glucose, et que cela n'a pas de lien avec la charge de ce groupement. La présence d'une charge en position 454 semble aussi être importante pour le transport de glucose puisque la mutation D454C produit une réduction de 97% du transport de sucre, de 95% de la charge transférée, mais n'a eu que peu d'effet sur l'affinité pour l' α MG (0.6 mM), telle que mesurée avec le changement de fluorescence encouru par le TMR6M

attaché à cette position en fonction de la concentration d' α MG (Diez-Sampedro *et al.*, 2004). Cependant, la réaction du MTSES (mais non du MTSET) sur cette cystéine nouvellement introduite a causé une augmentation modeste du transport de sucre (Diez-Sampedro *et al.*, 2004). Par ailleurs, lorsque l'acide aminé D454 est muté en histidine, il semble que la stoechiométrie du transport soit de 3 Na⁺ : 1 glucose à pH 5.5 et de 2 Na⁺ : 1 glucose à pH 7.5, suggérant que cet acide aminé soit important dans le couplage Na⁺/glucose (Diez-Sampedro *et al.*, 2004). Bref, le site de liaison du glucose n'est pas établi hors de tout doute mais pourrait être situé près du résidu Q457 dans hSGLT1.

D'autre part, Novakova et ses coauteurs (2001) ont quant à eux formulé l'hypothèse que les résidus 604 à 610 formaient une partie du site de liaison de la phlorizine. Cette hypothèse fut formulée à partir de résultats de mutagenèse de résidus de la boucle entre les segments transmembranaires 13 et 14, faites dans SGLT1 de lapin exprimé dans des cellules COS-7. Ils ont déterminé que leurs mutations affectaient le K_i^{Pz} sans affecter le $K_m^{\alpha MG}$. Pour corroborer leur hypothèse, ils ont ensuite isolé et purifié un peptide d'une centaine d'acides aminés correspondant à cette boucle de SGLT1 de lapin (Raja *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2004). Ils ont mesuré la fluorescence des tryptophanes présents dans leur peptide en présence et en absence de Pz. Comme la présence de Pz perturbait la fluorescence des tryptophanes, ils ont conclu à une interaction démontrant une affinité de 23 μ M pour la boucle wt et de 57 μ M pour la boucle mutante G609K. La Pz possède une moitié identique au glucose et deux anneaux aromatiques reliés par un alkyl (voir Figure 1.12). Comme l'inhibition produite par la Pz est compétitive par rapport au glucose, il est fort probable que son site de liaison soit formé en partie par le site de liaison du glucose et d'une autre région de SGLT1. À notre avis, les indications que les résidus 604 à 610 forment le site de liaison de la Pz sont faibles et il nous semble un peu naïf et certainement prématuré de croire que le site de liaison de la Pz est conservé lorsque la boucle 13-14 est exprimée en absence du reste de la protéine.

Lo et Silverman (1998a) ont d'abord spéculé que les acides aminés formant la boucle extracellulaire entre les segments transmembranaires IV et V (résidus 162 à 173) forment le site de la liaison des ions Na⁺ et participeraient à la sensibilité au voltage membranaire. Ils ont mesuré des modifications dans la valeur du $K_m^{\alpha MG}$ chez certains

mutants (F163C 0.58 mM, A166C 0.90 mM, T172C 0.35 mM vs. 0.15 mM pour wt rSGLT1) sans tester si ces modifications étaient dues à un changement dans l'affinité apparent pour les ions Na^+ . Il serait en effet attendu qu'une mutation qui met en jeu des résidus formant directement le site de liaison du Na^+ modifie l'affinité apparente pour cet ion et, de façon indirecte l'affinité pour le glucose. Par ailleurs, certains de leurs mutants se sont montrés sensibles aux réactifs MTS : le I_{cotr} de F163C et A166C est inhibé par le MTSEA et le I_{leak} de L173C est inhibé par MTSEA. Leur courbe de charge transférée (courbe Q-V) est aussi déplacée de -10 à -18 mV par la présence d'une charge positive (MTSEA) sans que la pente de la courbe soit affectée. La spéculation concernant le rôle de cette boucle dans la formation du site de liaison pour les ions Na^+ a été reprise et admise comme un fait établi dans une étude subséquente de ce groupe (Huntley *et al.*, 2004). Il nous apparaît incroyable que l'on puisse prétendre qu'un segment de SGLT1 soit impliqué dans le site de liaison du Na^+ sans jamais avoir montré les effets de mutations dans cette région sur l'affinité même du Na^+ . Il nous semble que d'autres mutations ont montré des effets importants sur l'affinité au Na^+ . Par exemple, la neutralisation du résidu K321 dans le STM VIII de SGLT1 engendre une réduction dramatique du transport de glucose, une modification de l'affinité apparente pour le Na^+ (70 vs. 3 mM, chez SGLT1 de lapin) ainsi qu'un déplacement de +50 mV la courbe de charge transférée (Panayotova-Heiermann *et al.*, 1998). Les auteurs ont conclu que ce résidu participait directement ou indirectement à l'établissement de l'affinité pour les ions Na^+ . En bref, les tentatives expérimentales ayant pour but d'établir la nature exacte des résidus qui participent au site de liaison des deux ions Na^+ n'y sont pas encore parvenues de façon persuasive.

1.4.4 Les cystéines endogènes

Les résidus cystéines peuvent jouer généralement un rôle important dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle des protéines (Voet et Voet, 1998, voir aussi section 7.2 de la discussion). La proximité de deux résidus cystéines en conditions oxydantes peut donner lieu à un lien covalent extrêmement fort entre les deux groupements (-SH) des cystéines : le pont disulfure. Cette liaison covalente aura lieu lors du repliement de la protéine, dans le réticulum endoplasmique, où l'environnement est justement oxydant.

Ce lien covalent maintient la structure de protéines et se situe généralement du côté extracellulaire puisque le cytoplasme est un milieu plutôt réducteur. Certains réactifs réducteurs peuvent être utilisés pour briser les ponts disulfures : le dithiothréitol (DTT), l'acide performique, le 2-mercaptoéthanol, le tris(2-carboxyéthyl)phosphine hydrochloride (TCEP). Par ailleurs, le groupement (-SH) hautement réactif, lorsqu'il est hydraté, peut réagir avec différents composés qui contiennent un groupement (-SH) libre comme les réactifs méthaneithiosulfonate (MTS).

L'étude des résidus cystéines de différents transporteurs tels le cotransporteur Na^+/P_i et le transporteur de sérotonine a mené à l'identification de pont disulfure (J.G. Chen *et al.*, 1997a; Sur *et al.*, 1997; Lambert *et al.*, 2000a, b) et a permis de comprendre le rôle de certains résidus cystéines dans le bon acheminement à la membrane plasmique du transporteur d'anions organiques et du cotransporteur $\text{Na}^+/\text{dicarboxylate}$ (Pajor *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2004). Il était clair pour les transporteurs de Na^+/P_i et de $\text{Na}^+/\text{dicarboxylate}$ qu'ils ne pourraient être fonctionnels sans leurs cystéines endogènes mais ce n'est pas le cas de toutes les protéines membranaires. La lactose perméase (van Iwaarden *et al.*, 1991), la sucrose perméase (Sahin-Toth *et al.*, 2000), la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase (Hu *et al.*, 2000), le canal K^+ *Shaker* (Boland *et al.*, 1994), ainsi que les canaux de jonction gap et NhaA (Bao *et al.*, 2004; Kuwabara *et al.*, 2004), sont complètement fonctionnels lorsque leurs cystéines endogènes sont remplacées, ou ne sont que faiblement affectés par comparaison avec la protéine sauvage.

En 1983, Turner et George ont étudié l'effet d'un agent réducteur (dithiothréitol, DTT) sur un cotransporteur $\text{Na}^+/\text{glucose}$ (probablement SGLT2 étant donné la stœchiométrie de 1:1 mentionnée par les auteurs) sur des BBMV du cortex externe de lapin (Turner et George, 1983, 1984). Les auteurs concluaient en l'existence d'au moins deux ponts disulfure importants pour la liaison de la Pz. Aucune étude de mutagenèse extensive n'a été faite sur les cystéines endogènes de SGLT1, ni de SGLT2 après leur clonage. Pourtant, certains résultats ont suggéré un rôle important de quelques-unes d'entre elles (Martin *et al.*, 1996b; Wright, 1998). Les trois mutations C255W, C292Y et C355S dans hSGLT1 engendrent le syndrome GGM. De plus, une hypothèse avait été formulée quant à la possibilité que les cystéines en positions 560 et 608 (dans SGLT1 lapin) puissent former

un pont disulfure entre elles dans la boucle entre les segments transmembranaires 13 et 14 isolée et purifiée (Xia *et al.*, 2003, 2004). À notre avis, il était prématuré de postuler que les deux cystéines formant un pont disulfure dans un peptide isolé d'une centaine d'acides aminés correspondant à la séquence d'une boucle de SGLT1 le fassent également dans la protéine entière. Les mutations C351A et C361A engendrent aussi un mauvais acheminement de SGLT1 à la membrane plasmique tandis que le double mutant C351A/C361A restaure le bon transport de la protéine jusqu'à la membrane (Xia *et al.*, 2005).

Ces divers éléments nous laissaient croire en l'importance des cystéines endogènes dans SGLT1. De plus, les résidus cystéines endogènes de SGLT1 semblent insensibles aux agents oxydants tels le N-éthylmaléimide (NEM) ou les réactifs méthane thiosulfonate (MTS) (MTSES, sodium (2-sulfonatoéthyl)méthane thiosulfonate, MTSET, [2-(Triméthylammonium) éthyl]méthane thiosulfonate bromide, MTSEA, 2-aminoéthyl méthane thiosulfonate hydrobromide), ce qui suggère que les cystéines sont physiquement inaccessibles à partir du milieu aqueux ou liées dans des ponts disulfure (Lo et Silverman, 1998; Loo *et al.*, 1998) et/ou que ces réactifs n'affectent pas la fonction de SGLT1 lorsqu'ils sont liés à un ou plusieurs cystéines endogènes.

1.4.5 Les courants transitoires

Chez un ovocyte de *Xenopus* non-injecté, lorsqu'un saut de V_m est appliqué à partir d'une valeur donnée (-50 mV), un large courant transitoire (I_c) est observé (Figure 1.14A). Le circuit électrique équivalent à un ovocyte contient une résistance et une capacitance. Le courant transitoire est donc dû à la charge ou la décharge de la capacité membranaire C_m . L'intégrale de ce courant transitoire tracée en fonction de la valeur de V_m appliquée sera linéaire et la pente représentera la capacité membranaire, puisque $I_c = C_m \frac{dV_m}{dt}$. Chez un ovocyte de *Xenopus*, la capacité membranaire est typiquement de l'ordre de 300-350 nF (ou environ $10 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ si l'on considère que le rayon moyen des ovocytes est de 0.5 mm). De plus, la vitesse de décroissance du courant, ou la constante de temps du courant capacitif,

sera directement dépendante de la vitesse à laquelle le V_m a été appliqué et sera de l'ordre de 0.5-2 ms en électrophysiologie en deux micro-électrodes.

Avec un ovocyte qui exprime le cotransporteur SGLT1, des courants transitoires sont aussi observés (Figure 1.14B) mais ils ne sont plus simplement linéaires en fonction du V_m appliqué et leur vitesse est significativement plus lente que la vitesse du saut de V_m . Ils ont été observés pour la première fois chez les ovocytes de *Xenopus* dans les années 1990 (Umbach *et al.*, 1990; Parent *et al.*, 1992a), ils sont dépendants de la présence de Na^+ et une concentration saturante de Pz ou de glucose les inhibe complètement. C'est pour ces raisons que le premier modèle cinétique basé sur les courants transitoires de SGLT1 postule que lors d'un changement de V_m disons de 0 mV vers une valeur négative, ils proviennent de 1) du changement de conformation dépendante du V_m qui amène les sites de liaison au Na^+ du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire et 2) de la liaison des ions Na^+ aux sites extérieurs du transporteur. Les courants transitoires sont caractérisés par leur constante de temps dépendante du V_m (τ -V) et par la courbe de charge transférée en fonction du V_m (Q-V). La quantité de charges transférées qui est mesurée lors d'un saut de voltage de -50 mV vers différents voltages (que l'on nomme Q_{ON} par analogie avec les charges de «gating» chez les canaux K_v), compris entre +75 mV et -175 mV par exemple, est aussi transférée lors du retour au voltage initial de -50 mV. Cette charge est nommée Q_{OFF} . Q_{ON} est donc toujours égale à Q_{OFF} . Lorsque la concentration des ions Na^+ extracellulaire est diminuée, l'amplitude des courants transitoires diminue, la constante de temps est modifiée et le $V_{1/2}$ (voir Figures 1.15 et 1.16), le V_m auquel la moitié de la charge est transférée est déplacée vers les V_m négatifs (Chen *et al.*, 1996). En absence de Na^+ extracellulaire, il est encore possible d'observer des courants transitoires, à des V_m beaucoup plus négatifs et avec des constantes de temps plus rapides (Chen *et al.*, 1996).

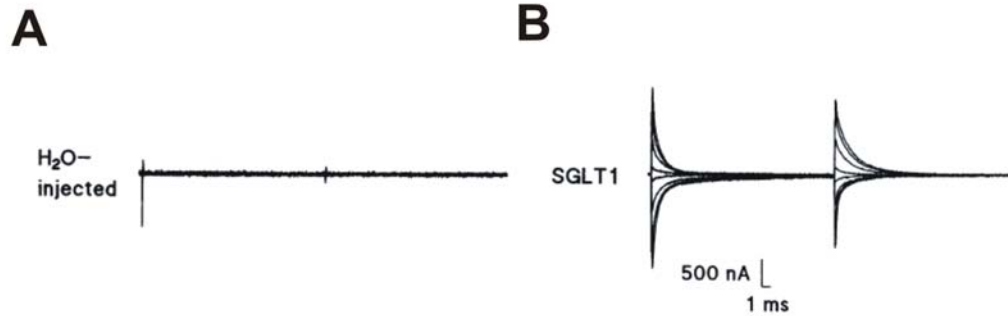


Figure 1.14 : Courants transitoires sensibles à la Pz chez un ovocyte injecté à l'eau (A) et chez un ovocyte exprimant SGLT1 (B).

La soustraction effectuée pour obtenir les courants sensibles à la Pz permet d'éliminer les courants capacitifs qui sont identiques avec ou sans Pz. Tiré de (Chen *et al.*, 1996).

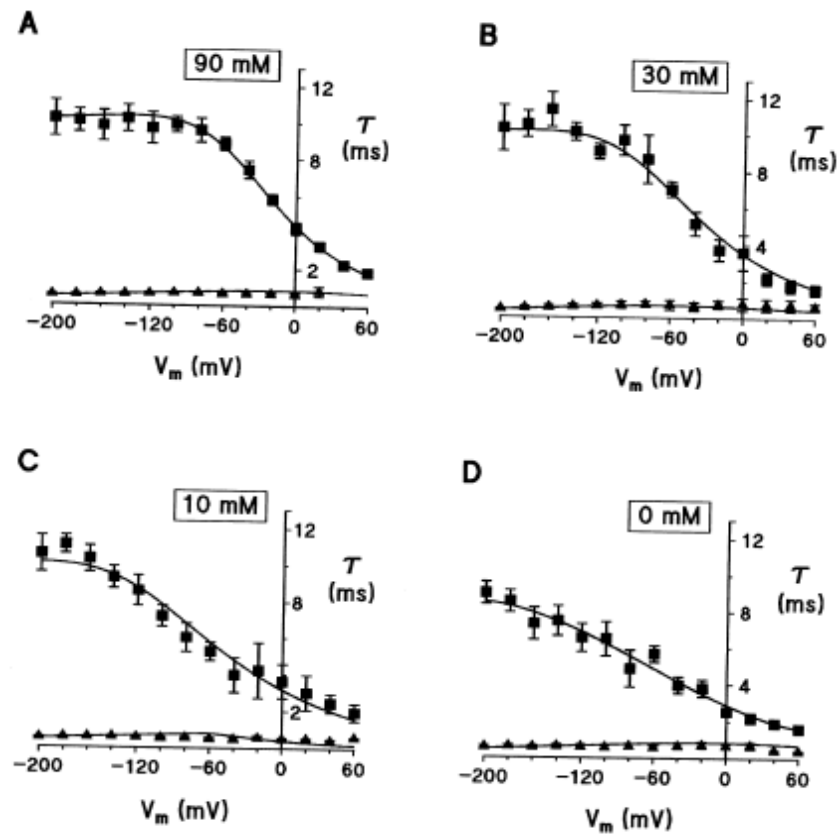


Figure 1.15 : Constantes de temps (rapide et lente) des courants transitoires de SGLT1 pour différentes concentrations de Na^+ extracellulaire.

La constante de temps lente (τ_{slow}) est représentée par les symboles carrés noirs et la constante de temps rapide (τ_{fast}) par les triangles noirs. Les traits représentent les prédictions du modèle cinétique proposé. Tiré de (Chen *et al.*, 1996).

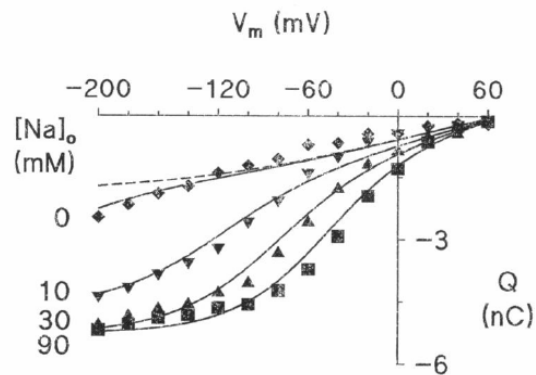


Figure 1.16 : Courbe de charges transférées en fonction du voltage membranaire (Q-V) pour différentes concentrations extracellulaires de Na^+ chez hSGLT1 mesuré en *cut-open* ovocyte.

Les traits représentent les prédictions du modèle cinétique proposé. Tiré de (Chen *et al.*, 1996).

Les courants transitoires de SGLT1 peuvent être extraits des courants totaux de plusieurs façons. L'une d'elles, utilisée par le groupe de Wright, consiste à faire un lissage de courbe des courants mesurés en fonction du temps pour plusieurs V_m , avec l'expression suivante :

$$I(t) = I_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + I_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) + I_{ss} \quad \text{Équation 1}$$

où $I_1 \exp(-t/\tau_1)$ représente le courant capacitif de l'ovocyte, $I_2 \exp(-t/\tau_2)$ le courant transitoire associé à SGLT1 et I_{ss} , le courant stationnaire. En supposant la présence d'une seule exponentielle pour les courants transitoires dépendants de SGLT1, selon la théorie des états de transitions d'Eyring, le groupe de Wright fait la supposition qu'une seule étape est nécessaire pour que le transporteur expose ses sites du Na^+ au milieu extracellulaire. De cette façon, ils obtiennent les constantes de temps ainsi que les amplitudes, qui permettent de calculer la charge transférée.

L'autre méthode consiste en la soustraction entre le courant en présence de Na^+ et celui en présence de l'inhibiteur spécifique de SGLT1, la Pz. En présence de Pz, le courant

représente essentiellement le courant capacitif de l'ovocyte plus tous les courants non spécifiques à l'expression de SGLT1. Il suffit ensuite de soustraire le courant stationnaire résiduel, représentant le courant que l'on appelle le courant de fuite de Na^+ (Mackenzie *et al.*, 1998; Loo *et al.*, 1999), un courant présent en absence de glucose qui est inhibé par la Pz. La quantité de charge transférée dans le champ électrique membranaire lors d'un changement de voltage s'obtient en faisant l'intégrale de ces courants transitoires en fonction du temps. La charge transférée en fonction du voltage appliqué est approximativement évaluée par une relation de Boltzmann tel que :

$$\frac{Q - Q_{hyp}}{Q_{max}} = \frac{1}{\left[1 + \exp\left(\frac{zF}{RT} (V_m - V_{1/2})\right) \right]} \quad \text{Équation 2}$$

où Q_{hyp} est la charge transférée au voltage membranaire (V_m) hyperpolarisant, Q_{dep} la charge transférée au V_m dépolarisant, on obtient alors la relation $Q_{max} = Q_{dep} - Q_{hyp}$, z est la valence de la charge transférée, $V_{1/2}$ le V_m auquel la moitié de la charge est transférée, F est la constante de Faraday dont la valeur est de 96 500 C/mol, R la constante des gaz (8.314 J/mol/K) et T la température en degrés Kelvin (K). Par ailleurs, les constantes de temps sont analysées avec les courants totaux desquels on soustrait le courant en présence de Pz. Deux courbes exponentielles sont nécessaires pour bien lisser ces courants, en absence ou en présence de Na^+ . Cela implique que même en absence de Na^+ , un minimum de deux transitions (donc trois états) sont requises pour que le transporteur expose ses sites du Na^+ au milieu extracellulaire (Chen *et al.*, 1996).

Lorsque la mutation de certains résidus a pour effet fonctionnel un déplacement de la courbe de charge transférée, il peut être tentant de penser qu'ils puissent constituer soit une partie de la charge mobile associée au cotransporteur soit un élément qui influence la position de la charge mobile. Pourtant, la nature moléculaire de cette structure (le «senseur de voltage») pourrait être difficile à déterminer puisqu'un déplacement de la courbe Q-V peut être observé en mutant les résidus de la boucle entre les STM IV et V (Lo et Silverman, 1998a) ainsi que plusieurs autres acides aminés, tel que démontré par le groupe de Wright (Panayotova-Heiermann *et al.*, 1994; Panayotova-Heiermann *et al.*, 1998).

Contrairement à ce qui fut trouvé chez les canaux K_v (voir section 1.2.1), aucun segment de SGLT1 ne contient plusieurs charges très bien conservées dans la famille SLC5 pouvant générer ces courants transitoires. Bref, l'origine moléculaire des courants transitoires en absence de Na^+ chez SGLT1 n'est pas encore définie.

1.4.6 Le modèle cinétique

En 1992, un modèle cinétique, illustré à la Figure 1.17A, a été proposé pour expliquer les caractéristiques électrophysiologiques pré-stationnaire et stationnaire de SGLT1 (Parent *et al.*, 1992b). Ce modèle comporte six états : un état où le transporteur est vide et dont le site de liaison au Na^+ fait face au côté intracellulaire (C_1), un état où le transporteur est vide mais avec son site du côté extracellulaire (permettant l'accessibilité des sites de liaison du Na^+) (C_2), un état lié aux deux ions Na^+ (extracellulaire) ($C_3(2Na^+)$), un état lié aux deux ions Na^+ et au glucose (extracellulaire) ($C_4(2Na^+S)$), un état lié aux deux ions Na^+ et au glucose (intracellulaire) ($C_5(2Na^+S)$) et un état lié aux deux ions Na^+ (intracellulaire) ($C_6(2Na^+)$). Ce modèle suppose que les ions se lient rapidement à leur site et que la coopérativité entre le premier ion Na^+ et le second est forte, ce qui permet de combiner la liaison des deux ions Na^+ en une seule étape. Les constantes de vitesse reliant les états correspondant au changement de conformation du transporteur vide ($C_1 \rightarrow C_2$) et la liaison des ions Na^+ ($C_2 \rightarrow C_3(2Na^+)$) dépendent du voltage membranaire tandis que les autres sont indépendantes du V_m . L'étape limitante du modèle, en absence de glucose, est le changement de conformation du transporteur lié au Na^+ ($C_3(2Na^+) \rightarrow C_6(2Na^+)$) (0.3 s^{-1}) tandis qu'en présence de glucose, l'étape limitante est celle le changement de conformation du transporteur lié au Na^+ et au glucose ($C_5(2Na^+S) \rightarrow C_6(2Na^+)$) (50 s^{-1}).

Ce modèle à six états prédit correctement la grande majorité des caractéristiques électrophysiologiques stationnaires et transitoires qui étaient jusqu'alors connues : 1) la forme sigmoïdale (et saturante aux voltages hyperpolarisants) des courbes I-V en absence et en présence de substrat, 2) la dépendance en voltage des affinités pour le Na^+ et le substrat, 3) la dépendance en voltage des courants maximum de Na^+ et de Na^+ /substrat, 4) la dépendance en Na^+ de l'affinité et du courant maximum pour le substrat, 5) la dépendance en substrat de l'affinité et du courant maximum pour le Na^+ ainsi que 6) la dépendance en

temps et en voltage des courants transitoires en absence de substrat. Le modèle prédisait une réduction des courants transitoires en présence de substrat mais non leur disparition totale.

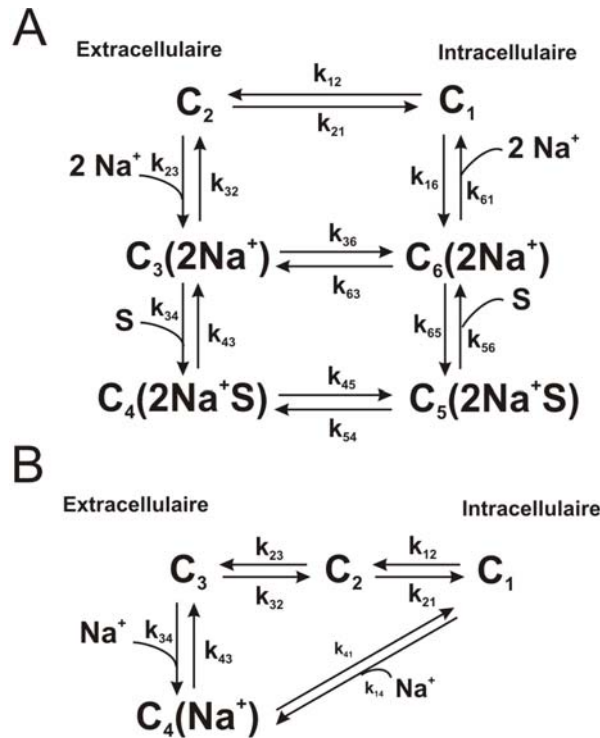


Figure 1.17 : Schéma de deux modèles cinétiques de SGLT1.

A) Modèle de transport de Na^+ et de glucose à six états de Parent et ses collègues (1992b),
 B) Modèle des courants transitoires dépendants du Na^+ à quatre états de Chen et ses coauteurs (1996).

En 1996, Chen *et al.* (1996), ont proposé un modèle avec un état supplémentaire pour le changement de conformation du transporteur vide, tel qu'illustré à la Figure 1.17B. En absence de Na^+ , les courants transitoires sensibles à la Pz devaient être lissés par une double exponentielle, donc avec deux constantes de temps (voir Figure 1.15), ce qui impliquait un minimum de trois états différents. De la même façon que dans le modèle précédent, les constantes de vitesse reliant les états C_1 à $\text{C}_4(\text{Na}^+)$ ($\text{C}_1 \rightarrow \text{C}_2 \rightarrow \text{C}_3 \rightarrow \text{C}_4(\text{Na}^+)$) dépendent du voltage membranaire sauf la réaction C_2 vers C_3 , qui est indépendante du V_m . Le changement de conformation du transporteur lié au Na^+ ($\text{C}_4(\text{Na}^+) \rightarrow \text{C}_1$) est aussi indépendant du V_m et est l'étape limitante dans ce cycle de transport ($< 10 \text{ s}^{-1}$).

Le modèle complet de Parent *et al.* (1992b) qui explique le transport de glucose comporte certaines lacunes qui ne peuvent être comblées jusqu'à présent à la lumière des estimations expérimentales des affinités apparentes des sites intracellulaires pour les ions Na^+ et pour le glucose. Il n'existe aucune estimation fiable de l'affinité apparente pour le site intracellulaire du Na^+ ($K_m^{\text{Na}^+}$) et celle pour le site intracellulaire du glucose ($K_m^{\alpha\text{MG}}$) est d'environ 35 mM, soit 35 fois plus élevé que le $K_m^{\alpha\text{MG}}$ extracellulaire (Sauer *et al.*, 2000; Eskandari *et al.*, 2005). De plus, lorsque des ovocytes exprimant wt SGLT1 sont incubés durant deux heures dans une solution sans K^+ ni Ca^{2+} , la concentration intracellulaire de Na^+ est augmentée (Jaisser *et al.*, 1994) et cela permet de mesurer des courants sortants de Na^+ /glucose après une injection intracellulaire de glucose (Charron *et al.*, 2006). Par conséquent, dans les conditions physiologiques normales, le mode inverse de transport est hautement improbable. Le nombre de transporteurs dans les états $\text{C}_5(2\text{Na}^+\text{S})$ et $\text{C}_6(2\text{Na}^+)$ du modèle de Parent et ses collègues (1992b) est donc certainement négligeable par rapport à la probabilité de trouver le transporteur dans les autres états. Néanmoins, ce modèle reste le modèle le plus simple et le plus complet couramment accepté qui explique la cinétique de transport de Na^+ et de glucose dans SGLT1.

1.4.7 Étude des changements de conformation à l'aide de sondes fluorescentes

Les sondes fluorescentes sont sensibles à leur environnement physico-chimique immédiat ce qui les rend capables de sentir certains changements de conformation de protéines sur lesquelles on peut les attacher. Cela se traduit par un changement de leur fluorescence lorsqu'un changement de pH, force ionique, hydrophobicité etc. surgit. Pour le tétraméthylrhodamine-maléimide (TMRM), le passage de l'eau vers l'éthanol engendre une augmentation du maximum du spectre d'émission de fluorescence et un déplacement de celui-ci vers les longueurs d'ondes plus longues (Mannuzzu *et al.*, 1996). La constante diélectrique, qui représente la capacité d'un milieu à séparer deux charges, de l'eau est de près de 80 tandis que celui de l'éthanol est de 24.5. La fluorométrie en condition de voltage imposé est une méthode extrêmement sensible qui détecte un changement dans l'environnement d'une sonde fluorescente attachée spécifiquement à une position dans une

protéine en activité. Il est maintenant reconnu que l'activité des protéines modifie leur conformation et peut engendrer des changements de fluorescence (ΔF) d'une sonde lorsqu'elle est attachée à un endroit stratégique.

Quatre études du laboratoire de Wright portent sur des mesures de changements de conformation de mutants de SGLT1 (Q457C et D454C) à l'aide de sondes fluorescentes (Loo *et al.*, 1998; Meinild *et al.*, 2002; Diez-Sampedro *et al.*, 2004; Loo *et al.*, 2005). Faits intéressants, tandis que le mutant Q457R de hSGLT1 est relié au GGM et est non fonctionnel lorsqu'exprimé dans les ovocytes de *Xenopus*, la mutant Q457C est fonctionnel mais son affinité pour le glucose est grandement réduite. De plus, la charge en position 454 semble importante puisque le mutant D454C a perdu sa sensibilité au V_m et le fait d'accrocher des réactifs chargés (positivement ou négativement) affectent de façon différente le transport de glucose. Une charge négative (MTSES) augmente le transport tandis qu'une charge positive (MTSET) modifie le couplage entre les ions Na^+ et le glucose (Diez-Sampedro *et al.*, 2004) (voir section 1.4.3.4).

L'étude de Loo *et al.* (1998) se concentrait sur l'accessibilité du résidu en position 457 à des réactifs sulfhydryls (MTSES, MTSEA et MTSET) et des sondes fluorescentes à base de maléimide (TMR5M et TMR6M). Les trois réactifs MTS et la sonde fluorescente TMR6M (le TMR5M ne s'y attache pas) peuvent se lier sur une cystéine à cette position. Le MTSEA cause une augmentation d' I_{leak} et une inhibition totale du transport de glucose, tel que mesuré par les courants induits par l'addition de glucose ou tel que mesuré par l'«uptake» de glucose. Le TMR6M inhibe aussi le transport du glucose lorsqu'attaché à cette position. L'accessibilité d'une cystéine en position 457 dépend du V_m et l'absence de Na^+ , la présence du glucose ou de Pz (en présence de Na^+) empêche ces réactifs de s'y lier. Cette étude montrait également pour une première fois dans SGLT1 que la fluorescence d'une sonde accrochée à une cystéine, à un endroit précis, pouvait être affectée par le V_m en absence de glucose. L'amplitude du changement de fluorescence et ses constantes de temps étaient bien corrélées avec celles des courants transitoires (voir Figure 1.18), ce qui appuyait l'hypothèse que ces changements de fluorescence nous rapportaient des changements de conformation de SGLT1.

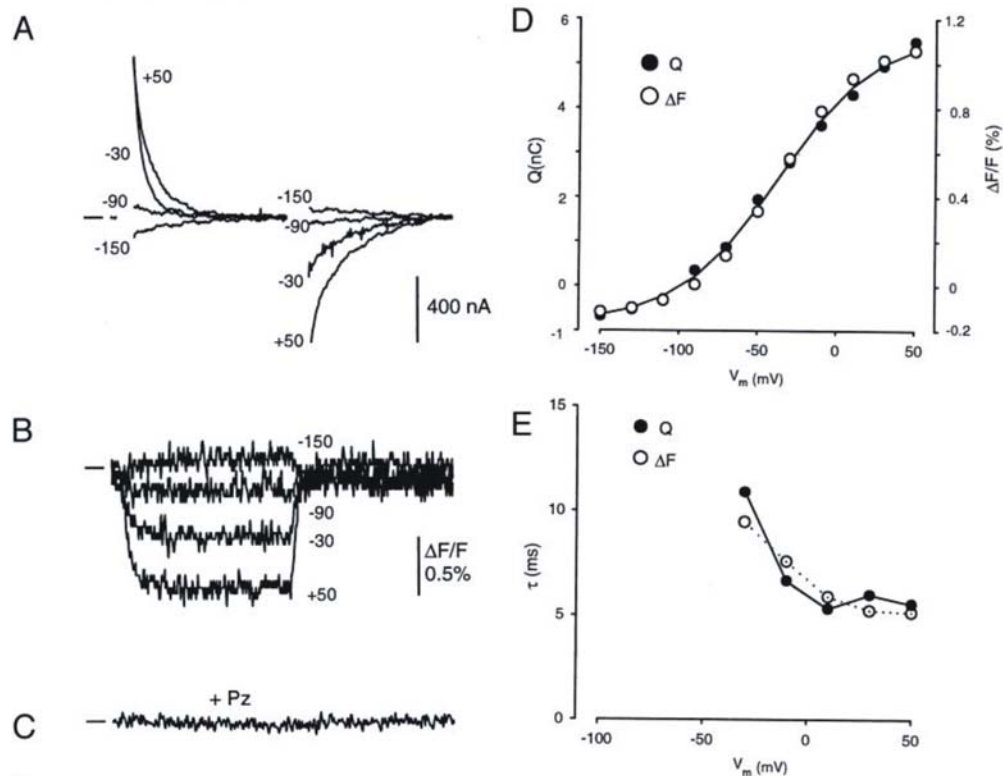


Figure 1.18 : Effet du voltage membranaire sur la fluorescence du TRM6M attaché en position 457.

A) Courant en fonction du temps pour quelques voltages membranaires. B) Fluorescence du TMR6M en fonction du temps pour certains voltages membranaires. C) Fluorescence en fonction du temps en présence de Pz. D) Relation entre la charge transférée et le changement de fluorescence en fonction du voltage membranaire. E) Constantes de temps des courants transitoires et de la fluorescence en fonction du voltage membranaire. Tiré de Loo et ses collègues (1998).

L'effet des ligands sur la fluorescence du TMR6M attaché à la cystéine en position 457 a ensuite été analysé en détails (Meinild *et al.*, 2002). Le Na^+ et le Li^+ (avec une affinité de 4 ± 4 et de 11 ± 4 mM, respectivement chez l'isoforme SGLT1 de lapin) (Hirayama *et al.*, 1997), qui sont transportés par SGLT1, peuvent induire un changement de conformation tels que mesurés par des changements de fluorescence dépendants du V_m , et leur concentration est importante afin d'avoir l'effet maximal. À l'inverse, les ions TEA^+ et NMDG^+ non transportés par SGLT1, n'induisent pas de changement de fluorescence (Meinild *et al.*, 2002). La concentration de glucose a aussi pour effet une augmentation significative de la fluorescence, tel qu'illustré à la Figure 1.19. La présence de glucose

affecte également la courbe de fluorescence du TMR6M en fonction du V_m par rapport à celle en absence de glucose (voir Figure 1.20).

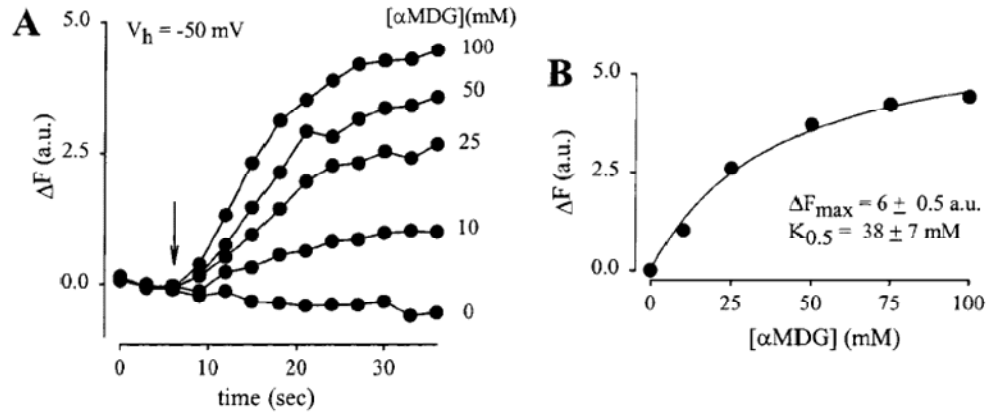


Figure 1.19 : Effet du glucose sur la fluorescence du TMR6M attaché en position 457.

A) Fluorescence en fonction du temps pour différentes concentrations d' αMG . B) Relation entre le changement de fluorescence et la concentration d' αMG . Tiré de Meinild et ses coauteurs (2002).

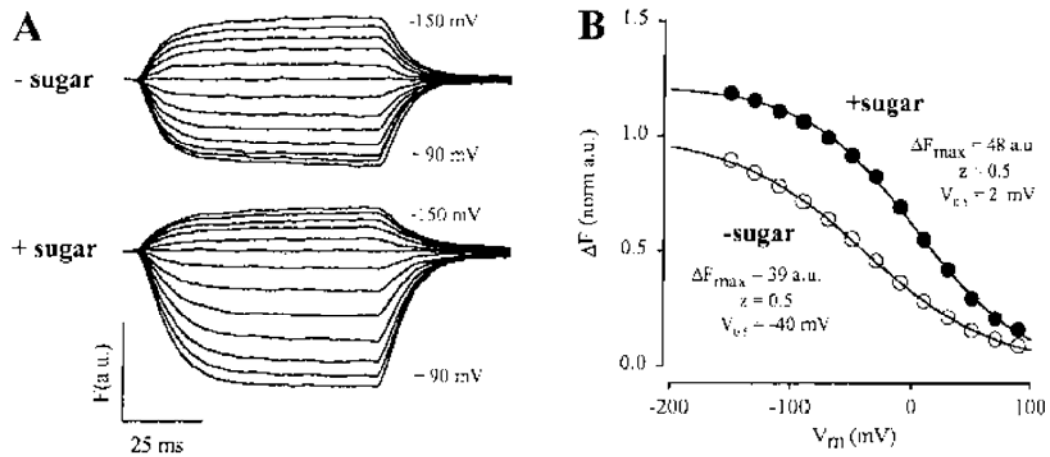


Figure 1.20 : Effet du glucose sur la fluorescence du TMR6M en position 457 en fonction du voltage membranaire.

A) Fluorescence en fonction du temps pour plusieurs potentiels membranaires avec et sans αMG (100 mM). B) Relation entre le changement de fluorescence en fonction du voltage membranaire avec et sans αMG . Tiré de (Meinild *et al.*, 2002).

Les changements de fluorescence du Q457C-TMR6M (voir section 1.4.3.4) ont aussi été étudiés par le laboratoire de Wright en absence de glucose avec la technique de *cut-open* ovocyte, mentionnée préalablement. Les courants transitoires et les changements de conformation de ce mutant marqué au TMR6M ont été corrélés entre eux et comparés avec ce qui a été mesuré en *cut-open* ovocyte pour le wt SGLT1. Cette étude a démontré qu'un changement de conformation avec une constante de temps ~ 100 ms pouvait être résolu avec la fluorescence. Cela apparaissait contredire le modèle du laboratoire de Wright, dont la constante de vitesse limitante est celle de la transition à travers la membrane du transporteur lié aux ions et au substrat qui fait face au côté extracellulaire et faisant face au milieu intracellulaire (50 s^{-1}) ($C_4(2\text{Na}^+\text{S}) \rightarrow C_5(2\text{Na}^+\text{S})$ dans le modèle de Wright). Cette mesure suggérait indirectement que le modèle de Wright devait être incomplet puisqu'il ne pouvait expliquer l'existence de changements de conformation plus lents que l'étape la plus lente de son modèle. Il a donc proposé une modification à son modèle, dans lequel il a ajouté deux états intermédiaires entre le transporteur vide qui fait face au milieu intracellulaire et celui qui fait face au milieu extracellulaire (C_1 à C_2 dans le schéma de la Figure 1.17A) (Loo *et al.*, 2005), un modèle analogue à celui proposé par Chen et coauteurs en 1996 mais comportant une étape supplémentaire. Par contre, les simulations numériques montrées dans cette étude contredisent notamment les $V_{1/2}$ des courbes Q-V à 100 mM Na^+ et à 0 mM Na^+ des travaux présents et antérieurs provenant de ce groupe ainsi que les constantes de temps des courants transitoires prises en *cut-open* ovocyte par Chen *et al.* (1996) ce qui nous fait douter de la véracité du modèle.

Plus récemment, la fluorescence du TMR6M attaché en positions 454 a aussi été étudiée (Diez-Sampedro *et al.*, 2004). Malgré que le mutant R454C soit peu fonctionnel en électrophysiologie (charge transférée de moins de 1 nC, versus plus de 15 nC et plus chez wt SGLT1), des changements de fluorescence en fonction du voltage ont pu être mesurés en présence de différentes concentrations d' α MG.

Les conclusions tirées de ces études sur des mutants quasi non fonctionnels (que ce soit dû à la mutation, comme pour D454C, ou au marquage par une sonde fluorescente dans le cas du Q457C) soulèvent de grands doutes quant à la signification données à ces résultats pour ce qui se produit dans la protéine sauvage. Ces résultats signifient sans doute que des

changements dans l'environnement des résidus en positions 454 et 457 se produisent tout de même lorsque la concentration ionique (Na^+) ou de substrat est modifiée et lorsque des sauts de voltage membranaire sont appliqués malgré qu'aucun transport net de substrat n'ait lieu. Certains changements de conformation ont donc probablement lieu dans ces mutants marqués avec des sondes fluorescentes, par contre, rien ne prouve jusqu'à présent que le transport sauvage ou un transporteur fonctionnel présente les mêmes caractéristiques.

1.4.8 À quoi pourrait ressembler la structure de SGLT1?

De nombreuses questions restent sans réponse mais sont essentielles à la compréhension du mécanisme d'action du cotransporteur Na^+ /glucose. Comment s'organisent les STM de SGLT1 dans l'espace? Quels acides aminés composent les sites de liaisons des deux ions Na^+ et comment se coordonnent-ils pour effectuer le transport de glucose? Comment sont agencés les sites de liaison des ions par rapport au site de liaison du glucose? Quelle est l'origine moléculaire des courants transitoires? Comment ces courants sont-ils couplés à un mouvement permettant le passage des ions?

Après l'examen des différentes structures 3D d'autres protéines membranaires et de leurs caractéristiques et après avoir revu nos connaissances actuelles sur SGLT1, nous pouvons tenter de nous imaginer la structure de SGLT1.

Il est fort probable que les 14 segments transmembranaires forment une cavité comme dans LacY et GltP à partir de laquelle on verrait un accès aux deux sites de liaison pour les ions Na^+ et au site pour la liaison du glucose. Peu d'information sont disponibles sur l'arrangement et la proximité des hélices transmembranaires entre elles dans SGLT1. Deux études publiées par Engelman concernant les motifs fréquemment retrouvés dans l'assemblage des STM entre eux nous permettent de spéculer quant aux STM qui pourraient former le cœur du mécanisme d'action de SGLT1 (Senes *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002). Ces auteurs ont déterminé que le motif GXXXG était particulièrement abondant et conservé dans les familles de transporteurs et canaux ioniques et qu'il joue un rôle dans l'assemblage des STM entre eux probablement en leur donnant une flexibilité. Nous avons recherché ces motifs dans les segments transmembranaires prédits par notre modèle

topologique. Cette recherche nous a appris que ce motif GXXXG était présent dans seulement six STM, les segments II, V, VII, X, XI et XII et absent dans les autres. De façon intéressante, le STM V est celui qui contient un motif signature des symporteurs couplés aux ions Na^+ (Wright, 2001), ce segment transmembranaire contient peut-être des résidus particulièrement importants pour la construction d'un ou des deux sites de liaison aux ions Na^+ . Ces six STM incluent les STM XI et XII qui jouxtent la courte boucle extracellulaire qui contient les résidus Q457 et D454, qui semblent importants pour la liaison au glucose. Nous pourrions spéculer que ces six STM se regroupent entre eux et constituent le cœur du fonctionnement de SGLT1 où les changements de conformation ont lieu.

Les sites pour les ions Na^+ sont probablement constitués de 5-6 atomes d'oxygènes comme dans le transporteur de leucine, provenant soit de la chaîne principale ou latérale d'acides aminés qui sont probablement situés sur deux ou trois hélices différentes. Nous devons nous attendre à retrouver une pochette hydrophobe, comme dans LacY et dans le transporteur de leucine, pour accommoder le glucose dans son site, provenant d'un ou plusieurs acide(s) aminé(s) aromatique(s). Le site de liaison du glucose pourrait par ailleurs être en partie constitué d'un (ou deux) ions Na^+ , comme dans le transporteur de leucine. Cela favorise certainement une grande efficacité de couplage entre les ions et le substrat. Nous croyons que les sites de liaison aux Na^+ et au glucose sont étroitement reliés dans la structure 3D, de façon similaire à ce qui est observé dans les cotransporteurs GltP et Leu_{TAa}.

Finalement, on pourrait aussi s'attendre à voir un petit passage, pour des molécules d'eau, séparé de l'emplacement central du mécanisme de cotransport lui-même, qui expliquerait une certaine perméabilité endogène à l'eau chez SGLT1. Malheureusement, il apparaît plus difficile d'imaginer l'origine moléculaire des courants transitoires chez SGLT1. Aucun de ses segments ne ressemble au segment S4 des canaux dépendants du V_m . Par contre, on peut s'attendre à ce que des charges situées sur des hélices transmembranaires, reliées ou non aux sites de liaison aux Na^+ , puissent sentir le champ électrique, générer ces courants transitoires et engendrer des changements de conformation qui mettraient en place tous les résidus composant le site de liaison des ions à chaque cycle de transport.

1.5 Justification du travail et objectifs de l'étude

Au début de mes études de doctorat, nos objectifs étaient : 1) d'identifier la nature moléculaire des courants transitoires de SGLT1 et 2) d'étudier ses changements de conformation à l'aide de la technique de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET), et ce sous différentes conditions ioniques (concentrations variables de Na^+ par exemple), en présence de son substrat ou de son inhibiteur et en fonction du voltage membranaire.

Nous nous sommes grandement inspirés des travaux effectués sur les canaux K^+ dépendants du voltage membranaire afin de développer notre stratégie expérimentale. Tel que nous l'avons présenté dans la section 1.2.1, le SCAM fut utilisé dans les canaux K_v pour démontrer que l'accessibilité des résidus arginines responsables des courants de «gating» dépendait du V_m (Larsson *et al.*, 1996; Yusaf *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 1998). De plus, ce sont des mesures de fluorescence en condition de voltage imposé d'une sonde spécifiquement attachée à une position stratégique de la boucle reliant les segments S3 et S4 du canal K^+ Shaker qui ont permis de démontrer que le segment S4 effectait un changement de conformation, révélé par des changements de la fluorescence de la sonde corrélés aux courants de «gating» (Mannuzzu *et al.*, 1996; Cha et Bezanilla, 1997). Les mesures de FRET et de LRET ont aussi contribué de façon importante à la compréhension du mouvement effectué par le segment S4 lors d'une dépolarisation (Cha *et al.*, 1999; Glauner *et al.*, 1999; Chanda *et al.*, 2005; Posson *et al.*, 2005).

Pour atteindre nos objectifs, nous devions avant tout identifier des résidus dont la mutation en cystéine affecte la courbe de charges transférées du transporteur. Ces résidus devaient être situés à une position qui permet l'attachement d'au moins une sonde fluorescente dont le signal de fluorescence serait affecté par le voltage membranaire. Finalement, nous devions développer un système de fluorométrie en condition de voltage imposé à haute résolution temporelle permettant de mesurer la fluorescence provenant de deux sondes simultanément avec les mesures de courants et de voltages.

Nous avons débuté nos travaux en mutant certains résidus de la boucle en résidu cystéine dans la boucle 13-14 de SGLT1 (Chapitre 3). Dans cette étude, nous avons utilisé le SCAM et le marquage fluorescent et développé le système de fluorométrie en condition de voltage imposé, que nous avons testé avec le mutant Q457C marqué avec le TMR6M (voir section 1.4.7). Nous avons par contre un faible ratio signal sur bruit ce qui limitait la durée des expériences réalisables sur des ovocytes. Nous avons identifié trois positions de la boucle 13-14 où le TMR5M pouvait s'attacher mais ni le V_m ni les ions ou le glucose n'affectait sa fluorescence. Nous avons tout de même construit deux mutants doubles (Q457C/N565C et Q457C/E624C) afin de débiter des mesures de FRET. Par contre, l'absence d'expression ou la faible expression des protéines mutantes et l'incertitude sur la fraction des protéines marquées par une seule sonde fluorescente sur chacune des deux cystéines diminuait grandement nos chances de succès pour des mesures de FRET.

La suite de nos travaux avait pour but d'élucider une question soulevée par l'effet du DTT sur la courbe de charges transférées chez wt SGLT1 (Chapitre 4) : quelles cystéines endogènes forment le(s) pont(s) disulfure(s) réduit(s) par le DTT et dont la rupture provoque un tel effet fonctionnel? Nous avons démontré que les C255 et C511 forment un pont disulfure qui est responsable de l'effet du DTT dans la protéine sauvage et que les deux cystéines du pont pouvaient être marquées par une sonde fluorescente (TMR5M) lorsque la cystéine partenaire du pont disulfure est éliminée par mutagenèse. Deux autres mutants doubles ont été construits (C255A/F163C et C255A/E624C), mais un des deux mutants n'est pas fonctionnel (C255A/F163C) et il nous a été impossible de marquer les deux cystéines avec deux sondes fluorescentes différentes avec certitude.

Afin de mieux comprendre le rôle fonctionnel de ce pont disulfure chez SGLT1 humain, nous avons étudié les courants transitoires des deux mutants qui ne possèdent pas le pont disulfure (C255A et C511A) ainsi que ceux de la protéine sauvage en présence du substrat (Chapitre 5) en utilisant l'électrophysiologie en deux micro-électrodes. Nous avons développé un modèle cinétique complet afin d'interpréter nos résultats.

Finalement, nous avons amélioré le ratio signal sur bruit du système de détection de la fluorescence en condition de voltage imposé et nous avons poursuivi l'étude du marquage fluorescent sur les deux cystéines (C255 et C511) en condition de voltage imposé (Chapitre 6) en utilisant quatre sondes fluorescentes (TMR5M, TMR6M, FM et Alexa488). Nos mutants sont complètement fonctionnels lorsqu'ils sont marqués par nos sondes fluorescentes. Nos résultats ont été analysés avec un modèle de fluorescence basé sur le modèle cinétique développé préalablement.

2 Méthodologies

2.1 La mutagenèse dirigée

Les mutations dans la séquence en acides aminés de SGLT1 ont été faites selon la méthode décrite par Fisher et Pei (Fisher et Pei, 1997), qui utilise la réaction d'amplification par la polymérase (PCR), illustrée à la Figure 2.1. Une paire d'oligonucléotides complémentaires (des brins d'ADN d'environ une trentaine de paires de bases) contenant les mutations nécessaires pour le changement d'un acide aminé est créée et utilisée pour la réaction de PCR. L'amplification de ces oligonucléotides par la polymérase génère des brins d'ADN mutants. Les brins d'ADN sauvages sont ensuite digérés par l'enzyme Dpn I, qui reconnaît et dégrade spécifiquement les brins sauvages puisqu'ils sont méthylés. De ce fait, les brins d'ADN sauvages sont éliminés et il ne reste plus que les brins issus de la réaction de PCR. Le séquençage de l'ADN est effectué afin d'y vérifier la présence de notre mutation. L'ADN ainsi muté est utilisé pour la fabrication d'ARNm *in vitro*, qui sera injecté dans les ovocytes, qui synthétiseront notre protéine.

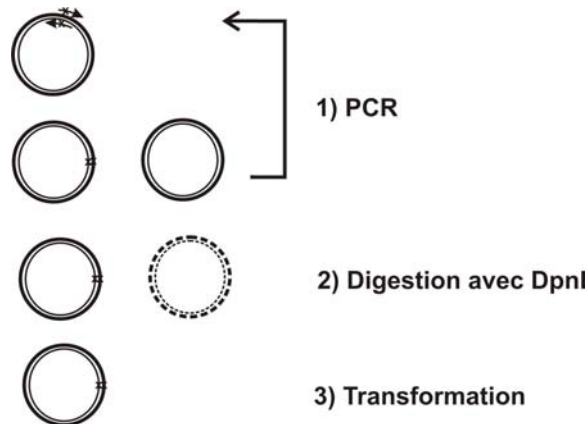


Figure 2.1 : Résumé de la méthode de mutagenèse dirigée par PCR utilisée.

Dans le cadre de ce doctorat, j'ai créé les mutants énumérés dans le Tableau II.I. et les séquences des oligonucléotides utilisés sont présentées dans l'Annexe I. L'Annexe I comporte aussi les différents protocoles utilisés en biologie moléculaire.

Tableau II.I : Transporteurs mutants de SGLT1 humain faits durant ce doctorat.

Mutants simples		Mutants doubles	
Boucles 13-14	Cystéines endogènes	Cystéines endogènes	Autres
N565C	C255A	C255A/C511A	Q457C/E624C
E586C	C292A	C314A/C560A	Q457C/N565C
I588C	C301A	C560A/C610A	C255A/E624C
A605C	C314A	C292A/C610A	C255A/F163C
Y606C	C317A	C301A/C610A	
D607C	C345A	C522A/C560A	
L608C	C351A		
E624C	C355A		
E625C	C361A		
K626C	C511A		
	C517A		
	C522A		
	C560A		
	C610A		
	C659A		

2.2 Ovocytes de grenouille *Xenopus Laevis*

La grenouille *Xenopus Laevis* est originaire des marais et étangs d'Afrique situés au Sud du Sahara. Elle peut pondre de 10 000 à 40 000 ovocytes durant sa vie: des œufs ronds, noirs et jaunes, d'environ 1 à 1.5 mm de diamètre, selon leur stade de croissance. L'injection de matériel génétique (ADN ou ARNm) codant pour une protéine cible dans ces ovocytes en fait de véritables usines à protéines. L'électrophysiologie à deux micro-électrodes a été abondamment utilisée depuis la fin des années 1980 afin de caractériser des protéines membranaires exprimées dans les ovocytes de *Xenopus*.

2.3 SCAM et SCAM inverse

Parmi les 20 acides aminés avec lesquels les protéines sont constituées, la cystéine est intéressante puisqu'elle possède un groupement hautement réactif (-SH) (voir Figure 2.2). Deux cystéines peuvent former un lien covalent nommé pont disulfure, reconnu puisqu'il stabilise la structure tridimensionnelle de nombreuses protéines. Alternativement, une cystéine isolée peut réagir avec des composés de type methanethiosulfonate (MTS) ou maléimide où sont attachés des groupements chargés (positivement ou négativement) ou fluorescent.

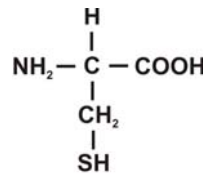


Figure 2.2 : Structure de l'acide aminé cystéine.

La méthode d'accessibilité des cystéines substituées (SCAM), a été développée durant les années 1990 (Akabas *et al.*, 1992; Karlin et Akabas, 1998). Cette technique consiste à tester l'effet des composés MTS (MTSES⁽⁻⁾, MTSET⁽⁺⁾ ou autres) sur l'activité d'une protéine où un acide aminé donné a été remplacé par une cystéine (voir Figure 2.3). La technique se base sur l'hypothèse que seule la cystéine introduite réagit avec le composé pour engendrer un effet sur la fonction. La communauté scientifique s'entend pour privilégier l'utilisation d'une protéine où aucune cystéine endogène, autre que celle introduite, n'est présente. Par conséquent, il est avantageux de muter une à une les cystéines endogènes et d'ajouter ensuite une nouvelle cystéine. Un composé MTS attaché sur cette cystéine peut ou non avoir de l'effet sur la fonction de la protéine. L'effet observé sur la fonction de la protéine peut être dû à un effet de charge introduite à un endroit particulier (dans le chemin de conductivité des ions par exemple) et nuisant au passage des ions, ou à un encombrement stérique nuisant aux mouvements permettant le transport des ions ou molécules. Lorsqu'il n'y a pas d'effet direct, d'autres astuces doivent être utilisées afin de conclure sur l'accessibilité de cet acide aminé.

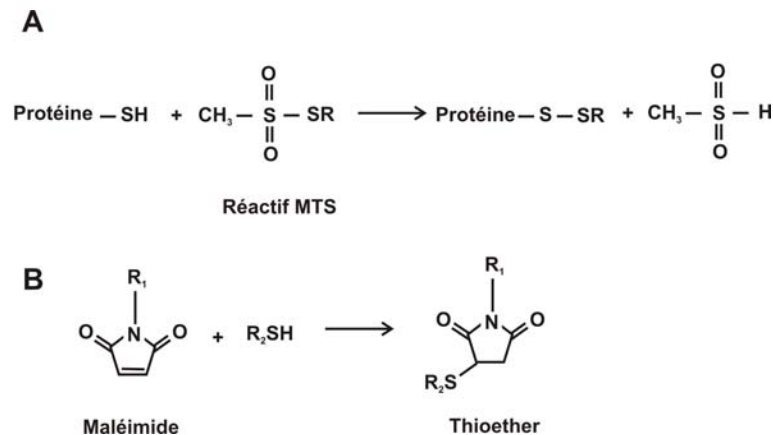


Figure 2.3 : Réaction de marquage de protéine avec les réactifs MTS (A) ou maléimide (B).

Le SCAM inverse est un terme que nous employons pour une technique très similaire mais utilisant les cystéines endogènes comme cible des composés MTS ou maléimide (voir Figure 2.3). Suivant l'hypothèse que deux cystéines puissent être impliquées dans un pont disulfure, la mutation d'une des deux cystéines libérera le groupement réactif de la cystéine partenaire et permettra la réactivité des MTS ou maléimide. Par contre, la protéine sauvage ou un double mutant où les deux partenaires du pont disulfure sont éliminés, ne permettent pas de réaction sur ces deux cystéines. Le SCAM inverse pourrait aussi permettre d'identifier une cystéine qui devient accessible suite à la mutation d'une autre cystéine, malgré qu'elle ne soit pas impliquée dans un pont disulfure.

Dans le cadre de ce doctorat, nous avons étudié l'accessibilité de certains acides aminés de la boucle 13-14 dans SGLT1 (SCAM). Nous avons remplacé individuellement 14 acides aminés par une acide aminé cystéine et testé l'effet des composés MTS (MTSES et MTSET) sur l'activité de ces mutants de SGLT1 ainsi que le marquage avec une sonde fluorescente (tétraméthylrhodamine-5-maléimide, TMR5M). Les acides aminés cystéines endogènes de SGLT1 ont ensuite été étudiés un à un (SCAM inverse), ils ont été remplacés par une alanine afin de voir l'effet de leur élimination sur la fonction de SGLT1 ainsi que pour tester la présence de pont disulfure.

2.4 Électrophysiologie en voltage imposé à deux micro-électrodes

L'électrophysiologie permet de mesurer le courant transmembranaire engendré lorsqu'un voltage est appliqué à une cellule, avec une résolution temporelle de l'ordre de la ms. Tel qu'illustré à la Figure 2.4, deux microélectrodes (e_v et e_c), fabriquées en chauffant et en étirant des capillaires de verre de borosilicate et remplies d'une solution KCl 1M, sont introduites dans les ovocytes de *Xenopus*. Deux électrodes de références sont positionnées dans le bain (e_b , électrode d'Ag-AgCl et pont d'agar, remplis de KCl 1 M). L'appareil de voltage imposé (Oocyte Clamp OC-725, Warner Instrument Corp., Hamden, CT) exécute les commandes de voltages d'un programme du logiciel d'acquisition (Clampex 8.2, Axon Instruments Inc, Union City, CA). Une micro-électrode injecte en tout temps le courant (e_i) nécessaire afin de maintenir un voltage donné, selon la mesure de l'électrode qui mesure le voltage (e_v). Un circuit de rétro-amplification relie les électrodes de référence aux électrodes de la cellule.

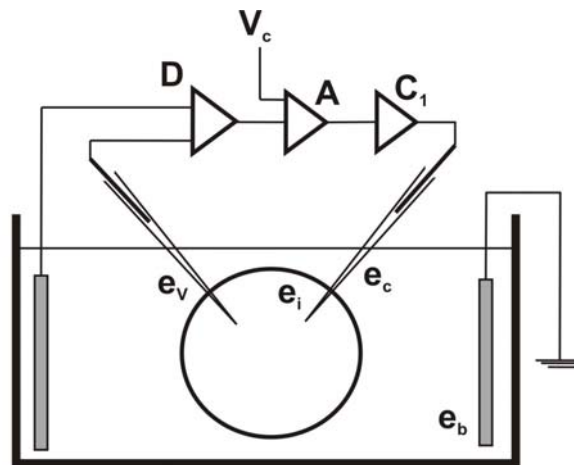


Figure 2.4 : Schéma électrique de l'électrophysiologie en deux micro-électrodes en condition de voltage imposé.

La vitesse de «*clamp*» obtenue avec l'électrophysiologie en deux micro-électrodes permet d'atteindre 95% du voltage de commande en 2-3 ms. Les micro-électrodes ne permettant pas une telle vitesse de «*clamp*» pour des expériences nécessitant l'analyse des constantes de temps des courants transitoires ont été rejetées. Évidemment, les expériences

avec des vitesses de «*clamp*» trop lentes (>5-6 ms) comparées aux vitesses typiquement possibles à l'aide de cette technique ont été rejetées. En effet, les courants transitoires se seraient confondus avec la relaxation exponentielle du courant due à l'établissement du voltage de commande et la constante de temps que nous aurions obtenue serait le reflet de la vitesse de «*clamp*». Par contre, en deçà d'une certaine limite (~5 ms), la vitesse de «*clamp*» a relativement peu d'effet sur le $V_{1/2}$ des courbes de charges transférées puisque la charge aura tout de même passé d'une position extrême à une autre, quelle que soit la vitesse de «*clamp*». Nous utilisons le protocole de soustraction des charges en présence de Pz, ce qui nous assure que nous éliminons les charges capacitives.

2.5 Préparation de fraction enrichie en membrane plasmique et immunobuvardage de type Western

La détection de protéines par immuno-buvardage de type Western est utilisée afin de déterminer la présence ou l'absence de protéine à la membrane plasmique pour des mutants non fonctionnels, par exemple.

La première étape consiste en une homogénéisation de quelques ovocytes exprimant notre protéine, une vingtaine dans notre cas. Les ovocytes sont incubés dans 1,5 ml d'un tampon d'homogénéisation (50 mM mannitol, 2 mM Tris, 5 mM EGTA où on ajoute un mélange d'inhibiteurs à protéases [Sigma-Aldrich]), pH 7.0). Trois centrifugations consécutives sont faites (2 × 10 min. à 1,000 g et 1 × 20 min. à 10, 000 g, à 4 °C) et le culot final est re-suspendu dans 10 µl du tampon d'homogénéisation.

On ajoute ensuite 10 µl de solution Laemmli (Tris pH 6.8 300 mM, SDS 7.5%, glycérol 30%, β-mercaptoéthanol 15%, bleu de bromophénol) et les échantillons sont ensuite placés sur un gel SDS-polyacrylamide d'électrophorèse. Brièvement, ce gel SDS-polyacrylamide confère des conditions dénaturantes, ce qui signifie que la protéine n'adopte plus sa conformation naturelle. La molécule de SDS forme un complexe chargé négativement avec la protéine qui migrera ensuite dans un champ électrique appliqué au gel, selon le poids moléculaire de la protéine. Les protéines qui ont migré sur le gel sont ensuite transférées, avec l'aide d'un champ électrique, sur une membrane de nitrocellulose.

La qualité du transfert est vérifiée par un marquage au rouge Ponceau qui colore les protéines.

L'immuno-détection de type Western permet de détecter la présence d'une protéine via l'utilisation de deux anticorps : un anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement la protéine à l'étude et un second secondaire qui reconnaît l'anticorps primaire. Les sites non spécifiques de la membrane sont saturés avec du lait (5% lait dans TBS, 1 heure à T° de la pièce), puis, la membrane est incubée avec un anticorps primaire (anti-myc, 1:500 dans solution de saturation, O/N à 4 °C). La membrane est ensuite lavée puis saturée et incubée avec l'anticorps secondaire (HRP-conjugated anti-souris IgG, 1:1,000 dans solution de saturation) à la T° de la pièce pour une heure. Après les étapes finales de lavage, la membrane est révélée avec le matériel de détection par chimio-luminescence (Phototope-HRP, New England Biolabs).

2.6 Fluorescence

La fluorescence est un phénomène physico-chimique relié aux changements d'états des électrons de valence d'une molécule. Un électron peut acquérir l'énergie suffisante pour passer d'un niveau fondamental (S_0) à un niveau excité (S_1 , S_2 etc.) après avoir absorbé l'énergie d'un photon ($h\nu_A$) d'énergie égale à la différence d'énergie entre ces deux niveaux d'énergie (voir Figure 2.5). Dans l'état excité, l'électron pourra subir une conversion interne et perdre de l'énergie par vibration et ensuite revenir au niveau fondamental, en perdant de l'énergie par radiation électromagnétique, c'est-à-dire par l'émission d'un photon d'énergie $h\nu_F$. C'est ce que l'on appelle la fluorescence. Le photon émis aura par conséquent une énergie plus faible que le photon d'excitation. Ce phénomène s'appelle le déplacement de Stokes («*Stokes' shift*»). Le phénomène de phosphorescence diffère légèrement de la fluorescence puisque sous l'état excité S_1 ou S_2 , les électrons peuvent, dans certaines conditions particulières, subir un croisement intersystème où ils sont délocalisés vers un état excité de type triplet (T_1). L'électron passe davantage de temps dans ce type d'état excité parce que la transition entre un état triplet et un singulet est en fait interdite. Ceci fait que le temps de vie de l'état excité est de l'ordre de la minute et de

l'heure pour la phosphorescence alors qu'il est de l'ordre de la nanoseconde pour la fluorescence.

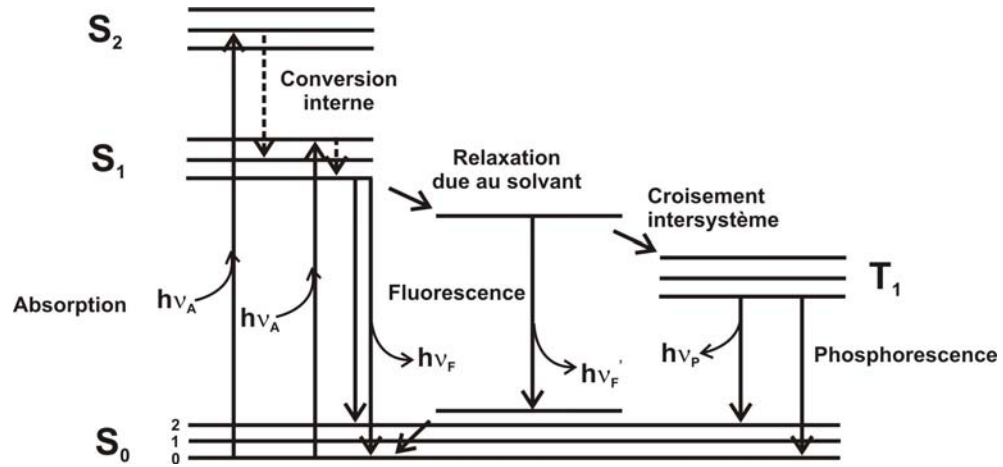


Figure 2.5 : Diagramme de Jablonski.

Les sondes fluorescentes sont extrêmement sensibles à leur environnement immédiat. Le solvant peut par exemple influencer la position spectrale de la lumière émise par certaines sondes fluorescentes par diverses interactions solvant-fluorophore qui peuvent être complexes. En général, l'interaction entre les dipôles du solvant et de la sonde fluorescente augmente l'énergie de l'état fondamental et diminue celle de l'état excité de la sonde, ce qui engendre une diminution de l'énergie de la lumière fluorescente émise, et donc un déplacement vers les longueurs d'onde plus grandes («*red shift*») (voir Figure 2.5) (Lakowicz, 1999).

Les sondes fluorescentes utilisées en biophysique sont souvent caractérisées par leurs larges bandes d'absorption (excitation) et d'émission. Leur structure est souvent caractérisée par des cycles aromatiques et des électrons qui peuvent être délocalisés dans la molécule. Lors de notre étude, nous avons utilisé les composés fluorescents tétraméthylrhodamine-5(ou -6)-maléimide, fluorescéine-5-maléimide et Alexa fluor 488-C₅-maléimide (voir Figure 6.1 pour les structures du TMR5M et TMR6M). Des filtres passe-bande (10 nm) sont utilisés pour l'excitation et la collecte de la lumière fluorescente, suivant le maximum d'absorption et d'émission des sondes utilisées.

2.6.1 Fluorométrie en condition de voltage imposé

Le défi à relever en fluorométrie en condition de voltage imposé est d'augmenter le ratio signal/bruit de la mesure de fluorescence effectuée sur un ovocyte vivant afin de pouvoir faire des mesures d'une durée raisonnable, et ce pendant que l'on fait varier la conformation de SGLT1 situé à la membrane plasmique de l'ovocyte par un changement de potentiel membranaire. Dans la première partie du projet (Chapitre 3), nous avons utilisé une lampe à arc au xénon (175 W) comme source d'excitation et des tubes photomultiplicateurs (PMT) (Hamamatsu, R1527P) pour détecter la lumière fluorescente. La lumière provenant de la source était dirigée sur le miroir dichroïque grâce à une fibre optique. Le PMT capte un signal fluorescent avec une constante de temps de l'ordre de 2.2 ns, ce qui est largement plus rapide que ce que nous demandons (~ms). Par contre, ce PMT était très sensible au bruit de fond; la lumière non spécifique qui l'atteignait, sans ovocyte dans le parcours optique, était du même ordre de grandeur que le signal que nous désirions mesurer. De plus, le bruit sur la mesure de la lumière non spécifique qui atteignait les PMT était d'environ 5-10%. Le signal spécifique pour un marquage significatif d'un ovocyte exprimant un mutant où une cystéine avait été introduite était de l'ordre de deux fois le signal non spécifique obtenu en traitant les ovocytes exprimant la protéine sauvage marqué dans les mêmes conditions. Notre mesure brute de fluorescence comportait un bruit d'environ 5-10% de notre signal, nous devions donc effectuer une moyenne d'au moins une centaine de mesures pour un voltage donné pour obtenir une résolution d'au mieux 0,5 % dans le signal de fluorescence. Les données étaient par la suite filtrées (200 Hz passe-bas).

Nous avons changé simultanément la source d'excitation et le système de détection de la fluorescence pour la dernière partie du projet (Chapitre 6). Deux raisons ont motivé ce choix : les photodiodes ont un meilleur ratio signal/bruit lorsque l'intensité de lumière est très grande par comparaison avec les PMT et les lampes halogènes sont reconnues pour leur excellente stabilité, lorsqu'utilisées avec une source de voltage contrôlée. La constante de temps de la photodiode pour capter la lumière fluorescente est de 26 ns. Avec la lampe halogène (30 W) placée directement derrière le filtre d'excitation, i.e. sans fibre optique, et les photodiodes (PIN-020A, UDT Sensors), nous avons obtenu le même niveau de bruit (0.5%) avec une seule mesure pour un voltage donné.

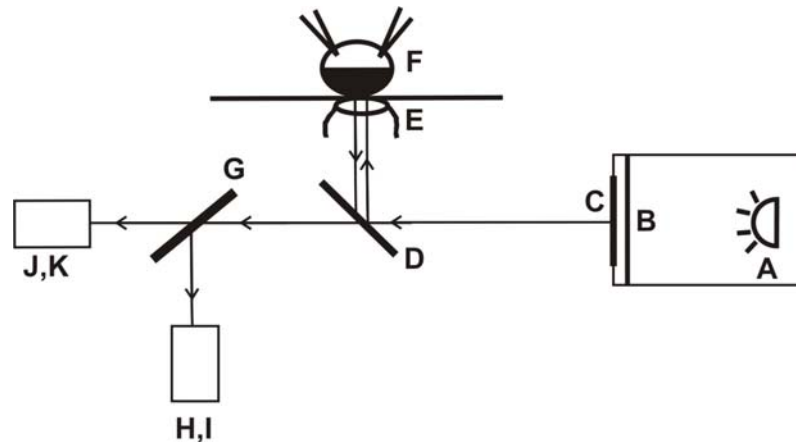


Figure 2.6 : Chemin optique de la lumière dans le montage de spectrofluorométrie en condition de voltage imposé.

Voir texte ci-dessous pour la signification des lettres.

La Figure 2.6 illustre le trajet optique de la lumière dans notre système. Dans notre système, une lumière blanche provient d'une source de lumière (A), qui est soit une lampe à arc au xénon ou une lampe halogène. Les longueurs d'onde d'excitation sont sélectionnées par un filtre d'excitation (C), précédé d'un obturateur (B) qui est utilisé pour réduire le photoblanchiment (ou photo-extinction, «*quenching*»). La lumière d'excitation est réfléchiée par un miroir dichroïque (D) puis traverse l'objectif (E) du microscope inversé. Le miroir dichroïque réfléchit la lumière ayant des longueurs d'onde inférieures à une certaine valeur et transmet la lumière ayant des longueurs d'onde supérieures. En position D, il réfléchit la lumière d'excitation et transmet la lumière fluorescente provenant de la sonde. En position G, il divise la lumière fluorescente de telle sorte que la fluorescence de la sonde TMR5M soit dirigée vers le détecteur K et celle de la sonde Alexa488 vers le détecteur I. La membrane de l'ovocyte, qui lui est placé dans un bain sous perfusion et empalé par les électrodes d'électrophysiologie, est excitée par la lumière d'excitation. La lumière fluorescence émise par la sonde traverse l'objectif et le miroir dichroïque (D), puis rejoint le système de détection, qui comprend un second miroir dichroïque (G), des filtres d'émission (H, J) qui sélectionnent la lumière fluorescente désirée. Les détecteurs, des tubes photomultiplicateurs ou des photodiodes (I, K), sont placés derrière les filtres et captent ensuite la lumière qui sera enregistrée par le système d'acquisition.

2.7 Modèle cinétique

Le logiciel de calcul Matlab 6.5.0 a été utilisé pour calculer les courants pré-stationnaires et stationnaires dans SGLT1 à l'aide d'un modèle cinétique. Ce modèle a été développé par Chen X.Z. lors de ses études de doctorat dans le laboratoire de Jean-Yves Lapointe. Certains taux de transitions (k_{ij}) ont dû être légèrement modifiés par rapport à ceux trouvés par Chen afin de bien reproduire nos résultats en électrophysiologie en deux micro-électrodes en absence de glucose pour le wt SGLT1 (courbe Q-V et τ -V).

Le modèle décrit les différents états que peut adopter le cotransporteur et les constantes de vitesse pour passer d'un état à un autre sont données par la théorie des états de transitions d'Eyring :

$$k_{ij} = k_{ij0} \exp\left(z_i \alpha_i \frac{FV_m}{RT}\right); k_{ji} = k_{ji0} \exp\left(-z_i (1 - \alpha_i) \frac{FV_m}{RT}\right) \quad \text{Équation 3}$$

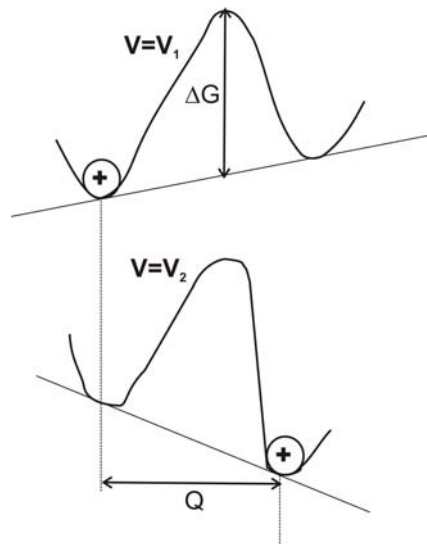


Figure 2.7 : Schéma illustrant le principe de barrières d'énergies dépendantes du V_m et de transfert de charges.

où une barrière d'énergie (ΔG) sépare deux états, représentant des conformations de notre protéine lors de son cycle de transport. Les transitions entre les états sont donc représentées par des relations exponentielles où l'énergie de transitions dépend du V_m (voir Figure 2.7).

Si une charge est située au bas de la barrière d'énergie, le voltage appliqué ($V_1 \rightarrow V_2$) peut influencer sa position initiale et engendrer un déplacement de charge.

Brièvement, notre modèle calcule l'évolution temporelle des probabilités de trouver le transporteur dans les différents états, à partir des probabilités de présence initiales (C_i) et des constantes de vitesses (k_{ij} et k_{ji} , $j=i+1$), avec un incrément de temps de 0.01 ms, et ce, pour des valeurs de V_m entre +75 et -175 mV. Une des constantes de vitesses (k_{14} ou k_{15}) est calculée pour respecter la microréversibilité. L'expression générale pour le calcul de la variation en fonction du temps de la probabilité C_i ($i=2, 3$ ou 4) en présence de glucose est:

$$\frac{dC_i}{dt} = C_{i-1}k_{i-1,j-1} - C_i k_{i,j-2} + C_{i+1}k_{i+1,j-1} - C_i k_{ij} \quad \text{Équation 4}$$

Par contre, lorsque le glucose est présent, dC_4/dt comporte deux termes de plus ($-C_4k_{41}+C_1k_{14}$) puisque le transport de Na^+ sans le glucose est toujours permis. On calcule la variation de C_1 comme étant la somme de la variation des autres C_i . On multiplie cette variation en fonction du temps par l'incrément de temps et on ajoute cette valeur à la valeur précédente de C_i . La somme des probabilités est conservée (la somme des probabilités est toujours égale à un), nous calculons C_1 en fonction de cette contrainte.

Les courants unitaires s'obtiennent en calculant la charge nette déplacée entre les états consécutifs en fonction du temps, comme suit :

$$I = (-C_2k_{21} + C_1k_{12})z_1e + (-C_3k_{32} + C_2k_{23})z_2e + (-C_4k_{43} + C_3k_{34})z_3e \quad \text{Équation 5}$$

Les étapes subséquentes ne comportent aucun transfert de charge et sont indépendantes du voltage, ils ne contribuent donc pas au courant. Les courants sont stationnaires lorsque les probabilités sont stabilisées. Les détails des calculs du modèle se trouvent dans l'Annexe II.

2.7.1 Modèle de fluorescence

Nous avons bâti un modèle de fluorescence à partir de ce modèle cinétique (Chen *et al.*, 1996). Les constants de vitesse établies préalablement grâce aux mesures d'électrophysiologie n'ont pas été modifiées. Nous avons pu reproduire le niveau de fluorescence stationnaire relatif à celui observé à +75 mV grâce à ce modèle simple où une valeur de Δf_i est attribuée à chacun des cinq états. En utilisant les probabilités de présence

des transporteurs (C_i) en fonction du V_m et de la présence des ligands (Na^+ , αMG), la fluorescence totale ΔF est calculée telle que :

$$\Delta F = \Delta f_1 C_1 + \Delta f_2 C_2 + \Delta f_3 C_3 + \Delta f_4 C_4 + \Delta f_5 C_5 \quad \text{Équation 6}$$

2.8 Analyse statistique des résultats

Toutes les expériences présentées dans cette thèse ont été faites sur au moins trois ovocytes provenant d'au moins deux grenouilles différentes. Les données sont rapportées en tant que moyenne \pm écart type de la moyenne (S.E.M.) (sauf exception) et ont été comparés par des tests t de Student effectués avec le programme Origin 7 (OriginLab Corporation, Northampton, MA); la signification statistique a été placée à $P < 0.05$.

Résultats

Avant-propos

La localisation intracellulaire de la boucle entre les segments transmembranaires 13 et 14 du cotransporteur Na⁺/glucose SGLT1 a été contestée il y a quelques années par le laboratoire du Prof. Kinne (Lin *et al.*, 1999). Ce groupe a aussi lancé l'hypothèse que des résidus de cette boucle puissent former une partie du site de liaison pour la phlorizine (Novakova *et al.*, 2001). Nous avons donc testé expérimentalement l'accessibilité de résidus cystéines introduits dans cette prétendue boucle intracellulaire à l'aide du SCAM et en utilisant une sonde fluorescente (Chapitre 3). De plus, nous avons mesuré l'effet de certaines de ces mutations sur la liaison de la Pz. Plus précisément, nous avons créé plusieurs mutants cystéine et testé l'effet du MTSES et du MTSET sur les courants de cotransport (I_{cotr}) et courant de fuite (I_{leak}) et effectué un marquage avec la sonde TMR5M. Nos résultats démontrent que les réactifs MTS et la sonde fluorescente peuvent se lier sur plusieurs des cystéines introduites à l'intérieur de la boucle et donc que sa topologie ne pouvait pas être simplement intracellulaire. Étant donné la longueur de cette boucle et son hydrophilicité, nous avons posé l'hypothèse que cette boucle ait une topologie ré-entrante. Nous avons aussi suggéré qu'elle puisse servir de «senseur de voltage» et soit à l'origine des courants transitoires observés en absence de glucose dans SGLT1.

Durant la dernière phase expérimentale sur les mutants de la boucle 13-14 affectés par les réactifs MTS, des expériences d'exposition au DTT, un agent réducteur, ont été commencées dans le but de restaurer l'activité initiale des mutants affectés par la liaison d'un composé MTS. L'effet du DTT sur SGLT1 sauvage a d'abord été testé et on a pu observer que cet agent produisait un déplacement net de la courbe de charge transférée en fonction du voltage membranaire (Chapitre 4). Cela suggérait l'existence d'au moins un pont disulfure dans SGLT1 qui serait important pour les courants transitoires. Par ailleurs, peu d'informations étaient disponibles sur le rôle des cystéines endogènes de SGLT1 mis à part que la mutation de trois d'entre elles pouvait engendrer le GGM (Martin *et al.*, 1996b; Wright, 1998) et la suggestion qu'un pont disulfure existait entre les C560 et C610 de la

boucle 13-14 (Xia *et al.*, 2003, 2004). Les 15 cystéines endogènes de SGLT1 semblaient également inaccessibles aux réactifs MTS (Loo *et al.*, 1998; Lo et Silverman, 1998a; Gagnon *et al.*, 2005), ce qui était cohérent avec la supposition que les cystéines endogènes étaient soit inaccessibles soit occupées dans la formation d'un ou de plusieurs pont(s) disulfure(s). Nous nous sommes donné comme mission de trouver ce(s) pont(s) disulfure(s) parmi les 15 cystéines endogènes de SGLT1, par mutagenèse, en utilisant la caractérisation en électrophysiologie (Chapitre 4). Les résultats obtenus sont spectaculaires puisque le pont disulfure responsable de l'effet du DTT a été positivement identifié entre les cystéines 255 et 511 chez wt SGLT1 humain. Cette observation constitue la toute première contrainte dans la structure tridimensionnelle du cotransporteur. Nous avons déterminé le rôle de ce pont disulfure dans le changement de conformation du transporteur vide.

Les deux mutants C255A et C511A brisent le pont disulfure identifié dans SGLT1 humain (Chapitre 4). Nous avons observé que ces mutants avaient une caractéristique particulière en présence du substrat. Dans ces mutants, une concentration saturante d' α MG (par rapport à l'affinité apparente pour l' α MG mesurée par les courants stationnaires induits par l' α MG) n'abolit pas complètement les courants transitoires contrairement à ce qui est observé dans SGLT1 sauvage. D'ailleurs, ce comportement du cotransporteur sauvage avait été observé par Parent et ses coauteurs (1992b) et Loo et ses collègues (1993) mais laissé sans explication complète relativement au modèle cinétique. Le fait que le substrat inhibe complètement les courants transitoires est une caractéristique commune à presque tous les cotransporteurs connus à ce jour (Parent *et al.*, 1992a; Loo *et al.*, 1993; Boorer *et al.*, 1994; Hager *et al.*, 1995; Mackenzie *et al.*, 1996; Eskandari *et al.*, 1997; Forster *et al.*, 1998; Bossi *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Coady *et al.*, 2002; Fesce *et al.*, 2002; Sacher *et al.*, 2002; Coady *et al.*, 2004; Kanai et Hediger, 2004; Virkki *et al.*, 2005). Nous avons donc caractérisé l'effet de l' α MG sur les courants transitoires pour ces mutants ainsi que pour SGLT1 sauvage et utilisé un modèle cinétique à cinq états afin d'expliquer nos résultats (Chapitre 5). Nous avons donc pu comprendre comment les courants transitoires disparaissent en fonction d'une concentration croissante d' α MG : leur amplitude est progressivement diminuée, la position d'équilibre de la courbe Q-V est déplacée vers les V_m plus positifs et leurs constantes de temps sont grandement modifiées.

Nous avons reproduit nos résultats, grâce aux simulations du modèle cinétique et, contrairement à ce qui était accepté jusqu'à présent, nous avons déterminé que le changement de conformation du transporteur lié au Na^+ et au glucose devait être très rapide et non limitant dans la protéine sauvage mais devait être limitant chez les mutants. L'utilisation des courants transitoires en présence de substrat pour comprendre le modèle cinétique s'est révélée extrêmement utile. Notre étude nous a permis de mieux comprendre le mécanisme de fonctionnement de SGLT1 et a précisé le rôle du pont disulfure C255-C511 dans SGLT1.

Nous avons démontré au Chapitre 4 qu'une sonde fluorescente pouvait se lier à C511 dans le mutant C255A et à C255 dans le mutant C511A, mais qu'aucun marquage n'était observé dans la protéine sauvage ou dans le double mutant C255A/C511A. Nous avons poursuivi cette étude en utilisant la technique de fluorométrie en condition de voltage imposé (VCF) (Chapitre 6). Nous avons utilisé quatre sondes fluorescentes, TMR5M, TMR6M, Alexa 488 et FM et avons pu tester l'effet des ligands (Na^+ , αMG) et du voltage sur la fluorescence des sondes TMR5M, TMR6M et Alexa488 attachées sur C511 et du TMR5M attaché sur C255. L'environnement de ces deux cystéines est grandement affecté par le V_m et les substrats de SGLT1, ce qui se caractérise par des changements dans le niveau de la fluorescence (ΔF). TMR5M-C511 a été particulièrement sensible à la présence de l' αMG . Une diminution de 12% de la fluorescence a été mesurée aux V_m négatifs avec l' αMG par rapport à la mesure aux V_m positifs. Cela suggère que l'environnement de C511 subit une augmentation de sa polarité lors de la liaison de l' αMG (Mannuzzu *et al.*, 1996). Cette étude de VCF est la première à avoir été effectuée sur des mutants de SGLT1 complètement fonctionnels lorsqu'une sonde fluorescente y est attachée, les résultats peuvent donc représenter une réalité pour la protéine sauvage. Ces résultats fournissent des informations complémentaires aux études d'électrophysiologie préalables avec nos deux mutants et valident notre modèle cinétique.

3 Membrane topology of loop 13-14 of the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1): a SCAM and fluorescent labelling study

Dominique G. Gagnon, Andrea Holt, Francis Bourgeois, Bernadette Wallendorff, Michael J. Coady et Jean-Yves Lapointe

Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes, Jun 30; 1712(2):173-84, 2005.

Résumé

L'accessibilité de la boucle hydrophile située entre les segments transmembranaires XIII et XIV dans le cotransporteur Na⁺/glucose (SGLT1) a été étudiée dans les ovocytes de *Xenopus*, avec la méthode d'accessibilité d'une cystéine substituée (SCAM) et le marquage fluorescent. Les 15 mutants cystéines entre les positions 565 et 664 avaient un courant de cotransport similaire à celui de SGLT1 sauvage (wt SGLT1). Les composés hydrophiliques MTSES⁽⁻⁾ et MTSET⁽⁺⁾ appliqués du côté extracellulaire n'ont eu aucun effet sur les courants de cotransport ou de fuite de Na⁺ chez wt SGLT1 mais neuf mutants ont été affectés par le MTSES et/ou le MTSET. Nous avons aussi effectué un marquage fluorescent sur nos protéines SGLT1 mutantes, avec la sonde tétraméthylrhodamine-5-maléimide et nous avons montré que les positions 586, 588 et 624 étaient accessibles. Nous avons mesuré les K_i^{Pz} et les $K_m^{\alpha MG}$ pour wt SGLT1 et pour nos mutants en positions 588, 605-608 et 625 pour tester l'hypothèse soulevée quant au rôle des acides aminés 604 à 610 de SGLT1 dans la formation du site de liaison pour la phlorizine (Pz). Malgré que les mutants A605C, Y606C et D607C aient une valeur de K_i^{Pz} supérieure à celle de wt SGLT1 et peu de changement dans celle de $K_m^{\alpha MG}$, les effets étaient modestes et ne valident pas l'hypothèse originale. Nous concluons que la grande boucle hydrophile près de l'extrémité carboxy terminale de SGLT1 est accessible du milieu extracellulaire et ne paraît pas jouer un rôle crucial dans la liaison de la phlorizine.

Reproduit de *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, Vol 1712(2), p. 173-84, Copyright (2005), avec la permission de Elsevier.

Abstract

The accessibility of the hydrophilic loop between putative transmembrane segments XIII and XIV of the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) was studied in *Xenopus* oocytes, using the substituted cysteine accessibility method (SCAM) and fluorescent labelling. Fifteen cysteine mutants between positions 565 and 664 yielded cotransport currents of similar amplitude than the wild-type SGLT1 (wtSGLT1). Extracellular, membrane-impermeant MTSES⁽⁻⁾ and MTSET⁽⁺⁾ had no effect on either cotransport or Na⁺ leak currents of wtSGLT1 but 9 mutants were affected by MTSES and/or MTSET. We also performed fluorescent labelling on SGLT1 mutants, using tetramethylrhodamine-5-maleimide and showed that positions 586, 588 and 624 were accessible. As amino acids 604 to 610 in SGLT1 have been proposed to form part of a phlorizin (Pz) binding site, we measured the K_i^{Pz} and $K_m^{\alpha MG}$ for wtSGLT1 and for cysteine mutants at positions 588, 605-608 and 625. Although mutants A605C, Y606C and D607C had slightly higher K_i^{Pz} values than wtSGLT1 with minimal changes in $K_m^{\alpha MG}$, the effects were modest and do not support the original hypothesis. We conclude that the large, hydrophilic loop near the carboxyl terminus of SGLT1 is thus accessible to the external solution but does not appear to play a major part in the binding of phlorizin.

Keywords: Na⁺/glucose cotransporter; Electrophysiology; SCAM; Fluorescence; Topology

Introduction

Despite their important physiological roles, little is known about the three-dimensional structures of membrane proteins and less than 35 different protein folds have been reported for transporters, channels or pumps (http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html). In the absence of physical structure, an important step in our understanding of their mechanisms of action at the molecular level is to correctly identify the orientation of each protein segment with respect to the membrane. In the case of the Na⁺/glucose cotransporter SGLT1¹, an archetype for Na⁺ cotransporters, a proposed membrane topology posits extracellular N- and C-termini and 14 transmembrane segments (TMS) (Turk *et al.*, 1996) comprising 48% of the protein. This model is based on hydrophobicity plots and on the insertion of glycosylation sites at different locations along the protein.

Several studies employing site-directed mutagenesis and chimeric constructions of SGLT1 have sought to identify the amino acids forming the Na⁺ binding sites, the glucose binding site and the voltage sensor responsible for the charge displacement observed in the absence of glucose. Since expression of a truncated protein composed of TMS 10-13 of SGLT1 in *Xenopus* oocytes is associated with an increase in glucose permeability, it has been suggested that the C-terminal end of SGLT1 forms the glucose permeation pathway (Panayotova-Heiermann *et al.*, 1997; Panayotova-Heiermann et Wright, 2001). However, this permeation pathway does not appear to be specific for glucose as mannitol fluxes were also increased and Pz sensitivity was lost (Panayotova-Heiermann et Wright, 2001). Replacing residue Q457 with a cysteine in this C-terminal portion of SGLT1 and labelling it with a fluorophore (tetramethylrhodamine-6-maleimide, TMR6M) showed that this residue is involved in a voltage-dependent conformational change that affects the fluorescence of TMR6M by 4-5 % (Loo *et al.*, 1998; Meinild *et al.*, 2002). The putative loop between TMS 4 and 5 has been proposed to form part of the Na⁺ interaction and voltage sensing domain based on an interpretation of the effects on pre-steady state currents of mutation of a series of amino acids there to cysteine residues +/- thiol-binding reagents (Vayro *et al.*, 1998; Lo et Silverman, 1998a; Huntley *et al.*, 2004). The evidence supporting

the physical separation between the putative pathways used by Na^+ and glucose appears questionable especially when compared to the recent crystallographic structure of the H^+ /lactose cotransporter (Abramson *et al.*, 2003).

An extremely hydrophilic segment of 88 amino acids positioned between the 13th and 14th TMS (amino acids (AA) #549 to 637 in the human clone) is considered to be intracellular by the model described above. This region is also noteworthy because it contains a quite conserved sequence followed by a less conserved one when the SGLT1 protein sequence is aligned with the closely related SGLT2 and SGLT3 proteins (see Fig. 3.1 A). The location of this segment, which contains 37 charged amino acids (21 negatively charged and 16 positively charged), was later challenged by Kinne's group based on the observation that histidine tags inserted at position 584-588 and 622-627 can be recognized by an antibody in the external solution (Lin *et al.*, 1999). More recently, the segment between 604 and 610 has also been proposed to be involved in the extracellular binding site for phlorizin (Pz), a specific inhibitor for SGLT1 (Novakova *et al.*, 2001; Raja *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2003).

As a step in establishing the structure and function of loop 13-14, we report here our observations of the electrophysiological characterization and fluorescent labelling of 15 different cysteine mutants created between residues N565 and A664 within the last hydrophilic loop and the last TMS of human SGLT1 expressed in *Xenopus* oocytes. The results clearly indicate that at least 10 of these 15 mutants are accessible from the extracellular solution by membrane-impermeant reagents or with a rhodamine-based fluorophore (tetramethylrhodamine-5-maleimide, TMR5M). In addition, mutations at positions 605-608 suggest a weak role for this segment in the ability of SGLT1 to bind extracellular Pz.

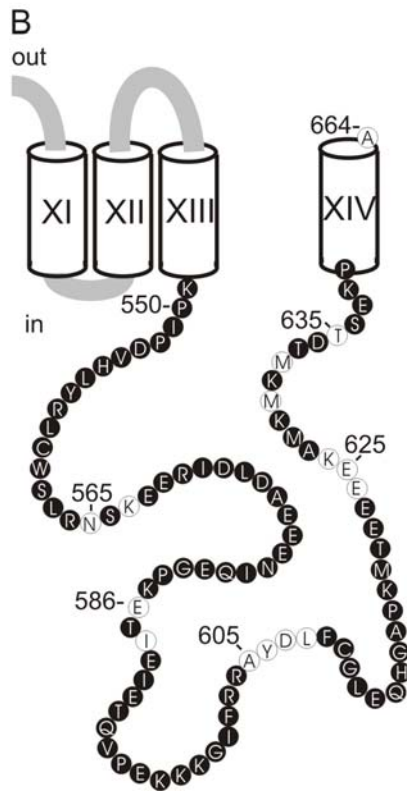
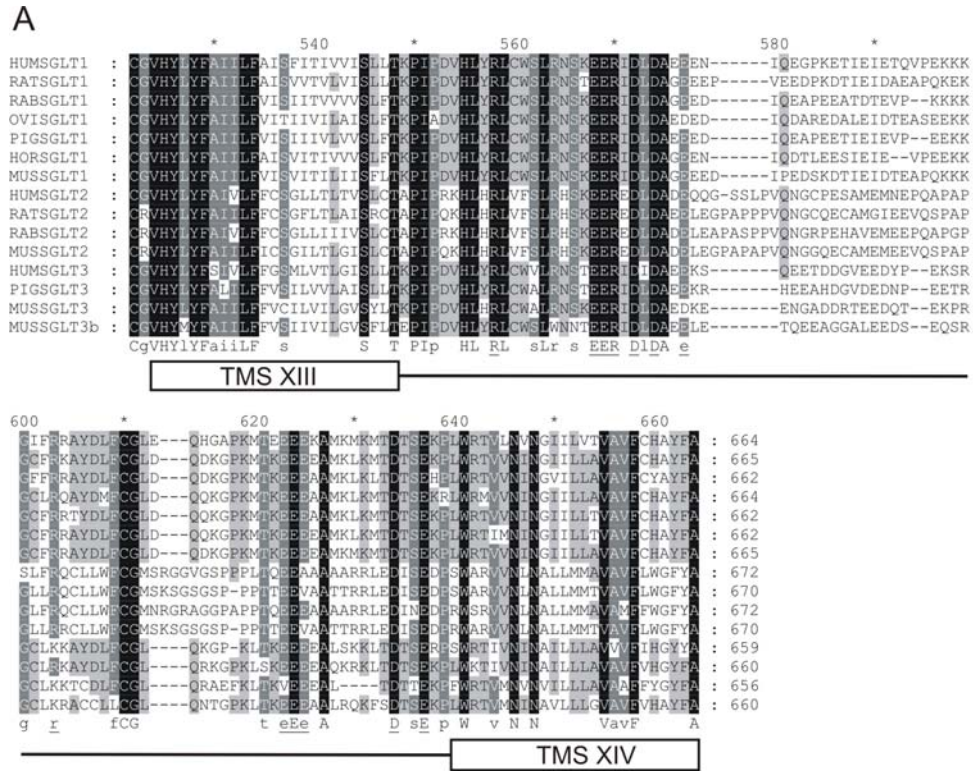


Figure 3.1: Properties and topology of loop 13-14 of the Na⁺/glucose cotransporter.

A) Sequence alignment of some isoforms of SGLT1, SGLT2 and SGLT3 between amino acids 540 and 664. Black columns represent 100% amino acid conservation, dark grey and light grey represents 80% and 60% conservation, respectively. The first line indicates the position in the amino acid sequence of hSGLT1 and the last line is the consensus sequence. Boxes depict the purported TMS regions. B) A current topological model of the last 4 transmembrane segments of the cotransporter. TMS are identified by Roman numerals, some amino acid positions in the protein sequence are indicated, the amino acids which were mutated to cysteine in the present study are depicted in white circles and the extracellular and intracellular side are indicated by the words "out" and "in", respectively.

Materials and methods

Molecular biology

We used human SGLT1 cDNA with an N-terminal myc epitope in the expression vector pBS (pBS-myc-hSGLT1) (Bissonnette *et al.*, 1999) to construct each of the mutations described here. They were created using the method described by Fisher and Pei (Fisher et Pei, 1997). Individual mutations were confirmed by DNA sequencing and the specific amino acids which were mutated to cysteine are indicated in Fig. 3.1 B. QIAGEN mini-prep kits were used to extract DNA and EcoRI digestion was followed by mRNA transcription in vitro using the T3 mMessage mMachine kit (Ambion, Austin TX).

Oocyte preparation and injection

Oocytes were surgically removed from *Xenopus laevis* frogs, dissected and defolliculated as described previously (Bissonnette *et al.*, 1999; Gagnon *et al.*, 2004). They were injected with 46 nl mRNA (0.25 µg/µl), aside from the wild-type SGLT1 (wtSGLT1), which was injected with 46 nl of a 0.1 µg/µl solution, and maintained in Barth's solution (in mM : 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgSO₄, 0.41 CaCl₂, 0.33 Ca(NO₃)₂, 5 HEPES, pH 7.6) supplemented with 5 % horse serum, 2.5 mM Na⁺ pyruvate, 100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin for 4-8 days prior to experimental use.

Electrophysiology

The saline solution is composed of (in mM) : 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgCl₂, 0.74 CaCl₂, 10 HEPES, and the solution pH was adjusted to 7.6 with NaOH. Steady-state currents were measured with 5 mM α-Methyl-glucose (αMG) and 200 µM phlorizin (Pz) for all experiments except for determination of apparent affinity for αMG ($K_m^{\alpha MG}$) and inhibition constant of Pz (K_i^{Pz}), which were done as described previously (Bissonnette *et al.*, 1999). Two-microelectrode voltage clamp experiments were performed with an Oocyte Clamp OC-725 (Warner Instrument Corp, Hamden, CT). Three repetitions of membrane potential steps (25 mV or 20 mV) between +70 and -170 mV were imposed for 300 ms intervals per

step. Data was obtained with a sampling frequency of 10 kHz (V was filtered at 1 kHz lowpass), and the 3 repetitions were averaged during the experiment by the acquisition program (Clampex 8.2.0.228, Axon Instruments Inc, Union City, CA). Steady-state current levels were obtained using mean values for measurements at the end of each pulse (between 150 and 300 ms). Treatments with 2.5 mM methanethiosulfonate (MTS) reagents were performed at the normal holding potential (-50 mV) in a saline solution for 5 to 10 min; afterwards the bath was washed sufficiently to eliminate unbound reactants. The activity of the cotransporter was tested before and after the treatment. The effects of treatments on the different mutants were normalized by dividing currents measured after treatment with the currents measured before treatment; these were compared to wtSGLT1 currents, normalized in the same fashion.

Fluorescence

A Nikon Diaphot inverted microscope was employed with a 40× oil immersion objective (numerical aperture 1.30, Nikon, Tokyo, Japan). A Lambda LS 175 W xenon arc lamp connected to a liquid light guide was used to illuminate oocytes (Sutter Instrument Company, Novato, CA). A motorized progressive filter (Carl Zeiss Canada Ltd, Toronto, Ontario, Canada) was used when measuring excitation spectra between 400 and 600 nm. Fluorescence was measured with a photomultiplier tube (Hamamatsu Photonics Corp., Bridgewater, NJ) and a 10 nm bandpass filter centered at 589 nm (Omega Optical Inc., Brattleboro, VT). A dichroic mirror with a discrimination wavelength of 570 nm was used (570DCXR, The Optikon Corporation Ltd. Kitchener, Ontario, Canada). A 10-min labelling period was performed on voltage-clamped oocytes at a holding potential of -90 mV using a concentration of 20 μ M tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMR5M, Molecular Probes, Eugene OR). As autofluorescence was found to be higher at the vegetal pole of the oocyte, all fluorescent experiments were performed using the animal pole. Fluorescence intensity was read at the maximal excitation wavelength.

Data analysis and statistics

Amino acids sequences were aligned using ClustalX and were displayed using Genedoc (Thompson *et al.*, 1997, <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>). Experiments with MTS reagents were performed on at least 3 oocytes obtained from a minimum of 2 different donors. Data are reported as mean \pm S.E. (except when otherwise noted) and are compared using unpaired Student's *t*-test; statistical significance was set at $p < 0.05$. Curve fitting of current values for determination of both $K_m^{\alpha\text{MG}}$ and K_i^{Pz} and statistical tests were performed using Origin 7 (OriginLab Corporation, Northampton, MA).

Results

Effect of MTS reagents

The large inward current through SGLT1 is due to the cotransport of two Na⁺ ions along with each α MG molecule into the cell. SGLT1 also displays a Pz-sensitive Na⁺ current in the absence of sugar, referred to as a Na⁺ leak (Parent *et al.*, 1992a). The accessibility of cysteine residues introduced into the protein sequence was tested by measuring the effect of non-permeant, Cys-binding reagents (MTSET, MTSES) on the I_{cotr} (maximal α MG cotransport current) and on the I_{leak} (Na⁺ leak current).

As the human SGLT1 contains 15 endogenous cysteine residues, it was necessary to begin by characterizing the effects of MTS reagents on the activity of the native cotransporter. Fig. 3.2 illustrates the current/voltage (I-V) relationship of the I_{cotr} and I_{leak} for 6 oocytes before and after treatment with MTSES (panel A) or MTSET (panel B). The currents stimulated by the addition of 5 mM α MG were unaffected by a 5-min treatment with either MTS reagent. On average, the I_{cotr} at -95 mV, after treatment with MTSES or MTSET, represent 95 ± 4 % and 107 ± 2 % of the pre-treatment currents, respectively (see Fig. 3.2 C, left). The I_{leak} was also found to be insensitive to treatment with MTS reagents; the I_{leak} after MTSES or MTSET treatment averaged 89 ± 7 % and 107 ± 7 %, respectively, of their magnitude immediately prior to the treatment (see Fig. 3.2 C, right). These results are in agreement with results mentioned previously. The absence of any significant effects of MTS reagents on oocytes expressing wtSGLT1 indicates that the endogenous cysteine residues are either physically non-accessible, already involved in a disulfide bridge or, alternatively, that they are accessible but that their covalent modification does not produce any significant functional changes in the transport mechanism of the cotransporter.

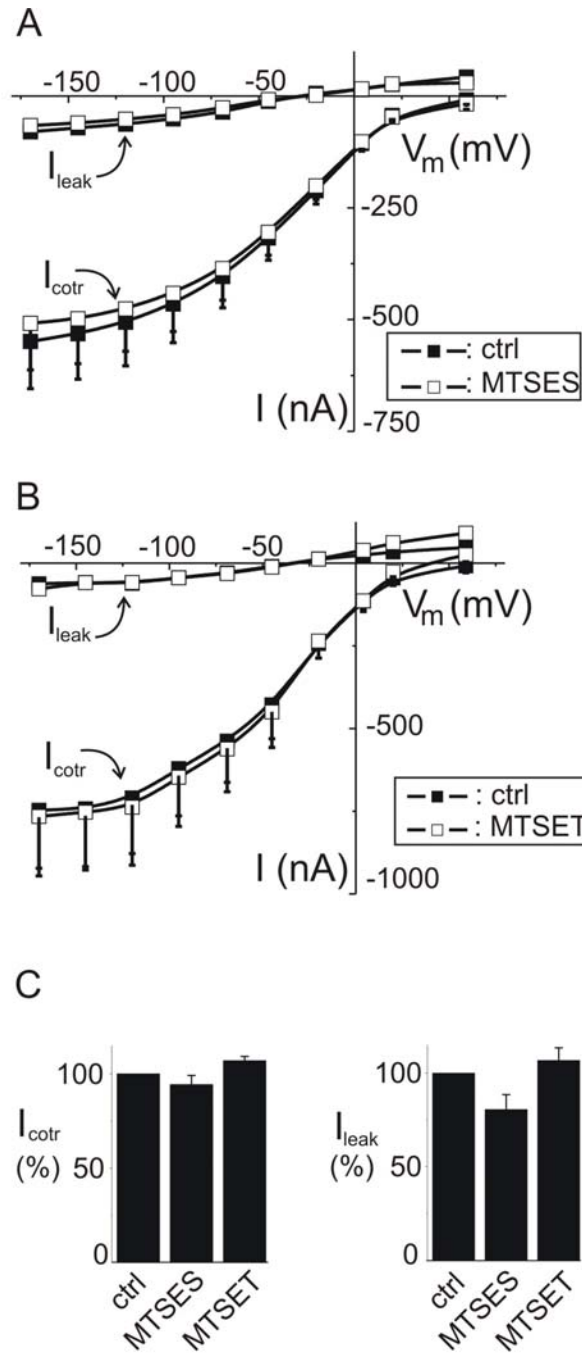


Figure 3.2: Effect of MTSEES and MTSET treatments on α MG-dependent currents (5 mM) and phlorizin-sensitive Na^+ leak currents of wild type hSGLT1.

A) I-V curve of I_{cotr} and I_{leak} before and after MTSEES treatment (paired experiments, n=6).
 B) I-V curve of I_{cotr} and I_{leak} before and after MTSET treatment (paired experiments, n=6).
 Error bars represent 1 S.E.M. and are shown when larger than symbols. C) Comparison of currents after MTS treatments to the control currents (set at 100%) at -95 mV for I_{cotr} (left) and I_{leak} (right).

Amino acids N565, K567, E586, I588, A605, Y606, D607, L608, E624, E625, K626, M630, M632 and T635 were individually replaced by cysteine in SGLT1 cDNA (see Fig. 3.1 B). The C-terminal amino acid (A664) was also replaced with cysteine in order to assess its location. All the mutants exhibited good expression levels as their I_{cotr} (in the presence of 5 mM α MG) ranged from 47% of the wtSGLT1 I_{cotr} (for A664C) to 185% (for M632C) (Fig. 3.3). The I_{leak} for every mutant was also very similar to that of the wtSGLT1 except for E586C, which had a I_{leak} corresponding to only 30% of the wtSGLT1, and for T635C which had a significantly increased I_{leak} (130% of wtSGLT1 I_{leak}). Consequently, each of the 15 different mutants was suitably folded and inserted in the plasma membrane, leading to reliable, functional expression in *Xenopus* oocytes.

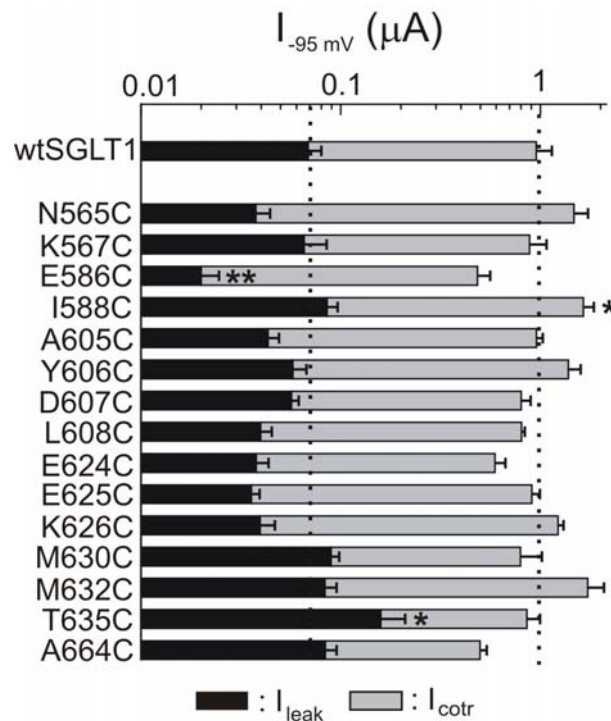


Figure 3.3: Comparison of mutated SGLT1 activities to that of wtSGLT1.

Maximal α MG cotransport (I_{cotr} at 5 mM α MG) and Na^+ leak (I_{leak}) currents at -95 mV of all the mutants expressed in *Xenopus* oocytes. The dotted lines indicate the mean expression level of wtSGLT1. $n \geq 6$ for each mutant. Errors are S.E.M. and stars indicate the statistical significance with respect to wtSGLT1 (* : $P \leq 0.05$, ** : $P \leq 0.01$, *** : $P \leq 0.001$).

Cotransport and Na⁺ leak currents were measured for 3 or 4 oocytes expressing each of these mutants before submitting them to a 5- to 10-min treatment with 2.5 mM MTSES or MTSET. These currents were then re-evaluated and the ratios between currents measured after treatment to initial currents were calculated. The results of the effects of MTSES and MTSET on the individual mutants are summarized in Fig. 3.4 and are compared to the (statistically insignificant) effects observed with oocytes expressing the wtSGLT1 cotransporter.

Binding of extracellular MTSES or MTSET to the cysteine residues introduced at 9 different locations in loop 13-14 produced a statistically significant effect in the I_{cotr} and/or I_{leak} . The combined effects of MTSES and MTSET established that the following amino acid positions are accessible to the external solution: 565, 567, 588, 605, 624, 625, 632, 635 and 664. One significant effect, on mutant E624C, is shown in Fig. 3.5 A and B where the MTSET-induced increase in I_{cotr} (137 +/- 9%) was considerable while the same treatment had no significant effect on the I_{leak} . Of the MTS-accessible locations, a few were observed to produce very large effects on the cotransporter functions. For example, the effect of MTSET on A664C was obvious as it increased the I_{cotr} nearly two-fold and decreased the I_{leak} by more than 60% (Fig. 3.5 C and D). In the case of K567C, M632C and T635C, the I_{leak} currents were practically doubled (Fig. 3.4). Despite their charge difference, MTSET and MTSES were never seen to produce opposite effects on any of the mutants studied.

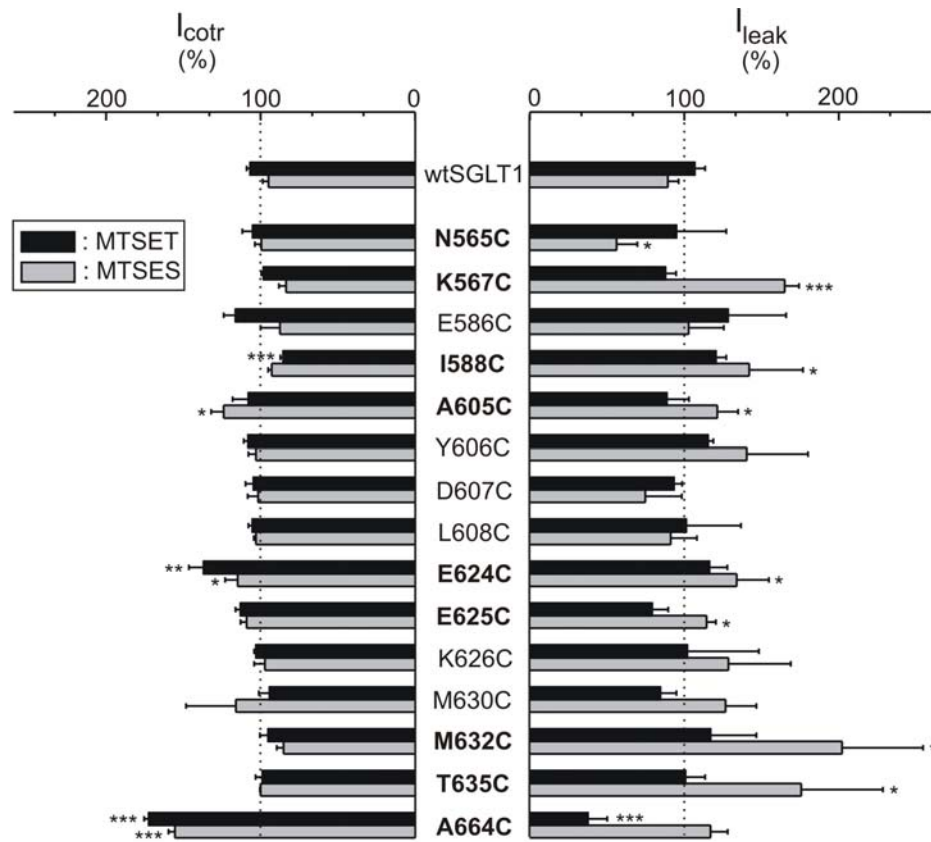


Figure 3.4: Effects of MTSES and MTSET on maximal α MG cotransport and Na^+ leak currents of wild type and mutant SGLT1.

The currents measured after MTS treatment are depicted as a proportion of the control currents (set at 100%) at -95 mV for I_{cotr} (left) and I_{leak} (right). Black bars are for MTSET and gray bars for MTSES treatments. The dotted line is at 100%. $n = 3$ to 4 oocytes for each type of experiment on each mutant, $n=6$ for wtSGLT1. Errors are S.E.M. Stars represent statistical significance vs. wtSGLT1 (as in Fig. 3.3) and the names of the accessible mutants have been printed in bold characters.

In conclusion, the effects of exposure to MTS reagents indicate that loop 13-14 (AA #549 to 637) can be reached from the extracellular space at, at least, 9 different locations ranging from AA #565 to 635. It should be noted that external accessibility to the other locations tested could have been overlooked if MTSES or MTSET could bind to the cysteine residue without producing any detectable, functional effects on the two electrophysiological parameters tested. It also suggests that these residues are somehow

important for SGLT1's function as exposition to a MTS reagent significantly modifies I_{cotr} and/or I_{leak} .

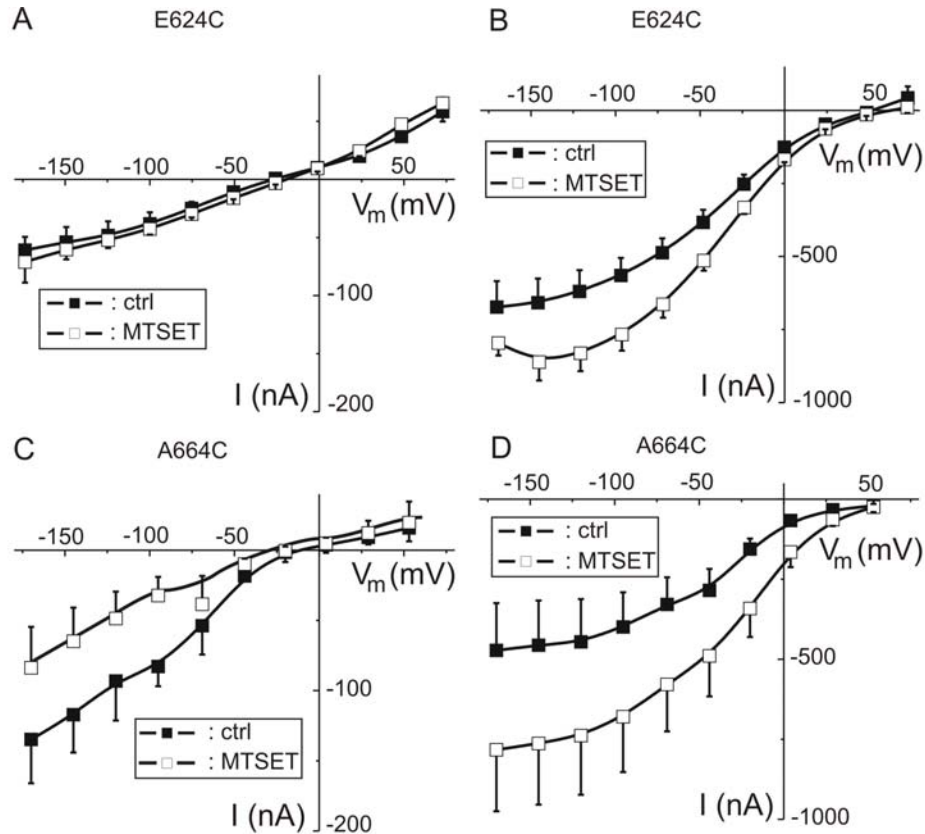


Figure 3.5: Effect of MTSET treatment on maximal α MG (5 mM) cotransport and Na^+ leak currents for mutants E624C and A664C.

A) I-V curve of I_{leak} before and after MTSET treatment for mutant E624C (n=3, paired experiments). B) I-V curve of I_{cotr} before and after MTSET treatment for mutant E624C (n=3, paired experiments). C) I-V curve of I_{leak} before and after MTSET treatment for mutant A664C (n=3, paired experiments). D) I-V curve of I_{cotr} current before and after MTSET treatment for mutant A664C (n=3, paired experiments). Errors are S.E.M.

Labelling with fluorescent probes

In order to complement our accessibility study with a method that does not require observation of an effect on cotransporter function, we used a maleimide-conjugated fluorescent probe to label the cysteine mutants of loop 13-14. With a triangular size of about 14 by 8 Å, as compared to the cylindrical MTS reagents (10 Å long with a diameter

of approximately 6 Å (Fabiato et Fabiato, 1979)), it is expected that the accessibility determined by these two reagents might differ significantly.

Binding of the fluorescent probe to oocytes exposed to 20 μM TMR5M for 10 min was detected by obtaining excitation spectra from 400 to 600 nm. As shown in Fig. 3.6, the fluorescence measurements performed on the wtSGLT1 and on mutants K567C and E586C reveal maximum absorption at a wavelength of about 560 nm. We performed excitation spectra on every oocyte and used the 560 nm measurement to compare experiments.

With a reading window of 250 μm x 250 μm, our fluorescence set-up yielded a fluorescence signal of 0.24 ± 0.03 V (n=58) at an excitation wavelength of 560 nm for a non-labelled oocyte. This is considered to derive from the combined autofluorescence originating from the oocyte, from the different optical components and from the bath. When a non-injected oocyte is treated with the standard labelling procedure (see Materials and methods section), fluorophore internalisation and endogenous membrane protein labelling yield a total fluorescence signal of 0.5 ± 0.7 V (n=4) (see Table III.I). Oocytes expressing the wtSGLT1 generated a fluorescent signal averaging 1.5 ± 0.3 V (n=8) which was higher than the autofluorescence level but not significantly different from the signal obtained from non-injected oocytes exposed to the fluorophore for the same period ($P=0.23$). This indicates that the 15 endogenous cysteine residues in SGLT1 are inaccessible to the fluorophore, agreeing with the observation above that neither MTSES nor MTSET affected the function of the wtSGLT1 cotransporter. An example of significant labelling is shown in Fig. 3.6 for E586C, and the data for all the mutants of the loop and for the last C-terminal amino acid (A664C) are presented in Table III.I. Three of the 15 mutants (E586C, I588C and E624C) were shown to be accessible to an extracellular fluorescent probe using our labelling procedure. In addition, pre-treatment with either MTSET or MTSES appeared to be effective in reducing the labelling observed for these mutants to the level obtained with wtSGLT1 (data not shown). The cotransporter activity of the mutant proteins were unaffected by the binding of the TMR5M reagent, based on substrate-induced currents (data not shown).

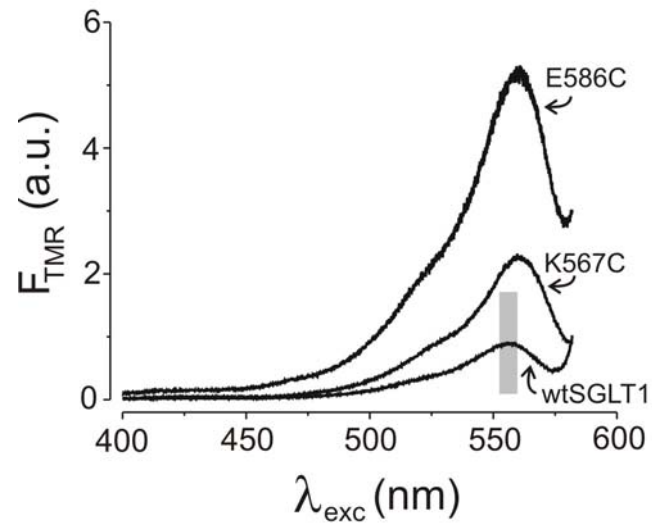


Figure 3.6: Excitation spectra of representative oocytes expressing wtSGLT1, K567C and E586C, labelled with TMR5M.

Fluorescence is quantitated in arbitrary units. The grey box represents ± 1 S.D. for the non-specific labelling measured on the wtSGLT1.

Table III.I: Fluorescent labelling of the mutants in loop 13-14 with a rhodamine based fluorophore (TMR5M)

Mutant	Intensity^a (a.u.)	t-test^b	n^c	Accessibility^d
N.I.^e	0.5±0.7	0.23	4	
wtSGLT1	1.5±0.3	-	8	
N565C	3±1	0.20	6	-
K567C	1.8±0.9	0.64	3	-
E586C	3.6±0.6	0.003	4	x
I588C	3.6±0.7	0.05	4	x
A605C	3±3	0.20	4	-
Y606C	0.54±0.08	0.05	4	-
D607C	2±1	0.37	3	-
L608C	3±2	0.14	3	-
E624C	6±1	0.001	4	x
E625C	0.7±0.3	0.14	4	-
K626C	1.9±0.7	0.49	4	-
M630C	3±2	0.16	3	-
M632C	1.1±0.3	0.41	4	-
T635C	2±1	0.58	4	-
A664C	1.1±0.4	0.48	3	-

Footnotes:

^a Each entry is the mean ± SEM of the maximum fluorescent signal taken from the excitation spectrum for each labelled oocyte (see Materials and methods and Fig. 3.6)

^b t-test entries represent the p value for unpaired Student's *t*-test against wtSGLT1 data

^c n is the number of experiments

^d A significant labelling as compared to wtSGLT1 is identified by x and no accessibility to the fluorescent probe by -

^e Non-injected oocyte

Membrane potential effect on fluorescence

Fluorescent labelling of the mutant Q457C was previously shown to produce a fluorescent signal that can be affected by ligands and voltage-dependent conformational changes of the protein (Meinild *et al.*, 2002). We confirmed this result by observing that, from +50 to -150 mV, the fluorescent signal for this mutant changed by 4-5% (data not shown). Unfortunately, for mutants presenting significant fluorescent labelling (E586C, I588C and E624C), none displayed a voltage sensitivity that exceeded the noise level of 0.5%. This was repeated in the presence of 5 mM α MG but no voltage-dependent fluorescence change could be observed (data not shown).

Affinities for substrate and inhibitor

As Novakova *et al.* (2001), Raja *et al.* (2003) and Xia *et al.* (2003) have proposed that the region between amino acids 604 and 610 in rSGLT1 appeared to be involved in the Pz binding site, we measured the apparent affinity for α MG ($K_m^{\alpha\text{MG}}$) and the inhibition constant for Pz (K_i^{Pz}) of mutant SGLT1 versions with cysteine residues inserted into this region. Fig. 3.7 A illustrates the absence of voltage dependence for these affinities measured with the wtSGLT1. All the affinities of the mutants tested were likewise insensitive to membrane potential, so affinities were compared at -150 mV (Fig. 3.7 B) for 4 mutants within the proposed Pz binding site (A605C, Y606C, D607C and L608C) and for 2 flanking mutants in loop 13-14 (I588C, E625C). This membrane potential was chosen because of the well defined affinity for Na^+ (15 mM) at this voltage. The $K_m^{\alpha\text{MG}}$ of wtSGLT1 is 0.9 ± 0.1 mM (at -150 mV) and the mutants displayed values which were not statistically different from this, aside from mutant D607C which exhibited greater affinity (0.51 ± 0.04 mM). However, the K_i^{Pz} for 3 of the mutants were significantly higher than for the wtSGLT1 (see Fig. 3.7 B). As the binding of α MG is dependent on prior Na^+ binding, any change in $K_m^{\text{Na}^+}$ should foster a change in $K_m^{\alpha\text{MG}}$. Consequently, as the Na^+ dependent

$K_m^{\alpha\text{MG}}$ of mutants is not different from that of wtSGLT1, the change in the K_i^{Pz} of the mutant SGLT1s is not likely to be due to a change in $K_m^{\text{Na}^+}$.

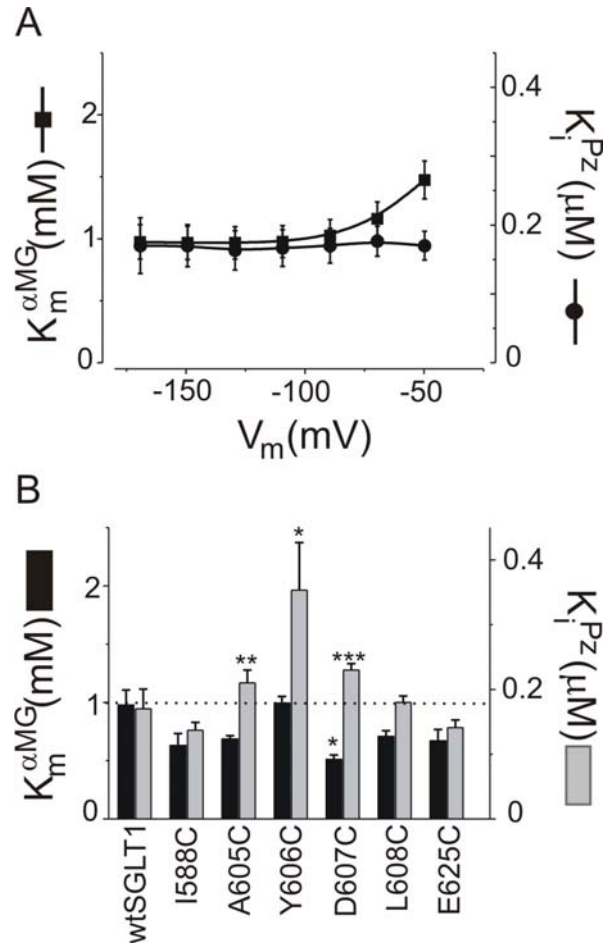


Figure 3.7: Apparent affinity for αMG and apparent inhibition constant of Pz for some selected mutants, compared to wtSGLT1.

A) Voltage dependency of apparent αMG affinity ($K_m^{\alpha\text{MG}}$) and apparent Pz inhibition constant (K_i^{Pz}) for wtSGLT1. Filled squares represent $K_m^{\alpha\text{MG}}$, filled circles represent K_i^{Pz} . B) $K_m^{\alpha\text{MG}}$ and K_i^{Pz} measured at -150 mV for wtSGLT1 and for some selected mutants in loop 13-14. Black bars represent $K_m^{\alpha\text{MG}}$, grey bars represent K_i^{Pz} . The dotted line indicates the levels of $K_m^{\alpha\text{MG}}$ and K_i^{Pz} for wtSGLT1. $n \geq 4$. The stars depicting statistical significance are as described for Fig. 3.3.

Discussion

The substituted cysteine accessibility method (SCAM) has proven to be a useful tool for examining the accessibility and role of specific membrane protein segments (Karlin et Akabas, 1998; Ehnes *et al.*, 2004b; Jung *et al.*, 2004). Experimental results, in combination with molecular modelling, can help to refine established models for protein structures, as was done for the Ca²⁺-activated K⁺ channel (Simoes *et al.*, 2002) and ECaC-TRPV5 (Dodier *et al.*, 2004) models, or to understand permeation mechanisms in other types of transporters (Arinaminpathy *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2004; Chakrabarti *et al.*, 2004; Noskov *et al.*, 2004). In the absence of crystal structure, these data could lead to major advances in the understanding of molecular mechanisms of action of transport proteins (Kaback *et al.*, 2001; Lambert *et al.*, 2001; Pajor, 2001; Yao et Pajor, 2002).

MTS results

We chose to not produce a cysteine-less cotransporter before doing SCAM for two reasons. First, neither MTSES nor MTSET had any functional effects on wtSGLT1 and its labelling with TMR5M was not different than the labelling of non-injected oocytes. Second, we knew that replacing cysteines at positions 560 or 610 would affect the kinetics of SGLT1 (data not shown) and it would be meaningless to study the accessibility of a specific loop in a structurally challenged cotransporter. Other studies using SCAM have also used a wild-type transporter instead of a cysteine-less version because of the deleterious effects of removing cysteines from the protein (Pajor *et al.*, 1999; Lambert *et al.*, 2000a; Yao et Pajor, 2002; Kohler *et al.*, 2003; Ehnes *et al.*, 2004a).

An unambiguous observation from MTS reagent labelling is that cysteine residues inserted in 9 different positions within loop 13-14 are accessible from the external solution by MTSET and/or MTSES. In the present study, MTSES was found to be more potent than MTSET. Six mutants were exclusively sensitive to MTSES (N565C, K567C, A605C, E625C, M632C and T635C), 3 mutants were affected by both MTSES and MTSET and none of the mutants was exclusively affected by MTSET. In the 3 cases where both MTS

reagents were effective, the effects do not appear to be charge-related as MTSET and MTSES do not simply have opposite effects on the parameter measured. In addition, an effect on I_{cotr} was not systematically accompanied by an effect on the I_{leak} . We can deduce from the MTS results that the amino acids in positions 565, 567, 588, 605, 624, 625, 632 and 635 within the last hydrophilic loop are hydrated and accessible from the extracellular medium by small hydrophilic compounds like MTSES and MTSET. We also assessed the accessibility of the C-terminus amino acid, A664, as both MTSES and MTSET affected transport through the A664C mutant.

Fluorescent labelling

Introducing cysteine into positions 586, 588 or 624 allowed significant binding of the fluorescent agent TMR5M, which could be prevented by pre-exposure to MTS reagents. While the cysteines inserted into position 588 and 624 were shown to be affected by exposure to MTS reagents (see Fig. 3.4 and 3.5), transport through the mutant E586C was not affected by the MTS reagent although the mutant protein was clearly labelled with TMR5M in the absence of the MTS reagent. This appears to be a situation where the MTS reagent bound to the cysteine residue without perturbing SGLT1 function. In the 7 other cases presented in Fig. 3.4, MTS reagents could reach the cysteine residues but the fluorophore could not. This could indicate that access to the cysteine residue is limited such that a molecule the shape of the fluorophore used could not reach this position. It should also be recalled that, as the fluorescent probe is maleimide based, it could react differently than do the MTS reagents.

Affinities for α MG and Pz

Amino acids 604-610 of rSGLT1 have been proposed to be important for Pz binding based on changes in K_i^{Pz} , but not in $K_m^{\alpha MG}$, of lysine mutants of the complete rSGLT1 protein expressed in COS-7 cells (Novakova *et al.*, 2001). However, the most convincing results supporting this proposal were obtained using mutated version of the isolated and purified loop 13-14 rather than intact SGLT1. Raja *et al.* (2003) and Xia *et al.* (2003) have

observed that Pz bound to this loop in situ (with K_d values similar to that seen with the wild-type isolated loop, ranging from 15 to 26 μM) and changed the fluorescence quenching (Trp fluorescence) of the mutated isolated loop which had the modified putative Pz binding site (D611W had a K_d of 54 μM). In our study, only mutant D607C exhibited a significant change in $K_m^{\alpha\text{MG}}$, but 3 mutants in the putative Pz site had a different K_i^{Pz} . The sequence AYDL (position 605-608) is conserved between SGLT1 and SGLT3 but is replaced by CLLW in SGLT2, which is also Pz sensitive but with a higher K_i than SGLT1 (9 μM at -50 mV in pSGLT2, measured by electrophysiology using SGLT2 expressed in *Xenopus* oocytes) (Mackenzie *et al.*, 1996). It is interesting that our study using the whole cotransporter revealed that a cysteine introduced to replace any of the normal A, Y or D residues produced a significant increase in the Pz K_i . While confirming the possible interaction between this segment and Pz, it seems that mutation to cysteine produces very little change, indicating that the geometry of AYDL is not a crucial element in favouring Pz binding.

Topology in the last TMS

The presently accepted topologic model of the Na^+ /glucose cotransporter has slowly evolved (Turk et Wright, 1997) since the cloning of the cotransporter. An N-glycosylation insertion site study helped to test the orientation of most of the previously proposed 12 TMS (Turk *et al.*, 1996), confirming certain TMS orientations and adding one TMS near the N-terminus and another at the C-terminus. Since that time, some evidence has arisen to challenge the assigned topology of the C-terminal region of the protein (Lin *et al.*, 1999).

Fig. 3.8 illustrates the experimental evidence underlying the topologic model of the last 4 TMS. For TMS XI to XIII, the first experimental evidence supporting the topologic model is that amino acid Q457 can be mutated into a cysteine which can be reached and altered by MTSES, MTSET and MTSEA or labelled with TMR6M (Fig. 3.8, position a) (Loo *et al.*, 1998; Meinild *et al.*, 2002). A subsequent glycosylation scanning study found that insertion of a glycosylation site at position 518 resulted in a functional, glycosylated transporter indicating that this sequence was facing the extracellular medium (Fig. 3.8, position b) (Turk *et al.*, 1996).

The topology of loop 13-14 has been directly or indirectly tested using several different methods but contradictory results have been obtained. Insertion of a glycosylation site into loop 13-14 resulted in a non-functional protein (Turk *et al.*, 1996), possibly due to the difficulties of inserting such a long segment (42 amino acids) without affecting the protein structure. Using ultra-thin frozen sections of rat kidney, immunohistochemical localization of SGLT1 with gold particles and a specific antibody recognizing amino acids 564 to 575 suggested an intracellular location for this epitope in SGLT1 (Fig. 3.8, position c) (Takata *et al.*, 1991). Insertion of a polyhistidine tag by Kinne's lab (Lin *et al.*, 1999) indicated that the protein region between amino acids 584 and 630 should be extracellular. A major drawback of this study is that 7 of the 11 mutants were nonfunctional, which precludes their use in ascertaining the membrane topology of correctly folded (i.e. active) SGLT1. Of the 4 functional mutants, 2 showed that positions 584-589 and positions 622-627 were located extracellularly (Fig. 3.8, positions d and f). Some other SGLT1 peptide sequences were also used in the same study to create specific, epitope-directed antibodies against wtSGLT1 expressed in CHO cells.

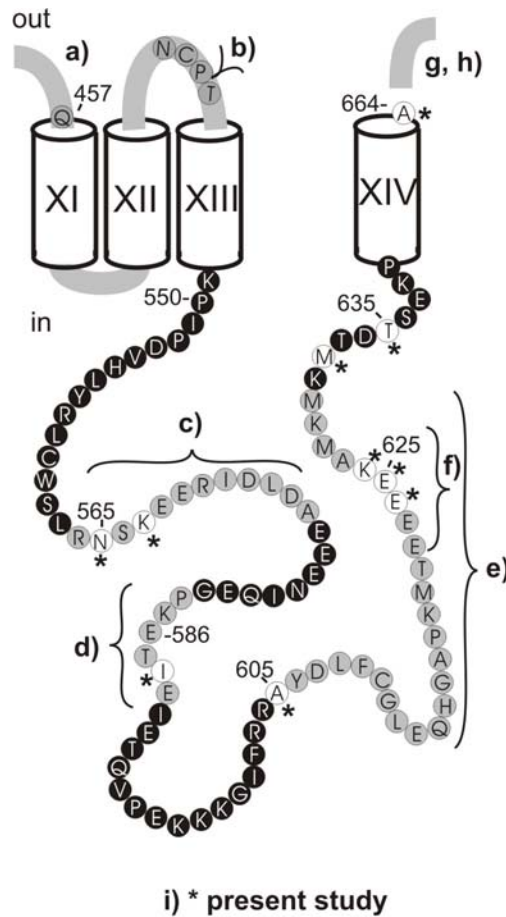


Figure 3.8: Summary of experimental results from the present study and from other labs for accessibility of the last 4 transmembrane segments.

TMS are identified by Roman numerals and numbers indicating position in the human SGLT1 protein sequence are shown and the extracellular and intracellular side are indicated by the words "out" and "in", respectively. a) The residue Q457 is accessible from the extracellular medium to both MTS reagents and to the TMR6M fluorescent probe (Meinild *et al.*, 2002). b) Insertion of an N-glycosylation site at position 518 produced a functional mutant and the amino acid residue was glycosylated, suggesting the accessibility of the site from extracellular milieu (Turk *et al.*, 1996). c) An antibody recognizing an epitope of amino acids 564 to 575 localized this epitope at the cytoplasmic surface of the membrane in rat kidney sections (Takata *et al.*, 1991). d), e), and f) Two 6-His mutants (from 584 to 589 and from 622 to 627) were functional and labelled with an antibody in non-permeabilized COS-7 cells, and an antibody recognizing an epitope from AA 606 to 630 in non-permeabilized COS-7 cells suggested extracellular location (Lin *et al.*, 1999). g) 6-His extension functional mutant (position 662) observed in permeabilized cells, suggesting intracellular location (Lin *et al.*, 1999). h) An antibody directed against a VSVG tag added to the C-terminus of rSGLT1 recognized its epitope in permeabilized Caco-2 cells only, also suggesting intracellular location (Turner *et al.*, 1996). i) Accessible residues examined in this study are shown in white with stars.

These results confirmed the topology of regions 306-311 (intracellular), 336-356 (extracellular) and 402-407 (intracellular) in SGLT1. The present study shows 15 cysteine mutants, all functional, of which amino acids 565, 567, 586, 588, 605, 624, 625, 632 and 635 in loop 13-14 (was after being mutated into a cysteine) could be reached by hydrophilic MTS reagents and/or by a fluorophore in the extracellular solution. This indicates that cysteine substitution creates less perturbation of SGLT1 structure than does 6-His insertion. For several of our Cys substitutions, additional credibility is provided by obtaining evidence of accessibility by the use of two different procedures. Our results with loop 13-14 are globally in accordance with the results from Kinne's lab (Lin *et al.*, 1999) but contradict the immunohistochemical localization of residues 564-575 using kidney section (Takata *et al.*, 1991).

A few studies have attempted to experimentally determine the orientation of the C-terminus in SGLT1. Turner *et al.* (1996) successfully expressed a VSVG-tagged rSGLT1 in Cos-1 and Caco-2 cells. Unfortunately, the protein did exhibit severely attenuated transport, suggesting a functionally important conformational change. In addition, the protein was mistargeted to the basolateral membrane. As the anti-VSVG antibody required cell permeabilization to yield significant labelling, it was concluded that the C-terminus was facing the intracellular milieu (Fig. 3.8, position h). The position of the C-terminus was also deduced to be either intracellular or to be part of the transmembrane domain following addition of 6-His at position 662, observed in permeabilized COS-7 cells (Fig. 3.8, position g) (Lin *et al.*, 1999). Unfortunately, in *Xenopus* oocytes, this result couldn't be confirmed using another tag as addition of myc, HA or poly-His tags to the C-terminus did not produce a functional cotransporter (Bissonnette *et al.*, 1999). Overall, the exact location of the C-terminus is not well established. The addition of a tag at the C-terminus could itself affect the membrane insertion of the last TMS, as apparently happened with insertion of an N-glycosylation sequence at the N-terminus (Turk *et al.*, 1996). We have shown that both MTSES and MTSET increased the I_{leak} by about 50% and that MTSET reduced the I_{cotr} by almost 60% for mutant A664C. It was thus concluded that this amino acid was accessible from the extracellular medium. A single amino acid substitution is likely to have less of an

effect on the topology of the C-terminal region than would a hexapeptide insertion, the present study provides an additional support to the contention that the C-terminus of SGLT1 is facing the extracellular milieu.

The hypothesis of a re-entrant loop

As discussed above, strong evidence supports the orientation of TMS XIII as shown in Fig 8 and, despite some contradictory interpretations, the present study suggests that the C-terminus of TMS XIV is extracellular. This would indicate that loop 13-14 would start and finish at the intracellular side and could form some kind of re-entrant loop, allowing accessibility from the extracellular solution. Recently obtained crystal structures of different cotransporters and channels indicate that, in several instances, short membrane-interacting short helices were not correctly predicted from hydrophathy profiles (Foster *et al.*, 1983; Dutzler *et al.*, 2002; Abramson *et al.*, 2003; Savage *et al.*, 2003). One peculiarity of loop 13-14 is its considerable hydrophilicity, which would normally preclude any membrane-interacting configuration for this segment. This feature, and the ambiguous membrane orientation of this highly charged loop which is indicated by the present study, are reminiscent of the voltage-sensor (S4 segment) of voltage-dependent ion channels, whose transmembrane orientation remains controversial (2003; Jiang *et al.*, 2003a; 2004).

In summary, immunolocalization, using peptide-specific antibodies or peptide tags (Lin *et al.*, 1999), and the MTS accessibility results presented in this study are not consistent with the membrane topology proposed in 1996 (Turk *et al.*, 1996) as shown in Fig 8. Some experimental evidence has been shown to confirm the orientations of TMS XI and TMS XIII (Turk *et al.*, 1996; Loo *et al.*, 1998) but the orientation of the last TMS remains ambiguous (Turk *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 1996, this study; Lin *et al.*, 1999). As the long "intracellular" loop 13-14 appears to be accessible from the external solution, at least at positions 565-589 and 605-635, and as MTS reagents can affect the functions of some mutant, this interesting loop may form a re-entrant loop or else be exposed at both surfaces, either simultaneously or at different points during the transport cycle.

Acknowledgments

We would like to express our gratitude to Michel Brunette for technical assistance and help with experimental setup. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant # MOP-10580). D.G.G. is a NSERC and FRSQ postgraduate scholar.

Received 11 February 2005; received in revised form 29 March 2005; accepted 18 April 2005. Available online 4 May 2005.

Abbreviations:

SGLT1, high affinity Na⁺/glucose cotransporter; hSGLT1, human isoform of SGLT1; rSGLT1, rabbit isoform of SGLT1; wtSGLT1, wild-type SGLT1; SCAM, substituted cysteine accessibility method; MTS, methanethiosulfonate; MTSES, sodium (2-sulfonatoethyl)methane thiosulfonate; MTSET, [2-(Trimethylammonium)ethyl]methanethiosulfonate bromide; MTSEA, 2-aminoethyl methanethiosulfonate hydrobromide; TMR5(6)M, tetramethylrhodamine-5(or 6)-maleimide; TMS, transmembrane segment; Pz, phlorizin; αMG, α-Methyl-glucose; V_m, membrane potential; *I*_{cotr}, αMG cotransport current; *I*_{leak}, Na⁺ leak current; AA, amino acid; $K_m^{\alpha\text{MG}}$, apparent affinity for αMG; K_i^{Pz} , inhibition constant of Pz; $K_m^{\text{Na}^+}$, apparent affinity for Na⁺; VSVG, vesicular stomatitis virus G protein.

References

- [1] E. Turk, C.J. Kerner, M.P. Lostao and E.M. Wright, Membrane topology of the human Na⁺/glucose cotransporter SGLT1, *J Biol Chem* 271 (1996) 1925-34.
- [2] M. Panayotova-Heiermann, S. Eskandari, E. Turk, G.A. Zampighi and E.M. Wright, Five transmembrane helices form the sugar pathway through the Na⁺/glucose cotransporter, *J Biol Chem* 272 (1997) 20324-7.
- [3] M. Panayotova-Heiermann and E.M. Wright, Mapping the urea channel through the rabbit Na⁽⁺⁾-glucose cotransporter SGLT1, *J Physiol* 535 (2001) 419-25.
- [4] D.D. Loo, B.A. Hirayama, E.M. Gallardo, J.T. Lam, E. Turk and E.M. Wright, Conformational changes couple Na⁺ and glucose transport, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 7789-94.
- [5] A.K. Meinild, B.A. Hirayama, E.M. Wright and D.D. Loo, Fluorescence studies of ligand-induced conformational changes of the Na⁽⁺⁾/glucose cotransporter, *Biochemistry* 41 (2002) 1250-8.
- [6] S.A. Huntley, D. Krofchick and M. Silverman, Position 170 of Rabbit Na⁺/Glucose Cotransporter (rSGLT1) Lies in the Na⁺ Pathway; Modulation of Polarity/Charge at this Site Regulates Charge Transfer and Carrier Turnover, *Biophys J* 87 (2004) 295-310.
- [7] B. Lo and M. Silverman, Cysteine scanning mutagenesis of the segment between putative transmembrane helices IV and V of the high affinity Na⁺/Glucose cotransporter SGLT1. Evidence that this region participates in the Na⁺ and voltage dependence of the transporter, *J Biol Chem* 273 (1998a) 29341-51.
- [8] B. Lo and M. Silverman, Replacement of Ala-166 with cysteine in the high affinity rabbit sodium/glucose transporter alters transport kinetics and allows

- methanethiosulfonate ethylamine to inhibit transporter function, *J Biol Chem* 273 (1998b) 903-9.
- [9] S. Vayro, B. Lo and M. Silverman, Functional studies of the rabbit intestinal Na⁺/glucose carrier (SGLT1) expressed in COS-7 cells: evaluation of the mutant A166C indicates this region is important for Na⁺-activation of the carrier, *Biochem J* 332 (Pt 1) (1998) 119-25.
- [10] J. Abramson, I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H.R. Kaback and S. Iwata, Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*, *Science* 301 (2003) 610-5.
- [11] J. Lin, J. Kormanec, D. Homerova and R.K. Kinne, Probing transmembrane topology of the high-affinity Sodium/Glucose cotransporter (SGLT1) with histidine-tagged mutants, *J Membr Biol* 170 (1999) 243-52.
- [12] R. Novakova, D. Homerova, R.K. Kinne, E. Kinne-Saffran and J.T. Lin, Identification of a region critically involved in the interaction of phlorizin with the rabbit sodium-D-glucose cotransporter SGLT1, *J Membr Biol* 184 (2001) 55-60.
- [13] X. Xia, J.T. Lin and R.K. Kinne, Binding of phlorizin to the isolated C-terminal extramembranous loop of the Na⁺/glucose cotransporter assessed by intrinsic tryptophan fluorescence, *Biochemistry* 42 (2003) 6115-20.
- [14] M.M. Raja, N.K. Tyagi and R.K. Kinne, Phlorizin recognition in a C-terminal fragment of SGLT1 studied by tryptophan scanning and affinity labeling, *J Biol Chem* 278 (2003) 49154-63.
- [15] P. Bissonnette, J. Noel, M.J. Coady and J.Y. Lapointe, Functional expression of tagged human Na⁺-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes, *J Physiol* 520 Pt 2 (1999) 359-71.
- [16] C.L. Fisher and G.K. Pei, Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method, *Biotechniques* 23 (1997) 570-1, 574.

- [17] M.P. Gagnon, P. Bissonnette, L.M. Deslandes, B. Wallendorff and J.Y. Lapointe, Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by Na⁺/glucose cotransport, *Biophys J* 86 (2004) 125-33.
- [18] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins, The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res* 25 (1997) 4876-82.
- [19] L. Parent, S. Supplisson, D.D. Loo and E.M. Wright, Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies, *J Membr Biol* 125 (1992) 49-62.
- [20] A. Fabiato and F. Fabiato, Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells, *J Physiol (Paris)* 75 (1979) 463-505.
- [21] S. Jung, M.H. Akabas and R.A. Harris, Functional and structural analysis of the GABAA receptor $\alpha 1$ subunit during channel gating and alcohol modulation, *J Biol Chem* (2004).
- [22] A. Karlin and M.H. Akabas, Substituted-cysteine accessibility method, *Methods Enzymol* 293 (1998) 123-45.
- [23] C. Ehnes, I.C. Forster, K. Kohler, A. Bacconi, G. Stange, J. Biber and H. Murer, Structure-Function Relations of the First and Fourth Predicted Extracellular Linkers of the Type IIa Na⁺/Pi Cotransporter: I. Cysteine Scanning Mutagenesis, *J Gen Physiol* 124 (2004) 475-88.
- [24] M. Simoes, L. Garneau, H. Klein, U. Banderali, F. Hobeila, B. Roux, L. Parent and R. Sauve, Cysteine mutagenesis and computer modeling of the S6 region of an intermediate conductance IKCa channel, *J Gen Physiol* 120 (2002) 99-116.

- [25] Y. Dodier, U. Banderali, H. Klein, O. Topalak, O. Dafi, M. Simoes, G. Bernatchez, R. Sauve and L. Parent, Outer pore topology of the ECaC-TRPV5 channel by cysteine scan mutagenesis, *J Biol Chem* 279 (2004) 6853-62.
- [26] N. Chakrabarti, B. Roux and R. Pomes, Structural determinants of proton blockage in aquaporins, *J Mol Biol* 343 (2004) 493-510.
- [27] T.W. Allen, O.S. Andersen and B. Roux, Energetics of ion conduction through the gramicidin channel, *PNAS* 101 (2004) 117-122.
- [28] S.Y. Noskov, W. Im and B. Roux, Ion Permeation through the α -Hemolysin Channel: Theoretical Studies Based on Brownian Dynamics and Poisson-Nernst-Planck Electrodiffusion Theory, *Biophys. J.* 87 (2004) 2299-2309.
- [29] Y. Arinaminpathy, P.C. Biggin, I.H. Shrivastava and M.S.P. Sansom, A prokaryotic glutamate receptor: homology modelling and molecular dynamics simulations of GluR0, 553 (2003) 321.
- [30] H.R. Kaback, M. Sahin-Toth and A.B. Weinglass, The kamikaze approach to membrane transport, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001) 610-20.
- [31] G. Lambert, I.C. Forster, G. Stange, K. Kohler, J. Biber and H. Murer, Cysteine mutagenesis reveals novel structure-function features within the predicted third extracellular loop of the type IIa Na⁽⁺⁾/P(i) cotransporter, *J Gen Physiol* 117 (2001) 533-46.
- [32] X. Yao and A.M. Pajor, Arginine-349 and aspartate-373 of the Na⁽⁺⁾/dicarboxylate cotransporter are conformationally sensitive residues, *Biochemistry* 41 (2002) 1083-90.
- [33] A.M. Pajor, Conformationally sensitive residues in transmembrane domain 9 of the Na⁽⁺⁾/dicarboxylate co-transporter, *J Biol Chem* 276 (2001) 29961-8.
- [34] A.M. Pajor, S.J. Krajewski, N. Sun and R. Gangula, Cysteine residues in the Na⁽⁺⁾/dicarboxylate co-transporter, NaDC-1, *Biochem J* 344 Pt 1 (1999) 205-9.

- [35] G. Lambert, I.C. Forster, J. Biber and H. Murer, Cysteine residues and the structure of the rat renal proximal tubular type II sodium phosphate cotransporter (rat NaPi IIa), *J Membr Biol* 176 (2000) 133-41.
- [36] K. Kohler, I.C. Forster, G. Stange, J. Biber and H. Murer, Essential cysteine residues of the type IIa Na⁺/Pi cotransporter, *Pflugers Arch* 446 (2003) 203-10.
- [37] C. Ehnes, I.C. Forster, K. Kohler, A. Bacconi, G. Stange, J. Biber and H. Murer, Structure-Function Relations of the First and Fourth Predicted Extracellular Linkers of the Type IIa Na⁺/Pi Cotransporter: I. Cysteine Scanning Mutagenesis, *J. Gen. Physiol.* 124 (2004) 475-488.
- [38] B. Mackenzie, D.D. Loo, M. Panayotova-Heiermann and E.M. Wright, Biophysical characteristics of the pig kidney Na⁺/glucose cotransporter SGLT2 reveal a common mechanism for SGLT1 and SGLT2, *J Biol Chem* 271 (1996) 32678-83.
- [39] E. Turk and E.M. Wright, Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family, *J Membr Biol* 159 (1997) 1-20.
- [40] K. Takata, T. Kasahara, M. Kasahara, O. Ezaki and H. Hirano, Localization of Na⁽⁺⁾-dependent active type and erythrocyte/HepG2-type glucose transporters in rat kidney: immunofluorescence and immunogold study, *J Histochem Cytochem* 39 (1991) 287-98.
- [41] J.R. Turner, W.I. Lencer, S. Carlson and J.L. Madara, Carboxy-terminal vesicular stomatitis virus G protein-tagged intestinal Na⁺-dependent glucose cotransporter (SGLT1): maintenance of surface expression and global transport function with selective perturbation of transport kinetics and polarized expression, *J Biol Chem* 271 (1996) 7738-44.
- [42] R. Dutzler, E.B. Campbell, M. Cadene, B.T. Chait and R. MacKinnon, X-ray structure of a Cl⁻ chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity, *Nature* 415 (2002) 287-94.

- [43] D.L. Foster, M. Boublik and H.R. Kaback, Structure of the lac carrier protein of *Escherichia coli*, *J Biol Chem* 258 (1983) 31-4.
- [44] D.F. Savage, P.F. Egea, Y. Robles-Colmenares, J.D. O'Connell, 3rd and R.M. Stroud, Architecture and selectivity in aquaporins: 2.5 a X-ray structure of aquaporin Z, *PLoS Biol* 1 (2003) E72.
- [45] M. Laine, D.M. Papazian and B. Roux, Critical assessment of a proposed model of Shaker, *FEBS Lett* 564 (2004) 257-63.
- [46] M. Laine, M.C. Lin, J.P. Bannister, W.R. Silverman, A.F. Mock, B. Roux and D.M. Papazian, Atomic proximity between S4 segment and pore domain in Shaker potassium channels, *Neuron* 39 (2003) 467-81.
- [47] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B.T. Chait and R. MacKinnon, X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel, *Nature* 423 (2003a) 33-41.
- [48] Y. Jiang, V. Ruta, J. Chen, A. Lee and R. MacKinnon, The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel, *Nature* 423 (2003b) 42-8.

4 Identification of a disulfide bridge linking the 4th and the 7th extracellular loops of the Na⁺/glucose cotransporter

Dominique G. Gagnon, Pierre Bissonnette et Jean-Yves Lapointe
The Journal of General Physiology, 127: 145-158, 2006.

Résumé

Le cotransporteur Na⁺/glucose (SGLT1) est un archétype pour la famille SLC5 qui regroupe des transporteurs couplés au Na⁺ pour des sucres, le myo-inositol, la choline et les anions organiques. Un traitement avec un agent réducteur (le dithiothréitol, DTT, 10 mM) sur des ovocytes exprimant SGLT1 humain en affecte les courants transitoires. L'intégration de ces courants pour différents potentiels membranaires (V_m) fournit la courbe Q-V, qui a été déplacée de +25 mV après le traitement au DTT. Le rôle des 15 cystéines endogènes a été étudié avec des protéines mutantes contenant chacune une mutation qui enlève une cystéine, exprimées dans les ovocytes de *Xenopus*, avec le voltage imposé en deux micro-électrodes et le marquage fluorescent. 12 des 15 mutants étaient fonctionnels et ont été classés dans trois groupes selon l'effet de la mutation sur la courbe Q-V: quatre mutants n'ont pas perturbé la charge transférée, six mutants ont une courbe Q-V déplacée vers les V_m plus négatifs et deux mutants (C255A et C511A) ont produit un déplacement vers les V_m plus positifs, d'une valeur identique à celui produit par le DTT sur SGLT1 sauvage (wt). Le double mutant C_{255,511}A a confirmé que l'effet observé avec chacun des simples mutants n'était pas additif. Les affinités apparentes pour l' α -méthyl-glucose (α MG) des simples mutants C255A et C511A, du double mutant C_{255,511}A ainsi que celui du wt SGLT1 traité au DTT étaient toutes augmentées de la même façon par rapport à la valeur du wt SGLT1. Lorsqu'exposés à une sonde fluorescente possédant un groupement maléimide, la protéine sauvage n'a pas été marquée tandis que les deux mutants C255A et C511A l'étaient clairement, ce qui démontrait la présence d'une cystéine accessible. Ces deux cystéines sont présumément C511 et C255, respectivement, puisque le

double mutant C_{255,511}A n'est pas marqué par la sonde. Ces résultats valident très bien l'hypothèse que C255 et C511 forment un pont disulfure dans SGLT1 humain et que ce pont est important pour le changement de conformation du transporteur non lié au glucose.

Reproduit de *The journal of General Physiology*, 2006, 127:145-158. Copyright (2006), The Rockefeller University Press.

Summary

The Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) is an archetype for the SLC5 family which is comprised of Na⁺ coupled transporters for sugars, myo-inositol, choline and organic anions. Application of the reducing agent dithiothreitol (DTT, 10 mM) to oocytes expressing human SGLT1 affects the protein's presteady-state currents. Integration of these currents at different membrane potentials (V_m) produces a Q-V curve, whose form was shifted by +25 mV due to DTT. The role of the 15 endogenous cysteine residues was investigated by expressing SGLT1 constructs, each bearing a single mutation for an individual cysteine, in *Xenopus* oocytes, using two-microelectrode voltage-clamp electrophysiology and fluorescent labeling. 12 of the 15 mutants were functional and could be separated into three distinct groups based on the effect of the mutation on the Q-V curve: four mutants did not perturb the transferred charge, six mutants shifted the Q-V curve towards negative potentials and two mutants (C255A and C511A) produced a shift in the positive direction which was identical to the shift produced by DTT on the wild-type (wt) SGLT1. The double mutant C_{255,511}A confirms that the effects of each single mutant on the Q-V curve were not additive. With respect to wt SGLT1, the apparent affinities for α -methyl-glucose (α MG) were increased in a similar manner for the single mutants C255A and C511A, the double mutant C_{255,511}A as well as for wt SGLT1 treated with DTT. When exposed to a maleimide-based fluorescent probe, wt SGLT1 was not significantly labeled but mutants C255A and C511A could be clearly labeled, indicating an accessible cysteine residue. These residues are presumed to be C511 and C255, respectively, as the double mutant C_{255,511}A could not be labeled. These results strongly support the hypothesis that C255 and C511 form a disulfide bridge in human SGLT1 and that this disulfide bridge is involved in the conformational change of the free carrier.

Keywords: SGLT1, mutagenesis, electrophysiology, disulfide bridge, presteady-state current, kinetic model

Introduction

The Na⁺/glucose cotransporter SGLT1, responsible for intestinal absorption and renal reabsorption of glucose, was first postulated by Crane four decades ago (Crane, 1965). In 1987, the cDNA of a first Na⁺/glucose cotransporter was cloned from rabbit small intestine (Hediger *et al.*, 1987) which has enabled detailed characterization using expression in *Xenopus* oocytes with two-electrode voltage-clamp and cut-open oocyte electrophysiology. Exploration of steady-state and presteady-state kinetics (i.e. phlorizin-sensitive presteady-state currents) led to a simple kinetic model explaining ligand binding and conformational changes but the identification of the amino acids forming the actual binding sites for Na⁺, glucose and phlorizin (Pz) is still a matter of some debate (Parent *et al.*, ; 1992ba,b; Panayotova-Heiermann *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Panayotova-Heiermann *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Panayotova-Heiermann *et al.*, 1996; X.Z. Chen *et al.*, 1997b; Wright *et al.*, 1998; Lo et Silverman, 1998a; Wright et Turk, 2004).

Cysteine residues involved in disulfide bridges generally play an important role in stabilizing a protein's three dimensional structure. Studies identifying essential cysteine and potential disulfide bridges in transporters have been performed in the past and have led to the identification of some initial three dimensional constraints, which are generally difficult to obtain for membrane proteins (van Iwaarden *et al.*, 1991; Sahin-Toth *et al.*, 1994; J.G. Chen *et al.*, 1997a; Sur *et al.*, 1997; Lambert *et al.*, 2000ba,b, 2001; Kohler *et al.*, 2003; Murer *et al.*, 2004). In some studies, cysteine replacements were shown to affect the correct trafficking or stability of the protein in the plasma membrane but there was no evidence that this effect implied the breaking of a disulfide bridge (J.G. Chen *et al.*, 1997a; Sur *et al.*, 1997; Pajor *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2004).

The effect of the reducing agent dithiothreitol (DTT) on Na⁺/glucose cotransport (probably via SGLT2) was explored in 1983 on rabbit renal outer cortical brush border membranes (Turner et George, 1983, 1984) and the authors proposed that at least two disulfide bridges were important for Pz binding. Unfortunately, no extensive mutagenesis study on the endogenous cysteine residues of SGLT1 (or SGLT2) has been published.

However, a few observations suggest important roles for some cysteine residues in SGLT1 (Martin *et al.*, 1996b; Wright, 1998; Xia *et al.*, 2003, 2004). The mutations C292Y or C355S in human SGLT1 produce the hereditary disease glucose-galactose malabsorption syndrome (Martin *et al.*, 1996b; Wright, 1998). Cysteines in positions 560 and 608 (in rabbit SGLT1) have been proposed to form a disulfide bridge in the purified isolated loop between the last two transmembrane segments (Xia *et al.*, 2003, 2004). Recently, the mutations C351A and C361A have been shown to impair proper trafficking to the plasma membrane which was, however, present in the double mutant (C351A/C361A) (Xia *et al.*, 2005). Finally, endogenous cysteine residues in SGLT1 have been shown to be insensitive to alkylation by NEM or MTS reagents, which suggests that they are either physically inaccessible or involved in disulfide bridges (Loo *et al.*, 1998; Lo et Silverman, 1998a; Gagnon *et al.*, 2005).

The aim of the present study is to identify the cysteine residues involved in the functional effects caused by treating SGLT1 with DTT, using mutagenesis, electrophysiology and fluorescent labeling after expressing SGLT1 mutants in *Xenopus* oocytes. We mutated each endogenous cysteine residue individually into an alanine residue. Our results indicate that cysteine residues C255 and C511 form a disulfide bridge in SGLT1 which explains the effect of DTT on SGLT1. To our knowledge, the identification of this disulfide bridge represents the first three-dimensional constraint to the simple membrane topology proposed for SGLT1.

Material and method

Molecular biology

Mutant forms of SGLT1 were constructed using the human Na⁺/glucose cotransporter with an NH₂-terminal myc epitope in expression vector pBS (pBS-myc-hSGLT1) (Bissonnette *et al.*, 1999). Site-directed mutations were created following the method of Fisher and Pei (Fisher et Pei, 1997) and were confirmed by dideoxy DNA sequencing (Sheldon Biotechnology). QIAGEN mini-prep kits were used to extract DNA and, after EcoR1 digestion, the cDNA insert was transcribed in vitro using the T3 mMessage mMachine kit (Ambion).

Oocyte preparation and injection

Oocytes were surgically removed from *Xenopus laevis* frogs, dissected and defolliculated as described previously (Bissonnette *et al.*, 1999; Gagnon *et al.*, 2004). One d after defolliculation, oocytes were injected with 46 nl of mRNA solution (0.1 µg/µl and 0.25 µg/µl for wt SGLT1 and mutants, respectively) in order to obtain maximal protein expression. Oocytes were maintained in Barth's solution (in mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgSO₄, 0.41 CaCl₂, 0.33 Ca(NO₃)₂, 5 Hepes, pH 7.6) supplemented with 5 % horse serum, 2.5 mM Na⁺-pyruvate, 100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin for 4-7 d before being used in an experiment.

Electrophysiology

The saline solution normally used in our electrophysiological experiments is composed of (in mM): 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgCl₂, 0.74 CaCl₂, 10 Hepes and the pH was adjusted to 7.6 with NaOH. Two electrode voltage-clamp experiments were performed using an Oocyte Clamp OC-725 (Warner Instrument Corp) and a data acquisition system (Digidata 1322A and Clampex 8.2.0.228, Axon Instruments Inc, Union City, CA). Current and voltage microelectrodes were filled with 1 M KCl and had a resistance of 2-5 MΩ. The bath current electrode was a Ag-AgCl pellet and the reference electrode was a 1 M KCl

agar bridge. The oocytes were clamped to a membrane potential of -50 mV and three repetitions of membrane potential steps between $+70$ to -170 mV (by increments of 20 mV, 300 ms duration, no series resistance compensation used) were applied with an interval of 1.7 s between each step. Data was obtained with a sampling frequency of 10 kHz and the three repetitions were averaged for each experiment. DTT (Sigma-Aldrich) treatments were performed by exposing oocytes for 20 - 30 min at their resting potential to 2.5 mM DTT for steady-state measurements (α -methyl-glucose [α MG] affinity measurements) or to 10 mM for presteady-state and Na^+ leak measurements. As the effects of DTT were rapidly reversible, DTT was also present in all experimental solutions following the initial treatment.

Data analysis

Current versus membrane potential curves (I-V curves) were obtained by averaging the current data points at the end of each membrane potential step (between 150 and 300 ms, except for mutants in Group B [see below], which were measured between 250 and 300 ms). Determination of apparent affinity for α MG ($K_m^{\alpha MG}$) was done as described before (Bissonnette *et al.*, 1999). Using the same pulse protocol, presteady-state current analysis (Q-V curves) was performed by subtracting the integrated baseline-corrected currents in phlorizin solution (200 μ M) from similar currents in saline solution. In general, the correction for steady-state currents was done by removing the mean current measured between 50 and 80 ms after the initiation of a voltage pulse. This was done in order to minimize the contribution of slower time-dependent increases in measured current that were sometimes observed at extreme membrane potentials. For some mutated proteins which presented significantly slower presteady-state currents, as compared to wt SGLT1 (Group B), the mean currents were taken at the end of the pulse (from 270 to 300 ms). A simple Boltzmann equation was fitted to the Q-V curve to estimate $V_{1/2}$ (the voltage at which half of the charge is transferred), Q_{\max} (the amplitude of the total charge transferred), and z (the valence of the transferred charge) (Bissonnette *et al.*, 1999). The time constants were evaluated by fitting a double exponential on the I_{transit} ($I_{\text{saline}} - I_{Pz}$) with the Clampfit 8.2 program (Axon Instruments Inc.).

Modelling of presteady-state currents

The presteady-state current time constants and transferred charges were calculated using a four-state kinetic model that we have proposed in a previous publication (Chen *et al.*, 1996) (see Appendices 4-A and 4-B and discussion for details). The numerical simulations were performed using Matlab 6.5.0 software (The Math Works Inc.). The transferred charges were analysed by fitting a Boltzmann curve to the calculated data in order to extract the $V_{1/2}$ and z parameters. The parameters of the model were adjusted by trial and error to obtain a satisfactory fit to the measured $V_{1/2}$ and the slow time constants of the presteady-state currents.

Plasma membrane preparation of oocytes and Western blot detection

Preparation of enriched plasma membrane fractions from oocytes and Western blot detection were performed as previously described (Bissonnette *et al.*, 1999). Briefly, 20 oocytes were rinsed then homogenized in 1.5 ml homogenization solution (50 mM mannitol, 2 mM Tris, 5 mM EGTA supplemented with a protease inhibitor cocktail [Sigma-Aldrich]), pH 7.0). Three consecutive centrifugations were performed (2×10 min at 1,000 g and 1×20 min at 10,000 g, at 4 °C) and the final pellet was resuspended in 10 μ l of homogenization solution. 10 μ l of Laemmli solution was added and the samples were loaded onto SDS-polyacrylamide gels for electrophoresis. The quality of transfer onto nitrocellulose was verified using Ponceau red staining. For Western blots, the membrane was blocked against nonspecific binding (5% fat milk in TBS, 1 h at room temperature), then incubated with the primary antibody (anti-myc, 1:500 in blocking solution, overnight at 4 °C). The membrane was washed, blocked again and then incubated with the secondary antibody (HRP-conjugated anti-mouse IgG, 1:1,000 in blocking solution) at room temperature for 1 h. After final washing steps, blots were revealed by enhanced chemiluminescence detection (Phototope-HRP, New England Biolabs).

Fluorescence

Fluorescence measurements were done as previously described (Gagnon *et al.*, 2005). In brief, a 5-10 min fluorescent labeling was performed on ice in a saline solution containing 20 μ M tetramethylrhodamine-5-maleimide fluorescent probe (TMR5M, Molecular Probes, Eugene OR) at the oocyte's resting potential. Oocytes were preincubated 5-10 min on ice before the fluorescent probe was added. Fluorescence intensity was read, at the animal pole, using excitation and emission filters (10 nm bandwidth) wavelength centered at 500 nm and 600 nm, respectively.

Statistics

Experiments were performed on at least three oocytes obtained from a minimum of two different donors. Data are reported as mean \pm SEM (except when otherwise noted) and are compared using unpaired Student's *t*-test; statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

DTT effect on wild-type SGLT1 activity

We tested the effects of breaking disulfide bridges with DTT on steady-state parameters (cotransport current due to the addition of 5 mM α MG [I_{cotr}], Na^+ leak current [I_{leak}], apparent affinities for the sugar substrate [$K_m^{\alpha MG}$]) and on presteady-state currents (Q-V curves) of the wt human SGLT1. Prior to DTT treatment, our measurements were fully consistent with those previously published for human SGLT (Parent *et al.*, 1992aa,b; Loo *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1996; Hirayama *et al.*, 1996; Bissonnette *et al.*, 1999). Fig. 4.1 illustrates the effects of DTT on steady state parameters of wt SGLT1. The reducing treatment was found to decrease I_{leak} (Fig. 4.1 B) as well as the apparent affinities for α MG (panel C) without having any significant effect on I_{cotr} (panel A).

The effect of DTT treatment on the transferred charge curve, shown in Fig. 4.2, demonstrates a clear cut shift of +25 mV (see Fig. 4.2 B) from a $V_{1/2}$ of -46 ± 3 mV under control conditions (n=9) to -21 ± 1 mV in the presence of DTT (n=6). As shown in Fig. 4.2 C, the effects of DTT on the presteady-state currents of wt SGLT1 are not only to shift the Q-V curve toward more positive potentials but also to accelerate the presteady-state current. Prior to the DTT treatment, the slow time constant of the presteady-state current is observed to plateau at 10 ms for all hyperpolarizing potentials whereas in DTT the plateau is found around 4.5 ms. This effect requires ~20-25 min to be complete, and is completely reversible when DTT is removed from bathing solutions (unpublished data). It is clear that the total charge transferred and the z parameter (related to the slope of the Q-V curve) are not affected by the reducing agent, which affects only the $V_{1/2}$ parameter and the time constant.

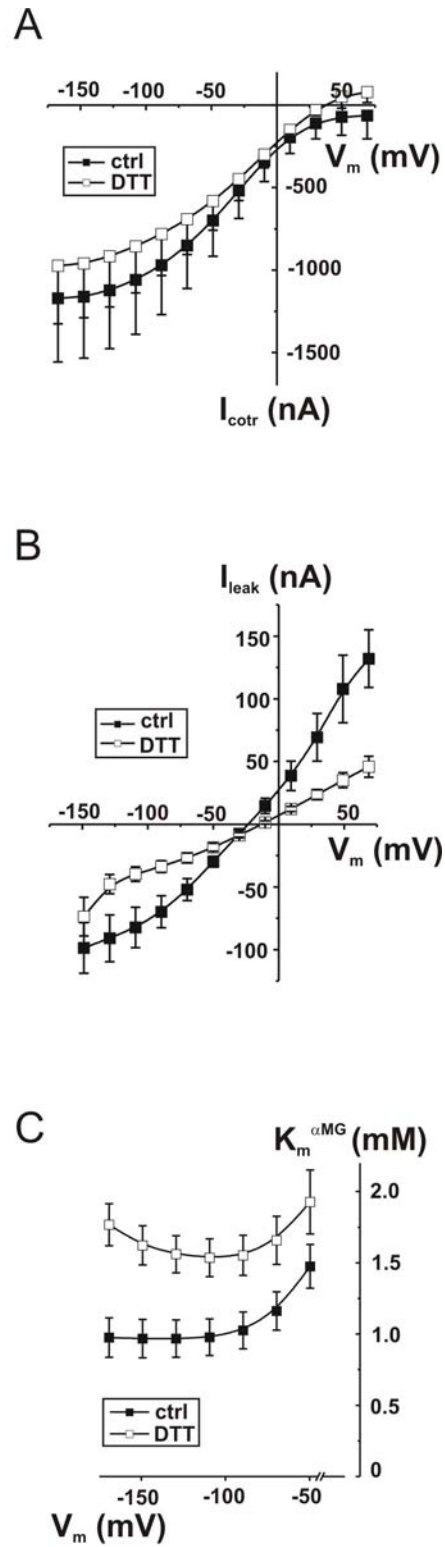


Figure 4.1: Effects of DTT exposure on steady-state parameters of wt Na^+ /glucose cotransporter (wt SGLT1).

(A) Effect of DTT on α MG cotransport current (I_{cotr}) of wt SGLT1. Estimation of the currents was done under control conditions (filled symbols) and in the presence of DTT (2.5 mM) (open symbols) on each oocyte ($n=3$, paired experiments). (B) Effect of DTT on Na^+ leak current (I_{leak}) of wt SGLT1. A 30-min exposure with 10 mM DTT was done before the experimental test of I_{leak} (done in the presence of DTT). ($n=6$ for control conditions, filled symbols, $n=5$ for DTT, open symbols, unpaired experiments). (C) Effect of DTT on apparent affinity for α MG ($K_m^{\alpha MG}$) as a function of membrane potential (V_m). Estimation of the apparent affinity for α MG was done under control conditions (filled symbols) and in the presence of DTT (2.5 mM) (open symbols) on each oocyte ($n=4$, paired experiments).

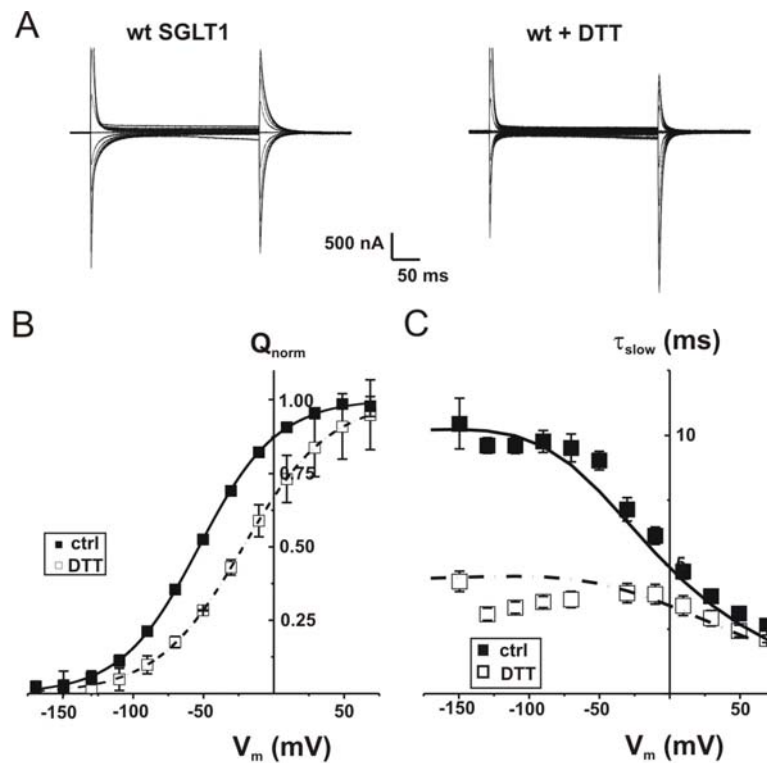


Figure 4.2: Effect of DTT exposure on presteady-state parameters of wt Na^+ /glucose cotransporter (wt SGLT1).

(A) Presteady-state currents (Pz-sensitive currents in the absence of glucose) of a typical oocyte expressing wt SGLT1 under control conditions and after exposure to DTT (30 min preincubation with 10 mM DTT, with DTT present in subsequent experimental solutions). (B) Effect of DTT on transferred charges (Q - V curve) of wt SGLT1. Q - V curves were fitted with a Boltzmann equation (see MATERIALS AND METHODS), adjusted to 0 at hyperpolarizing voltages and normalized with respect to the extrapolated Q_{max} ($n=9$ for control conditions, filled symbols, $n=6$ for DTT, open symbols, unpaired experiments). (C) Time constant of the 10-ms component of presteady-state currents of wt SGLT1 compared

to wt + DTT. The curves represent the time constants evaluated with a four-state model of presteady-state currents with parameters described in Table IV.I.

As the presteady-state currents are thought to originate from the movement of a charged portion of SGLT1 in the membrane electric field and/or from the voltage-dependent Na^+ binding step (Parent *et al.*, 1992aa,b), we hypothesized that one or more disulfide bridges were playing important roles in one or both of these steps. The presence of a disulfide bridge can be assessed by mutating each endogenous cysteine residue, which would potentially remove a disulfide bridge, and further tested by studying double mutants. If a cysteine residue plays an important functional role through a disulfide bridge, mutating either of the two cysteines involved should produce equivalent effects. In addition, mutating a cysteine residue involved in a disulfide bridge should not produce any effect if its partner cysteine has already been replaced (i.e., comparing a single with a double cysteine mutant).

Molecular biology and expression of mutants SGLT1s

Fig. 4.3 illustrates the position of the 15 endogenous cysteine residues present in the human Na^+ /glucose cotransporter using a modified topologic model (Gagnon *et al.*, 2005) based on the model originally proposed by Turk *et al.* (1996). Mutants were tested using two micro-electrode electrophysiology. We first tested the three basic electrophysiological characteristics: I_{cotr} (current due to the addition of 5 mM αMG), I_{leak} (currents in the saline solution minus the currents measured in the presence of 200 μM Pz) and the charge transferred (Q-V).

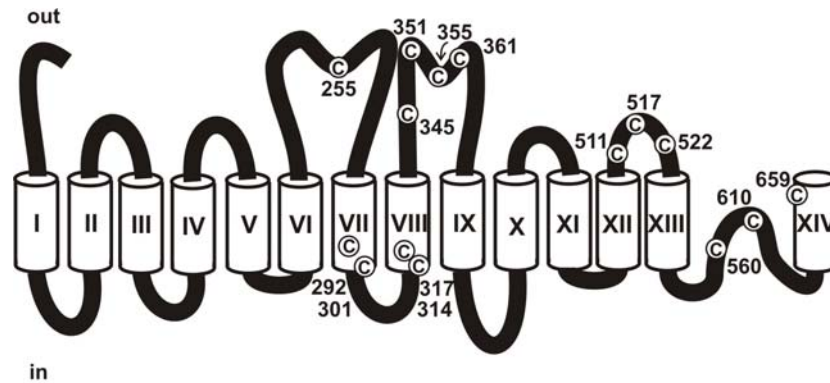


Figure 4.3: A modified topological model of SGLT1.

Transmembrane segments are identified by Roman numerals, amino acid positions of endogenous cysteine residues, depicted in white circles, are indicated and the extracellular and intracellular side are indicated by the words "out" and "in", respectively.

Of the 15 single mutants generated, only three were non-functional: C351A, C355A and C361A. These mutants displayed no presteady-state currents, no I_{leak} and no I_{cotr} . The possibility that the sugar affinity could have been vastly decreased was investigated by applying 100 mM α MG to these mutants but still no cotransport currents could be detected ($n=3$). Through Western blot detection against plasma membrane enriched subcellular fractions of oocytes expressing these mutant proteins, SGLT1 expression could be detected for C351A and C361A but not for mutant C355A (Fig. 4.4). In a few experiments, a very weak band could be observed for C355A indicating that the protein was poorly translated or generated an unstable product. As preparations enriched in plasma membranes may also contain intracellular membranes, the three inactive mutants may have been trapped in some intracellular compartments or may be present at the plasma membrane but inactive.

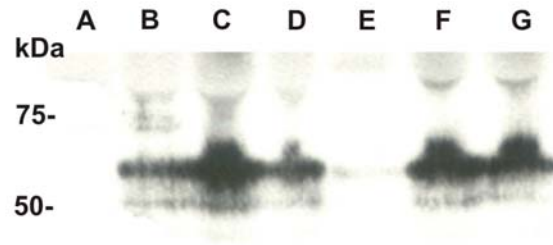


Figure 4.4: Western blot analysis of some selected mutants, compared to wild type SGLT1, detected with an anti-myc antibody.

Extracts enriched in plasma membrane were purified from non injected oocytes (A), wt SGLT1-injected oocytes (B), and mutants C345A (C), C351A (D), C355A (E), C361A (F) and double mutant C_{522,560}A (G) and were loaded onto a polyacrylamide gel (equivalent to membranes from 20 oocytes) and protein equivalencies were confirmed by Ponceau Red staining. Molecular standard masses are indicated on the left (in kD) (New England Biolabs).

Based on analysis of their presteady-state currents, the 12 functional mutants could be separated into three categories: Group A, which exhibited no significant shift of the Q-V curve; Group B, which had a shift toward negative potentials; and Group C, which had a shift toward positive potential. These shifts are compared to $V_{1/2}$ of the wt SGLT1 which averaged -46 ± 3 mV. Figs. 5-7 illustrate, for each of the three groups of mutants, the amplitude of the α MG cotransport current (I_{cotr}), the Na^+ leak current (I_{leak}) at -110 mV (panel A), the Pz-sensitive presteady-state currents ($I_{saline} - I_{Pz}$) for a selection of membrane potentials ranging from $+70$ mV to -170 mV (panel B) and the values of the measured $V_{1/2}$ (panel C) for presteady-state currents, i.e., the voltage for which half of the mobile charge is equally balanced between inward-facing and outward-facing configurations.

Mutants C317A, C345A, C517A and C659A form Group A (Fig. 4.5). Aside from mutant C345A, which has a very low expression level ($I_{cotr} -107 \pm 39$ nA, I_{leak} of -13 ± 5 nA and Q_{max} of 2.66 ± 0.09 nC, $n=4$, see Fig. 4.4 for the detection of C345A in Western blots), the expression levels of mutants C317A, C517A and C659A were comparable to that normally reached by wt SGLT1. The $V_{1/2}$ of these 4 mutants ranged between -40 and -56 mV and, aside from the $V_{1/2}$ for mutant C659A, were not significantly different from the $V_{1/2}$ for wt SGLT1. Mutant C659A had a $V_{1/2}$ of -56 ± 2 mV ($n=5$) and was barely

significantly more negative than that of wt SGLT1 ($P=0.011$) but because of the small difference and the considerable variability normally observed within a series of measurements of $V_{1/2}$, mutant C659A was classified into Group A.

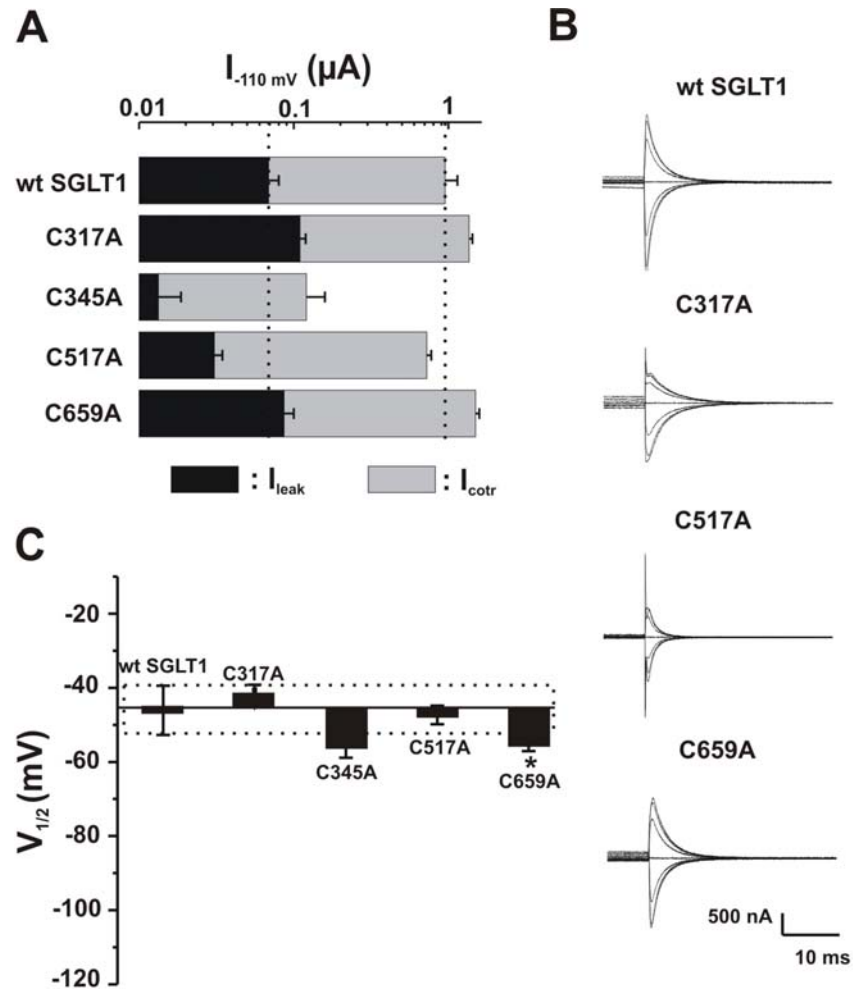


Figure 4.5: Electrophysiological characteristics of mutants classified in Group A, as compared to wt SGLT1.

(A) Comparison of mutant SGLTs activities to that of wt SGLT1. Maximal α MG cotransport (I_{cotr} at 5 mM α MG) and Na^+ leak (I_{leak}) currents were measured at -110 mV. The dotted lines indicate the mean expression level of wt SGLT1. $n \geq 5$ for each mutant. (B) Off response of presteady-state currents (Pz-sensitive currents in the absence of glucose) of typical oocytes expressing each of the mutant SGLTs compared to an oocyte expressing wt SGLT1. (C) $V_{1/2}$ of mutant SGLTs as compared to that of wt SGLT1. A dotted box represents the interval for which $V_{1/2}$ of a mutant would not be significantly different from that of wt SGLT1. Errors are SEM. Asterisks indicate the statistical significance with respect to wt SGLT1 (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$).

Group B (Fig. 4.6) is composed of single mutants that have a $V_{1/2}$ shifted toward negative membrane potentials as compared to that of wt SGLT1. The $V_{1/2}$ values for mutants C292A, C301A, C314A, C522A, C560A and C610A were measured at -84 ± 4 (n=7), -81 ± 2 (n=6), -66 ± 2 (n=7), -67 ± 4 (n=7), -75 ± 3 (n=6) and -121 ± 6 (n=6) mV, respectively. As observed for three of the Group A mutants, mutants C301A, C314A and C610A display I_{cotr} and I_{leak} values quite comparable to those for wt SGLT1. Mutants C522A and C560A were both characterized by a reduced I_{cotr} (-174 ± 29 nA and -307 ± 43 nA, respectively) which might be caused by a low expression level as their Q_{max} (2.7 ± 0.2 and 9.2 ± 0.5 nC, respectively) values were also reduced with respect to that for wt SGLT1 (Q_{max} wt = 25 ± 5 nC). Cotransport through the last mutant in Group B, C292A, appears to be severely perturbed since its I_{cotr} is only 20% of the wt I_{cotr} but its I_{leak} is twice as large. As shown in Fig. 4.6 B, the leak current of C292A becomes larger than its cotransport current at potentials more negative than -90 mV. As the reduced I_{cotr} seen for C292A, C522A and C560A could be due to a large decrease in sugar affinity, the $K_m^{αMG}$ of these mutants were measured. They were found to be even smaller than that for wt SGLT1 (in mM: 0.27 ± 0.01 for C292A, 0.71 ± 0.06 for C522A, 0.38 ± 0.1 for C560A and 0.97 ± 0.1 mM for wt SGLT1 not shown). We tested the effect of DTT on mutants C560A and C610A and their $V_{1/2}$ was also shifted by approximately +25 mV for mutant C560A and about +45 mV for C610A, indicating that these two cysteines were not responsible for the observed effect of DTT on $V_{1/2}$ of wt SGLT1.

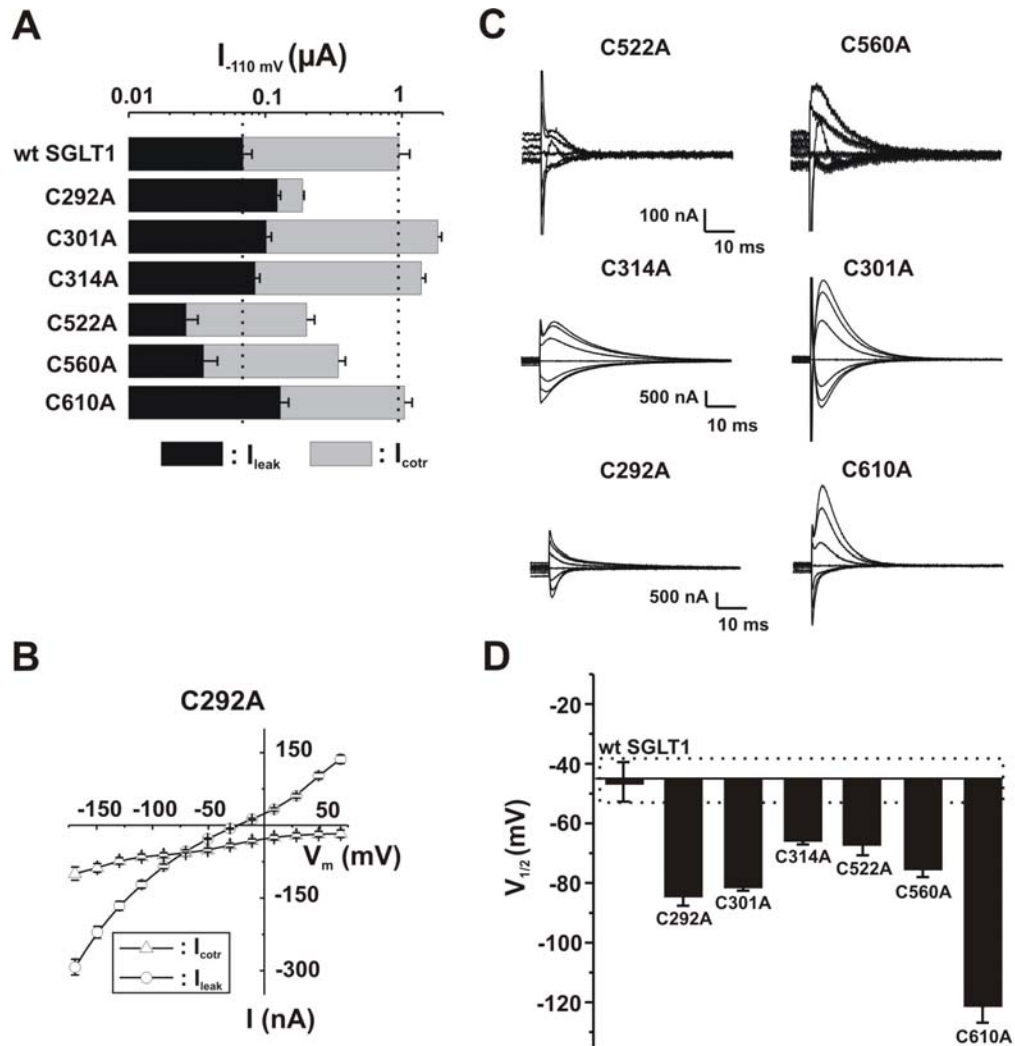


Figure 4.6: Electrophysiological characteristics of mutants classified in Group B, as compared to wt SGLT1.

(A) Comparison of mutant SGLT1 activities to that of wt SGLT1. Maximal α MG cotransport (I_{cotr} at 5 mM α MG) and Na^+ leak (I_{leak}) currents were measured at -110 mV. The dotted lines indicate the mean expression level of wt SGLT1. $n \geq 5$ for each mutant. (B) I-V curve for α MG cotransport and Na^+ leak currents of C292A. (C) Off response of presteady-state currents (Pz-sensitive currents in the absence of glucose) of typical oocytes expressing each of the mutant SGLT1s. (D) $V_{1/2}$ of mutant SGLT1s as compared to that of wt SGLT1. A dotted box represents the interval for which $V_{1/2}$ of a mutant would not be significantly different from that of wt SGLT1. Errors are SEM. All $V_{1/2}$ values for this series of mutants were significantly different ($P < 0.001$ in each case) from the $V_{1/2}$ of wt SGLT1.

Finally, the two remaining mutants, C255A and C511A, comprise Group C. As shown in Fig. 4.7 A, these mutants share the characteristics of wt SGLT1 in the presence of DTT, such as a reduced I_{leak} . The $V_{1/2}$ of mutant C255A was -24 ± 2 mV (n=8) and -27 ± 2 mV (n=4) for C511A, which is not significantly different from the $V_{1/2}$ of wt SGLT1 in the presence of DTT (-21 ± 1 mV, n=6). The two mutants were insensitive to DTT treatment with respect to $V_{1/2}$ (no further shift) and I_{leak} (remained identical to the I_{leak} observed before DTT treatment). The time constants, shown in Fig. 4.7 D, are characterized by their plateau value at ~ 4.5 ms. These values are remarkably similar to the time constants characterizing wt SGLT1 exposed to DTT (see Fig. 4.2 C).

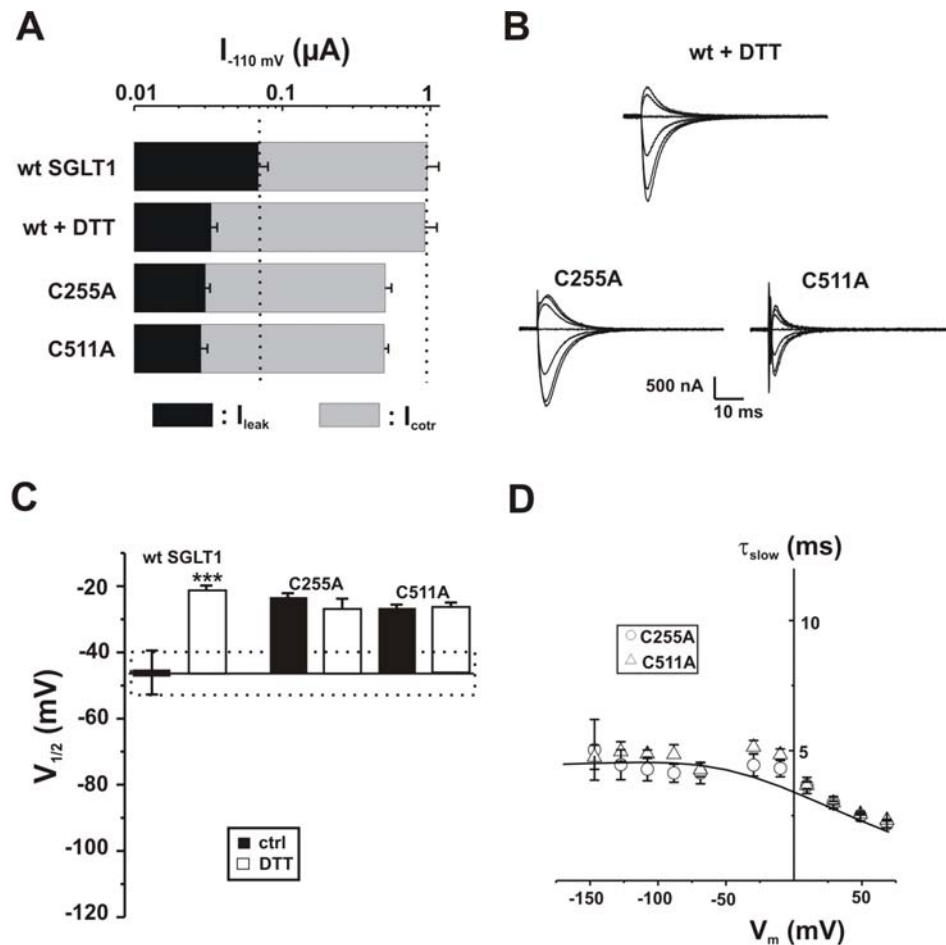


Figure 4.7: Electrophysiological characteristics of mutants classified in Group C, as compared to wt SGLT1, with and without DTT.

(A) Comparison of mutant SGLT1s activities to that of wt SGLT1 and to wt SGLT1 + DTT. Maximal αMG cotransport (I_{cotr} at 5 mM αMG) and Na^+ leak (I_{leak}) currents were

measured at -110 mV. The dotted lines indicate the mean expression level of wt SGLT1. $n \geq 5$ for each mutant. (B) Off response of presteady-state currents (Pz-sensitive currents in the absence of glucose) of typical oocytes expressing wt SGLT1 exposed to DTT and mutants C255A and C511A. (C) $V_{1/2}$ of mutant SGLT1s as compared to that of wt SGLT1 (filled bars) and to wt SGLT1 and mutants exposed to DTT (open bars). The dotted box represents the interval for which $V_{1/2}$ of a mutant would not be significantly different from that of wt SGLT1. (D) Time constants of the slow component of presteady-state currents for mutants of Group C. The curves represent the time constants evaluated with a four-state model of presteady-state currents with parameters described in Table IV.I. Errors are SEM.

α MG affinities of certain mutants

Other functional characteristics can be used to help identify cysteine residues involved in disulfide bridges. Echoing Fig. 4.1 C, Fig. 4.8 shows that the DTT increased the $K_m^{\alpha MG}$ of wt SGLT1 from 0.97 ± 0.1 mM to 1.6 ± 0.1 mM (as measured at -150 mV). Interestingly, the two mutants of Group C (C255A and C511A) have $K_m^{\alpha MG}$ values very similar to that of DTT-treated wt SGLT1 (in mM: 1.5 ± 0.1 for C255A and 1.6 ± 0.2 for C511A).

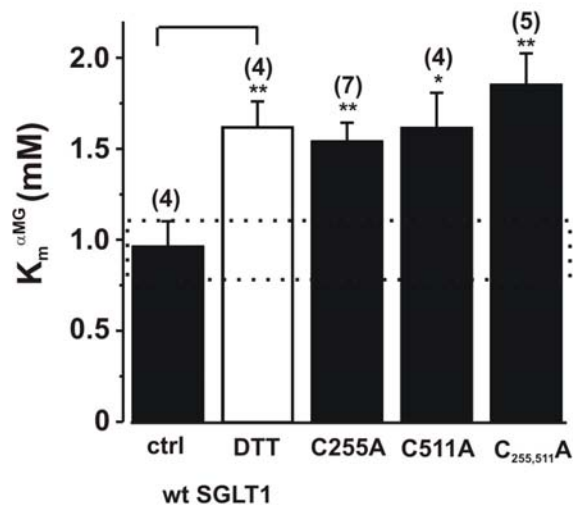


Figure 4.8: Apparent affinity for α MG ($K_m^{\alpha MG}$) for oocytes expressing mutants C255A, C511A and C_{255,511}A compared with wt SGLT1, with and without DTT.

The application of DTT to wt SGLT1 was performed as described in MATERIALS AND METHODS (paired experiments). The affinity was assessed with data measured at -150 mV. The dotted box represents the interval for which the $K_m^{\alpha MG}$ of a mutant would not be

significantly different from that of wt SGLT1. The number of individual oocytes used per value is indicated in parentheses. Errors are SEM. Stars indicate the statistical significance (see Fig. 4.5 legend).

Identification of pairs of cysteine residues possibly forming a disulfide bridge

The data shown in Figs. 6 and 7 already suggest specific pairs of cysteine residues that could be involved in disulfide bridges. The most obvious pair is from Group C where replacing C255 and C511 generate functional effects that closely mimic the effect of DTT. This is true for the positive shift in $V_{1/2}$, the acceleration of the presteady-state currents and the reduced proportion between I_{leak} and I_{cotr} . Within Group B, the identification of interesting cysteine residues pairs is less straightforward. Mutants C314A, C522A and C560A had very similar $V_{1/2}$ values. Of these three mutants, C522A and C560A also exhibited similar reduction in levels of expression. Consequently, double mutants were produced involving the pairs of amino acids residues 314,560 and 522,560. The pair 560,610 was also studied because these two cysteines have previously been postulated to form a disulfide bridge in an isolated loop in rabbit SGLT1 (Xia *et al.*, 2003, 2004) and this hypothesis had not yet been tested using the complete and functional protein. We also studied other pairs of mutants under the assumption that C610 could be forming a disulfide bridge with a different partner than the one proposed by Xia *et al.* (2003, 2004). The most logical partners (292 and 301) were the cysteines that had the most important shift in $V_{1/2}$ as compared to wt SGLT1.

Double mutants

In creating double mutants to check for the presence of a disulfide bridge, we sought instances where the effect of a single cysteine replacement on a given parameter would vanish if its partner cysteine residue had already been replaced. Six double mutants were generated. Unfortunately, the double mutant C_{522,560}A was not functional even though it was present as observed by Western blot (Fig. 4.4, lane G). The other double mutants (C_{255,511}A, C_{314,560}A, C_{560,610}A, C_{292,610}A and C_{301,610}A) were functional and the amplitude of their α MG cotransport currents (I_{cotr}) and Na⁺ leak currents (I_{leak}) at -110 mV (Fig. 4.9 A), as well as their $V_{1/2}$ values (Fig. 4.9 C) were compared to those of wt SGLT1. (The

name of double mutants was shortened for clarity in figures. For example, the symbol C_{255,511}A means that the cysteines in positions 255 and 511 were both mutated into an alanine residue.)

In two cases, the effects of each mutations on $V_{1/2}$ were roughly additive. This is the case of C_{292,610}A and C_{301,610}A. Analysis of Fig. 4.9 C indicates that mutating C610 to an alanine residue produces a powerful negative shift in $V_{1/2}$ by ~75 mV independent of the presence of C292 or C301. The double mutant C_{292,610}A retains the large I_{leak} of the individual, single mutants while the I_{cotr} is completely abolished for 5 mM α MG (Fig. 4.9 B) and no current could be induced by the addition of either 25 mM or 100 mM α MG (not depicted). In contrast, when C560 is mutated to an alanine, replacing C610 only produce a shift of $V_{1/2}$ by 50 mV. To put it another way, the single C560A mutation produced a shift of $V_{1/2}$ by -30 mV when compared to wt SGLT1 but the effect of the double mutant is only -6 mV when compared to the single mutant C610A. A qualitatively similar comparison can be done with mutations C314A and C560A. The effect of introducing either mutation is significantly reduced when they are performed after the other cysteine residue has been replaced. In these two cases (C_{560,610}A and C_{314,560}A), other parameters have to be considered before suggesting the presence of disulfide bridges. Fig. 4.6 A shows that replacing C560 produces a reduction of I_{cotr} by 63% while the I_{cotr} reached with C314A and C610A are equal or larger than the wt level. It appears that the effect of C560 replacement on the activity level is conserved when it is performed alongside alanine substitution of C314 or of C610 (80% and 75% reduction with respect to C314A and C610A, respectively, see Fig. 4.6 A and 4.9 A). This is not what would be expected if the effect of C560 replacement was due to the disruption of disulfide bridges with C314 or C610.

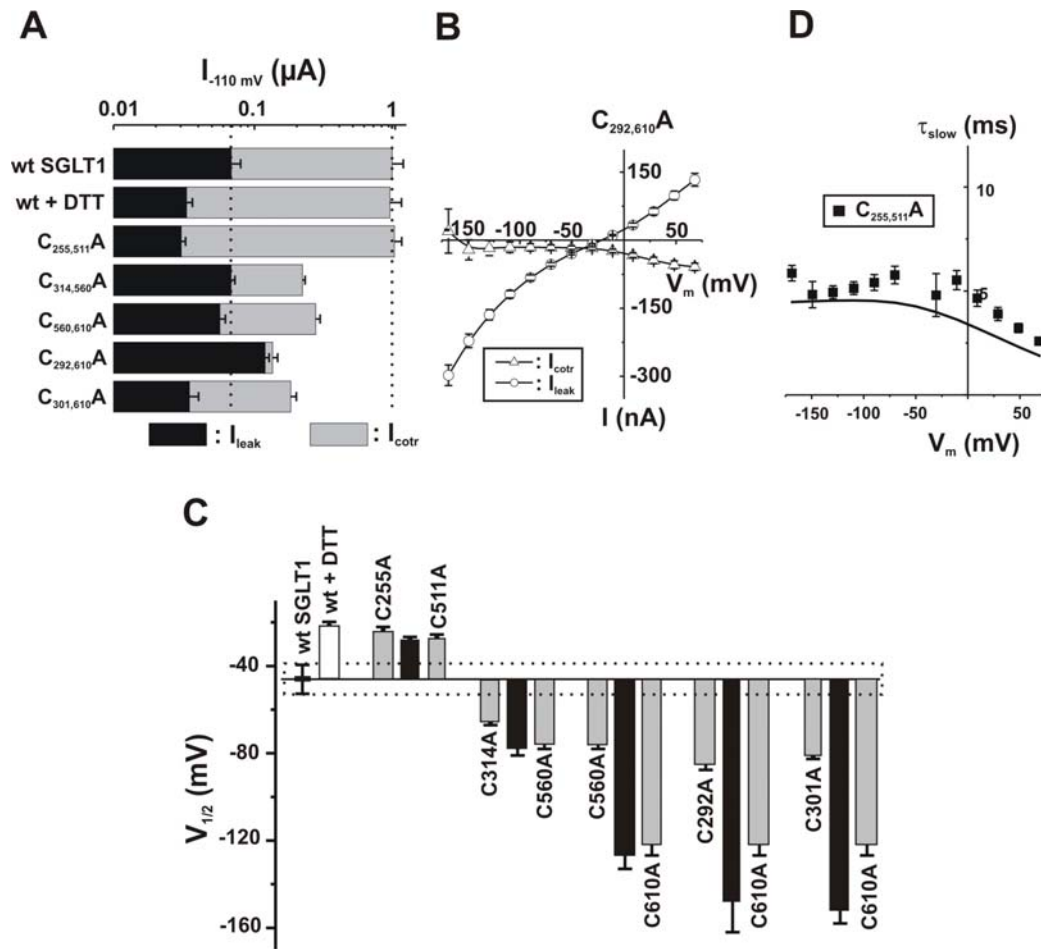


Figure 4.9: Electrophysiological characteristics of the double mutants as compared to wt SGLT1.

(A) Comparison of mutant SGLT1 activities to that of wt SGLT1. Maximal α MG cotransport (I_{cotr} at 5 mM α MG) and Na^+ leak (I_{leak}) currents were measured at -110 mV. The dotted lines indicate the mean expression level of wt SGLT1. $n \geq 5$ for each mutant. (B) I-V curve for α MG cotransport and Na^+ leak currents of the double mutant C_{292,610}A. (C) $V_{1/2}$ of double mutant SGLTs as compared to that of wt SGLT1 and to single mutants. Each double mutant bar (black) is preceded and followed by the two bars representing the $V_{1/2}$ values for the corresponding single mutants (light grey). The dotted box represents the interval for which $V_{1/2}$ of a mutant would not be significantly different from that of wt SGLT1. (D) Time constants of the slow component of presteady-state currents for the double mutant C_{255,511}A (see Fig. 4.7). ($n=5$). The curve represents the time constants evaluated with a four-state model of presteady-state currents with parameters described in Table IV.I. Errors are SEM.

Finally, the double mutant C_{255,511}A had an activity level (Fig. 4.9 A), a time constant for presteady-state currents (Fig. 4.9 D) and a V_{1/2} (Fig. 4.9 C) similar to the simple mutants C255A and C511A. With respect to the effect on V_{1/2}, it is clear that the effect of introducing either of the single mutants (a shift by +20 mV) is lost when the other cysteine residue has already been replaced (compare the effect of C_{255,511}A to the effect of each of the single mutants in Fig. 4.9 C). Moreover, C255A, C511A and C_{255,511}A are insensitive to DTT as their V_{1/2} values remain unchanged by treatment with 10 mM DTT (Fig. 4.7 C for simple mutant, not shown for C_{255,511}A). The presence of a disulfide bridge between C255 and C511 is also supported by the observation that, in the double mutant, K_m^{αMG} was the same as that for each of the simple mutants C255A and C511A, which is also very similar to that of wt SGLT1 in the presence of DTT (see Fig. 4.8).

Fluorescent labelling of C255 and C511

To complement studies examining the function of SGLT1 mutants and to further test the hypothesis that C255 and C511 could form a disulfide bridge, we used fluorescent labeling as an independent test of available cysteine residues in the mutant proteins. We incubated the C255A- and C511A-expressing oocytes with saline solution containing the fluorescent probe tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMR5M, see MATERIALS AND METHODS). Fig. 4.10 shows the fluorescent signal of labeled oocytes expressing mutant C511A (TMR5M putatively attached to C255) and of mutant C255A (TMR5M putatively attached to C511) as compared with wt SGLT1 and to the double mutant C_{255,511}A in which no cysteine appears to be available for labeling. This indicates that the two simple mutations (C255A and C511A) allow the fluorescent probe to access a cysteine that is not accessible in the double mutant (C_{255,511}A) or in wt SGLT1 and strongly supports the hypothesis of a disulfide bridge between these two cysteine residues in SGLT1.

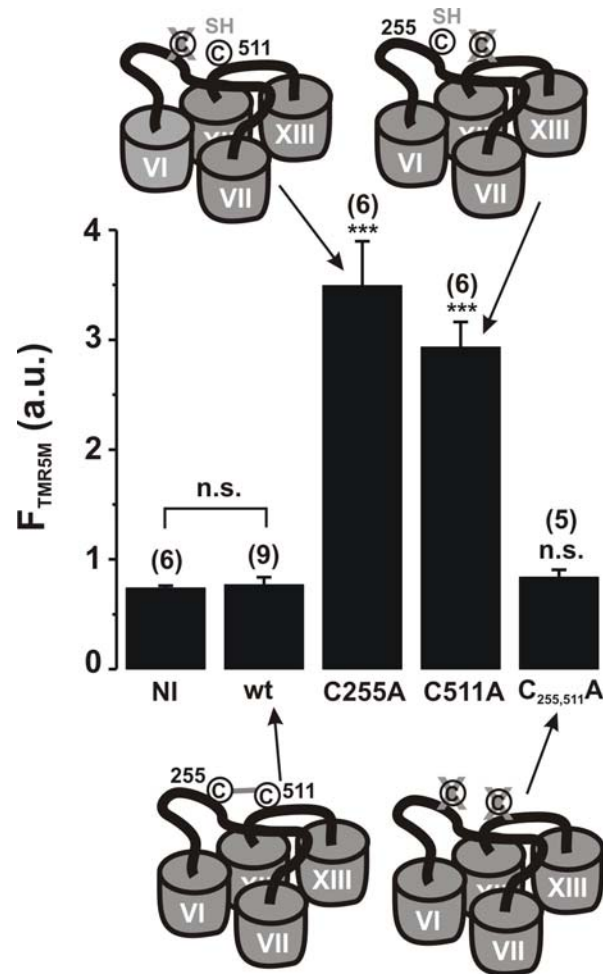


Figure 4.10: Fluorescent labeling of oocytes expressing mutants C255A, C511A and C_{255,511}A as compared to wt SGLT1.

See MATERIALS AND METHODS for the procedure of fluorescent labeling with the TMR5M fluorescent probe. The fluorescence signal is indicated in arbitrary units (a.u.). NI indicates noninjected oocytes. The number of oocytes used per sample is indicated in parentheses. A cartoon shows the availability of cysteine residues in each situation. Stars indicate the statistical significance for unpaired Student's *t*-test against wt SGLT1 data (see Fig. 4.5 legend). Errors are SEM.

Discussion

In SGLT1 only 5 of the 15 endogenous cysteine residues are located in putative transmembrane segments (TMS VII, VIII and XIV), with the majority located in extracellular loops (loop 6-7, loop 8-9, loop 12-13) and in the special, putatively re-entrant loop 13-14 (Lin *et al.*, 1999; Gagnon *et al.*, 2005). Eight of these cysteine residues (C255, C292, C345, C351, C355, C361, C511 and C610) are conserved amongst SGLT1, SGLT2, SGLT3, SMIT1 and SMIT2. Amongst those, C351 is conserved across nearly the entire SLC5 family. Some other residues are conserved among the SGLT1, 2 and 3 isoforms (C301, C314, C317, C517, C522 and C560). In contrast, C659 is present only within the SGLT1 isoforms. This high degree of cysteine conservation suggests that they may play a role either in a specific function or in the general structure (or both) of the Na⁺ coupled cotransporters of SLC5 family. It has been shown before that wt SGLT1 is not sensitive to alkylation (NEM nor MTS reagents) (Loo *et al.*, 1998; Lo et Silverman, 1998a; Gagnon *et al.*, 2005). This means that these reagents can bind to some cysteine residues without producing any functional effect or, alternatively, that no cysteine residues are available to these reagents because the residues are buried in the membrane, involved in disulfide bridges or inaccessible to the solvent. The fact that the degree of fluorescent labeling of wt SGLT1 with TMR5M is identical to the basal fluorescent labeling obtained with non-injected oocytes supports the latter possibility. Although the roles of the endogenous cysteine residues in SGLT1 have never been studied in detail, a few reports have suggested important roles for, at least, some of them in protein trafficking (Martin *et al.*, 1996b; Wright, 1998; Xia *et al.*, 2003, 2004).

Presteady-state currents involving SGLT1 can be observed in the absence of glucose. They were first observed shortly after the cloning of SGLT1 which, through expression in *Xenopus* oocytes, enabled its precise characterization using the two microelectrode voltage-clamp technique (Umbach *et al.*, 1990; Parent *et al.*, 1992aa,b). The model proposed by Parent *et al.* (1992aa,b) was revisited using the cut-open oocyte technique, providing the observation of a faster component of presteady-state currents (Chen *et al.*, 1996). A slower time constant was also postulated recently (Krofchick et

Silverman, 2003; Loo *et al.*, 2005). As illustrated in Fig. 4.11, presteady-state currents arise from the voltage-dependent empty carrier translocation ($C_1 \leftrightarrow C_2 \leftrightarrow C_3$) and from voltage-dependent Na^+ binding-debinding ($C_3 \leftrightarrow C_4(\text{Na}^+)$). Integration of these currents corresponds to the quantity of transferred charge that can be approximated (as a function of membrane potential) by a Boltzmann equation. Two parameters of presteady-state currents were examined to compare normal and mutant SGLT1: $V_{1/2}$, the voltage at which half of the charge is transferred and the ~ 10 ms time constant (described by Loo *et al.* (1993) and by Chen *et al.* (1996)) arising from the modulated transition between C_1 to $C_4(\text{Na}^+)$. The faster time constant could not be accurately resolved by two-microelectrode voltage-clamp.

DTT effect on wt SGLT1 activity

We report in the present study the sensitivity of SGLT1 steady-state and presteady-state currents to a reducing agent, DTT, which is assumed to break all disulfide bridges even if they are buried within the membrane (Cleland, 1964). The steady-state parameters (I_{leak} and I_{cotr}) were not similarly affected by DTT exposure: I_{leak} was reduced whereas I_{cotr} was not affected at all. The $K_m^{\alpha MG}$ was increased by 60 % without any change in its voltage dependence (Fig. 4.1 C). According to the current model (see below), these effects are consistent with a shift in the conformational equilibrium toward an outward facing configuration of the transporter. As the affinity for sugar depends on a large number of parameters, it is difficult at this point to propose any specific change produced by DTT in the transporter mechanism to explain the rise of $K_m^{\alpha MG}$. In contrast, presteady-state currents were greatly affected by DTT as the Q-V curve was shifted by +25 mV (Fig. 4.2 B) and the time constants were accelerated (Fig. 4.2 C). Compared to parameter such as $K_m^{\alpha MG}$, the $V_{1/2}$ of the Q-V curve depends on a smaller set of rate constants and was therefore chosen as our principal criterion for classifying the mutated forms of SGLT1 for identifying the disulfide bridge(s) responsible for the effects of DTT.

Non-functional mutants

Mutants C351A, C355A, C361A, located in the extracellular loop between TMS VIII and IX, and the double mutant C_{522,560}A were non-functional: they exhibited no

presteady-state currents, no I_{leak} nor I_{cotr} (5 mM α MG or 100 mM α MG, unpublished data). However, we could detect the presence of SGLT1 on Western blots using preparations enriched in plasma membranes. As mutants C351A and C361A were shown not to be trafficked to the plasma membrane (Xia *et al.*, 2005), we suggest that these mutants are also retained within intracellular compartments and confirm that C351 and C361 are important in the correct trafficking to the plasma membrane.

Expression of single mutants

The characteristics of the single mutants presented in this study suggest that endogenous cysteine residues in SGLT1 are involved in important aspects of protein function: proper trafficking to the plasma membrane (as suggested by the non-functional mutants and by some weakly expressed mutants) and maintaining the voltage sensor in either the inward or outward configurations (as suggested by mutants in Group B and C). Only three cysteines could be removed without any prominent effect on the function of the transporter (C317A in TMS 8, C517A in loop 12-13 and C659A in the last TMS). These results are similar to those obtained with other cotransporters, which also suggested a role for endogenous cysteines in the proper trafficking of proteins to the plasma membrane (J.G. Chen *et al.*, 1997a; Sur *et al.*, 1997; Pajor *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2004). However, none of the endogenous cysteines previously studied in other cotransporters has been reported to play a role in presteady-state currents. The first round of mutation identified C255 and C511 as being potentially involved in the disulfide bridge.

Expression of double mutants

In order to identify a disulfide bridge, the mutants of Group A were discarded because the $V_{1/2}$ of their Q-V curve was not significantly different from that of wt SGLT1 under control conditions. Then mutants whose $V_{1/2}$ was affected were classified into two categories: those with Q-V curves shifted toward negative potentials (Group B) and those which were shifted toward positive potentials (Group C).

As a first observation, all mutants in Group B display distinctly different characteristics, except for C522A and C560A which were indistinguishable in terms of $V_{1/2}$, I_{cotr} and I_{leak} . However, the double mutant C_{522,560}A did not generate any cotransport activity. As both C522A and C560A presented reduced activity in terms of I_{cotr} and I_{leak} (20-30 % of wt SGLT1), the absence of functional activity for the double mutant could be interpreted as though the effects of the two mutations were additive. This is not what would be expected if C522 and C560 were linked through a disulfide bridge.

The additive effect can also be seen with other mutants; for instance, the mutant C_{314,560}A displays half the I_{cotr} seen with the single mutant C314A while the I_{leak} and the $V_{1/2}$ remain normal, similar to the effects of the single mutant C560A. This reduced I_{cotr} also occurred in the double mutant C_{560,610}A. This was the first double mutant produced in this study because these two cysteines have been postulated to be involved in a disulfide bridge in an isolated loop in rabbit SGLT1 (Xia *et al.*, 2003, 2004). Our results do not support this hypothesis as the $V_{1/2}$ associated with the double mutant seems to be controlled by the C610A mutation while the activity level seems to be controlled by the C560A mutation. Moreover, the Q-V curves of these two mutants are still shifted toward positive potential by DTT, similarly to wt SGLT1.

The double mutant C_{292,610}A is very interesting since it has no α MG cotransport whereas its I_{leak} is as large as those of the singly mutated forms of SGLT1. The absence of I_{cotr} was not due to a simple decrease of α MG affinity for its binding site since the $K_m^{\alpha\text{MG}}$ values for the single mutants were similarly low (0.27 ± 0.01 mM for C292A and 0.28 ± 0.02 mM for C610A). Interestingly, Pz still inhibits the I_{leak} and presteady-state currents. We can not state that these cysteines form a disulfide bridge because of the effects observed with the double mutant. However, it suggests that these two cysteines, together, somehow play a role in coupling Na^+ and glucose transport.

Disulfide bridge between C255 and C511

To date, intramolecular disulfide bridges have been identified for only a few transporters. The endogenous cysteine residues of Na^+/Pi cotransporter type IIa have been

studied in detail using mutagenesis, Western blot, and by examining the effects of the reagents TCEP and MTS on transport (Lambert *et al.*, 2000a; Lambert *et al.*, 2000b; Kohler *et al.*, 2003): an essential disulfide bridge between two cysteines, which are located in the same extracellular loop, has been identified and another was postulated. These are responsible for the TCEP (another reducing agent) sensitivity of the transporter. The serotonin transporter (SERT) contains 16 endogenous cysteines of which three are conserved throughout the NaCl-coupled neurotransmitter transporter family (J.G. Chen *et al.*, 1997a; Sur *et al.*, 1997). Characterization of the transport properties of SERT mutants have identified functionally important cysteines as well as a disulfide bridge between two conserved cysteines, also located on the same extracellular loop.

The similarity of the $V_{1/2}$ values of the mutants in Group C (C255A and C511A, located in extracellular loops 6-7 and 12-13, respectively) with that of reduced wt SGLT1 is remarkable (Fig. 4.2 D, Fig. 4.7 D and Fig. 4.9 D). It suggests that these two cysteines are, in fact, covalently bound by a disulfide bridge and that its breakage affects the $V_{1/2}$. The $V_{1/2}$ of both of these mutants are also DTT-insensitive. The double mutant C_{255,511}A supports this hypothesis as its $V_{1/2}$ is the same as those of the simple mutants, and it is also insensitive to DTT. As another functional test, we measured the apparent affinity for α MG for these mutants. The three mutants C255A, C511A and C_{255,511}A also exhibit a $K_m^{\alpha\text{MG}}$ value similar to that of wt SGLT1 under reducing conditions. We showed that SGLT1 (when C511 had been mutated into alanine or when C255 had been mutated into alanine) could be labeled by a fluorescent probe and that, in the absence of both cysteines (in mutant C_{255,511}A), no labeling could be achieved (Fig. 4.10). Taken together, these results strongly support the disulfide bridge hypothesis. We also demonstrated that the disruption of the bridge affects the function of the protein, changing the equilibrium voltage for the proposed negatively charged binding site ($V_{1/2}$) and thus affecting the Na^+ current in the absence of glucose (I_{leak}) and the apparent affinity for glucose ($K_m^{\alpha\text{MG}}$).

Kinetic model of presteady-state currents

The simple four-state kinetic model proposed by Chen *et al.* (1996) and illustrated in Fig. 4.11 (see also Table IV.I for k_{ij} values and for deduced $V_{1/2}$), was used to model the

time constants and transferred charges. The principal equations describing this model are given in Appendices 4-A and 4-B. The model explains the time constants of presteady-state currents (curves in Fig. 4.2 C for wt SGLT1, Fig. 4.7 D for C255A and C511A and Fig. 4.9 D for C_{255,511A}) and transferred charges, allowing to fit a theoretical Q-V curve with a simple Boltzmann curve to extract $V_{1/2}$. Parameters values proposed by Chen *et al.* (1996) were slightly modified to fit wt SGLT1 time constant and Q-V curves obtained in double microelectrode electrophysiology. The values of z_i used for the equivalent charge moving across the entire membrane electrical field in the step between state “i” and “j” were -0.4, -0.35, -0.6 and 0, while the values for α_i describing the asymmetry of the energy barrier were 0.3, 0, 0.4 and 0 for i going from 1 to 4, respectively. If it is assumed that one negative charge is attached to the binding site is moving in the membrane electrical field, these values of z_i would indicate that the charge is crossing 40% of the electrical field in the reaction linking C_1 to C_2 and 35% between C_2 and C_3 . In the Na^+ binding reaction, the equivalent of one positive charge would cross 60% of the membrane electrical field. This could be due to the movement of Na^+ , the movement of the negative charge attached to the binding site or a combination of both. The set of proposed rate constants for wt SGLT1 in Table IV.I would lead to occupancy probability (C_i) of 0.07, 0.31, 0.31 and 0.31 (from $i=1$ to 4) at -50 mV.

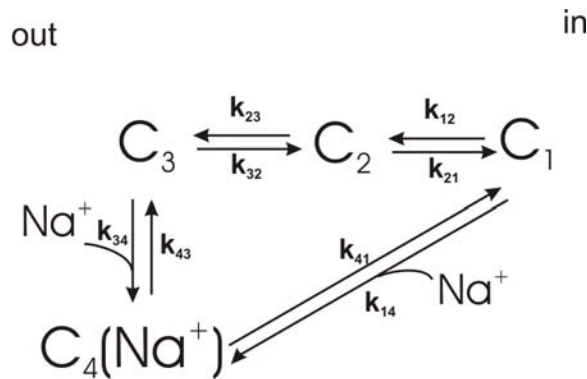


Figure 4.11: Kinetic model of the Na^+ /glucose cotransporter states for the estimation of presteady-state currents.

The model was previously described in Chen *et al.* (1996). See Appendices 4-A and 4-B for details.

Table IV.I: Rate constant of the four-state kinetic model used for the calculations of time constants and transferred charges of wt SGLT1 and mutants

	k_{120}^a	k_{210}	k_{230}	k_{320}	k_{340}	k_{430}	k_{410}^b	$V_{1/2}^c$
	(s ⁻¹)	(s ⁻¹)	(s ⁻¹)	(s ⁻¹)	(M ⁻¹ s ⁻¹)	(s ⁻¹)	(s ⁻¹)	(mV)
wt SGLT1	790	370	100	180	8000	2300	10	-39
wt + DTT, C255A, C511A and C255,511A	790	370	230	180	8000	2300	10	-20

Footnotes:

^a The constant k_{120} (as well as other k_{ij0}) represents the value of k_{12} (and k_{ij}) at 0 mV.

^b The constant k_{140} (in s⁻¹M⁻¹) was calculated in order to respect the micro reversibility as described in Appendix 4-A.

^c The $V_{1/2}$ was obtained from a fit of a Boltzmann relation to the Q-V curve calculated with the model as described in Appendix 4-B. The experimental values are cited in the text.

We thus achieve a $V_{1/2}$ of -39 mV for Q-V curve with satisfying time constants as a function of V_m for wt SGLT1. To obtain the one of wt SGLT1 in the presence of DTT, we had to increase k_{230} by a factor 2.3 to account for the faster time constants observed for the presteady-state current at hyperpolarizing potentials. This sole change affected both the plateau of the time constants at hyperpolarizing potential and the $V_{1/2}$, reaching -20 mV, without any change in the apparent valence of the Boltzmann curve (unpublished data), which is in agreement with the observations. These changes also correctly fit to the mutants characteristics.

Even though this disulfide bridge is not essential for the function of SGLT1, since removing it did not prevent the transporter from being functional at the plasma membrane, it greatly influenced the equilibrium position of transferred charges. The disulfide bridge described in other transporters has had no such important role.

Conclusion

With the presence of 15 endogenous cysteine residues in SGLT1, 105 different combinations exist for creating a disulfide bridge. In the present study, we have presented an approach that allows one to positively identify a specific disulfide bridge without having to test all of the possibilities. Our results suggest important roles for cysteine in SGLT1: proper trafficking to the plasma membrane and maintenance of the voltage sensing part of the protein in the inward or outward facing configuration. We also identified a functionally important disulfide bridge, between C255 and C511 of human SGLT1, which is responsible of the effects of DTT on the transferred charges of wild type SGLT1, and which affects the voltage-independent conformation change from state C_2 to C_3 . The identification of a disulfide bridge in SGLT1 (and possibly in SGLT2 and 3 and in SMIT1 and 2 where these residues are conserved) provides a direct, three-dimensional constraint to the structure of the transporter and to the organisation of some transmembrane segments. If amino acids 255 and 511 are closer than 2.05 Å from each other (Loerger, 2005), it indicates that TMS VI and VII are close to TMS XI, XII and XIII. To our knowledge, this is the first direct experimental evidence of a physical constraint between two distant amino acid positions in SGLT1.

Appendix

4-A. EXPRESSIONS FOR RATE CONSTANT AND TIME CONSTANTS

The four-state kinetic model from Chen *et al.* (1996) was used to model the effects of DTT on wt SGLT1 and to examine the characteristics of mutants C255A, C511A and the double mutant C_{255,511}A (see Figs. 4.2, 4.7 and 4.9 for experimental and simulated curves, Fig. 4.11 for the scheme of the model and Table IV.I for the values of k_{ij0} and of the deduced $V_{1/2}$). For all of the simulations, $[Na^+_{out}]$ and $[Na^+_{in}]$ were fixed at 90 mM and 7 mM, respectively. See DISCUSSION for other values.

The following equations were used to calculate time constants occurring for different membrane potentials:

$$\begin{aligned}
 k_{12} &= k_{120} \exp\left(z_1 \alpha_1 \frac{FV}{RT}\right) \\
 k_{21} &= k_{210} \exp\left(-z_1(1-\alpha_1) \frac{FV}{RT}\right) \\
 k_{23} &= k_{230} \exp\left(z_2 \alpha_2 \frac{FV}{RT}\right) \\
 k_{32} &= k_{320} \exp\left(-z_2(1-\alpha_2) \frac{FV}{RT}\right) \\
 k_{34} &= k_{340} [Na^+_{out}] \exp\left(z_3 \alpha_3 \frac{FV}{RT}\right) \\
 k_{43} &= k_{430} \exp\left(-z_3(1-\alpha_3) \frac{FV}{RT}\right) \\
 k_{41} &= k_{410} \exp\left(z_4 \alpha_4 \frac{FV}{RT}\right)
 \end{aligned} \tag{1}$$

where z_i represents the charge valence (equivalent charge moving across the whole membrane), α_i (ranging between 0 and 1) describes the asymmetry of the energy barriers, V is the membrane potential and F , T and R have their usual meanings. To assure microscopic reversibility, the last constant k_{140} was calculated to have no net transport at 0 mV with no Na^+ gradient:

$$k_{140} = \left(\frac{k_{120}k_{230}k_{340}k_{410}}{k_{430}k_{320}k_{210}} \right) \quad (2)$$

$$k_{14} = k_{140} [\text{Na}_m^+] \exp\left(-z_4(1-\alpha_4)\frac{FV}{RT}\right)$$

Certain approximations, satisfied in our case and described in Chen *et al.* (1996), allowed us to establish the slow time constant and to determine the following expression for τ_{slow} :

$$\begin{aligned} f_{12} &= \frac{k_{12}}{(k_{12} + k_{21})} \\ f_{43} &= \frac{k_{43}}{(k_{34} + k_{43})} \\ \tau_{slow} &= \frac{1}{f_{12}k_{23} + f_{43}k_{32}} \end{aligned} \quad (3)$$

4-B. EXPRESSIONS FOR TRANSFERRED CHARGES

Variations in time of the probability of finding transporters in each state are calculated as usual, for the desired membrane potential, with a given first value:

$$\frac{dC_2}{dt} = -C_2k_{21} + C_1k_{12} - C_2k_{23} + C_3k_{32}$$

$$\frac{dC_3}{dt} = -C_3k_{32} + C_2k_{23} - C_3k_{34} + C_4k_{43}$$

$$\frac{dC_4}{dt} = -C_4k_{43} + C_3k_{34} - C_4k_{41} + C_1k_{14}$$

They were multiply by the time increment and this variation was added to the previous value:

$$\Delta C_i = \frac{dC_i}{dt} dt$$

$$C_i|_t = C_i|_{t-1} + \Delta C_i \quad (4)$$

where C_i represents the probability of occupation of state i in the model (see Fig. 4.11), but to conserve the total probability of transporters at unity, C_1 is calculated as followed:

$$C_1 = 1 - (C_2 + C_3 + C_4) \quad (5)$$

We set the charge to be zero at extreme hyperpolarizing potentials (as $C_4=1$ and $C_3=C_2=C_1=0$) by use of the following equation:

$$-Q = C_3z_3 + C_2(z_2 + z_3) + C_1(z_1 + z_2 + z_3) \quad (6)$$

Acknowledgements

We thank Michael Coady for valuable discussion and for his comments on the manuscript.

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant # MOP-10580). D.G.G. is a NSERC and FRSQ postgraduate scholar.

Laurence G. Palmer served as editor.

Submitted: 18 October 2005

Accepted: 22 December 2005

Abbreviations used in this paper:

α MG, α -Methyl-glucose; DTT, dithiothreitol; Pz, phlorizin; SGLT1, Na⁺/glucose cotransporter; TMR5M, tetramethylrhodamine-5-maleimide; TMS, transmembrane segment; wt, wild-type

References

- Bissonnette, P., J. Noel, M.J. Coady and J.Y. Lapointe. 1999. Functional expression of tagged human Na⁺-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol.* 520 Pt 2:359-371.
- Chen, J.G., S. Liu-Chen and G. Rudnick. 1997. External cysteine residues in the serotonin transporter. *Biochemistry.* 36:1479-1486.
- Chen, X.Z., M.J. Coady, F. Jackson, A. Berteloot and J.Y. Lapointe. 1995. Thermodynamic determination of the Na⁺: glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. *Biophys J.* 69:2405-2414.
- Chen, X.Z., M.J. Coady, F. Jalal, B. Wallendorff and J.Y. Lapointe. 1997. Sodium leak pathway and substrate binding order in the Na⁺-glucose cotransporter. *Biophys J.* 73:2503-2510.
- Chen, X.Z., M.J. Coady and J.Y. Lapointe. 1996. Fast voltage clamp discloses a new component of presteady-state currents from the Na⁽⁺⁾-glucose cotransporter. *Biophys J.* 71:2544-2552.
- Cleland, W.W. 1964. Dithiothreitol, A New Protective Reagent For Sh Groups. *Biochemistry.* 35:480-482.
- Crane, R.K. 1965. Na⁺ -dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Fed Proc.* 24:1000-1006.
- Fisher, C.L. and G.K. Pei. 1997. Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method. *Biotechniques.* 23:570-571, 574.

- Gagnon, D.G., A. Holt, F. Bourgeois, B. Wallendorff, M.J. Coady and J.Y. Lapointe. 2005. Membrane topology of loop 13-14 of the Na⁽⁺⁾/glucose cotransporter (SGLT1): A SCAM and fluorescent labelling study. *Biochim Biophys Acta*. 1712:173-184.
- Gagnon, M.P., P. Bissonnette, L.M. Deslandes, B. Wallendorff and J.Y. Lapointe. 2004. Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by Na⁺/glucose cotransport. *Biophys J*. 86:125-133.
- Hediger, M.A., M.J. Coady, T.S. Ikeda and E.M. Wright. 1987. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature*. 330:379-381.
- Hirayama, B.A., M.P. Lostao, M. Panayotova-Heiermann, D.D. Loo, E. Turk and E.M. Wright. 1996. Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na⁺-glucose cotransporters (SGLT-1). *Am J Physiol*. 270:G919-926.
- Kohler, K., I.C. Forster, G. Stange, J. Biber and H. Murer. 2003. Essential cysteine residues of the type IIa Na⁺/Pi cotransporter. *Pflugers Arch*. 446:203-210.
- Krofchick, D. and M. Silverman. 2003. Investigating the conformational states of the rabbit Na⁺/glucose cotransporter. *Biophys J*. 84:3690-3702.
- Lambert, G., I.C. Forster, J. Biber and H. Murer. 2000. Cysteine residues and the structure of the rat renal proximal tubular type II sodium phosphate cotransporter (rat NaPi IIa). *J Membr Biol*. 176:133-141.
- Lambert, G., I.C. Forster, G. Stange, K. Kohler, J. Biber and H. Murer. 2001. Cysteine mutagenesis reveals novel structure-function features within the predicted third extracellular loop of the type IIa Na⁽⁺⁾/P(i) cotransporter. *J Gen Physiol*. 117:533-546.

- Lambert, G., M. Traebert, J. Biber and H. Murer. 2000. Cleavage of disulfide bonds leads to inactivation and degradation of the type IIa, but not type IIb sodium phosphate cotransporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol.* 176:143-149.
- Lin, J., J. Kormanec, D. Homerova and R.K. Kinne. 1999. Probing transmembrane topology of the high-affinity Sodium/Glucose cotransporter (SGLT1) with histidine-tagged mutants. *J Membr Biol.* 170:243-252.
- Lo, B. and M. Silverman. 1998a. Cysteine scanning mutagenesis of the segment between putative transmembrane helices IV and V of the high affinity Na⁺/Glucose cotransporter SGLT1. Evidence that this region participates in the Na⁺ and voltage dependence of the transporter. *J Biol Chem.* 273:29341-29351.
- Loerger, T.R. 2005. Automated detection of disulfide bridges in electron density maps using linear discriminant analysis. *Journal of applied crystallography.* 121-125.
- Loo, D.D., A. Hazama, S. Supplisson, E. Turk and E.M. Wright. 1993. Relaxation kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:5767-5771.
- Loo, D.D., B.A. Hirayama, A. Cha, F. Bezanilla and E.M. Wright. 2005. Perturbation analysis of the voltage-sensitive conformational changes of the Na⁺/glucose cotransporter. *J Gen Physiol.* 125:13-36.
- Loo, D.D., B.A. Hirayama, E.M. Gallardo, J.T. Lam, E. Turk and E.M. Wright. 1998. Conformational changes couple Na⁺ and glucose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7789-7794.
- Martin, M.G., E. Turk, M.P. Lostao, C. Kerner and E.M. Wright. 1996. Defects in Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) trafficking and function cause glucose-galactose malabsorption. *Nat Genet.* 12:216-220.

- Murer, H., I. Forster and J. Biber. 2004. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. *Pflugers Arch.* 447:763-767.
- Pajor, A.M., S.J. Krajewski, N. Sun and R. Gangula. 1999. Cysteine residues in the Na⁺/dicarboxylate co-transporter, NaDC-1. *Biochem J.* 344 Pt 1:205-209.
- Panayotova-Heiermann, M., D.D. Loo, C.T. Kong, J.E. Lever and E.M. Wright. 1996. Sugar binding to Na⁺/glucose cotransporters is determined by the carboxyl-terminal half of the protein. *J Biol Chem.* 271:10029-10034.
- Panayotova-Heiermann, M., D.D. Loo, M.P. Lostao and E.M. Wright. 1994. Sodium/D-glucose cotransporter charge movements involve polar residues. *J Biol Chem.* 269:21016-21020.
- Panayotova-Heiermann, M., D.D. Loo and E.M. Wright. 1995. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter. *J Biol Chem.* 270:27099-27105.
- Parent, L., S. Supplisson, D.D. Loo and E.M. Wright. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies. *J Membr Biol.* 125:49-62.
- Parent, L., S. Supplisson, D.D. Loo and E.M. Wright. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *J Membr Biol.* 125:63-79.
- Sahin-Toth, M., B. Persson, J. Schwieger, P. Cohan and H.R. Kaback. 1994. Cysteine scanning mutagenesis of the N-terminal 32 amino acid residues in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 3:240-247.

- Sur, C., P. Schloss and H. Betz. 1997. The rat serotonin transporter: identification of cysteine residues important for substrate transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 241:68-72.
- Tanaka, K., F. Zhou, K. Kuze and G. You. 2004. Cysteine residues in the organic anion transporter mOAT1. *Biochem J.* 380:283-287.
- Turk, E., C.J. Kerner, M.P. Lostao and E.M. Wright. 1996. Membrane topology of the human Na⁺/glucose cotransporter SGLT1. *J Biol Chem.* 271:1925-1934.
- Turner, R.J. and J.N. George. 1983. Evidence for two disulfide bonds important to the functioning of the renal outer cortical brush-border membrane D-glucose transporter. *J Biol Chem.* 258:3565-3570.
- Turner, R.J. and J.N. George. 1984. Characterization of an essential disulfide bond associated with the active site of the renal brush-border membrane D-glucose transporter. *Biochim Biophys Acta.* 769:23-32.
- Umbach, J.A., M.J. Coady and E.M. Wright. 1990. Intestinal Na⁺/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes is electrogenic. *Biophys J.* 57:1217-1224.
- van Iwaarden, P.R., J.C. Pastore, W.N. Konings and H.R. Kaback. 1991. Construction of a functional lactose permease devoid of cysteine residues. *Biochemistry.* 30:9595-9600.
- Wright, E.M. 1998. I. Glucose galactose malabsorption. *Am J Physiol.* 275:G879-882.
- Wright, E.M., D.D. Loo, M. Panayotova-Heiermann, B.A. Hirayama, E. Turk, S. Eskandari and J.T. Lam. 1998. Structure and function of the Na⁺/glucose cotransporter. *Acta Physiol Scand Suppl.* 643:257-264.

- Wright, E.M. and E. Turk. 2004. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* 447:510-518.
- Xia, X., C.T. Lin, G. Wang and H. Fang. 2004. Binding of phlorizin to the C-terminal loop 13 of the Na(+)/glucose cotransporter does not depend on the [560-608] disulfide bond. *Arch Biochem Biophys.* 425:58-64.
- Xia, X., J.T. Lin and R.K. Kinne. 2003. Binding of phlorizin to the isolated C-terminal extramembranous loop of the Na⁺/glucose cotransporter assessed by intrinsic tryptophan fluorescence. *Biochemistry.* 42:6115-6120.
- Xia, X., G. Wang, Y. Peng and J. Jen. 2005. Cys351 and Cys361 of the Na⁺/glucose cotransporter are important for both function and cell-surface expression. *Arch Biochem Biophys.* 438:63-69.

5 Effect of substrate on the presteady state kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter

Dominique G. Gagnon, Carole Frindel and Jean-Yves Lapointe

Soumis le 23 juin 2006, version révisée soumise le 5 septembre, accepté le 5 octobre 2006.

The Biophysical Journal, BIOPHYSJ/2006/092296, sous presse

Résumé

Lorsque l'activité du cotransporteur Na⁺/glucose (SGLT1) est mesurée dans les ovocytes de *Xenopus* avec la technique de voltage imposé en deux micro-électrodes, les courants transitoires disparaissent complètement en présence d'une concentration saturante d' α -méthyl-glucose (α MG, un analogue du glucose non hydrolysable). Au contraire, les deux mutants de SGLT1 (C255A et C511A) dont le pont disulfure est brisé (Gagnon *et al.*, JGP, 2006, 127:145-158), démontrent toujours des courants transitoires en présence d' α MG. L'effet de la concentration du α MG sur les courants transitoires a été étudié sur SGLT1 sauvage (wt) et sur les deux mutants. Une augmentation de la concentration d' α MG réduit la charge transférée (partiellement pour les mutant et totalement pour wt SGLT1), déplace le point d'inflexion de la courbe de charge transférée versus le potentiel membranaire (Q-V) vers des potentiels plus positifs et modifie significativement les constantes de temps des courants transitoires. Un modèle cinétique à cinq états est proposé pour expliquer quantitativement l'effet du α MG sur les courants transitoires. Cette analyse révèle que la réorientation du transporteur vide est l'étape la plus lente chez wt SGLT1 en absence ou en présence d' α MG. Au contraire, le changement de conformation du transporteur mutant lié au Na⁺ et au substrat constitue l'étape limitante en présence de substrat et explique la persistance des courants transitoires dans cette situation.

Reproduit de *The Biophysical Journal*, 2006, article sous presse. Copyright 2006. The Biophysical Journal.

Abstract

When measuring Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) activity in *Xenopus* oocytes with the two-electrode voltage-clamp technique, presteady state currents dissipate completely in the presence of saturating α -methyl-glucose (α MG, a nonhydrolysable glucose analogue) concentrations. In sharp contrast, two SGLT1 mutants (C255A and C511A) which lack a recently identified disulfide bridge (Gagnon *et al.*, JGP, 2006, 127:145-158), express the presteady state currents in the presence of α MG. The dose-dependent effects of α MG on presteady state currents were studied for wild type (wt) SGLT1 and for the two mutants. Increases in α MG concentration reduced the total transferred charge (partially for the mutants, totally for wt SGLT1), shifted the transferred charge versus membrane potential (Q-V) curve toward positive potentials and significantly modified the time constants of the presteady state currents. A five-state kinetic model is proposed to quantitatively explain the effect of α MG on presteady state currents. This analysis reveals that the reorientation of free transporter is the slowest step for wt SGLT1 either in the presence or in the absence of α MG. In contrast, the conformational change of the fully loaded, mutant transporters constitutes their rate limiting step in the presence of substrate and explains the persistence of presteady state currents in this situation.

Keywords: SGLT1, two-electrode voltage-clamp, mutagenesis, presteady state currents, transferred charge, kinetic model

Introduction

The Na⁺/glucose cotransporter SGLT1 is a member of the SLC5 family and has been the archetype of this class of Na⁺-coupled substrate transporters. Soon after its cloning (Hediger *et al.*, 1987), expression in *Xenopus* oocytes enabled the measurement of presteady state currents, i.e. transient currents observed in the absence of substrate, which were suggestive of gating currents observed in voltage-dependent channels. As these currents were Na⁺-dependent and were absent in the presence of the specific inhibitor phlorizin (Pz) or in the presence of glucose, they were considered to represent charge displacements occurring during the voltage-dependent reorientation of the Na⁺ binding site and upon Na⁺ binding (Parent *et al.*, 1992b).

Presteady state currents have been extremely useful for devising a credible transport mechanism with quantitative estimation of the rate constants linking the different conformational states. The original model (Parent *et al.*, 1992b) proposed in 1992 has been challenged both theoretically and experimentally (Chen *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997b; Falk *et al.*, 1998; Falk *et al.*, 1999; Krofchick et Silverman, 2003; Krofchick *et al.*, 2004; for review see Wright et Turk, 2004), and new steps have been proposed. Recently Loo *et al.*, using fluorescently labeled mutants (Loo *et al.*, 2005), have reported extremely slow conformational changes (time constants on the order of 100 ms) which have yet to be quantitatively explained by any proposed kinetic model. In particular, this observation is incompatible with a rate limiting step of 50 s⁻¹ which was proposed for the translocation of the fully loaded transporter in hSGLT1 (Parent *et al.*, 1992b; Loo *et al.*, 1993).

One characteristic observed for nearly all cotransporters studied (Na⁺/glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2, Na⁺/myo-inositol cotransporters SMIT1 and SMIT2, Na⁺/monocarboxylate cotransporter SMCT1, Na⁺/Pi cotransporter NaPiII, Na⁺/I⁻ symporter NIS, GABA transporters GAT1 and GAT3, H⁺/hexose cotransporter STP1, Cl⁻ dependant K⁺/amino acids transporter KAAT1), is that addition of a saturating concentration of substrate leads to the total inhibition of presteady state currents (Parent *et al.*, 1992a; Loo *et al.*, 1993; Boorer *et al.*, 1994; Hager *et al.*, 1995; Mackenzie *et al.*, 1996; Eskandari *et al.*,

1997; Forster *et al.*, 1998; Bossi *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Coady *et al.*, 2002; Fesce *et al.*, 2002; Sacher *et al.*, 2002; Coady *et al.*, 2004; Kanai et Hediger, 2004; Virkki *et al.*, 2005). Surprisingly, with the exception of GAT1, no quantitative explanation has been proposed to explain this phenomenon.

Recently, we identified a disulfide bridge between C255 and C511 in human SGLT1 (Gagnon *et al.*, 2006a). An interesting feature of mutants C255A and C511A, which we have not previously published, is that they express presteady state currents in the presence of a saturating α MG concentration, in contrast to what is observed with wild type (wt) SGLT1. This phenomenon has prompted us to examine the dose-dependent effects of α MG on the presteady state currents for the two mutants as well as for wt SGLT1 and to propose a quantitative explanation using a kinetic model displaying different rate limiting steps for the wt SGLT1 and the mutant cotransporters.

Material and method

Oocyte preparation and injection

Oocytes were surgically removed from *Xenopus laevis* frogs, dissected and defolliculated as described previously (Bissonnette *et al.*, 1999). One day after defolliculation, oocytes were injected with 46 nl of water containing mRNA (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ for wt SGLT1 and mutants, respectively) to obtain maximal protein expression. Oocytes were maintained in Barth's solution (in mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgSO_4 , 0.41 CaCl_2 , 0.33 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 HEPES, pH 7.6) supplemented with 5 % horse serum, 2.5 mM Na^+ pyruvate, 100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin for 4-7 days before electrophysiological experimentation.

Molecular biology

The constructions prepared for obtaining the mutants C255A and C511A have been described elsewhere (Gagnon *et al.*, 2006a).

Electrophysiology

The saline solution normally used in our electrophysiological experiments is composed of (in mM): 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgCl_2 , 0.74 CaCl_2 , 10 HEPES and the pH was adjusted to 7.6 with NaOH. Two-electrode voltage-clamp experiments were performed using an Oocyte Clamp OC-725 (Warner Instrument Corp) and a data acquisition system (Digidata 1322A and Clampex 8.2.0.228, Axon Instruments Inc, Union City, CA). Current and voltage microelectrodes were filled with 1 M KCl and had a resistance of 1-2 $\text{M}\Omega$. The bath current electrode was an Ag-AgCl pellet and the reference electrode was a 1 M KCl agar bridge. The oocytes were clamped to a membrane potential (V_m) of -50 mV and three repetitions of V_m steps between $+70$ to -170 mV (by increments of 20 mV, 300 ms duration, no series resistance compensation used) were applied with an interval of 1.7 s between each step. 95% of the command voltage step was reached in 3-4 ms. Data was

obtained with a sampling frequency of 10 kHz, without filtering, and the three repetitions were averaged for each experiment.

Data analysis

Presteady state current analysis was performed as described previously (Gagnon *et al.*, 2006a). Briefly, the transferred charge was obtained at each membrane potential (Q-V curve) by subtracting the integrated baseline-corrected currents in Pz solution (200 μM) from similar currents in saline solution (either in the presence or absence of αMG). Thus, the transferred charge calculated corresponds to the total charge in one experimental condition minus the total charge in the presence of Pz. The total charge in the presence of Pz was found to be linear with voltage as expected if it was mainly due to the presence of the oocyte capacitive current. The baseline correction was obtained from the mean current measured between 50 and 80 ms after the initiation of a voltage pulse. A simple Boltzmann equation was fitted to the Q-V curve to estimate $V_{1/2}$ (the voltage at which half of the charge is transferred), Q_{max} (the amplitude of the total charge transferred), and z (the valence of the transferred charge) (Gagnon *et al.*, 2006a). The time constants (τ_{slow}) were evaluated by fitting a double exponential on the I_{transit} ($I_{\text{saline}} - I_{\text{Pz}}$) with the Clampfit 8.2 program (Axon Instruments Inc, Union City, CA). Only the slow time constant (2-10 ms), which has the dominant amplitude, was considered.

Statistics

Experiments were performed on at least 6 oocytes obtained from a minimum of two different donors. Data are reported as mean \pm SE. and are compared using unpaired Student's *t*-test; statistical significance was set at $P < 0.05$. Errors bars were omitted when smaller than the symbol size.

Results

Presteady state currents in the presence of α MG for C255A and C511A

In contrast to wt SGLT1, the mutants C255A and C511A clearly exhibit presteady state currents in the presence of a saturating α -methyl-glucose (α MG) concentration (Gagnon *et al.*, 2006a), particularly at depolarizing V_m levels. Fig. 5.1 A and Fig. 5.2 A show the Pz-sensitive currents with different voltage steps for the two mutant proteins using several α MG concentrations (0, 1, 5 and 10 mM α MG). As the capacitive currents are eliminated by subtraction of currents measured in the presence of Pz, the transient currents at each voltage step directly represent SGLT1-specific presteady state currents. The integrals of the transient currents measured at different V_m are used to produce transferred charge versus V_m (Q-V) curves. The Q-V curves for the two mutants are shown in Fig. 5.1 B and Fig. 5.2 B. As the cotransporter conformation at very positive V_m levels is predicted to be independent of the presence of extracellular α MG (the binding site being predicted to face inside in all cases (Parent *et al.*, 1992b; Chen *et al.*, 1996; Loo *et al.*, 2005)), each Q-V curve was shifted vertically in order to have $Q=0$ at +50 mV under all conditions. This allows direct comparison of the transferred charge at different V_m ; it is clear that they decrease as the α MG concentration increases. It is also clear from Fig. 5.1 B and 5.2 B that the voltage range over which charge can be transferred is reduced in amplitude and displaced toward more positive potentials when the α MG concentration is increased. The measured charge, at saturating α MG concentration, has reached its plateau level at -50 mV and remains basically constant as V_m becomes more negative. However, a saturating α MG concentration does not totally abolish the transferred charge. A Boltzmann relation can be fitted to the Q-V curves which yields a value for the parameter $V_{1/2}$, the V_m at which half of the mobile charge is equally balanced between the inward and outward facing positions. For both mutants, an increase in α MG concentration shifts the $V_{1/2}$ toward more positive values. For mutant C255A, the measured $V_{1/2}$ averaged -35 ± 5 mV at 0 mM and 5 ± 5 mV at 10 mM α MG (n=6). For mutant C511A, the corresponding values were -28 ± 2 mV at 0 mM and 13 ± 3 mV at 10 mM α MG (n=6).

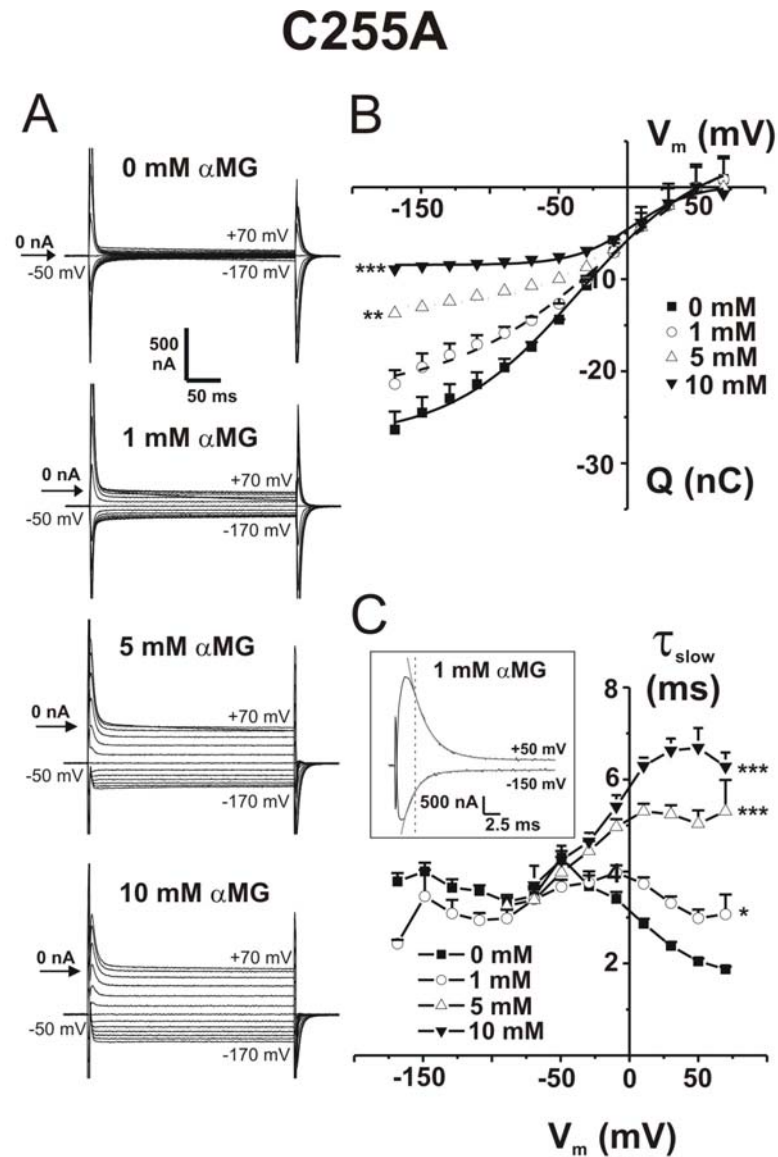


Figure 5.1: Presteady state currents of mutant C255A in the presence of different α MG concentrations.

(A) Presteady state current traces at different V_m in the presence of various α MG concentrations (0, 1, 5 and 10 mM) for a typical C255A-expressing oocyte. The currents were obtained by subtracting the currents in the presence of 200 μ M Pz from the currents measured in the various conditions. (B) Q-V curves in different α MG concentrations were compared to those in the absence of substrate. Values were shifted to have the same $Q=0$ at $V_m = +50$ mV. The curve represents a Boltzmann equation fitted to the points ($n=6$). (C) Time constants of the presteady state currents in different α MG concentrations were compared to those in the absence of substrate. ($n=6$). The inset represents the double exponential fit (red line) of the Pz-sensitive currents (black line) shown in (A), at 1 mM α MG, for the indicated V_m . The dotted line indicates the time at which 95% of the V_m is

achieved. Mean \pm SE. are shown. Stars indicate statistical significance with respect to wt SGLT1 (*: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$).

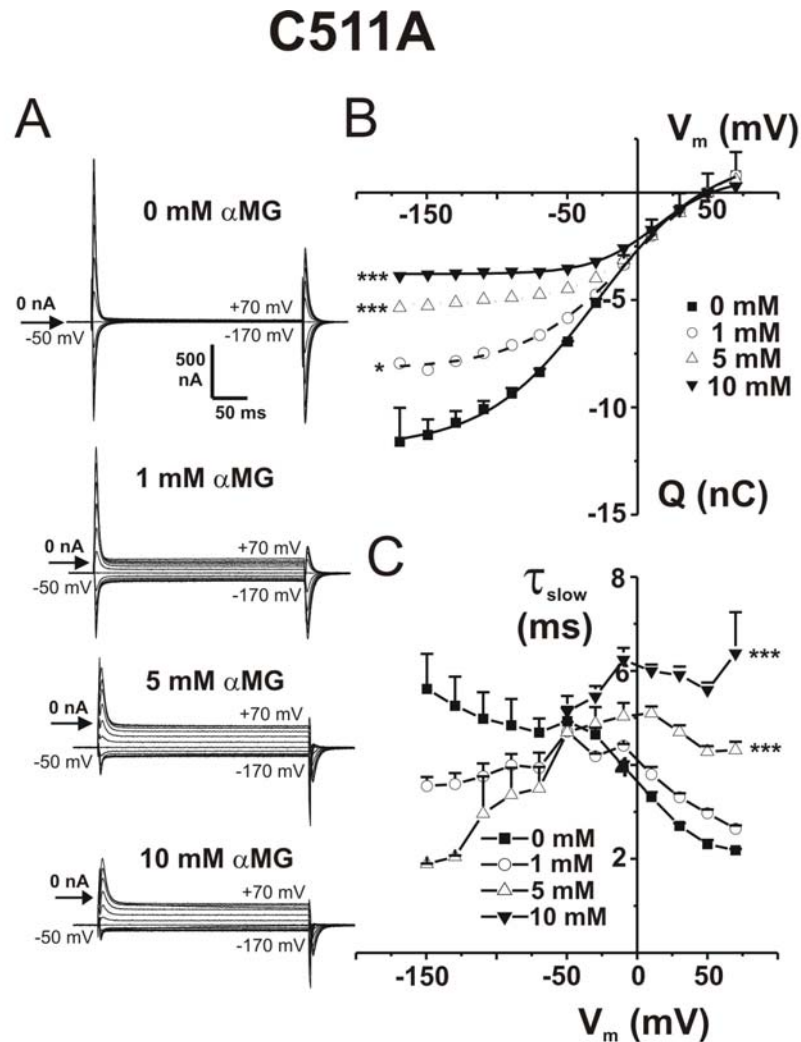


Figure 5.2: Presteady state currents of mutant C511A in the presence of different α MG concentrations.

(A) Presteady state current traces at different V_m in the presence of various α MG concentrations (0, 1, 5 and 10 mM) for a typical C511A-expressing oocyte. The currents were obtained by subtracting the currents in the presence of 200 μ M Pz from the currents measured in the various conditions. (B) Q-V curves in different α MG concentrations were compared to those in the absence of substrate. Values were shifted to have the same $Q=0$ at $V_m = +50$ mV. The curve represents a Boltzmann equation fitted to the points ($n=6$). (C) Time constants of the presteady state currents in different α MG concentrations were compared to those in the absence of substrate. ($n=6$). Mean \pm SE. are shown. Stars indicate statistical significance (see Fig. 5.1 legend).

The progressive addition of extracellular α MG also affected the slow time constant (τ_{slow}) for presteady state currents as depicted in Fig. 5.1 C and Fig. 5.2 C. They were obtained by fitting double exponentials to the Pz-sensitive currents. As reported previously (Gagnon *et al.*, 2006a), in the absence of α MG, τ_{slow} for the mutant proteins reached a plateau of 4 to 5 ms at hyperpolarised V_m , which is about half of the value measured for the wt SGLT1. An increase in α MG concentration clearly produced an increase of τ_{slow} at positive V_m . For V_m more negative than -50 mV, addition of α MG accelerated the transient currents, as shown in Fig. 5.2 C for 1 mM α MG. The currents in the presence of higher concentrations can no longer be fitted accurately at these voltages (see Fig. 5.2 C for 10 mM α MG and Fig. 5.1 C for 5 and 10 mM α MG). Consequently, at 1 mM α MG, the τ_{slow} versus V_m ($\tau_{\text{slow}}-V$) curve has a bell shape centred around -50 mV for both mutants. At 10 mM α MG, τ_{slow} would start at very low values for negative V_m and reaches a value of 6-7 ms for both mutants at depolarizing potentials.

The stability of the preparation as a function of time was tested in each experiment by comparing presteady state currents in the absence of α MG measured before and after having presented the different α MG concentrations. In all cases, the Q-V and $\tau_{\text{slow}}-V$ curves were found identical. In addition, the effects of α MG on the presteady state currents were found to be independent on the order of the α MG concentrations applied (increasing or decreasing concentrations).

Presteady state currents in the presence of α MG for wt SGLT1

While the inhibitory effect of α MG on wt SGLT1 presteady state currents has long been known (Parent *et al.*, 1992a; Loo *et al.*, 1993), it has never been studied quantitatively in a dose-dependent manner nor been explained with the use of a kinetic model. Given our findings with the two SGLT1 mutant proteins, we sought to characterize this effect in detail on wt SGLT1 and to compare it with that observed for the mutants. Fig. 5.3 A shows Pz-sensitive presteady state currents recorded from wt SGLT1 in the absence or in the presence of different α MG concentrations (0.5 mM, 1 mM and 5 mM). In agreement with previous reports, addition of extracellular α MG leads to a progressive decrease in the presteady state

currents and to the appearance of steady state inward Na^+ /glucose flux, which have been described in detail (Parent *et al.*, 1992a; Loo *et al.*, 1993). The Q-V curves obtained with different α MG concentrations is illustrated in Fig. 5.3 B. It is obvious that a saturating concentration of α MG (5 mM) completely abolished charge transfer (n=9), at least within the time resolution provided by the two-electrode voltage-clamp technique. In the presence of 5 mM α MG, the amplitude of the transferred charge that can be detected is approximately equal to that measured from a non-injected oocyte (<1 nC). The time constants of these presteady state currents are shown in Fig. 5.3 C. Increased α MG concentrations produce a clear acceleration of the transient currents at negative V_m whereas the value of the time constant remains the same at positive V_m . In the presence of 5 mM α MG, the transient currents are difficult to fit to a double exponential equation because τ_{slow} shows only modest voltage dependence, and reaches a value of ~2.5 ms (at +70 mV) with very small amplitude (n=7). Both parameters are close to the limits inherent to the two-electrode voltage-clamp technique.

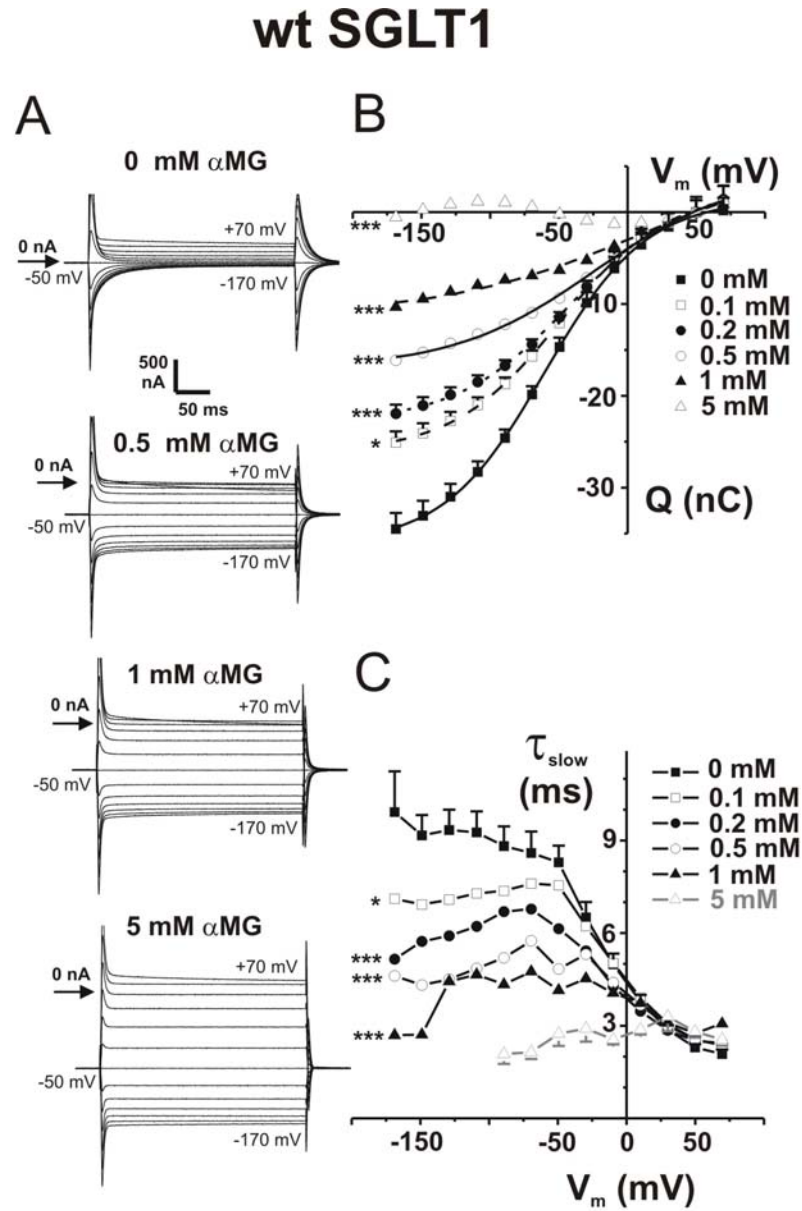


Figure 5.3: Presteady state currents of wt SGLT1 in the presence of different α MG concentrations.

(A) Presteady state current traces for different V_m , in the presence of various α MG concentrations (0, 0.5, 1 and 5 mM) containing solutions, for a typical wt SGLT1 expressing oocyte. The currents were obtained by subtracting the currents in the presence of 200 μ M Pz to the ones in the various conditions. (B) Q-V curves in different α MG concentrations as compared to those in the absence of substrate. Values were shifted to have the same $Q=0$ at $V_m = +50$ mV. The curve represents a Boltzmann relation fitted to the points ($n=9$). (C) Time constants of the presteady state currents in different α MG concentrations as compared to those in the absence of substrate. The time constants at 5 mM α MG were plotted in gray because of the small amplitude of the exponential giving

uncertainty about the value of this time constant (n=7). Mean \pm SE. are shown. Stars indicate the statistical significance (see Fig. 5.1 legend).

Fig. 5.4 summarizes the effects of α MG on the $V_{1/2}$ and on the normalized amplitude of the total transferred charge for wt SGLT1 versus the two mutants. In Fig. 5.4 A, the shift in $V_{1/2}$ produced by the addition of α MG to the wt SGLT1 is compared with the shifts mentioned above for the two mutants. For wt SGLT1, $V_{1/2}$ goes rapidly from -60 ± 5 mV at 0 mM to 12 ± 12 mV at 1 mM α MG (n=9) and, at α MG concentrations higher than 1 mM, the amplitude of the Q-V curve is reduced to such an extent that the fitting of a Boltzmann curve is not reliable. In all cases, the $V_{1/2}$ is progressively shifted toward positive V_m levels as the external [α MG] increases but this shift is less marked for the mutants than for wt SGLT1.

In order to quantitatively compare the sensitivity of the presteady state currents to α MG, the decrease in transferred charge caused by α MG were normalized to the total transferred charge in the absence of substrate (i.e., $\frac{Q_{saline} - Q_{\alpha MG}}{Q_{saline}}$). A simple Michaelis-

Menten equation was fitted to $(\frac{Q_{saline} - Q_{\alpha MG}}{Q_{saline}})$ taken at -170 mV as a function of α MG concentration after setting “Q=0” for $V_m = +50$ mV (as done in Figs. 1 B, 2 B and 3 B). It is clear that for the wt SGLT1, a high α MG concentration inhibits 100% of the transferred charge whereas only partial inhibition (~65-75% inhibition) was observed for the mutant proteins. It was found that the α MG-sensitive charge is consistent with α MG affinity constants ($K_{mQ}^{\alpha MG}$) of 0.48 ± 0.05 mM for wt SGLT1 (see Fig. 5.4 B), 5 ± 2 mM for mutant C255A and 2 ± 1 mM for mutant C511A whereas their $K_{ml}^{\alpha MG}$ constants, using α MG-sensitive cotransport current (steady state values, $I_{ss}(\alpha MG)$), were 0.97 ± 0.1 mM for wt SGLT1 (Bissonnette *et al.*, 1999; Gagnon *et al.*, 2006a), 1.6 ± 0.2 mM (C255A) and 1.6 ± 0.2 mM (C511A) at -170 mV (Gagnon *et al.*, 2006a).

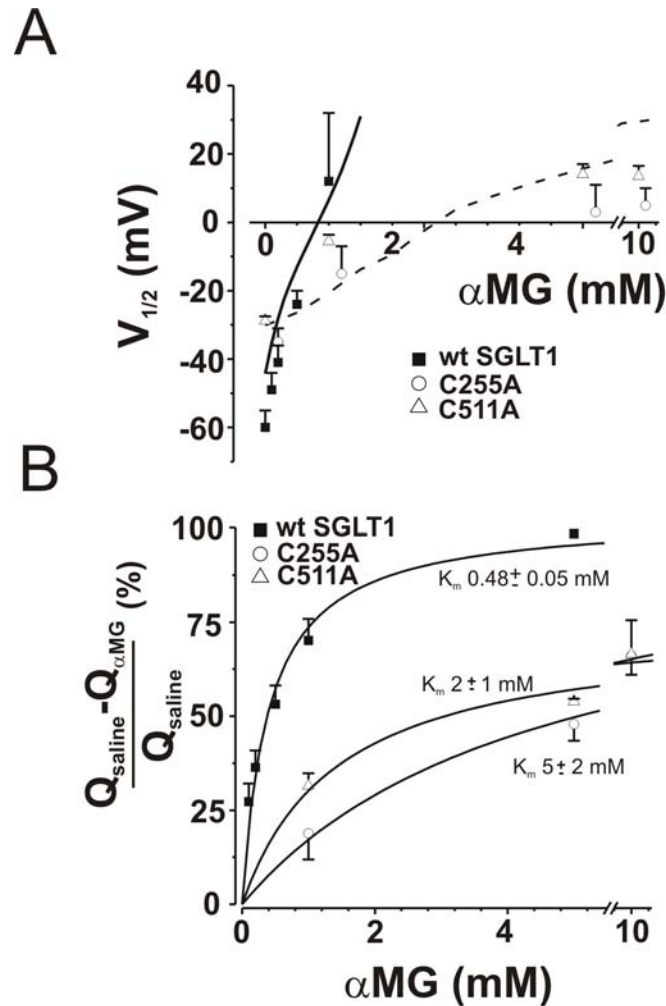


Figure 5.4: Effect of α MG on $V_{1/2}$ and estimation of $K_m^{\alpha\text{MG}}$ with the transferred charge.

(A) $V_{1/2}$ of C255A (open circles), C511A (open triangles) and wt SGLT1 (filled squares), in the presence or absence of different α MG concentrations. The lines represent the extracted $V_{1/2}$ values from the theoretical Q-V curves obtained with the kinetic model's current simulations (solid line: wt SGLT1, dotted line: mutants). The phenomenological parameter $V_{1/2}$ is obtained by a simple Boltzmann relation fitted to the experimental and theoretical Q-V curves (see Fig. 5.1 B, 5.2 B and 5.3 B). (B) Normalized α MG-dependent

transferred charge in the presence of different α MG concentrations ($\frac{Q_{\text{saline}} - Q_{\alpha\text{MG}}}{Q_{\text{saline}}}$) of wt

SGLT1 (filled square), C255A (open circle) and C511A (open triangle) at -170 mV. The line represents a simple Michaelis-Menten equation fitted to the points and the corresponding K_m value from the fit is noted. Mean \pm SE. are shown.

Kinetic model for presteady state currents

A scheme of the simple five-state kinetic model used is presented in Fig. 5.5. The substrate binding and debinding steps (k_{45} and k_{54}) are voltage-independent (Parent *et al.*, 1992b; Eskandari *et al.*, 2005) as are the lumped reactions k_{41} and k_{51} which represent the conformational changes of the Na^+ -loaded transporter (involved in the leak current) and the Na^+ - and αMG -loaded transporter, respectively, with their associated intracellular release steps. It was found that the extracellular Na^+ -binding reaction could be assumed to be a fast reaction at equilibrium without losing any fitting performance. The voltage-dependent reactions are expressed as follows (for $i=1, 2, 3; j=i+1$):

$$k_{ij} = k_{ij0} \exp\left(z_i \alpha_i \frac{FV_m}{RT}\right), \quad k_{ji} = k_{ji0} \exp\left(-z_i (1 - \alpha_i) \frac{FV_m}{RT}\right) \quad \text{Eq. 1}$$

where z_i is the valence of the equivalent moving charge, α_i represents the asymmetry of the energy barrier, V_m is the membrane potential and F , R and T have their usual meaning (see also Table V.I).

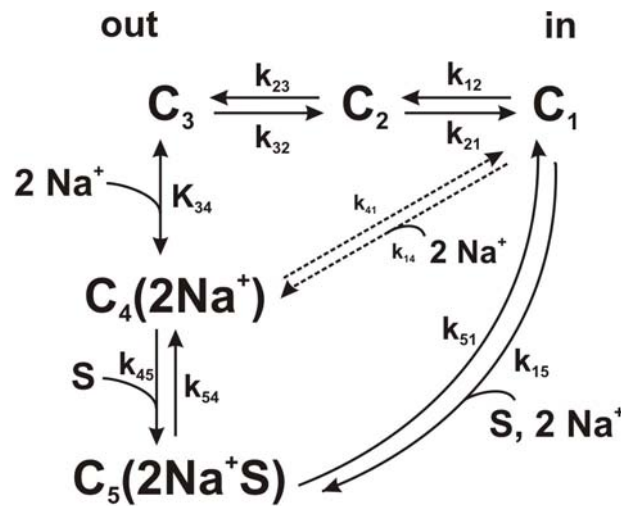


Figure 5.5: Kinetic model of the Na^+ /glucose cotransporter for the estimation of presteady state currents.

The voltage-independent substrate binding/debinding events are included (k_{45} , k_{54}), in contrast to the models previously described in Chen *et al.* (1996) and in Gagnon *et al.* (2006). See Table V.I for rate constant values and RESULTS and DISCUSSION for further details.

The affinity for intracellular Na^+ ($K_m^{\text{Na}^+}$) was previously estimated for rabbit SGLT1 in giant, excised, inside-out patches and was found to vary from 44 mM to 70 mM (Sauer *et al.*, 2000; Eskandari *et al.*, 2005). In agreement with these estimates, we recently found that intracellular Na^+ has to be increased by blocking the Na^+/K^+ -ATPase overnight in order to generate a measurable outward Na^+ /glucose current upon intracellular glucose injection (Charron *et al.*, 2006). This is consistent with an intracellular $K_m^{\text{Na}^+}$ much higher than the physiological intracellular Na^+ concentration. On the other hand, the estimation of $K_m^{\alpha\text{MG}}$ for the intracellular site is ~ 35 mM (Sauer *et al.*, 2000; Eskandari *et al.*, 2005). Consequently, under physiological conditions, the inverse mode of transport is highly unlikely which is reflected by very low values of “ k_{14} ” and “ k_{15} ” (see Table V.I). Thus, we assumed that the probability of finding the intracellular site loaded with Na^+ and αMG was negligible and we reduced the potential seven-state kinetic model into the five-state kinetic model shown in Fig. 5.5.

Table V.I: Rate constants of a five-state kinetic model used for the presteady state current simulations of wt SGLT1 and mutants

	k_{120}^*	k_{210}	k_{23}	k_{320}	K_{340}^\dagger	k_{41}^\ddagger	k_{45}	k_{54}	k_{51}^\ddagger
	(s ⁻¹)	(s ⁻¹)	(s ⁻¹)	(s ⁻¹)	(M ²)	(s ⁻¹)	(M ⁻¹ s ⁻¹)	(s ⁻¹)	(s ⁻¹)
Loo <i>et al.</i>									
(1993) [§]	25	600	-	-	0.021	0.3	10000	20	50
Chen <i>et al.</i>									
(1996)	790	370	100	280	0.153	-	-	-	-
wt SGLT1	790	370	110	130	0.1	10	300000	1000	2000
Mutants	790	230	230	100	0.072	10	60000	100	80

Footnotes:

* The constants k_{ij0} represent the value of k_{ij} at 0 mV (see Eq. 1). The rate constants which are independent of V_m are simply noted k_{ij} . The values of z_i used for the equivalent charge moving across the entire membrane electrical field in the step between state “i” and “i+1” were -0.38, -0.52 and -1.1 for i varying from 1 to 3, respectively. The values for α_i describing the asymmetry of the energy barrier were 0.3 and 0 for i of 1 and 2, respectively.

† The Na⁺ binding step is assumed to be in rapid equilibrium. K_{340} represents the ratio k_{430}/k_{340} , the equilibrium dissociation constant. This simplification eliminates the need for α_3 in the description of the voltage-dependent Na⁺-binding step.

‡ The constants k_{14} (in M⁻²s⁻¹) and k_{15} (in M⁻³s⁻¹) were calculated to respect micro reversibility. If the intracellular Na⁺ concentration is set at 7 mM, the reaction rates from state 1 to state 4 are 0.009 s⁻¹ and 0.05 s⁻¹ for wt SGLT1 and for the mutants, respectively. If the intracellular α MG concentration is 0.1 mM, the reaction rate from state 1 to state 5 are 0.05 s⁻¹ and 0.03 s⁻¹ for wt SGLT1 and for the mutants, respectively.

§ In the model of Loo *et al.*, there are six states and no intermediate state between our C₁ and C₃. Moreover, there are two additional states representing the intracellular facing fully loaded transporter and Na⁺-loaded transporter which are lumped into k_{41} and k_{51} in our model. See RESULTS and DISCUSSION for more details and references (Parent *et al.*, 1992b; Loo *et al.*, 1993).

The numerical simulations were performed using Matlab 6.5.0 software (The Math Works Inc., Natick, MA). Transferred charges were calculated as the integral of the presteady state currents as done during the analysis of the experimental data and were also fitted with a simple Boltzmann curve to deduce the $V_{1/2}$, Q_{\max} and z parameters. As the analytical expression for the time constant in the presence of substrate cannot be obtained in a five-state model, the numerical values of the time constant were obtained by taking the reciprocal of the eigenvalues of the following matrix, as previously reported (Loo *et al.*, 2005):

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \\ C_4 \\ C_5 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -(k_{12} + k_{15}) & k_{21} & 0 & 0 & k_{51} \\ k_{12} & -(k_{21} + k_{23}) & k_{32} & 0 & 0 \\ 0 & k_{23} & -(k_{32} + k_{34}) & k_{43} & 0 \\ k_{14} & 0 & k_{34} & -(k_{45} + k_{43} + k_{41}) & k_{54} \\ k_{15} & 0 & 0 & k_{45} & -(k_{54} + k_{51}) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \\ C_4 \\ C_5 \end{bmatrix}$$

Moreover, the model predicts the relaxation of presteady state currents toward steady-state currents. The current (I) versus V_m curves are sigmoid, as observed for the experimental I-V curves, in the absence and in the presence of α MG (not shown). The rate constants of the model were adjusted by trial and error to obtain a satisfactory fit to the measured Q-V curves, the $V_{1/2}$ and the slow time constants of the presteady state currents. The steady state parameters (I-V curves, $K_m^{\text{Na}^+}$ or $K_m^{\alpha\text{MG}}$) were not considered as criteria for the adjustment of the model parameters but were found afterwards to be in accordance with the experimental values.

Simulation of presteady state currents in the absence of α MG

Table V.I gives the rate constants used by Chen *et al.* (1996) and by Loo *et al.* (1993) as well as the rate constants used by the present study to simulate the time constants of the presteady state currents. As shown in Fig. 5.6 A, our new set of rate constants can reproduce, in a generally satisfying manner, the currents, the Q-V curves and the τ_{slow} -V curves for wt SGLT1 exposed to different α MG concentrations. In the presence of 90 mM

Na^+ , a k_{210}/k_{120} ratio of about 0.5 is required for the plateau effect seen on the $\tau_{\text{slow}}\text{-V}$ curve at hyperpolarizing V_m . k_{23} is a crucial rate constant because it is voltage-independent and becomes rate limiting for V_m below -70 mV (at 90 mM Na^+). Indeed, the value of $1/k_{23}$ closely corresponds to the plateau value reached by τ_{slow} at very negative V_m . The ratio k_{23}/k_{32} is also responsible for the voltage dependence of τ_{slow} observed at depolarizing V_m . At 0 mV, K_{34} (the ratio k_{43}/k_{34}) is 0.1 M^2 for wt SGLT1 and 0.07 M^2 for the mutants and is largely responsible for the Na^+ affinity measured at low αMG concentration. This ratio also has a large influence on the position of the $V_{1/2}$ of the Q-V curve. The K_{34} and the k_{23} values were modified for simulation of transferred charges through the mutant proteins to account for the faster τ_{slow} at negative V_m and the new $V_{1/2}$ of -30 mV (instead of -50 mV) which was observed for both mutants (Gagnon *et al.*, 2006a). These two simple modifications yielded the fit for the Q-V curve of Fig. 5.6 B (left panel), shown for mutant C511A, and the $\tau_{\text{slow}}\text{-V}$ curve shown in Fig. 5.6 B (right panel) at 5 mM αMG .

Simulation of the effect of αMG on the presteady state currents

In order to interpret the effects of αMG on the presteady state currents, appropriate values for the parameters k_{45} , k_{54} and k_{51} have to be determined. Our strategy was to start by establishing parameters that could explain the behaviour of the transferred charges of wt SGLT1 in the presence of different αMG concentrations. Our first criterion was that the transferred charge had to disappear in the presence of a saturating αMG concentration. The k_{ij} of the four state model established in the absence of αMG were maintained constant and we investigated the effects of the three new k_{ij} on the simulated Q-V curve. We started with the parameters proposed by Loo *et al.* (1993) (see Table V.I) but needed to increase the value of k_{51} by up to 40-fold over the original value (2000 vs. 50 s^{-1}) to reproduce the charge disappearance observed at high αMG concentration. It was also clear that the ratio k_{45}/k_{54} influenced the $V_{1/2}$ of the Q-V curve: an increase in this ratio shifts the $V_{1/2}$ toward more positive V_m . However, the absolute value of k_{45} and k_{54} (and not only their ratio) were also important in the global behaviour of the Q-V curve as a function of αMG concentration. With respect to the values proposed by Loo *et al.* (1993), the values of k_{45} and k_{54} had to be increased by factors of 30 and 50, respectively.

For the mutants, we first established the values of the parameters k_{210} , k_{23} and K_{340} to account for the faster time constants and the positive shift in $V_{1/2}$ in the absence of α MG. Changes in k_{210} and k_{23} were necessary along with more modest changes in the remaining parameters describing the α MG-independent steps of the kinetic model. The new values of k_{45} , k_{54} and k_{51} found for the wt transporter could not reproduce the observed Q-V and τ_{slow} -V curves of the mutants. We found that the reactions describing α MG binding and debinding had to be reduced by an order of magnitude and the reorientation of the fully loaded carrier (k_{51}) had to be massively decreased from 2000 to 80 s⁻¹. The best parameter set found is presented in Table V.I for wt SGLT1 and the mutants.

Simulations of wt SGLT1

The simulated wt SGLT1 Q-V curves are shown in Fig. 5.6 A (middle panel), superimposed on the experimental data points (in gray). Although, the shapes of the theoretical and experimental Q-V curves differ slightly, the general decrease due to external α MG concentration is well-represented. Three parameters were used to measure the accuracy of the model predictions: the $V_{1/2}$ of the Q-V curves, the normalized transferred charge curves in the presence of different α MG concentrations ($\frac{Q_{\text{saline}} - Q_{\alpha\text{MG}}}{Q_{\text{saline}}}$) as well as the τ_{slow} -V curve. Fig. 5.4 A illustrates the phenomenological parameter $V_{1/2}$ as a function of α MG concentration extracted from the fits of a simple Boltzmann relation to our theoretical Q-V curves (solid line). Although the theoretical Q-V curve differs slightly from a simple Boltzmann relation, the model correctly represents the voltage shift produced by α MG addition. The model also correctly predicts the total inhibition of the transferred charge by a saturating α MG concentration. We estimated an apparent affinity for α MG ($K_{mQ}^{\alpha\text{MG}}$), using the remaining charge in the presence of α MG ($\frac{Q_{\text{saline}} - Q_{\alpha\text{MG}}}{Q_{\text{saline}}}$), to compare it with that obtained experimentally. The parameters given in Table V.I yield a $K_{mQ}^{\alpha\text{MG}}$ value of 0.40 ± 0.07 mM at -170 mV which is not significantly different from the experimental value reported above. Finally, Fig. 5.6 A (right panel) shows that the τ_{slow} -V curve values are close to the experimental values as the model reproduces very well the

acceleration of the transient currents at hyperpolarizing V_m and shows the bell shaped curve peak shifting toward more positive V_m as the α MG concentration increases.

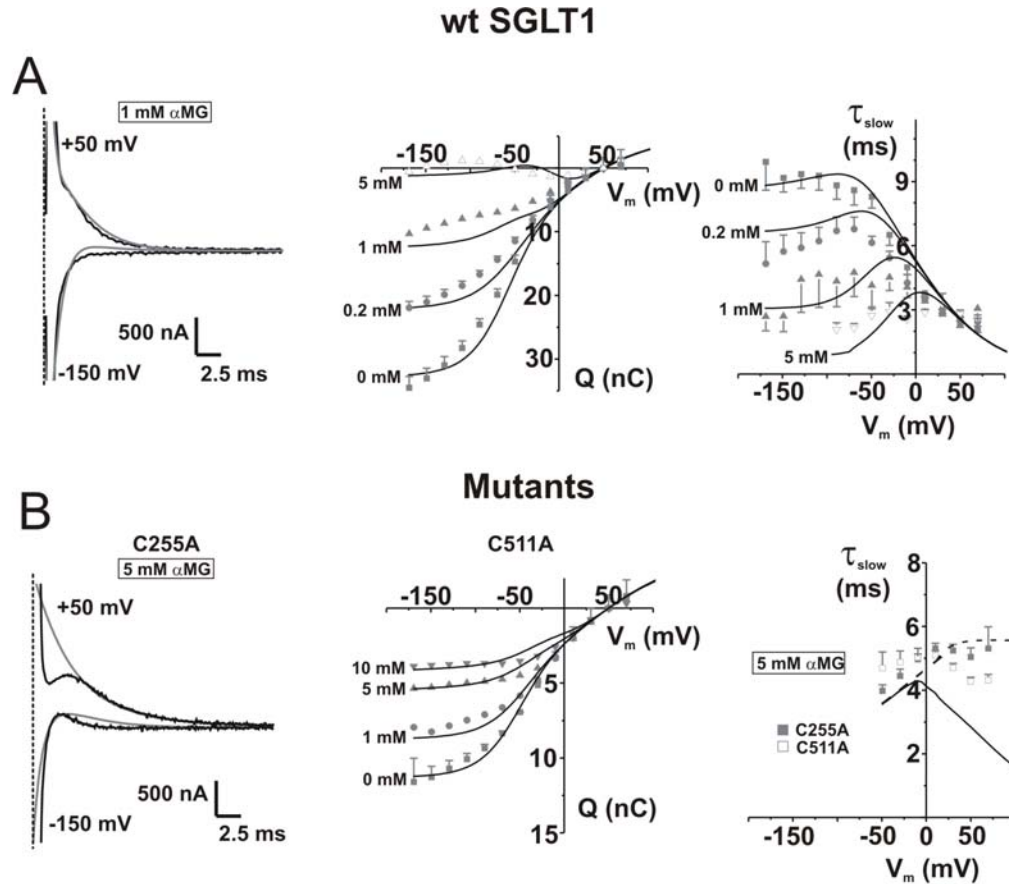


Figure 5.6: Predictions of the kinetic model.

(A) Predictions of the kinetic model superimposed on the experimental data for wt SGLT1. The left panel shows simulated currents (red line) superimposed on the experimental current (black line) at 1 mM α MG, for the indicated V_m ; the vertical dotted line indicates the beginning of the voltage step. The middle panel illustrates the Q-V curves and the right panel shows slow time constants (τ_{slow}) as a function of V_m at different α MG concentrations. (B) Predictions of the kinetic model superimposed on the experimental data for mutants. The left panel shows the experimental current (black line) of mutant C255A superimposed on the simulated currents at 1 mM α MG (red line) for the indicated V_m ; the vertical dotted line indicates the beginning of the voltage step. The middle panel illustrates the Q-V curves for mutant C511A and the right panel shows slow time constants (τ_{slow}) as a function of V_m for both mutants at 5 mM α MG. The current from wt SGLT1 and C255A come from the experiment presented in Fig. 5.3 A and Fig. 5.1 A, respectively. The experimental data points were represented in gray for comparison. For clarity, only data points from mutant C511A are presented for the Q-V curve. The Q-V curve was shifted vertically such that Q=0 at +50 mV. As the model predicts significant amplitudes for two

exponential components, the two time constants (a fast one, solid line and a slower one, dash line) are presented.

Simulations of the mutant SGLT1s

The simulated Q-V curves for the mutant SGLT1s are shown in Fig. 5.6 B (middle panel), superimposed on the experimental data points for mutant C511A alone (in gray) because mutant C255A produced very similar values. The charge plateau value reached at hyperpolarizing V_m , at 5 and 10 mM α MG, is reproduced very well by the modelled Q-V curve. The dotted line on Fig. 5.4 A illustrates $V_{1/2}$ as a function of α MG concentration for the mutants. It is clear that the estimated $V_{1/2}$ for the modelled Q-V curves of the mutants closely reproduced the characteristics of both mutants. The model accounts for the partial inhibition of the transferred charge at high α MG concentrations. In addition, the $K_m^{Q\alpha MG}$ was estimated with the remaining charge in the presence of α MG ($\frac{Q_{saline} - Q_{\alpha MG}}{Q_{saline}}$) and provided the value of 4 ± 2 mM at -170 mV, which is close to the experimental values reported above for C511A and, to a lesser extent, for C255A (2 ± 1 mM and, 5 ± 2 mM respectively). Finally, the theoretical τ_{slow} values were superimposed on the experimental values for both mutants at 5 mM α MG in Fig. 5.6 B (right panel). The model predicts two exponentials with significant amplitude with time constants in the range of 2-10 ms in the presence of α MG. The first one is almost identical with that observed in the absence of α MG. The second one is slower at depolarizing V_m where it reaches a plateau value of ~ 5.5 ms. Experimentally, a single exponential with a time constant in the ms range could be detected. Given the limited speed of the voltage pulse, the typical noise level found in our current recording and given the fact that the two predicted time constants are in the same order of magnitude, it is conceivable that our experimental time constant would correspond to some intermediate value between the predicted ones. Thus it is concluded that the model reproduces fairly well the experimental time constants measured in the presence of α MG.

Discussion

The identification of a disulfide bridge between C255 and C511 constitutes an important step in our understanding of how the 14 transmembrane segments are located with respect to each other and in the eventual identification of the physical structure that serves as the voltage sensor in SGLT1 (Gagnon *et al.*, 2006a). The two mutants C255A and C511A were found to display further interesting features which confirmed the importance of this region of the cotransporter. In the present study we report that, in contrast with wt SGLT1, these two mutants exhibit presteady state currents in the presence of a saturating α MG concentration. By analysing the dose-dependent effects of α MG on the presteady state currents of these mutants as well as for wt SGLT1, we sought to identify a satisfying kinetic explanation for both the partial diminution of mutant presteady state currents by α MG and for the complete disappearance of the wt SGLT1 transient currents.

The presteady state currents in the absence of α MG have been studied using cut-open oocytes exposed to various Na^+ concentrations and a simple four-state kinetic model (Chen *et al.*, 1996) was found to be consistent with the amplitudes and the time constants (τ_{fast} (<1 ms) and τ_{slow} (1-10 ms)) of the experimentally determined presteady state currents as a function of the external Na^+ concentration. The presence of these two time constants was more recently confirmed for rabbit SGLT1 (Krofchick et Silverman, 2003; Krofchick *et al.*, 2004) and for human SGLT1 (Loo *et al.*, 2005). In this last study, fluorescently labeled cotransporters were also used and a slower time constant of ~ 100 ms was reported in addition to τ_{fast} and τ_{slow} . A seven state model was suggested for the translocation of the free transporter and the binding of two external Na^+ ions but the authors could not find a parameter set that would be in quantitative agreement with their own observations. Considering the time resolution provided by the two-electrode voltage-clamp technique, we decided to use the four state model proposed by Chen *et al.* (1996) to explain the effects of disrupting the disulfide bridge C255-C511 on the $V_{1/2}$ of the Q-V and τ_{slow} -V curves in the absence of α MG (Gagnon *et al.*, 2006a). In the original model, it was assumed that a single Na^+ ion was involved in the presteady state currents. In order to incorporate α MG binding, and given that the cotransport stoichiometry is 2 Na^+ :1 glucose (Chen *et al.*, 1995), we

simply replaced the original rate constant for Na⁺ binding (k_{34}) by $k_{34}/[\text{Na}^+]$ in order to account for both Na⁺ ions and made it a second order rate constant in M⁻²s⁻¹. As the extracellular Na⁺ concentration is constant in the present study, further studies will have to test whether the model used is consistent with the effects of changes in external Na⁺ concentration.

Occupancy probabilities in the presence and absence of α MG

In the absence of α MG and at -50 mV, the set of rate constants proposed in Table V.I leads to occupancy probabilities (C_i) of 5%, 22%, 43% and 30% (from $i=1$ to 4) indicating that 73% of the Na⁺ binding sites are exposed outside either in a free or Na⁺-bound state (Chen *et al.*, 1996; Gagnon *et al.*, 2006a). Obviously this situation is highly voltage-dependent and, at $+70$ mV, C_1 and C_2 now represent 52% and 40% of the cotransporter conformations, respectively. If, from state C_4 to state C_1 , the total number of unitary charges that can move across the entire membrane electrical field is 2 ($|z_1+z_2+z_3|=2$), the occupancy probabilities at $+70$ mV indicate that all but 11% of it has already moved into the inward facing configuration. Fig. 5.7 A presents the occupancy probabilities in the absence of α MG for an extreme voltage step from $+70$ to -150 mV. Upon hyperpolarisation, C_1 rapidly transforms into C_2 and the free binding sites exposed to the extracellular solution (C_3) become Na⁺-bound immediately. The step $C_1 \rightarrow C_2$ is considered to be mainly responsible for the fast component to the transient current. In contrast, the following slow transformation of C_2 into C_3 (which is in equilibrium with $C_4(2\text{Na}^+)$) is clearly responsible for the slow component of the observed transient currents. Fig. 5.7 B and C present the changes in occupancy probability for a similar voltage step but in the presence of α MG at 1 or 5 mM. At $+70$ mV, the starting probabilities are independent of the presence of α MG in the extracellular solution as are the fast events occurring in the first ms after hyperpolarisation. At -150 mV, the slowest rate constant in the reactions leading to the inward Na⁺/glucose current is clearly k_{23} . This is why C_2 accumulates transiently (75%) then relaxes to a value consistent with the steady state cotransport rate allowed by the external α MG concentration. This is shown in Fig. 5.7 D

where the probability of finding C_2 is plotted as a function of time for different α MG concentrations.

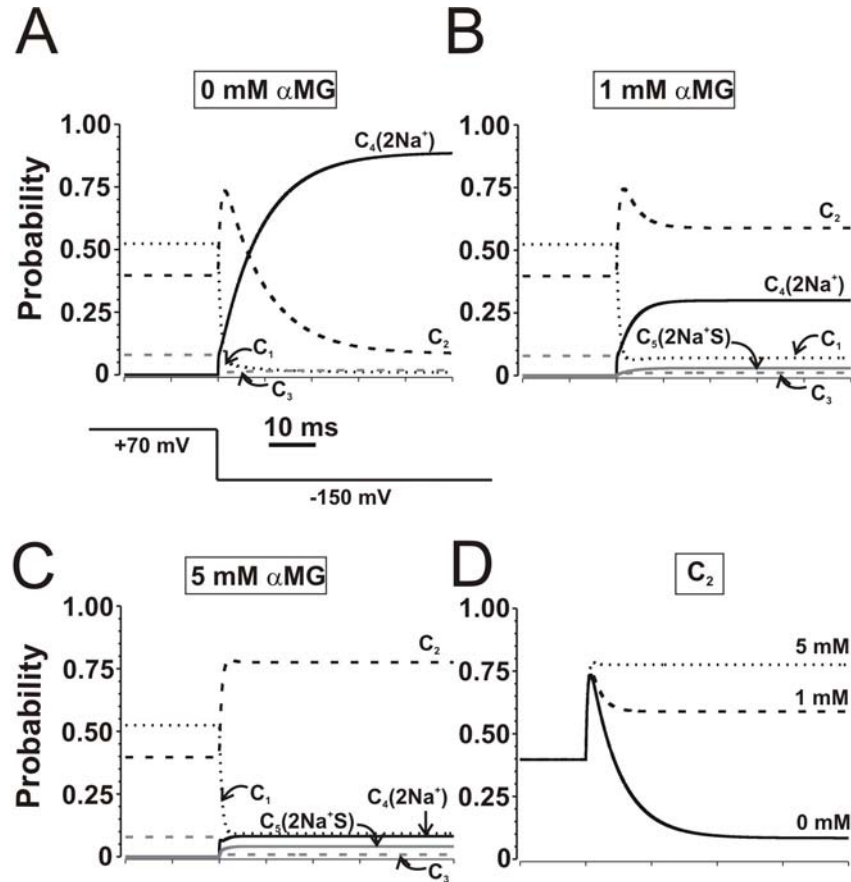


Figure 5.7: Occupancy probability (C_i) as a function of time as calculated by the five-state kinetic model for wt SGLT1.

(A) Time course of wt SGLT1 occupancy probabilities (90 mM Na^+) for a V_m pulse from +70 mV to -150 mV in the absence of α MG, in the presence of 1 mM α MG (B) and 5 mM α MG (C). (D) Time course of wt SGLT1 C_2 occupancy probability in the absence of α MG (solid line, 90 mM Na^+) or in the presence of 1 mM (dash line) or 5 mM (small dash line) α MG for a V_m pulse from +70 mV to -150 mV.

For the mutants, the rate constants of Table V.I lead to occupancy probabilities of 2%, 9%, 45% and 44% (from $i=1$ to 4) at -50 mV in the absence of α MG which is quite similar to the C_i probabilities found for wt SGLT1. At +70 mV, the distribution is slightly different from the wt SGLT1 as C_2 now dominates with a probability of 42% with respect to C_1 (34%) while the outward facing, free binding site (C_3) presents a significant

probability of 23%. Fig. 5.8 A presents the changes in C_1 as a function of time for an extreme voltage pulse from +70 mV to -150 mV. Once again, in the absence of α MG, C_2 is transiently accumulated before relaxing to less than 5% as the Na^+ -bound form progressively rises to more than 90%. Fig. 5.8 B and C depict the occupancy probabilities in the presence of 1.5 and 5 mM α MG. Under these circumstances, and in marked contrast to wt SGLT1, C_2 continues to relax to a low value and it is $C_5(2\text{Na}^+\text{S})$, the fully loaded transporter, that progressively increases and attains up to 48% (this value increases to 58% at 10 mM α MG). As illustrated in Fig. 5.8 D, contrary to what was seen for wt SGLT1, the C_2 state increases (55%) and then relaxes to much lower steady state values of 5% and 21% in the presence or absence of α MG, respectively. This simply reflects the fact that, for the mutant proteins, the slowest rate constant in the steps mediating Na^+ /glucose cotransport at -150 mV is k_{51} . As the steps involved in generating the slow component of presteady state currents are the transition between C_2 and $C_4(2\text{Na}^+)$, Fig. 5.7 D and 5.8 D illustrate the reason why transient currents disappear in the presence of α MG for the wt transporter but not for the mutants.

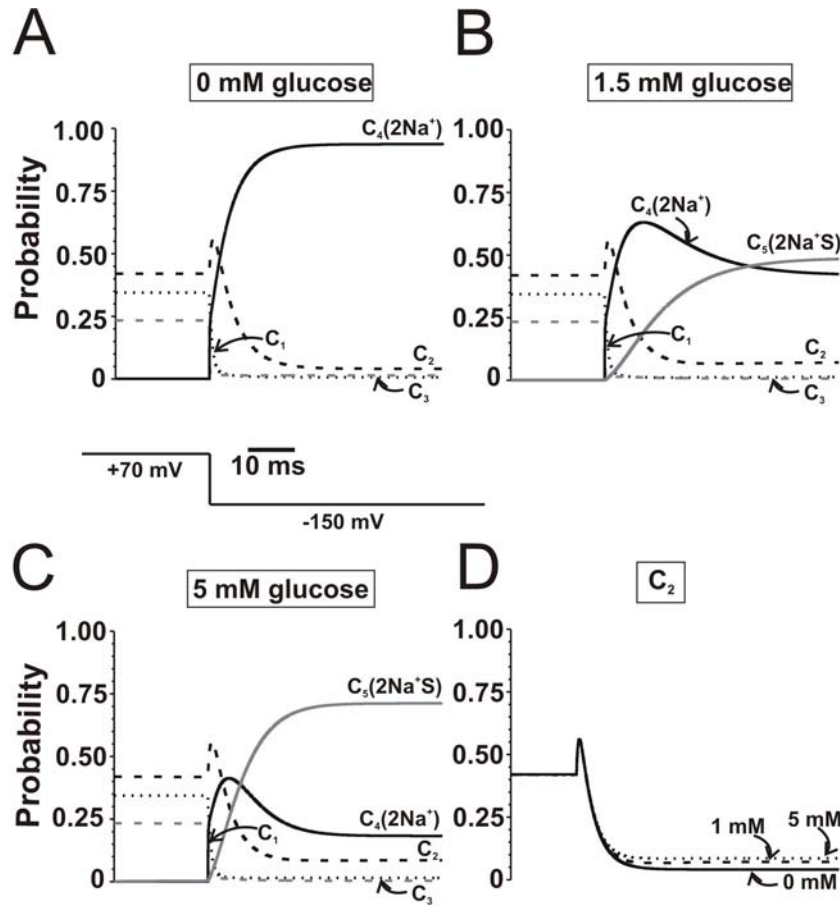


Figure 5.8: Occupancy probability (C_i) as a function of time as calculated by the five-state kinetic model for the mutants.

(A) Time course of mutant SGLT1 occupancy probabilities (90 mM Na^+) for a V_m pulse from +70 mV to -150 mV in the absence of α MG, in the presence of 1.5 mM α MG (B) and in the presence of 5 mM α MG (C). (D) Time course of mutant C_2 occupancy probability in the absence of α MG (solid line, 90 mM Na^+) or in the presence of 1.5 mM (dash black line) or 5 mM (small dash black line) or 10 mM (solid gray line) α MG for a V_m pulse from +70 mV to -150 mV.

Apparent affinity for α MG

We presented two distinct methods of estimating the apparent affinity for the substrate: one can use the steady state currents ($I_{ss}(\alpha MG)$) and obtain $K_{mI}^{\alpha MG}$ or the substrate-dependent charge disappearance ($\frac{Q_{saline} - Q_{\alpha MG}}{Q_{saline}}$) to obtain $K_{mQ}^{\alpha MG}$. For the wt SGLT1, both experimental (0.97 mM and 0.48 mM) and theoretical (0.36 mM and 0.40

mM) approaches show that the $K_{mI}^{\alpha MG}$ and the $K_{mQ}^{\alpha MG}$ are close in value. However, the two experimental K_m estimates for the mutants are significantly different, particularly for mutant C511A. It is important to specify that these two K_m are apparent K_m and depend not only on the rate constants k_{45} and k_{54} but also on the other rate constants. It seems that the rate limiting step position is crucial for this discrepancy and that the two methods of obtaining an apparent affinity constant for α MG should be considered with caution. The accordance between their values for wt SGLT1 may simply be coincidental.

Role of the disulfide bridge C255-C511 in SGLT1

In a previous study, we have shown that the breakage of a disulfide bridge between C255 and C511 using dithiothreitol (DTT) or by disruption through specific alanine mutations led to a displacement of the equilibrium position of the voltage sensor and to an acceleration of time constant of presteady state current in the absence of α MG (Gagnon *et al.*, 2006a). In the present study, we established that the disulfide bridge C255-C511 (in human SGLT1) also plays a major role in facilitating the conformational change of the fully loaded cotransporter. In addition, a minor role was also detected in the α MG binding and debinding reactions. In the absence of a tridimensional structure, it is impossible to know the exact position of this disulfide bridge in relation to the Na^+ or α MG binding sites but it is certainly important for the mechanical structure involved in those processes.

Conclusions

In summary, this study has provided a quantitative explanation for the observation that transient currents disappear in the presence of α MG for the wt SGLT1 but not for the mutant transporters. In wt SGLT1 and in the presence of substrate, the rate limiting step is from state 2 to state 3. The transferred charges are not observed in this case because, upon hyperpolarization from a very positive to a very negative V_m , the large steady state current requires a high C_2 probability. Under these circumstances, the steady state transporter distribution is predicted to simply move from state 1 to state 2 which should generate only a very fast transient current ($\tau \approx 0.5$ ms). In contrast, for the mutants C255A and C511A in the presence of α MG, the rate limiting step is from state 5 to state 1. The transporter after having reached a high C_2 probability will relax to a much lower level in order to reach the required C_5 probability to account for the steady state current. As the transporter moves from state 2 to states 3-5 through electrogenic steps, a slow transient current is generated. The behaviour of the mutants underscores the role played by the rate limiting step in the possibility of observing presteady state currents. It also reveals the importance of the disulfide bridge C255-C511 in facilitating the translocation of the fully loaded transporter from the outward facing to the inward facing configuration.

Acknowledgements

We thank Michael Coady for valuable discussions and for his comments on the manuscript. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant # MOP-10580). D.G.G. is a Natural sciences and engineering research council of Canada and Fonds de la recherche en santé du Québec postgraduate scholar.

Footnotes

Abbreviations in this paper:

α MG: α -methyl-glucose, hSGLT1: human isoform of SGLT1, $K_m^{\alpha\text{MG}}$: apparent affinity for α MG, I-V: current versus membrane potential, Pz: phlorizin, Q-V: transferred charge versus membrane potential, SGLT1: high affinity Na^+ /glucose cotransporter, τ_{slow} : slow time constant, V_m : membrane potential, wt: wild-type

References

- 1- Hediger, M.A., M.J. Coady, T.S. Ikeda, and E.M. Wright. 1987. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* 330(6146):379-381.
- 2- Parent, L., S. Supplisson, D.D. Loo, and E.M. Wright. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *J Membr Biol* 125(1):63-79.
- 3- Chen, X.Z., M.J. Coady, F. Jalal, B. Wallendorff, and J.Y. Lapointe. 1997. Sodium leak pathway and substrate binding order in the Na⁺-glucose cotransporter. *Biophys J* 73(5):2503-2510.
- 4- Chen, X.Z., M.J. Coady, and J.Y. Lapointe. 1996. Fast voltage clamp discloses a new component of presteady-state currents from the Na⁽⁺⁾-glucose cotransporter. *Biophys J* 71(5):2544-2552.
- 5- Falk, S., A. Guay, C. Chenu, S.D. Patil, and A. Berteloot. 1998. Reduction of an eight-state mechanism of cotransport to a six-state model using a new computer program. *Biophys J* 74(2 Pt 1):816-830.
- 6- Falk, S., N. Oulianova, and A. Berteloot. 1999. Kinetic mechanisms of inhibitor binding: relevance to the fast-acting slow-binding paradigm. *Biophys J* 77(1):173-188.
- 7- Krofchick, D., S.A. Huntley, and M. Silverman. 2004. Transition states of the high-affinity rabbit Na⁽⁺⁾/glucose cotransporter SGLT1 as determined from measurement and analysis of voltage-dependent charge movements. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(1):C46-54.
- 8- Krofchick, D., and M. Silverman. 2003. Investigating the conformational states of the rabbit Na⁺/glucose cotransporter. *Biophys J* 84(6):3690-3702.
- 9- Wright, E.M., and E. Turk. 2004. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch* 447(5):510-518.

- 10- Loo, D.D., B.A. Hirayama, A. Cha, F. Bezanilla, and E.M. Wright. 2005. Perturbation analysis of the voltage-sensitive conformational changes of the Na⁺/glucose cotransporter. *J Gen Physiol* 125(1):13-36.
- 11- Loo, D.D., A. Hazama, S. Supplisson, E. Turk, and E.M. Wright. 1993. Relaxation kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(12):5767-5771.
- 12- Boorer, K.J., D.D. Loo, and E.M. Wright. 1994. Steady-state and presteady-state kinetics of the H⁺/hexose cotransporter (STP1) from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 269(32):20417-20424.
- 13- Bossi, E., E. Centinaio, M. Castagna, S. Giovannardi, S. Vincenti, V.F. Sacchi, and A. Peres. 1999. Ion binding and permeation through the lepidopteran amino acid transporter KAAT1 expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 515 (Pt 3):729-742.
- 14- Coady, M.J., M.H. Chang, F.M. Charron, C. Plata, B. Wallendorff, J.F. Sah, S.D. Markowitz, M.F. Romero, and J.Y. Lapointe. 2004. The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na⁺-monocarboxylate cotransporter. *J Physiol* 557(Pt 3):719-731.
- 15- Coady, M.J., B. Wallendorff, D.G. Gagnon, and J.Y. Lapointe. 2002. Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter. *J Biol Chem* 277(38):35219-35224.
- 16- Eskandari, S., D.D. Loo, G. Dai, O. Levy, E.M. Wright, and N. Carrasco. 1997. Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem* 272(43):27230-27238.
- 17- Fesce, R., S. Giovannardi, F. Binda, E. Bossi, and A. Peres. 2002. The relation between charge movement and transport-associated currents in the rat GABA cotransporter rGAT1. *J Physiol* 545(Pt 3):739-750.

- 18- Forster, I., N. Hernando, J. Biber, and H. Murer. 1998. The voltage dependence of a cloned mammalian renal type II Na⁺/Pi cotransporter (NaPi-2). *J Gen Physiol* 112(1):1-18.
- 19- Hager, K., A. Hazama, H.M. Kwon, D.D. Loo, J.S. Handler, and E.M. Wright. 1995. Kinetics and specificity of the renal Na⁺/myo-inositol cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol* 143(2):103-113.
- 20- Kanai, Y., and M.A. Hediger. 2004. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch* 447(5):469-479.
- 21- Li, M., R.A. Farley, and H.A. Lester. 2000. An intermediate state of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT1 revealed by simultaneous voltage clamp and fluorescence. *J Gen Physiol* 115(4):491-508.
- 22- Sacher, A., N. Nelson, J.T. Ogi, E.M. Wright, D.D. Loo, and S. Eskandari. 2002. Presteady-state and steady-state kinetics and turnover rate of the mouse gamma-aminobutyric acid transporter (mGAT3). *J Membr Biol* 190(1):57-73.
- 23- Virkki, L.V., I.C. Forster, J. Biber, and H. Murer. 2005. Substrate interactions in the human type IIa sodium-phosphate cotransporter (NaPi-IIa). *Am J Physiol Renal Physiol* 288(5):F969-981.
- 24- Mackenzie, B., D.D. Loo, M. Panayotova-Heiermann, and E.M. Wright. 1996. Biophysical characteristics of the pig kidney Na⁺/glucose cotransporter SGLT2 reveal a common mechanism for SGLT1 and SGLT2. *J Biol Chem* 271(51):32678-32683.
- 25- Parent, L., S. Supplisson, D.D. Loo, and E.M. Wright. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies. *J Membr Biol* 125(1):49-62.

- 26- Gagnon, D.G., P. Bissonnette, and J.Y. Lapointe. 2006. Identification of a disulfide bridge linking the fourth and the seventh extracellular loops of the Na^+ /glucose cotransporter. *J Gen Physiol* 127(2):145-158.
- 27- Bissonnette, P., J. Noel, M.J. Coady, and J.Y. Lapointe. 1999. Functional expression of tagged human Na^+ -glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 520 Pt 2:359-371.
- 28- Eskandari, S., E.M. Wright, and D.D. Loo. 2005. Kinetics of the reverse mode of the Na^+ /glucose cotransporter. *J Membr Biol* 204(1):23-32.
- 29- Sauer, G.A., G. Nagel, H. Koepsell, E. Bamberg, and K. Hartung. 2000. Voltage and substrate dependence of the inverse transport mode of the rabbit Na^+ /glucose cotransporter (SGLT1). *FEBS Lett* 469(1):98-100.
- 30- Charron, F.M., M.G. Blanchard, and J.Y. Lapointe. 2006. Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with Na^+ /glucose cotransport. *Biophys J* 90(10):3546-3554.
- 31- Chen, X.Z., M.J. Coady, F. Jackson, A. Berteloot, and J.Y. Lapointe. 1995. Thermodynamic determination of the Na^+ : glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. *Biophys J* 69(6):2405-2414.

6 Voltage-clamp fluorometry in the local environment of the C255-C511 disulfide bridge of the Na⁺/glucose cotransporter

Dominique G. Gagnon, Carole Frindel and Jean-Yves Lapointe

Soumis le 22 septembre 2006 dans *Biophysical Journal*, BIOPHYSJ/2006/097964

Résumé

Nous avons identifié récemment un pont disulfure entre les C255 et C511 du cotransporteur Na⁺/glucose SGLT1 humain, qui est important pour sa fonction. Pour cette étude, la fluorométrie en condition de voltage imposé (VCF) a été utilisée pour caractériser la fluorescence de quatre sondes fluorescentes attachées sur C255 et C511 sous différentes conditions ioniques et avec ou sans substrat ou inhibiteur. Des changements de fluorescence (ΔF) dépendants de l'état du transporteur ont été observés lorsque les sondes TMR5M ou TMR6M sont attachées aux résidus C255 et C511 ou lorsque Alexa488 est attachée sur C511. TMR5M-C511 a été extrêmement sensible au potentiel membranaire (V_m) et au Na⁺ et α MG (un analogue non métabolisable du glucose). Une augmentation progressive de la concentration d' α MG a modifié drastiquement le ΔF maximal dépendant du voltage et a produit un déplacement du point d'inflexion de la courbe ΔF - V_m . En associant une intensité de fluorescence à chaque état du cotransporteur, nos mesures de fluorescences stationnaires ont pu être reproduites en utilisant les constants de vitesse proposées auparavant pour un modèle cinétique à cinq états exclusivement dérivé à partir de mesures électrophysiologiques. Nos résultats sont cohérents avec le modèle cinétique proposé et montrent que la liaison de l' α MG modifie significativement l'environnement des cystéines C255 et C511.

Abstract

We recently identified a functionally important disulfide bridge between C255 and C511 of the human Na⁺/glucose cotransporter SGLT1. In the present study, voltage-clamp fluorometry (VCF) was used to characterize the fluorescence of four different dyes attached to C255 and C511 under various ionic and substrate/inhibitor conditions. State-dependent fluorescence changes (ΔF) were observed when TMR5M or TMR6M dyes were attached to C255 and C511 or when Alexa488 was bound to C511. TMR5M-C511 was extremely sensitive to membrane potential (V_m) and to external Na⁺ and α MG (a non-metabolizable glucose analogue) concentrations. A progressive increase in α MG concentration drastically changed the maximal voltage-dependent ΔF and produced a positive shift in the mid-point of the ΔF - V_m curve. By determining specific fluorescence intensity for each state of the cotransporter, our steady state fluorescence data could be reproduced using the rate constants previously proposed for a five-state kinetic model exclusively derived from electrophysiological measurements. Our results bring an independent support to the proposed kinetic model and show that the binding of α MG substrate significantly modifies the environment of C255 and C511.

Keywords: SGLT1, *Xenopus* oocytes, two-electrode voltage-clamp, maleimide-based dye, fluorescence model

Introduction

The classical distinction between ion channels and transporters is the contention that, for the latter group, a significant conformational change is required during each transport cycle. This is generally associated with larger activation energies for transporters (cotransporter and exchanger, $E_a \sim 25$ kCal/mol in the case of SGLT1 (Hazama *et al.*, 1997)) versus channels ($\sim 4-7$ kCal/mol, (Tseeb *et al.*, 1991; Hille, 2001)). In recent years, this distinction has become less stringent as ligand-gated (for reviews see Keramidas *et al.*, 2004; Hogg *et al.*, 2005) and voltage-gated channels (for review see Bezanilla, 2000) must experience conformational changes to become activated and as transporters and pumps have been shown to present channel-like behaviour (Artigas et Gadsby, 2002; Accardi et Miller, 2004). Nevertheless, while most channels are merely gated, transporters require conformational changes to create directed binding sites, implying a set of distinct conformational states.

In the absence of crystal structures for the different forms of a transporter, fluorescence spectroscopy coupled to electrophysiology is the most powerful way of determining conformational change in a time-resolved manner and it has been used since 1996 for studying movement of the voltage sensor in voltage-gated channels (Mannuzzu *et al.*, 1996; Cha et Bezanilla, 1997). In general, the amplitude of the fluorescence variation following a conformational change depends on the degree to which the conformational change affects the environment of the fluorophore at the molecular level. For cotransporters, voltage-clamp fluorometry (VCF) was first employed in 1998 (Loo *et al.*, 1998) for the Na^+ /glucose cotransporter SGLT1, which is a member of the SLC5A family of Na^+ coupled cotransporters (for review see Wright et Turk, 2004). A fluorescent dye, tetramethylrhodamine-6-maleimide (TMR6M), was attached to a cysteine residue replacing amino acid Q457 and fluorescence changes were recorded simultaneously with presteady state currents in the absence of glucose. Since then, it has been applied to a few other cotransporters such as the GABA transporter GAT1 (Li *et al.*, 2000), the serotonin transporter SERT (Li et Lester, 2002), the glutamate transporter EAAT3 (Larsson *et al.*, 2004) and, more recently, to the Na^+/P_i cotransporter (Virkki *et al.*, 2005). Additional

studies of SGLT1 have also been performed using this method, with the mutant Q457C and with the mutant D454C labeled with tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMR5M) or/and TMR6M (Meinild *et al.*, 2002; Diez-Sampedro *et al.*, 2004; Loo *et al.*, 2005). The studies with SGLT1 were compromised by near-complete loss of function in the labeled proteins, which diminishes the relevance of the data obtained to the normal cotransport cycle.

We have previously introduced cysteine residues into 14 different locations in the loop joining transmembrane segments (TMS) XIII and XIV of human SGLT1 (Gagnon *et al.*, 2005) but none of the mutant proteins exhibits both full functionality and voltage- or substrate-dependent fluorescence changes when labeled with TMR5M. More recently, we have identified a disulfide bridge between C255 and C511 (Gagnon *et al.*, 2006a). We have characterized the steady state and presteady state kinetics of SGLT1 following site-directed mutagenesis at either of these two residues (C255A and C511A) and have proposed a five-state kinetic model (Gagnon *et al.*, 2006b) which reproduces the functional characteristics of the normal and mutated proteins. The mutants C255A and C511A, lacking this disulfide bridge, are fully functional with near-normal voltage-dependence, Na⁺ affinities and αMG affinities. We have also shown that C511 and C255 can be specifically labeled with a maleimide-attached fluorophore in the C255A and C511A mutants, respectively, without affecting their kinetics.

In this study we examined conformational changes using VCF via labeling of these two cysteine residues, which report the same local environment in SGLT1, using four different fluorescent dyes. In particular, TMR5M attached to C511 was found to be extremely sensitive to conformational states attained when two Na⁺ ions and one substrate molecule are bound to the external site. The fluorescence changes observed are fully consistent with the five-state model, and its quantitative rate constants, previously proposed on the basis of electrophysiological data.

Materials and methods

Oocyte preparation and injection

Oocytes were surgically removed from *Xenopus laevis* frogs, dissected and defolliculated as described previously (Bissonnette *et al.*, 1999; Gagnon *et al.*, 2004). One day after defolliculation, oocytes were injected with 46 nl of water containing mRNA (0.25 µg/µl) to obtain maximal protein expression. Oocytes were maintained in Barth's solution (in mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgSO₄, 0.41 CaCl₂, 0.33 Ca(NO₃)₂, 5 HEPES, pH 7.6) supplemented with 5 % horse serum, 2.5 mM Na⁺ pyruvate, 100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin for 4-7 days before electrophysiological and fluorescence experimentation.

Molecular biology

Preparation of the constructs C255A and C511A have been described elsewhere (Gagnon *et al.*, 2006a).

Electrophysiology

The saline solution normally used in our electrophysiological experiments is composed of (in mM): 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgCl₂, 0.74 CaCl₂, 10 HEPES and the pH was adjusted to 7.6 with NaOH. α-methyl-glucose (αMG, a non-metabolizable glucose analogue) or Pz (200 µM) were added to this solution where indicated. The 0 mM Na⁺ solution was obtained by replacing 90 mM Na⁺ with 90 mM N-methyl-D-glucamine (NMDG) and buffering with Tris rather than NaOH. Use of the two-electrode voltage-clamp apparatus has been described previously (Gagnon *et al.*, 2006a). In this series of experiments, voltage pulses ranged from -175 to +75 mV with 150 ms pulse duration.

Fluorescence

A Nikon Diaphot inverted microscope was employed with a 40× oil immersion objective (numerical aperture 1.30, Nikon, Tokyo, Japan). Dichroic mirrors with discrimination wavelengths of 505 nm or 570 nm (505DCXR or 570DCXR, The Optikon Corporation Ltd. Kitchener, Ontario, Canada) were used for Alexa Fluor® 488 C₅ maleimide (Alexa488) and fluorescein-5-maleimide (FM) or tetramethylrhodamine-5(or 6)-maleimide (TMR5M or TMR6M) dyes (Molecular Probes, Eugene OR), respectively. See Fig. 6.1 A for the probe structures of TMR5M and TMR6M. A 30W halogen lamp (GE Lighting, Cleveland, OH) was used to illuminate oocytes; the optimal excitation wavelengths were obtained by using excitation filters (10 nm bandpass) centered at 488 nm for Alexa488 and FM and at 550 nm for TMR5M and TMR6M dyes (Omega Optical Inc., Brattleboro, VT). Fluorescence intensity was read from the oocyte animal pole, through 10 nm bandpass filters centered at 535 nm or 600 nm (Omega Optical Inc., Brattleboro, VT) for Alexa488 and FM, or TMR5M and TMR6M dyes, respectively, with a PIN-020A photodiode (UDT Sensors Inc., Hawthorne, CA). Oocytes were preincubated for 5-10 min on ice before the dye was added to the bathing solution in order to minimize dye internalization. A 10-min labeling period was performed on ice at the oocytes resting potential using 20 μM dye in the 90 mM Na⁺ containing solution. The fluorescence and electrophysiological signals were acquired using a Digidata 1322A digitizer and Clampex 8.2 software (Axon Instruments Inc, Union City, CA).

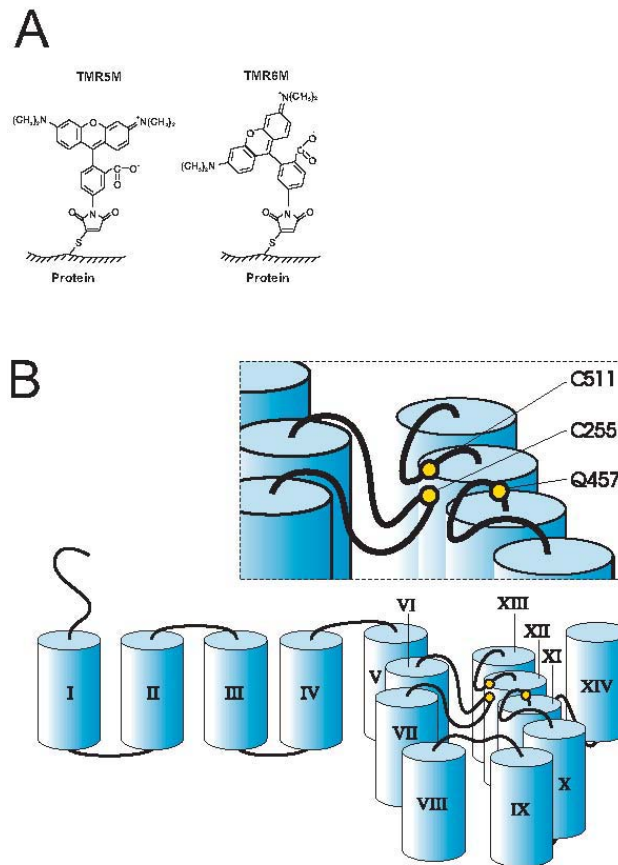


Figure 6.1: SGLT1 membrane topology and probe structures.

(A) Chemical structures of tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMR5M) and tetramethylrhodamine-6-maleimide (TMR6M) attached to a sulphur atom of a cysteine residue. (B) Cartoon illustrating a pseudo three dimensional membrane topology and the transmembrane segments (TMS) around the disulfide bridge C255-C511 in SGLT1. TMS were schematically represented by cylinders and are identified by Roman numerals. The position of the disulfide bridge C255-C511 close to the membrane is shown as is the nearby residue Q457.

Voltage clamped fluorescence experiments

In simultaneous electrophysiology-fluorescence experiments, the oocytes were clamped at a membrane potential of -50 mV and 5 or 10 repetitions of membrane potential steps (5 repetitions for C255A mutant and 10 repetitions for C511A mutant) were applied. A mechanical shutter was opened 100 ms before and closed 150 ms after the membrane potential pulse in order to reduce photobleaching. Under these conditions, photobleaching was typically 1% after 5-10 series of voltage pulses. The fluorescence recorded at -50 mV

was normalized as 100% for each series of voltage pulses. Data were obtained with a sampling frequency of 5 kHz, without filtering, and the repetitions were averaged for each experiment. Data were reduced by averaging 35 consecutive data points. Steady state fluorescence was taken as the mean of normalized fluorescence values recorded between 120 and 145 ms after the initiation of the voltage pulse. In absolute value, the fluorescence level of labeled oocytes was observed to remain essentially constant (taking into consideration the photobleaching effect) at extreme depolarizing potentials (+75 mV) in the presence of different Na⁺ or α MG concentrations. We thus defined the steady state fluorescence values to equal 0 at +75 mV. Time constants for fluorescence changes were measured by fitting a single exponential to the fluorescence measurements using Clampfit 8.2 program (Axon Instruments Inc, Union City, CA).

Statistics

Experiments were performed on at least 3 oocytes obtained from a minimum of 3 different donors. Data are reported as mean \pm SE. and are compared using unpaired Student's *t*-test; statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Before using thiol-targeted probes to examine the fluorescence of SGLT1 mutants where one cysteine in the disulfide bridge has been mutated, the effects of V_m on the background fluorescence level of oocytes expressing either wt SGLT1, or the double mutant C255A/C511A, following labeling, was tested. The level of fluorescence observed was comparable to that seen with non-injected oocytes which had been similarly labeled, which was approximately three to four times smaller than the fluorescence level of TMR5M-labeled mutants C255A and C511A (Gagnon *et al.*, 2006a). As expected, no voltage-dependent changes in the background fluorescence (ΔF) could be observed in oocytes expressing wt SGLT1 or the double mutant C255A/C511A. The effect of voltage was within the noise level, which averaged 0.5%.

The effect of V_m was then investigated on the fluorescence generated by the two hydrophilic probes, Alexa488 and FM and the two slightly hydrophobic probes, TMR5M and TMR6M, when attached to either C255 or C511. The positions of the labeled cysteines are shown in Fig. 6.1 B on a cartoon of a SGLT1 topology which accounts for the presence of a C255-C511 disulfide bridge.

Fluorescence labeling of C255

The accessibility of C255 to TMR6M, Alexa488 and FM is weak, i.e. the fluorescence intensity was comparable to the level obtained with oocytes expressing wt SGLT1 which were submitted to the same labeling procedures. However, labeling this cysteine residue with TMR5M produced a measurable ΔF in the presence of Na^+ and in the presence of Na^+ and αMG (see Fig. 6.2 A). Once corrected for photobleaching, in order to maintain a constant F value at -50 mV (see MATERIALS AND METHODS), the ΔF from $+75$ mV to -175 mV was -1.5% in the presence of 90 mM Na^+ . The presence of αMG slightly enhanced the total amplitude of ΔF . No ΔF could be observed in the absence of Na^+ , except at extremely hyperpolarizing potentials, where the ΔF is approximately 0.5% less than the fluorescence value at $+75$ mV. As expected, the presence of Pz, a specific

inhibitor of SGLT1, completely inhibited this ΔF at all values of V_m . The labeling of C255 with TMR5M had no effect on the mutant's electrophysiological characteristics. SGLT1 specific currents in the absence and in the presence of α MG are shown on Fig. 6.2 B for a typical TMR5M-C255 expressing oocyte. The α MG cotransport currents were approximately -700 nA at -150 mV and the amount of charge transferred during presteady state currents did not show any significant difference from that previously published (the $V_{1/2}$ being ~ -30 mV and $\sim +5$ mV in the absence and in the presence of α MG, respectively) (Gagnon *et al.*, 2006b).

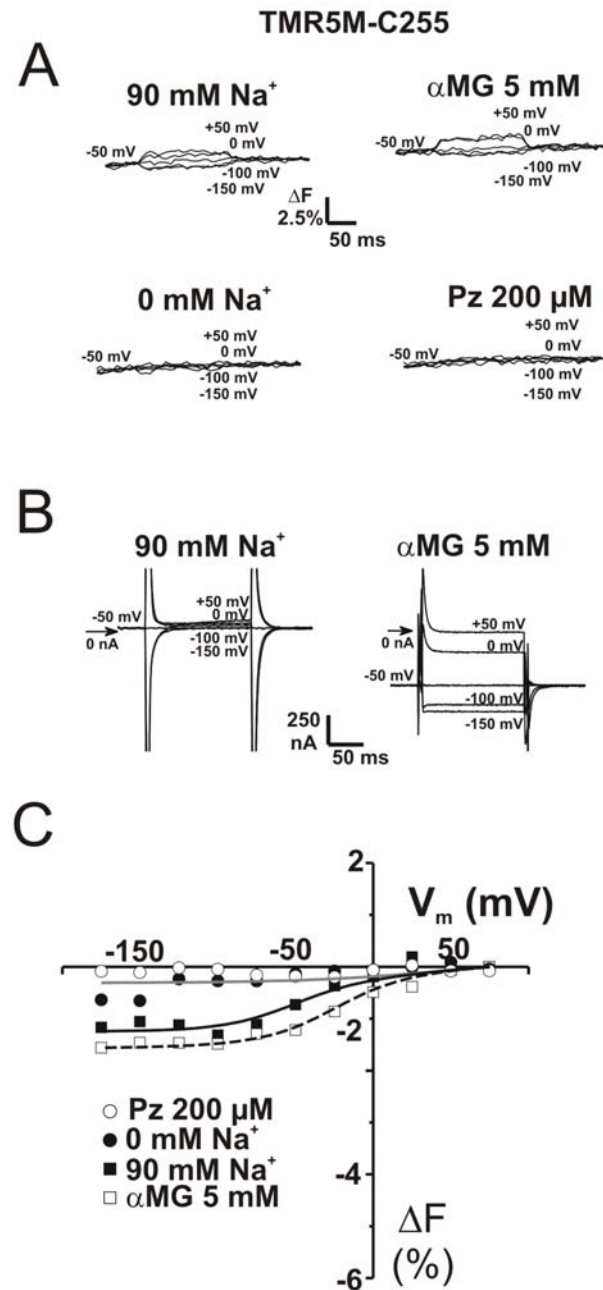


Figure 6.2: Substrate and voltage effects on the fluorescence of TMR5M attached to C255.

(A) Results from typical TMR5M-labeled C255-expressing oocytes are shown. Fluorescence changes (ΔF) in the presence of 90 mM Na⁺ (upper left), 0 mM Na⁺ (lower left), 5 mM α MG (upper right) and 200 μ M Pz (lower right) at different voltages, as indicated. (B) SGLT1 specific current in the absence of α MG (left) or in its presence (right) for the oocyte presented in (A). This illustrates the presteady state currents, i.e. the Pz-sensitive current, in the absence and in the presence of α MG for the labeled mutant. (C)

Mean steady state ΔF versus V_m curves ($n=3$). The fluorescence values were corrected for photobleaching and normalized to have the same fluorescence values at +75 mV (see MATERIALS AND METHODS). The smooth lines are from the fluorescence model (see Table VI.II and DISCUSSION for details). Errors bars were omitted when smaller than symbols.

The normalized steady state levels of fluorescence and their modulation by V_m (ΔF - V_m) are shown in Fig. 6.2 C. The fluorescence values were baseline to 0 at +75 mV (see MATERIALS AND METHODS). Globally, the effects of glucose on ΔF - V_m are to slightly increase the amplitude of ΔF and to shift the mid-point of the ΔF - V curve toward more positive V_m (from -36 ± 5 mV in its absence to -13 ± 8 mV in its presence).

Fluorescence labeling of C511

When C511 was labeled with Alexa488, small ΔF were observed with steps in V_m , particularly at positive V_m in the 90 mM Na^+ solution as illustrated in Fig. 6.3 A for a typical oocyte. Under these conditions, the maximal ΔF was -1% for a voltage pulse from +75 mV to -175 mV, whether or not 5 mM αMG mM was present. This ΔF required the presence of Na^+ and was completely inhibited when the transporter was blocked with Pz (in 90 mM Na^+ solution). The SGLT1 specific currents from this oocyte were recorded simultaneously with the fluorescence signal are shown in Fig. 6.3 B. Labeling with Alexa488 had no influence on the presteady state currents characteristics of mutant C255A. Average ΔF - V_m curves in the 90 mM Na^+ solution and in the presence of 5 mM αMG are shown in Fig. 6.3 C. Similarly, FM attached to C511 produced weak but measurable ΔF (data not shown).

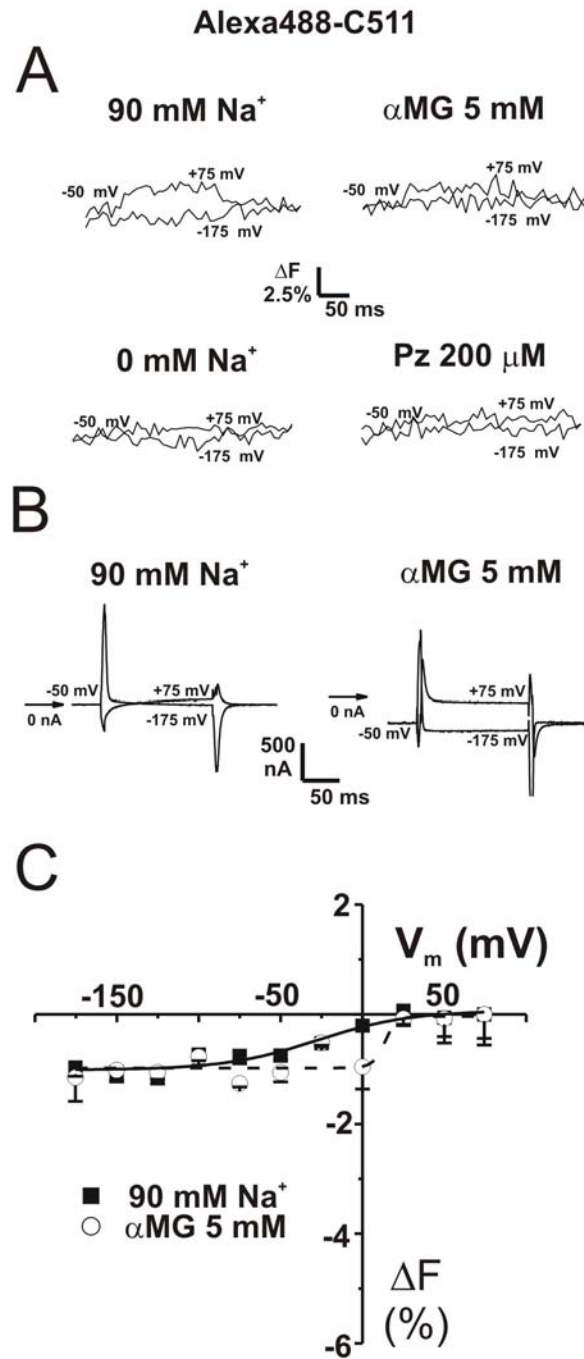


Figure 6.3: Substrate and voltage effects on the fluorescence of Alexa488 attached to C511.

(A) ΔF for +75 and -175 mV, in various conditions, as indicated, from typical Alexa488-labeled C511-expressing oocytes is shown. (B) Presteady state current traces for the oocyte presented in (A) with (right) or without α MG (left). (C) Mean steady state ΔF - V_m curve ($n=3$). The curves represent Boltzmann relations fitted to the points. Mean \pm SE. are shown.

Both TMR5M and TMR6M could be bound to C511 without affecting the protein's electrophysiological characteristics (not shown). Fig. 6.4 illustrates the average ΔF - V_m curves with TMR6M attached to C511 in the presence of 90 mM Na^+ , 0 mM Na^+ , 5 mM αMG and 200 μM Pz for different V_m values. First, in the presence of 90 mM Na^+ , a pulse from +75 mV to -175 mV produced a change in fluorescence of -4%. Addition of αMG did not affect this steady state ΔF throughout the voltage range. Both the absence of Na^+ and the presence of Pz significantly inhibited the voltage dependency of TMR6M fluorescence. Glucose causes a shift of the ΔF - V_m curve mid-point by ~ 20 mV toward more positive (from -21 ± 6 mV in its absence to -2 ± 6 mV in its presence) and a modest reduction (0.6%) in the total amplitude of ΔF . As the amplitude of the voltage-dependent fluorescent changes were sufficiently large, the time constants of the fluorescence (τ_F) could be established. The τ_F values were voltage-independent, were the same in the presence or absence of glucose and were always between 5 and 10 ms.

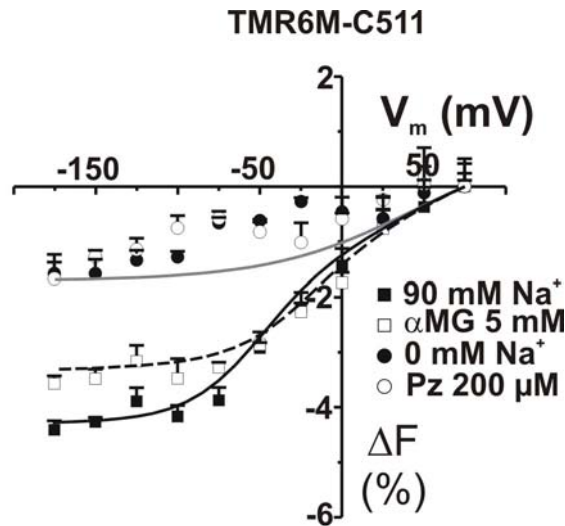


Figure 6.4: Substrate and voltage effects on the fluorescence of TMR6M attached to C511.

Mean steady state ΔF - V_m curve are shown ($n=3$). The smooth lines are from the fluorescence model (see Table VI.II and DISCUSSION for details). Mean \pm SE. are shown.

TMR5M-C511 fluorescence increased by 1 to 2% when hyperpolarising from +75 to -175 mV in the absence of Na^+ (NMDG $^+$ replacement) ($n=4$, data not shown). Replacing 90 mM Na^+ by 90 mM NMDG $^+$ or Li^+ produced the same effect, indicating that V_m could

slightly influence the fluorescence intensity in the presence of a these cations (n=4, data not shown).

TMR5M-C511 oocytes were observed to be extremely sensitive to the presence of α MG in the bathing solution, as shown in Fig. 6.5 for a typical oocyte and in Fig. 6.6 A for a mean of eight oocytes. Increases in α MG concentration progressively enhanced the total amplitude of the ΔF and shifted the voltage sensitivity toward more positive potentials. At 0 mV, there was almost no change in fluorescence in the presence of 1 mM α MG (as compared to the 90 mM Na^+ solution) whereas at 10 mM α MG, fluorescence was already 4% lower than that measured at +75 mV ($F_{+75\text{mV}}$). At hyperpolarizing V_m , the amplitude of the ΔF progressively increased with increasing [α MG] until reaching a plateau value at 5-10 mM α MG of $\sim 10\%$ lower than $F_{+75\text{mV}}$. As shown in Fig. 6.5 C, the τ_F values exhibited a clear voltage-dependence in the presence of α MG. Fig. 6.5 B illustrates the accuracy of a mono-exponential fit to the experimental data from the oocytes shown in Fig. 6.5 A, at 5 mM α MG. Time constants were significantly slower when α MG was increased (reaching ~ 45 ms at depolarizing V_m in the presence of 10 mM α MG) while, in the absence of α MG, it was voltage-independent and was measured in the 5-10 ms range. At +75 mV, an increase in [α MG] increases τ_F value ($p=0.04$, 0.2 mM against 5 mM α MG). These data allowed us to estimate an apparent affinity for α MG ($K_{mF}^{\alpha MG}$) based on the effects of the substrate on the observed ΔF at the different V_m values. We found that the $K_{mF}^{\alpha MG}$ was voltage-independent below -75 mV but voltage dependent at voltages higher than -50 mV (Fig. 6.6 C), as was found from the steady state α MG-dependent current analysis (present work and Gagnon *et al.*, 2006a). The $K_{mF}^{\alpha MG}$ value was 1.0 ± 0.2 mM at -150 mV, and the $K_{mI}^{\alpha MG}$, calculated from the steady state currents (illustrated on Fig. 6.6 B) measured simultaneously with the fluorescence intensities, gave a value of 1.6 ± 0.3 mM, as shown on Fig. 6.6 C.

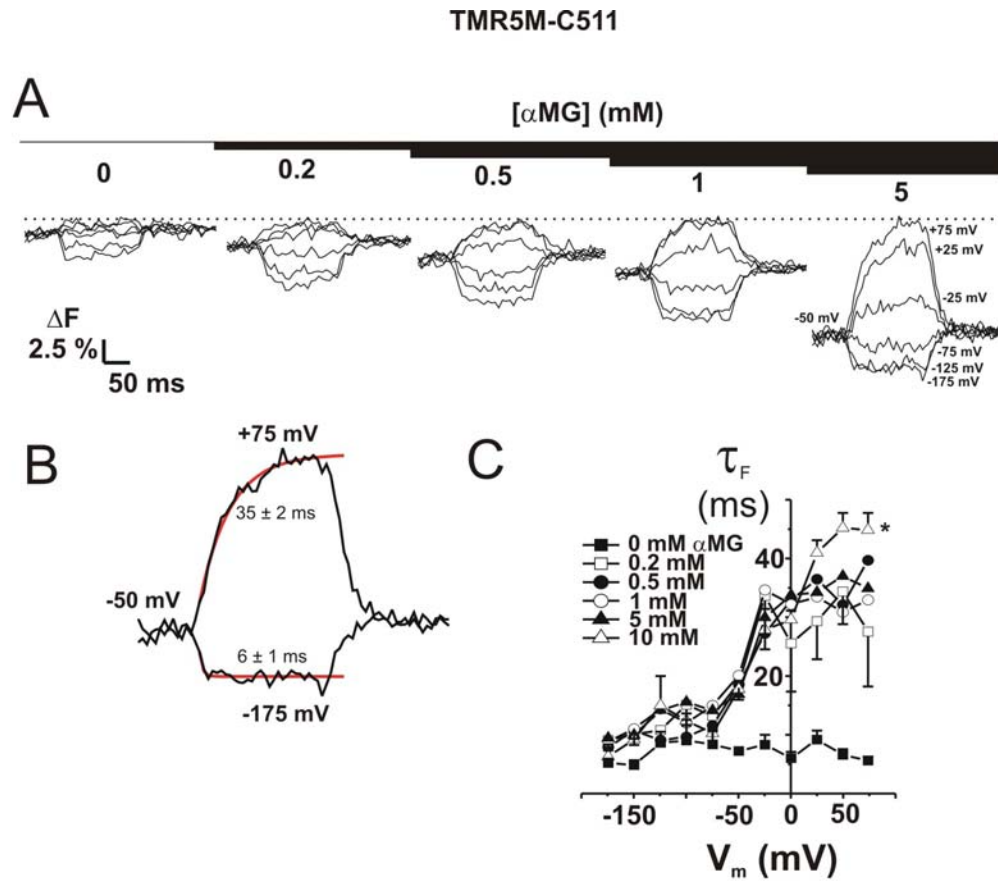


Figure 6.5: Effect of α MG on fluorescence of TMR5M attached to C511.

(A) The typical ΔF for different α MG concentrations for V_m going from +75 mV to -175 mV, by 50 mV increment, are shown. A dotted line indicates the +75 mV level. (B) A mono-exponential fit (red line) is represented over the fluorescence traces (black line) for +75 and -175 mV to illustrate the accuracy of the fit. The corresponding time constant are indicated. (C) Mean time constants τ_F for fluorescence in the presence and absence of various α MG concentrations ($n=8$). *: $p \leq 0.05$. Mean \pm SE. are shown.

TMR5M-C511

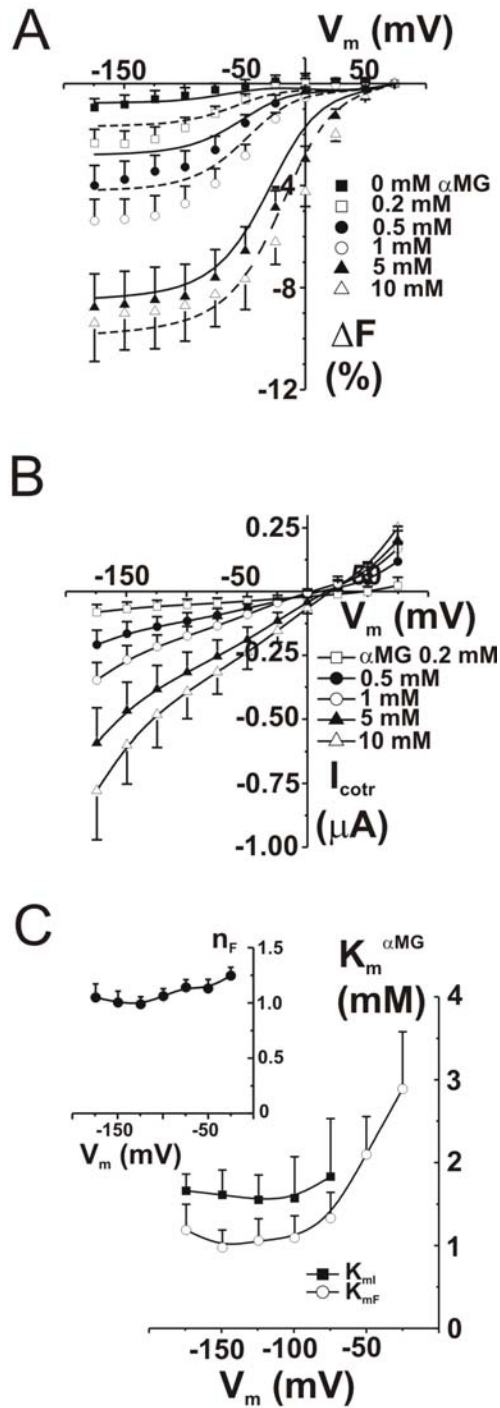


Figure 6.6: Estimates of the apparent affinity values.

(A) Mean steady state ΔF - V_m curve for different α MG concentrations ($n=8$). (B) Mean I_{cotr} (α MG cotransport current), simultaneously measured with fluorescence changes ($n=8$). (C)

Estimates of the apparent affinity values as a function of V_m coming from the simultaneous fluorescence ($K_{mF}^{\alpha MG}$, filled circles) and currents ($K_{mI}^{\alpha MG}$, filled squares) measurements. The fluorescence data were fitted using a Hill equation and the nH parameter is represented in the inset. The I_{cotr} versus $[\alpha MG]$ at a given V_m were fitted using a Michaelis-Menten equation. Mean \pm SE. are shown.

Table VI.I summarizes the ΔF observed for the different dyes attached to the either of the two available cysteine residues in the SGLT1 mutants.

Table VI.II: Summary of the experimental maximal ΔF (from +75 to -175 mV) observed for the different dyes attached to C255 and C511

Dye	C255	C511
Alexa488	<i>Not accessible</i>	90 Na ⁺ -1%
		0 Na ⁺ none
		αMG -1%
		Pz none

FM	<i>Not accessible</i>	<i>weak ΔF</i>

TMR5M	90 Na ⁺ -1.3 %	90 Na ⁺ -4%
	0 Na ⁺ -0.5 %	0 Na ⁺ 1.5%
	αMG -1.5%	αMG -10 to 12 %
	Pz none	Pz -4% (as 90 Na ⁺)

TMR6M	<i>Not accessible</i>	90 Na ⁺ -4.5 %
		0 Na ⁺ -1%
		αMG -3.5 %
		Pz -1%

Discussion

VCF can indicate changes in the immediate environment of a dye attached to a specific residue of a transporter during the protein's turnover at different membrane potentials. Local ionic strength, pH, and hydrophobicity in the vicinity of the label can all influence its fluorescence level. For example, TMRM experiences a 33% decrease in fluorescence and a shift in maximum absorption wavelength from 567 to 575 nm when going from an hydrophobic (ethanol) to a polar (water) environment (Mannuzzu *et al.*, 1996). Even if the precise environment (i.e. nearby amino acids) of a labeled cysteine is impossible to establish in the absence of a crystal structure, movement of the protein during its transport cycle may directly affect this microenvironment and the concomitant fluorescence changes can be used to monitor the transport cycle. However, it must be borne in mind that these changes in fluorescence reflect only the conformational changes that alter that specific micro-domain of the protein.

The extreme sensitivity of dye to changes in their microenvironment can be seen by examining the results in this paper. The fully functional SGLT1 mutants C255A and C511A allow labeling of C511 or C255, which are located close together as they normally form a disulfide bridge in wt SGLT1. Although four dyes were used (FM, Alexa488, TMR5M and TMR6M) only two were experiencing significant changes in their immediate environment, detecting voltage- and ligand-sensitive conformational changes. The observation that voltage-dependent ΔF was obtained with several dyes at position C511 but only with one fluorophore at position C255 indicates that the specific 3D structure of a fluorophore is also important in reporting a conformational change. In the present study, hydrophobic probes such as TMR were better suited for measuring substrate and V_m dependent conformational changes in our mutant transporters.

Effects of Na^+ on voltage-dependent ΔF

A ΔF was measured with TMR5M-C511 in the absence of Na^+ , though it was not measurable (or was only barely so) with TMR5M-C255 or TMR6M-C511. This is in

agreement with the models recently proposed for SGLT1 which require the presence of three different Na^+ -independent states to account for presteady state current measurements (Chen *et al.*, 1996; Loo *et al.*, 2005). The ΔF voltage-dependence in the presence of Na^+ correlated well with what had been previously observed when measuring the transferred charge (Gagnon *et al.*, 2006b). The $V_{1/2}$ values obtained from analysis of fluorescence were -36 mV and -21 mV for TMR5M-C255 and TMR6M-C511 in the absence of glucose whereas the $V_{1/2}$ constants for both mutants, when calculated using the charges transferred in the absence of glucose, were of ~ -30 mV.

High sensitivity of TMR5M-C511 to α MG binding

The presence of α MG shifted the mid-point of the ΔF - V_m relation of TMR(5 or 6)M (attached to C255 or C511) toward more positive V_m . The same shift occurred for the presteady state currents of these proteins in the presence of different α MG concentrations (Gagnon *et al.*, 2006b). For TMR5M-C255 and TMR6M-C511, the presence of glucose shifted the ΔF - V_m curve by ~ 20 mV. For transferred charges, the TMR5M-C511 shift in $V_{1/2}$ is ~ 40 mV when adding 5 mM α MG (Gagnon *et al.*, 2006b). In addition to a positive shift in the ΔF - V_m curve, α MG addition increased the ΔF amplitude for TMR5M-C511 (Fig. 6.5 and 6.6) but not for TMR5M-C255 (Fig. 6.2) and C511-TMR6M (Fig. 6.4). These different behaviours, as well the absence of effect of α MG on several other TMR5M-labeled cysteine mutants (Gagnon *et al.*, 2005), rule out the possibility of a direct quenching effect of α MG on TMR fluorescence.

α MG has also an influence on the τ_F for TMR5M-C511, which is much slower at depolarizing V_m than at hyperpolarizing V_m , where τ_F reaches the 5-10 ms level typically observed for this mutant in the absence of α MG. While this behaviour was also observed for the presteady state currents recorded in these mutants in the presence of the same amount of α MG, the absolute values for the current time constant (τ_I) at positive V_m was between 4.5 and 5.5 ms, i.e. almost 10 times faster than the observed τ_F (Gagnon *et al.*, 2006b). The discrepancy between the time constant values (τ_F and τ_I) could originate from many sources and has also been reported for SGLT1 and NaPi-IIb (Meinild *et al.*, 2002;

Diez-Sampedro *et al.*, 2004; Virkki *et al.*, 2005). It suggests that changes in fluorescence report a transporter conformational change with some “delay”, compared to the presteady state currents. This could occur if a slow relaxation in the environment of the fluorescent dye, without being a part of the transport cycle, was a consequence of a relatively fast conformational change of the transporter.

Kinetic model based on SGLT1 fluorescence data

We have used a linear fluorescence model based on a five-state kinetic model of the SGLT1 mutants C255A and C511A (Gagnon *et al.*, 2006b) (see Fig. 6.7). The rate constants originally derived exclusively from the presteady-state electrophysiological data were maintained (Gagnon *et al.*, 2006b) and the k_{ij0} values are given in Fig. 6.7. The experimental ΔF , normalized using the fluorescence levels observed at +75 mV, were reproduced within the kinetic model by attributing a certain Δf_i to each of the model’s five states. Using the voltage-dependent probabilities (C_i) of finding the transporter in a given state i , the total ΔF was calculated as follows:

$$\Delta F = \Delta f_1 C_1 + \Delta f_2 C_2 + \Delta f_3 C_3 + \Delta f_4 C_4 + \Delta f_5 C_5 \quad \text{Eq. 1}$$

The model was applied to the data for TMR5M-C255, TMR6M-C511 and TMR5M-C511, and the Δf_i values were determined as follows. First, we established the Δf_1 , Δf_2 and Δf_3 values (for states where Na^+ is absent) to account for the voltage-dependence of the fluorescence in the absence of Na^+ . Under these conditions, C_1 is dominant at positive V_m and C_3 is dominant at negative V_m , providing strong constraints on the Δf_i values that can be used. We kept these values fixed when adjusting Δf_4 to reproduce the ΔF - V_m curve in the presence of Na^+ . Finally, the Δf_5 value was determined in the presence of αMG while keeping the other Δf_i values fixed. The continuous lines presented in Figs. 2 C, 4 and 6 A were derived from this fluorescence model, using the fluorescence measurements obtained for each probe/mutant combination. The steady state changes of fluorescence under different conditions for TMR5M-C255 and for both TMR dyes bound to C511 are fairly well reproduced.

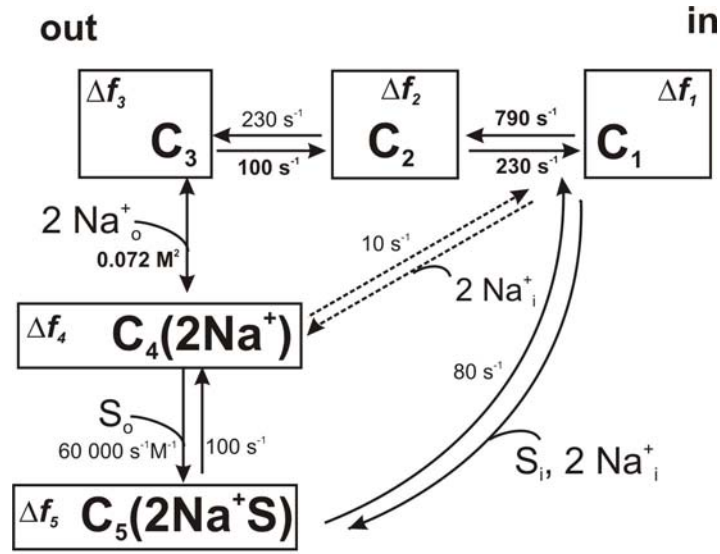


Figure 6.7: Kinetic model of the cotransport mechanism used to simulate conformation-dependent fluorescence variations.

The model was established in a previous study to account for the mutants (C255A and C511A) presteady state currents (Gagnon *et al.*, 2006b). Each box represents a state for which a change in fluorescence value (Δf_i) was attributed with respect to the total fluorescence intensity recorded when the transporter is facing a V_m of +75 mV. The rate constants (k_{ij}) between state “i” and “j=i+1” are calculated as $k_{ij} = k_{ij0} \exp\left(z_i \alpha_i \frac{FV_m}{RT}\right)$ and

$k_{ji} = k_{ji0} \exp\left(-z_i(1-\alpha_i)\frac{FV_m}{RT}\right)$ were kept as previously determined (Gagnon *et al.*,

2006b). The k_{ij0} , representing the values of k_{ij} at 0 mV, are indicated in small characters and those which are voltage-dependent are in bold. The values of z_i used for the equivalent charge moving across the entire membrane electrical field in the step between state “i” and “i+1” were -0.38 , -0.52 and -1.1 for i varying from 1 to 3, respectively. The values for α_i describing the asymmetry of the energy barrier were 0.3 and 0 for i of 1 and 2, respectively. The Na^+ binding step is assumed to be in rapid equilibrium. The constants k_{14} (in $M^{-2}s^{-1}$) and k_{15} (in $M^{-3}s^{-1}$) were calculated to respect micro reversibility. See Table VI.II for the Δf_i values for the different dyes and DISCUSSION for further details.

The Δf_i values used for simulations of the different ΔF - V_m curves for the various probes and SGLT1 positions are shown in Table VI.II. It is not surprising that the value of Δf_i is similar for all cases presented (1.8 or 1.5) in Table VI.II since $\sim 35\%$ of the mutant transporters are in state C_1 at +75 mV which was attributed a normalized fluorescence level of 100%. The Δf_2 value is negative for TMR5M-C511 (-2.5) but positive for the other two

cases (1.3 for TMR5M-C255 and 0.5 for TMR6M-C511). Δf_3 was almost the same for TMR5M for the two mutants but changed its sign for TMR6M-C511. The sign had to be changed because of the reduction in the amplitude of ΔF in the presence of α MG compared with that in its absence (see Fig. 6.4). Δf_3 also influences the V_m at which half of the ΔF occurs.

Table VI.II: Change in fluorescence values (Δf_i) attributed to each state (C_i) in the kinetic model.

These values, given in % of the fluorescence level recorded at +75 mV, were used to simulate the steady state fluorescence (ΔF) as a function of membrane potential (V_m).

Cysteine	Dye	Δf_1	Δf_2	Δf_3	Δf_4	Δf_5
C255	TMR5M	1.8	1.3	1.2	0	-0.9
C511	TMR5M	1.8	-2.5	1	-1.1	-16.5
	TMR6M	1.5	0.5	-1.2	-4	-3.6

The Δf_4 and Δf_5 parameters are primarily responsible for the results observed in the presence of Na^+ and α MG. In the case of the two mutants used, the state $C_4(2\text{Na}^+)$ dominates at low α MG concentrations while the state $C_5(2\text{Na}^+\text{S})$ dominates at high α MG concentrations (Gagnon *et al.*, 2006b). Thus, for TMR5M-C511 in the presence of various α MG concentrations, it was found that Δf_4 plays an important role in explaining the fluorescence level observed at low α MG concentrations while the effect of Δf_5 becomes dominant for the higher α MG concentrations. Examining the values of Δf_4 and Δf_5 in Table VI.II is interesting because in two cases (TMR5M-C255 and TMR5M-C511), the value of Δf_5 is larger and more negative than the one of Δf_4 . In the case of TMR5M-C255, the values of Δf_4 and Δf_5 were respectively of 0 and -0.9 whereas those for TMR5M-C511 were -1.1 and -16.5. This explains why adding α MG produces a larger decrease in fluorescence for TMR5M-C511 (Fig. 6.6 A) than for TMR5M-C255 (Fig. 6.2 C). However, for TMR6M-C511, the value of Δf_5 (-3.6) was slightly smaller than Δf_4 (-4) which explains the small decrease in the maximal ΔF due to the addition of α MG (Fig. 6.4). A possible explanation

of the large effect of α MG on the fluorescence of TMR5M-C511 (Fig. 6.6 A) would be that the conformational change triggered by the binding of α MG produced an increase in the polarity in the immediate environment of TMR5M when it is attached to C511 (Mannuzzu *et al.*, 1996).

C255 and C511 are positioned in a “hot spot” in the SGLT1 structure

Previously, only residues Q457C and D454C have been shown to produce ΔF that are sensitive to different V_m and substrate conditions in SGLT1 (Loo *et al.*, 1998; Meinild *et al.*, 2002; Diez-Sampedro *et al.*, 2004; Loo *et al.*, 2005). However, the functional relevance of these observations is questionable as the transport kinetics of Q457C are highly perturbed compared to wt SGLT1 and substrate cotransport (though not substrate binding) was abolished by the fluorescent labeling itself in both of these mutants. Some other residues located in loop XIII-XIV were labeled with TMR5M without any evident, state-dependent ΔF (Gagnon *et al.*, 2005). In this study, we have identified two other amino acid residues, located adjacent in the intact protein, where ΔF could be observed with more than one dye. In addition, our mutant transporters were fully functional when labeled with the dyes. Four different combinations of cysteine residue and fluorescent dye were found to be sensitive to the voltage-dependent conformational change of the cotransporter. Interestingly, even though C255 and C511 are positioned close together, they behave differently when labeled with the same dye, a stark confirmation of the fact that protein conformational changes are measurable by sensing the physico-chemical environment of the fluorophore at a very small scale.

Conclusions

Fluorescence changes observed with four different fluorescent dyes attached to two nearby cysteine residues in fully functional mutants of SGLT1 have been reported. The two more hydrophobic probes (TMR5M and TMR6M) were particularly useful for detecting voltage-dependent conformational changes. The fact that the fluorescence intensities measured as a function of voltage, Na^+ and αMG concentrations are fully compatible with the occupation probabilities predicted by the five-state kinetic model previously proposed (Gagnon *et al.*, 2006b) provides an additional and independent support for the validity of this model.

Acknowledgments

We acknowledge Rikard Blunck and Mike Coady for valuable discussions and for comments on the manuscript, Michel Brunette for technical assistance and Claude Gauthier for art work. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant # MOP-10580). D.G.G. is a Natural sciences and engineering research council of Canada and Fonds de la recherche en santé du Québec postgraduate scholar.

Footnotes

Abbreviations in this paper:

Alexa488: Alexa Fluor® 488 C₅ maleimide, α MG: α -methyl-glucose, TMR5M-C255: C255 labeled by TMR5M, FM: fluorescein-5-maleimide, ΔF -V_m: fluorescence change versus membrane potential, hSGLT1: human isoform of SGLT1, I-V: current versus membrane potential, I_{cotr} : α MG induced cotransport current ($I_{\alpha MG} - I_{90Na}$), $K_m^{\alpha MG}$: apparent affinity for α MG, Pz: phlorizin, Q-V: transferred charge versus membrane potential, SGLT1: high affinity Na⁺/glucose cotransporter, TMS: transmembrane segment; TMR5M or TMR6M: tetramethylrhodamine-5(or 6)-maleimide, VCF: voltage clamp fluorometry, V_m: membrane potential, wt: wild-type

References

- 1- Hazama, A., D.D. Loo, and E.M. Wright. 1997. Presteady-state currents of the rabbit Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1). *J Membr Biol* 155(2):175-186.
- 2- Tseeb, V.E., V.I. Geletuk, and V.N. Kazachenko. 1991. [Temperature dependence of the conductivity of individual potential-dependent K⁺-channels in mollusk neurons]. *Biofizika* 36(5):810-821.
- 3- Hille, B. 2001. Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA
- 4- Hogg, R.C., B. Buisson, and D. Bertrand. 2005. Allosteric modulation of ligand-gated ion channels. *Biochem Pharmacol* 70(9):1267-1276.
- 5- Keramidas, A., A.J. Moorhouse, P.R. Schofield, and P.H. Barry. 2004. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog Biophys Mol Biol* 86(2):161-204.
- 6- Bezanilla, F. 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 80(2):555-592.
- 7- Accardi, A., and C. Miller. 2004. Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl⁻ channels. *Nature* 427(6977):803-807.
- 8- Artigas, P., and D.C. Gadsby. 2002. Ion channel-like properties of the Na⁺/K⁺ Pump. *Ann N Y Acad Sci* 976:31-40.
- 9- Cha, A., and F. Bezanilla. 1997. Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K⁺ channel with fluorescence. *Neuron* 19(5):1127-1140.
- 10- Mannuzzu, L.M., M.M. Moronne, and E.Y. Isacoff. 1996. Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science* 271(5246):213-216.

- 11- Loo, D.D., B.A. Hirayama, E.M. Gallardo, J.T. Lam, E. Turk, and E.M. Wright. 1998. Conformational changes couple Na⁺ and glucose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13):7789-7794.
- 12- Wright, E.M., and E. Turk. 2004. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch* 447(5):510-518.
- 13- Li, M., R.A. Farley, and H.A. Lester. 2000. An intermediate state of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT1 revealed by simultaneous voltage clamp and fluorescence. *J Gen Physiol* 115(4):491-508.
- 14- Li, M., and H.A. Lester. 2002. Early fluorescence signals detect transitions at mammalian serotonin transporters. *Biophys J* 83(1):206-218.
- 15- Larsson, H.P., A.V. Tzingounis, H.P. Koch, and M.P. Kavanaugh. 2004. Fluorometric measurements of conformational changes in glutamate transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(11):3951-3956.
- 16- Virkki, L.V., I.C. Forster, J. Biber, and H. Murer. 2005. Substrate interactions in the human type IIa sodium-phosphate cotransporter (NaPi-IIa). *Am J Physiol Renal Physiol* 288(5):F969-981.
- 17- Diez-Sampedro, A., D.D. Loo, E.M. Wright, G.A. Zampighi, and B.A. Hirayama. 2004. Coupled sodium/glucose cotransport by SGLT1 requires a negative charge at position 454. *Biochemistry* 43(41):13175-13184.
- 18- Loo, D.D., B.A. Hirayama, A. Cha, F. Bezanilla, and E.M. Wright. 2005. Perturbation analysis of the voltage-sensitive conformational changes of the Na⁺/glucose cotransporter. *J Gen Physiol* 125(1):13-36.
- 19- Meinild, A.K., B.A. Hirayama, E.M. Wright, and D.D. Loo. 2002. Fluorescence studies of ligand-induced conformational changes of the Na⁽⁺⁾/glucose cotransporter. *Biochemistry* 41(4):1250-1258.

- 20- Gagnon, D.G., A. Holt, F. Bourgeois, B. Wallendorff, M.J. Coady, and J.Y. Lapointe. 2005. Membrane topology of loop 13-14 of the Na(+)/glucose cotransporter (SGLT1): A SCAM and fluorescent labelling study. *Biochim Biophys Acta* 1712(2):173-184.
- 21- Gagnon, D.G., P. Bissonnette, and J.Y. Lapointe. 2006. Identification of a disulfide bridge linking the fourth and the seventh extracellular loops of the na+/glucose cotransporter. *J Gen Physiol* 127(2):145-158.
- 22- Gagnon, D.G., C. Frindel, and J.-Y. Lapointe. 2006. Effect of substrate on the presteady state kinetics of the Na+/glucose cotransporter. *Biophys J*. In revision. Ms # 092296.
- 23- Gagnon, M.P., P. Bissonnette, L.M. Deslandes, B. Wallendorff, and J.Y. Lapointe. 2004. Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by Na+/glucose cotransport. *Biophys J* 86(1 Pt 1):125-133.
- 24- Bissonnette, P., J. Noel, M.J. Coady, and J.Y. Lapointe. 1999. Functional expression of tagged human Na+-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 520 Pt 2:359-371.
- 25- Chen, X.Z., M.J. Coady, and J.Y. Lapointe. 1996. Fast voltage clamp discloses a new component of presteady-state currents from the Na(+)-glucose cotransporter. *Biophys J* 71(5):2544-2552.

7 Discussion

Dans cette thèse, nous avons abordé plusieurs aspects de la structure et de la fonction de SGLT1. Depuis une quinzaine d'années, la mutagenèse est devenu un outil incontournable à l'étude de la relation structure fonction des protéines membranaires. Dans le cadre de ce doctorat, nous avons caractérisé 36 mutants. Nous avons d'abord étudié la topologie membranaire de la boucle 13-14 en introduisant une cystéine à 14 endroits différents dans cette boucle d'environ 90 acides aminés. Puis, nous avons étudié le rôle des 15 cystéines endogènes de SGLT1 et avons ainsi découvert la présence d'un pont disulfure qui relie deux d'entre elles qui sont distancées par plus de 250 résidus. Cette découverte constitue la première contrainte dans le repliement 3D des 14 segments transmembranaires de SGLT1. Ce pont disulfure s'est aussi révélé important pour la fonction de SGLT1 et fut grandement utile tant pour la compréhension des courants transitoires en présence de substrat que pour la fluorométrie en condition de voltage imposé. Nous avons étudié les changements de conformation de SGLT1 à l'aide de sondes fluorescentes spécifiquement attachées à l'une ou l'autre des cystéines du pont disulfure. Finalement, nous avons utilisé un modèle cinétique simple afin d'expliquer le rôle du pont disulfure dans la fonction de SGLT1, avec et sans substrat, un modèle qui s'est aussi montré utile pour l'interprétation des données de fluorescence.

Nous allons diviser la discussion en quatre parties : 1) la topologie des derniers segments transmembranaires de SGLT1, particulièrement de la boucle 13-14, 2) le rôle des cystéines endogènes et l'identification du pont disulfure, 3) les courants transitoires en présence de substrat chez les mutants C255A et C511A et chez wt SGLT1, dans laquelle le modèle cinétique sera abordé et finalement 4) la fluorométrie en condition de voltage imposé.

7.1 Topologie et rôle de la boucle 13-14

7.1.1 SCAM

La technique de SCAM a été utilisée pour tester l'accessibilité et le rôle de certains segments spécifiques de protéines membranaires (Karlin et Akabas, 1998; Ehnes *et al.*, 2004b; Jung *et al.*, 2004). En absence de la structure tridimensionnelle d'une protéine, le SCAM combiné avec la modélisation moléculaire est très utile pour raffiner un modèle 3D de structure, tel que cela a été fait pour les canaux K^+ activés par le Ca^{2+} intracellulaire (Simoes *et al.*, 2002) et le canal ECaC-TRPV5 (Dodier *et al.*, 2004) ou pour comprendre le mécanisme de perméation de certains transporteurs (Arinaminpathy *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2004; Chakrabarti *et al.*, 2004; Noskov *et al.*, 2004). Alternativement, en absence d'une structure 3D ou d'un modèle de structure, l'application du SCAM peut permettre des avancées majeures sur la compréhension du mécanisme d'action moléculaire (Kaback *et al.*, 2001; Lambert *et al.*, 2001; Pajor, 2001; Yao et Pajor, 2002).

Nous avons utilisé le SCAM avec le MTSET et le MTSES pour tester l'accessibilité de résidus cystéines introduits dans la boucle 13-14 de SGLT1 (Chapitre 3), dont la topologie intracellulaire établie par le groupe de Wright fut remise en question (Lin *et al.*, 1999). Nous avons choisi de ne tester que ces deux réactifs MTS puisqu'ils sont très hydrophiles et ne peuvent apparemment pas traverser la membrane lipidique, contrairement au MTSEA (en moins de 10 minutes dans les ovocytes de *Xenopus*), qui est plus perméable et qui possède une charge positive comme le MTSET (Holmgren *et al.*, 1996). Par contre, dans le contexte de notre étude sur la topologie de cette boucle, il aurait pu être intéressant de comparer les effets dus au MTSET avec ceux obtenus avec le MTSEA. De plus, nous nous sommes concentrés sur l'effet des composés après un traitement court de 5-10 minutes plutôt que d'étudier la vitesse de modification ($M^{-1}s^{-1}$) souvent utilisée en SCAM (Simoes *et al.*, 2002; Ehnes *et al.*, 2004a; Jung *et al.*, 2004). Comme l'effet des réactifs MTS était entre autre mesuré sur le déplacement de la courbe Q-V et que cette mesure requiert plusieurs manipulations (utilisation à répétition de la Pz), il aurait été malaisé de répéter cette mesure pour des temps variés d'exposition aux produits MTS. C'est pour cette raison

que nous avons préféré adopter un protocole où le résultat est plutôt du type «tout ou rien». Par ailleurs, la mesure d'accessibilité pourrait éventuellement être intéressante pour une étude plus poussée des courants transitoires (voir section 7.1.4) de certains mutants. La mesure d'accessibilité aurait également pu être poussée plus loin, par exemple être étudiée avec le substrat et en fonction du voltage membranaire, mais dans ce cas, une quantité moindre de mutants aurait été utilisée. Si l'accessibilité d'un résidu dépendait du substrat et/ou du voltage, cela pourrait signifier qu'un changement de conformation se produit dans ces conditions.

Nous avons introduit les cystéines dans SGLT1 sauvage qui contient déjà 15 cystéines endogènes. Ces 15 cystéines sont insensibles aux réactifs oxydants spécifiques aux groupements thiols (MTSES, MTSET, MTSEA et NEM) (Loo *et al.*, 1998; Gagnon *et al.*, 2005) et ne sont pas marquées par des sondes fluorescentes (Gagnon *et al.*, 2005). Nous pouvons donc supposer que les effets observés sur un mutant de SGLT1 sont fort probablement dus à la cystéine nouvellement introduite. Peu après, l'étude présentée au Chapitre 4 nous a convaincus qu'un transporteur sans cystéine ne pourrait être fonctionnel et justifie l'utilisation de la protéine sauvage pour le SCAM malgré une certaine incertitude quant à la possibilité qu'une mutation modifie l'accessibilité d'une cystéine endogène et que l'effet observé soit dû à cette cystéine plutôt qu'à la cystéine nouvellement introduite.

7.1.2 Accessibilité des résidus de la boucle 13-14

Nos résultats ont démontré qu'en neuf positions, le MTSET et/ou le MTSES pouvait(ent) se lier à une cystéine introduite dans la boucle 13-14 lorsque les réactifs sont présentés du côté extracellulaire. Le MTSES a affecté la fonction de six mutants (N565C, K567C, A605C, E625C, M632C et T635C), le MTSET et le MTSES ont tous deux affecté les mutants I588C, E624C et A664C mais aucun mutant n'a été sensible qu'au MTSET (voir Figures 3.4 et 3.5). Chez les mutants affectés par les deux réactifs MTS, l'effet fonctionnel n'est probablement pas dû à la charge du réactif puisque l'effet mesuré avec l'un n'est pas l'opposé de l'effet mesuré avec l'autre. De plus, ces effets semblent spécifiques à un aspect donné du mécanisme de transport de SGLT1 puisqu'un effet sur l' I_{cotr} n'était pas systématiquement accompagné d'un effet sur l' I_{leak} . Nous devons admettre

toutefois que certains effets produits par le MTSET ou le MTSES ne sont que de faibles augmentations ou diminutions de ces courants (de l'ordre de 15 à 20% chez les mutants I588C, A605C, E624C et E625C), mais chez les mutants N565C, K567C, M632C, T635C et A664C, l'effet est de l'ordre de 50%. Quoi qu'il en soit, nous concluons prudemment que les cystéines introduites aux positions 565, 567, 588, 605, 624, 625, 632, 635 et 664 doivent certainement être hydratées et accessibles à partir du milieu extracellulaire, des conditions essentielles à la réactivité des composés MTS (Karlin et Akabas, 1998).

Parallèlement, nous avons aussi utilisé une sonde fluorescente afin de tester d'une façon plus directe l'accessibilité de ces cystéines. En effet, pour qu'une cystéine soit déclarée accessible par l'approche du SCAM il faut non seulement qu'elle ait réagi avec la cystéine mais il faut aussi qu'encombrement stérique ou l'ajout d'une charge (+/-) à cet endroit produise un effet fonctionnel. Le marquage avec un fluorophore constitue une mesure plus directe de l'accessibilité d'une cystéine puisqu'il ne nécessite pas que la sonde produise un effet fonctionnel lorsqu'elle est attachée à la cystéine. D'autre part, le fluorophore est une molécule significativement plus grosse que les réactifs MTS usuellement employés. Il est donc possible que le fluorophore ne marque pas tous les sites qui se sont montrés accessibles à l'un et/ou l'autre des réactifs MTS. Indirectement, nous pouvons aussi démontrer qu'un réactif n'ayant aucun effet fonctionnel se lie effectivement à une cystéine s'il est appliqué d'abord et qu'il protège du marquage d'un réactif fluorescent. Les cystéines introduites en positions 586, 588 ou 624 furent marquées significativement par le fluorophore TMR5M, tandis qu'un prétraitement à l'un ou l'autre des MTS empêchait efficacement ce marquage (voir Figure 3.6 et Tableau III.I). Dans le cas du mutant E586C, les réactifs MTS ne produisaient aucun effet mais devaient s'être liés quand même à la cystéine puisqu'ils prévenaient la liaison du TMR5M.

L'accessibilité des résidus révélée par les composés MTS et la sonde fluorescente reflète sans doute deux réalités distinctes : 1) le TMR5M n'a pas accès à tous les sites qui peuvent être atteints par les petits réactifs tels le MTSES et le MTSET et 2) certains sites peuvent peut-être démontrer une préférence pour la réactivité du groupement maléimide (du TMR5M) versus la réactivité du groupement thiol des réactifs MTS.

7.1.3 Topologie de l'extrémité C-terminale de SGLT1

Plusieurs observations expérimentales sont en accord avec la topologie des quatre derniers STM de SGLT1 proposée par Turk et ses coauteurs (1996). L'orientation des segments XI, XII et XIII semble correcte puisque les positions 454 et 457, situés entre les segments X et XI, sont accessibles aux réactifs MTSES, MTSET et MTSEA et peuvent être marqués par une sonde fluorescente telle TMR6M (et le TMR5M dans le cas de la position 454) (Loo *et al.*, 1998; Meinild *et al.*, 2002; Diez-Sampedro *et al.*, 2004). De plus, SGLT1 est fonctionnel et glycosylé lorsqu'un site de glycosylation est introduit en position 518 (entre les segments XII et XIII), ce qui indique que ce site est extracellulaire (Turk *et al.*, 1996).

Par contre, la topologie exacte de la boucle 13-14 paraît difficile à établir : elle a été défiée directement ou indirectement par différentes méthodes expérimentales et des conclusions contradictoires en sont ressorties. Des coupes ultra-fines de rein de rat ont été utilisées pour effectuer une localisation de l'épitope correspondant aux acides aminés 564 à 575, et ce, avec un anticorps couplé à des particules d'or qui le reconnaît spécifiquement. Les résultats obtenus suggéraient une localisation intracellulaire (Takata *et al.*, 1991). Dans la même région de la boucle, la détection de deux épitopes de six résidus histidine (poly-His) insérés aux positions 584 à 589 et 622 à 627 de SGLT1 suggère une localisation extracellulaire, puisque qu'aucune perméabilisation des cellules n'était nécessaire pour observer un marquage en immuno-fluorescence (Lin *et al.*, 1999). Nous avons démontré qu'une cystéine nouvellement introduite dans neuf positions dans la boucle 13-14 était accessible du milieu extracellulaire à des composés MTS, petits et hydrophiles, et que certaines étaient aussi accessibles à une molécule fluorescente. Globalement, nos résultats corroborent ceux du laboratoire de Kinne (Lin *et al.*, 1999) et suggèrent qu'une bonne partie de cette boucle 13-14 est directement accessible de l'extérieur. Par contre, ces résultats contredisent les résultats sur les coupes ultrafines de rein (Takata *et al.*, 1991).

Enfin, l'orientation du dernier STM semble encore ambiguë. Plusieurs tentatives ont échoué à nous convaincre de l'orientation réelle du dernier STM de SGLT1. Premièrement, l'isoforme de lapin de SGLT1 a été utilisé et exprimé dans les cellules Cos-1 et Caco-2

après avoir été modifié par un marqueur VSVG (Turner *et al.*, 1996). Ce marqueur a sûrement modifié de façon importante sa structure puisque le transport de glucose était sévèrement atténué. De plus, VSVG-SGLT1 est acheminé par la machinerie cellulaire à la membrane basolatérale plutôt qu'à la membrane apicale tel qu'attendu. La détection de l'épitope VSVG par un anticorps anti-VSVG a requis la perméabilisation des cellules, ce qui suggérait que l'extrémité carboxy terminale faisait face au milieu intracellulaire. Il est connu que l'insertion d'un long épitope peut modifier l'insertion dans la membrane d'un STM, cela a d'ailleurs été démontré pour l'extrémité amino terminale de SGLT1 (Turk *et al.*, 1996). Deuxièmement, un épitope poly-His, ajouté en position 662 (i.e. à l'extrémité C-terminale), a aussi nécessité la perméabilisation afin d'être détecté, les auteurs n'ont pu que suggérer une position intracellulaire ou transmembranaire (Lin *et al.*, 1999). En effet, ce segment pourrait être partiellement enfoui dans la membrane sans être inversé et faire face au milieu intracellulaire. Par contre, ce résultat n'a malheureusement pu être confirmé dans les ovocytes de *Xenopus* puisqu'aucune protéine fonctionnelle n'a pu être obtenue ni avec l'épitope HA ni poly-His insérés en position carboxy terminale (Bissonnette *et al.*, 1999). Finalement, nous avons testé l'accessibilité du dernier résidu de SGLT1, A664, situé à l'extrémité carboxy terminale. L'effet des deux réactifs MTS sur une cystéine attachée au dernier résidu du dernier STM indique que celui-ci est probablement situé du côté extracellulaire. La mutation simple d'un résidu en cystéine est probablement moins sujette à modifier l'orientation d'un STM tel que peut le faire une longue insertion d'acides aminés mais cette possibilité ne peut quand même pas être écartée. À tout le moins, nous pouvons déduire que l'extrémité carboxy terminale de SGLT1 semble importante tant pour la fonction que pour l'acheminement correct à la membrane plasmique.

7.1.4 Rôle de la boucle 13-14 dans la fonction de SGLT1

7.1.4.1 Site de liaison de la Pz

Novakova et ses coauteurs (2001) ont postulé que les acides aminés 604-610 de SGLT1 de lapin forment une partie du site de liaison pour la Pz. Leurs travaux ont démontré une modification du K_i^{Pz} , non concomitante à une modification du $K_m^{\alpha MG}$, pour des protéines SGLT1 mutantes (mutations Y604K, L606K, F607K, C608K, G609K et

L610K) exprimées dans les cellules COS-7. D'autres résultats sur un peptide isolé et purifié correspondant aux cent acides aminés de la boucle 13-14 de SGLT1 ont démontré une liaison de la Pz avec un K_d de 15 à 26 μM (sauvage) et une modification de la photo-extinction de la fluorescence des tryptophanes (D611W avec un K_d de 54 μM) chez des mutants dont le site hypothétique de liaison à la Pz avait été modifié (Raja *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2003). Nous avons testé cette hypothèse en mesurant les constantes d'inhibition de la Pz (K_i^{Pz}) pour nos mutants de SGLT1, dont la protéine est entière et fonctionnelle. Lorsqu'évaluées dans les ovocytes de *Xenopus*, la valeur du $K_m^{\alpha\text{MG}}$ du mutant D607C a diminué de 50% par rapport à celle du wt SGLT1 et celle du K_i^{Pz} a augmenté légèrement pour les mutants A605C, Y606C et D607C (voir Figure 3.7). De façon intéressante, la séquence AYDL en position 605 à 608 est conservée chez les isoformes de SGLT1 et SGLT3 (identité de 70% avec SGLT1) mais est remplacée par la séquence CLLW chez SGLT2 (identité de 75% avec SGLT1), dont le K_i^{Pz} est de 9 μM (à -50 mV), pour l'isoforme de porc exprimé dans les ovocytes de *Xenopus* (Mackenzie *et al.*, 1996). Cette valeur est 45 fois plus grande que la valeur connue pour SGLT1 humain (~0.2 μM à -50 mV) mais à notre connaissance, aucune mesure du K_i^{Pz} n'a été faite sur l'isoforme wt SGLT1 de porc. Nos résultats démontrent que le remplacement des résidus A, Y et D par une cystéine produit une augmentation mineure du K_i^{Pz} mais ces acides aminés ne semblent tout de même pas cruciaux à la liaison de la Pz. Ce n'est pas un comportement attendu si ce segment jouait un rôle central dans la liaison de la Pz.

7.1.4.2 Le «senseur de voltage»

La revue de la littérature concernant la topologie de SGLT1 suggère que l'orientation des STM XIII et XIV dans le modèle topologique actuel est correcte. Cela a des implications directes sur la topologie de la boucle 13-14. Elle devrait débiter et se terminer du côté intracellulaire, tout en formant une structure permettant son accessibilité du côté extracellulaire mais elle ne pourrait pas constituer deux nouveaux segments transmembranaires puisque qu'elle est trop courte et nettement trop hydrophile (voir Figure 7.1). Nous avons formulé l'hypothèse qu'elle forme une boucle ré-entrante, une topologie présente dans des structures 3D de protéines membranaires sans avoir été bien prédite par les profils d'hydropathie (Foster *et al.*, 1983; Doyle *et al.*, 1998; Dutzler *et al.*, 2002;

Abramson *et al.*, 2003; Savage *et al.*, 2003). Le segment S4, le senseur de voltage des canaux ioniques dépendants du V_m , est un bon exemple d'un segment dont la topologie n'avait pas été bien prédite par les profils d'hydropathie. Même avec plus d'une structure 3D, son orientation par rapport au plan de la membrane fut controversée jusqu'à tout récemment (voir section 1.2.1). Le groupe de MacKinnon a récemment admis que la structure du senseur de voltage dans KvAP (Jiang *et al.*, 2003a) n'était probablement pas dans son état natif et que cette structure nécessitait un ajustement (Lee *et al.*, 2005). Ruta et ses coauteurs ont proposé un nouveau modèle de structure de KvAP qui se rapproche beaucoup du modèle du *Shaker* proposé par Chanda *et al.* (2005). Par contre, les auteurs ont testé l'amplitude du mouvement effectué par les résidus arginines et ce point semble être encore de nature à controverse (Ruta *et al.*, 2005).

La boucle 13-14 pourrait-elle former le «senseur de voltage» de SGLT1, une structure dont l'orientation serait sensible au V_m et qui permettrait aux sites de liaison des ions Na^+ de devenir accessible aux V_m hyperpolarisants? La mesure expérimentale cruciale pour la détermination du rôle des charges du segment S4 dans la sensibilité au voltage dans les canaux K_v fut l'observation d'un changement de pente (z) dans la courbe Q-V, concomitante à une modification du $V_{1/2}$ lorsque les résidus chargés du segment S4 sont mutés (Aggarwal et MacKinnon, 1996; Seoh *et al.*, 1996). Certains de nos résultats préliminaires démontrent que plusieurs mutations de résidus chargés dans la boucle 13-14 ont modifié la position de la courbe Q-V ($V_{1/2}$) par rapport à celle du wt SGLT1 (résultats non publiés). Par contre, nous savons que de nombreuses mutations qui n'impliquent pas la boucle 13-14 peuvent modifier le $V_{1/2}$. Il semble qu'il y ait plusieurs façons directes ou indirectes d'influencer la charge et la position du senseur de voltage de SGLT1.

Tel qu'illustré à la Figure 7.1, la séquence de la boucle 13-14 est hautement hydrophile et des résidus chargés sont regroupés de façon particulière. En examinant le profil d'hydropathie, il est clair que des regroupements d'environ une vingtaine d'acides aminés hydrophobes pourraient former les STM XI, XII, XIII et XIV et que les STM XIII et XIV sont séparés par une région hydrophile contenant un petit groupe d'acides aminés un peu plus hydrophobe, entre A605 et L612 (chez hSGLT1). La portion hydrophile de la boucle contient 38 acides aminés chargés, dont 21 négatifs et 17 positifs, qui sont répartis

en alternance de groupes de résidus chargés négativement et positivement. Nous pensons que ce segment de SGLT1 commence et se termine du côté intracellulaire et nous avons démontré qu'il était accessible du côté extracellulaire. Un tel segment, qui traverse la membrane et qui possède un moment dipolaire (alternance de charges nettes négatives et positives) possède les propriétés nécessaires pour agir comme un senseur de voltage. Lors d'un changement de voltage, l'orientation de ce segment par rapport au plan de la membrane pourrait très bien être modifiée, engendrer des mouvements dans des hélices adjacentes et contribuer à la formation du site de liaison des ions Na^+ aux V_m négatifs par exemple. Pour l'instant, nous ne possédons pas encore assez de résultats pour corroborer complètement cette hypothèse mais elle mérite certainement d'être explorée en détails.

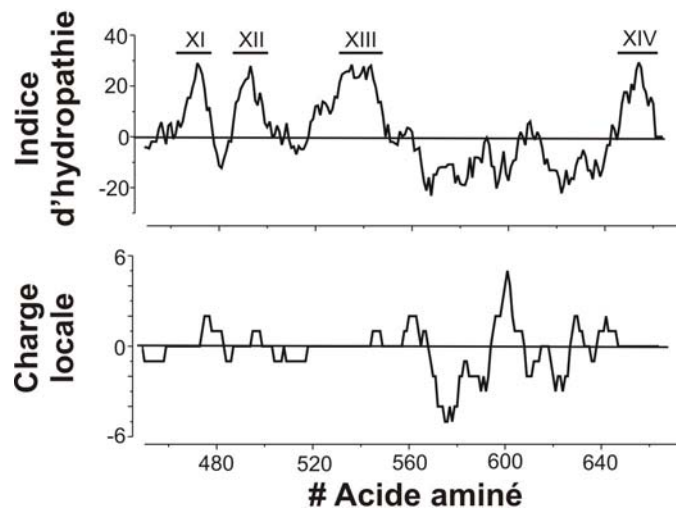


Figure 7.1 : Propriétés de la boucle 13-14 de hSGLT1.

Le panneau du haut montre l'indice d'hydrophobicité sur une fenêtre de 9 acides aminés pour la séquence correspondant aux quatre derniers STM calculé avec l'algorithme de Kyte et Doolittle (1982). Le panneau du bas illustre quant à lui la charge locale sur la même séquence de la protéine. Le même algorithme que pour le profil d'hydrophobicité a été utilisé mais en attribuant des valeurs de +1 pour les acides aminés chargés positivement (K, R), de -1 pour les acides aminés chargés négativement (D, E) et 0 pour les autres.

7.2 Le rôle des cystéines endogènes et l'identification du pont disulfure

Les cystéines endogènes de SGLT1 sont hautement conservées parmi les différents isoformes de la famille SLC5. L'alignement des séquences a été fait en utilisant le logiciel

ClustalX (Heringa, 1999) d'abord et ensuite, certaines régions ont été ajustées manuellement. Cependant, la portion carboxy terminale, principalement la boucle 13-14, est beaucoup moins conservée et pose certains problèmes lors de l'alignement des séquences. Malgré cela, huit cystéines (C255, C292, C345, C351, C355, C361, C511 et C610) sont conservées chez tous les isoformes de toutes les espèces de SGLT1, SGLT2, SGLT3, SMIT1 et SMIT2. SGLT1 a un fort pourcentage d'identité et de similarité avec SGLT2 (57% identité et 77% similarité, respectivement), SGLT3 (69% et 84%), SMIT1 (41% et 60%) et SMIT2 (49% et 68%). C351 est présente dans tous les transporteurs eucaryotes de la famille SLC5, à l'exception de quelques isoformes de transporteurs de choline, qui sont beaucoup moins similaire à SGLT1 que le sont les transporteurs de sucres mentionnés plus haut. Les cystéines en positions 301, 314, 317, 517, 522 et 560 ne sont quant à elles conservées que dans SGLT1, SGLT2 et SGLT3. Seule C659 n'est présente que dans les isoformes de SGLT1. Un tel degré de conservation suggère que les cystéines jouent un rôle important dans la structure et/ou la fonction des transporteurs couplés au Na⁺ de la famille SLC5.

7.2.1 Effet des agents oxydants et réducteurs sur wt SGLT1

Notre laboratoire et d'autres laboratoires ont démontré que les agents oxydants (réactifs MTS, NEM) n'affectaient pas la fonction de SGLT1 sauvage (isoformes humain et lapin) de façon significative (Lo et Silverman, 1998a; Loo *et al.*, 1998; Gagnon *et al.*, 2005) (voir Figure 3.2). Il existe deux principales explications à cette observation : 1) ces composés ne se lient à aucune cystéine endogène soit parce qu'elles sont inaccessibles (enfouies dans la membrane ou liées de façon covalente dans un (des) pont(s) disulfure(s)) ou non solvatées et 2) ces composés se lient aux cystéines mais ils ne génèrent aucune modification significative et mesurable de la fonction de SGLT1. Nous avons par ailleurs démontré qu'une sonde fluorescente qui réagit spécifiquement sur les cystéines grâce à un groupement maléimide (TMR5M) ne pouvait marquer un ovocyte exprimant la protéine sauvage davantage qu'elle ne marque un ovocyte non-injecté. Ce résultat suggère que l'explication 1) est la plus probable.

D'autre part, nous avons démontré qu'un agent réducteur, le DTT, qui brise potentiellement tous les ponts disulfures, enfouis ou non dans la membrane (Cleland, 1964), avait un effet marqué sur les courants transitoires et stationnaires de SGLT1 (Chapitre 4) (voir Figures 4.1, 4.2 et 4.8). Nous avons mesuré une réduction du courant I_{leak} , une augmentation de 60% du $K_m^{\alpha MG}$ (i.e. une réduction de l'affinité apparente pour l' αMG), un déplacement de +25 mV la courbe Q-V, i.e. une modification de la position d'équilibre du «senseur de voltage», et une accélération des courants transitoires lors d'un traitement prolongé au DTT. Ce résultat suggérait l'existence d'au moins un pont disulfure important pour la fonction de SGLT1. Une étude systématique du rôle des cystéines endogènes fut donc entreprise (Chapitre 4).

7.2.2 SCAM inverse de SGLT1

Nous avons bâti notre stratégie d'identification du(des) pont(s) disulfure(s) en nous inspirant des travaux faits sur d'autres transporteurs, dont les buts étaient d'identifier la(s) cystéine(s) à l'origine d'une sensibilité à un réactif MTS dans la protéine sauvage ou de créer un transporteur sans cystéine endogène afin de faire du SCAM. Les cystéines endogènes du transporteur Na^+/Pi de type IIa ont été étudiées une à une par mutagenèse (mutation simple et mutations multiples), par analyse de Western blot et en étudiant les effets des réactifs TCEP et de réactifs MTS sur le transport de la protéine sauvage et des mutants créés (Lambert *et al.*, 2000a; Lambert *et al.*, 2000b; Kohler *et al.*, 2003). Ils ont identifié, principalement à partir d'analyses biochimiques, un pont disulfure essentiel à la fonction du transporteur entre deux cystéines (C306-C334 dans NaPi IIa de rat) situées sur la même boucle extracellulaire. Les mutants dans lesquels ce pont disulfure était éliminé (C306S, C334S et C306S/C334S) démontraient toujours une sensibilité au TCEP, de façon similaire à la protéine sauvage, ce qui indiquait qu'il existait au moins un autre pont disulfure. Les auteurs ont postulé que C225 formait un second pont disulfure avec C520, sans avoir pu obtenir de résultats très convaincants pour valider leur hypothèse. En utilisant une méthodologie semblable, un pont disulfure a aussi été identifié entre deux cystéines d'une même boucle extracellulaire (C200 et C209 dans SERT de rat) dans le transporteur de sérotonine SERT, qui contient 16 cystéines endogènes (J.G. Chen *et al.*, 1997a; Sur *et*

al., 1997). Le résultat le plus persuasif qui a mené les auteurs à cette conclusion était la diminution de l'affinité de la liaison du β -CIT par les mutations (wt SERT K_D 2.2 ± 1.0 nM, C200S 12.2 ± 5.9 nM, C209S 46 ± 15 nM et C200S/C209S 22 ± 12 nM). De plus, l'effet du MTSEA sur wt SERT fut attribué à C109 (J.G. Chen *et al.*, 1997a) puisque sa mutation en alanine abolit l'inactivation par le MTSEA et par le MTSET observée dans wt SERT.

Notre stratégie a donc été la suivante. Nous avons mesuré un effet marqué du DTT sur la courbe de charge transférée du wt SGLT1, un déplacement du V_m auquel la moitié de la charge est transférée. Nous nous sommes donc concentrés à évaluer l'effet produit par les mutations simples sur la courbe Q-V par rapport à celle du wt SGLT1 et avons classifié les mutants en groupes selon l'effet produit par la mutation. Ce critère de sélection était aussi plus simple puisque la charge transférée dépend d'un moins grand nombre de paramètres cinétiques que l'affinité pour le substrat par exemple. Les résultats obtenus avec les mutants simples nous ont poussés à évaluer d'autres caractéristiques fonctionnelles sur un plus petit nombre de mutants simples et à créer des mutants doubles afin de tester d'autres hypothèses. En plus de cette stratégie, le marquage avec une sonde fluorescente a été utilisé sur deux mutants simples et sur un mutant double préalablement identifiés afin de déterminer si le fait d'éliminer une des deux cystéines du pont pouvait rendre accessible l'autre cystéine, alors qu'elle ne l'était pas dans la protéine sauvage, et afin de déterminer si la double mutation empêche ce marquage. Nous avons appelé cette méthode le SCAM inverse et cette méthode était assez originale puisqu'à notre connaissance le marquage fluorescent n'a été utilisé dans aucune autre étude afin d'identifier un pont disulfure dans une protéine. Par contre, l'idée d'enlever une cystéine afin de rendre accessible une autre cystéine à un réactif MTS avait été mentionnée et utilisée auparavant dans l'étude de J.G. Chen et ses coauteurs (1997a). Nous avons donc pu analyser un nombre relativement petit de mutants et arriver à notre but d'identifier le pont disulfure responsable de l'effet du DTT sur la protéine sauvage. Sans cette stratégie, nous aurions pu devoir tester les 105 combinaisons possibles (i.e. $\sum_{n=1}^{14} n$, n étant le nombre de partenaires possibles pour une cystéine, la première cystéine ayant 14 partenaires possibles, la deuxième 13, etc.)

Les mutants ont été divisés en quatre principaux groupes : les mutants non fonctionnels (C351A, C355A et C361A), les mutants dont le $V_{1/2}$ de la courbe Q-V était

similaire ou identique à celui de la protéine sauvage (groupe A : C317A, C345A, C517A, C659A, voir Figure 4.5), les mutants dont le $V_{1/2}$ de la courbe Q-V est déplacé vers les V_m négatifs par rapport à celui de la protéine sauvage (groupe B : C292A, C301A, C314A, C522A, C560A, C610A, voir Figure 4.6) et les mutants dont le $V_{1/2}$ de la courbe Q-V est déplacé vers les V_m positifs par rapport à celui de la protéine sauvage (groupe C : C255A et C511A, voir Figure 4.7). Nous avons aussi effectué une série de double mutants (C314A/C560A, C522A/C560A, C560A/C610A, C292A/C610A, et C301A/C610A, voir Figure 4.9) afin de tester une hypothèse : existe-t-il un pont disulfure, entre deux cystéines du groupe B, dont la rupture engendre un déplacement du $V_{1/2}$ vers les V_m négatifs par rapport au $V_{1/2}$ de la protéine sauvage? Entre autres, des travaux effectués sur le peptide isolé correspondant à la boucle 13-14 de SGLT1 avaient suggéré l'existence d'un pont disulfure entre les cystéines C560 et C610 (Xia *et al.*, 2003, 2004). L'étude des mutants doubles a aussi permis de tester dans la protéine complète et fonctionnelle l'hypothèse de Xia et ses coauteurs. Un dernier mutant double (C255A/C511A) a été créé afin de vérifier que les deux mutations simultanées n'avaient pas plus d'effet que les mutations simples.

Un des rôles principaux des cystéines endogènes ressort aisément du classement des mutants : plusieurs cystéines (groupes B et C) sont essentielles à la stabilisation du «senseur de voltage» dans sa position d'équilibre. En effet, les courants transitoires sont engendrés par le changement de conformation du transporteur entre la conformation vide dont les sites de liaisons font face au milieu intracellulaire (C_1) et celle dont les sites font face au milieu extracellulaire (C_3) ainsi que par la liaison des ions Na^+ ($C_4(2Na^+)$). Le $V_{1/2}$ est en effet un paramètre qui donne la valeur du voltage pour laquelle la moitié des charges se sont déplacées d'une position extrême à l'autre. Cet aspect sera discuté davantage plus loin dans la section du modèle cinétique (section 7.3). D'autres cystéines (C345, C351, C355, C361, C522, C560) se sont révélées essentielles pour l'acheminement à la membrane plasmique et un petit nombre d'entre elles sont apparues non-essentielles à la fonction de SGLT1. Que des cystéines soient essentielles à l'acheminement à la membrane plasmique ne nous a pas surpris. L'idéal de créer un transporteur sans cystéine s'avère souvent impossible puisque dans plusieurs cas, le transporteur n'est plus correctement acheminé à la membrane plasmique lorsque plusieurs cystéines sont remplacées par une sérine ou une

alanine (Pajor *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2004). Par contre, aucune étude n'avait encore révélé l'importance des cystéines pour la stabilisation des charges transférées dans un transporteur.

7.2.3 Cystéines non-essentiels

Seules les trois cystéines C317 dans le STM VIII, C517 dans la boucle 12-13 et C659 dans le dernier STM peuvent être substituées par une alanine sans modifier le niveau d'expression tel que mesuré par l'amplitude du courant maximal induit par l'addition d'une concentration saturante de glucose ou par la quantité de charges transférées (Q_{\max}), ni la forme ou le V_{rev} des courbes I-V des courants I_{leak} , I_{cotr} ou les courbes Q-V ($V_{1/2}$ et z). Ces cystéines ne sont conservées que dans les isoformes de SGLT1, SGLT2 et SGLT3 sauf C659 qui n'est conservée que dans les isoformes de SGLT1. Étant donné que la mutation de ces cystéines en alanine ne reproduisait pas l'effet du DTT sur wt SGLT1, nous n'avons pas considéré que deux d'entre elles puissent former un pont disulfure important pour la fonction de SGLT1. Par contre, deux d'entre elles pourraient former un pont disulfure dont la rupture n'aurait *a priori* aucun effet sur la fonction. Cela pourrait être vérifié par SCAM inverse à l'aide de sonde fluorescente.

7.2.4 Cystéines importantes pour l'acheminement correct à la membrane plasmique

Les mutants non-fonctionnels (C351A, C355A et C361A) dont la cystéine était localisée dans la boucle extracellulaire entre les STM VIII et IX, ne présentaient pas d' I_{cotr} , que ce soit à 5 mM ou 100 mM α MG. La protéine était par contre détectable sur une membrane de nitrocellulose après l'immuno-détection de type Western utilisant une préparation enrichie en membranes plasmiques et un anticorps anti-myc reconnaissant un épitope myc ajouté à l'extrémité amino terminale de SGLT1 (voir Figure 4.4), tandis qu'en utilisant une préparation de membranes plasmiques isolées, l'analyse d'immuno-détection de type Western a révélé qu'aucune de ces protéines mutantes n'est présente à la membrane plasmique (voir Figure 7.2, Leduc-Nadeau *et al.*, 2006).

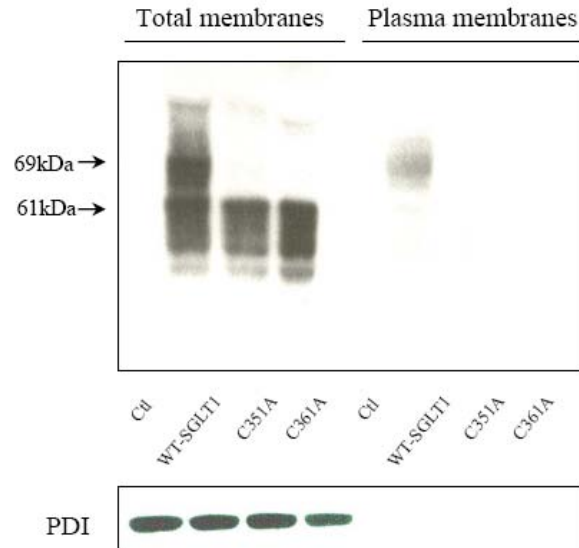


Figure 7.2 : Analyse d'immunobuvardage de type Western de préparations de membranes totales et de membranes plasmiques isolées. Tiré de (Leduc-Nadeau *et al.*, 2006).

De plus, les ovocytes injectés avec l'ARNm codant pour ces protéines mutantes n'ont pas été marqués par la sonde TMR5M. Étant donné que les ovocytes fabriquent la protéine mais qu'aucun transport ni courant transitoire ne sont détectés en électrophysiologie, nous avons conclu que ces cystéines sont importantes pour l'acheminement correct du transporteur à la membrane plasmique. Toutefois, seule la mutation en résidu alanine a été testée et nous n'avons pas tenté de modifier le codon du résidu alanine, l'acheminement à la membrane plasmique peut dépendre de plusieurs facteurs relatifs à la biologie de la cellule. Il est intéressant de voir que C351 est cruciale pour ce processus et qu'elle est à la fois conservée dans presque toute la famille SLC5. Cela suggère que cette cystéine est également très importante dans d'autres cotransporteurs de type SLC5. Le mutant C345A, classé dans le groupe A à cause de la valeur du $V_{1/2}$ de sa courbe Q-V, est lui aussi très important pour l'acheminement à la membrane plasmique, de même que les mutants C522A et C560A, dont les valeurs de I_{cotr} , I_{leak} et Q_{max} suggèrent une importante réduction du nombre de protéines à la membrane plasmique. Les travaux de Xia et ses coauteurs

(2005) ont aussi démontré que les cystéines C351 et C361 avaient un rôle important dans l'acheminement à la membrane plasmique. De plus, leurs résultats démontrent que les mutants simples sont fonctionnels dans les compartiments intracellulaires et que de muter les deux cystéines à la fois rétablissait l'acheminement correct à la membrane plasmique et que ce transporteur était fonctionnel comme la protéine sauvage.

7.2.5 Cystéines importantes pour la position du «senseur de voltage»

Les caractéristiques fonctionnelles des mutants du groupe B et des doubles mutants se sont aussi montrées très intéressantes. Une première analyse des caractéristiques des mutants simples nous a poussés à faire l'hypothèse de l'existence d'un pont disulfure entre les cystéines C522 et C560, puisque les deux mutants C522A et C560A ont des caractéristiques extrêmement similaires, à un tel point qu'on ne pourrait les distinguer l'un de l'autre. En effet, leurs I_{leak} , I_{cotr} et Q_{max} et $V_{1/2}$ sont identiques. Malheureusement, le double mutant C522A/C560A n'est pas fonctionnel, quoi qu'il soit produit par les ovocytes puisque la protéine peut être observée avec une analyse de type Western sur une préparation enrichie en membranes plasmiques. Cela nous dit que si la réduction d'expression à la membrane observée avec les deux simples mutants (réduction d' I_{cotr} et du Q_{max}) était due au bris d'un pont disulfure, la double mutation produirait un effet supplémentaire qui empêche l'observation d'une protéine fonctionnelle à la membrane plasmique. Nous avons donc conclu que C522 et C560 ne formaient pas de pont disulfure entre elles dans la protéine sauvage ou du moins que si elles en forment un, l'éliminer en mutant l'une ou l'autre des cystéines ou les deux n'a pas le même effet puisque le double mutant est non fonctionnel et que les deux simples mutants le sont. Il serait intéressant de muter ces deux cystéines (individuellement et en paire) en sérine et/ou d'utiliser un autre codon pour la mutation en alanine afin de s'assurer ce l'hypothèse du pont disulfure doit être proscrite. Si l'hypothèse s'avérait, cela signifierait que la cystéine C560 est située du côté extracellulaire, la topologie de la boucle 13-14 en serait grandement affectée (voir aussi section 7.1). De tous les autres mutants simples, les mutants C292A et C610A sont aussi particulièrement intéressants puisque leur $V_{1/2}$ est déplacé par plus de -40 et de -70 mV par rapport à celui du wt SGLT1. Cela signifie que les sites de liaison des transporteurs

mutés sont principalement dans la configuration intracellulaire à -50 mV. Les mutants C292A ont un courant de fuite (I_{leak}) très grand, jusqu'à trois fois plus grand que celui du wt SGLT1 mais leur I_{cotr} sont très différents. Chez le mutant C292A, il est presque absent (<50 nA) tandis qu'il est de $\sim 1 \mu A$ chez le mutant C610A. Par contre, le mutant double C292A/C610A ne transporte pas d' αMG (< 10 nA) mais son I_{leak} est resté intact. De récents travaux de notre laboratoire ont démontré que les ions Na^+ ne pouvaient être cotransportés avec l' αMG dans ce mutant mais que les H^+ se substituaient très bien au Na^+ pour engendrer un I_{cotr} de plus de $1 \mu A$ à pH 5.5, inhibé par la Pz. Cela suggère que la mutation C292A qui serait située au centre du STM VII a généré un changement d'affinité du site de liaison qui fait que le Na^+ se lie mal et que les H^+ se lient maintenant très bien et peuvent engendrer du cotransport avec l' αMG .

7.2.5.1 Le pont disulfure C255-C511

Plusieurs résultats nous ont permis de conclure que les cystéines C255 et C511 forment un pont disulfure entre elles : 1) les deux simples mutants du groupe C ont une courbe Q-V caractérisée par le même $V_{1/2}$ que celui du wt SGLT1 traité au DTT, 2) les constantes de temps de leurs courants transitoires sont très similaires à celle du wt SGLT1 traité au DTT, 3) la courbe Q-V du double mutant C255A/C511A est identique à celles des mutants simples, 4) sa constante de temps des courants transitoires est aussi très similaire à celle du wt SGLT1 traité au DTT et à celles des simples mutants, 5) les deux mutants simples et le mutant double ont perdu toute sensibilité au DTT, c'est-à-dire que lorsqu'un traitement au DTT est effectué, la courbe Q-V ne se déplace pas davantage, indiquant que le DTT ne peut plus engendrer l'effet observé sur le wt SGLT1, 6) l'affinité apparente pour l' αMG des mutants simples et du mutant double est identique à celle du wt SGLT1 traité au DTT, et finalement, et de façon très claire, 7) le traitement des ovocytes exprimant les différents transporteurs à l'aide d'une sonde fluorescente qui réagit spécifiquement sur les cystéines indique un fort marquage chez les mutants simples et aucun marquage chez la protéine sauvage ni chez le mutant double (voir Figure 4.10). Ces nombreux résultats apportent, à notre avis, une preuve très convaincante de la présence de ce pont disulfure.

Notre découverte d'un pont disulfure dans SGLT1 représente la toute première contrainte dans l'arrangement tridimensionnel du cotransporteur. Les acides aminés C255 et C511 ne sont donc probablement pas à plus de 2.05 Å (Loerger, 2005) l'un de l'autre dans la protéine sauvage, ce qui suppose que les STM VI et VII doivent être relativement près des STM XI, XII et XIII. Les C255 et C511 étant conservées dans les isoformes de SGLT1, SGLT2, SGLT3, SMIT1 et SMIT2, nous pouvons penser que ce pont disulfure puisse être un élément de structure commun à tous ces transporteurs et que la rupture de ce pont disulfure puisse y engendrer des effets fonctionnels.

7.3 Les courants transitoires en présence de substrat chez les mutants C255A et C511A et chez wt SGLT1

Une caractéristique extrêmement intéressante des mutants C255A et C511A a attiré notre attention : en présence d'une grande concentration d' α MG, des courants transitoires y sont toujours observables, et ce, uniquement aux V_m dépolarisants (Chapitre 5). Il est connu depuis les premières études en électrophysiologie sur SGLT1 que son substrat abolit complètement les courants transitoires à des concentrations saturantes (Parent *et al.*, 1992a; Loo *et al.*, 1993). C'est aussi le cas pour la majorité des cotransporteurs tels SGLT1 et SGLT2, les transporteurs de myo-inositol SMIT1 et SMIT2, le transporteur de monocarboxylate SMCT1, le transporteur de phosphate inorganique NaPiII, le transporteur d'iode NIS, les transporteurs de GABA GAT1 et GAT3, le transporteur de H^+ /hexose STP1 et le transporteur de K^+ /acides aminés dépendant du Cl^- KAAT1 (Parent *et al.*, 1992a; Loo *et al.*, 1993; Boorer *et al.*, 1994; Hager *et al.*, 1995; Mackenzie *et al.*, 1996; Eskandari *et al.*, 1997; Forster *et al.*, 1998; Bossi *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Coady *et al.*, 2002; Fesce *et al.*, 2002; Sacher *et al.*, 2002; Coady *et al.*, 2004; Kanai et Hediger, 2004; Virkki *et al.*, 2005). En fait, cette caractéristique était connue et reconnue de tous mais avait été laissée sans explication cinétique satisfaisante. Le modèle cinétique de Parent et ses coauteurs (1992b) prédisait une diminution partielle seulement des courants transitoires en présence de substrat. Autrement, seul un modèle simple a été proposé pour GAT1 afin d'expliquer le phénomène mais ne pouvait malheureusement pas être généralisé (Fesce *et al.*, 2002). Il nous apparaissait surprenant que les transporteurs puissent générer des courants transitoires

lorsque le substrat est absent mais qu'en sa présence, ils ne le fassent pas. En effet, si on imagine un changement de voltage d'une valeur très positive vers une valeur très négative, le transporteur doit passer par les mêmes conformations (C_1 , C_2 , C_3 et $C_4(2Na^+)$) pour adopter la conformation liée au Na^+ , que le substrat soit présent ou non. Comment était-il possible que la liaison du substrat suivie d'un changement de conformation et de la libération du Na^+ et du substrat à l'intérieur de la cellule puisse annuler complètement les transferts de charges associés au passage de l'état C_1 à l'état $C_4(2Na^+)$? Nous avons donc étudié les courants transitoires de nos deux mutants et de la protéine sauvage en fonction de la concentration d' α MG. Nous avons aussi utilisé le modèle cinétique simple à cinq états afin de mieux comprendre ce phénomène et fournir une explication quantitative (Chapitre 5).

D'abord, il faut spécifier que l'effet de la présence du substrat n'avait été rapporté que de façon globale : absence de substrat versus concentration saturante de substrat. Il fut surprenant de constater la progression de la disparition des courants transitoires dans le wt SGLT1 puisque plusieurs effets sont observés simultanément lorsque la concentration d' α MG est augmentée : 1) une diminution de la charge totale transférée (Q_{max}) jusqu'à sa disparition totale à 5 mM α MG, 2) un déplacement de la courbe Q-V vers les V_m plus positifs 3) une diminution progressive de la constante de temps (τ_{slow}) de 10 ms aux V_m négatifs jusqu'à la vitesse de 2-3 ms en présence de 5 mM α MG, ce qui correspond à la limite de la résolution temporelle de notre technique d'électrophysiologie (voir Figures 5.3 et 5.4). Chez les mutants, la diminution de la charge totale et le déplacement de la courbe Q-V vers les V_m plus positifs sont aussi observés, quoiqu'ils soient moindres (voir Figures 5.1 et 5.2). Par contre, les courants transitoires ne sont pas accélérés mais plutôt ralentis par rapport à ceux observés en absence de substrat, aux V_m positifs.

Pour comprendre ce qui se passe, nous devons nous référer directement au modèle cinétique. Brièvement, la présence de glucose limite la présence des transporteurs dans les états C_1 à $C_4(2Na^+)$ qui sont responsables des déplacements de charges lorsque le V_m est changé. De plus, la présence de substrat donne accès à des états qui sont reliés par des constantes de vitesse rapides qui tendent à accélérer la vitesse caractéristique de relaxation

des probabilités de présence des transporteurs entre la configuration à -50 mV et les autres V_m . Voyons plus en détails ce qui se passe.

7.3.1 Le modèle cinétique de SGLT1

Nous avons utilisé le modèle cinétique de Chen et ses coauteurs (1996) afin de comprendre les étapes affectées par le bris du pont disulfure (voir Chapitre 4, Figure 4.11). Le modèle de Chen n'utilise la liaison que d'un seul ion Na^+ et peut reproduire les courbes de charges transférées et les constantes de temps des courants transitoires, et ce pour différentes concentrations de Na^+ extracellulaire. Nous n'avons pas testé l'effet de la concentration de Na^+ extracellulaire dans cette étude, c'est pourquoi nous avons utilisé ce modèle simple où un seul ion est présent.

Par ailleurs, afin de découvrir les raisons pour lesquelles les courants transitoires disparaissent en présence d'une grande concentration d' αMG chez le wt SGLT1 et celles pour lesquelles ils persistent chez nos mutants dont le pont disulfure est absent (voir Chapitre 5, Figure 5.5), nous avons dû ajouter à ce modèle la liaison du second Na^+ et la liaison du substrat. La stoechiométrie $2 \text{Na}^+ : 1 \text{ glucose}$, l'ordre de liaison $\text{Na}^+ : \text{Na}^+ : \text{substrat}$ et la coopérativité des deux ions Na^+ dans SGLT1 sont des faits généralement acceptés (Parent *et al.*, 1992b; Chen *et al.*, 1995; Berteloot, 2003), nous avons donc combiné la liaison des deux ions en une seule étape et ajouté la liaison du substrat après l'étape de liaison des ions.

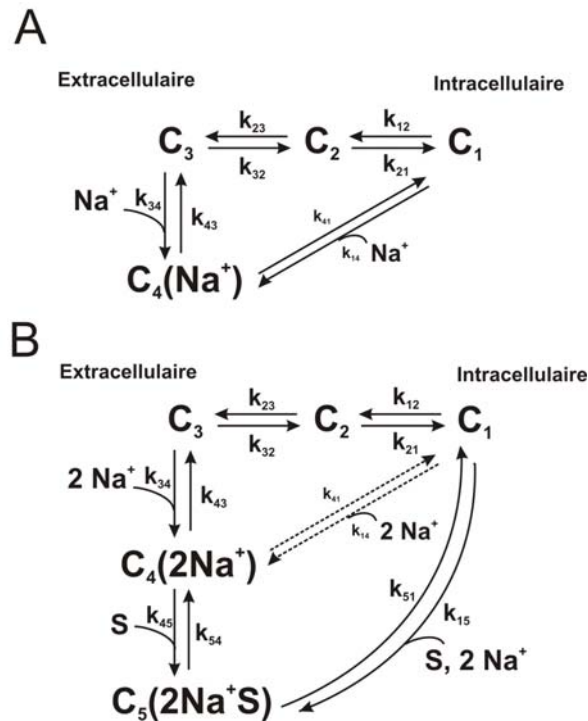


Figure 7.3 : Schéma des deux modèles cinétiques présentés dans les Chapitres 4 (en A), 5 et 6 (en B).

Nous allons d’abord traiter des implications de la liaison du second ion Na^+ sur les probabilités d’occupation à -50 mV chez le wt SGLT1 et des étapes qui ont dû être légèrement modifiées dans le modèle à deux Na^+ versus celui à un ion Na^+ . Il est important de mentionner que nous avons pu reproduire de façon très satisfaisante les caractéristiques de la protéine sauvage et des mutants avec les deux modèles. Nous allons ensuite expliquer les étapes affectées par les mutations C255A et C511A dans les deux modèles, tel que présenté dans les Chapitres 4 et 5.

7.3.1.1 En absence de substrat

7.3.1.1.1 Modèle à un ion Na^+

Nous avons modifié légèrement certaines constantes de vitesse établies par Chen *et al.* (k_{320} et k_{340} sont passées de 280 et 15 000 à 180 et 8 000, respectivement) afin de bien reproduire nos résultats en deux micro-électrodes (Chapitre 4). Nous avons ajusté ces

constantes principalement par essais et erreurs afin de bien superposer la constante de temps théorique à celle que nous obtenions expérimentalement en voltage imposé en deux micro-électrodes, ce faisant la courbe de charge transférée restait cohérente avec nos observations. Nous avons conservé les valeurs de z_i et α_i établies auparavant ($z_1 = -0.4$, $z_2 = -0.36$ et $z_3 = -0.6$, $z_4 = 0$, $\alpha_1 = 0.3$, $\alpha_2 = 0$, $\alpha_3 = 0.4$ et $\alpha_4 = 0$) puisque nous n'avons aucune observation expérimentale qui les questionnait.

Avec ces paramètres, nous obtenons un $V_{1/2}$ de -39 mV (vs -46 ± 5 mV expérimentalement) et une courbe théorique de constante de temps en fonction du V_m très proche de notre courbe expérimentale pour le wt SGLT1 (voir Figure 4.2). À -50 mV et en absence de substrat, les transporteurs sont plutôt bien balancés entre les trois configurations où aucun ion ou substrat ne sont liés et seulement 7% des transporteurs sont dans la conformation liée au Na^+ (voir Tableau VII.I), tel que trouvé par Chen *et al.* (1996).

7.3.1.1.2 Modèle à 2 ions Na^+

Dans le modèle à deux ions Na^+ qui se lie au transporteur, les valeurs de z_i ont dû être modifiées afin que la valeur totale de la charge du transporteur soit de -2 (Chapitre 5) (Parent *et al.*, 1992b). Cela a pour avantage que la liaison des ions Na^+ (valence positive de 2) neutralise la charge intrinsèque au transporteur, ce qui permet de considérer les étapes subséquentes comme électroneutres. La valeur de z_1 n'a été que légèrement modifiée (-0.38 dans le modèle à deux ions) mais celles de z_2 et z_3 ont dû être augmentées à des valeurs de -0.52 et -1.1, respectivement. Les valeurs de α_1 et α_2 n'ont pas été modifiées par rapport au modèle à un ion Na^+ . Pour ce qui est des constantes de vitesse, la constante (k_{34}) du modèle à un ion Na^+ a été remplacée par $k_{34}/[\text{Na}^+]$ dans le modèle à deux ions Na^+ . Ce faisant, nous obtenons, tel que nécessaire, les bonnes unités ($\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$). Ensuite, les réactions de liaison et de libération du Na^+ ont été mises à l'équilibre puisque le meilleur ensemble de paramètres montrait que ces constantes de vitesse étaient beaucoup plus rapides que pour les autres réactions du modèle. La nouvelle constante (K_{34}), qui correspond au ratio k_{43}/k_{34} , est alors utilisée, ce qui simplifie le modèle en éliminant le paramètre α_3 . Pour la protéine sauvage, avec ces paramètres, nous avons obtenu un $V_{1/2}$ de -50 mV pour la courbe Q-V et des constantes de temps qui se superposent très bien aux valeurs expérimentales (voir Figure

5.6). Les probabilités d'occupation des états reflètent bien que la moitié de la charge a été déplacée à -50 mV (voir Tableau VII.I).

Tableau VII.I : Probabilités d'occupation, en pourcentage, des états C_1 à C_4 pour les modèles à un ion Na^+ et celui à 2 ions Na^+ , à -50 mV, pour le wt SGLT1 et pour les mutants.

	wt SGLT1		Mutants	
	Modèle à 1 ion Na^+	Modèle à 2 ions Na^+	Modèle à 1 ion Na^+	Modèle à 2 ions Na^+
C_1	31	5	4	2
C_2	31	22	17	9
C_3	31	43	40	45
$C_4(1\text{Na}^+)$	7	-	39	-
$C_4(2\text{Na}^+)$	-	30	-	44

Avec les mutants C255A et C511A, dans le modèle à un ion Na^+ (Chapitre 4), nous n'avons modifié que la constante de temps k_{23} qui est indépendante du V_m et avons obtenu un $V_{1/2}$ de -20 mV (vs. -26 ± 2 mV expérimentalement pour les deux mutants) et des constantes de temps avec un plateau à 4.5 à 5 ms tel que ce que nous observions expérimentalement (voir Figures 4.7). À -50 mV, la modification de la constante k_{23} favorise la configuration faisant face au milieu extracellulaire et liée au Na^+ , ce qui explique qu'un moins grand voltage négatif doit être appliqué pour un transfert de charge complet (et donc un déplacement global de la courbe Q-V vers les V_m plus positifs).

Par ailleurs, dans le modèle à deux ions Na^+ (Chapitre 5), la constante K_{340} devait aussi être modifiée puisque la diminution de la barrière d'énergie entre les états C_2 et C_3 favorisait maintenant une courbe de charge déplacée vers les V_m trop négatifs pour bien représenter nos mutants. En diminuant légèrement la valeur de K_{340} , nous pouvions à la fois accélérer les courants transitoires à la valeur de 4.5 à 5 ms et déplacer la courbe Q-V vers

les V_m positifs par rapport à celle du wt SGLT1 (voir Figure 5.6). Les probabilités de présence à -50 mV sont très similaires à ce que nous avons trouvé dans le modèle à un ion Na^+ (voir Tableau VII.I).

Dans les deux modèles, tant pour le wt SGLT1 que pour les mutants, les transporteurs seront entraînés dans l'état C_1 à V_m dépolarisants et dans l'état $C_4(1\text{Na}^+)$ ou $C_4(2\text{Na}^+)$ aux V_m hyperpolarisants, en absence de substrat. Cela s'explique par la dépendance en voltage des constantes de vitesse qui sont accélérées dans un sens ou dans l'autre par le V_m , à l'exception de la constante k_{23} qui est indépendante du V_m tel que démontré par Chen *et al.* (1996). De plus, dans les deux modèles, la constante de temps lente ($\tau \sim 10$ ms) des courants transitoires est due aux étapes C_2 vers C_4 et la constante rapide ($\tau \sim 1$ ms) est due à la transition C_1 vers C_2 .

Il apparaît donc clair que le pont disulfure nuit au changement de conformation entre C_2 et C_3 en élevant la barrière d'énergie indépendante du V_m , chez le wt SGLT1, et que lorsque celui-ci est brisé par un agent réducteur ou lorsqu'il est absent (dans les mutants), ce changement de conformation est facilité. Cela se répercute sur les courbes de charges transférées et sur les constantes de temps des courants transitoires.

7.3.1.2 En présence de substrat

Nous avons d'abord dû établir les constantes de vitesse associées à la liaison du substrat (k_{45}), à sa libération (k_{54}) ainsi qu'à la translocation du transporteur lié aux ions et au substrat (k_{51}). Les valeurs des constantes de vitesse établies en absence de substrat ont été maintenues constantes. Notre stratégie pour établir les trois nouveaux paramètres fut donc de bien identifier l'effet de chacun des paramètres afin de pouvoir reproduire les résultats en fonction de la concentration d' αMG . Entre autres, la charge transférée devait disparaître à de hautes concentrations d' αMG . Nous avons en fait débuté avec les valeurs établies par Loo et ses coauteurs (1993) pour SGLT1 humain. Nous avons rapidement constaté que nous devions augmenter par un facteur 40 la valeur de k_{51} de Loo *et al.* (2000 vs. 50 s^{-1}) afin que la charge transférée disparaisse à concentration saturante d' αMG (5 mM). Il était tout à fait surprenant de constater que le modèle proposé ne reflétait

aucunement le fait que les courants transitoires disparaissent en présence d'un substrat saturant. Nous avons aussi constaté que le ratio k_{45}/k_{54} influence le $V_{1/2}$ de la courbe Q-V : en augmentant le ratio, le $V_{1/2}$ est plus positif. Non seulement ce ratio s'est révélé important mais les valeurs absolues de k_{45} et k_{54} ont leur importance dans la dépendance en α MG de la courbe Q-V. Bref, ces valeurs ont été augmentées par un facteur 30 et 50 respectivement par rapport aux valeurs proposées par Loo *et al.* (1993) pour hSGLT1. Avec ces constantes de vitesses, nous reproduisons très bien la majorité des résultats observés sur le wt SGLT1 (voir Figure 5.6).

Dans le cas des mutants, nous avons également maintenu fixes les valeurs obtenues en absence de glucose et établi les valeurs de k_{45} , k_{54} et k_{51} . Celles qui avaient été déterminées pour le wt SGLT1 n'ont pas pu reproduire les courbes Q-V et les constantes de temps des mutants. Cela nous dit que les seules modifications de k_{23} et K_{34} nécessaires pour reproduire le comportement des mutants en absence de substrat ne suffisent pas pour expliquer tous les comportements observés, incluant ceux en présence d' α MG. Les constantes de liaison et de libération de l' α MG furent réduites par un ordre de grandeur et la réorientation du transporteur lié aux ions Na^+ et au substrat a été réduite à une aussi petite valeur que 80 s^{-1} (vs. 2000 s^{-1} pour wt SGLT1). Les courbes Q-V ainsi que les constantes de temps des courants transitoires générés par ce modèle reproduisent avec une grande similitude les résultats expérimentaux (voir Figure 5.6).

Curieusement, nous pouvons constater que les constantes de vitesse proposées par Loo et ses coauteurs (1993) se rapprochent davantage de celles que nous avons obtenues pour nos mutants que de celles pour le wt SGLT1. Leur ratio k_{45}/k_{54} est de 500 (vs. 600 pour nos mutants) tandis que nous avons trouvé qu'un ratio de 300 était nécessaire pour que le $V_{1/2}$ se déplace tel que ce que nous l'observons expérimentalement pour le wt SGLT1. De plus, leur valeur de k_{51} est aussi du même ordre de grandeur que la valeur que nous avons déterminée pour les mutants. Une valeur beaucoup plus élevée de k_{51} était absolument nécessaire afin d'expliquer l'inhibition de la charge transférée avec une grande concentration d' α MG pour le wt SGLT1.

Comment s'expliquent la disparition et la persistance des courants transitoires chez le wt SGLT1 et les mutants? Nous répondrons à cette question en analysant les probabilités de présence des transporteurs dans les différents états du modèle aux V_m extrêmes. Dans le cas de SGLT1 sauvage, en absence de substrat, une large hyperpolarisation typique, de +70 à -150 mV, produit un transfert des populations de C_1 vers C_2 , C_3 et $C_4(2Na^+)$ où ~90 % des transporteurs se trouvent à -150 mV (voir Figure 5.7). Dans ce cas, l'étape limitante est le saut de $C_4(2Na^+)$ à C_1 qui a une constante de vitesse quasi-nulle ($k_{41}=10 \text{ s}^{-1}$) en absence de substrat. En présence de substrat, l'étape limitante devient celle du passage de l'état C_2 à l'état C_3 ($k_{23}=110 \text{ s}^{-1}$) et c'est ce qui explique qu'à -150 mV, 75 à 78 % des transporteurs sont dans l'état C_2 . Aux voltages dépolarisants extrêmes, les transporteurs se trouvent dans l'état C_1 tandis qu'ils sont principalement dans l'état C_2 aux V_m hyperpolarisants. Le saut de C_1 vers C_2 s'effectue avec une constante de vitesse proche de $1/(k_{12}+k_{21})$ (soit ~0.8 ms à 0 mV), qui est en dessous de la limite de résolution temporelle de la technique de voltage imposé en deux micro-électrodes. De plus, la transition entre les états C_2 et $C_4(2Na^+)$ est responsable de la composante lente des courants transitoires. Les C_3 et $C_4(2Na^+)$ sont peu peuplés en présence d' α MG et les transporteurs en C_2 font face à une barrière d'énergie pour le wt SGLT1, ce qui réduit grandement l'amplitude de cette composante mais explique tout de même la faible présence de courants transitoires avec des constantes de temps de l'ordre de 3 ms. D'ailleurs, le modèle prédit l'existence d'une composante rapide à 5 mM α MG en forme de cloche dont le pic est à environ 3.5 ms.

Dans le cas des mutants, l'étape limitante en présence de substrat est le saut de $C_5(2Na^+S)$ à C_1 ($k_{51}=80 \text{ s}^{-1}$). Cela se reflète dans les probabilités de présence dans les différents états (de C_1 à $C_5(2Na^+S)$) qui sont de 3.6%, 20%, 3.9%, 17% et 58%, à 10 mM α MG, à -150 mV. Lors d'un saut de +70 à -150 mV, C_2 s'accumule de façon transitoire et relaxe par la suite vers la probabilité $C_5(2Na^+S)$ qui augmente puisqu'elle fait face à l'étape limitante (voir Figure 5.8). On voit la charge transférée lorsque C_3 passe à $C_4(2Na^+)$ avec un z_3 important de -1.1, ce qui fait que l'on voit passer ~40% de la charge totale avec une vitesse tout à fait mesurable en voltage imposé en deux micro-électrodes. Dans le cas des mutants, deux constantes de temps sont prédites par le modèle, une qui est identique à celle

observée en absence d' α MG et une qui possède un plateau à une valeur de 5.5 ms aux V_m positifs. Expérimentalement, une seule constante est détectée et elle se rapproche davantage de la constante de temps lente prédite par le modèle.

Deux méthodes ont été utilisées afin de mesurer une affinité apparente pour l' α MG lors de cette étude : 1) en utilisant le I_{cotr} pour différentes concentrations d' α MG à un V_m donné (on obtient alors $K_{\text{ml}}^{\alpha\text{MG}}$) et 2) en utilisant la quantité de charges qui a disparu en fonction de la concentration d' α MG au V_m hyperpolarisant i.e. $\frac{Q_{\text{saline}} - Q_{\alpha\text{MG}}}{Q_{\text{saline}}}$ à -170 mV (on obtient alors le $K_{\text{mQ}}^{\alpha\text{MG}}$). Wright utilise la valeur de $K_{\text{mQ}}^{\text{substrat}}$ comme une indication fiable de celle de $K_{\text{ml}}^{\text{substrat}}$ (Loo *et al.*, 2000; Sacher *et al.*, 2002), est-ce le cas? Il est à noter que ces valeurs expérimentales d'affinité ne peuvent être comparées au seul rapport k_{54}/k_{45} (3.3 mM pour wt SGLT1 et 1.67 mM pour mutants) puisque la valeur de l'affinité apparente pour le substrat dépend aussi d'autres constantes de vitesse du cycle de transport et malheureusement, aucune expression analytique n'existe pour ces deux paramètres dérivés pour des modèles à plus de quatre états. Pour le wt SGLT1, les deux valeurs expérimentales (0.97 mM pour $K_{\text{ml}}^{\alpha\text{MG}}$ et 0.48 mM pour $K_{\text{mQ}}^{\alpha\text{MG}}$) et théoriques (0.36 mM et 0.40 mM) se rapprochent l'une de l'autre mais pour les mutants, ces valeurs ne concordent pas, surtout dans le cas du mutant C511A. Notre modèle théorique nous dit donc que ces deux valeurs ne sont pas interchangeables. Il se pourrait bien que la position de l'étape limitante dans le cycle de transport puisse expliquer cette différence. Par exemple, il se peut que lorsque k_{51} n'est pas limitant, les deux valeurs d'affinité soient similaires tandis que lorsque k_{51} est limitant, comme c'est le cas pour les mutants, une différence puisse exister. Bref, la concordance entre les deux types d'affinité pour le wt SGLT1 pourrait être une simple coïncidence et notre étude tend à démontrer qu'il est inexact de considérer que les deux méthodes donnent *a priori* la même valeur d'affinité.

Le modèle que nous proposons fournit une explication aux comportements observés dans les courants transitoires en présence de substrat dans le cas de wt SGLT1 et dans celui des mutants. De plus, ce modèle prédit la relaxation des courants transitoires vers les courants stationnaires avec une affinité pour le substrat de l'ordre de grandeur attendu. Le

«*turnover*» du transporteur prédit par le modèle est de 101 s^{-1} pour le wt SGLT1 tandis qu'il est de 57 s^{-1} pour les mutants. Nous avons estimé des valeurs expérimentales de 42 s^{-1} pour wt SGLT1, 28 s^{-1} et 29 s^{-1} pour les mutants C255A et C511A (résultats non publiés). Le modèle prédit donc des valeurs de «*turnover*» absolues plus élevées d'environ un facteur deux et prédit que le «*turnover*» des mutants est de 44% de la valeur du wt SGLT1. Expérimentalement, les mutants ont un «*turnover*» de 68% de la valeur du wt SGLT1. Considérant que le modèle est basé exclusivement sur des données pré-stationnaires et que nous n'avons pas tenu compte des courants stationnaires ni des constantes d'affinités apparentes pour les Na^+ ou l' αMG pour établir les constantes de vitesse, le modèle est en très bon accord avec l'expérience et explique très bien la majorité des aspects du transport chez SGLT1.

Pour aller plus loin dans la description expérimentale des courants transitoires en présence de substrat dans SGLT1, la technique de «*cut-open*» ovocyte pourrait être utilisée. Elle permettrait de résoudre la constante de temps rapide (1 ms) (Chen *et al.*, 1996) mais le modèle ne prédit pas que celle-ci soit modifiée par la présence de substrat. Dans le cas des mutants, il pourrait être intéressant d'aller explorer les deux premières ms du courant transitoire pour expliquer la descente et la remontée du courant observées aux voltages membranaires hyperpolarisants dans quelques expériences (mutant C255A) en deux micro-électrodes et aussi prédite par le modèle (voir Figure 5.6). Un inconvénient majeur de la technique de «*cut-open*» est que la durée des expériences pouvant être effectuées est beaucoup plus courte que celle en deux micro-électrodes (souvent moins de 30 minutes pour le «*cut-open*» versus parfois plus de 2 h en deux micro-électrodes). Quoiqu'il en soit, l'évaluation faite en électrophysiologie à deux micro-électrodes est suffisamment précise pour décrire correctement le comportement prédit par le modèle.

Ce que ce modèle ne peut prédire et expliquer jusqu'à présent sont les courants stationnaires sortants et le potentiel d'inversion du courant I_{leak} . En effet, les estimations expérimentales des constantes d'affinités apparentes intracellulaires pour le Na^+ ou pour l' αMG indiquent que celles-ci sont très différentes des constantes pour les sites extracellulaires. Par conséquent, le mode inverse de transport est hautement défavorisé de par la nature des sites intracellulaires pour le Na^+ et le glucose. Par contre,

expérimentalement, une augmentation du courant sortant aux V_m positifs est souvent observée (résultats non publiés) après une application prolongée de glucose, de même qu'après une augmentation du Na^+ intracellulaire et lorsque du glucose est injecté dans les ovocytes (Charron *et al.*, 2006). Ceci suggère l'existence d'un transport d'une espèce ionique négligée dans le modèle qui pourrait expliquer l'existence des courants sortants sensibles à la Pz en présence d'un Na^+ intracellulaire bas. La nature du courant I_{leak} est aussi largement incomprise. En effet, par le passé, il a été proposé puis largement accepté que ce courant est dû aux ions Na^+ qui peuvent être transportés en absence de glucose (Mackenzie *et al.*, 1998; Loo *et al.*, 1999). Par contre, le V_{rev} de ce courant est d'environ -25 mV, tandis qu'un courant pur de Na^+ devrait s'inverser plutôt à un V_m de +60 mV. Des expériences ont montré que ce ne pouvait être des ions Cl^- entrant mais que les H^+ intracellulaires pouvaient être de bons candidats (observations non publiées de notre laboratoire).

7.4 La fluorométrie en condition de voltage imposé

Dans un premier temps, nous avons créé le mutant Q457C de SGLT1 afin de tester notre montage expérimental et de vérifier si nous pouvions reproduire les ΔF en fonction du V_m en absence et en présence d' αMG (voir section 1.4.7), tel que publié auparavant par le laboratoire de Wright avec la sonde TMR6M (Loo *et al.*, 1998; Meinild *et al.*, 2002). Nous pouvions en effet mesurer des ΔF d'environ 4-5 % en absence d' αMG et de 6-7% en présence d' αMG tel qu'illustré à la Figure 7.3. Nous n'observons bien sûr aucun changement de la fluorescence sur les ovocytes exprimant SGLT1 sauvage soumis aux mêmes conditions de marquage que le mutant Q457C. Nous avons marqué des cystéines introduites dans la boucle 13-14, en position 586, 588 et 624, mais nous n'avons pu mesurer des changements de conformation avec le TMR5M (Chapitre 3). Aucun ΔF de la sonde n'a été détecté en fonction du V_m ni en ajoutant l' αMG . Trois explications à ce résultat sont possibles : 1) les positions marquées par le fluorophore sur la protéine ne subissent aucun mouvement lorsque la protéine est en activité, 2) il n'y a pas de modification significative de leur environnement lors des changements de conformation de la protéine ou 3) les modifications de leur environnement ne modifient pas la fluorescence

de cette sonde fluorescente. Afin de confirmer ces hypothèses, nous pourrions effectuer le marquage avec d'autres sondes fluorescentes ayant des propriétés différentes. Le profil d'accessibilité pourrait être tout autre et des changements de conformation tel que déduits en mesurant des ΔF en fonction de l'activité du transporteur pourraient peut-être être détectés. Nous n'avons pas poursuivi l'étude de ces mutants avec d'autres sondes fluorescentes puisque le TMRM est la sonde fluorescente qui a eu le plus de succès par le passé pour détecter des changements de conformation dans des protéines membranaires et nous avons donc pensé que nous avons peu de chance d'en détecter avec d'autres sondes attachées à chacune de ces positions.

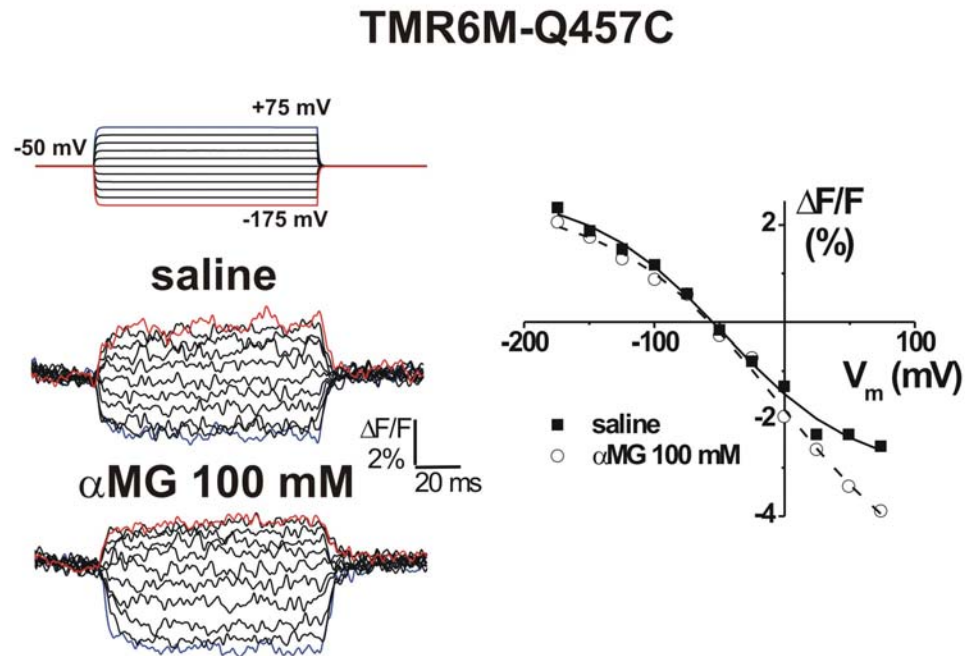


Figure 7.4 : Effet du voltage et de l' α MG sur la fluorescence du TMR6M attaché en position 457 de SGLT1, tel que mesuré avec la lampe à arc au xénon et avec un PMT.

Les mesures de fluorescence proviennent d'un ovocyte typique exprimant le mutant Q457C de SGLT1 marqué avec le TMR6M et correspondent à la moyenne de 100 mesures consécutives pour chaque saut de voltage, les données ont été filtrées («*lowpass*» Bessel 8-pole) à 200 Hz et normalisées.

Nous avons eu plus de chance avec le marquage fluorescent des positions C255 et C511. Les sondes TMR5M et TMR6M se sont révélées plus sensibles aux changements

dans l'environnement encourus dans ces positions C255 et C511 que les sondes FM et Alexa488 (Chapitre 6). Des ΔF ont pu être détectés aisément avec le TMR5M et TMR6M lorsqu'en position C511 (voir Figures 6.4, 6.5 et 6.6) tandis que seul le TMR5M s'est montré sensible en position C255 (voir Figure 6.2). L'Alexa488 et la FM ont démontré de faible ΔF en position C511 seulement (voir Figure 6.3) tandis qu'elles ne se lient pas en position C255. Le TMR6M ne peut pas davantage se lier à C255. Les effets du voltage, de la présence du Na^+ et de l' αMG ainsi que de la Pz ont été étudiés sur la fluorescence de ces sondes attachées à SGLT1. Deux éléments clés en ressortent : 1) le Na^+ n'est pas absolument essentiel pour observer un changement de conformation, 2) l' αMG affecte la sensibilité au voltage.

7.4.1 L'effet du Na^+ sur les ΔF

Nous avons en effet pu mesurer des ΔF , interprétés comme des changements de conformation de notre protéine, dans une solution où le Na^+ a été remplacé par un cation non-transporté par SGLT1, le NMDG. Ces ΔF sont particulièrement évidents avec TMR5M-C511 à tous les V_m tandis que pour le TMR5M-C255, ils ne sont observables qu'à des V_m hyperpolarisants (< -150 mV). Nous ne les détectons pas avec TMR6M-C511 ni avec Alexa488-C511. Grâce à l'électrophysiologie, nous savons que SGLT1 subit deux changements de conformation en absence de Na^+ ($C_1 \rightarrow C_2 \rightarrow C_3$) même si ces courants transitoires (avec deux constantes de temps) sont observés à des V_m nettement plus négatifs que ceux observés en présence de Na^+ (Chen *et al.*, 1996). Cette différence de sensibilité entre TMR5M-C511 et TMR5M-C255 est mise en évidence dans l'analyse que nous avons faite avec le modèle cinétique et les changements de fluorescence associés à chaque état (les Δf_i). Pour les deux situations, les Δf_1 et Δf_3 sont très similaires (Δf_1 est +1.8 dans les deux cas et Δf_3 est +1.2 et +1.0 pour TMR5M-C255 et TMR5M-C511, respectivement). La différence la plus importante se situe au niveau des Δf_2 qui passent de +1.3 à -2.5 pour dans la situation TMR5M-C255 et TMR5M-C511, respectivement. Ceci signifie que selon notre modèle, en présence de Na^+ , l'état C_2 contribue à faire augmenter la fluorescence du TMR5M (lorsqu'il est attaché à C255) de 1.3% tandis que lorsque le TMR5M est attaché à

C511, l'état C₂ donne plutôt une contribution de -2.5%, par rapport à la fluorescence moyenne enregistrée à +75 mV.

Par ailleurs, en présence de Na⁺, la forme des courbes de $\Delta F-V_m$ est sigmoïde pour TMR5M-C255 et pour TMR6M-C511 et leur $V_{1/2}$ est de -36 mV et -21 mV, respectivement. La sensibilité au voltage est bien corrélée avec les charges transférées dans les courants transitoires qui ont, pour les deux mutants, un $V_{1/2}$ d'environ -30 mV dans les mêmes conditions.

7.4.2 Modification de la sensibilité au V_m par l' α MG : cas du TMR5M-C511

La présence d' α MG a modifié la sensibilité au V_m des sondes TMR5M attachée sur C255 et C511 et TMR6M attachée sur C511. L' α MG a déplacé vers un V_m plus positif le point d'inflexion de la courbe $\Delta F-V_m$, d'environ +20 mV dans les deux premiers cas et de plus de +75 mV dans le dernier cas, alors que 5 mM d' α MG fait déplacer le point d'inflexion ($V_{1/2}$) des courbes Q-V des mutants par environ +40 mV tel que mesuré par l'électrophysiologie. L' α MG augmente aussi l'amplitude de la courbe $\Delta F-V_m$ dans deux cas (TMR5M-C255 et TMR5M-C511) tandis qu'il la réduit dans le cas de TMR6M-C511. Cet effet sur l'amplitude de la courbe ne peut être dû à un effet de photo-extinction direct par l' α MG puisque nous savons que l' α MG n'a aucun effet sur la fluorescence de nos sondes (Gagnon *et al.*, 2005) mais est plutôt dû à l'effet des conformations adoptées par la protéine sur la sonde et à la sensibilité des sondes dans ces différentes conformations.

L' α MG a aussi eu une influence sur la constante de temps de fluorescence (τ_F) mesurée sur TMR5M-C511. Celle-ci est de l'ordre de 5-10 ms pour tous les V_m en absence d' α MG tandis qu'elle est d'environ 35 ms (aux V_m positifs) en sa présence et elle devient alors fortement dépendante du V_m atteignant une valeur de 7 ms aux V_m négatifs. Nous avons aussi observé un ralentissement des courants transitoires avec l' α MG dans ces mutants (Gagnon *et al.*, 2006bb). L'origine de la différence entre les τ_F et les constantes de temps des courants transitoires est difficile à cerner et a déjà été observée pour SGLT1,

NaPi-IIb et dans le transporteur de glutamate (Meinild *et al.*, 2002; Diez-Sampedro *et al.*, 2004; Larsson *et al.*, 2004; Virkki *et al.*, 2005). Se pourrait-il qu'un lent changement de conformation qui ne soit pas impliqué dans le cycle de transport, qu'il soit détectable ou non en électrophysiologie, soit nécessaire pour l'expliquer? Si ce changement de conformation était nécessaire au mécanisme de transport, il ralentirait probablement les effets électrophysiologiques observés ainsi que le «turnover». Par contre, cette possibilité ne peut pas être exclue. Une autre interprétation serait que des changements de conformation rapides (5-6 ms) de la protéine pourraient produire des changements lents (35-40 ms) dans l'environnement des sondes fluorescentes. Il pourrait exister, quoi que ce soit peu probable, dans certaines situations, un délai dans la réponse temporelle du signal fluorescent par rapport au mouvement de la protéine. Cela impliquerait l'existence d'un mouvement lent de la sonde fluorescente et/ou que celle-ci soit grandement contrainte dans ses mouvements lorsqu'elle est située à cette position. Des mesures d'anisotropie du TMR5M, qui reflèteraient l'influence de l'environnement sur le degré de liberté dans le mouvement de la sonde, pourraient nous aider à résoudre cette ambiguïté (Cha et Bezanilla, 1998). D'un autre côté, les valeurs stationnaires des ΔF mesurés sont complètement compatibles avec le modèle cinétique tiré des mesures électrophysiologiques. Nous croyons donc que les changements de fluorescence reflètent adéquatement les différentes conformations adoptées par le cotransporteur. Il ne faut pas oublier que la sonde ne détecte pas directement les changements de conformation mais les effets des changements de conformation sur l'environnement de la sonde. Afin d'aller plus loin dans l'analyse des changements de conformation de SGLT1, des mesures de FRET entre le TMR5M attaché à cette position et un agent photoextincteur, par exemple, dans les environs pourraient être effectuées (Cha *et al.*, 1999; Glauner *et al.*, 1999).

7.4.3 Modèle de fluorescence

Les valeurs des paramètres Δf_1 , Δf_2 et Δf_3 ont d'abord été établies pour expliquer le ΔF - V_m en absence de Na^+ . Dans ces conditions, C_1 domine aux V_m positifs et C_3 domine aux V_m négatifs. Ces deux caractéristiques ont fourni de fortes contraintes sur les valeurs de Δf_i pouvant être utilisées. Ces valeurs ont ensuite été maintenues fixes pour la

détermination de la valeur de Δf_4 pouvant expliquer les ΔF - V_m en présence de Na^+ . Finalement, la valeur de Δf_5 a pu être établie pour les données en présence d' αMG . Avec ce modèle, nous avons pu reproduire assez fidèlement les différentes courbes de ΔF - V_m pour le TMR5M attaché aux deux positions et pour le TMR6M attaché en position C511. Il ne s'agissait pas d'un exercice trivial puisque toutes les valeurs de C_i pour différents V_m et pour différentes situations expérimentales étaient imposées par le modèle électrophysiologique. Si le modèle n'avait pas été adéquat, il aurait pu facilement mener à une impasse où, par exemple, les valeurs de Δf_1 , Δf_2 et Δf_3 trouvées en absence d' αMG n'auraient pas été compatibles avec les changements de fluorescence mesurées en présence d' αMG .

Nous avons trouvé que les valeurs de Δf_1 sont similaires dans tous les cas (variant de 1.5 à 1.8). La valeur de Δf_2 est par contre positive pour TMR5M-C255 et TMR6M-C511 (1.3 pour TMR5M-C255 et 0.5 pour TMR6M-C511) mais négative pour TMR5M-C511 (-2.5). Dans le cas de TMR5M-C511, en absence de Na^+ , on observe une augmentation de la fluorescence aux V_m négatifs. Dans notre modèle, le signe du paramètre Δf_2 est important pour reproduire cette observation. Par ailleurs, celle de Δf_3 est presque la même pour la sonde TMR5M, pour les deux mutants mais son signe a dû être modifié dans le cas TMR6M-C511. Cela était nécessaire pour expliquer la réduction de l'amplitude de ΔF en présence d' αMG versus celle observée en absence d' αMG . Le paramètre Δf_3 exerce aussi une forte influence sur le V_m auquel la moitié de l'amplitude totale de ΔF maximale est observé.

Enfin, Δf_4 et Δf_5 sont les paramètres les plus importants pour expliquer les résultats en présence de Na^+ et d' αMG . Pour nos deux mutants, l'état $C_4(2\text{Na}^+)$ domine aux faibles concentrations d' αMG tandis qu'aux hautes concentrations, c'est l'état $C_5(2\text{Na}^+\text{S})$ qui domine (Chapitre 6). Les valeurs Δf_5 pour TMR5M-C255 et TMR5M-C511 est négative et plus grande que celle de Δf_4 . Dans le cas de TMR5M-C255, Δf_4 et Δf_5 prennent des valeurs de 0 et -0.9 tandis que pour TMR5M-C511, elles étaient de -1.1 et -16.5. Cela explique l'augmentation de l'amplitude du ΔF chez TMR5M-C511 lorsque l' αMG est ajouté. Le contraire est observé pour TMR6M-C511, la valeur de Δf_5 (-3.6) était légèrement plus

faible que celle de Δf_4 (-4), ce qui explique la diminution du ΔF maximal observé avec l' α MG versus en son absence. D'après le comportement du TMR en solution dans des milieux de polarité différente, nous pouvons spéculer que la liaison de l' α MG engendre un changement de conformation (détecté par une diminution de la fluorescence) qui augmente la polarité de l'environnement immédiat de la sonde TMR5M lorsqu'elle est attachée en position C511 (Mannuzzu *et al.*, 1996). Cette hypothèse pourrait être évaluée en effectuant des mesures de photoblanchiment de la sonde TMR5M attachée sur C255 ou sur C511 par l'iode en présence et en absence de substrat. L'iode est un anion utilisé comme photoextincteur collisionnel du TMR5M et doit être utilisé en remplaçant les ions Cl^- déjà présents dans la solution. Une étude complète de l'effet de l'iode sur la fluorescence du TMR5M en condition de voltage imposé nécessiterait aussi l'étude de l'effet de l'iode sur les courants transitoires de notre mutant, et donc, de l'effet du Cl^- sur ceux-ci, ainsi que dans la protéine sauvage. Des résultats préliminaires ont démontré que l'iode a un effet photoextincteur sur la fluorescence du TMR5M lorsqu'attaché sur C511 et ce, aux voltages positifs principalement et que l'iode affecte les courants transitoires du mutant C255A en absence et en présence d' α MG. Ces résultats ouvrent la voie à d'intéressantes découvertes et devront être analysés avec plus de détails.

Notre modèle explique très bien les mesures de $\Delta F-V_m$ stationnaires mesurées pour deux sondes attachées à C511 et une sonde attachée à C255. Les contraintes sur les paramètres selon les conditions expérimentales ont rapidement indiqué les valeurs idéales des différents Δf_i . Ce modèle de fluorescence qui reproduit des résultats obtenus avec une méthode totalement indépendante à l'observation des courants transitoires, valide le modèle cinétique proposé qui a été bâti sur des mesures électrophysiologiques. Évidemment, on pourrait rêver d'un modèle qui pourrait expliquer à la fois les courants transitoires et stationnaires et les mesures de changements de fluorescence transitoires et stationnaires. Jusqu'à présent, aucun modèle comme tel n'a été développé pour expliquer la cinétique d'une protéine membranaire étudiée en électrophysiologie et en fluorométrie en condition de voltage imposé.

7.4.4 Améliorations de la technique de fluorométrie en condition de voltage imposé

Certaines modifications pourraient être apportées au montage actuel de fluorométrie en condition de voltage imposé afin d'améliorer le ratio signal sur bruit dans la mesure de fluorescence. Par exemple, les filtres d'excitation et d'émission utilisés pourraient couvrir une plus large bande spectrale. Initialement, nous avons opté pour des filtres à bande étroite (10 nm) afin de réduire le recouvrement entre les signaux mesurés pour les deux sondes pour d'éventuelles mesures de FRET mais cela n'est pas essentiel pour la mesure d'une seule sonde fluorescente à la fois. Nous pourrions aussi penser à nous munir d'un générateur stabilisé, à fort ampérage, pour pouvoir utiliser une lampe halogène ayant une puissance beaucoup plus élevée (certains laboratoires utilisent des lampes ayant une puissance de 100 à 150 W (Cha et Bezanilla, 1997; Meinild *et al.*, 2002; Virkki *et al.*, 2006)). Cela serait évidemment au détriment de la durée de vie de la sonde fluorescente et donc de la durée d'une expérience sur un même ovocyte puisque le photoblanchiment serait plus rapide. De plus, l'amplification du signal provenant de la photodiode pourrait peut-être être améliorée si le signal était mesuré par un amplificateur de «*patch-clamp*». La détection du signal provenant de la sonde Alexa488 ou FM aurait grandement intérêt à être améliorée puisqu'actuellement, le signal spécifique n'est d'au plus que deux fois plus grand que le signal non spécifique. En effet, l'autofluorescence des ovocytes se situe dans la région de la fluorescence ces sondes, ce qui nuit à la détection du signal spécifique. Peu de positions se sont révélées facilement accessibles à ces sondes ce qui limite la possibilité de faire du FRET avec le TMRM.

Afin de combiner des mesures électrophysiologiques avec une résolution temporelle plus élevée et des mesures de fluorescence plus précises, nous pourrions développer un montage de fluorométrie en condition de voltage imposé pour le «*cut-open*» ovocyte (Chanda *et al.*, 2004). Cela nécessiterait l'utilisation d'un microscope à fluorescence droit et non d'un microscope inversé tel que celui nous utilisons actuellement. Ce microscope devrait être muni d'un objectif à immersion dans l'eau à faible distance de travail et à haute ouverture numérique (>1), ce qui pourrait réduire la perte de signal fluorescent par rapport à l'utilisation d'un objectif à immersion dans l'huile.

Conclusion et perspectives

Conclusions

Les travaux effectués durant ce doctorat ont porté principalement sur la structure et la fonction du cotransporteur de Na⁺/glucose SGLT1, grâce aux techniques de mutagenèse dirigée, d'électrophysiologie à deux micro-électrodes et de fluorométrie en condition de voltage imposé.

La grande boucle hydrophile entre les segments transmembranaires 13 et 14 s'est montrée largement accessible du milieu extracellulaire à des composés MTS et à quelques endroits à une sonde fluorescente (TMR5M). Nous lui avons proposé une nouvelle topologie de boucle ré-entrante et avons émis l'hypothèse qu'elle puisse constituer en partie le «senseur de voltage» de SGLT1, une structure importante pour la réorientation des sites de liaison aux ions Na⁺ lors d'un changement de voltage membranaire.

Douze des 15 cystéines endogènes de SGLT1 jouent un rôle dans la structure et/ou la fonction de SGLT1, dont, pour plusieurs d'entre elles, le maintien de la position d'équilibre du «senseur de voltage». Les C255 et C511, qui sont conservées parmi les différents isoformes de SGLT1, SGLT2, SGLT3, SMIT1 et SMIT2, forment un pont disulfure dans SGLT1, qui est responsable de l'effet du DTT sur la fonction de la protéine SGLT1 humaine sauvage. Ce pont disulfure rapproche donc les segments transmembranaires VI et VII des segments transmembranaires XI, XII et XII et cela constitue la première contrainte physique connue dans la structure 3D de SGLT1. Il joue aussi plusieurs rôles dans la fonction de SGLT1, notamment dans le changement de conformation du transporteur vide, dans celui du transporteur lié au Na⁺ et au glucose ainsi que dans la liaison et la dissociation du substrat. Le changement de conformation du transporteur vide est l'étape limitante dans le cycle de transport de SGLT1 sauvage avec et sans son substrat. En contrepartie, lorsque le pont disulfure est absent (dans les mutants C255A et C511A), l'étape limitante en présence de substrat est le changement de conformation du transporteur lié au Na⁺ et au substrat.

Ce pont disulfure est localisé de façon telle que des sondes fluorescentes nous rapportent des changements dans leur environnement lorsqu'elles sont attachées à l'une ou l'autre des cystéines du pont disulfure. La liaison du substrat modifie probablement la polarité de l'environnement local près du pont disulfure.

Perspectives

Plusieurs projets dont certains sont déjà en cours dans le laboratoire de mon directeur de recherche, découlent directement de ma thèse de doctorat. Il serait intéressant d'étudier la topologie du segment transmembranaire 14 à l'aide du SCAM, de poursuivre l'étude concernant le rôle des cystéines C292 et C610 dans le couplage entre la liaison du Na^+ et du glucose et de déterminer le rôle de la boucle extracellulaire 4 ainsi que du segment transmembranaire VII où se situent les C255 et C292, respectivement. De plus, la poursuite du SCAM inverse des cystéines endogènes de SGLT1 pourrait se révéler très intéressante et ouvrir la voie à de nouvelles découvertes, par exemple celle d'un autre pont disulfure, qu'il ait ou non un rôle fonctionnel. L'identification de la nature ionique exacte du courant I_{leak} reste également une question fondamentale à la compréhension de la fonction de SGLT1.

Deux questions fondamentales à la compréhension de la relation entre la structure et la fonction de SGLT1 se posent : quel sont les résidus formant les sites de liaison pour les deux ions Na^+ ? Quelle est l'origine moléculaire des courants transitoires? Il existe deux possibilités quant à leur identité: 1) les résidus qui composent les sites de liaison aux ions Na^+ sont directement responsables des courants transitoires et 2) une structure donnée engendre un changement de conformation des hélices qui forment les sites de liaison aux ions Na^+ . Sans aucun doute, ces deux questions sont intimement reliées et y répondre nous permettrait de confirmer ou d'infirmer les implications mécanistiques du modèle cinétique proposé. Par exemple, certaines mesures obtenues par le laboratoire de Wright vont à l'encontre de ce que prédit le modèle. Nous pouvons remettre en doute les mesures expérimentales ou le modèle actuel. En effet, le modèle cinétique actuel suppose que les changements de conformation qui dépendent du voltage membranaire soient directement inclus dans le cycle de transport et que l'étape la plus lente soit d'environ 100 s^{-1} . Cela est en contradiction avec des étapes lentes ayant des constantes de temps de plus de 35 ms par exemple. Serait-il possible que ce type de modèle ne soit pas approprié et que d'autres avenues doivent être envisagées?

Pour résoudre ces deux problèmes, des études de mutagenèse et de caractérisation fonctionnelle de mutants sont sûrement encore nécessaires. Différentes astuces expérimentales utilisant les sondes fluorescentes pourraient grandement nous aider à résoudre ces questions. Notamment, le mouvement des résidus de la boucle 13-14 marqués par le TMR5M pourrait être évalué en effectuant des mesures de FRET entre un agent photoextincteur (DPA) dont la localisation dans la membrane plasmique dépend du voltage membranaire (Chanda *et al.*, 2005). De la même façon, le mouvement de C255 et C511 pourraient aussi être analysés en fonction du voltage membranaire, des conditions ioniques et des ligands.

Bibliographie

- Abramson, J., S. Iwata, et H.R. Kaback. 2004. Lactose permease as a paradigm for membrane transport proteins (Review). *Mol Membr Biol.* 21:227-236.
- Abramson, J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H.R. Kaback, et S. Iwata. 2003. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science.* 301:610-615.
- Accardi, A., L. Kolmakova-Partensky, C. Williams, et C. Miller. 2004. Ionic currents mediated by a prokaryotic homologue of CLC Cl⁻ channels. *J Gen Physiol.* 123:109-119.
- Accardi, A., et C. Miller. 2004. Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CLC Cl⁻ channels. *Nature.* 427:803-807.
- Accardi, A., M. Walden, W. Nguitragool, H. Jayaram, C. Williams, et C. Miller. 2005. Separate ion pathways in a Cl⁻/H⁺ exchanger. *J Gen Physiol.* 126:563-570.
- Aggarwal, S.K., et R. MacKinnon. 1996. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron.* 16:1169-1177.
- Agre, P., et D. Kozono. 2003. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett.* 555:72-78.
- Ahern, C.A., et R. Horn. 2004. Stirring up controversy with a voltage sensor paddle. *Trends Neurosci.* 27:303-307.
- Akabas, M.H., D.A. Stauffer, M. Xu, et A. Karlin. 1992. Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science.* 258:307-310.
- Allen, T.W., O.S. Andersen, et B. Roux. 2004. Energetics of ion conduction through the gramicidin channel. *PNAS.* 101:117-122.
- Arinaminpathy, Y., P.C. Biggin, I.H. Shrivastava, et M.S.P. Sansom. 2003. A prokaryotic glutamate receptor: homology modelling and molecular dynamics simulations of GluR0. 553:321.
- Armstrong, C.M., et F. Bezanilla. 1973. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature.* 242:459-461.
- Artigas, P., et D.C. Gadsby. 2002. Ion channel-like properties of the Na⁺/K⁺ Pump. *Ann N Y Acad Sci.* 976:31-40.

- Artigas, P., et D.C. Gadsby. 2003. Na⁺/K⁺-pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:501-505.
- Baker, O.S., H.P. Larsson, L.M. Mannuzzu, et E.Y. Isacoff. 1998. Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in shaker K⁺ channel gating. *Neuron*. 20:1283-1294.
- Bao, X., Y. Chen, L. Reuss, et G.A. Altenberg. 2004. Functional expression in *Xenopus* oocytes of gap-junctional hemichannels formed by a cysteine-less connexin 43. *J Biol Chem*. 279:9689-9692.
- Berneche, S., et B. Roux. 2001. Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *Nature*. 414:73-77.
- Berteloot, A. 2003. Kinetic mechanism of Na⁺ -glucose cotransport through the rabbit intestinal SGLT1 protein. *J Membr Biol*. 192:89-100.
- Beuming, T., L. Shi, J.A. Javitch, et H. Weinstein. 2006. A comprehensive structure-based alignment of prokaryotic and eukaryotic neurotransmitter/Na⁺ symporters (NSS) aids in the use of the LeuT structure to probe NSS structure and function. *Mol Pharmacol*. *In press*.
- Bezanilla, F. 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev*. 80:555-592.
- Bissonnette, P., J. Noel, M.J. Coady, et J.Y. Lapointe. 1999. Functional expression of tagged human Na⁺-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol*. 520 Pt 2:359-371.
- Blunck, R., J.F. Cordero-Morales, L.G. Cuello, E. Perozo, et F. Bezanilla. 2006. Detection of the opening of the bundle crossing in KcsA with fluorescence lifetime spectroscopy reveals the existence of two gates for ion conduction. *J Gen Physiol*, *In press*.
- Boland, L.M., M.E. Jurman, et G. Yellen. 1994. Cysteines in the Shaker K⁺ channel are not essential for channel activity or zinc modulation. *Biophys J*. 66:694-699.
- Boorer, K.J., D.D. Loo, et E.M. Wright. 1994. Steady-state and presteady-state kinetics of the H⁺/hexose cotransporter (STP1) from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*. 269:20417-20424.
- Bossi, E., E. Centinaio, M. Castagna, S. Giovannardi, S. Vincenti, V.F. Sacchi, et A. Peres. 1999. Ion binding and permeation through the lepidopteran amino acid transporter KAAT1 expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*. 515 (Pt 3):729-742.
- Brown, G.K. 2000. Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 23:237-246.

- Calado, J., J. Loeffler, O. Sakallioğlu, F. Gok, K. Lhotta, J. Barata, et J. Rueff. 2006. Familial renal glucosuria: SLC5A2 mutation analysis and evidence of salt-wasting. *Kidney Int.* 69:852-855.
- Calado, J., K. Soto, C. Clemente, P. Correia, et J. Rueff. 2004. Novel compound heterozygous mutations in SLC5A2 are responsible for autosomal recessive renal glucosuria. *Hum Genet.* 114:314-316.
- Cha, A., et F. Bezanilla. 1997. Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K⁺ channel with fluorescence. *Neuron.* 19:1127-1140.
- Cha, A., et F. Bezanilla. 1998. Structural implications of fluorescence quenching in the Shaker K⁺ channel. *J Gen Physiol.* 112:391-408.
- Cha, A., G.E. Snyder, P.R. Selvin, et F. Bezanilla. 1999. Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature.* 402:809-813.
- Chakrabarti, N., B. Roux, et R. Pomes. 2004. Structural determinants of proton blockage in aquaporins. *J Mol Biol.* 343:493-510.
- Chanda, B., O.K. Asamoah, et F. Bezanilla. 2004. Coupling interactions between voltage sensors of the sodium channel as revealed by site-specific measurements. *J Gen Physiol.* 123:217-230.
- Chanda, B., O.K. Asamoah, R. Blunck, B. Roux, et F. Bezanilla. 2005. Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature.* 436:852-856.
- Charron, F.M., M.G. Blanchard, et J.Y. Lapointe. 2006. Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with Na⁺/glucose cotransport. *Biophys J.* 90:3546-3554.
- Chen, J.G., S. Liu-Chen, et G. Rudnick. 1997a. External cysteine residues in the serotonin transporter. *Biochemistry.* 36:1479-1486.
- Chen, X.Z., M.J. Coady, F. Jackson, A. Berteloot, et J.Y. Lapointe. 1995. Thermodynamic determination of the Na⁺: glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. *Biophys J.* 69:2405-2414.
- Chen, X.Z., M.J. Coady, F. Jalal, B. Wallendorff, et J.Y. Lapointe. 1997b. Sodium leak pathway and substrate binding order in the Na⁺-glucose cotransporter. *Biophys J.* 73:2503-2510.

- Chen, X.Z., M.J. Coady, et J.Y. Lapointe. 1996. Fast voltage clamp discloses a new component of presteady-state currents from the Na(+)-glucose cotransporter. *Biophys J.* 71:2544-2552.
- Cleland, W.W. 1964. Dithiothreitol, A New Protective Reagent For Sh Groups. *Biochemistry.* 35:480-482.
- Coady, M.J., M.H. Chang, F.M. Charron, C. Plata, B. Wallendorff, J.F. Sah, S.D. Markowitz, M.F. Romero, et J.Y. Lapointe. 2004. The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na⁺-monocarboxylate cotransporter. *J Physiol.* 557:719-731.
- Coady, M.J., A.M. Pajor, et E.M. Wright. 1990. Sequence homologies among intestinal and renal Na⁺/glucose cotransporters. *Am J Physiol.* 259:C605-610.
- Coady, M.J., B. Wallendorff, D.G. Gagnon, et J.Y. Lapointe. 2002. Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter. *J Biol Chem.* 277:35219-35224.
- Cordero-Morales, J.F., L.G. Cuello, et E. Perozo. 2006a. Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter. *Nat Struct Mol Biol.* 13:319-322.
- Cordero-Morales, J.F., L.G. Cuello, Y. Zhao, V. Jogini, D.M. Cortes, B. Roux, et E. Perozo. 2006b. Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat Struct Mol Biol.* 13:311-318.
- Crane, R.K. 1965. Na⁺ -dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Fed Proc.* 24:1000-1006.
- Crane, R.K., P. Malathi, et H. Preiser. 1976. Reconstitution of specific Na-dependent D-glucose transport in liposomes by Triton X-100 extracted proteins from purified brush border membranes of hamster small intestine. *Biochem Biophys Res Commun.* 71:1010-1016.
- Diedrich, D.F. 1961. Comparison of effects of phlorizin and phloretin 2'-galactoside on the renal tubular reabsorption of glucose in dog. *Biochim Biophys Acta.* 47:618-620.
- Diez-Sampedro, A., S. Eskandari, E.M. Wright, et B.A. Hirayama. 2001. Na⁺-to-sugar stoichiometry of SGLT3. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280:F278-282.
- Diez-Sampedro, A., D.D. Loo, E.M. Wright, G.A. Zampighi, et B.A. Hirayama. 2004. Coupled sodium/glucose cotransport by SGLT1 requires a negative charge at position 454. *Biochemistry.* 43:13175-13184.
- Dodier, Y., U. Banderali, H. Klein, O. Topalak, O. Dafi, M. Simoes, G. Bernatchez, R. Sauve, et L. Parent. 2004. Outer pore topology of the ECaC-TRPV5 channel by cysteine scan mutagenesis. *J Biol Chem.* 279:6853-6862.

- Doyle, D.A., J. Morais Cabral, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, et R. MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. 280:69-77.
- Ducis, I., et H. Koepsell. 1983. A simple liposomal system to reconstitute and assay highly efficient Na⁺/D-glucose cotransport from kidney brush-border membranes. *Biochim Biophys Acta*. 730:119-129.
- Duquette, P.P., P. Bissonnette, et J.Y. Lapointe. 2001. Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na⁽⁺⁾/glucose cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:3796-3801.
- Dutzler, R., E.B. Campbell, M. Cadene, B.T. Chait, et R. MacKinnon. 2002. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*. 415:287-294.
- Dutzler, R., E.B. Campbell, et R. MacKinnon. 2003. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science*. 300:108-112.
- Ehnes, C., I.C. Forster, K. Kohler, A. Bacconi, G. Stange, J. Biber, et H. Murer. 2004a. Structure-Function Relations of the First and Fourth Predicted Extracellular Linkers of the Type IIa Na⁺/Pi Cotransporter: I. Cysteine Scanning Mutagenesis. *J. Gen. Physiol.* 124:475-488.
- Ehnes, C., I.C. Forster, K. Kohler, A. Bacconi, G. Stange, J. Biber, et H. Murer. 2004b. Structure-Function Relations of the First and Fourth Predicted Extracellular Linkers of the Type IIa Na⁺/Pi Cotransporter: I. Cysteine Scanning Mutagenesis. *J Gen Physiol*. 124:475-488.
- Eisenman, G. 1975. Lipid bilayers and biological membranes: Dynamic properties, In *Membranes*.
- Eskandari, S., D.D. Loo, G. Dai, O. Levy, E.M. Wright, et N. Carrasco. 1997. Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem*. 272:27230-27238.
- Eskandari, S., E.M. Wright, et D.D. Loo. 2005. Kinetics of the reverse mode of the Na⁺/glucose cotransporter. *J Membr Biol*. 204:23-32.
- Fabiato, A., et F. Fabiato. 1979. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J Physiol (Paris)*. 75:463-505.

- Falk, S., A. Guay, C. Chenu, S.D. Patil, et A. Berteloot. 1998. Reduction of an eight-state mechanism of cotransport to a six-state model using a new computer program. *Biophys J.* 74:816-830.
- Falk, S., N. Oulianova, et A. Berteloot. 1999. Kinetic mechanisms of inhibitor binding: relevance to the fast-acting slow-binding paradigm. *Biophys J.* 77:173-188.
- Fesce, R., S. Giovannardi, F. Binda, E. Bossi, et A. Peres. 2002. The relation between charge movement and transport-associated currents in the rat GABA cotransporter rGAT1. *J Physiol.* 545:739-750.
- Fisher, C.L., et G.K. Pei. 1997. Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method. *Biotechniques.* 23:570-571, 574.
- Forster, I., N. Hernando, J. Biber, et H. Murer. 1998. The voltage dependence of a cloned mammalian renal type II Na⁺/Pi cotransporter (NaPi-2). *J Gen Physiol.* 112:1-18.
- Foster, D.L., M. Boublik, et H.R. Kaback. 1983. Structure of the lac carrier protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 258:31-34.
- Francis, J., J. Zhang, A. Farhi, H. Carey, et D.S. Geller. 2004. A novel SGLT2 mutation in a patient with autosomal recessive renal glucosuria. *Nephrol Dial Transplant.* 19:2893-2895.
- Gadsby, D.C. 2004. Ion transport: spot the difference. *Nature.* 427:795-797.
- Gagnon, D.G., P. Bissonnette, et J.Y. Lapointe. 2006a. Identification of a disulfide bridge linking the fourth and the seventh extracellular loops of the Na⁺/glucose cotransporter. *J Gen Physiol.* 127:145-158.
- Gagnon, D.G., C. Frindel, et J.-Y. Lapointe. 2006b. Effect of substrate on the presteady state kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Biophys J.* Sous presse.
- Gagnon, D.G., A. Holt, F. Bourgeois, B. Wallendorff, M.J. Coady, et J.Y. Lapointe. 2005. Membrane topology of loop 13-14 of the Na⁽⁺⁾/glucose cotransporter (SGLT1): A SCAM and fluorescent labelling study. *Biochim Biophys Acta.* 1712:173-184.
- Gagnon, M.P., P. Bissonnette, L.M. Deslandes, B. Wallendorff, et J.Y. Lapointe. 2004. Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by Na⁺/glucose cotransport. *Biophys J.* 86:125-133.
- Gibbs, E.M., M. Hosang, B.F. Reber, G. Semenza, et D.F. Diedrich. 1982. 4-Azidophlorizin, a high affinity probe and photoaffinity label for the glucose transporter in brush border membranes. *Biochim Biophys Acta.* 688:547-556.

- Giraldez, A., et J. Larralde. 1960. [Phlorhizin inhibition in the absorption of monosaccharides by the cat intestine.]. *Rev Esp Fisiol*. 16:79-89.
- Glauner, K.S., L.M. Mannuzzu, C.S. Gandhi, et E.Y. Isacoff. 1999. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature*. 402:813-817.
- Gouaux, E., et R. Mackinnon. 2005. Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science*. 310:1461-1465.
- Hager, K., A. Hazama, H.M. Kwon, D.D. Loo, J.S. Handler, et E.M. Wright. 1995. Kinetics and specificity of the renal Na⁺/myo-inositol cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol*. 143:103-113.
- Hazama, A., D.D. Loo, et E.M. Wright. 1997. Presteady-state currents of the rabbit Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1). *J Membr Biol*. 155:175-186.
- Hediger, M.A., M.J. Coady, T.S. Ikeda, et E.M. Wright. 1987. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature*. 330:379-381.
- Hediger, M.A., J. Mendlein, H.S. Lee, et E.M. Wright. 1991. Biosynthesis of the cloned intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Biochim Biophys Acta*. 1064:360-364.
- Heringa, J. 1999. Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput Chem*. 23:341-364.
- Hille, B. 2001. Ion channels of excitable membranes. 3rd edition. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA 814 pp.
- Hirayama, B.A., D.D. Loo, et E.M. Wright. 1997. Cation effects on protein conformation and transport in the Na⁺/glucose cotransporter. *J Biol Chem*. 272:2110-2115.
- Hirayama, B.A., M.P. Lostao, M. Panayotova-Heiermann, D.D. Loo, E. Turk, et E.M. Wright. 1996. Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na⁺-glucose cotransporters (SGLT-1). *Am J Physiol*. 270:G919-926.
- Hirayama, B.A., et E.M. Wright. 1992. Glycosylation of the rabbit intestinal brush border Na⁺/glucose cotransporter. *Biochim Biophys Acta*. 1103:37-44.
- Hodgkin, A.L., et A.F. Huxley. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*. 117:500-544.
- Hogg, R.C., B. Buisson, et D. Bertrand. 2005. Allosteric modulation of ligand-gated ion channels. *Biochem Pharmacol*. 70:1267-1276.
- Holmgren, M., Y. Liu, Y. Xu, et G. Yellen. 1996. On the use of thiol-modifying agents to determine channel topology. *Neuropharmacology*. 35:797-804.

- Horisberger, J.D. 2004. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda)*. 19:377-387.
- Hosang, M., E.M. Gibbs, D.F. Diedrich, et G. Semenza. 1981. Photoaffinity labeling and identification of (a component of) the small-intestinal Na⁺,D-glucose transporter using 4-azidophlorizin. *FEBS Lett.* 130:244-248.
- Hu, Y.K., J.F. Eisses, et J.H. Kaplan. 2000. Expression of an active Na,K-ATPase with an alpha-subunit lacking all twenty-three native cysteine residues. *J Biol Chem.* 275:30734-30739.
- Huang, Y., M.J. Lemieux, J. Song, M. Auer, et D.N. Wang. 2003. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science*. 301:616-620.
- Hunte, C., E. Screpanti, M. Venturi, A. Rimon, E. Padan, et H. Michel. 2005. Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature*. 435:1197-1202.
- Huntley, S.A., D. Krofchick, et M. Silverman. 2004. Position 170 of Rabbit Na⁺/Glucose Cotransporter (rSGLT1) Lies in the Na⁺ Pathway; Modulation of Polarity/Charge at this Site Regulates Charge Transfer and Carrier Turnover. *Biophys J.* 87:295-310.
- Jaisser, F., P. Jaunin, K. Geering, B.C. Rossier, et J.D. Horisberger. 1994. Modulation of the Na,K-pump function by beta subunit isoforms. *J Gen Physiol.* 103:605-623.
- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B.T. Chait, et R. MacKinnon. 2002a. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*. 417:515-522.
- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B.T. Chait, et R. MacKinnon. 2002b. The open pore conformation of potassium channels. *Nature*. 417:523-526.
- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B.T. Chait, et R. MacKinnon. 2003. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*. 423:33-41.
- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B.T. Chait, et R. MacKinnon. 2003a. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*. 423:33-41.
- Jiang, Y., V. Ruta, J. Chen, A. Lee, et R. MacKinnon. 2003b. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*. 423:42-48.
- Jung, S., M.H. Akabas, et R.A. Harris. 2004. Functional and structural analysis of the GABAA receptor $\alpha 1$ subunit during channel gating and alcohol modulation. *J Biol Chem*.

- Kaback, H.R., M. Sahin-Toth, et A.B. Weinglass. 2001. The kamikaze approach to membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:610-620.
- Kanai, Y., et M.A. Hediger. 2004. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* 447:469-479.
- Karlin, A., et M.H. Akabas. 1998. Substituted-cysteine accessibility method. *Methods Enzymol.* 293:123-145.
- Keramidas, A., A.J. Moorhouse, P.R. Schofield, et P.H. Barry. 2004. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog Biophys Mol Biol.* 86:161-204.
- Kessler, M., O. Acuto, C. Storelli, H. Murer, M. Muller, et G. Semenza. 1978. A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport systems. *Biochim Biophys Acta.* 506:136-154.
- Kessler, M., et G. Semenza. 1983. The small-intestinal Na⁺, D-glucose cotransporter: an asymmetric gated channel (or pore) responsive to delta psi. *J Membr Biol.* 76:27-56.
- Kleta, R., C. Stuart, F.A. Gill, et W.A. Gahl. 2004. Renal glucosuria due to SGLT2 mutations. *Mol Genet Metab.* 82:56-58.
- Klip, A., S. Grinstein, J. Biber, et G. Semenza. 1980. Interaction of the sugar carrier of intestinal brush-border membranes with HgCl₂. *Biochim Biophys Acta.* 598:100-114.
- Klip, A., S. Grinstein, et G. Semenza. 1979. Distribution of sulfhydryl groups in intestinal brush border membranes. Localization of side-chains essential for glucose transport and phlorizin binding. *Biochim Biophys Acta.* 558:233-245.
- Kohler, K., I.C. Forster, G. Stange, J. Biber, et H. Murer. 2003. Essential cysteine residues of the type IIa Na⁺/Pi cotransporter. *Pflugers Arch.* 446:203-210.
- Krofchick, D., S.A. Huntley, et M. Silverman. 2004. Transition states of the high-affinity rabbit Na⁽⁺⁾/glucose cotransporter SGLT1 as determined from measurement and analysis of voltage-dependent charge movements. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287:C46-54.
- Krofchick, D., et M. Silverman. 2003. Investigating the conformational states of the rabbit Na⁺/glucose cotransporter. *Biophys J.* 84:3690-3702.

- Kuo, A., J.M. Gulbis, J.F. Antcliff, T. Rahman, E.D. Lowe, J. Zimmer, J. Cuthbertson, F.M. Ashcroft, T. Ezaki, et D.A. Doyle. 2003. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science*. 300:1922-1926.
- Kuwabara, N., H. Inoue, Y. Tsuboi, N. Nakamura, et H. Kanazawa. 2004. The fourth transmembrane domain of the *Helicobacter pylori* Na⁺/H⁺ antiporter NhaA faces a water-filled channel required for ion transport. *J Biol Chem*. 279:40567-40575.
- Kyte, J., et R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. 157:105-132.
- Laine, M., M.C. Lin, J.P. Bannister, W.R. Silverman, A.F. Mock, B. Roux, et D.M. Papazian. 2003. Atomic proximity between S4 segment and pore domain in Shaker potassium channels. *Neuron*. 39:467-481.
- Laine, M., D.M. Papazian, et B. Roux. 2004. Critical assessment of a proposed model of Shaker. *FEBS Lett*. 564:257-263.
- Lakowicz, J.R. 1999. Principles of fluorescence spectroscopy. 698.
- Lam, J.T., M.G. Martin, E. Turk, B.A. Hirayama, N.U. Bosshard, B. Steinmann, et E.M. Wright. 1999. Missense mutations in SGLT1 cause glucose-galactose malabsorption by trafficking defects. *Biochim Biophys Acta*. 1453:297-303.
- Lambert, G., I.C. Forster, J. Biber, et H. Murer. 2000a. Cysteine residues and the structure of the rat renal proximal tubular type II sodium phosphate cotransporter (rat NaPi IIa). *J Membr Biol*. 176:133-141.
- Lambert, G., I.C. Forster, G. Stange, K. Kohler, J. Biber, et H. Murer. 2001. Cysteine mutagenesis reveals novel structure-function features within the predicted third extracellular loop of the type IIa Na(+)/P(i) cotransporter. *J Gen Physiol*. 117:533-546.
- Lambert, G., M. Traebert, J. Biber, et H. Murer. 2000b. Cleavage of disulfide bonds leads to inactivation and degradation of the type IIa, but not type IIb sodium phosphate cotransporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol*. 176:143-149.
- Lapointe, J.Y., M.P. Gagnon, D.G. Gagnon, et P. Bissonnette. 2002. Controversy regarding the secondary active water transport hypothesis. *Biochem Cell Biol*. 80:525-533.
- Lapointe, J.Y., R.L. Hudson, et S.G. Schultz. 1986. Current-voltage relations of sodium-coupled sugar transport across the apical membrane of *Necturus* small intestine. *J Membr Biol*. 93:205-219.
- Larsson, H.P., O.S. Baker, D.S. Dhillon, et E.Y. Isacoff. 1996. Transmembrane movement of the shaker K⁺ channel S4. *Neuron*. 16:387-397.

- Larsson, H.P., A.V. Tzingounis, H.P. Koch, et M.P. Kavanaugh. 2004. Fluorometric measurements of conformational changes in glutamate transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:3951-3956.
- Leduc-Nadeau, A., K. Lahjouji, P. Bissonnette, J.Y. Lapointe, et D.G. Bichet. 2006. Elaboration of a novel technique for the purification of plasma membranes from *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Lee, S.Y., A. Lee, J. Chen, et R. MacKinnon. 2005. Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:15441-15446.
- Li, M., R.A. Farley, et H.A. Lester. 2000. An intermediate state of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT1 revealed by simultaneous voltage clamp and fluorescence. *J Gen Physiol*. 115:491-508.
- Li, M., et H.A. Lester. 2002. Early fluorescence signals detect transitions at mammalian serotonin transporters. *Biophys J*. 83:206-218.
- Lin, J., J. Kormanec, D. Homerova, et R.K. Kinne. 1999. Probing transmembrane topology of the high-affinity Sodium/Glucose cotransporter (SGLT1) with histidine-tagged mutants. *J Membr Biol*. 170:243-252.
- Liu, Y., D.M. Engelman, et M. Gerstein. 2002. Genomic analysis of membrane protein families: abundance and conserved motifs. *Genome Biol*. 3:research0054.
- Lo, B., et M. Silverman. 1998. Cysteine scanning mutagenesis of the segment between putative transmembrane helices IV and V of the high affinity Na⁺/Glucose cotransporter SGLT1. Evidence that this region participates in the Na⁺ and voltage dependence of the transporter. *J Biol Chem*. 273:29341-29351.
- Lo, B., et M. Silverman. 1998a. Cysteine scanning mutagenesis of the segment between putative transmembrane helices IV and V of the high affinity Na⁺/Glucose cotransporter SGLT1. Evidence that this region participates in the Na⁺ and voltage dependence of the transporter. *J Biol Chem*. 273:29341-29351.
- Lo, B., et M. Silverman. 1998b. Replacement of Ala-166 with cysteine in the high affinity rabbit sodium/glucose transporter alters transport kinetics and allows methanethiosulfonate ethylamine to inhibit transporter function. *J Biol Chem*. 273:903-909.
- Loerger, T.R. 2005. Automated detection of disulfide bridges in electron density maps using linear discriminant analysis. *Journal of applied crystallography*. 121-125.
- Long, S.B., E.B. Campbell, et R. Mackinnon. 2005. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science*. 309:897-903.

- Loo, D.D., S. Eskandari, K.J. Boorer, H.K. Sarkar, et E.M. Wright. 2000. Role of Cl⁻ in electrogenic Na⁺-coupled cotransporters GAT1 and SGLT1. *J Biol Chem.* 275:37414-37422.
- Loo, D.D., A. Hazama, S. Supplisson, E. Turk, et E.M. Wright. 1993. Relaxation kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:5767-5771.
- Loo, D.D., B.A. Hirayama, A. Cha, F. Bezanilla, et E.M. Wright. 2005. Perturbation analysis of the voltage-sensitive conformational changes of the Na⁺/glucose cotransporter. *J Gen Physiol.* 125:13-36.
- Loo, D.D., B.A. Hirayama, E.M. Gallardo, J.T. Lam, E. Turk, et E.M. Wright. 1998. Conformational changes couple Na⁺ and glucose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7789-7794.
- Loo, D.D., B.A. Hirayama, A.K. Meinild, G. Chandy, T. Zeuthen, et E.M. Wright. 1999. Passive water and ion transport by cotransporters. *J Physiol.* 518 (Pt 1):195-202.
- Loo, D.D., T. Zeuthen, G. Chandy, et E.M. Wright. 1996. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:13367-13370.
- MacAulay, N., U. Gether, D.A. Klaerke, et T. Zeuthen. 2001. Water transport by the human Na⁺-coupled glutamate cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 530:367-378.
- Mackenzie, B., D.D. Loo, M. Panayotova-Heiermann, et E.M. Wright. 1996. Biophysical characteristics of the pig kidney Na⁺/glucose cotransporter SGLT2 reveal a common mechanism for SGLT1 and SGLT2. *J Biol Chem.* 271:32678-32683.
- Mackenzie, B., D.D. Loo, et E.M. Wright. 1998. Relationships between Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) currents and fluxes. *J Membr Biol.* 162:101-106.
- Magen, D., E. Sprecher, I. Zelikovic, et K. Skorecki. 2005. A novel missense mutation in SLC5A2 encoding SGLT2 underlies autosomal-recessive renal glucosuria and aminoaciduria. *Kidney Int.* 67:34-41.
- Malathi, P., et H. Preiser. 1983. Isolation of the sodium-dependent d-glucose transport protein from brush-border membranes. *Biochim Biophys Acta.* 735:314-324.
- Malathi, P., H. Preiser, et R.K. Crane. 1980. Protease-resistant integral brush border membrane proteins and their relationship to sodium-dependent transport of D-glucose and L-alanine. *Ann N Y Acad Sci.* 358:253-266.

- Mannuzzu, L.M., M.M. Moronne, et E.Y. Isacoff. 1996. Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science*. 271:213-216.
- Martin, M.G., E. Turk, C. Kerner, B. Zabel, S. Wirth, et E.M. Wright. 1996a. Prenatal identification of a heterozygous status in two fetuses at risk for glucose-galactose malabsorption. *Prenat Diagn*. 16:458-462.
- Martin, M.G., E. Turk, M.P. Lostao, C. Kerner, et E.M. Wright. 1996b. Defects in Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) trafficking and function cause glucose-galactose malabsorption. *Nat Genet*. 12:216-220.
- Meinild, A., D.A. Klaerke, D.D. Loo, E.M. Wright, et T. Zeuthen. 1998. The human Na⁺-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J Physiol*. 508 (Pt 1):15-21.
- Meinild, A.K., B.A. Hirayama, E.M. Wright, et D.D. Loo. 2002. Fluorescence studies of ligand-induced conformational changes of the Na⁽⁺⁾/glucose cotransporter. *Biochemistry*. 41:1250-1258.
- Meinild, A.K., D.D. Loo, A.M. Pajor, T. Zeuthen, et E.M. Wright. 2000. Water transport by the renal Na⁽⁺⁾-dicarboxylate cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol*. 278:F777-783.
- Merritt, E.A., S. Sarfaty, I.K. Feil, et W.G. Hol. 1997. Structural foundation for the design of receptor antagonists targeting Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Structure*. 5:1485-1499.
- Miller, C. 2006. CIC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature*. 440:484-489.
- Murer, H., I. Forster, et J. Biber. 2004. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. *Pflugers Arch*. 447:763-767.
- Murer, H., et U. Hoyer. 1974. Demonstration of electrogenic Na⁺-dependent D-glucose transport in intestinal brush border membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 71:484-488.
- Noda, M., S. Shimizu, T. Tanabe, T. Takai, T. Kayano, T. Ikeda, H. Takahashi, H. Nakayama, Y. Kanaoka, N. Minamino, et et al. 1984. Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*. 312:121-127.
- Noskov, S.Y., W. Im, et B. Roux. 2004. Ion Permeation through the α -Hemolysin Channel: Theoretical Studies Based on Brownian Dynamics and Poisson-Nernst-Planck Electrodiffusion Theory. *Biophys. J*. 87:2299-2309.

- Novakova, R., D. Homerova, R.K. Kinne, E. Kinne-Saffran, et J.T. Lin. 2001. Identification of a region critically involved in the interaction of phlorizin with the rabbit sodium-D-glucose cotransporter SGLT1. *J Membr Biol.* 184:55-60.
- Pajor, A.M. 2001. Conformationally sensitive residues in transmembrane domain 9 of the Na⁺/dicarboxylate co-transporter. *J Biol Chem.* 276:29961-29968.
- Pajor, A.M., S.J. Krajewski, N. Sun, et R. Gangula. 1999. Cysteine residues in the Na⁺/dicarboxylate co-transporter, NaDC-1. *Biochem J.* 344 Pt 1:205-209.
- Panayotova-Heiermann, M., S. Eskandari, E. Turk, G.A. Zampighi, et E.M. Wright. 1997. Five transmembrane helices form the sugar pathway through the Na⁺/glucose cotransporter. *J Biol Chem.* 272:20324-20327.
- Panayotova-Heiermann, M., D.W. Leung, B.A. Hirayama, et E.M. Wright. 1999. Purification and functional reconstitution of a truncated human Na⁽⁺⁾/glucose cotransporter (SGLT1) expressed in E. coli. *FEBS Lett.* 459:386-390.
- Panayotova-Heiermann, M., D.D. Loo, C.T. Kong, J.E. Lever, et E.M. Wright. 1996. Sugar binding to Na⁺/glucose cotransporters is determined by the carboxyl-terminal half of the protein. *J Biol Chem.* 271:10029-10034.
- Panayotova-Heiermann, M., D.D. Loo, J.T. Lam, et E.M. Wright. 1998. Neutralization of conservative charged transmembrane residues in the Na⁺/glucose cotransporter SGLT1. *Biochemistry.* 37:10522-10528.
- Panayotova-Heiermann, M., D.D. Loo, M.P. Lostao, et E.M. Wright. 1994. Sodium/D-glucose cotransporter charge movements involve polar residues. *J Biol Chem.* 269:21016-21020.
- Panayotova-Heiermann, M., D.D. Loo, et E.M. Wright. 1995. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter. *J Biol Chem.* 270:27099-27105.
- Panayotova-Heiermann, M., et E.M. Wright. 2001. Mapping the urea channel through the rabbit Na⁽⁺⁾-glucose cotransporter SGLT1. *J Physiol.* 535:419-425.
- Papazian, D.M., T.L. Schwarz, B.L. Tempel, Y.N. Jan, et L.Y. Jan. 1987. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from Drosophila. *Science.* 237:749-753.
- Parent, L., S. Supplisson, D.D. Loo, et E.M. Wright. 1992a. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies. *J Membr Biol.* 125:49-62.

- Parent, L., S. Supplisson, D.D. Loo, et E.M. Wright. 1992b. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *J Membr Biol.* 125:63-79.
- Posson, D.J., P. Ge, C. Miller, F. Bezanilla, et P.R. Selvin. 2005. Small vertical movement of a K⁺ channel voltage sensor measured with luminescence energy transfer. *Nature.* 436:848-851.
- Quick, M., D.D. Loo, et E.M. Wright. 2001. Neutralization of a conserved amino acid residue in the human Na⁺/glucose transporter (hSGLT1) generates a glucose-gated H⁺ channel. *J Biol Chem.* 276:1728-1734.
- Raja, M.M., N.K. Tyagi, et R.K. Kinne. 2003. Phlorizin recognition in a C-terminal fragment of SGLT1 studied by tryptophan scanning and affinity labeling. *J Biol Chem.* 278:49154-49163.
- Roux, B., S. Berneche, et W. Im. 2000. Ion channels, permeation, and electrostatics: insight into the function of KcsA. *Biochemistry.* 39:13295-13306.
- Ruta, V., J. Chen, et R. MacKinnon. 2005. Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K⁺ channel. *Cell.* 123:463-475.
- Sacher, A., N. Nelson, J.T. Ogi, E.M. Wright, D.D. Loo, et S. Eskandari. 2002. Presteady-state and steady-state kinetics and turnover rate of the mouse gamma-aminobutyric acid transporter (mGAT3). *J Membr Biol.* 190:57-73.
- Sahin-Toth, M., S. Frillingos, M.C. Lawrence, et H.R. Kaback. 2000. The sucrose permease of Escherichia coli: functional significance of cysteine residues and properties of a cysteine-less transporter. *Biochemistry.* 39:6164-6169.
- Sahin-Toth, M., B. Persson, J. Schwieger, P. Cohan, et H.R. Kaback. 1994. Cysteine scanning mutagenesis of the N-terminal 32 amino acid residues in the lactose permease of Escherichia coli. *Protein Sci.* 3:240-247.
- Sauer, G.A., G. Nagel, H. Koepsell, E. Bamberg, et K. Hartung. 2000. Voltage and substrate dependence of the inverse transport mode of the rabbit Na⁽⁺⁾/glucose cotransporter (SGLT1). *FEBS Lett.* 469:98-100.
- Savage, D.F., P.F. Egea, Y. Robles-Colmenares, J.D. O'Connell, 3rd, et R.M. Stroud. 2003. Architecture and selectivity in aquaporins: 2.5 a X-ray structure of aquaporin Z. *PLoS Biol.* 1:E72.
- Schmidt, U.M., B. Eddy, C.M. Fraser, J.C. Venter, et G. Semenza. 1983. Isolation of (a subunit of) the Na⁺/D-glucose cotransporter(s) of rabbit intestinal brush border membranes using monoclonal antibodies. *FEBS Lett.* 161:279-283.

- Semenza, G., M. Kessler, M. Hosang, J. Weber, et U. Schmidt. 1984. Biochemistry of the Na⁺, D-glucose cotransporter of the small-intestinal brush-border membrane. The state of the art in 1984. *Biochim Biophys Acta*. 779:343-379.
- Senes, A., M. Gerstein, et D.M. Engelman. 2000. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol*. 296:921-936.
- Seoh, S.A., D. Sigg, D.M. Papazian, et F. Bezanilla. 1996. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron*. 16:1159-1167.
- Simoes, M., L. Garneau, H. Klein, U. Banderali, F. Hobeila, B. Roux, L. Parent, et R. Sauve. 2002. Cysteine mutagenesis and computer modeling of the S6 region of an intermediate conductance IKCa channel. *J Gen Physiol*. 120:99-116.
- Starace, D.M., et F. Bezanilla. 2001. Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the shaker k⁺ channel. *J Gen Physiol*. 117:469-490.
- Starace, D.M., et F. Bezanilla. 2004. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature*. 427:548-553.
- Starace, D.M., E. Stefani, et F. Bezanilla. 1997. Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K⁺ channel. *Neuron*. 19:1319-1327.
- Sui, H., B.G. Han, J.K. Lee, P. Walian, et B.K. Jap. 2001. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*. 414:872-878.
- Sur, C., P. Schloss, et H. Betz. 1997. The rat serotonin transporter: identification of cysteine residues important for substrate transport. *Biochem Biophys Res Commun*. 241:68-72.
- Takata, K., T. Kasahara, M. Kasahara, O. Ezaki, et H. Hirano. 1991. Localization of Na⁽⁺⁾-dependent active type and erythrocyte/HepG2-type glucose transporters in rat kidney: immunofluorescence and immunogold study. *J Histochem Cytochem*. 39:287-298.
- Tanaka, K., F. Zhou, K. Kuze, et G. You. 2004. Cysteine residues in the organic anion transporter mOAT1. *Biochem J*. 380:283-287.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, et D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 25:4876-4882.
- Toggenburger, G., M. Kessler, A. Rothstein, G. Semenza, et C. Tannenbaum. 1978. Similarity in effects of Na⁺ gradients and membrane potentials on D-glucose

transport by, and phlorizin binding to, vesicles derived from brush borders of rattit intestinal mucosal cells. *J Membr Biol.* 40:269-290.

- Toyoshima, C., et T. Mizutani. 2004. Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature.* 430:529-535.
- Toyoshima, C., M. Nakasako, H. Nomura, et H. Ogawa. 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature.* 405:647-655.
- Toyoshima, C., et H. Nomura. 2002. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature.* 418:605-611.
- Tseeb, V.E., V.I. Geletiuik, et V.N. Kazachenko. 1991. [Temperature dependence of the conductivity of individual potential-dependent K⁺-channels in mollusk neurons]. *Biofizika.* 36:810-821.
- Turk, E., C.J. Kerner, M.P. Lostao, et E.M. Wright. 1996. Membrane topology of the human Na⁺/glucose cotransporter SGLT1. *J Biol Chem.* 271:1925-1934.
- Turk, E., M.G. Martin, et E.M. Wright. 1994. Structure of the human Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT1. *J Biol Chem.* 269:15204-15209.
- Turk, E., et E.M. Wright. 1997. Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *J Membr Biol.* 159:1-20.
- Turk, E., B. Zabel, S. Mundlos, J. Dyer, et E.M. Wright. 1991. Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature.* 350:354-356.
- Turner, J.R., W.I. Lencer, S. Carlson, et J.L. Madara. 1996. Carboxy-terminal vesicular stomatitis virus G protein-tagged intestinal Na⁺-dependent glucose cotransporter (SGLT1): maintenance of surface expression and global transport function with selective perturbation of transport kinetics and polarized expression. *J Biol Chem.* 271:7738-7744.
- Turner, R.J., et J.N. George. 1983. Evidence for two disulfide bonds important to the functioning of the renal outer cortical brush-border membrane D-glucose transporter. *J Biol Chem.* 258:3565-3570.
- Turner, R.J., et J.N. George. 1984. Characterization of an essential disulfide bond associated with the active site of the renal brush-border membrane D-glucose transporter. *Biochim Biophys Acta.* 769:23-32.
- Turner, R.J., et E.S. Kempner. 1982. Radiation inactivation studies of the renal brush-border membrane phlorizin-binding protein. *J Biol Chem.* 257:10794-10797.

- Umbach, J.A., M.J. Coady, et E.M. Wright. 1990. Intestinal Na⁺/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes is electrogenic. *Biophys J.* 57:1217-1224.
- van Iwaarden, P.R., J.C. Pastore, W.N. Konings, et H.R. Kaback. 1991. Construction of a functional lactose permease devoid of cysteine residues. *Biochemistry.* 30:9595-9600.
- Vayro, S., B. Lo, et M. Silverman. 1998. Functional studies of the rabbit intestinal Na⁺/glucose carrier (SGLT1) expressed in COS-7 cells: evaluation of the mutant A166C indicates this region is important for Na⁺-activation of the carrier. *Biochem J.* 332 (Pt 1):119-125.
- Verkman, A.S. 2005. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci.* 118:3225-3232.
- Verkman, A.S., et A.K. Mitra. 2000. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol.* 278:F13-28.
- Virkki, L.V., I.C. Forster, J. Biber, et H. Murer. 2005. Substrate interactions in the human type IIa sodium-phosphate cotransporter (NaPi-IIa). *Am J Physiol Renal Physiol.* 288:F969-981.
- Virkki, L.V., H. Murer, et I.C. Forster. 2006. Voltage clamp fluorometric measurements on a type II Na⁺-coupled Pi cotransporter: shedding light on substrate binding order. *J Gen Physiol.* 127:539-555.
- Voet, D., et J.G. Voet. 1998. Biochimie. 2^{ème} édition. De Boeck Université, John Wiley and Sons, Inc.,
- White, S.H. 1994. Hydropathy plots and the prediction of membrane protein topology. In Membrane protein structure: Experimental approaches. New York: Oxford University Press.
- Wood, I.S., et P. Trayhurn. 2003. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr.* 89:3-9.
- Wright, E.M. 1998. I. Glucose galactose malabsorption. *Am J Physiol.* 275:G879-882.
- Wright, E.M. 2001. Renal Na⁽⁺⁾-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280:F10-18.
- Wright, E.M., D.D. Loo, M. Panayotova-Heiermann, B.A. Hirayama, E. Turk, S. Eskandari, et J.T. Lam. 1998. Structure and function of the Na⁺/glucose cotransporter. *Acta Physiol Scand Suppl.* 643:257-264.

- Wright, E.M., et E. Turk. 2004. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* 447:510-518.
- Wright, E.M., E. Turk, et M.G. Martin. 2002. Molecular basis for glucose-galactose malabsorption. *Cell Biochem Biophys.* 36:115-121.
- Xia, X., C.T. Lin, G. Wang, et H. Fang. 2004. Binding of phlorizin to the C-terminal loop 13 of the Na⁽⁺⁾/glucose cotransporter does not depend on the [560-608] disulfide bond. *Arch Biochem Biophys.* 425:58-64.
- Xia, X., J.T. Lin, et R.K. Kinne. 2003. Binding of phlorizin to the isolated C-terminal extramembranous loop of the Na⁺/glucose cotransporter assessed by intrinsic tryptophan fluorescence. *Biochemistry.* 42:6115-6120.
- Xia, X., G. Wang, Y. Peng, et J. Jen. 2005. Cys351 and Cys361 of the Na⁺/glucose cotransporter are important for both function and cell-surface expression. *Arch Biochem Biophys.* 438:63-69.
- Yamashita, A., S.K. Singh, T. Kawate, Y. Jin, et E. Gouaux. 2005. Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature.* 437:215-223.
- Yao, X., et A.M. Pajor. 2002. Arginine-349 and aspartate-373 of the Na⁽⁺⁾/dicarboxylate cotransporter are conformationally sensitive residues. *Biochemistry.* 41:1083-1090.
- Yernool, D., O. Boudker, Y. Jin, et E. Gouaux. 2004. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature.* 431:811-818.
- Yu, X., S. Carroll, J.L. Rigaud, et G. Inesi. 1993. H⁺ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophys J.* 64:1232-1242.
- Yusaf, S.P., D. Wray, et A. Sivaprasadarao. 1996. Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel. *Pflugers Arch.* 433:91-97.
- Zeidel, M.L., S.V. Ambudkar, B.L. Smith, et P. Agre. 1992. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry.* 31:7436-7440.
- Zhou, L., E.V. Cryan, M.R. D'Andrea, S. Belkowski, B.R. Conway, et K.T. Demarest. 2003. Human cardiomyocytes express high level of Na⁺/glucose cotransporter 1 (SGLT1). *J Cell Biochem.* 90:339-346.
- Zorzato, F., J. Fujii, K. Otsu, M. Phillips, N.M. Green, F.A. Lai, G. Meissner, et D.H. MacLennan. 1990. Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms

of the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 265:2244-2256.

Annexe I : Biologie moléculaire

Protocoles

Méthode de mutagenèse par PCR (décrite par Fisher, C.L. et Pei, G.K., 1997)

Caractéristiques des oligonucléotides :

Riches en GC

$T_m \geq 78^\circ\text{C}$ ($T_m = 81.5 + 0.41 * (\%GC) - 675/N - \%mismatch$)

Longueur entre 25-33 paires de bases

De préférences purifiées par OPC

PCR :

(2 segments)

1^{er} : 1 cycle à 95 °C, 30 sec.

2^{em} : 16 cycles de 95 °C pour 30 sec., 55 °C pour 1 min. et 68 °C pour 5min. 30sec. (pBS-SGLT1)

Dans un volume total de 50 µl :

5 µl Rx buffer 10X

5 ng ADN mère

1 µl des 2 oligonucléotides 500 µM, dilués 1/50 chacun ensemble ([oligos]_{finale} 10 mM)

0.5 µl dNTP (si on a un mix à 10 mM)

Compléter le V avec de l'dH₂O (41.5 µl)

Ajouter 1 µl enzyme Pfu polymérase (ou Pfu Ultra) lorsque que T° est de 95 °C, ou au début si c'est Pfu Hotstart (mais ajouter 5 min à 95 °C pour l'activer au début du cycle)

Digestion par Dpn I (ajout de 1 µl d'enzyme à la Rx PCR directement, 1h à 37 °C)

Transformation de bactéries compétentes (10 µl de la Rx PCR+DpnI)

Sélection de colonies, faire pousser dans 3-4 ml LB

Mini-prep classique, précipitation ADN, test enzyme, gel analytique

Transformation de nouvelles bactéries avec ADN purifié d'une colonie (1 µl suffisant)

Mini-prep QIAGEN

Précipitation ADN

Digestion avec Eco RI (10-20 µg ADN)

Extraction phénol-chloroforme

Précipitation ADN

Transcription *in vitro* (Kit AmbionT3) (1 µg ADN linéaire)

Précipitation ARNm

Filterer (0.2 µm) et diluer selon le besoin (conserver du 1 µg/µl)

Transformation de bactéries compétentes

Mettre les tubes sur la glace et le SOC à 37 °C

200 µl de bactéries + 10 µM de la Rx PCR+Dpn I

Attendre 30 min.

Choc thermique à 42 °C pour 30 sec. à 1 min.

Mettre sur glace et ajouter 800 µl SOC

Mettre 1h à 37 °C + brassage

Étaler sur pétris+AMP, 37 °C O/N (on peut tester différentes [], par exemple 50 µl de 1/100, 50 µl non dilué et 500 µl non dilué)

Piquer colonies et faire pousser dans LB+AMP (volume selon l'utilisation subséquente)

Mini-prep classique ou mini-prep QIAGEN (selon l'utilisation subséquente)

Mini-prep classique

Précipitation des bactéries par centrifugation, jeter surnageant

Re-suspendre dans 100 μ l solution I (frigo)

Lyse alcaline 200 μ l de solution II, **maximum du temps de réaction 5 min.**

Neutralisation avec 150 μ l de solution III (attendre 5 min.)

Centrifugation 5 min.

Récupération du surnageant dans tube propre contenant 250 μ l d'isopropanol (attendre 20 min.)

Re-mélanger et centrifuger 5 min.

Rincer avec éthanol 75 % (200 μ l)

Mélanger, centrifuger 1 min., éliminer le surnageant

Centrifuger, éliminer le surnageant

Laisser sécher

Solubilisation dans 10 μ l TE

Extraction ADN au phénol-chloroforme

(À partir de notre 200 µl ADN coupé Eco RI par exemple)

Ajouter 100 µl phénol (jaunâtre)
Ajouter 100 µl chloroforme (transparent)

Vortex 15 sec.
Centrifuger 2-3 min.
Éliminer la phase du bas (sans l'interface)
Centrifuger 2-3 min.

Récupérer la phase liquide (sans l'interface) et la mettre dans 200 µl de chloroforme

Vortex 15 sec.
Centrifuger 2-3 min.
Éliminer la phase du bas ou récupérer la phase du haut
Centrifuger 2-3 min.

Précipitation de l'ADN

Ajouter Na⁺ acétate 3 M (final 0.3 M) et éthanol 100 % (final 70 %)
Par exemple pour 200 µl ADN 20 µl Na⁺ acétate et 400 µl éthanol 100%

Mettre à -20 °C pour minimum 15 min.

Centrifuger 5 min. (culot)
Éliminer le surnageant

Rincer avec éthanol 70 % (environ 400 µl pour 200 µl d'ADN, grosso modo pour couvrir le culot)
Centrifuger 1 min.

Éliminer le surnageant
Laisser sécher à l'air

Solubiliser dans TE
(11 µl, dont 1 µl servira pour le dosage) et faire dosage (ajustement à 1 µg/µl de préférence)

Précipitation de l'ARNm

(kit Ambion T3)

Ajouter environ 50 % du volume de la Rx de LiCl (10 μ l dans la réaction de 20 μ l)
Mélanger et mettre à -20 °C pour environ 30 min.

Centrifuger 5 min.

Éliminer le surnageant

Rincer avec environ 80 μ l d'éthanol 70 % **ARNase free**

Centrifuger 1 min.

Éliminer le surnageant

Laisser sécher

Solubiliser dans dH₂O **ARNase free**

(11 μ l dont 1 μ l servira pour dosage) et faire dosage (ajustement à 1 μ g/ μ l de préférence)

Mutations

Tableau AI.II : Oligonucléotides et enzymes de restriction des mutants de l'article 1 (Chapitre 3)

Mutant	Enzyme test*	# site(s) dans pBS-SGLT1	+/- [§]	Oligonucléotides [†]
N565C	Bpm I	2	+	5' CTGTGCTGGAGCCT TGCG CTGCAGCAAAGAGGAG 3' 5' CTCCTCTTTGCT GCAG CGCAGGCTCCAGCACAG 3'
E586C	Mfe I	0	+	5' CAAGAAGGCCCTAAG TGCACA ATTGAAATAG 3' 5' CTATTTCAATT TGTGCA CTTAGGGCCTTCTTG 3'
I588C	Bsp MI	0	+	5' CCTAAGGAGACCT TGCG AAATAGAAACACAAG 3' 5' CTTGTGTTTCTATTT CGCAG GTCTCCTTAGG 3'
A605C	Bsp EI	1	+	5' GGAATCTTCCGGAGAT TGCT ATGACCTATTTTGT 3' 5' ACAAATAGGTCATAG CAT CTCCGGAAGATTCC 3'
Y606C	Bsp EI	1	+	5' GGAATCTTCCGGAGAGCCT TGTG ACCTATTTTGT 3' 5' ACAAATAGGTCACAGGCTCTCCGGAAGATTCC 3'
D607C	Bsp EI	1	+	5' TTCCGGAGAGCCTAT TGC CTATTTTGTGGGCTA 3' 5' TAGCCACAAAATAGG CA ATAGGCTCTCCGGA 3'
L608C	Xho I	0	+	5' AGAGCCTATGACT TGCT TTTGTGGGCTCGAGCAG 3' 5' CTGCTC GAG CCCACAAA AGC AGTCATAGGCTCT 3'
E624C	Bsr DI	2	+	5' ATGACTGAGGAAT TGCG GAGAAAGCAATGAAGATG 3' 5' CATCTTCATT TGCT TTTCT CGC ATTTCCTCAGTCAT 3'
E625C	Bsr DI	2	+	5' ATGACTGAGGAAGAG TGCA AAGCAATGAAGATG 3' 5' CATCTTCATT TGCT TT TGCA CTTTCCTCAGTCAT 3'
K626C	Bsr DI	2	+	5' GAGGAAGAGGAG TGCG CAATGAAGATGAAGATG 3' 5' CATCTTCATCTTCATT TGCG CACTCCTTTCCTC 3'

Note :

* , L'enzyme test est l'enzyme de restriction pour lequel on a enlevé ou ajouté un site de restriction.

§ , + signifie qu'un site de restriction a été ajouté, - signifie qu'un site de restriction a été enlevé.

† , Les bases en caractères gras sont celles qui ont été modifiées par rapport à celles de la séquence de wt SGLT1.

Tableau AI.III : Oligonucléotides et enzymes de restriction des mutants de l'article 2 (Chapitre 4)

Mutant	Enzyme test	# site(s) dans SGLT1	+/-	Oligonucléotides
C255A	Hind III	0	+	5' CCT TTCAGGAAAAAG C TTACTCTCCAAGGGCCG 3' 5' CGGCCCTTGGAGTGTA A GC T TTTTCTGAAAGG 3'
C294A	Bmr I	2	-	5' ACCTTGTGGTAT T GGG G CCACAGATCAGGTCATT 3' 5' AATGACCTGATCTGTGG G CCCAATACCACAAGGT 3'
C301A	Bsr GI	2	-	5' GTCATTGTACAGCG G CCCTCTCAGCCAAG 3' 5' CTTGGCTGAGAGGG G CGCGCTGTACAATGAC 3'
C314A	Bmg BI	1	+	5' CACGTCAAGGGTGG C GCATCCTGTGTGGGTAT 3' 5' ATACCCACACAGGATGG C GCCACCCTT G ACGTG 3'
C317A	Eco RV	1	+	5' GGTGGCTGCATCCTGG G CTGGATATCTAAAGCTG 3' 5' CAGCTTTAGATAT T CCAG C CAGGATGCAGCCACC 3'
C345A	Pvu II	0	+	5' TACACAGAAAAAATTGC A GCTGTCGTCCCTTCA 3' 5' TGAAGGGACGACAG C TGCAATTTTTTCTGTGTA 3'
C351A	Ssp I	2	-	5' GTCCCTTCAGAAG C TGAGAAGTATTGCGGT 3' 5' ACCGCAATA C TTCTCAG C TTCTGAAGGGAC 3'
C355A	NgoMIV	0	+	5' TGTGAGAAATAT G CCGGCACCAAGGTTGGC 3' 5' GCCAACCTTGGT G CCGG C CATATTTCTCACA 3'
C361A	Nar I	0	+	5' GGTACCAAGGTTGG C GCCACCAACATCGCC 3' 5' GGCGATGTTGGT G GCGCCAACCTTGGTACC 3'

VIII

C511A	Age I	0	+	5' TATGGAACCGGTAGCGCCATGGAGCCCAGC 3' 5' GCTGGGCTCCATGGCGCTACCGGTTCCATA 3'
C517A	Bsr DI	2	+	5' GAGCCCAGCAATGCTCCCACGATTATCTGT 3' 5' ACAGATAATCGTGGGAGCATTGCTGGGCTC 3'
C522A	Apa LI	3	-	5' CCCACGATTATCGCTGGGGTCCACTACTTG 3' 5' CAAGTAGTGGACCCCAGCGATAATCGTGGG 3'
C560A	Bsm BI	0	+	5' GTGCATCTCTACCGTCTCGCTTGGAGCCTGCGC 3' 5' GCGCAGGCTCCAAGCGAGACGGTAGAGATGCAC 3'
C610A	Xho I	0	+	5' GCCTATGACCTATTTGCTGGGCTCGAGCAGCAC 3' 5' GTGCTGCTCGAGCCCAGCAAATAGGTCATAGGC 3'
C659A	Sph I	0	+	5' ACCGTGGCTGTCTTTGCGCATGCATATTTTGCC 3' 5' GGCAAATATGCATGCGCAAAGACAGCCACGGT 3'

Annexe II : Modèle cinétique

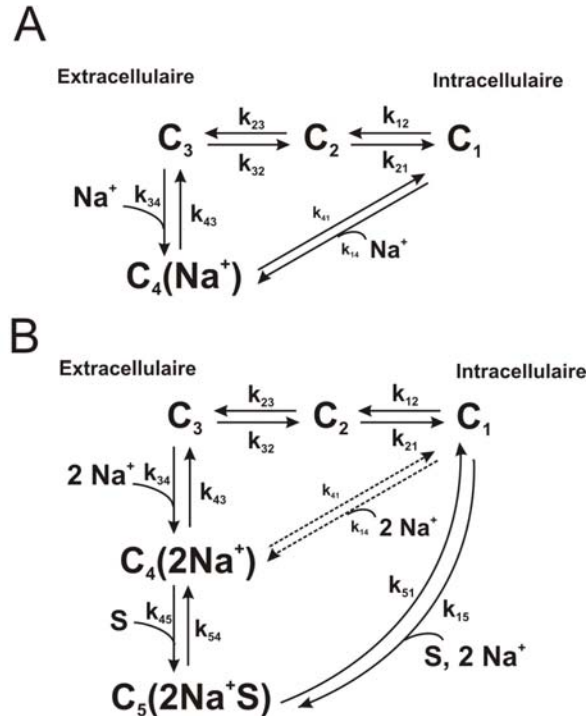


Figure AII.1 : Schéma des deux modèles cinétiques présentés dans les Chapitres 4 (en A), 5 et 6 (en B).

En absence de glucose

En absence de glucose, le modèle comporte quatre états, tel qu'illustré à la Figure AII.1. Le modèle est basé sur la théorie des barrières d'énergie d'Eyring, qui suppose que les taux de transitions entre deux états adoptent la forme suivante :

$$k_{12} = k_{120} \exp\left(z_1 \alpha_1 \frac{FV}{RT}\right)$$

$$k_{21} = k_{210} \exp\left(-z_1 (1 - \alpha_1) \frac{FV}{RT}\right)$$

$$k_{23} = k_{230} \exp\left(z_2 \alpha_2 \frac{FV}{RT}\right)$$

$$k_{32} = k_{320} \exp\left(-z_2 (1 - \alpha_2) \frac{FV}{RT}\right)$$

(1)

$$k_{34} = k_{340} [Na_{out}^+] \exp\left(z_3 \alpha_3 \frac{FV}{RT}\right)$$

$$k_{43} = k_{430} \exp\left(-z_3 (1 - \alpha_3) \frac{FV}{RT}\right)$$

$$k_{41} = k_{410} \exp\left(z_4 \alpha_4 \frac{FV}{RT}\right)$$

où z_i représente la valence de la charge équivalente qui se déplace à travers toute la membrane, α_i (entre 0 et 1) décrit l'asymétrie de la barrière d'énergie, V est le voltage membranaire et F , T et R sont la constante de Faraday (96 500 C mol⁻¹), la température (en K) et la constante des gaz (8.314 J K⁻¹ mol⁻¹). Afin que la micro-réversibilité soit assurée, la dernière constante k_{140} est calculée afin qu'il n'y ait aucun transport net à 0 mV lorsqu'il n'y a pas de gradient d'ions Na⁺ :

$$k_{140} = \left(\frac{k_{120} k_{230} k_{340} k_{410}}{k_{430} k_{320} k_{210}} \right) \quad (2)$$

$$k_{14} = k_{140} [Na_{in}^+] \exp\left(-z_4 (1 - \alpha_4) \frac{FV}{RT}\right)$$

En électrophysiologie à double microélectrode, nous ne pouvons résoudre temporellement que la constante de temps τ_{slow} de Chen *et al.* (1996). Certaines de leurs approximations sont également satisfaites dans notre cas. La constante de temps est calculée selon les expressions suivantes :

$$f_{12} = \frac{k_{12}}{(k_{12} + k_{21})}$$

$$f_{43} = \frac{k_{43}}{(k_{34} + k_{43})}$$

$$\tau_{slow} = \frac{1}{f_{12} k_{23} + f_{43} k_{32}} \quad (3)$$

Afin de calculer les courants (pré-stationnaires et stationnaires) et les charges transférées, nous calculons les probabilités de trouver les transporteurs dans les différents états, pour chaque V_m , à partir d'une valeur initiale, comme suit :

$$\frac{dC_2}{dt} = -C_2k_{21} + C_1k_{12} - C_2k_{23} + C_3k_{32}$$

$$\frac{dC_3}{dt} = -C_3k_{32} + C_2k_{23} - C_3k_{34} + C_4k_{43}$$

$$\frac{dC_4}{dt} = -C_4k_{43} + C_3k_{34} - C_4k_{41} + C_1k_{14}$$

$$\frac{dC_1}{dt} = -\left(\frac{dC_2}{dt} + \frac{dC_3}{dt} + \frac{dC_4}{dt}\right)$$

L'incrément de temps multiplie cette valeur, puis on ajoute cette variation à la valeur précédente :

$$\Delta C_i = \frac{dC_i}{dt} dt$$

$$C_i|_t = C_i|_{t-1} + \Delta C_i \quad (4)$$

où C_i représentent la probabilité d'occupation de l'état i dans le modèle (voir Figure 1.17). C_1 est calculé comme suit pour conserver la probabilité totale à l'unité :

$$C_1 = 1 - (C_2 + C_3 + C_4) \quad (5)$$

Le courant unitaire est calculé à partir des variations des probabilités C_i et des charges équivalentes qui traversent la membrane (z_i) :

$$I = (-C_2k_{21} + C_1k_{12})z_1e + (-C_3k_{32} + C_2k_{23})z_2e + (-C_4k_{43} + C_3k_{34})z_3e$$

Finalement, pour le calcul de la charge transférée, nous avons posé que la charge était nulle aux V_m hyperpolarisants extrêmes (où $C_4=1$ et $C_3=C_2=C_1=0$), puis utilisé l'équation suivante :

$$-Q = C_3z_3 + C_2(z_2 + z_3) + C_1(z_1 + z_2 + z_3) \quad (6)$$

Cette équation est valide puisque la constante k_{41} est négligeable (voir Tableau IV.I) et n'engendre qu'un faible courant stationnaire. Pour les simulations, les $[Na^+_{out}]$ et $[Na^+_{in}]$ ont été fixées à 90 mM et 7 mM, respectivement, et la concentration intracellulaire de glucose a

été posée à 0. Les valeurs z_i sont de -0.4 , -0.35 , -0.6 et 0 et les α_i de 0.3 , 0 , 0.4 et 0 respectivement pour i allant de 1 à 4 .

En présence de glucose

Ensuite, j'ai utilisé le modèle pour l'interprétation des courants transitoires en présence de glucose. J'ai donc ajouté la liaison du second ion Na^+ , l'étape de liaison des deux ions Na^+ est simplifiée par un équilibre rapide, et la liaison du glucose, qui est indépendante du voltage membranaire mais dépend de la concentration du glucose extracellulaire.

Les équations suivantes ont été utilisées pour le calcul des taux de transitions :

$$\begin{aligned}
 k_{12} &= k_{120} \exp\left(z_1 \alpha_1 \frac{FV}{RT}\right) \\
 k_{21} &= k_{210} \exp\left(-z_1(1-\alpha_1) \frac{FV}{RT}\right) \\
 k_{23} &= k_{230} \exp\left(z_2 \alpha_2 \frac{FV}{RT}\right) \\
 k_{32} &= k_{320} \exp\left(-z_2(1-\alpha_2) \frac{FV}{RT}\right) \\
 k_{34} &= k_{340} [\text{Na}_{out}^+]^2 \exp\left(z_3 \alpha_3 \frac{FV}{RT}\right) \\
 k_{43} &= k_{430} \exp\left(-z_3(1-\alpha_3) \frac{FV}{RT}\right) \\
 k_{41} &= k_{410} \exp\left(z_4 \alpha_4 \frac{FV}{RT}\right) \\
 k_{45} &= k_{450} [\text{sucrose}_{out}] \\
 k_{54} &= k_{540} \\
 k_{51} &= k_{510}
 \end{aligned} \tag{1}$$

Afin que la micro-réversibilité soit assurée, les constantes qui effectuent un cycle de transport k_{140} (cycle de transport de Na^+) et k_{150} (cycle de transport de Na^+ et de glucose) ont été calculées afin qu'il n'y ait aucun transport net à 0 mV :

$$k_{140} = \left(\frac{k_{120}k_{230}k_{340}k_{410}}{k_{430}k_{320}k_{210}} \right) \quad (2)$$

$$k_{14} = k_{140} [\text{Na}_{in}^+]^2 \exp\left(-z_4(1-\alpha_4)\frac{FV}{RT}\right)$$

$$k_{150} = \left(\frac{k_{120}k_{230}k_{340}k_{450}k_{510}}{k_{540}k_{430}k_{320}k_{210}} \right)$$

$$k_{15} = k_{150} [\text{Na}_{in}^+]^2 [\text{sucrose}_{in}]$$

Les courants (pré-stationnaires et stationnaires) sont calculés à partir d'une valeur initiale, comme suit :

$$\frac{dC_2}{dt} = -C_2k_{21} + C_1k_{12} - C_2k_{23} + C_3k_{32}$$

$$\frac{dC_3}{dt} = -C_3k_{32} + C_2k_{23} - C_3k_{34} + C_4k_{43}$$

$$\frac{dC_4}{dt} = -C_4k_{43} + C_3k_{34} - C_4k_{45} + C_5k_{54} - C_4k_{41} + C_1k_{14}$$

$$\frac{dC_5}{dt} = -C_5k_{54} + C_4k_{45} - C_5k_{51} + C_1k_{15}$$

$$\frac{dC_1}{dt} = -\left(\frac{dC_2}{dt} + \frac{dC_3}{dt} + \frac{dC_4}{dt} + \frac{dC_5}{dt}\right)$$

L'incrément de temps multiplie cette valeur, puis on ajoute cette variation à la valeur précédente :

$$\Delta C_i = \frac{dC_i}{dt} dt$$

$$C_i|_t = C_i|_{t-1} + \Delta C_i \quad (4)$$

où C_i représentent la probabilité d'occupation de l'état i dans le modèle (voir Figure 1.17). C_1 est calculé comme suit pour conserver la probabilité totale à l'unité :

$$C_1 = 1 - (C_2 + C_3 + C_4 + C_5) \quad (5)$$

Le courant unitaire est calculé à partir des variations des probabilités C_i et des charges équivalentes qui traversent la membrane (z_i) :

$$I = (-C_2 k_{21} + C_1 k_{12}) z_1 e + (-C_3 k_{32} + C_2 k_{23}) z_2 e + (-C_4 k_{43} + C_3 k_{34}) z_3 e \quad (6)$$

Finalement, pour le calcul de la charge transférée, en présence de glucose, le calcul précédent n'est plus valable puisque le cycle de transport peut s'effectuer (i.e. k_{51} n'est pas négligeable), ce qui fait que nous ne pouvons prédire d'où proviennent les transporteurs (d'une étape précédente ou subséquente). La charge transférée a donc été calculée tel que pour l'analyse des charges transférées expérimentales.

Les constantes de temps du modèle à cinq états ne peuvent être résolues théoriquement tel que cela avait été fait pour le modèle en absence de glucose, en considérant certaines approximations. Nous avons donc utilisé l'inversement de la matrice des variations de probabilités en fonction du temps pour trouver les constantes de temps, qui sont l'inverse des valeurs propres du système (Loo *et al.*, 2005):

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \\ C_4 \\ C_5 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -(k_{12} + k_{15}) & k_{21} & 0 & 0 & k_{51} \\ k_{12} & -(k_{21} + k_{23}) & k_{32} & 0 & 0 \\ 0 & k_{23} & -(k_{32} + k_{34}) & k_{43} & 0 \\ k_{14} & 0 & k_{34} & -(k_{45} + k_{43} + k_{41}) & k_{54} \\ k_{15} & 0 & 0 & k_{45} & -(k_{54} + k_{51}) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \\ C_4 \\ C_5 \end{bmatrix}$$

De la même façon qu'en absence de glucose, les $[\text{Na}^+_{\text{out}}]$ et $[\text{Na}^+_{\text{in}}]$ ont été fixées à 90 mM et 7 mM, respectivement, et la concentration intracellulaire de glucose a été posée à 0. Les valeurs z_i sont de -0.35 et -0.55 et les α_i de 0.3, 0 et 0.4.

Annexe III : Contribution personnelle, accord des coauteurs et permission des éditeurs

Article 1

Membrane topology of loop 13-14 of the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1): a SCAM and fluorescent labelling study

Gagnon D.G., Holt A., Bourgeois F., Wallendorff B., Coady M.J. & Lapointe J.Y.

Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes, Jun 30; 1712(2):173-84, 2005.

J'ai fait la mutagenèse de 10 des 15 mutants qui sont utilisés dans cette étude, fait la majorité des expériences en fluorescence et en électrophysiologie, j'ai effectué la presque totalité de l'analyse des résultats présentés dans l'article. J'ai aussi supervisé le travail des deux étudiants qui ont participé au projet lors d'un cours (PHY 3030) et d'un travail d'été (Andrea Holt et Francis Bourgeois). Bernadette Wallendorff a fait des expériences de K_i^{Pz} et de $K_m^{\alpha MG}$ pour 3 des mutants présentés dans l'article, faisant l'objet d'une partie de la Fig. 7. J'ai conçu les figures, j'ai écrit la première version de l'article et, avec l'aide de mon directeur de recherche, j'ai participé à toutes les étapes de sa révision.

Article 2

Identification of a disulfide bridge linking the 4th and the 7th extracellular loops of the Na⁺/glucose cotransporter

Gagnon D.G., Bissonnette P. & Lapointe J.Y.

The Journal of General Physiology, 127: 145-158, 2006.

J'ai initié ce projet durant la phase expérimentale finale pour l'article 1, fait la biologie moléculaire nécessaire à la création des 21 mutants ainsi que toutes les expériences de caractérisation, tant en électrophysiologie qu'en fluorescence. J'ai fait la totalité de

l'analyse des résultats. J'ai aussi travaillé sur le modèle cinétique afin d'en comprendre les étapes affectées par certaines mutations. Pierre Bissonnette a effectué le Western blot pour la Fig. 3 de l'article. Finalement, j'ai conçu les figures et rédigé le premier jet du manuscrit, qui a ensuite été corrigé par les autres auteurs.

Article 3

Effect of substrate on the presteady state kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter

Gagnon D.G., Frindel C. & Lapointe J.Y.

Soumis le 23 juin, version révisée soumise le 5 septembre, accepté le 5 octobre dans *The Biophysical Journal*, sous presse. Ms # 092296.

Certains résultats obtenus lors de la caractérisation des mutants C255A et C511A présentés dans l'article 2 m'ont donné l'idée du projet que j'ai soumise à mon directeur de recherche. J'ai effectué les expériences et les ai analysées. J'ai poursuivi l'analyse grâce au modèle cinétique préalablement développé, je l'ai modifié afin de tenir compte de la liaison du glucose et j'ai ensuite supervisé Carole Frindel, une étudiante faisant le cours PHY 3030 et un stage dans le laboratoire, pour la poursuite des simulations et de l'analyse de ces résultats. J'ai fait les figures et rédigé l'article qui a ensuite été corrigé par mon directeur de recherche. J'ai participé activement à tout ce qui a eu trait à sa révision pour la publication dans *The Biophysical Journal*.

Article 4

Voltage-clamp fluorometry in the local environment of the C255-C511 disulfide bridge of the Na⁺/glucose cotransporter

Gagnon D.G., Frindel C. & Lapointe J.Y.

Soumis dans *The Biophysical Journal* le 22 septembre, accepté pour publication le 2 novembre 2006. Ms # 097964.

J'ai amélioré le montage expérimental et effectué toutes les expériences en fluorescence en condition de voltage imposé et les ai analysées. J'ai supervisé le travail de Carole Frindel sur le modèle de fluorescence, basé sur le modèle cinétique (présenté dans l'article 3) et sur mes mesures expérimentales. J'ai conçu les figures et écrit le manuscrit qui a été corrigé par mon directeur de recherche.