



Doctoral Thesis

Phlorizin derivatives as photoaffinity labels of the Na⁺, D-glucose transporter in brush border membranes

Author(s):

Hosang, Markus

Publication Date:

1981

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000241645> →

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 No 6874

PHLORIZIN DERIVATIVES AS PHOTOAFFINITY LABELS OF THE
Na⁺, D-GLUCOSE TRANSPORTER IN BRUSH BORDER MEMBRANES

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

presented by

Markus Hosang

Dipl. Natw. ETH

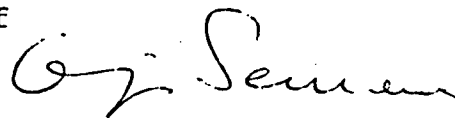
born September 9th, 1951

citizen of Hausen/AG

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. G. Semenza, referee

Prof. Dr. H. Murer, co-referee



1981

Parts of this thesis will be published in the following articles:

- Hosang, M., Vasella, A. and Semenza, G. (1981)
Biochemistry, in press
- Hosang, M., Gibbs E.M., Diedrich, D.F. and Semenza, G.
(1981) FEBS letters, in press

SUMMARY

A series of photolabile derivatives of phlorizin have been synthesized as photoaffinity labels of the (phlorizin binding component of the) Na^+ D-glucose transporter in brush border membranes. These derivatives carry the photoreactive (nitroaryl)azido group either in position 6 of the glucopyranosyl moiety (6-azido-6-deoxyphlorizin, N-(2-nitro-4-azidophenyl)- β -alanyl-6-O-phlorizin (NAP- β -Ala-Phlz), N-(2-nitro-4-azidophenyl)-6-amino-6-deoxyphlorizin and N-(2-nitro-4-azidophenyl)- β -alanyl-6-amino-6-deoxyphlorizinamide) or in the ring B of the aglycone moiety (4-azidophlorizin).

Like phlorizin ($K_i \approx 8 \mu\text{M}$), these derivatives competitively inhibited D-glucose uptake in rabbit small-intestinal brush border membrane vesicles in the presence of a NaSCN-gradient ($K_i \approx 10, 48, 40, 148$ and $139 \mu\text{M}$, respectively). In addition they inhibited specific phlorizin binding to vesicles and to DOC extracted membranes to a similar extent.

Repeated short-time photolysis of NAP- β -Ala-Phlz with visible light under anaerobic conditions in the presence of membrane vesicles resulted in a specific (phlorizin-protectable) reduction of $\Delta \tilde{J}_{\text{Na}^+}$ -driven accumulative D-glucose uptake and of D-glucose tracer exchange in these vesicles. Also Na^+ -dependent binding of (^3H)-phlorizin to DOC extracted membranes was specifically and irreversibly blocked under the same photolysis conditions. Since only phlorizin, and not its 4'-isomer (para-phlorizin; a very weak inhibitor of D-glucose uptake) protected the inactivation of D-glucose tracer exchange and phlorizin binding, it is concluded that NAP- β -Ala-Phlz specifically inactivates the small-intestinal Na^+ D-glucose transporter by binding covalently to the substrate binding site.

Photolysis of (^3H)-NAP- β -Ala-Phlz in the presence of both intact vesicles and DOC extracted membranes resulted in the labeling of a variety of protein bands as shown when the membranes were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. However, specific labeling (phlorizin but not para-phlorizin protectable, Na^+ -dependent) of a band could not be detected.

Photolysis of 4-azidophlorizin with light of wavelength λ 315 nm in the presence of brush border vesicles or DOC extracted membranes led to an irreversible inhibition of D-glucose tracer exchange and Na^+ -dependent phlorizin binding, respectively; there being a stronger unspecific photoinactivation (in the absence of photolabel) of the transporter by this light than by visible light. Photolysis of (^3H)-4-azidophlorizin in the presence of DOC extracted membranes resulted, besides the (unspecific) labeling of a variety of bands, in the specific labeling of a minor protein band with an apparent molecular weight of approximately 72,000 D: (i) the presence of 200 μM phlorizin during photolysis, but not, or only to a lesser extent, the presence of 200 μM para-phlorizin, prevented the band from being labeled; (ii) labeling of this band was reduced when Na^+ in the photolysis incubation was replaced by choline $^+$ or K^+ ; (iii) labeling of this band was increased when membranes were used in which the "carrier density" was enriched by "negative purification", i.e., by DOC extraction or by DOC extraction plus KI extraction. It is proposed therefore, that the 72,000 D band is the Na^+ , D-glucose transporter or a part of it.

Finally the "in dark" reversible inhibitory potencies of the various phlorizin derivatives provide some indirect information on the mode of interaction of phlorizin and its derivatives with the binding site of the transporter.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Reihe von photoreaktiven Derivaten von Phlorizin wurden als mögliche Photoaffinitätsmarker des Na^+ , D-Glukose Transporters (oder seiner Phlorizin-bindenden Untereinheit(en)) in Bürstensaummembranen synthetisiert. Diese Derivate tragen die photo-reaktive (Nitroaryl)azido Gruppe entweder in Position 6 des Glukopyranosylrests (6-azido-6-deoxyphlorizin, N-(2-nitro-4-azido phenyl)- β -alanyl-6-0-phlorizin (NAP- β -Ala-Phlz), N-(2-nitro-4-azidophenyl)-6-amino-6-deoxyphlorizin und N-(2-nitro-4-azidophenyl)- β -alanyl-6-amino-6-deoxyphlorizinamide) oder im Ring B des Aglykon-Rests (4-Azidophlorizin).

Im Dunkeln hemmten diese Derivate die D-Glukoseaufnahme in Bürstensaummembranvesikel von Kaninchendünndärmen unter einem 100 mM NaSCN Gradienten in vollständig kompetitiver Weise ($K_i' = 10, 48, 40, 148$ und $139 \mu\text{M}$, respektive). Der K_i' -Wert von Phlorizin war $8 \mu\text{M}$. Im weiteren hemmten diese Derivate die spezifische Phlorizinbindung an Vesikel und an DOC-extrahierte Membranen in ähnlichem Ausmass.

Wiederholte Kurzzeitphotolyse (10 s) von NAP- β -Ala-Phlz mit sichtbarem Licht unter Sauerstoffausschluss in Anwesenheit von Membranvesikeln führte zu einer spezifischen (Phlorizin-schütz-baren) irreversiblen Hemmung der D-Glukoseaufnahme in Anwesenheit eines 100 mM NaSCN Gradienten und des D-Glukose "Tracer-Exchange". Unter den gleichen Photolysebedingungen wurde die Na^+ -abhängige Phlorizinbindung an DOC-extrahierten Membranen ebenfalls spezifisch und irreversibel erniedrigt. Da nur Phlorizin, nicht aber sein 4'-Isomeres (para-Phlorizin; ein sehr schwacher Hemmer der D-Glukoseaufnahme) gegen Inaktivierung des D-Glukose "Tracer-Exchange" und der Phlorizinbindung schützte, darf man schliessen, dass die beobachtete irreversible Hemmung des Na^+ , D-Glukose Transporters nach Photolyse in Gegenwart von NAP- β -Ala-Phlz darauf beruht, dass der Label kovalent an die Substratbindungsstelle gebunden wird.

Photolyse von (^3H)-NAP- β -Ala-Phlz in Anwesenheit von Membranen führte zur Markierung einer Vielzahl von Membranproteinen, wie aus SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese ersichtlich war, unabhängig davon, ob intakte oder DOC-extrahierte Membranen markiert wurden. Spezifische Markierung einer Bande (Phlorizin-, aber nicht Para-Phlorizin schützbar, Na^+ -abhängig) konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Bestrahlung von 4-Azidophlorizin in Gegenwart von Vesikeln oder DOC-extrahierten Membranen mit Licht mit $\lambda > 315$ nm führte ebenfalls zu einer irreversiblen Hemmung des D-Glukose "Tracer Exchange" und der Phlorizinbindung. Die unspezifische Beschädigung des Transporters durch dieses Licht (in Abwesenheit von Label) war jedoch stärker als diejenige, welche durch sichtbares Licht verursacht wurde. Photolyse von DOC-extrahierten Membranen in Anwesenheit von (^3H)-4-Azidophlorizin führte neben beträchtlichem (unspezifischem) Labeling, zur spezifischen Markierung einer feinen Proteinbande mit dem scheinbaren Molekulargewicht von 72,000 D: (i) Die Markierung dieser Bande wurde in der Gegenwart von 200 μM Phlorizin stark unterdrückt; in der Gegenwart von 200 μM para-phlorizin hingegen war die Reduktion nicht vorhanden oder sehr viel schwächer. (ii) Die Markierung dieser Bande wurde vermindert, wenn Na^+ (100 mM) im Photolysepuffer isoosmolar durch K^+ oder Cholin^+ ersetzt wurde. (iii) Die Markierung dieser Bande war verstärkt, wenn Membranen verwendet wurden in denen der Transporter durch "negative Reinigung" "angereichert" war, d.h. nach DOC oder DOC und KI Extraktion.

Aus den relativen Hemmvermögen der einzelnen Phlorizinderivate konnten indirekte Hinweise auf die Art der Wechselwirkung von Phlorizin und seinen Derivaten mit der Bindungsstelle des Transporters erhalten werden.