

**Bindungs- und Aufnahmestudien von Eisen und Uranyl
an intestinalen Bürstensaummembranvesikeln**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels
Doktor der Naturwissenschaften
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

GLORIA PEREWUSNYK

dipl. Natw. ETH

geboren am 26. April 1960
von Baden (AG)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. W. Schneider, Referent
Prof. Dr. H. Hauser, Korreferent
Dr. F. Funk, Korreferent

Zürich 1994

Zusammenfassung

Die Aufnahme von Eisen und Uranyl in intestinale Bürstensaummembranvesikel (BBMV) von Ratten und Kaninchen wurde untersucht. In Kombination mit einer Lokalisierungsstrategie unter Verwendung von Sephadexsäulen hat sich diese Methode als brauchbares Instrument zur Aufklärung der Aufnahmeprozesse und der darin involvierten Metallspezies erwiesen. Die Methode ist geeignet für Studien zur Entwicklung von optimalen Präparaten für die orale Eisentherapie, und auch zur Beurteilung von präventiven Massnahmen bei Verseuchungen von Trinkwasser und Nahrung mit radioaktiven Stoffen aus der Gruppe der Aktinide, wie am Beispiel des Uranyls gezeigt werden konnte.

Die BBMV wurden in Inkubationsmedien suspendiert, welche überschüssiges Nitrilotriacetat (NTA) in gepufferter Lösung (pH 7.4) enthielten. In diesen Lösungen sind die Komplexe $\text{FeNTA}(\text{OH})^-$ und UO_2NTA^- gegenüber der hydrolytischen Vernetzung von Fe(III) bzw. U(VI) leicht instabil. Diese liegen zu signifikanten Anteilen als kleinere polynukleare Hydroxokomplexe vor.

Die Verteilung des im Uptake gemessenen Eisens bzw. Uranyls auf vier Kompartimente wurde bestimmt, nämlich auf

- a) äussere Membrangrenzschicht
- b) innere Membrangrenzschicht
- c) Membraninnenphase
- d) wässrige Phase im Vesikelinnern.

Danach ist je etwa ein Drittel des Eisens an die beiden Bürstensaummembran-seiten gebunden. Rund ein Viertel befindet sich innerhalb der Membrandoppelschicht. Das in ungebundener Form im Vesikelinnenraum vorliegende Eisen (ca. 8 %) entspricht dem Gleichgewichtszustand mit dem Aussenmedium.

Die Verteilung für Uranyl sieht folgendermassen aus: Zwei Drittel des Uranyls sind an die Membranaussenseite gebunden, etwa ein Zehntel befindet sich in der Membrandoppelschicht, und demnach muss ein Fünftel des im Uptake gemessenen Uranyls im Vesikelinnenraum lokalisiert sein. Aus experimentellen Gründen, insbesondere wegen der hohen Bindungskapazität der Sephadexsäule für Uranyl, ist jedoch die Verteilung dieses Aktinids zwischen wässriger Innenphase und der inneren Membranoberfläche nicht bestimmbar. Für den

Gleichgewichtszustand müsste sich ca. 1 % des totalen Vesikeluranyl in der wässrigen Innenphase befinden. Betrachtet man die Menge Eisen in diesem Kompartiment und die Attraktion der äusseren Membranoberfläche für das Uranyl, so erscheint dieser Anteil durchaus realistisch zu sein.

Diese Verteilungen und ihre zeitliche Evolution werden durch die Speziesverteilung im Inkubationsmedium und die Kinetik der koordinativen Umwandlungen in den BBMV-Kompartimenten bestimmt. Die Resultate zeigen, dass die aktiven Uptake- bzw. Transportspezies im Falle von Eisen die Zwillinge mononukleares (mn-)Fe(OH)₃ und FeNTA(OH)⁻ sind, welche rasch ineinander übergehen können. Dies bestätigt anderweitige Indizien, wonach jede Eisen(II,III)-Verbindung in Aufnahmesystemen nur eine Quelle von mononuklearen Fe(OH)₃ ist, deren Erzeugungsrate die Bioverfügbarkeit bestimmt.

Eine analoge Situation findet sich beim Uranyl. Hier gewährleistet die NTA-katalysierte Auflösung von (UO₂)₃(OH)₅⁺ eine stationäre UO₂NTA⁻ - Konzentration. Der Komplex UO₂NTA⁻ ist nur der Vorläufer von UO₂(OH)⁺, dem Analogen zum mn-Fe(OH)₃. Das entscheidende Zwillingsspaar ist nunmehr UO₂NTA⁻/UO₂(OH)⁺.

In enger Verbindung mit den erwähnten Befunden über Metallkompartimentierung und relevante Metallspezies lassen sich auch Schlussfolgerungen über die Frage des Transportmechanismus ziehen: Weder Eisen noch Uranyl müssen die Membran notwendigerweise mittels spezieller Proteincarrier durchdringen. Die Gesamtheit der Membranproteine könnte über lokale Interaktionen eine makroskopische Penetration der Membran gewährleisten.

Summary

The uptake of iron and uranyl in intestinal brush border membrane vesicles (BBMV) of rats and rabbits was examined. In combination with a localization strategy by running Sephadex columns, this method proved to be a useful tool for the determination of the metal species involved in the uptake processes. The procedure is suitable for optimizing the absorbability of oral iron preparations. In addition the method is useful for developing prophylactic treatment following intake of radioactive nuclides, such as the actinides, from contaminated drinking water or food. This could be shown in the case of uranyl.

Brush border membrane vesicles were incubated with media containing excess nitrilotriacetic acid (NTA) in buffered solutions (pH 7.4). The complexes $\text{FeNTA}(\text{OH})^-$ and UO_2NTA^- are slightly unstable in these solutions with regard to the hydrolytic polymerization of Fe(III) and U(VI), respectively. A significant amount of those metals is present in the form of small polynuclear hydroxo complexes.

The distribution of the iron or uranyl measured in the uptake was determined in the four compartments of the BBMV, namely

- a) outer membrane surface
- b) inner membrane surface
- c) membrane interior
- d) aqueous phase within the vesicles.

Approximately one third of the iron is bound on each side of the brush border membrane, one quarter is located within the membrane bilayer, and the amount of iron in the aqueous phase within the vesicles (ca. 8 %) corresponds to the equilibrium with the outer membrane concentration of iron.

In the case of uranyl, two thirds are bound to the outer membrane surface and approximately one tenth is located within the membrane bilayer. The space within the vesicles contains the remaining fifth of the uranyl measured in the uptake. Because of the high binding capacity of the Sephadex column for uranyl, among other experimental reasons, the distribution of this actinide between the aqueous phase within the vesicles and the inner membrane surface cannot be determined. To reach an equilibrium value, approximately 1 % of the total

uranyl associated with the vesicles should be placed in the aqueous phase within the vesicles. This fraction is reasonable, considering the amount of iron in this compartment and the affinity of the outer membrane surface for the uranyl.

These distributions and their time evolution are determined by the distribution of the species in the incubation medium and the kinetics of the coordinative transformations within the compartments of the BBMV. In the case of iron, the active species for uptake or transport are the twins mononuclear (mn-) $\text{Fe}(\text{OH})_3$ and $\text{FeNTA}(\text{OH})^-$, which convert very rapidly one to the other. This confirms previously reported results, suggesting that each iron(II,III)-compound in uptake systems represents merely a source of mononuclear $\text{Fe}(\text{OH})_3$. The bioavailability is controlled by its production rate.

A similar situation is found in uranyl uptake. The dissolution of $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$, mediated by NTA ensures a stationary UO_2NTA^- - concentration. The complex UO_2NTA^- is merely the precursor of $\text{UO}_2(\text{OH})^+$, i.e. the crucial twins are $\text{UO}_2\text{NTA}^-/\text{UO}_2(\text{OH})^+$.

Closely related to the findings mentioned above, in regard to the metal compartmentalization and the relevant metal species, it is possible to draw conclusions concerning the transport mechanisms. There is no evidence that a specific protein carrier was strictly required in both, iron and uranyl uptake. Rather, the macroscopic penetration of the membrane can be understood in terms of local interactions of mononuclear species with the variety of membrane proteins.