



Doctoral Thesis

High affinity phlorizin binding to the small intestinal Na exp +, D-glucose carrier

Author(s):

Toggenburger, Gerhard

Publication Date:

1979

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000191099> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss ETH 6383

HIGH AFFINITY PHLORIZIN BINDING TO THE SMALL
INTESTINAL Na^+ , D-GLUCOSE CARRIER

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of Doctor of Natural Sciences

presented by

GERHARD TOGGENBURGER

dipl. Natw. ETH

born June 26th 1951

citizen of Zurich

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. G. Semenza, referee
Prof. Dr. A. Rothstein, co-referee

1979

9. SUMMARY / ZUSAMMENFASSUNG

A rapid phlorizin binding assay was developed, which allowed the precise measurement of phlorizin binding to rabbit intestinal brush border vesicles. It was possible to identify up to 80 % of the 2 s phlorizin binding sites with the Na⁺-dependent D-glucose carrier. This identity was demonstrated by the following observations:

- (i) The K_d value of the high-affinity phlorizin binding sites match the K_i value of phlorizin inhibition of D-glucose transport. K_d and K_i are in the presence of a 100 mM NaSCN gradient, $4,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$ and $7,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ($\bar{x} \pm \text{SE}$) respectively.
- (ii) The K_d - and K_i -values for phlorizin change in parallel depending on the experimental conditions.
- (iii) D-glucose inhibits high-affinity phlorizin with a K_i of 100 μM which is not statistically different from its K_t for D-glucose transport (the experiments were performed in the presence of 100 mM NaSCN_{out} and 0 mM NaSCN_{in}).
- (iv) The potency of phlorizin as an inhibitor of D-glucose transport parallels the time required for phlorizin to associate to its sites. This was obvious from comparing the time courses of K_i and phlorizin binding at very short incubation times.

Phlorizin binding to brush border membrane vesicles is strictly Na^+ -dependent. The binding can be increased many fold by establishing a $\Delta \Psi$ across the membrane (negative inside). $\Delta \Psi$ was generated by various methods:

- (1) different rheogenic permeable ion gradients were established across the membrane
- (2) $\Delta \Psi$ was varied by the use of the ionophore valinomycin
- (3) binding was measured during the dissipation of $\Delta \Psi$

The $\Delta \Psi$ dependence of phlorizin binding to the D-glucose translocator was discussed in terms of a currently accepted Na^+ -D-glucose co-transport model. The $\Delta \Psi$ dependence of phlorizin binding can be taken as an independent criterion for the transport protein being mobile, at least in some part.

Using Geck and Heinz' test it appears that the net charge of the unloaded mobile part (including the binding sites of Na^+ and glucose) of the D-glucose transporter is electrically neutral ($z = 0$). This holds true if the carrier system behaves almost symmetrically. However, if the carrier system functions extremely asymmetrically further studies are required to support the conclusion that $z = 0$.

The pH dependence of phlorizin binding and phlorizin inhibition of D-glucose transport indicates that it is the protonated (uncharged) form of phlorizin that binds to the D-glucose carrier protein.

It was shown that phlorizin behaves like a ligand bound to the D-glucose transport system, and that it is not released into the inner compartment. In fact:

- (i) The time course of phlorizin binding is more similar to D-glucose influx rate than to D-glucose uptake.
- (ii) The initial increase in phlorizin binding is reflected in a parallel decrease of the inhibitor constant K_i .
- (iii) Almost all of D- and L-glucose and methionine taken up into their osmotic space was released into the medium following osmotic shock whereas most of the phlorizin remained associated with the vesicles under identical conditions.
- (iv) Zn^{2+} inhibits D-glucose efflux but does not affect the release of phlorizin. In addition, D-glucose efflux was affected by different $\Delta\Psi$ whereas phlorizin efflux remained unaltered.

Papain treatment of intestinal brush border vesicles results in a remarkable loss of protein not involved in D-glucose transport. The specific D-glucose transport activity and the high-affinity phlorizin binding sites are enriched by a factor of two, or of two to three respectively, upon papain digestion.

In dieser Dissertation wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, die Phlorizinbindung an Bürstensaummembranvesikeln von Kaninchendünndärmen zu bestimmen. Während eines Zeitraums von 2 s bindet Phlorizin zu 80 % an das D-Glukose Transportsystem:

- (i) Die Dissoziationskonstante K_d der hochaffinen Bindungsstellen für Phlorizin stimmt in hohem Grade mit der Konstanten K_i der Hemmung des Zuckertransports durch Phlorizin überein.

In Anwesenheit eines 100 mM NaSCN Gradienten wurden für K_d $4,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$ und für K_i $7,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ($\bar{x} \pm \text{SE}$) bestimmt.

- (ii) Die K_d - und K_i -Werte ändern sich in gleicher Weise je nach den experimentellen Bedingungen.

- (iii) D-Glukose verdrängt Phlorizin von seiner hochaffinen Bindungsstelle mit einer K_i von 100 μM . Dieser Wert ist statistisch nicht verschieden von K_t der D-Glukose inbezug auf das Transportsystem.

- (iv) Der zeitliche Verlauf der Hemmung des D-Glukose Transports durch Phlorizin ist vergleichbar mit demjenigen der Bindung von Phlorizin an das Transportsystem.

Die Phlorizinbindung ist streng Na^+ - abhängig. Messungen in Anwesenheit von verschiedenen $\Delta\psi$ zeigen den grossen Einfluss von $\Delta\psi$ auf die Bindung. Diese Tatsache untermauert die aus kinetischen Messungen des D-Glukose Transports abgeleitete Forderung, wonach mindestens ein Teil des Transportproteins mobil sein muss. Weitere

kinetische Analysen des Zuckertransports deuten darauf hin, dass der mit Na^+ und Glukose unbeladene, mobile Teil des Carriers neutral sein könnte ($z = 0$). Dies gilt vorläufig jedoch nur, falls der Carrier funktionell symmetrisch ist.

Die pH-Abhängigkeit der Phlorizinbindung lässt den Schluss zu, dass es die protonierte (neutrale) Form von Phlorizin ist, die an das D-Glukose Transportprotein bindet.

Phlorizin verhält sich gegenüber dem D-Glukose Transportsystem als Ligand, und nicht als Substrat, das transportiert wird:

- (i) Der zeitliche Verlauf der Bindung stimmt eher mit dem Zeitverlauf der Geschwindigkeit des D-Glukose Influx als mit der D-Glukose Aufnahme überein.
- (ii) Die anfängliche Zunahme der Bindung bewirkt eine Abnahme der Hemmkonstanten K_i .
- (iii) Im Gegensatz zu L-Methionin, zu D- und L-Glukose, bleibt Phlorizin nach osmotischem Schocken mit den Membranen assoziiert.
- (iv) Zn^{2+} hemmt den D-Glukose Efflux, während die Abdissoziation von Phlorizin durch Zn^{2+} nicht beeinflusst wird. Im Gegensatz zu Phlorizinabdissoziation ist der D-Glukose Efflux potencialabhängig.

Durch negative Reinigung der Vesikel konnte die spezifische Transportaktivität zweifach, die hochaffine Phlorizinbindung zweifach bis dreifach angereichert werden.