

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

β1-АДРЕНОРЕЦЕПТОР В СОСТАВЕ НАНОДИСКОВ РАЗМЕРОМ 10-16 НМ СОХРАНЯЕТ ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА

Т.В. Шарф¹, В.А. Балобанов², М.М. Пекло^{1}, Л.Н. Липатова¹, Н.М. Каширина¹, И.Б. Кузнецова¹, Е.В. Янушевская¹, П.Н. Руткевич¹, И.Н. Рыбалкин¹, В.А. Колб², Т.Н. Власик¹, Е.Е. Ефремов¹*

¹Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. ак. Е.И. Чазова, 121552 Москва, ул. Академика Чазова, 15а; *e-mail: peclo@yandex.ru

²Институт белка РАН, Пушкино

Выявление в крови больных аутоантител к β1-адренорецептору (АДРБ1 АТ) и мониторинг содержания этих антител является актуальной потребностью клинической практики. Формат твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), где в качестве антигена используется АДРБ1 в нативной конформации, представляется наиболее удобным для решения этой задачи. Ранее нами было проведено тестирование различных амфипатических полимеров по их способности солибилизовать АДРБ1 в форме нанодисков, таким образом, чтобы АДРБ1 сохранял свои антигенные свойства. Целью настоящей работы было изучение лиганд-связывающих свойств АДРБ1 в составе нанодисков, полученных с помощью амфипатических полимеров Ultrasolute™ Amphipol (UA17) и AASTY 11-45, а также определение размеров нанодисков методом динамического светорассеяния. Связывание лигандов изопроterenоло (агониста) и цианопиндолола (антагониста) оценивали по их способности конкурировать с рекомбинантными антителами hAB2367, специфичными ко второй внеклеточной петле АДРБ1, в твердофазном ИФА. Было продемонстрировано сохранение лиганд-связывающих свойств АДРБ1, солиблизованного с помощью UA17 и AASTY 11-45. Этот факт служит свидетельством в пользу предположения о сохранности нативной структуры АДРБ1 в составе нанодисков. Методом динамического светорассеяния впервые определен размер нанодисков, получаемых с использованием UA17. В диапазоне концентраций полимера от 0.0625% до 0.5% не обнаружено достоверных различий в размерах нанодисков, варьирующих от 10 нм до 16 нм.

Ключевые слова: β1-адренорецептор; нанодиски; Ultrasolute™ Amphipol 17; AASTY 11-45

DOI: 10.18097/BMCRM00247

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в литературе имеется немало данных, свидетельствующих о возможном вкладе аутоиммунных процессов в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний. В основном эти исследования касаются пациентов, страдающих хронической сердечной недостаточностью (ХСН) различной этиологии. В частности, аутоантитела к β1-адренорецептору (АДРБ1 АТ) обнаруживаются в сыворотке крови больных дилатационной кардиомиопатией (ДКМП, [1, 2]), болезнью Чагаса [3], перипартальной кардиомиопатией [4]. Было показано, что по крайней мере некоторые АДРБ1 АТ вызывают увеличение частоты и силы сокращений (положительный хронотропный и инотропный эффекты соответственно) кардиомиоцитов, выделенных из желудочков сердца новорожденных крысят. Кроме того, АДРБ1 АТ обладают прямым и непрямым (опосредованным через фибробласты сердца) кардиотоксическим действием. Современные представления о кардиопатогенных свойствах АДРБ1 АТ рассмотрены в обзорах [5-7]. Патогенетическая роль АДРБ1 АТ обуславливает соответствующие терапевтические стратегии, связанные с удалением этих антител из кровотока больных. Так, проведение процедуры специфической иммуноадсорбции у больных ДКМП (сорбенты на основе пептидов, воспроизводящих фрагменты второй внеклеточной петли АДРБ1) приводило к улучшению гемодинамических показателей [8]. Как неизбирательное,

так и избирательное удаление иммуноглобулинов позволяло продлить время ожидания трансплантации сердца терминальным больным с ДКМП [9]. Таким образом, можно заключить, что выявление АДРБ1 АТ в крови больных и мониторинг содержания этих антител является актуальной потребностью клинической практики.

«Золотым стандартом» определения АДРБ1 АТ считается функциональный тест, который был впервые предложен в 1987 г. Wallukat с соавторами, а затем ими же усовершенствован и валидирован [10]. Метод основан на феномене появления положительного хронотропного эффекта в первичной культуре спонтанно сокращающихся кардиомиоцитов новорожденных крысят в присутствии АДРБ1 АТ. Сложность метода не позволяет использовать его в условиях клинических лабораторий.

Наиболее удобным для повседневной лабораторной работы является формат твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). До недавнего времени для обнаружения АДРБ1 АТ широко применяли ИФА с использованием в качестве антигена линейных пептидов, воспроизводящих в большинстве случаев аминокислотные последовательности второй внеклеточной петли АДРБ1 [11]. Данный метод, однако, не раз подвергался заслуженной критике ввиду его низкой чувствительности, обусловленной, по-видимому, тем, что линейные пептиды не способны адекватно воспроизводить конформационно-зависимые эпитопы молекул рецептора, с которыми предположительно



связываются АДРБ1 АТ [12-14]. Были также предприняты попытки (в том числе и в нашей лаборатории) создания протоколов выявления АДРБ1 АТ с помощью так называемых конкурентных ИФА, где в качестве антигена использовали трансгенные клетки, экспрессирующие на своей поверхности АДРБ1. Содержание АДРБ1 АТ в сыворотке крови пациентов оценивали по количеству связавшегося с антигеном мышинового рекомбинантного антитела к АДРБ1, конкурирующего с человеческими АДРБ1 АТ за места связывания с рецептором [15, 16]. Результаты оказались сложно интерпретируемыми, возможно, из-за частично денатурированного состояния антигена: клетки подвергались фиксации параформальдегидом [15] либо глутаровым альдегидом [16].

Для разработки адекватного метода твердофазного ИФА, позволяющего надежно и воспроизводимо выявлять АДРБ1 АТ, необходимо использовать в качестве антигена препарат рецептора в той же конформации, что и в исходной клеточной мембране. Перспективным подходом для решения этой задачи является сольubilизация АДРБ1 в форме нанодисков [17]. В нанодисках молекулы АДРБ1 оказываются включенными во фрагменты бислоидной липидной мембраны, что, согласно современным представлениям, должно сохранять нативную конформацию рецептора. Для получения нанодисков используют либо мембранные каркасные белки (membrane scaffold proteins, MSP [17]), либо амфипатические полимеры. Последние позволяют экстрагировать мембранные белки в нативном липидном окружении непосредственно из живых клеток или из мембранных везикул [18, 19].

В нашей предыдущей статье подробно описаны результаты тестирования различных амфипатических полимеров по их способности сольubilизировать АДРБ1 таким образом, чтобы он был пригоден для использования в качестве антигена в твердофазном ИФА [20]. АДРБ1, сольubilизированный с помощью либо Ultrasolute™ Amphipol 17 (UA17), либо AASTY 11-45, сохранял свои антигенные свойства будучи адсорбированным в лунках пластикового планшета.

Целью настоящей работы было дальнейшее изучение физико-химических свойств АДРБ1-содержащих нанодисков: определение их размеров методом динамического светорассеяния и оценка способности АДРБ1 связывать специфические лиганды.

МЕТОДИКА

Линия клеток, экспрессирующих АДРБ1, получение мембранной фракции (МФ) и сольubilизация мембранных белков

Создание линии клеток ADL-7A, экспрессирующих АДРБ1 человека, свойства и условия культивирования этих клеток описаны нами ранее [21]. Подробные протоколы получения клеток ADL-7A и сольubilизации мембранных белков содержатся в нашей предыдущей работе [20]. Клетки выращивали в чашках Петри диаметром 10 см до плотности около 10^7 клеток на чашку, отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ, «neoFroxx GmbH», Германия), затем снимали силиконовым скребком. Суспензию клеток обрабатывали ультразвуком, дебрис осаждали при 1000 g в течение 15 мин при 4°C, после чего супернатант отбирали, переносили

в пробирки для ультрацентрифугирования и осаждали МФ при 100000 g, 4°C в течение 1 ч. Осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 50 mM NaH_2PO_4 , 200 mM NaCl, 5 мкг/мл аprotинина и лейпептина, pH8.0, аликвотировали и хранили при -70°C.

С целью сольubilизации мембранных белков аликвоты МФ размораживали, измеряли в них концентрацию белка методом Бредфорда и доводили ее до 700 мкг/мл. Затем добавляли растворы полимеров UA17 или AASTY 11-45 (Synthetic Nanodisc Screening Kit MAXI, «Cube Biotech», Германия), используя 10% сток-растворы, приготовленные в соответствии с рекомендациями производителя. Конечная концентрация полимеров составляла 0.0625%, 0.125%, 0.25% и 0.5%. Препараты инкубировали при 37°C в течение 1 ч с перемешиванием на ротаторе Hematology Chemistry Mixer model 346 («Fisher», США), затем центрифугировали при 100000 g, 4°C в течение 1 ч. Полученные супернатанты, содержащие МФ, сольubilизированную полимерами (далее МФ + ПОЛ), использовали в дальнейшей работе.

Измерение размеров нанодисков методом динамического светорассеяния

Определение размеров нанодисков в препаратах МФ+ПОЛ проводили методом динамического рассеяния света с использованием прибора Malver Zetasizer Nano ZSP («Malvern Instruments», Великобритания) в режиме измерения размера частиц. Были использованы одноразовые пластиковые кюветы объемом 100 мкл и длиной оптического пути 1 см. Анализировали рассеяние под углом 173°. Для каждого образца измерения повторяли трижды. Обработку данных и графическое представление выполняли в программе Zetasizer Software 7.11.

Иммуоферментный анализ в присутствии лигандов АДРБ1

Образцы исходной МФ и МФ+ПОЛ (5 мкг/мл) адсорбировали на поверхности 96-луночных полистироловых планшетов для ИФА («Corning», США) в ФСБ при 4°C в течение ночи. На следующий день лунки планшетов промывали 4 раза ФСБ с 0.1% Tween-20 и вносили в них по 50 мкл раствора химерных (мышь/человек, 3 мкг/мл) рекомбинантных антител hAB2367 ко второй внеклеточной петле АДРБ1, полученных нами ранее [21], в блокирующем растворе, содержащем 20% казеинового концентрата СВС1 («SDT GmbH», Германия), 0.02% консерванта Proclin 300 («Sigma», США) и 0.1% Tween-20 в ФСБ, а также по 50 мкл растворов лигандов в том же буфере. Конечная концентрация изопротеренола («Sigma Aldrich», США) составляла 10 мМ, 20 мМ, 40 мМ и 80 мМ, цианопиндолола («Tocris Bioscience», США) – 0.313 мМ, 0.625 мМ, 1.25 мМ, 2.5 мМ, 5 мМ, 10 мМ и 20 мМ. Инкубацию проводили в течение 1 ч при комнатной температуре с перемешиванием на орбитальном шейкере (Kodak Amerlite Shaker Incubator, «Kodak», Великобритания) при скорости 750 об/мин. Затем лунки промывали 4 раза ФСБ с 0.1% Tween-20 и инкубировали 30 мин в тех же условиях с мышинными моноклональными АТ к человеческим IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена [22], которые вносили в рабочем разведении в блокирующем растворе по 100 мкл в каждую лунку.

Количество связавшегося конъюгата определяли при помощи хромогенного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Значения оптической плотности (ОП) при 450 нм (после остановки реакции раствором серной кислоты) считывали при помощи микропланшетного ридера Stat Fax-2100 («Awareness Technology», США). Анализ каждого образца проводили дважды, полученные значения ОП усредняли. Ингибирование связывания антител hAB2367 с лигандами АДРБ1 (эффект конкуренции) выражали в % от исходного связывания в отсутствие лиганда.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущей работе мы изучили способность различных амфипатических полимеров солюбилизовать АДРБ1 в форме, пригодной для использования в качестве антигена в твердофазном ИФА [20]. Предполагается, что разрабатываемый метод позволит надежно и достоверно определять содержание аутоантител к АДРБ1 в крови пациентов. Поэтому мы выбрали в качестве интегрального критерия эффективности солюбилизации максимальное связывание адсорбированными на пластике планшета препаратами МФ+ПОЛ (антигенами) специфических рекомбинантных антител hAB2367 ко второй внеклеточной петле АДРБ1 по отношению к аналогичному значению, получаемому с исходной МФ (условный показатель солюбилизации (УПС), выраженный в %). Наилучшими оказались полимеры UA 17 и AASTY 11-45 в концентрации 0.0625% (УПС 87% и 76% соответственно).

Для изучения лиганд-связывающих свойств АДРБ1 в составе нанодисков МФ+UA 17 и МФ+AASTY 11-45 были проведены эксперименты с двумя лигандами АДРБ1: агонистом изопротеринолом (ISO) и антагонистом цианопиндололом (СYA). В лунки планшета для ИФА вносили препараты МФ и МФ + ПОЛ, затем рекомбинантные антитела hAB2367 (и антигены, и антитела – в фиксированных количествах), после чего добавляли тот или иной лиганд в различных концентрациях. Из данных, представленных на рисунке 1, следует, что и агонист (ISO), и антагонист (СYA) конкурируют с антителами за место связывания с АДРБ1, причем, чем выше концентрация лиганда, тем в большей степени подавляется связывание антител, что свидетельствует в пользу предположения о сохранности нативной структуры АДРБ1 в составе нанодисков.

Как нам удалось выяснить ранее [20], полимеры UA17 и AASTY11-45 продемонстрировали обратную зависимость УПС от их концентрации: при низких конечных концентрациях (0.0625% и 0.125%) адсорбированные препараты МФ + ПОЛ связывали больше антител hAB2367.

Одно из возможных объяснений этого феномена может заключаться в том, что увеличение концентрации полимера приводит к уменьшению размеров формирующихся нанодисков, из-за чего молекула АДРБ1 не может полноценно включаться в них, что ведет к нарушению структуры молекулы.

Мы исследовали размеры нанодисков в препаратах МФ + ПОЛ, полученных при различных конечных концентрациях полимера UA 17: 0.0625%, 0.125%, 0.25% и 0.5%. Результаты измерений, проведенных с помощью метода динамического светорассеяния, представлены

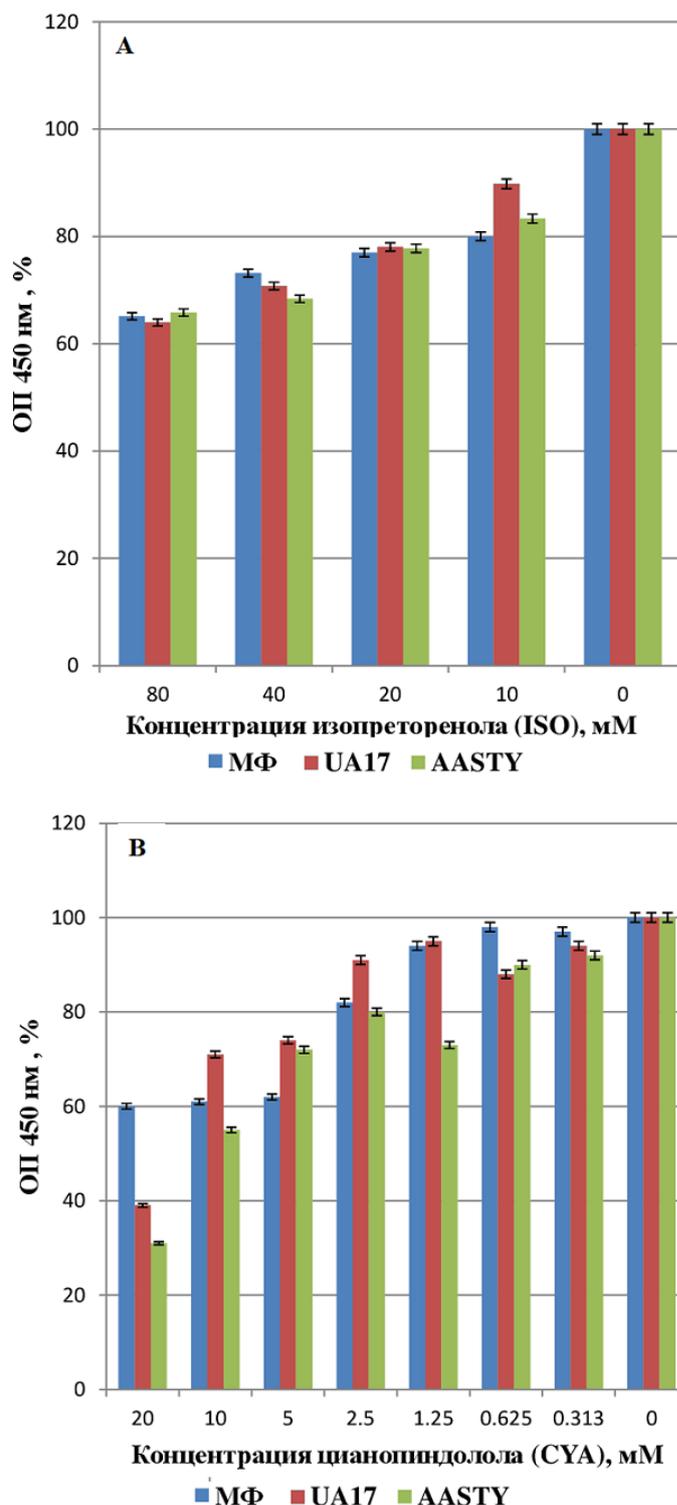


Рисунок 1. Конкуренция изопротеренола (А) и цианопиндолола (В) с антителами hAB2367 за связывание с АДРБ1. UA17 – препарат МФ + ПОЛ, полученный с UA17, AASTY – препарат МФ + ПОЛ, полученный с AASTY 11-45. ОП 450 нм, % – оптическая плотность, выраженная в процентах.

в таблице 1. Как можно видеть, размеры нанодисков в основном пике (пик 1, в котором содержится основная масса частиц препаратов) варьируют в диапазоне от 10 нм до 16 нм, причем, не наблюдается явной зависимости этих величин от концентрации UA 17. Это свидетельствует в пользу другого объяснения обратной зависимости УПС от концентрации полимера: возможно, избыток полимера

Таблица 1. Размеры нанодисков при различных концентрациях UA 17.

Образец	Пик	Размер частиц в пике	% от суммарной массы
опыт 1 UA17 0.0625%	1	13.14±0.25	96
	2	55.81±13.16	2.7
	3	241.2±38.36	0.7
опыт 2 UA17 0.5%	1	11.45±1.45	98.2
	2	49.36±19.93	1.6
	3	350.8±51.50	0.3
опыт 2 UA17 0.25%	1	12.43±3.2	94.3
	2	29.9±9.98	3.1
	3	272.37±233	0.1
опыт 2 UA17 0.125%	1	10.62±1.8	98.7
	2	30.12±9.4	1.1
	3	361±100	0.3
опыт 2 UA17 0.0625%	1	16.13±2.25	87
	2	74.69±43.45	2.2
	3	401±87	0.8

блокирует места связывания рекомбинантных антител с АДРБ1.

Как было показано ранее [20], самый высокий УПС (87%) наблюдался при концентрации UA17, равной 0.0625%. Этой концентрации соответствуют нанодиски размером 13.14 ± 0.25 нм и 16.13 ± 2.25 нм (результаты двух независимых измерений, табл.1). В случае другого выбранного нами для дальнейшей работы полимера AASTY 11-45 (УПС 76% при концентрации полимера 0.0625% [20]) размер нанодисков в основном пике оказался равным 14.14 ± 0.93 нм (данные не показаны). В литературе отсутствуют сведения о размерах нанодисков, полученных с использованием UA17 и AASTY 11-45. Анализ соответствующих данных, касающихся других амфипатических агентов, показывает, что размеры нанодисков зависят от состава и длины полимера, pH и солевого состава буфера для солюбилизации [23]. Так, при использовании MSP в качестве амфипатического агента формируются нанодиски, имеющие размеры от 6 нм до 17 нм в зависимости от разновидности MSP [23]. Сополимер стирола и малеиновой кислоты (SMA) позволяет генерировать нанодиски размером 10-15 нм [23]. Нанодиски, полученные с помощью SMA, в составе которых находится бактериальный родопсин – белок, содержащий семь трансмембранных доменов (как и АДРБ1), имеют размеры 12 ± 2 нм [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе продемонстрировано сохранение лиганд-связывающих свойств АДРБ1, солюбилизированного с помощью амфипатических полимеров UA17 и AASTY 11-45. Этот факт свидетельствует в пользу предположения о сохранности нативной структуры АДРБ1 в составе нанодисков.

Методом динамического светорассеяния впервые определен размер нанодисков, получаемых с использованием UA17. В диапазоне концентраций полимера от 0.0625%

до 0.5% не обнаружено достоверных различий в размерах нанодисков, варьирующих от 10 нм до 16 нм.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не связана с исследованиями, в которых в качестве объекта выступают люди или животные.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят эксперта лаборатории клеточной инженерии института экспериментальной кардиологии им. ак. В.Н. Смирнова Национального медицинского исследовательского центра кардиологии им. ак. Е.И. Чазова М.А. Слинкина за критические замечания и помощь в оформлении рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минздрава РФ (государственной заданием по теме №152 «Разработка метода иммуноферментного анализа для определения аутоантител к β 1-адренорецептору у кардиологических больных с использованием в качестве антигена очищенного рекомбинантного β 1-адренорецептора в нативной конформации», рег. № НИОКТР 122020400212-0) и Общества с ограниченной ответственностью «Мона», (Москва, ОГРН 5087746251896).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Magnusson, Y., Wallukat, G., Waagstein, F., Hjalmarson, A., Hoebcke, J. (1994) Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta1-adrenoceptor with positive chronotropic effect.

- Circulation, **89**, 2760–2767. DOI:10.1161/01.cir.89.6.2760
2. Jahns, R., Boivin, V., Siegmund, C., Inselmann, G., Lohse, M.J., Boege, F. (1999) Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure. *Circulation*, **99**, 649-654. DOI:10.1161/01.cir.99.5.649
 3. Sterin-Borda, L., Cossio, P.M., Gimeno, M.F., Gimeno, A.L., Diez, C., Laguens, R.P., Meckert, P.C., Arana, R.M. (1976) Effect of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation: immunological, morphological and function aspects. *Cardiovasc. Res.*, **10**, 613–622. DOI:10.1093/cvr/10.6.613
 4. Liu, J., Wang, Y., Chen, M., Zhao, W., Wang, X., Wang, H., Zhang, Z., Zhang, J., Xu, L., Chen, J., Yang, X., Zhang, L. (2014) The correlation between peripartum cardiomyopathy and autoantibodies against cardiovascular receptors. *PLoS One*, **9**(1), e86770. DOI: 10.1371/journal.pone.0086770
 5. Kostyukevich, M.V., Zykov, K.A., Mironova, N.A., Agapova, O.Y., Shevelev, A.Y., Efremov, E.E., Vlasik, T.N., Golitsyn, S.P. (2016) Role of autoantibodies against β 1- adrenergic receptor in cardiovascular diseases. *Cardiology*, **12**, 5–11.
 6. Boivin-Jahns, V., Jahns, R., Boege, F. (2018) Relevant effects of beta1-adrenoceptor autoantibodies in chronic heart failure. *Frontiers in Bioscience, Landmark*, **23**, 2146-2156. DOI:10.2741/4695
 7. Bornholz, B., Roggenbuck, D., Jahns, R., Boege, F. (2014) Diagnostic and therapeutic aspects of beta-adrenergic receptor autoantibodies in human heart disease. *Autoimmunity Rev.*, **13**, 954-962. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.08.021
 8. Ronspeck, W., Brinckmann, R., Egner, R., Gebauer, F., Winkler, D., Jekow, P., Wallukat, G., Muller, J., Kunze, R. (2003) Peptide based adsorbers for therapeutic immunoadsorption. *Ther. Apher. Dial.*, **7**(1), 91-7. DOI: 10.1046/j.1526-0968.2003.00017.x
 9. Dandel, M., Wallukat, G., Englert, A., Lehmkuhl, H.B., Knosalla, C., Hetzer R. (2012) Longterm benefits of immunoadsorption in beta(1)-adrenoceptor autoantibody-positive transplant candidates with dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Fail*, **14**(12), 1374-88. DOI: 10.1093/eurjhf/hfs123
 10. Wenzel, K., Schulze-Rothe, S., Haberland, A., Müller, J., Wallukat, G., Davideit, H. (2017) Performance and in-house validation of a bioassay for the determination of beta1-autoantibodies found in patients with cardiomyopathy. *Heliyon*, **3**(7), e00362. DOI:10.1016/j.heliyon.2017.e00362
 11. Matsui, S., Fu, M.L., Shimizu, M., Fukuoka, T., Teraoka, K., Takekoshi, N., Murakami, E., Hjalmarsen, A. (1995) Dilated cardiomyopathy defines serum autoantibodies against G-protein coupled cardiovascular receptors. *Autoimmunity*, **21**, 85–88. DOI: 10.3109/08916939508993354
 12. Bornholz, B., Hanzen, B., Reinke, Y., Felix, S.B., Jahns, R., Schimke, I., Wallukat, G., Boege F. (2016) Detection of DCM-associated beta1-adrenergic receptor autoantibodies requires functional readouts or native human beta1-receptors as targets. *Int J Cardiol*, **202**, 728-30. DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.10.068
 13. Jahns, R., Boege, F. (2015) Questionable validity of peptide-based ELISA strategies in the diagnostics of cardiopathogenic autoantibodies that activate G-protein-coupled receptors. *Cardiology*, **131**, 149-150. DOI: 10.1159/000376546
 14. Boege, F., Westenfeld, R., Jahns, R. (2017) beta1AAb determined by peptide ELISA: A signal in the noise? *J. Am. Coll. Cardiol.*, **70**(6), 807-808. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.03.617
 15. Holthoff, H.P., Zeibig, S., Boivin, V., Bauer, J., Lohse, M.J., Kaab, S., Clauss, S., Jahns, R., Schlipp, A., Munch, G., Ungerer, M. (2012) Detection of anti beta1-ar auto-antibodies in heart failure by a cell-based competition ELISA. *Circ. Res.*, **111**(6), 675-84. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.272682
 16. Shevelev, A.Y., Kostyukevich, M.V., Efremov, E.E., Vlasik, T.N., Mironova, N.A., Zykov, K.A., Kashirina, N.M., Kuznetsova, I.B., Sharf, T.V., Mamochkina, E.N., Lipatova, L.N., Peklo, M.M., Rutkevich, P.N., Yanushevskaya, E.V., Rybalkin, I.N., Stukalova, O.V., Malkina, T.A., Belyaeva, M.M., Kuznetsova, T.V., Tkachev, G.A., Zinchenko, L.V., Gupalo, E.M., Agapova, O.A., Yureneva-Tkhorzhvskaya, T.V., Rvacheva, A.V., Sidorova, M.V., Sadgyan, A.S., Tereshchenko, S.N., Golitsyn, S.P. (2016) Detection of autoantibodies against the β 1-adrenergic receptor in the sera of patients via the competitive cell-based enzyme linked immunosorbent assay. *Cardiology*, **56** (11), 61-70. DOI: 10.18565/cardio.2016.11.61-70
 17. Sun, R., Mak, S., Haschemi, J., Horn, P., Boege, F., Lippa, P.B. (2019) Nanodiscs incorporating native β 1 adrenergic receptor as a novel approach for the detection of pathological autoantibodies in patients with dilated cardiomyopathy. *J. Appl. Lab. Med.* **4**(3),391-403. DOI: 10.1373/jalm.2018.028225.
 18. Krishnarajuna, B., Ramamoorthy, A. (2022) Detergent-free isolation of membrane proteins and strategies to study them in a near-native membrane environment. *Biomolecules*, **12**(8), 1076. DOI: 10.3390/biom12081076
 19. Orekhov, P.S., Bozdoganyan, M.E., Voskoboynikova, N., Mulikjanian, A.Y., Karlova, M.G., Yudenko, A., Remeeva, A., Ryzhykau, Y.L., Gushchin, I., Gordeliy, V.I., Sokolova, O.S., Steinhoff, H.J., Kirpichnikov, M.P., Shaitan K.V. (2022) Mechanisms of formation, structure, and dynamics of lipoprotein discs stabilized by amphiphilic copolymers: a comprehensive review. *Nanomaterials*, **12**(3), 361. DOI: 10.3390/nano12030361
 20. Peclo, M.M., Lipatova, L.N., Kashirina, N.M., Sharf, T.V., Kuznetsova, I.B., Efremov, E.E., Yanushevskaya, E.V., Rutkevich, P.N., Rybalkin, I.N., Vlasik, T.N. (2023) β 1-adrenergic receptor solubilized in the form of nanodiscs: screening of various amphipatic polymers. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **6**(4), e00206. DOI: 10.18097/BMCRM00206
 21. Shevelev, A.Y., Kashirina, N.M., Kuznetsova, T.B., Sharf, T.V., Mamochkina, E.N., Agapova, O.Y., Gurskaya, T.K., Lipatova, L.N., Peklo, M.M., Rutkevich, P.N., Yanushevskaya, E.V., Rybalkin, I.N., Skoblov, Y.S., Efremov, E.E., Vlasik, T.N., Zykov, K.A. (2015) Cell line expressing recombinant β 1-adrenergic receptor for the agonistic autoantibodies detection by a competitive enzymelinked immunosorbent assay. *Vestnik Biotechnol.*, **11**(4), 5–14.
 22. Afanas'eva, O.I., Klesareva, E.A., Efremov, E.E., Sidorova, M.V., Bespalova, Zh.D., Levashov, P.A., Ezhov, M.V., Adamova, I.Yu., Pokrovsky, S.N. (2013) An immunoenzyme method based on chimeric molecule and oligopeptide fragments for determining the autoantibodies to β 1-adrenergic receptor in patients with dilated cardiomyopathy. *Zh. Klin. Lab. Diagn.*, **58**(4), 24-27.
 23. Dörr, J. M., Scheidelaar, S., Koorengel, M.C., Dominguez, J.J., Schäfer, M., van Walree, C.A., Killian, J.A. (2015) The styrene-maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research. *European Biophysics Journal*, **45**(1), 3–21. DOI: 10.1007/s00249-015-1093-y
 24. Orwick-Rydmark, M., Lovett, J.E., Graziadei, A., Lindholm, L., Hicks, M.R., Watts, A. (2012) Detergent-free incorporation of a seven transmembrane receptor protein into nanosized bilayer Lipodisq particles for functional and biophysical studies. *Nano Lett.*, **12**, 4687–4692. DOI: 10.1021/nl3020395

Поступила: 27.09.2024
 После доработки: 15.10.2024
 Принята к публикации: 16.10.2024

β1-ADRENERGIC RECEPTOR WITHIN NANODISCS OF 10-16 NM IN DIAMETER RETAINS LIGAND-BINDING PROPERTIES

T.V. Sharf¹, V.A. Balobanov², M.M. Peclo^{1}, L.N. Lipatova¹, N.M. Kashirina¹, I.B. Kuznetzova¹, E.V. Yanushevskaya¹, P.N. Rutkevich¹, I.N. Rybalkin¹, V.A. Kolb², T.N. Vlasik¹, E.E. Efremov¹*

¹National Medical Research Center of Cardiology named after Academician E.I.Chazov, 15a, Academician Chazov str., Moscow, 121552 Russia; *e-mail: peclo@yandex.ru

²Institute of Protein Research RAS, Pushchino, Russia.

The detection of autoantibodies against the β1-adrenergic receptor (ADRB1 Ab) in the blood of patients and the monitoring of the levels of these antibodies is an urgent need in clinical practice. The solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using ADRB1 in native conformation as antigen, seems to be the most suitable for this task. We have previously tested various amphipathic polymers for their ability to solubilize ADRB1 in the form of nanodiscs so that ADRB1 retains its antigenic properties. The aim of the present work was to investigate the ligand binding properties of ADRB1 in nanodiscs prepared with amphipathic polymers such as Ultrasolute™ Amphipol (UA17) and AASTY 11-45 and to determine the size of the nanodiscs by dynamic light scattering. The binding of the ligands isoproterenol (agonist) and cyanopindolol (antagonist) was assessed by their ability to compete with recombinant hAB2367 antibodies specific for the second extracellular loop of ADRB1 in ELISA. It was found that ADRB1 solubilized with UA17 and AASTY 11-45 retained its ligand-binding properties. This fact supports the assumption that ADRB1 retains its native structure in nanodiscs. The size of nanodiscs prepared with UA17 was determined for the first time by dynamic light scattering. In the range of polymer concentrations from 0.0625% to 0.5%, no significant differences were observed in the size of the nanodiscs, which varied between 10 and 16 nm.

Key words: β1- adrenergic receptor, nanodiscs, Ultrasolute™ Amphipol 17, AASTY

FUNDING

The work was carried out with the financial support of the Ministry of Health of the Russian Federation (state assignment on the subject No. 152 “Development of an enzyme immunoassay method for measuring autoantibodies to β1-adrenergic receptor in cardiac patients using purified recombinant β1-adrenergic receptor in native conformation as an antigen”, reg. No. NIOKTR 122020400212-0) and Limited Liability Company “Mona” (Moscow, OGRN 5087746251896).

Received: 27.09.2024, revised: 15.10.2024, accepted: 16.10.2024