

Diss. ETH No. 8761

**Identity of Transport Systems for Bile Acids
and Drugs in Basolateral Rat Liver Plasma
Membrane Vesicles**

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

presented by
BRIGITTE ZIMMERLI MATTER
eidg. dipl. Apothekerin
born 10th March, 1959
citizen of Kölliken, AG

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'E. Carafoli', is written to the right of the author's name.

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. E. Carafoli, examiner
PD Dr. P.J. Meier-Abt, co-examiner

Zurich 1989

Summary

In order to provide efficient transport of cholephilic substances from blood into bile, hepatocytes possess distinct transport systems on their two polar surface domains. The present study characterizes the Na^+ dependent bile acid uptake system in isolated basolateral rat liver plasma membrane (bLPM) vesicles. The data demonstrate that a) isolation of functionally intact bLPM vesicles requires the inclusion of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) into the homogenization medium, b) Na^+ dependent taurocholate uptake into bLPM vesicles is influenced by divalent cations such as Ca^{2+} and Mg^{2+} and can selectively be stimulated by low concentrations of bovine serum albumin (BSA), c) Na^+ specific taurocholate uptake can be inhibited by the anion transport inhibitor 4,4'-diisothiocyanato-2,2'-disulfonic acid stilbene (DIDS) and exhibits saturation kinetics with an apparent K_m of $22 \pm 3 \mu\text{M}$ and an v_{max} of $3.2 \pm 1.0 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, d) BSA selectively increases the affinity of the Na^+ dependent bile acid uptake system for taurocholate, e) anionic cholate, the unconjugated analogue of taurocholate, is - at least in part - taken up into bLPM vesicles by the same transport system as taurocholate, f) pH gradient driven bLPM vesicle uptake of cholate represents nonionic diffusion with subsequent trapping of anionic cholate within the vesicles, and g) the Na^+ dependent bile acid uptake system exhibits broad substrate specificity and cotransports a wide variety of amphipathic compounds including steroids, steroid metabolites and numerous drugs. Hence, the study provides definite evidence for the basolateral Na^+ dependent bile acid uptake system being also involved in the hepatocellular uptake of structurally unrelated amphipathic compounds. However, this apparent multispecificity of the Na^+ dependent taurocholate uptake system does not extend to all cholephilic organic anions and excludes cotransport of amphiphilic organic dyes such as bromosulphophthalein, indocyanine green and rose bengal. Thus, the findings are consistent with the concept of multiple basolateral organic anion "carriers" each exhibiting broad, but partially overlapping substrate specificity.

Finally, bLPM vesicles were solubilized with octylglucoside and Na^+ dependent taurocholate transport was reconstituted in artificial soybean phospholipid proteoliposomes. As in native bLPM vesicles this reconstituted Na^+ /bile acid cotransport was completely DIDS sensitive. These reconstitution experiments provide a powerful tool for further investigation of the bile acid transport systems on the molecular level.

Zusammenfassung

Um cholephile Substanzen effizient vom Blut in die Galle transportieren zu können, besitzen Hepatozyten verschiedene polar verteilte Transportsysteme. Die vorliegende Arbeit charakterisiert das Na^+ abhängige Aufnahmesystem für Gallensäuren in isolierten basolateralen Plasmamembranen von Rattenlebern (bLPM). Damit die isolierten bLPM Vesikel funktionell intakt bleiben, muss dem Homogenisationsmedium der Proteinaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zugefügt werden. Die Na^+ abhängige Aufnahme von Taurocholat in bLPM Vesikel wird durch zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} beeinflusst und kann selektiv durch tiefe Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA) stimuliert werden. Die Na^+ spezifische Aufnahme von Taurocholat in bLPM Vesikel ist mit dem Anionentransportinhibitor 4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure (DIDS) hemmbar und stellt einen sättigbaren Prozess mit scheinbarer K_m von $22 \pm 3 \mu\text{M}$ und einer v_{max} von $3.2 \pm 1.0 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ dar. BSA erhöht selektiv die Affinität des Na^+ abhängigen Gallensäureaufnahmesystems für Taurocholat. Ausserdem wird Cholat, das unkonjugierte Analoge von Taurocholat – wenigsten teilweise – durch das selbe Transportsystem wie Taurocholat in bLPM Vesikel aufgenommen. Daneben kann die Cholataufnahme in bLPM Vesikel durch einen pH Gradienten getrieben werden, dies erfolgt durch nichtionische Diffusion mit anschliessender Dissoziation zum anionischen Cholat innerhalb des Vesikels. Schliesslich demonstriert das Na^+ abhängige Aufnahmesystem für Gallensäuren eine breite Substratspezifität und kotransportiert eine Vielzahl von amphipathischen Substanzen wie Steroide, Steroidmetabolite und zahlreiche Medikamente. Diese Studie liefert also definitive Argumente für die Beteiligung des Na^+ abhängigen Gallensäure-Transportsystems an der hepatozellulären Aufnahme von strukturell unterschiedlichen amphipathischen Substanzen. Allerdings erstreckt sich die Multispezifität des Na^+ abhängigen Aufnahmesystems für Taurocholat nicht auf alle cholephilen, organischen Anionen und schliesst einen Kotransport von amphiphilen organischen Farbstoffen wie Bromosulphophthalein, Indocyaningrün und Bengalrosa aus. Die Daten sind also mit dem Konzept von multiplen basolateralen "Carriern" für organische Anionen mit breiter, aber teilweise überlappender Substratspezifität konsistent.

Schliesslich wurden bLPM Vesikel mit Octylglucosid solubilisiert und der Na^+ abhängige Taurocholattransport wurde in künstlichen Proteoliposomen aus Sojabohnenphospholipiden rekonstituiert. Wie in nativen bLPM Vesikel war dieser rekonstituierte Na^+ /Gallensäure-Kotransport DIDS sensi-

tiv. Diese Rekonstitutionsexperimente eröffnen neue Möglichkeiten zur weiteren Untersuchung von Gallensäuretransportsystemen auf der molekularen Ebene.