

# Bilirubin in einem neuen Licht\*\*

Johannes Broichhagen und Dirk Trauner\*

Bilirubin · Fluoreszenz · Gelbsucht ·  
Genetisches Engineering · Proteine

**B**ilirubin (BR), ein Katabolit von Häm, wird normalerweise mit menschlichen Exkreten und deren Farbe assoziiert. Es ist auch für die sichtbaren Symptome der Gelbsucht verantwortlich, die auftritt, wenn die Ausscheidung von Bilirubin aus dem Körper zu langsam ist. Dies ist in der Tat eine erhebliche chemische Herausforderung, da Bilirubin in seiner unkonjugierten Form wegen eines Netzwerks intramolekularer Wasserstoffbrücken und der damit verbundenen Maskierung polarer Funktionalitäten recht lipophil ist (Schema 1). Erst nach enzymatischer Konjugation mit Glucuronsäure wird dieses Netzwerk gebrochen, und konjugiertes Bilirubin (C-BR) kann leicht ausgeschieden werden. Unkonjugiertes BR dagegen neigt dazu, sich in Fett- und Nervengewebe anzuansammeln, was besonders bei Neugeborenen toxische Effekte hat. Somit ist eine zuverlässige Quantifizierung von BR im Serum von entscheidender Bedeutung für die Beurteilung der Schwere der Neugeborenen-Gelbsucht (ikterus neonatorum).

Bis heute erfolgt diese Quantifizierung mit einem kolorimetrischen Verfahren, das der Arzt Albert Abraham Hijmans van den Bergh vor fast hundert Jahren entwickelt hat.<sup>[1]</sup> Die Methode beruht darauf, dass C-BR leicht mit einer wässrigen Lösung von diazotierter Sulfanilsäure zu Produkten reagiert, die durch Absorptionsspektroskopie quantifiziert werden können. Im Unterschied dazu erfordert unlösliches BR die Zugabe von Ethanol, um die Reaktion zu ermöglichen. Somit kann die Gesamtmenge beider Bilirubine – und durch Subtraktion von C-BR der Gehalt an giftigem BR – bestimmt werden.

So einfach diese Methode ist, so unzuverlässig ist sie wegen der Komplexität und Variabilität der an der chemischen Reaktion beteiligten Spezies sowie der Inhomogenität biologischer Proben aber auch. Ein Fluoreszenzassay, der auf einer sauberen chemischen Reaktion beruht, wäre daher vorteilhaft. Es ist daher eine erfreuliche Nachricht, dass Kumagai et al. kürzlich ein Protein identifizierten, das in Gegenwart von BR zu fluoreszieren beginnt.<sup>[2]</sup> Die Wechselwirkung erwies sich als spezifisch und empfindlich genug, um

damit zuverlässig BR-Konzentrationen im menschlichen Serum und in Gewebeproben zu messen.

Alles begann mit einer überraschenden Beobachtung im Jahr 2009:<sup>[3]</sup> Muskelfasern des japanischen Aals *Anguilla japonica* erwiesen sich als fluoreszierend, und diese Fluoreszenz konnte auf ein Protein zurückgeführt werden. Das Protein, genannt UnaG, gehört zu den fettsäurebindenden Proteinen (FABP) und weist 56% Homologie zum menschlichen FABP auf, das im Gehirn zu finden ist. Nach Klonierung und Expression in Bakterien sowie in HeLa-Zellen war die Fluoreszenz nur in den menschlichen Zellen nachweisbar, was darauf schließen lässt, dass zum Einschalten der Fluoreszenz ein Cofaktor notwendig war, der in Bakterien nicht vorhanden ist. Darüber hinaus zeigten mit UnaG transfizierter HeLa-Zellen intensive Fluoreszenz unter hypoxischen Bedingungen – was bedeutet, dass kein Sauerstoff für die Reifung des Fluorophors erforderlich ist. Die Zugabe von fötalem Rinderserum (FBS) zu aufgereinigtem apo-UnaG schaltet die Fluoreszenz dagegen sofort ein.

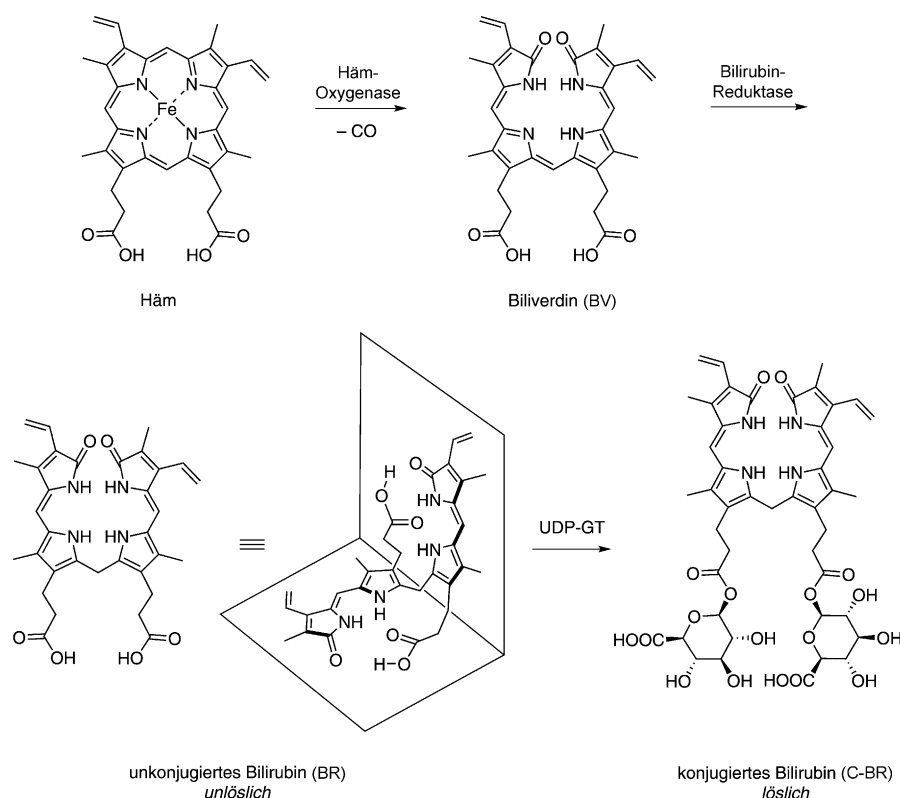
Nach diesen Beobachtungen begann die Jagd auf das kleine Molekül, das für dieses Einschalten verantwortlich ist. Fluoreszenz wurde nur induziert, wenn heterolog in *E. coli* exprimiertes apo-UnaG mit Fraktionen von FBS, die Albumin oder High-Density-Lipoprotein enthalten, versetzt wurde. Beide Fraktionen sind dafür bekannt, BR zu enthalten. Expression von FLAG-markiertem UnaG in HEK-Zellen mit nachfolgender Aufreinigung, Extraktion mit Chloroform/Methanol und MS-Analyse ergab schließlich ein Signal bei 585.30 Da, was BR als Cofaktor bestätigte.

Unkonjugiertes Bilirubin selbst hat ein Absorptionsmaximum von  $\lambda_{\text{Abs}} = 450$  nm, was für seine gelborangene Farbe verantwortlich ist, und ist selbst nur sehr schwach fluoreszierend. Nach Zugabe von apo-UnaG verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf  $\lambda_{\text{Abs}} = 498$  nm, und es kann eine starke Fluoreszenzemission bei  $\lambda_{\text{Em}} = 527$  nm beobachtet werden (Schema 2). Diese Eigenschaft erklärt den Namen des neuen fluoreszierenden Proteins, der nicht nur für Sushi-Liebhaber leicht zu merken ist: UnaG (vermutlich „Una-Dschi“ ausgesprochen), ein Wortspiel aus Unagi, dem Aal, und Grün, der Farbe der Fluoreszenz.

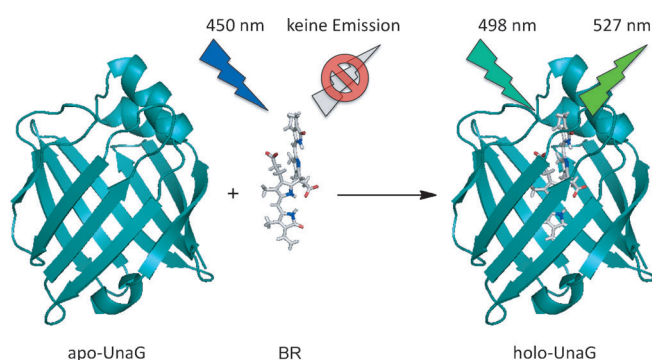
Titrationstudien von apo-UnaG mit konjugiertem BR ergaben einen extrem niedrigen  $K_d$ -Wert von 98 pM. Demnach ist UnaG humanem Serumalbumin (HSA) überlegen, dessen  $K_d$ -Wert mit unkonjugiertem BR mit 87 nM – und damit um einen Faktor von etwa 1000 höher – bestimmt wurde. Darüber hinaus ist HSA nicht fluoreszierend, wenn es an BR gebunden ist. Ferner gab die Zugabe von anderen

[\*] Dipl.-Chem. J. Broichhagen, Prof. Dr. D. Trauner  
Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München  
und Center of Integrated Protein Science Munich  
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)  
E-Mail: dirk.trauner@lmu.de

[\*\*] J.B. dankt der Studienstiftung des deutschen Volkes für ein Promotionsstipendium.



**Schema 1.** Häm wird enzymatisch zu Biliverdin (BV) und anschließend weiter zu unkonjugiertem Bilirubin (BR) abgebaut. UDP-Glucuronosyltransferase (UDP-GT) wandelt unlösliches BR zu wasserlöslichem konjugiertem Bilirubin (C-BR) um. BR erfordert die Zugabe von Ethanol, um löslich und reaktiv gegenüber diazotierter Sulfanilsäure zu werden, während C-BR leicht mit der wässrigen Lösung des Reagens reagiert.

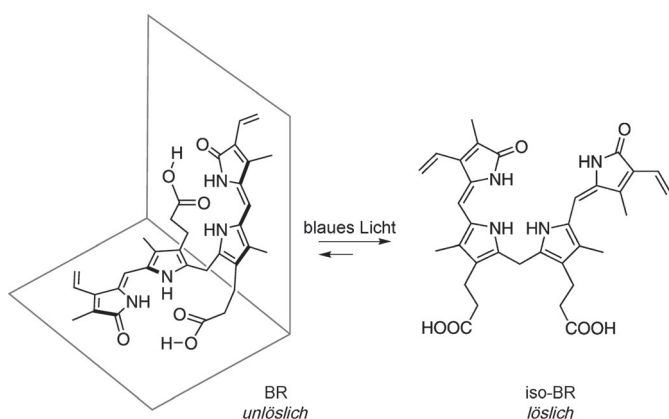


**Schema 2.** Wie UnaG funktioniert. Weder die apo-Form des Proteins noch konjugiertes Bilirubin (BR,  $\lambda_{\text{Abs}} = 450 \text{ nm}$ ) sind fluoreszierend. Beim holo-Protein verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Chromophors auf  $\lambda_{\text{Abs}} = 498 \text{ nm}$ , und Emission wird bei  $\lambda_{\text{Em}} = 527 \text{ nm}$  beobachtet.

Mitgliedern des Häm-Stoffwechselweges, wie Biliverdin (BV), Urobilin, C-BR und ditau-BR, zu UnaG praktisch keine Fluoreszenz. Diese äußerst hohe Affinität und Selektivität von UnaG zu BR sollten die Messung von konjugiertem Bilirubin in biologischen Proben ermöglichen. Tatsächlich konnte der BR-Spiegel in humanen Serumproben leicht mit UnaG bestimmt werden. Die Reaktion ist innerhalb von 10–20 min beendet, und die resultierende Fluoreszenz ist bis zu eine Stunde lang stabil.

UnaG kann genetisch an seinen N- und C-Termini mit anderen Proteinen (wie mCherry in der vorliegenden Studie) fusioniert werden und wird in einer Vielzahl von Zellen exprimiert. Es kann daher wie grün fluoreszierendes Protein (GFP) und seine Derivate<sup>[4]</sup> als ein genetisch kodierbarer Protein-Tag fungieren – mit dem wichtigen Unterschied, dass die Fluoreszenz von allgegenwärtigem oder einfach zuzugebendem BR induziert werden kann. Mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von  $\Phi = 0.51$ , einem molaren Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{\text{max}} = 77\,300$  und einem Molekulargewicht von  $M_w = 16.5 \text{ kDa}$  hat UnaG Vorteile gegenüber typischen fluoreszierenden Proteinen wie enhanced GFP ( $\Phi = 0.60$ ,  $\epsilon_{\text{max}} = 49\,550$ ,  $M_w = 26.9 \text{ kDa}$ ). Zwar ist die Quantenausbeute von UnaG niedriger, allerdings ist der Extinktionskoeffizient höher und das Protein wesentlich kleiner, wovon eine genetische Fusion ohne Störung der biologischen Funktion profitieren könnte. Darüber hinaus benötigt UnaG keinen molekularen Sauerstoff, um fluoreszierend zu werden, eine Voraussetzung, die die Verwendung von GFP und seinen Derivaten unter bestimmten Bedingungen (z.B. hypoxischen) einschränkt.

Mutationsstudien zeigten, dass die Aminosäure Asparagin 57 (N57) von entscheidender Bedeutung für das Fluoreszenzverhalten von UnaG ist. Wird N57 durch Glutamin (N57Q) oder Alanin (N57A) ersetzt, verringert sich bzw. verschwindet die Fluoreszenz. Die genaue Art der Bindung von BR an apo-UnaG wurde durch Röntgenkristallographie mit einer Auflösung von  $1.2 \text{ \AA}$  bestimmt (PDB-Code: 4I3B).



**Schema 3.** BR kann durch einfache Bestrahlung mit blauem Licht in eine lösliche Form umgewandelt werden. Diese Phototherapie ist weit verbreitet bei der Behandlung von Neugeborenen-Gelbsucht, entweder mit einem blau beleuchteten Inkubator (dargestellt) oder mit Decken aus blauen LEDs.

Dabei wurde festgestellt, dass N57 eines der Carboxylate und einen der Lactamringe von BR kontaktiert und in einer gestreckten Konformation gebunden ist. Im fluoreszierenden Protein sind die intramolekularen Wasserstoffbrücken von freiem BR durch Wasserstoffbrücken von Wassermolekülen oder Seitenketten ersetzt. Röntgenkristallstrukturen der

beiden Mutanten wurden ebenfalls erhalten (PDB-Codes: 4I3C (N57A) und 4I3D (N57Q)). Aus diesen Strukturen war aber nicht sofort ersichtlich, warum die N57A-Mutante nichtfluoreszierend ist und welche anderen Mutationen getestet werden sollten, um die Anregungs- und Emissionswellenlänge von UnaG zu verschieben. Wie bei anderen Mitgliedern der „Farbpalette der fluoreszierenden Proteine“<sup>[5]</sup> könnte die Farbabstimmung der Fluoreszenz die Evaluierung von Zufallsmutationen oder gerichtete Evolution erfordern.

Wegen der hohen Affinität von UnaG zu BR kann man spekulieren, ob es bei der Therapie von Gelbsucht, besonders bei Neugeborenen, verwendet werden könnte. Dabei wären jedoch praktische Einschränkungen sowie immunologische Bedenken zu berücksichtigen, und davon abgesehen ist ein solcher Einsatz auch nicht wirklich nötig, da bereits eine sehr effektive Therapie verfügbar ist (Schema 3): Neugeborene mit Gelbsucht werden heutzutage blauem Licht ausgesetzt (420–470 nm), was eine Isomerisierung der Doppelbindung im BR-Molekül zur Folge hat, durch die das Netzwerk der intramolekularen Wasserstoffbrücken gebrochen wird.<sup>[6]</sup> Dies macht das lösliche Isomer für die weitere metabolische Verarbeitung und Ausscheidung verfügbar (Schema 3). Dieses Verfahren ist zurzeit wohl die nützlichste (und lebenswerteste) Anwendung des Photoschaltens in der Medizin.

Eingegangen am 21. August 2013

Online veröffentlicht am 7. November 2013

- [1] A. A. H. van den Bergh, P. Muller, *Biochem. Z.* **1916**, 77, 90.
- [2] A. Kumagai, R. Ando, H. Miyatake, P. Greimel, T. Kobayashi, Y. Hirabayashi, T. Shimogori, A. Miyawaki, *Cell* **2013**, 153, 1602.
- [3] S. Hayashi, Y. Toda, *Fish. Sci.* **2009**, 75, 1461.
- [4] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509.
- [5] R. Y. Tsien, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 5721; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5612.
- [6] A. F. McDonagh, D. A. Lightner, *Pediatrics* **1985**, 75, 443.