

**Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, 47. Mitt.¹:
Zum Transport von Gallenfarbstoffen durch Modellmembranen**

Dieter Eichinger und Heinz Falk*

Institut für Analytische, Organische und Physikalische Chemie,
Johannes-Kepler-Universität Linz, A-4040 Linz, Österreich

(Eingegangen 2. Dezember 1982. Angenommen 16. Dezember 1982)

*On the Chemistry of Pyrrole Pigments, XLVII:
The Transport of Bile Pigments Through Model Bulk Membranes*

Carrier mediated transport of bilirubin, biliverdin, their dimethylesters and aetiobiliverdin-IV- γ is measured using a variety of potential carriers like proteins, peptides, tensides and β -cyclodextrin in a bulk membrane model. A strong dependence of the transport flux densities on structural details of the carriers as well as of the bile pigments themselves is observed.

(Keywords: Bilirubin; Biliverdin; Carrier mediated Transport)

Einleitung

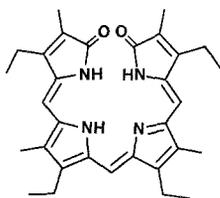
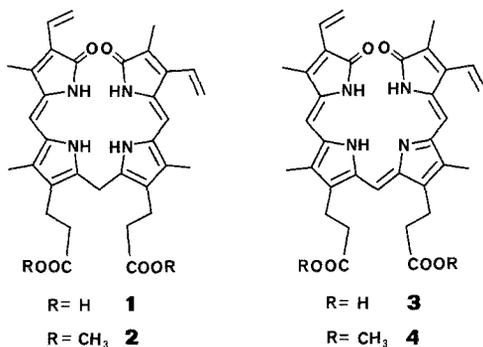
Das Problem des Transports von Gallenfarbstoffen stellt sich an mehreren Stellen des Metabolismus, der vom Häm bis zur Exkretion des Urobilinogens führt². So ist im Blutplasma der effiziente Transport von Bilirubin (**1**) durch die außerordentlich hohe Assoziationskonstante zwischen **1** und Albumin³ gewährleistet — die Übernahme von **1** durch die Bilitranslokase in der Sinusoidalmembran und die Weitergabe an das Innere der Leberzelle stellt ebenfalls einen solchen, wahrscheinlich durch einen Carrier vermittelten Transport dar⁴, der überdies noch durch die Glucuronidierung von **1** den erforderlichen Konzentrationsgradienten erhält. An der Canalicularmembran wiederum scheint ein Carrier entsprechender Selektivität für konjugiertes **1** die Abgabe in die Gallengänge zu vermitteln⁵. Aber auch die unterschiedliche Permeabilität der Placenta für Biliverdin und **1**⁶ dürfte in engerem Zusammenhang mit dem Problem von Transportsystemen für Gallenfarbstoffe stehen.

In einer vorangegangenen Mitteilung⁷ haben wir über den Transport von Ionen *mit* Hilfe von *Gallenfarbstoffen* durch Modellmembranen

berichtet. Diese Untersuchungen sollen nun in Hinblick auf die oben angedeuteten Problemkreise auf den Transport von Gallenfarbstoffen durch Modellmembranen erweitert werden.

Methodik — Experimentelle Details

Von den Gallenfarbstoffen war Bilirubin (**1**) kommerziellen Ursprungs (Fluka, p. A.), Bilirubindimethylester (**2**), Biliverdin (**3**), Biliverdindimethylester (**4**) und Aetiobiliverdin-IV- γ (**5**) stellte man nach Angaben der Literatur⁸⁻¹¹ dar. An Carriermodellen verwendete man Rinderserumalbumin (**6**, lyophilisiert und kristallisiert, M 66 000, SIGMA), Rinder- γ -Globulin (**7**, Cohn Fraktion II, ca. 99%, M 150 000, SIGMA), (*L*)-Polyalanin (**8**, Typ I A, M 5000, SIGMA), (*DL*)-Polylysin · HBr (**9**, Typ VI B, M 9000, SIGMA), Natrium-(*L*)-Polyglutamat (**10**, Typ I, M 14 000, SIGMA), Natrium-1-dodecansulfonat (**11**, für Tensiduntersuchungen, Merck), Natriumdesoxycholat (**12**, purum, Fluka), Kaliumoleat (**13**, techn. Fluka), β -Cyclodextrinhydrat (**14**, Aldrich), *N*-Cetyl-*N,N,N*-trimethylammoniumbromid (**15**, p. A. Merck), *N*-Benzyl-*N,N,N*-trimethyl ammonium-bromid (**16**, p. A. Merck) und Polyvinylpyrrolidon (**17**, M 30 000, Merck).



5

Die Transportexperimente führte man mit unten geschlossenen H-förmigen Röhren (10 cm Höhe, Verbindungsrohr in einer Höhe von 5 cm) mit einem Querschnitt von 1,76 cm² aus. Die beiden Schenkel enthielten die Senderphase [$4 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹ **1**, $1,3 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ **2**, $2 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹ **3**, $1,3 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ **4** bzw. **5** gelöst in 8 ml frisch über Al₂O₃ (Akt. Stufe II, Merck) filtriertem und entgastem

CHCl_3 (p. A. Merck)] bzw. die Empfängerphase (8 ml frisch über Al_2O_3 filtriertes und entgastes CHCl_3). Die Phasen wurden mit der Lösung des jeweiligen Carriers (15 ml einer 10^{-3} – 10^{-2} molaren Lösung) in entgastem dest. H_2O bzw. 10^{-4} molarem Phosphatpuffer so überschichtet, daß das Verbindungsrohr vollständig gefüllt war. Nach Spülen mit Argon setzte man das mit Durchstichstopfen verschlossene System in ein Bad ein ($20,00^\circ\text{C} \pm 0,05^\circ$) und rührte die drei Phasen unabhängig voneinander magnetisch (150 Umdrehungen pro min). Die Entnahme von Proben erfolgte über eine in die Empfängerphase permanent eingelegte Teflonkanüle, sie wurden spektrophotometrisch (Mikro-küvette, $l = 1$ cm, Perkin-Elmer-Spektrophotometer Mod. 330) bezüglich ihrer Konzentration vermessen. Für Bestimmung der Transportflußdichten ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) korrigierte man jeweils für den Leerwert, der aus einem Experiment ohne den Zusatz von Carrier bestimmt worden war. Der Transport verläuft linear mit der Zeit. Bei kleinen Transportflußdichten, die längere Meßzeiten erforderten (50–100 h), korrigierte man auch für die aus Kontroll-experimenten ermittelte Zersetzung der einzelnen Gallenfarbstoffe.

Ergebnisse und Diskussion

Zum Mechanismus des durch Carrier vermittelten Transports

Zunächst sei am Beispiel von **1** mit dem Carrier **15** dokumentiert, daß die Transportflußdichte J mit der Konzentration an **1** in der Senderphase linear korreliert (Abb. 1). Dies deutet auf einen einfachen

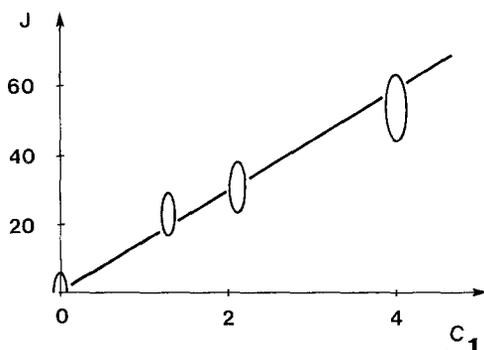


Abb. 1. Konzentrationsabhängigkeit ($C_1 \cdot 10^5 \text{ mol l}^{-1}$) der Transportflußdichte $J \cdot 10^{11}$ ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) von **1** bei einer Carrierkonzentration (**15**) von $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$

Transportprozeß hin, der durch eine „Komplexbildungsreaktion“ von Carrier und Substrat vermittelt wird. Untersucht man die Abhängigkeit der Transportflußdichte von der Carrierkonzentration, so werden zwei Fälle beobachtet: Im Falle z. B. des Albumins (**6**) wird ein linearer

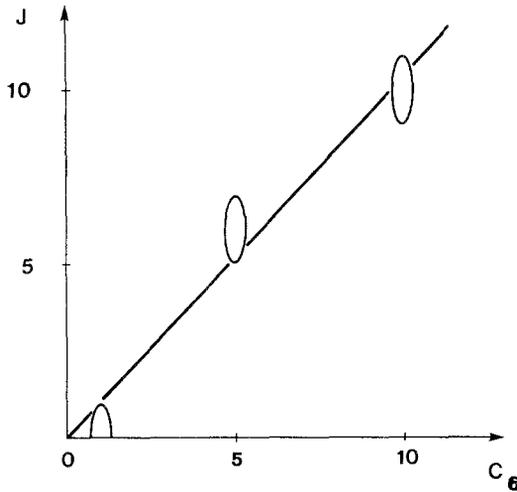


Abb. 2. Konzentrationsabhängigkeit ($C_6 \cdot 10^5 \text{ mol l}^{-1}$) der Transportflußdichte $J \cdot 10^{11} \text{ (mol m}^{-2} \text{ s}^{-1})$ von **6** bei einer Konzentration an **1** in der Donorphase von $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$

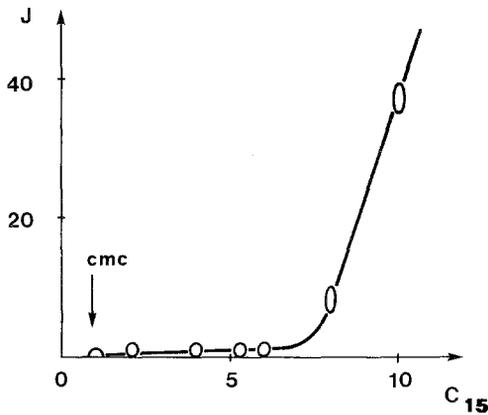


Abb. 3. Konzentrationsabhängigkeit ($C_{15} \cdot 10^3 \text{ mol l}^{-1}$) der Transportflußdichte $J \cdot 10^{11} \text{ (mol m}^{-2} \text{ s}^{-1})$ von **15** bei einer Konzentration an **1** in der Donorphase von $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$

Konzentrationsverlauf erhalten, wie er in Abb. 2 dargestellt ist. Ist jedoch der Carrier ein Tensid, wie z. B. **15**, so setzt der Transport erst etwa im Bereich der fünffachen kritischen Micellbildungskonzentration ($cmc = 9 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$)¹² ein, um dann ebenfalls einen linearen Konzentrationsverlauf zu ergeben, wie dies aus Abb. 3 hervorgeht.

Transport und Struktur des Carrier

Wie die Tabelle 1 zeigt, bestehen hinsichtlich der Strukturabhängigkeit des Carriers für **1** wesentliche Unterschiede. So wird Bilirubin (**1**) von Albumin (**6**) sehr gut, von Globulin (**7**) praktisch nicht transportiert. Sowohl saure als auch basische Polyaminosäuren **9**, **10** können als Carrier dienen, hingegen kaum die neutrale Polyaminosäure **8** oder Polyvinylpyrrolidon (**17**).

Tabelle 1. *Transportflußdichten (J , mol m⁻² s⁻¹) von **1** (Senderphase $4 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹) und Wechselzahlen der Carrier [$W = (\text{Moleküle } 1) / (\text{Carriermoleküls})$]*

Carrier	Konz. (mol l ⁻¹)	$J \cdot 10^{11}$	$W \cdot 10^{11}$
6	$1,0 \cdot 10^{-4}$	12 ± 1	1200 ± 100
7	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 0,5$	0 ± 10
8	$6,6 \cdot 10^{-4}$	3 ± 2	20 ± 15
9	$3,7 \cdot 10^{-4}$	6 ± 2	120 ± 40
10	$2,4 \cdot 10^{-4}$	5 ± 1	150 ± 30
11	$1,0 \cdot 10^{-2}$	300 ± 20	360 ± 30
12	$1,0 \cdot 10^{-2}$	3 ± 2	$1 \pm 0,7$
13	$1,0 \cdot 10^{-2}$	8 ± 2	$1 \pm 0,2$
14	$5,0 \cdot 10^{-3}$	21 ± 1	40 ± 2
15	$1,0 \cdot 10^{-2}$	37 ± 1	40 ± 1
16	$1,0 \cdot 10^{-2}$	0 ± 1	0 ± 1
17	$1,0 \cdot 10^{-3}$	0 ± 1	0 ± 1

Ebenso bestehen im Bereich der Tenside **11**, **12**, **13**, **15** und **16** ausgeprägte Unterschiede. Offenbar ist wenigstens eine lange aliphatische Kette des Micellbildners eine wesentliche Voraussetzung für seine Eignung als Carrier für **1**, vorausgesetzt, daß er in Konzentrationen oberhalb der *cmc* eingesetzt wird. Interessant ist in diesem Zusammenhang vor allem, daß Na-desoxycholat kaum über diesbezügliche Eigenschaften verfügt. Die molekulare Höhlung des β -Cyclodextrins ist aber offenbar imstande, zumindest durch Aufnehmen eines Teils von Bilirubin (**1**) einen wirksamen Transport zu ermöglichen.

Transport und Struktur des Gallenfarbstoffes

Tab. 2 faßt nun die Wechselzahlen der Pigmente **1**—**5** für vier ausgewählte Carrier zusammen.

Die Carrier **6**, **11**, **15** und **17** weisen weitgehende Selektivität für bestimmte Gallenpigmentstrukturtypen auf. So werden sowohl Bilirubin (**1**) als auch Biliverdin (**3**) sehr effizient von Albumin transportiert, die Veresterung der beiden Carboxylgruppen zu **2** bzw. **4** bewirkt eine vollständige Abweisung durch den Carrier.

Tabelle 2. Wechselzahlen (W , s^{-1}) der Carrier **6**, **11**, **15** und **17** für die Gallenfarbstoffe **1**—**5**

Pigment	Carrier			
	6	11	15	17
1	1200 ± 100	360 ± 30	40 ± 1	0 ± 1
2	0 ± 1	0 ± 1	10 ± 1	0 ± 1
3	3000 ± 600	1400 ± 200	500 ± 50	6000 ± 250
4	0 ± 1	0 ± 1	1 ± 0,1	0 ± 1
5	100 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 1

Über die mikroskopischen Ursachen dieser Selektivität kann derzeit bestenfalls spekuliert werden, weshalb hier auch die eher empirische Feststellung getroffen werden soll, daß es sowohl in bezug auf die Struktur des Carriers als auch des transportierten Substrates sehr spezifische intermolekulare Wechselwirkungen geben muß. Daß dies nicht auf das Albumin (**6**) beschränkt ist, wird durch den Vergleich der Daten für die Micellbildner **11** und **15** und des Polyvinylpyrrolidons (**17**) sehr deutlich. Gerade letzteres zeigt eine auffallende, ausschließliche Neigung für den Transport des Biliverdins (**3**). Interessant ist aber auch, daß sogar **11** und **15** sehr deutliche Strukturabhängigkeit der Transporteigenschaften zeigen, da hier *a priori* doch die Vorstellung naheliegend ist, daß die Micellstruktur weit weniger diskriminierend wirken sollte als die hochdifferenzierte Struktur eines Proteins.

Literatur

- ¹ 46. Mitt.: Falk H., Grubmayr K., Magauer K., Müller N., Zrunek U., Isr. J. Chem. (im Druck).
- ² Siehe z. B. die Übersicht: Schmid R., Gastroenterology **74**, 1307 (1978).
- ³ Jacobsen J., FEBS Letters **5**, 112 (1969).
- ⁴ Sottocosa G. L., Tribelli C., Luciani M., Lunazzi G. C., Gazzin B., Dev. Bioenerg. Biomembr. **1979**, 451.
- ⁵ Goresky C. A., J. Assoc. Med. Canad. **1965**, 851.
- ⁶ McDonagh A. F., Palma L. A., Schmid R., Biochem. J. **194**, 273 (1981).
- ⁷ Eichinger D., Falk H., Monatsh. Chem. **113**, 355 (1982).
- ⁸ Küster W., Z. Physikal. Chem. **141**, 40 (1924); Fischer H., Plieninger H., Weissbarth O., Z. Physiol. Chem. **268**, 197 (1941).
- ⁹ McDonagh A. F., Palma L. A., Biochem. J. **189**, 193 (1980).
- ¹⁰ Falk H., Grubmayr K., Haslinger E., Schlederer T., Thirring K., Monatsh. Chem. **109**, 1451 (1978).
- ¹¹ Falk H., Grubmayr K., Synthesis **1977**, 614.
- ¹² Czerniawski W., Roczn. Chem. **40**, 1935 (1966).