

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ, СЕЛЕКТИВНО ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТЁР OATP1B1

© 2023 М.С. Котлярова¹, А.В. Шулькин², П.Д. Ерохина², П.Ю. Мыльников²,
Е.Н. Якушева², Н.И. Надолинская¹, М.В. Замахеев¹, А.В. Гончаренко^{1*}

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха,
119071 Москва, Россия; электронная почта: pylaevanna@gmail.com

² Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова
Минздрава России, 390026 Рязань, Россия

Поступила в редакцию 25.05.2023

После доработки 30.06.2023

Принята к публикации 23.08.2023

Полипептид, транспортирующий органические анионы, OATP1B1 — один из важнейших белков-транспортёров, опосредующий проникновение многих эндогенных веществ и ксенобиотиков в гепатоциты. Для оценки взаимодействия OATP1B1 с различными веществами необходима модельная система, обеспечивающая экспрессию функционального белка. На основе клеток HEK293 была получена линия HEK293-OATP1B1, стабильно экспрессирующая ген *SLCO1B1*, кодирующий транспортёр OATP1B1. Экспрессия гена *SLCO1B1* была подтверждена с помощью ПЦР-анализа в реальном времени, а наличие белка — иммунохимически. Функциональность транспортёра была оценена по транспорту аторвастатина, являющегося субстратом OATP1B1. Полученная клеточная линия, селективно продуцирующая функционально активный рекомбинантный транспортёр OATP1B1, может быть использована для его изучения, а также для тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам OATP1B1 и оценки рисков межлекарственных взаимодействий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: белки-транспортёры, *SLCO1B1*, OATP1B1, HEK293, трансфекция, плаزمид, межлекарственные взаимодействия.

DOI: 10.31857/S0320972523090063, EDN: WTOBBY

ВВЕДЕНИЕ

Мембранные белки, осуществляющие перенос молекул через клеточные мембраны, могут быть разделены на 4 типа: ионные каналы, транспортёры растворённых веществ (SLC, solute carrier family), аквапорины и АТФ-зависимые насосы. Мембранные транспортные белки присутствуют практически во всех типах эукариотических клеток и участвуют в переносе ионов, сахаров, аминокислот и других молекул через цитоплазматические мембраны, а также мембраны органелл: митохондрий, эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, везикул [1].

Все SLC-белки используют для переноса своих субстратов разность электрохимических

потенциалов или ионный градиент. Именно поэтому они относятся ко вторично-активным транспортёрам.

Среди SLC-переносчиков выделяют следующие надсемейства: SLCO (SLC21)-надсемейство (organic anion-transporting polypeptides, OATP), SLC22A-надсемейство (organic anion transporters, OAT; organic cation transporters, OCT; organic cation/carnitine transporters, OCTN), SLC15A-надсемейство (peptide transporters, PEPT) и SLC47A-надсемейство (multidrug and toxin extrusion, MATE). Члены данных надсемейств опосредуют транспорт широкого спектра соединений: OCT переносит катионы, OATP — большие и гидрофобные органические анионы, а OAT — более мелкие и более гидрофильные органические

Принятые сокращения: EGFP — улучшенный зелёный флуоресцентный белок; клетки линии HEK293 — клетки, полученные из эмбриональных почек человека; OATP — белки-транспортёры органических анионов; OCT — белки-транспортёры органических катионов; SLC — белки-транспортёры растворённых веществ.

* Адресат для корреспонденции.

анионы, РЕРТ отвечают в основном за транспорт ди- и трипептидов [2, 3].

Одним из наиболее клинически значимых представителей ОАТР является ОАТР1В1 (ОАТР2).

ОАТР1В1 (organic anion transporting polypeptide 1В1) экспрессируется на базолатеральной мембране гепатоцитов, где этот транспортёр опосредует поглощение ряда амфипатических соединений из портальной крови [4].

ОАТР1В1 является основным базолатеральным переносчиком, обеспечивающим проникновение внутрь гепатоцитов желчных солей, а также транспорт билирубина, гормонов, циклических и линейных пептидов. Мутации в гене *SLCO1B1* (solute carrier organic anion transporter family member 1В1), кодирующем ОАТР1В1, являются причиной синдрома Ротора — наследственного заболевания, проявляющегося гипербилирубинемией [5].

Кроме того, ОАТР1В1 участвует в транспорте ряда токсинов и лекарственных веществ, в частности антибиотиков, статинов и противораковых препаратов.

Известно, что активность ОАТР1В1 изменяется под воздействием ряда факторов и веществ. Индинавир, саквинавир, ритонавир, рифампицин и циклоспорин А ингибируют ОАТР1В1 и могут вызывать лекарственно-индуцированную гипербилирубинемия [6] или аторвастатин-индуцированный рабдомиолиз [7].

Очевидна необходимость тестирования новых лекарственных препаратов на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам ОАТР1В1. В качестве модели *in vivo* были предложены мыши с нокаутом по гену *Oatp1b2*, имеющему сходство с *SLCO1B1* и *SLCO1B3*. Степень гомологии продукта гена с ОАТР1В1 составляет 65%, и модель хорошо себя показала при исследованиях поглощения известных субстратов ОАТР1В1. Однако возможны и межвидовые отличия, например нокаут гена не влиял на соотношение концентраций цериастатина и симвастатиновой кислоты в печени и плазме животных, что может указывать на разницу в субстратной специфичности и требует дальнейшего изучения [8]. Кроме того, на уровне целого организма сложнее оценить вклад взаимодействия препарата с конкретным транспортёром из-за большого числа других факторов, и, как правило, модели *in vivo* и *in vitro* дополняют друг друга. Согласно международным рекомендациям управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (The U.S. Food and Drug Administration, FDA), Европейского агентства по лекарственным средствам

(European Medicines Agency, ЕМА) и Международного консорциума по транспортёрам (The International Transporter Consortium, ITC), данные исследования проводят на первичных гепатоцитах или клеточных линиях, которые стабильно и селективно синтезируют рекомбинантный ОАТР1В1. Последние удобнее для выявления взаимодействия с конкретным белком, поскольку клеточные линии гепатоцитарного происхождения обычно экспрессируют сразу несколько транспортёров, что затрудняет проведение анализа [9, 10, 11].

На сегодняшний день в России отсутствуют подобные клеточные линии и их приобретение невозможно, поэтому актуальна задача получения отечественных клеточных линий, экспрессирующих клинически значимые белки-транспортёры. Целью настоящей работы явилось создание клеточной линии, селективно гиперэкспрессирующей человеческий транспортёр ОАТР1В1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. Клетки линии НЕК293 (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; https://incras-ckp.ru/catalog/293-hek-293/?PROP_25=1) и полученные рекомбинантные клетки НЕК293-ОАТР1В1 культивировали в Дульбекко-модифицированной среде Игла («ПанЭко», Россия) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/литр) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», Германия) и 2 мМ L-глутамин («Sigma-Aldrich», Германия) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в инкубаторе WS-189С («World Science», Южная Корея). Каждый эксперимент выполнялся в трёх повторях.

Получение плазмиды pEGFP-SLCO1B1. Ген *SLCO1B1* (Gene ID:10599, NCBI Reference Sequence: NM_006446.5) был получен путём синтеза («Atagenix», Китай) и клонирован в линейаризованный по сайтам XhoI и HindIII вектор pEGFP-N1 путём безлигазного клонирования с Т4 ДНК-полимеразой, в результате чего была получена плазида pEGFP-SLCO1B1 (рис. 1П в Приложении). Соответствие последовательности клонированного гена *SLCO1B1* проверяли секвенированием. Целевой ген клонирован в вектор pEGFP-N1 в одной рамке считывания с геном, кодирующим улучшенный зелёный флуоресцентный белок EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) на C-конце (рис. 1). Поскольку ген *EGFP* находится в той же рамке считывания, что и целевой ген *SLCO1B1*,



Рис. 1. Фрагмент экспрессионного вектора pEGFP-SLCO1B1

флуоресценция в трансфицированной клетке должна была указывать на экспрессию *SLCO1B1*.

Трансфекция. Клетки линии HEK293 (пассаж 49) высевали в 96-луночный планшет («NEST», Китай) в количестве 10^4 клеток на лунку. По достижении 70% конфлюэнтности клетки подвергали трансфекции плазмидой pEGFP-SLCO1B1 методом липофекции с использованием реагента Lipofectamine 3000 Reagent («Invitrogen», США). Все манипуляции производили в соответствии с инструкцией производителя. Через 48 ч экспрессию EGFP оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus CKX53 («Olympus», Япония). Для получения стабильных клонов HEK293-OATP1B1, экспрессирующих *SLCO1B1*, проводили селекцию с использованием антибиотика G-418 («Promega», США) в концентрации 500 мкг/мл. Было отобрано четыре стабильных клона, которые, в свою очередь, подвергли клональной селекции методом предельных разведений. Через 2 недели культивирования клоны с сохранённой флуоресценцией перестали получать антибиотики и подверглись вторичному клонированию. Целевые клоны отбирали по интенсивности флуоресценции, размножали и использовали для дальнейшей работы. Стабильность экспрессии рекомбинантного белка клетками линии HEK293-OATP1B1 оценивали после 10 последовательных пассажей.

ПЦР в реальном времени. Экспрессия гена *SLCO1B1* в полученной клеточной линии HEK293-OATP1B1 была подтверждена методом ПЦР в реальном времени. Для этого клетки культивировали в 6-луночных планшетах («Corning», США; 351146). После образования монослоя их механически (с помощью скребка) снимали с лунок. Суммарную РНК выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit («QIAGEN», Германия), согласно инструкции производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрическим способом с помощью NanoPhotometr NP80-Touch («Implen», Германия). Реакцию ОТ-ПЦР проводили одношаговым методом с помощью набора «Био-Мастер ОТ-ПЦР SYBR Blue» («Биолабмикс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Условия обратной транскрипции: температура – 45 °С, время – инкубации 10 мин, количество циклов – 1.

Последовательности праймеров были подобраны с помощью программы DNASTAR Lasregene, PrimerSelect. Для оценки экспрессии гена *SLCO1B1* использовали следующие праймеры: 5'-GGTGAATGCCCAAGAGATGAG-3' (прямой) и 5'-TGGAAACCCAGTGC AAGTGATT-3' (обратный) («Евроген», Россия). В качестве референсного гена, относительно экспрессии которого вычислялась экспрессия *SLCO1B1*, был выбран ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH), и следующие праймеры: 5'-GTCC CTCTGACTTCAACAGCG-3' (прямой) и 5'-AC CACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3' (обратный) («Евроген»). Анализ проводили при следующих условиях температурных циклов: денатурация – нагрев реакционной смеси до 95 °С в течение 10 с, затем охлаждение – 10 с при 53 °С и элонгация – 72 °С при 30 с. Число циклов – 40. Для работы использовались пробирки объёмом 0,2 мл в стрипах по 8 штук («Axygen», США). Анализ проводился на амплификаторе нуклеиновых кислот Applied Biosystems Quant Studio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени («Life Technologies Holdings Pte. Ltd.», Сингапур) с программным обеспечением QuantStudio Design and Analysis. Расчёт уровня экспрессии *SLCO1B1* относительно референсного гена был осуществлён с помощью программного обеспечения LinRegPCR v.11.0 (Heart failure research center, Нидерланды).

Вестерн-блоттинг. Синтез белка OATP1B1 в полученной клеточной линии HEK293-OATP1B1 был подтверждён методом вестерн-блоттинга. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах («Corning»). После образования монослоя их снимали с лунок раствором трипсин–ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА; «Sigma-Aldrich», США). Полученные клетки лизировали при помощи буфера NP40 («Thermo Fisher Scientific», США) с ингибиторами протеаз («Sigma Aldrich», США; S8820-2ТАВ) из расчёта 100 мкл буфера на 10^7 клеток в течение 30 мин при 4 °С. Каждые 10 мин образцы перемешивали на встряхивателе Vortex («Heidolph», Германия). Концентрацию белка в пробах определяли по методу Бредфорда [12]. Интенсивность окраски оценивали на спектрофотометре «SmartSpec Plus»

(«Bio-Rad», США) при длине волны 595 нм. Далее, по 20 мкг каждого образца подвергали электрофорезу в 10%-ном полиакриламидном геле с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad») в буферной системе Laemmli («Bio-Rad») и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad») с размером пор 0,2 мкм методом полусухого переноса при помощи прибора Transblot («Bio-Rad»). Затем мембраны на 1 ч помещали в раствор казеина («Bio-Rad»), после чего инкубировали с первичными поликлональными кроличьими антителами ОАТР2 Polyclonal Antibody («Invitrogen»; PA5-113548; разведение 1 : 2000) в течение ночи при 4 °С. После инкубации с первичными антителами мембрану промывали Tris-солевым буферным раствором («Bio-Rad»), после чего инкубировали 1 ч при комнатной температуре с вторичными антителами Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP («Invitrogen»; 31462; разведение 1 : 4000). Белки визуализировали с помощью системы Chemi Doc XRS+ («Bio-Rad»). Количество ОАТР1В1 оценивали относительно содержания глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы GAPDH (первичные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), («Invitrogen»; MA5-15738; разведение 1 : 1000)); вторичные антитела – Rabbit anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP («Invitrogen»; 31450; разведение 1 : 4000). Интенсивность окраски полос оценивали денситометрически с использованием программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad»).

Конфокальная микроскопия. Мембранная локализация ОАТР1В1 была подтверждена конфокальной микроскопией. По 10^5 клеток линии НЕК293-ОАТР1В1 высевали на 35-мм чашку со стеклянным дном, на следующие сутки изучали клетки с использованием микроскопа Nikon TE2000-U, оснащенного конфокальной сканирующей системой DCS-120 с детектором РМС-100 («Becker&Hickl», Германия). Получали серии оптических срезов с шагом в 1 мкм.

Транспортные эксперименты. Активность ОАТР1В1 в трансфицированных клетках НЕК293-ОАТР1В1 оценивали по проникновению внутрь клеток субстрата транспортёра аторвастатина («Sigma-Aldrich», Германия). Аторвастатин (3,1 мг) растворяли в 600 мкл диметилсульфоксида (ДМСО; «ПанЭко», Россия) и доводили объём до 2,5 мл транспортной средой (сбалансированный солевой раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich», Германия), содержащий 25 мМ Hepes (pH 7,4) и 1% диметилсульфоксида). Полученный раствор последовательно разводили транспортной средой до

концентрации 1 мкМ. В качестве контроля использовали интактные клетки НЕК293. Непосредственно перед проведением транспортного эксперимента клетки однократно промывали нагретой до 37 °С транспортной средой. Затем к клеткам добавляли транспортную среду, содержащую аторвастатин в конечной концентрации 1 мкМ. Для ингибирования функциональной активности ОАТР1В1 перед проведением транспортного эксперимента клетки НЕК293-ОАТР1В1 преинкубировали со 100 мкМ рифампицина («Spectrum Chemical Mfg. Corp.», США), являющегося ингибитором транспортёра, в течение 15 мин при 37 °С, после чего рифампицин удаляли из лунки и добавляли смесь рифампицина (100 мкМ) и аторвастатина (1 мкМ). Клетки инкубировали в течение 5, 15, 30, 45 и 60 мин. Реакцию останавливали удалением транспортной среды, содержащей тестируемое вещество, и немедленной промывкой клеток 500 мкл охлаждённой транспортной среды.

Для описания кинетики активности ОАТР1В1 и выбора оптимальной концентрации в созданной клеточной линии выполняли эксперименты с разными концентрациями аторвастатина (0,1; 1; 10 и 50 мкМ).

После остановки транспорта клетки трижды промывали 500 мкл холодного фосфатного буфера («ПанЭко», Россия). Лизис клеток осуществляли 3-кратным циклом замораживания-размораживания (клетки замораживали при –80 °С, затем размораживали при комнатной температуре). Концентрацию общего белка в пробах анализировали по методу Бредфорда [12] с помощью коммерческого набора Pierce Coomassie Plus Bradford Assay Kit («ThermoFisher», США). Интенсивность окраски оценивали на спектрофотометре «SmartSpec Plus» («Bio-Rad») при длине волны 595 нм.

Высокоэффективная жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС/МС). Концентрацию аторвастатина в лизате клеток определяли методом ВЭЖХ-МС/МС по ранее описанному и валидированному методу [13] на высокоэффективном жидкостном хроматографе Ultimate 3000 («ThermoFisher») с тандемным масс-селективным детектором TSQ Fortis («ThermoFisher»), градиентным насосом, дегазатором и автосемплером. Полученные результаты обрабатывались с помощью программного обеспечения «Thermo Scientific Xcalibur» (ver. 4.2.47). Нижний предел количественного определения для аторвастатина составил 0,5 нмоль/литр. Линейность метода была подтверждена в диапазоне 0,5–200 нмоль/литр.

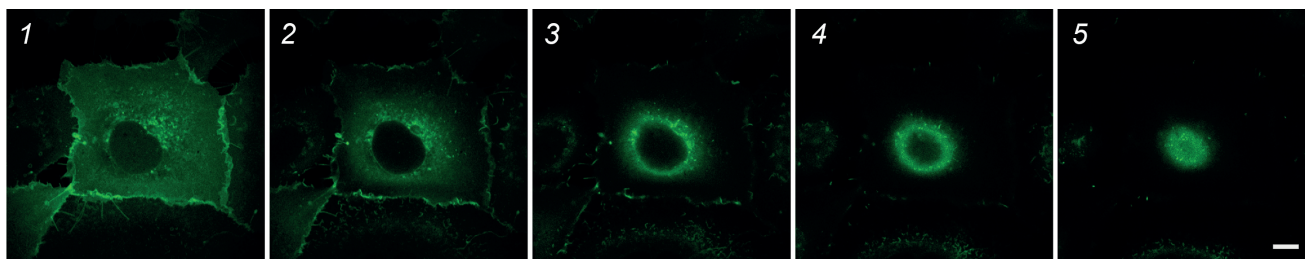


Рис. 2. Флуоресценция HEK293-OATP1B1. На рисунке приведена серия оптических срезов с шагом 1 мкм. Цифрами обозначены номера срезов. Локализация EGFP преимущественно в перинуклеарной области и на клеточной мембране, что соответствует синтезу и встраиванию в мембрану клетки химерного белка OATP1B1–EGFP. Масштабный отрезок – 20 мкм

Статистический анализ полученных результатов. Статистический анализ проводился с использованием программы GraphPad Prism версии 8.1.2. («GraphPad Software», США). Полученные данные представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение. Различия между группами определяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением теста Даннетта при сравнении более чем двух групп и непарного *t*-критерия Стьюдента – при сравнении двух групп. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Кинетические параметры K_m (константа Михаэлиса) и V_{max} (максимальная скорость поглощения) рассчитывали с использованием уравнения конкурентного ингибирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клетки линии HEK293 трансфицировали плазмидой pEGFP-N1-SLCO1B1. Целевой белок экспрессировался в виде полипептида слияния с EGFP на С-конце.

Через 48 ч после выполнения трансфекции оценивали ее эффективность с использованием флуоресцентного микроскопа. В среднем ~70% клеток экспрессировали EGFP. Для получения стабильной клеточной линии производили селекцию с использованием G-418 в концентрации 500 мкг/мл.

Трансфицированные EGFP-экспрессирующие клетки отбирали методом предельных разведений. Выбранный клеточный клон HEK293-OATP1B1 в течение месяца наблюдения сохранял флуоресценцию, что свидетельствовало об интеграции плазмиды в геном. На рис. 2 приведена серия оптических срезов клеток HEK293-OATP1B1, полученная методом конфокальной микроскопии. Отмечалась преимущественно мембранная локализация EGFP, что указывает на встраивание транспортера OATP1B1 в клеточную мембрану.

Также накопление флуорохрома наблюдалось вблизи ядра, предположительно, в области эндоплазматического ретикулула и аппарата Гольджи, что, вероятно, связано с синтезом и транслокацией белка. Менее интенсивная флуоресценция выявлялась в цитоплазме клетки, что может указывать на расщепление слитого полипептида. При оценке стабильности полученной клеточной линии было показано, что HEK293-OATP1B1 стабильно экспрессирует функционально активный OATP1B1 в течение 10 пассажей. Клон был размножен и использован для дальнейшей характеристики.

На следующем этапе исследования была оценена экспрессия гена *SLCO1B1* в полученной клеточной линии. Было показано, что экспрессия мРНК *SLCO1B1* в созданной клеточной линии HEK293-OATP1B1 существенно превышает данный показатель в нативных клетках HEK293, что подтверждает экспрессию рекомбинантного гена (рис. 3).

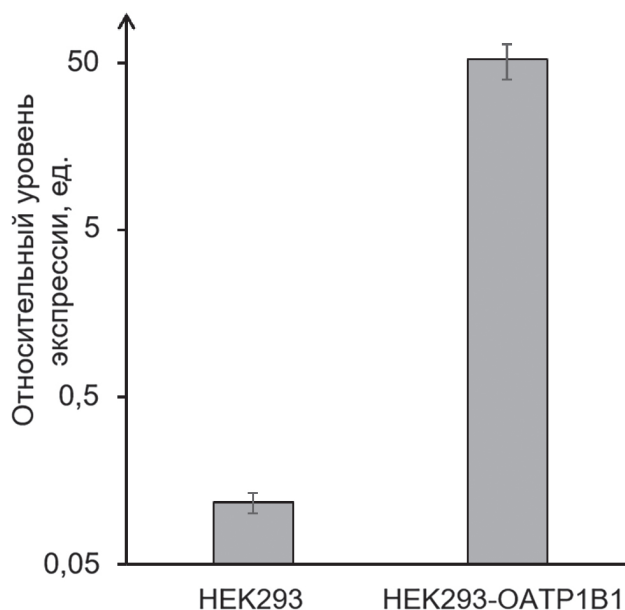


Рис. 3. Относительная представленность ампликонов гена *SLCO1B1* в клетках линий HEK293 и HEK293-OATP1B1 по результатам количественного ОТ-ПЦР-анализа в реальном времени

Относительное количество ОАТР1В1 в лизатах клеток оценивали методом вестерн-блот-анализа. Интактные клетки линии НЕК293 не содержали ОАТР1В1 (отсутствовали специфические полосы на мембране), в отличие от образцов клеток линии НЕК293-ОАТР1В1.

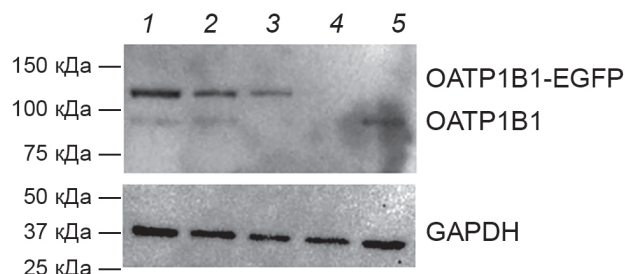


Рис. 4. Относительное содержание ОАТР1В1 в образцах лизатов клеток НЕК293-ОАТР1В1, НЕК293 и НерG2 по результатам вестерн-блот-анализа. Цифрами обозначены номера дорожек: 1 – НЕК293-ОАТР1В1 (20 мкг белка в лизате клеток), 2 – НЕК293-ОАТР1В1 (10 мкг), 3 – НЕК293-ОАТР1В1 (5 мкг), 4 – НЕК293 (20 мкг), 5 – НерG2 (20 мкг)

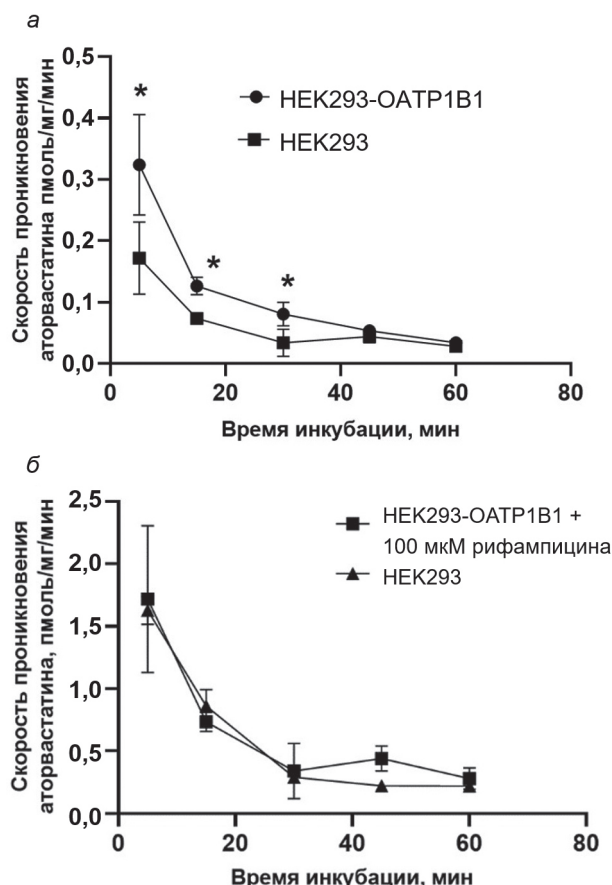


Рис. 5. Специфическая активность ОАТР1В1 в клетках линии НЕК293-ОАТР1В1. *а* – Проникновение аторвастатина (1 мкМ) в клетки НЕК293 и НЕК293-ОАТР1В1; *б* – проникновение аторвастатина в клетки НЕК293 и в клетки НЕК293-ОАТР1В1 в присутствии 100 мкМ рифампицина. * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия по сравнению с показателями клеток НЕК293

Полоса образцов из НЕК293-ОАТР1В1 располагалась на 30 кДа выше, чем полоса образцов клеток линии НерG2 (гепатоцеллюлярная карцинома), которые были использованы в качестве позитивного контроля, что свидетельствует о том, что ОАТР1В1 синтезировался в виде слитого с EGFP полипептида (рис. 4).

Стоит отметить, что, по данным вестерн-блоттинга, в клетках НЕК293-ОАТР1В1 наблюдается незначительное расщепление слитного белка до исходного ОАТР1В1 (рис. 4). Данный факт может объяснять попадание EGFP во внутренние компартменты клетки.

На заключительном этапе исследования была оценена специфическая активность ОАТР1В1 в клетках линии НЕК293-ОАТР1В1. В качестве субстрата ОАТР1В1 использовался аторвастатин в концентрации 1 мкМ. Проникновение аторвастатина внутрь клеток НЕК293-ОАТР1В1 на всех временных точках эксперимента (5, 15 и 30 мин) достоверно превышало проникновение субстрата в интактные клетки НЕК293 (рис. 5, *а*). Обработка клеток ингибитором ОАТР1В1 рифампицином в концентрации 100 мкМ приводила к снижению транспорта аторвастатина в клетки НЕК293-ОАТР1В1 до уровня интактных НЕК293 на всех временных точках эксперимента (рис. 5, *б*).

Полученные данные свидетельствуют о том, что ОАТР1В1 в созданной клеточной линии НЕК293-ОАТР1В1 является функционально активным. При этом максимальная скорость транспорта аторвастатина наблюдалась через 5 мин и затем постепенно снижалась. Поэтому для дальнейших исследований использовали время инкубации 5 мин. Для описания кинетики активности ОАТР1В1 в созданной клеточной линии выполняли эксперименты с разными концентрациями аторвастатина (0,1;

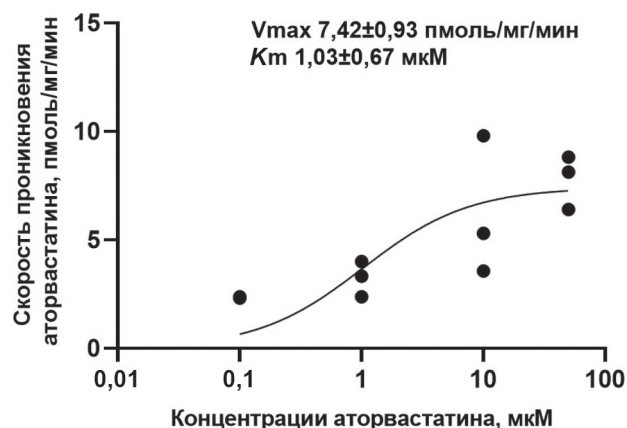


Рис. 6. Зависимость проникновения аторвастатина внутрь клеток от его концентрации

1; 10 и 50 мкМ). При расчёте константы Михаэлиса (K_m) и скорости реакции при насыщении фермента субстратом (V_{max}) были получены следующие результаты: $K_m = 1,03 \pm 0,67$ мкМ; $V_{max} = 7,42 \pm 0,93$ пмоль $\cdot$ мг $^{-1}$ $\cdot$ мин $^{-1}$ (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Создание клеточной линии, селективно экспрессирующей важнейший транспортный белок OATP1B1, позволит решить ряд задач по изучению механизмов его работы и оценке его роли в транспорте эндогенных молекул, а также тестировать лекарственные вещества на принадлежность к его субстратам, индукторам и ингибиторам *in vitro*, что необходимо для прогнозирования развития межлекарственных взаимодействий с участием OATP1B1.

Клетки HEK293 характеризуются низкой эндогенной экспрессией транспортёров, в том числе OATP1B1, что позволяет рассматривать их как оптимальную культуру для получения модельной линии для гиперэкспрессии целевого гена [14]. Также преимуществами клеток HEK293 являются высокая эффективность трансфекции, быстрая скорость роста и простота поддержания культуры, а также и способность осуществлять правильный фолдинг целевого белка [15].

Целевой ген был введён в клетки HEK293 в составе плазмиды pEGFP-N1-SLCO1B1, обеспечивающей экспрессию OATP1B1, слитого с EGFP на C-конце. Затем была проведена селекция с использованием G-418 и отбор клонов с интегрированной в геном генетической конструкцией методом предельных разведений. При нелегитимной рекомбинации экспрессионный вектор встраивается в случайное место в геноме. В результате этого большинство клонов, экспрессирующих целевой продукт, могут быть нестабильны или обеспечивать низкий выход белка. Выделение стабильных клонов клеток, экспрессирующих рекомбинантный белок с высоким выходом, является ключевой задачей в разработке стабильной клеточной линии.

В данной работе значительная часть клонов выживала в среде с антибиотиком, однако не обладала способностью к флуоресценции. Вероятно, в таких клонах интеграция плазмиды произошла с нарушением структуры гена слитого белка. Так как ген EGFP находится после SLCO1B1 в той же рамке считывания, появление зеленой флуоресценции указывает на экспрессию целевого гена. Использование флуоресцентной метки облегчает селекцию,

что позволило нам получить стабильно экспрессирующие белок клоны даже при трансфекции небольшой исходной популяции (10^4 клеток).

Ранее в работе, где была получена линия HEK293, транзистентно экспрессирующая SLCO1B1, было показано, что использование EGFP в качестве C-концевой метки не препятствует функциональности белка. Так, установлено, что при временной экспрессии такого химерного белка в клетках HEK293 поглощение эстрон-3-сульфата возросло более, чем в 6 раз по сравнению с нативными клетками [16].

В полученной клеточной линии флуоресцентная метка была локализована преимущественно на клеточной мембране, а рекомбинантный OATP1B1 обладал функциональной активностью. В исследовании поглощения аторвастатина были получены следующие значения константы Михаэлиса и скорости реакции: $K_m = 1,03 \pm 0,67$ мкМ; $V_{max} = 7,42 \pm 0,93$ пмоль $\cdot$ мг $^{-1}$ $\cdot$ мин $^{-1}$. Полученные значения активности OATP1B1 в созданной клеточной линии соответствуют показателям, полученным другими авторами: в работе Karlgren et al. [17] значение K_m составляло $0,77 \pm 0,24$ мкМ, а $V_{max} = 6,61 \pm 1,24$ пмоль $\cdot$ мг $^{-1}$ $\cdot$ мин $^{-1}$; в работе Amundsen et al. [18] были получены значения $K_m = 0,93 \pm 0,23$ мкМ и $V_{max} = 3,84 \pm 0,27$ пмоль $\cdot$ мг $^{-1}$ $\cdot$ мин $^{-1}$.

Таким образом, функционально активный транспортёр OATP1B1 стабильно экспрессируется в созданной клеточной линии. Эта система экспрессии может быть использована для изучения работы OATP1B1 и в качестве модели для тестирования лекарственных веществ и оценки возможности межлекарственных взаимодействий, осуществляющихся через данный транспортёр. Полученная линия доступна для исследований по запросу. Также представляет интерес возможность введения мутаций в ген SLCO1B1 вектора pEGFP-SLCO1B1. Полученная таким путём транзистентная или постоянная клеточная линия может использоваться для изучения полиморфизмов SLCO1B1, для оценки их влияния на эффективность и возможные побочные эффекты приёма лекарственных препаратов, что является шагом к разработке персонализированной медицины.

Вклад авторов. А.В. Гончаренко, А.В. Шулькин — концепция и руководство исследованием; М.С. Котлярова, П.Д. Ерохина, П.Ю. Мыльников, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева, М.В. Замахаев, Н.И. Надолинская — проведение экспериментов; П.Д. Ерохина, П.Ю., Мыльников,

А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева, М.С. Котлярова, А.В. Гончаренко — написание текста статьи; М.В. Замахаяев — редактирование текста статьи.

Благодарности. Авторы благодарят за помощь ЦКП «Индустриальная Биотехнология» ФИЦ Биотехнологии РАН и И.Д. Соловьева за помощь в проведении конфокальной микроскопии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vasiliou, V., Vasiliou, K., and Nebert, D. W. (2009) Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family, *Hum. Genomics*, **3**, 281-290, doi: 10.1186/1479-7364-3-3-281.
- Roth, M., Obaidat, A., and Hagenbuch, B. (2012) OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies, *Br. J. Pharmacol.*, **165**, 1260-1287, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x.
- Liu, X. (2019) SLC family transporters, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1141**, 101-202, doi: 10.1007/978-981-13-7647-4_3.
- Hsiang, B., Zhu, Y., Wang, Z., Wu, Y., Sasseville, V., Yang, W. P., and Kirchgesner, T. G. (1999) A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters, *J. Biol. Chem.*, **274**, 37161-37168, doi: 10.1074/jbc.274.52.37161.
- Van de Steeg, E., Stranecky, V., Hartmannova, H., Noskova, L., Hrebicek, M., Wagenaar, E., van Esch, A., de Waart, D. R., Oude Elferink R. P., Kenworthy, K. E., Sticova, E., al-Edreesi, M., Knisely, A. S., Kmoch, S., Jirsa, M., and Schinkel, A. H. (2012) Complete OA TPIB1 and OA TPIB3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver, *J. Clin. Invest.*, **122**, 519-528, doi: 10.1172/JCI59526.
- Campbell, S. D., de Morais, S. M., and Xu, J. J. (2004) Inhibition of human organic anion transporting polypeptide OATP1B1 as a mechanism of drug-induced hyperbilirubinemia, *Chem. Biol. Interact.*, **150**, 179-187, doi: 10.1016/j.cbi.2004.08.008.
- Neuvonen, P., Niemi, M., and Backman, J. (2006) Drug interactions with lipid-lowering drugs: Mechanisms and clinical relevance, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **80**, 565-581, doi: 10.1016/j.clpt.2006.09.003.
- Chen, C., Stock, J. L., Liu, X., Shi, J., Van Deusen, J. W., DiMattia, D. A., Dullea, R. G., and de Morais, S. M. (2008) Utility of a novel Oatplb2 knockout mouse model for evaluating the role of Oatplb2 in the hepatic uptake of model compounds, *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 1840-1845, doi: 10.1124/dmd.108.020594.
- Hirano, M., Maeda, K., Shitara, Y., and Sugiyama, Y. (2004) Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**, 139-146, doi: 10.1124/jpet.104.068056.
- Sudsakorn, S., Bahadduri, P., Fretland, J., and Lu, C. (2020) 2020 FDA drug-drug interaction guidance: a comparison analysis and action plan by pharmaceutical industrial scientists, *Curr. Drug Metab.*, **6**, 403-426, doi: 10.2174/1389200221666200620210522.
- Drug interaction studies (2022) URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m12-drug-interaction-studies-step-2b_en.pdf.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **7**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Erokhina, P. D., Myl'nikov, P. Y., Ganina, S. O., Konyakhin, E. A., Shchul'kin, A. V., Slepnev, A. A., and Yakusheva, E. N. (2022) Development and validation of the quantitative determination of atorvastatin in HepG2 cell line using high-performance liquid chromatography with mass-spectrometric detection, *I. P. Pavlov Russ. Med. Biol. Herald*, **30**, 149-158, doi: 10.17816/PAVLOVJ100986.
- Ahlin, G., Hilgendorf, C., Karlsson, J., Szegarty, C. A. K., Uhlén, M., and Artursson, P. (2009) Endogenous gene and protein expression of drug-transporting proteins in cell lines routinely used in drug discovery programs, *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 2275-2283, doi: 10.1124/dmd.109.028654.
- Ooi, A., Wong, A., Esau, L., Lemtiri-Chlieh, F., and Gehring, C. (2016) A guide to transient expression of membrane proteins in HEK-293 cells for functional characterization, *Front. Physiol.*, **7**, 300, doi: 10.3389/fphys.2016.00300.
- Sun, A. Q., Ponamgi, V. M., Boyer, J. L., and Suchy, F. J. (2008) Membrane trafficking of the human organic anion-transporting polypeptide C (hOATPC), *Pharm. Res.*, **25**, 463-474, doi: 10.1007/s11095-007-9399-9.
- Karlgrén, M., Ahlin, G., Bergström, C. A., Svensson, R., Palm, J., and Artursson, P. (2012) *In vitro* and *in silico* strategies to identify OATP1B1 inhibitors and

- predict clinical drug-drug interactions, *Pharm. Res.*, **29**, 411-426, doi: 10.1007/s11095-011-0564-9.
18. Amundsen, R., Christensen, H., Zabihyan, B., and Asberg, A. (2010) Cyclosporine A, but not tacrolimus, shows relevant inhibition of organic anion-transporting protein 1B1-mediated transport of atorvastatin, *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 1499-1504, doi: 10.1124/dmd.110.032268.

GENERATION OF A CELL LINE SELECTIVELY PRODUCING THE FUNCTIONALLY ACTIVE OATP1B1 TRANSPORTER

M. S. Kotliarova¹, A. V. Shchulkin², P. D. Erokhina², P. Y. Mylnikov², E. N. Yakusheva²,
N. I. Nadolinskaia¹, M. V. Zamakhaev¹, and A. V. Goncharenko^{1*}

¹ *Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; e-mail: pylaevanna@gmail.com*

² *Ryazan State Medical University named after Academician I. P. Pavlov, 390026 Ryazan, Russia*

The solute carrier organic anion transporter family member OATP1B1 is one of the most important transporter proteins which mediate the penetration of many endogenous substances and xenobiotics into hepatocytes. A model system providing the expression of the functional protein is needed to assess the interaction of OATP1B1 with various substances. Based on HEK293 cells, we obtained the HEK293-OATP1B1 cell line, permanently expressing the *SLCO1B1* gene encoding the OATP1B1 transporter. Expression of the *SLCO1B1* gene was confirmed by real-time PCR analysis and immunochemically. The functionality of the transporter was assessed by the transport of atorvastatin, which is a substrate of OATP1B1. Cells of the resulting cell line, which selectively express the functionally active recombinant OATP1B1 transporter, can be used to study its function and to test drugs for belonging to substrates, inducers, and inhibitors of OATP1B1 to assess the risks of drug-drug interactions.

Keywords: transporter proteins, *SLCO1B1*, OATP1B1, HEK293, transfection, plasmid, drug-drug interactions