

**Hyperosmolarity stimulates transporter-mediated
insertion of estrone sulfate into the
plasma membrane, but inhibits the uptake by
SLC10A1 (NTCP)**



Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Julian Peter Müller

aus Lindlar

2021

Abstract

It is common belief that transporters translocate their substrates from one site of the plasma membrane to the other. In our previous project this definition of transport proteins was challenged by the hypothesis, that SLC22A11 inserts its substrate estrone 3 sulfate (E3S) into the plasma membrane, while uric acid (UA) is a normal cytosolic substrate. In this context, we addressed the transport mechanism of the human Na⁺ taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP, gene symbol *SLC10A1*) with E3S and the detergent-like bile acid taurocholic acid (TCA). Here, we showed that SLC10A1 transport mechanisms for the substrates E3S and TCA are the same. Furthermore, we addressed the hypothesis of E3S membrane insertion by SLC22A11. By variation of extracellular osmolarity, we substantiated this hypothesis. While accumulation of UA decreased under hyperosmolar conditions, accumulation of E3S increased, surprisingly. We showed that hyperosmolarity had no effect on cell viability and that it led to cell shrinkage. The concept of osmolarity-dependent effects on substrate accumulation were tested and confirmed with sucrose and mannitol and the transporters ETT, OCT2, MATE1, SLC22A9, SLC10A6 and OAT3. Again, we demonstrated peculiar behaviour of E3S under hyperosmolar conditions with MATE1, SLC22A9, SLC10A6 and OAT3. Interestingly, we observed contrasting effects of E3S substrate accumulation under hyperosmolar conditions with SLC22A11 and SLC10A1, suggesting different transport mechanisms between those transporters. We hypothesize that, while SLC22A11 and other transporters insert E3S in the plasma membrane, SLC10A1 transports E3S and the bile acids into the cytosol. We propose that the use of osmolarity is a valuable tool for research addressing the question of the membrane insertion of transporter substrates

Zusammenfassung

Generell wird davon ausgegangen, dass Transportproteine ihre Substrate von einer Seite der Plasmamembran auf die andere transportieren. In einem vorherigen Projekt unserer Arbeitsgruppe wurde diese Definition eines Transportproteins in Frage gestellt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Transporter SLC22A11 sein Substrat Estron-3-Sulfat (E3S) in die Plasmamembran inseriert, während andere Substrate wie Harnsäure in das Zytosol transportiert werden. In diesem Kontext wurde der humane Transporter Na⁺ taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP, Gen *SLC10A1*) näher untersucht, da dieser sowohl E3S als auch Detergenzien wie die Gallensäure Taurocholat (TCA) transportiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SLC10A1 denselben Transportmechanismus für beide Substrate aufweist. Zusätzlich wurde die Hypothese der Membraninsertion von E3S durch SLC22A11 mittels Hyperosmolarität weiter untersucht. Hier konnten wir zeigen, dass in hyperosmolarem Puffer die Akkumulation von Harnsäure abnahm, während die Aufnahme von E3S überraschenderweise zunahm. Dabei konnte mikroskopisch eine Volumenabnahme der Zellen festgestellt werden, wohingegen die Viabilität der Zellen nicht durch Hyperosmolarität beeinflusst wurde. Das Konzept der Osmolarität bedingten Effekte auf die Akkumulation wurde mit weiteren Transportern (ETT, OCT2, MATE1, SLC22A9, SLC10A6 und OAT3) mit Saccharose und Mannitol getestet. Wieder konnten wir ein abweichendes Verhalten von E3S mit MATE1, SLC22A9, SLC10A6 und OAT3 nachweisen, während alle anderen hydrophilen Substrate unter hyperosmolaren Bedingungen weniger Transport aufwiesen. Interessanterweise konnten große Unterschiede in der Akkumulation von E3S mit SLC10A1 bei Hyperosmolarität festgestellt werden. Dies impliziert unterschiedliche Transportmechanismen bei diesen Transportern. Entsprechend unserer Hypothese deutet dies darauf hin, dass E3S von SLC22A11 und anderen Transportern in die Membran inseriert wird, während SLC10A1 E3S und TCA in das Zytosol transportiert. Somit kann der vorgestellte Hyperosmolaritätsassay als wertvolles Hilfsmittel bei der Frage der Membraninsertion von Transporter-Substraten dienen.