

DISS. ETH NO. 29901

***Structural and Functional Studies of Organic Anion
Transporting Polypeptides OATP1B1 and OATP1B3***

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

ANCA-DENISE CIUȚĂ

M.Sc. Biochemistry, The University of Manchester

born on *30.08.1994*

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Kaspar Locher
Prof. Dr. Rudolf Glockshuber
Prof. Dr. Bruno Stieger

Summary

The liver plays a crucial role in numerous physiological processes, including blood detoxification and the maintenance of body homeostasis. Hepatocytes have evolved a complex enzymatic molecular machinery specializing in converting hydrophobic molecules into hydrophilic metabolites, which is a critical process for drug pharmacokinetics. Hepatic transporters are essential for the influx and efflux of drugs and their metabolites across cell membranes. The superfamily of organic anion-transporting polypeptides (OATPs), particularly OATP1B1, OATP1B3, and OATP2B1, is clinically involved in mediating drug absorption and distribution in humans, facilitating drug uptake across the basolateral membrane. OATP1B1 and OATP1B3 transporters recognize a wide range of structurally diverse amphipathic molecules and are linked to hepatic drug disposition and systemic drug clearance. Impaired function due to untargeted inhibition or nucleotide polymorphisms is linked to reduced drug clearance, systemic circulation, and associated adverse events. Drug-drug interactions (DDIs) are associated with adverse clinical events that can substantially affect patient health outcomes. Consequently, this can lead to increased healthcare costs and potential withdrawal of drugs from the market. Thus, numerous regulatory agencies recommend testing new molecular entities (NME) for hepatic uptake of OATP1B transporters to identify potential substrates or inhibitors and predict potential DDIs in the early stages of drug development. Owing to their significant clinical implications, it is essential to elucidate the molecular and structural basis of substrate selectivity and uptake mechanisms.

The aim of this research project was to elucidate the substrate selectivity and transport mechanism of OATP1B transporters through structural and functional studies. To obtain high-resolution structures of OATP1B1 and OATP1B3 transporters, it was essential to establish a robust platform for the overexpression of functional proteins and purification of stable and homogenous samples. In Chapter 2, I describe the development and screening of different fusion constructs for heterologous expression and purification of OATP1B1 and OATP1B3, resulting in stable cell lines being the best expression system. To test the function of the fusion constructs expressed in stable cell lines, I established a cell-based transport assay using radioactively labeled substrates, as presented in Chapter 3. To facilitate the structural studies of OATP1B1 and OATP1B3 in lipid nanodiscs, in Chapter 4, I discuss the methods used to generate high-affinity conformational binders. In Chapter 5, I describe the determined cryo-EM structures of OATP1B1 and OATP1B3 in functionally distinct states, which allowed us to propose a transport mechanism. The structure of E1S-OATP1B1 was determined at a resolution of 3.67 Å, which allowed for the identification of the substrate-binding pocket. The results provide structural insight into transporter selectivity for large organic anions. Additionally, we observed a bicarbonate ion bound to OATP1B3 in a pocket formed by residues of the signature motif, and the ion was coordinated by a highly conserved histidine residue associated with pH-sensitivity in OATP transporters. The bicarbonate-bound OATP1B3 was determined at a resolution of 2.97 Å.

Zusammenfassung

Die Leber spielt eine entscheidende Rolle bei zahlreichen physiologischen Prozessen, einschließlich der Blutentgiftung und der Aufrechterhaltung der Körperhomöostase. Hepatozyten haben eine komplexe enzymatische molekulare Maschinerie entwickelt, die darauf spezialisiert ist, hydrophobe Moleküle in hydrophile Metaboliten umzuwandeln, was ein kritischer Prozess für die Pharmakokinetik von Arzneimitteln ist. Hepatische Transporter sind für den Zu- und Abfluss von Arzneimitteln und Metaboliten durch die Zellmembranen von wesentlicher Bedeutung. Die Superfamilie der Organische Anionen Transporter (OATPs), insbesondere OATP1B1, OATP1B3 und OATP2B1, ist von medizinischer Bedeutung, da sie an der Arzneimittelabsorption und -verteilung beim Menschen beteiligt sind, indem sie die Arzneimittelaufnahme durch die basolaterale Membran ermöglicht. Die OATP1B1- und OATP1B3-Transporter erkennen eine grosse Vielfalt an strukturell unterschiedlicher, amphipathischer Moleküle und sind an der hepatischen Arzneimitteldisposition und der systemischen Arzneimittelclearance beteiligt. Eine Beeinträchtigung ihrer Funktion aufgrund von unspezifischer Hemmung oder Nukleotid-Polymorphismen ist mit einer verringerten Medikamenten-Clearance, systemischer Zirkulation und damit assoziierten gesundheitlichen Konsequenzen verbunden. Wechselwirkungen zwischen Arzneimitteln (DDIs) werden mit unerwünschten, medizinischen Ereignissen in Verbindung gebracht, die den Gesundheitszustand der Patienten erheblich beeinträchtigen können. Dies kann zu erhöhten Kosten für den Patienten und einer möglichen Rücknahme von Arzneimitteln vom Markt führen. Daher empfehlen zahlreiche Zulassungsbehörden, neue molekulare Wirkstoffe (NME) auf die hepatische Aufnahme von OATP1B-Transportern zu testen, um potenzielle Substrate oder Inhibitoren zu identifizieren und mögliche DDIs in den frühen Phasen der Arzneimittelentwicklung vorherzusagen. Aufgrund ihrer medizinisch essenziellen Bedeutung ist es wichtig, die molekularen und strukturellen Grundlagen der Substratselektivität und der Aufnahmemechanismen aufzuklären.

Ziel dieses Forschungsprojekts war es, die Substratselektivität und den Transportmechanismus von den OATP1B-Transportern durch strukturelle und funktionelle Studien aufzuklären. Um hochauflösende Strukturen von OATP1B1- und OATP1B3-Transportern zu erhalten, war es unerlässlich, eine robuste Plattform für die Überexpression funktioneller Proteine und die Aufreinigung stabiler und homogener Proben zu etablieren. In Kapitel 2 beschreibe ich die Entwicklung und das Screening verschiedener Fusionskonstrukte für die heterologe Expression und Aufreinigung von OATP1B1 und OATP1B3, wobei sich stabile Zelllinien als das beste Expressionssystem erwiesen. Um die Funktion der in stabilen Zelllinien exprimierten Fusionskonstrukte zu testen, habe ich Zell-basierte Transport Assays mithilfe von radioaktiv markierten Substraten durchgeführt, wie in Kapitel 3 beschrieben wird. Für die Ermöglichung der Strukturbestimmung von OATP1B1 und OATP1B3 in lipiden Nanodiscs erörtere ich in Kapitel 4 jene Methoden, die zur Generierung hochaffiner Konformationsbinder verwendet wurden. In Kapitel 5 beschreibe ich die ermittelten Kryo-EM-Strukturen von OATP1B1 und OATP1B3 in funktionell unterschiedlichen Konformationen, die es uns ermöglichten, einen

potenziellen Transportmechanismus herzuleiten. Die Struktur von E1S-OATP1B1 wurde mit einer Auflösung von 3.67 Å bestimmt, was die Identifizierung der Substratbindetasche ermöglichte. Die Ergebnisse erlauben einen Einblick in das strukturelle Grundgerüst, welches für die Selektivität des Transporters für große organische Anionen verantwortlich ist. Zudem, konnten wir ein, von OATP1B3 gebundenes, Bikarbonat Ion beobachten, welches in einer Bindetasche koordiniert wird, die von Aminosäuren des Signaturmotivs und einem hochkonservierten Histidin, das mit der pH-Empfindlichkeit von OATP-Transportern in Verbindung gebracht wird, besteht. Die Struktur von dem Bicarbonat-gebundenen OATP1B3 wurde mit einer Auflösung von 2.97 Å bestimmt.