

## **Transport des Hydroxyanalogons von Leucin in Bürstensaum-Membranvesikel des Kaninchendünndarms**

**M. Friedrich<sup>1</sup>, H. Murer<sup>2</sup> und E. G. Berger<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Zentralinstitut für Ernährung, Potsdam-Rehbrücke

<sup>2</sup> Physiologisches Institut der Universität Zürich

*Zusammenfassung:* Hydroxyanaloga essentieller Aminosäuren können ebenso wie ihre Ketoanaloga zur Minimierung der nutritiven Stickstoffaufnahme verwandt werden. In der vorliegenden Arbeit werden Mechanismen der intestinalen Absorption des L-Hydroxyanalogons von Leucin untersucht. Die Aufnahme dieses Substrates in Bürstensaum-Membranvesikel des jejunalen Kaninchendünndarms wird durch einen nach innen gerichteten Protonengradienten stimuliert ( $\text{pH}_{\text{außen}} 6,0$ ;  $\text{pH}_{\text{innen}} 7,5$ ). Die scheinbare Transportkonstante beträgt 15,4 mM. Durch das carrier-vermittelte Transportsystem werden gleichfalls L- und D-Stereoisomere der anderen Hydroxyanaloga verzweigkettiger Aminosäuren sowie L-Lactat aufgenommen.

*Summary:* Hydroxy analogues of essential amino acids can be used in clinical nutrition to minimize nitrogen intake. In this study intestinal uptake of L-leucine hydroxy analogue into rabbit jejunal brush-border membrane vesicles was investigated. An inward directed  $\text{H}^+$ -gradient was a driving force of uptake ( $\text{pH}_{\text{outside}} = 6.0$ ;  $\text{pH}_{\text{inside}} = 7.5$ ) and led to a transient accumulation. The saturable system has a apparent transport constant  $K_t = 15.4 \text{ mM}$ . By trans stimulation experiments it could be shown that both D- and L-stereoisomers of hydroxy analogues of branched chain amino acids as well as L-lactate share with the same  $\text{H}^+$ -driven uptake system.

*Schlüsselwörter:* Hydroxyanaloga von Aminosäuren,  $\text{H}^+$ -Ionen-stimulierter Transport, Bürstensaum-Membranvesikel

*Key words:* hydroxy analogues of amino acids, proton driven transport, brush-border membran vesicles

### **Abkürzungen**

HEPES = 4-(2-Hydroxyäthyl)piperazin-1-äthansulfonsäure;  $\text{L-(}^3\text{H)-LHA}$  =  $\text{L-(4,5-}^3\text{H)-Leucinhydroxyanalogon}$  ( $\text{L-(4,5-}^3\text{H)-2-Hydroxy-4-methyl-pentansäure}$ ); MES = 2-Morpholinoäthansulfonsäure; Tris = Tris (hydroxymethyl) aminomethan; FCCP = Carbonylcyanid-4-trifluormethoxyphenylhydrazon.

## Einleitung

Hydroxyanaloga essentieller Aminosäuren (Ausnahmen: Lysin und Threonin) können ebenso wie Ketoanaloga zur Senkung der Stickstoffaufnahme unter Bedingungen einer proteinrestriktiven Diät eingesetzt werden (1, 2, 3). Sie werden teilweise oder vollständig in ihre korrespondierenden Aminosäuren umgewandelt (4, 5). Im Vergleich zu Ketoanaloga sind sie leichter zu synthetisieren, chemisch stabiler und besitzen einen besseren Geschmack. Über Mechanismen des Transports von Hydroxy- oder Ketoanaloga durch intestinale Membranen ist nur soviel bekannt, daß das D, L-Hydroxyanalogon von Methionin durch Bürstensaum-Membranvesikel von Kaninchen und Huhn carriervermittelt aufgenommen wird (6, 7). Ob und welche Triebkraft die Aufnahme stimulieren kann, ist unbekannt.

## Material und Methoden

D- und L-Hydroxyanaloga verzweigtkettiger Aminosäuren sowie das L-(4,5- $^3\text{H}$ )-Leucinhydroxyanalogon wurden durch Desaminierung der entsprechenden Aminosäuren hergestellt. Bürstensaum-Membranvesikel aus dem Kaninchenjejunum wurden nach der Mg-Präzipitationsmethode hergestellt (8). Die intra- und extravasikulären Puffer hatten folgende Basiszusammensetzung (in mM): intravesikulär (300 Mannitol; 50 HEPES/Tris pH 7,5; 50  $\text{KNO}_3$ ), extravasikulär (300 Mannitol; 10 HEPES-40 MES/Tris pH 6,0; 300 Mannitol, 0,5 L-( $^3\text{H}$ )-LHA). Bei Zugabe von Effektoren wurde die Isoosmolalität auf Kosten von Mannitol eingehalten. Zur Ausschaltung von Membranpotentialen enthielten beide Kompartments das  $\text{K}^+$ -Ionophor Valinomycin (10  $\mu\text{M}$ ). Die Transportstudien wurden nach der Schnellfiltrationstechnik bei 25 °C durchgeführt. Bei Inkubationszeiten im Bereich von 1,5 s bis 5,5 s wurde eine halbautomatische Meßeinrichtung verwandt (9). Die Untersuchungen wurden an Membranvesikel-Präparationen von drei verschiedenen Kaninchen durchgeführt. Sie ergaben jeweils qualitativ gleiche Resultate. In der vorliegenden Mitteilung werden repräsentative Ergebnisse eines Tieres dargestellt. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte von jeweils drei bis sechs Paralleluntersuchungen einer Vesikelpräparation. Die Intaktheit der Bürstensaum-Membranvesikel wurde anhand der  $\text{Na}^+$ -Gradienten-stimulierten Aufnahme von L-( $^3\text{H}$ ) Leucin geprüft.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Aufnahme (pmol/mg Membranprotein) von 0,5 mM L-( $^3\text{H}$ )-LHA in die Membranvesikel erfolgt in Anwesenheit eines  $\text{H}^+$ -Gradienten ( $\Delta \text{pH} = 1,5$ ;  $\text{pH}_{\text{außen}} = 6,0$ ;  $\text{pH}_{\text{innen}} = 7,5$ ) mit einer mehr als fünffach höheren Anfangsgeschwindigkeit als mit einem  $\text{Na}^+$ -Gradienten ( $\text{pH}_{\text{außen}} = \text{pH}_{\text{innen}} = 7,5$ ;  $[\text{Na}^+]_{\text{außen}} = 108 \text{ mM}$ ,  $[\text{Na}^+]_{\text{innen}} = 0 \text{ mM}$ ) und einer 20fach höheren Geschwindigkeit als ohne  $\text{H}^+$ -Gradienten. In Gegenwart des  $\text{H}^+$ -Gradienten liegt innerhalb der ersten Minuten intravesikulär eine höhere Konzentration von L-( $^3\text{H}$ )-LHA vor, als es der Gleichgewichtskonzentration nach 60 min entspricht (Abb. 1). Der Protonengradient stellt somit die dominierende Triebkraft des Membrantransports von L-( $^3\text{H}$ )-LHA dar.

Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit (pmol/s · mg Membranprotein) von L-( $^3\text{H}$ )-LHA unterliegt einer Sättigungskinetik. Die scheinbare Transportkonstante  $K_t$  errechnet sich aus dem Eadie-Hofstee-plot mit 15,4 mM. Die Aufnahme von L-( $^3\text{H}$ )-LHA erfolgt somit carriervermittelt. Die Trans-

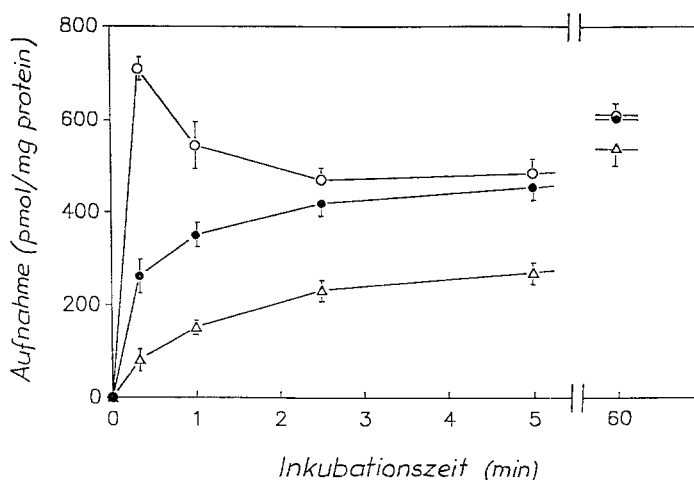


Abb. 1. Zeitverlauf der Aufnahme des L-(<sup>3</sup>H)-Leucinhydroxyanalogons in Bürstensaum-Membranvesikel.

Intravesikularpuffer in Material und Methoden angegeben. Nach Mischung von 1 Vol Membranvesikelsuspension und 4 Vol Substratpuffer ergeben sich folgende extravesikuläre Pufferzusammensetzungen (in mM):

H<sup>+</sup>-Gradient (---○---): 0,5 L-(<sup>3</sup>H)-LHA, 300 Mannitol, 10 HEPES – 40 MES/Tris pH 6,0, 50 KNO<sub>3</sub>, 0,01 Valinomycin. Na<sup>+</sup>-Gradient (---●---): 0,5 L-(<sup>3</sup>H)-LHA, 100 Mannitol, 108 NaCl, 50 HEPES/Tris pH 7,5, 50 KNO<sub>3</sub>, 0,01 Valinomycin. Gradientenfrei (---△---): 0,5 L-(<sup>3</sup>H)-LHA, 300 Mannitol, 50 HEPES/Tris pH 7,5, 50 KNO<sub>3</sub>, 0,01 Valinomycin.

Die Daten ergeben sich aus vier Parallelmessungen ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) einer Vesikelpräparation.

portkonstante liegt im gleichen Bereich wie diejenige der H<sup>+</sup>Gradienten-stimulierten L-Lactat-Aufnahme in Membranvesikel des jejunalen Kaninchendünndarms (10).

Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit von 0,5 mM L-(<sup>3</sup>H)-LHA in Membranvesikel ist in Gegenwart folgender strukturanaloger Verbindungen, die in einer Konzentration von 20 mM im extravesikulären Kompartiment vorliegen, erniedrigt (cis-Inhibition): L-Hydroxyanaloge von Leucin, Isoleucin und Valin (42%–45% Hemmung), D-Hydroxyanaloge von Leucin und Valin (36%–42%) sowie L-Lactat (25%). Die drei verzweigtkettigen Aminosäuren zeigen keinen Hemmeffekt.

Die Entscheidung, ob der Hemmeffekt tatsächlich auf eine Beteiligung an dem L-(<sup>3</sup>H)-LHA-Carrier zurückzuführen ist, wird durch trans-Stimulationsexperimente getroffen. Die Membranvesikel werden mit 10 mM der genannten Substanzen beladen. Sofern der Austritt in das extravesikuläre Kompartiment durch den gleichen Carrier erfolgt, wird das auf den Konzentrationsunterschieden beruhende chemische Potential für eine beschleunigte initiale Aufnahmegeschwindigkeit von L-(<sup>3</sup>H)-LHA aus dem extra- in das intravesikuläre Kompartiment genutzt werden. Die L- und D-Hydroxyanaloge der verzweigtkettigen Aminosäuren stimulieren

Tab. 1. Transstimulation der  $H^+$ -Gradienten-vermittelten Aufnahme des L-( $^3H$ )-Leucinhydroxyanalogons in Bürstensaum-Membranvesikel.

Effektor	L-( $^3H$ )-LHA (pmol/s · mg Protein)	%
Kontrolle	44,1 ± 3,1	100
L-Lactat	74,9 ± 4,3	170
L-Leucinhydroxyanalogon	74,1 ± 5,1	168
L-Isoleucinhydroxyanalogon	77,3 ± 3,6	175
L-Valinhydroxyanalogon	75,0 ± 3,6	170
D-Leucinhydroxyanalogon	70,2 ± 4,5	159
L-Leucin	42,9 ± 4,0	97

Bürstensaum-Membranvesikel ( $\approx 30$  mg Membranprotein/ml Puffer) (Pufferzusammensetzung: Material und Methoden) werden bei 25 °C über 60 min in ein Puffersystem mit folgender Endkonzentration (in mM) überführt: 50 HEPES/Tris pH 7,5; 50  $KNO_3$ , 290 Mannitol (Kontrolle: 300 Mannitol), 10 Effektor (mit Tris auf pH 7,5) (Kontrolle: ohne Effektor), 0,01 Valinomycin.

Bürstensaum-Membranvesikelsuspension (1 Vol) und Substratpuffer (12,5 Vol) werden gemischt (Start). Der extravesikuläre Puffer nimmt dabei folgende Zusammensetzung an (in mM):

0,5 L-( $^3H$ )-LHA, 0,75 jeweiliger Effektor, 50  $KNO_3$ , 3,7 HEPES/Tris – 46,3 MES/Tris pH 6,0, 299 Mannitol, 0,01 Valinomycin. Die Anfangsgeschwindigkeit wird als 4-s-Intervall zwischen Sekunde 1,5 und 5,5 nach dem Start gemessen.

Die Daten ergeben sich aus sechs Parallelmessungen ( $\bar{x} \pm SD$ ) einer Vesikelpräparation.

die Aufnahmegeschwindigkeit auf 120 %–140 % des Kontrollwertes, L-Lactat stimuliert sie auf 150 %, und L-Leucin ist ohne Einfluß auf die Aufnahmegeschwindigkeit von L-( $^3H$ )-LHA (Tab. 1).

Während die  $H^+$ -Gradienten-stimulierte L-( $^3H$ )-Aufnahme in Gegenwart des  $H^+$ -Ionophors FCCP erlischt, bleibt die  $Na^+$ -Gradienten-stimulierte L-( $^3H$ )-Aufnahme unbeeinflusst. Obwohl dieser Befund zunächst für die Unabhängigkeit beider Triebkräfte spricht, sind für die Klärung dieser Frage weitere Untersuchungen notwendig.

Es kann daher geschlußfolgert werden, daß die intestinale Aufnahme von Hydroxyanaloga verzweigtkettiger Aminosäuren nicht durch einfache Diffusion erfolgt, sondern carriervermittelt ist, daß die dominierende Triebkraft im Gegensatz zu den korrespondierenden Aminosäuren ein Protonengradient ist und daß der entsprechende Carrier keine oder nur eine geringe Stereospezifität besitzt.

#### Literatur

1. Editorial (1976) Nutr Reviews 34:22–23.
2. Mitch M, Walser M (1977) Clin Nephrol 8:341–344.
3. Bauerdick H, Spellerberg P, Lamberts B (1978) Am J Clin Nutr 31:1793–1796.
4. Chow KW, Walser M (1975) J Nutr 105:372–378.

5. Boebel K, Baker D (1982) *J Nutr* 112:1929–1939.
6. Brachet P, Puigserver A (1986) in: Alvarado F, van Os CM (Hrsg.): Ion Gradient-Coupled Transport, INSERM Symposium No 26. Elsevier Science Publisher BV, Amsterdam, pp 169–173.
7. Brachet P, Puigserver A (1987) *J Nutr* 117:1241–1246.
8. Biber J, Stieger B, Haase W, Murer H (1981) *Biochim Biophys Acta* 647:169–176.
9. Stieger B, Stange G, Biber J, Murer H (1983). *J. Membrane Biol* 73:25–37.
10. Tiruppathi C, Balkovetz DF, Ganapathy V, Miyamoto Y, Leibach FH (1988) *Biochem J* 256:219–233.

Eingegangen 15. April 1991  
akzeptiert 20. Juli 1991

Für die Verfasser:

Manfred Friedrich, Doz. Dr. sc. nat., Zentralinstitut für Ernährung, Arthur-Scheunert-Allee 114–116, O-1505 Bergholz-Rehbrücke