

Identification and functional characterization of human organic anion transporting polypeptides

Doctoral Thesis

Author(s):

Pizzagalli, Flavia

Publication date:

2003

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004636702>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Dissertation ETH Nr. 15146

Identification and Functional Characterization of Human Organic Anion Transporting Polypeptides

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, Switzerland
For the degree of Doctor of Natural Sciences

presented by

Flavia Pizzagalli

Pharmacist (eidg. dipl. Apothekerin)
University of Basel

born August 28th, 1974
citizen of Lugano (TI)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. G. Folkers, examiner
Prof. Dr. P.J. Meier-Abt, co-examiner
Prof. Dr. L. Scapozza, co-examiner
PD Dr. B. Hagenbuch, co-examiner

2003

Summary

In the past it was believed that solute disposition within the body exclusively depended on the physicochemical properties of a substance. However, increasing evidence suggests that carrier membrane proteins actively contribute to the entry/exit of endobiotics as well as xenobiotics into/out of cells. After isolation and characterization of different membrane proteins, it became clear that a select family contributed to the uptake of amphipathic organic compounds into cells: the organic anion transporting polypeptide (OATP, *SLC21A* in human and *Oatp*, *Slc21a* in rodent) superfamily. OATPs/Oatps represent a large superfamily of membrane solute carrier proteins responsible for the cellular entry of a wide variety of amphipathic organic compounds including bile acids, steroid hormones and their conjugates, eicosanoids, peptides and numerous xenobiotics. Several OATPs/Oatps are expressed in the liver, where they presumably act as body detoxification mechanisms. Nevertheless, the physiological significance of their extrahepatic presence is still an object of debate. Hence, only through identification of all potential superfamily members and the clear understanding of their functional properties, can speculation as to their importance for overall body homeostasis be made.

The main aspects of this work concern: 1) the isolation and functional characterization of a novel human OATP: OATP-F (*SLC21A14*). 2) Furthermore, the functional properties of OATP-B (*SLC21A9*) were investigated in comparison to the other hepatically expressed human OATPs: OATP-A (*SLC21A3*), OATP-C (*SLC21A6*) and OATP8 (*SLC21A8*). 3) Finally, the potential participation of OATPs in the delivery of hormones to target cells in human mammary gland tissue was investigated.

OATP-F represents a new member of the OATP superfamily. It was isolated from a human brain cDNA library and is characterized by a selective tissue distribution comprising different brain regions and testis Leydig cells. OATP-F operates with a narrow substrate specificity. It preferentially transports 3',5'-iodinated thyroid hormones (i.e. thyroxine and reverse triiodothyronine) in a stereo-unspecific way. Less well transported substrates include triiodothyronine, the steroid hormone

conjugates estrone-3-sulfate (E_1S) and estradiol-17 β -glucuronide and bromosulfophthalein.

OATP-B was cloned from a human brain cDNA library but shows the highest expression level in human liver, where it localizes to the basolateral membrane domain of hepatocytes. By Northern blotting, OATP-B demonstrates a wide tissue distribution, which includes liver, brain, placenta, spleen, lung, pancreas, heart, kidney, testis, ovary and small intestine. The functional properties of OATP-B were compared to those of the other hepatically expressed OATP members, i.e. OATP-A, OATP-C and OATP8. OATP-B was unique in its transport features, since it mediated exclusively uptake of E_1S , dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and bromosulfophthalein. On the contrary, OATP-A, OATP-C and OATP8 exhibited overlapping, broad substrate specificities comprising bile acids, steroid hormones and their conjugates, thyroid hormones, peptides, eicosanoids and selected drugs.

Membrane transport mechanisms in the mammary gland have been implicated in steroidogenic, biosynthetic, metabolic and secretory functions. Moreover, those processes that mediate the entry into mammary epithelia of precursors of biologically active hormones, which preferentially circulate as anionic steroid sulfates, have not been investigated. Because of the ability of OATPs/Oatps to transport amphipathic organic compounds including steroid hormones and their conjugates, we investigated the expression of OATPs in the human mammary gland.

The major OATP expressed in the breast was OATP-B. In normal tissue, OATP-B localized to the membranes of myoepithelial cells that surround the ductular epithelial cells. Uptake by OATP-B of E_1S and the adrenally derived hormone precursor, DHEAS, into the myoepithelium implies that these cells may play a central role in determining the extent of exposure of the adjacent epithelial cells to biologically active estrogen. In invasive carcinoma, ductal epithelial cells were strongly positive for OATP-B. Given the importance of estrogen in the etiology and progression of breast cancer, further studies focused on the regulation mechanisms controlling OATP-B function and expression in the mammary gland might contribute to the better understanding of the factors influencing the growth of hormone-dependent tumors in this tissue.

Northern blot analysis revealed that OATP-D (*SLC21A11*) is also present in human normal mammary gland tissue. From the two existing OATP-D splice variants, OATP-D1 was the major one found in the breast. Immunohistochemistry showed that in normal tissue OATP-D1 localizes to the basolateral membrane of ductal epithelial cells, which retained OATP-D1 expression in carcinoma. Its contribution extent of estrogen exposure or other physiological processes in the mammary epithelium is not yet certain.

In conclusion, this work has identified: 1) a novel human OATP superfamily member, OATP-F, which provides essential thyroid hormones and sex hormones to brain and testis. 2) Among the OATPs expressed in the liver, OATP-A, OATP-C and OATP8 clearly represent multispecific transport mechanisms, whereas OATP-B exhibits a preference for sex hormones. 3) Furthermore, both OATP-B and OATP-D1 have been localized in the human mammary gland, where they may govern estrogen exposure to target cells.

This work supports the notion that multispecific OATPs contribute to the overall body clearance of solutes and OATPs with a narrow substrate specificity participate in physiological processes, as e.g. hormonal control. Hence, these findings suggest, a potential involvement of these transport proteins in the overall body hormone homeostasis, especially related to steroid hormones, amine derived hormones such as thyroid hormones and presumably even peptide hormones.

Zusammenfassung

Vor einigen Jahren machte man noch ausschliesslich die physikalischen und chemischen Eigenschaften einer löslichen Substanz für deren Verteilung im Körper verantwortlich. Heute hat man erkannt, dass Membrantransportproteine dabei auch eine wichtige Rolle spielen, indem sie sowohl Aufnahme als auch Ausscheidung von körpereigenen und körperfremden Stoffen beeinflussen. Unter den bis heute identifizierten und charakterisierten Proteinen gibt es eine grosse Familie von Transportproteinen, die für die zelluläre Aufnahme von amphipathischen organischen Stoffen (wie z.B. Gallensäuren, Steroidhormone und deren Konjugate, Eicosanoide, kleine Peptide und verschiedene Medikamente) verantwortlich sind: die Superfamilie der organischen Anionen Transportproteinen (OATP, *SLC21A* im Menschen und *Oatp*, *Slc21a* in Nagern). Bestimmte OATPs/Oatps werden ausschliesslich in der Leber exprimiert, wo sie die Ausscheidung von unerwünschten Stoffen fördern und so vermutlich eine wichtige Rolle gegen die Einwirkung von Noxen spielen. Die Bedeutung ihrer extrahepatischen Expression ist noch nicht völlig klar. Nur durch die Isolierung und Charakterisierung aller Mitglieder der OATP/Oatp Superfamilie wird es möglich sein, Hypothesen über ihre physiologische Relevanz im Körper zu formulieren und experimentell zu überprüfen.

Die Hauptziele dieser Arbeit waren: 1) Isolierung und Charakterisierung eines neuen OATP des Menschen: OATP-F (*SLC21A14*). 2) Charakterisierung der Transporteigenschaften von OATP-B (*SLC21A9*) im Vergleich zu anderen OATPs, die in der Leber vorkommen, d.h. (*SLC21A3*), OATP-C (*SLC21A6*) und OATP8 (*SLC21A8*). 3) Erforschung der Beteiligung von OATPs an der Bereitstellung von Hormonen im menschlichen Brustdrüsengewebe.

OATP-F stellt einen neuen Vertreter der OATP/Oatp-Superfamilie dar, der aus einer Gehirn-cDNA-Bibliothek isoliert wurde. Das Besondere an OATP-F ist seine auf zahlreichen Gehirnregionen und die Leydig Zellen der Hoden beschränkte Gewebeverteilung und seine beschränkte Substratspezifität. Es werden vorzugsweise 3',5'-iodierte Thyroidhormone (d.h. Thyroxin und reverses Triiodothyronin) transportiert. Zusätzliche Substrate, die aber nur geringfügig von

OATP-F aufgenommen werden, sind Triiodothyronin, die Steroidkonjugate Estron-3-Sulfat (E_1S) und Estradiol-17 β -Glukuronid sowie Bromosulphthalein.

Obwohl OATP-B aus einer Gehirn-cDNA-Bibliothek isoliert wurde, wird es am stärksten in der Leber exprimiert, wo es in der basolateralen Membran der Hepatozyten lokalisiert ist. Mittels Northern-Blot-Analyse wurde gezeigt, dass OATP-B in vielen verschiedenen Geweben unter anderen auch in Leber, Gehirn, Plazenta, Milz, Lunge, Pankreas, Herz, Niere, Hoden, Eierstock und Dünndarm vorkommt. Die Transporteigenschaften von OATP-B wurden mit denjenigen von OATP-A, OATP-C und OATP8, verglichen und es stellte sich heraus, dass OATP-B einzigartig war, weil es ausschliesslich die Aufnahme von E_1S , Dehydroepiandrosteron Sulfat (DHEAS) und Bromosulphthalein vermittelte. Im Gegenteil dazu besitzen OATP-A, OATP-C und OATP8 eine breite Substratspezifität, welche Gallensäuren, Steroidhormone und deren Konjugate, Thyroidhormone, Peptide, Eicosanoide und ausgewählte Medikamente einschliesst.

Im Brustdrüsengewebe sind Membrantransportmechanismen wichtig, um Ausgangsprodukte für Biosynthese und Steroidmetabolismus aber auch Abbauprodukte effizient über die verschiedenen Membranbarrieren zu transportieren. Die Aufnahme von vorwiegend sulfatierten Hormonvorläufer für die Produktion biologisch aktiver Oestrogene war auf dem molekularen Niveau jedoch nicht charakterisiert. Deshalb untersuchten wir, ob OATPs, welche Steroidhormone und deren Konjugate transportieren können, in der menschlichen Brustdrüse vorkommen. OATP-B ist der häufigste Vertreter der OATPs im Brustgewebe und findet sich in normalem Gewebe auf der Membran von Myoepithelzellen, wo es für die Aufnahme von E_1S und DHEAS verantwortlich zu sein scheint. Dies deutet darauf hin, dass Myoepithelzelle eine zentrale Rolle im Steroidmetabolismus spielen und die benachbarten Epithelzellen mit Oestrogenen versorgen. In invasiven Karzinomen konnte OATP-B in diesen Epithelzellen selbst nachgewiesen werden. Bei Entstehung und Verlauf von hormonabhängigen Brustkrebsarten spielen Oestrogene eine wichtige Rolle. Deshalb sollte die Aufklärung der Regulationsmechanismen der Expression und der Funktion von OATP-B in solchen Epithelzellen zum Verständnis der Entstehung und des Verlaufs dieser Krebsarten beitragen.

Northern-Blot-Analyse zeigte, dass auch OATP-D (*SLC21A11*) in der normalen Brustdrüse vorkommt. Von den zwei existierenden OATP-D Splicevarianten wird ausschliesslich OATP-D1 im Brustgewebe exprimiert und konnte in normalen Gewebe an der basolateralen Membran der Epithelzellen nachgewiesen werden. Auch in invasiven Karzinomen konnte die gleiche Lokalisation von OATP-D1 beobachtet werden, obwohl dort in den meisten Fällen die Zellpolarität nicht mehr klar feststellbar war. Es ist noch unklar, in welchem Ausmass OATP-D1 die physiologischen Prozesse beeinflusst und inwieweit es zur Exposition der Epithelzellen mit Oestrogenen beiträgt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in dieser Arbeit 1) ein neues Mitglied der OATP-Superfamilie, OATP-F, als spezifischer Thyroid- und Steroidhormon Transporter in Gehirn und Hoden identifiziert wurde, dass 2) OATP-B im Vergleich zu den in der Leber exprimierten multispezifisch OATP-A, OATP-C und OATP8 als Steroidhormon Transporter mit beschränkter Substratspezifität erkannt wurde und dass 3) verschiedener OATPs im Brustdrüsengewebe nachgewiesen werden konnten, wo sie am Steroidmetabolismus beteiligt zu sein scheinen.

Diese Arbeit unterstützt die Hypothese, dass multispezifische OATPs an der Elimination von Stoffen aus dem Körper beteiligt sind, während OATPs mit einer begrenzten Substratspezifität für bestimmte physiologische Prozesse wichtig sind. Deshalb deuten diese Resultate darauf hin, dass OATPs/Oatps zu generellen hormonellen Homöostase im Körper beitragen könnten.