

Percentage inhibition data for L-leucine transport

Inhibitor (10 mM)	Inhibition of 5-sec uptake (% ± S.E.M.) Substrate (0.1 mM)
L-Methionine	65 ± 2 (9) ^a
L-Isoleucine	64 ± 2 (10)
L-Ethionine	60 ± 3 (5)
L-Norleucine	52 ± 3 (5)
L-Norvaline	51 ± 15 (4)
L-α-amino-n-butyric acid	48 ± 4 (5)
L-Valine	46 ± 4 (14)
L-Aminocyclopentane carboxylic acid (cycloleucine)	26 ± 4 (5)
Sarcosine	17 ± 7 (9)
L-Aminocyclopropane carboxylic acid	14 ± 7 (9)
L-Alanine	10 ± 5 (14)
L-Serine	9 ± 7 (5)
L-Lysine	5 ± 11 (5)
L-Proline	3 ± 8 (5)
D-Leucine (25 mM)	0 ± 4 (10)
β-Alanine	-5 ± 7 (10)
L-Glutamic acid	-9 ± 5 (5)
α-Aminoisobutyric acid (AIB)	-13 ± 8 (10)
(±) b-2-Aminobicyclo [2,2,1] heptane-2- carboxylic acid (BCH)	-15 ± 8 (10)
Glycine	-19 ± 15 (5)

^a Number of determinations. Experimental conditions described in text.

minimum requirement for activity. N-substitution, inverting the configuration about the α-carbon atom or incorporation of formal negative or positive charge into the sidechain either abolishes or severely limits reactivity. The requirement for an α-hydrogen atom is evidenced by the low apparent affinity of cycloleucine and its cyclopropyl analog; their higher and lower homologs, BCH and AIB, are excluded. An analogy can be drawn between the mediator receptive to leucine in this study and the L system formally defined for the Ehrlich cell by OXENDER and CHRISTENSEN³, because the reactivity of the latter agency is in proportion to the hydrocarbon mass of neutral amino acids, while AIB and N-substituted amino acids are excluded.

Zusammenfassung. Die Darmabsorption von Leucin wurde bei Hühnern in vitro im 5-Sekunden-Versuch untersucht und ein Absorptionssystem für Leucin beschrieben.

J. LERNER and D. S. MILLER

Department of Biochemistry, University of Maine, Orono (Maine 04473, USA), 24 April 1972.

³ D. L. OXENDER and H. N. CHRISTENSEN, J. biol. Chem. 238, 3686 (1963).

⁴ This investigation was supported by a grant from the Maine Agricultural Experiment Station (Hatch Project No. 880-241) awarded to J. L. Part of this work was taken from the Ph. D. thesis of D. S. M.

Influence du glucose sur le transport intestinal de la phénylalanine en présence et en absence de dinitrophénol

Il est généralement admis¹ que le transport actif des acides aminés et des sucres par l'entérocyte n'a lieu que si un gradient de concentration de sodium est maintenu de part et d'autre de la membrane luminale de la cellule. Les mécanismes générateurs de l'énergie nécessaire au maintien de ce gradient sont peu connus. Le dinitrophénol, agent découplant la phosphorylation oxydative, abaisse l'énergie intracellulaire, et diminue le transport des acides aminés et des sucres². Le but de ce travail a été d'étudier chez le rat les effets du glucose sur l'inhibition du transport intestinal de la phénylalanine provoquée par le dinitrophénol.

L'emploi du dinitrophénol a permis de nouvelles observations sur l'interaction entre les sucres et les acides aminés au niveau de l'absorption intestinale³.

Certains chercheurs⁴⁻⁷, utilisant chez le rat la méthode des sacs d'intestin retourné, ont observé que le glucose stimulait le passage d'acides aminés à travers la paroi du sac tandis que le galactose l'inhibait; ils en ont conclu que les acides aminés et les sucres entrent en compétition pour l'énergie nécessaire à leurs transports respectifs. On a déjà souligné ailleurs^{3,8} la faiblesse de cette théorie pour expliquer les interactions entre les sucres et les acides aminés, et les résultats obtenus dans notre travail avec le dinitrophénol suggèrent une autre explication.

Méthodes. On a prélevé et découpé en rondelles de 20-50 mg la partie terminale de l'intestin grêle de rats Wistar mâles anesthésiés à l'éther. Ces rondelles ont été incubées à 37 °C dans un tampon Krebs bicarbonate contenant de la L-phénylalanine-U-C¹⁴ en concentration 1 mM. En adjonction, les inhibiteurs suivants ont été utilisés: 2:4-dinitrophénol (1 mM), fluorure de sodium (10 mM), et glucose ou galactose (5,55 mM).

Tableau I. Analyse statistique des différences entre groupes expérimentaux

Différence	Valeur de F	Signification (P)
I et II	$F_{1,64} = 11,0$	< 0,01
III et IV	$F_{1,32} = 58,0$	< 0,01
IV et V	$F_{1,96} = 168,1$	< 0,01
V et VI	$F_{1,32} = 7,0$	0,01 < P < 0,05
V et VII	$F_{1,32} = 6,1$	0,01 < P < 0,05
VI et VII	$F_{1,32} = 0,3$	non significative

L'expérience a été planifiée en incubant 5 rondelles par rat pour chaque condition (le nombre de rats de chacune des conditions est précisé dans la légende de la Figure). Chaque paire de conditions a été soumise à une analyse de variance globale considérant les rats comme blocs casualisés et les rondelles individuelles comme répétitions.

¹ S. G. SCHULTZ et P. F. CURRAN, Physiol. Rev. 50, 637 (1970).

² J. W. L. ROBINSON et J.-P. FELBER, Gastroenterologia 104, 335 (1965).

³ J. W. L. ROBINSON et F. ALVARADO, Pflügers Arch. 326, 48 (1971).

⁴ H. NEWBY et D. H. SMYTH, Nature, Lond. 202, 400 (1964).

⁵ J. K. BINGHAM, H. NEWBY et D. H. SMYTH, Biochim. biophys. Acta 130, 281 (1966).

⁶ B. G. MUNCK, Biochim. biophys. Acta. 150, 82 (1968).

⁷ S. REISER et P. A. CHRISTIANSEN, Am. J. Physiol. 216, 915 (1969).

⁸ F. ALVARADO, Am. J. clin. Nutr. 23, 824 (1970).

Tableau II. Inhibition de la vitesse initiale de l'absorption de L-phénylalanine par le glucose en présence et absence de 2:4-dinitrophénol

Conditions expérimentales	Prise de phénylalanine (nmoles/100 mg tissu frais)
1 mM phénylalanine	82,7
1 mM phénylalanine + 5,5 mM glucose	71,9
1 mM phénylalanine + 1 mM DNP	52,7
1 mM phénylalanine + 1 mM DNP + 5,5 mM glucose	47,8

Les tissus ont été incubés 2 min à 37°C dans les solutions indiquées. Les résultats sont les moyennes de 8 rats différents, 5 rondelles par rat étant incubées sous chaque condition. Une analyse de variance en blocs casualisés avec répétitions montre que l'inhibition par le glucose en absence de DNP est très significative ($F_{1,64} = 20,5$), ainsi que l'inhibition par le DNP en absence de glucose ($F_{1,64} = 154,2$). L'inhibition par le glucose en présence de DNP est aussi significative ($F_{1,64} = 6,10$).

Deux séries d'incubation ont été réalisées, les unes d'une durée de 2 min pour déterminer la vitesse initiale d'entrée du substrat, les autres de 45 min, durée suffisante pour permettre l'établissement d'un équilibre entre tissu et milieu. A la fin de l'incubation, chaque segment a été rapidement rincé, essuyé, pesé et digéré dans 0,1 ml de KOH bouillant, puis sa radioactivité a été déterminée dans un compteur à scintillation liquide conformément aux méthodes décrites antérieurement².

Pour chaque série expérimentale, 5 rondelles provenant du même rat ont été incubées dans 10 ml de chacune des solutions. Les expériences ont été répétées sur au moins quatre rats différents. Nous avons utilisé pour l'évaluation statistique des résultats le modèle d'analyse de variance en blocs casualisés avec répétitions, ceci à cause des importantes variations enregistrées entre les échantillons, surtout dans les incubations ne contenant pas de glucose.

Résultats. Les résultats rapportés dans la Figure montrent que lors des incubations de 45 min le glucose a un effet inhibiteur sur l'accumulation tissulaire de phénylalanine, et que le dinitrophénol réduit la concentration intracellulaire presque au niveau de celle du milieu d'incuba-

tion. Par contre, l'adjonction de glucose au milieu contenant du dinitrophénol permet d'établir une concentration intracellulaire plus élevée que celle de l'extérieur. Le galactose est incapable de provoquer cette amélioration, et d'autre part si du fluorure est ajouté au milieu contenant déjà du glucose et du dinitrophénol, la stimulation par le glucose n'a plus lieu.

Les incubations de courtes durées (2 min) permettent de distinguer un effet sur l'entrée de substrat d'un effet survenant au cours des différentes phases d'équilibration⁹. Nous voyons que dans ce cas (Tableau II), le glucose seul provoque une diminution de la prise de phénylalanine; cette diminution subsiste en présence de dinitrophénol, ce qui diffère des observations rapportées dans la Figure. Le dinitrophénol a lui-même un effet inhibiteur sur l'entrée du substrat, ce qui a déjà été rapporté⁹.

Discussion. Ces résultats indiquent que le glucose exogène est capable de fournir suffisamment d'énergie par la

⁹ R. A. CHEZ, R. R. PALMER, S. G. SCHULTZ et P. F. CURRAN, J. gen. Physiol. 50, 2357 (1967).

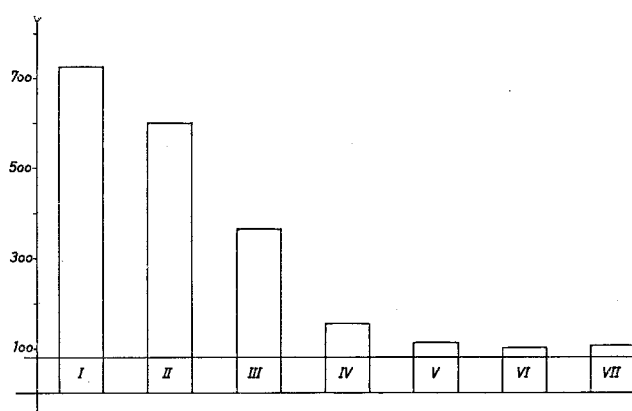


Figure. Absorption de L-phénylalanine par les rondelles d'intestin grêle de rat en présence de différents inhibiteurs:

- I (12) Phénylalanine (1 mM)
- II (8) Phénylalanine + 5,55 mM glucose
- III (4) Phénylalanine + 5,55 mM glucose + 10 mM NaF
- IV (12) Phénylalanine + 5,55 mM glucose + 1 mM DNP
- V (12) Phénylalanine + 1 mM DNP
- VI (4) Phénylalanine + 1 mM DNP + 5,55 mM glucose + 10 mM NaF
- VII (4) Phénylalanine + 1 mM DNP + 5,55 mM galactose

L'absorption est exprimée en nmoles de phénylalanine absorbée par 100 mg de tissu frais pendant une incubation de 45 min. Le nombre de rats utilisés pour chaque détermination est donné entre parenthèses. La ligne horizontale représente le niveau d'équilibration entre tissu et milieu. L'analyse statistique des différences est présentée dans le Tableau I.

voie glycolytique pour permettre un certain transport d'acides aminés même en présence de dinitrophénol. Cette hypothèse est confirmée par le fait que le fluorure, inhibiteur spécifique de la glycolyse, abolit l'effet du glucose. L'intestin de rat est particulièrement sensible à la présence de glucose dans le milieu d'incubation¹⁰; ceci pourrait expliquer la stimulation du transport des acides aminés par le glucose, qu'ont observée d'autres expérimentateurs⁴⁻⁷ lors de longues incubations. Le glucose, comme le galactose et d'autres sucres⁸, a un effet inhibiteur sur l'entrée initiale des acides aminés. Cet effet n'est visible, en présence de dinitrophénol, que lors de courtes incubations, puisque dans des incubations de longue durée, il est masqué par l'action énergétique du glucose.

Une explication possible de ces résultats serait celle de SEMENZA¹¹, selon laquelle l'inhibition du flux net des acides aminés serait due à une augmentation locale de sodium à l'intérieur des microvilli. Si ceci était vérifié dans notre expérience, on pourrait s'attendre à ce que l'inhibition entre glucose et phénylalanine soit plus grande en présence de dinitrophénol, car celui-ci favorise une accumulation intracellulaire de sodium⁹. Nous voyons que l'interaction est plus importante en absence de dinitrophénol. L'ensemble des résultats est en fait mieux expliqué par l'hypothèse d'une interaction allostérique entre les deux groupes de substrats (sucres et acides aminés) au ni-

veau d'un transporteur multifonctionnel dans la membrane luminale de la cellule épithéliale. Cette théorie a été exposée en détail dans d'autres publications récentes^{8, 12}.

Summary. Glucose inhibits the accumulation of L-phenylalanine by rat intestinal slices during 45-minute incubations. In the presence of DNP (which alone abolishes all active transport), glucose, but not galactose, significantly stimulates amino-acid uptake. However, during short incubations, glucose inhibits the entry of phenylalanine into the tissue, both in the presence and absence of DNP.

A.-L. LUISIER et J. W. L. ROBINSON¹³

*Département de Chirurgie Expérimentale,
Hôpital Cantonal Universitaire,
CH-1011 Lausanne (Suisse), 12 avril 1972.*

¹⁰ J. W. L. ROBINSON, Pflügers Arch. ges. Physiol. 294, 182 (1967).

¹¹ G. SEMENZA, Biochim. biophys. Acta 241, 637 (1971).

¹² F. ALVARADO, Boln. R. Soc. esp. Hist. Nat. (Biol.) 68, 33 (1970).

¹³ Ce travail a été subventionné par le Fonds National Suisse. Nous tenons à remercier Mmes C. BRANDT et U. PÄSSLER pour leur aide technique efficace.

Gas Liquid Chromatographic Analysis of Amino Acids in the Hemolymph of *Oncopeltus fasciatus*

Although it is well known that metabolite level in the blood of mammals controls feeding¹⁻³, this aspect of feeding control in insects has not been studied because of the lack of techniques for quantifying solutes in very small untreated biological samples. We have used gas liquid chromatography to quantify the amino acids in the hemolymph of the large milkweed bug and to demonstrate the affect of starvation on amino acids in the hemolymph.

A Varian 1520B gas chromatograph and Model 20 recorder with disc integrator were used. The 3' x 1/8" coiled glass columns were packed with 1.5% w/w OV17 on H.P. acid washed Chromosorb G⁴. The detector temperature was 250°C and the injector was 150°C. The program was 2°C/min from 75° to 225°C. N₂ gas flow was 55 ml/min and H₂ was 30 ml/min. A mixture of amino acids (2.5 mM each) was run repeatedly to determine retention temperature and to confirm the integrity of the column. The N-trifluoroacetyl n-butyl ester derivatives of the amino acids were injected on column.

Newly ecdysed 5th instar bugs were collected from the stock colony between 10.00 h and 13.00 h. On each day of the 5th instar, 2 µl of hemolymph was collected from 4 of these insects and the individual samples were analyzed for amino acids. The starved insects were deprived of food but not water for 24 h before bleeding.

The relative mole percent⁴ was calculated for each peak of the chromatogram. The relative mole percent of an amino acid equals the

Results. The values for hydroxyproline-proline, glutamic acid, and tryptophan were lower in the fed than in the starved insects (Table). The values for the fed and starved conditions were approximately the same for threonine-glycine, isoleucine-leucine, methionine, phenylalanine-aspartic acid-histidine, tyrosine, lysine, and arginine. The values for alanine and cystine were clearly higher in the fed insects than in the starved ones. There was little variation in the quantities of individual amino acids from day to day except for alanine, glutamic acid, and cystine. In the fed bugs, alanine showed 2 periods of high relative mole percent: at the beginning of the instar and again around day 5. The second peak was not present in the starved insects. Glutamic acid was highest at the beginning of the instar and then gradually decreased. The starved bugs surprisingly had higher relative mole percents than did the fed bugs on almost all days of the instar. Cystine

¹ J. D. DAVIS, R. L. GALLAGHER and R. LADOVE, Science 156, 1247 (1967).

² J. D. DAVIS, R. L. GALLAGHER, R. F. LADOVE and A. J. TURAUSKY, J. comp. Physiol. Psych. 67, 407 (1969).

³ A. E. HARPER, H. J. BENEVENGA and R. M. WOHLHUETER, Physiol. Rev. 50, 428 (1970).

⁴ C. W. GEHRKE, D. ROACH, R. W. ZUMWALT, D. L. STALLING and L. L. WALL, Quantitative Gas Liquid Chromatography of Amino Acids in Proteins and Biological Substances, Macro, Semimicro and Micro Methods (Analytical Biochemistry Laboratories, Inc., Columbia, Mo. 1968).

$$\frac{\frac{\text{area of amino acid peak}}{\text{amino acid standard molar response}}}{\frac{\text{areas of amino acid peaks}}{\text{amino acid standard molar response}}} \times 100$$

If a peak contained 2 or 3 unresolved amino acids, the upper denominator in the above formula was multiplied by 2 or 3, respectively.

in the fed insects was lowest at the beginning of the instar and then gradually increased to reach its highest concentration on the last day of the instar. The concentra-