

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ХИМЕРНОГО ГЕНА РЕНАЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА, КОДИРУЮЩЕГО N-КОНЦЕВУЮ СИГНАЛЬНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СЕКРЕТОРНОГО БЕЛКА ПРОЛАКТИНА

В.И. Федченко*, А.А. Калошин, А.В. Веселовский, А.Е. Медведев

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича,
Москва, 119121, ул. Погодинская 10; valfed38@yandex.ru

Реналаза (RNLS) - белок, который выполняет различные защитные функции как внутри, так и снаружи клеток. Внутриклеточная RNLS проявляет свойства FAD-зависимой оксидоредуктазы (КФ 1.6.3.5). Внеклеточная RNLS, лишенная N-концевого пептида, не взаимодействует с FAD, проявляет различные защитные эффекты на клетку посредством взаимодействия на рецепторные белки. Механизмы и факторы, ответственные за транспорт RNLS из клетки, до конца не изучены. Хорошо известно, что сигнальная последовательность играет ключевую роль в классическом механизме транспорта внутриклеточных белков. Одним из подходов для изучения секреции RNLS из клетки может быть создание химерных форм белка с модифицированной N-концевой сигнальной аминокислотной последовательности. Биоинформатический анализ показал, что сигнальная последовательность гена пролактина (*PRL*), соединенная с матричной последовательностью гена *RNLS*, давала классический сигнал, свойственный секреторным белкам. Исходя из этого, в данной работе: (i) описан метод конструирования гена *RNLS* человека, в котором N-концевая последовательность, кодируемая геном *RNLS*, была заменена на N-концевую последовательность, кодируемую геном *PRL*; (ii) проведена экспрессия этой химерной генетической конструкции.

Ключевые слова: ПЦР; клонирование; экспрессия; реналаза; пролактин; сигнальная последовательность

DOI: 10.18097/BMCRM00175

ВВЕДЕНИЕ

RNLS - недавно открытый секреторный белок, который выполняет различные функции внутри и снаружи клеток [1-5]. Внутриклеточная RNLS проявляет свойства FAD-зависимой оксидоредуктазы (КФ 1.6.3.5) [5, 6], кофактор FAD которой может быть «размещён» только в полном размере белке, содержащем N-концевой пептид [2, 7, 8]. Одновременно этот же пептид рассматривается как сигнал внеклеточной локализации белка. Внеклеточная RNLS, лишенная N-концевого пептида, неспособна связывать FAD [8] и оказывает различные защитные эффекты на клетку посредством взаимодействия на рецепторные белки [9-11]. Механизмы и факторы, ответственные за транспорт RNLS из клетки, до конца не изучены [12]. Одним из подходов к изучению секреции RNLS из клетки и роли N-концевой сигнальной последовательности может быть создание химерных форм белка, модифицированных по N-концу. Ранее мы получили химерную RNLS человека, лишенную N-концевой последовательности (аминокислотные остатки 1-17 последовательности RNLS) [13].

В данной работе описан метод конструирования химерного гена *RNLS* человека, в котором N-концевая нуклеотидная последовательность гена *PRL*, кодирующего гормон пролактин, была вставлена вместо N-концевой нуклеотидной последовательности гена *RNLS*. Компьютерное моделирование с применением программ (Phobios, TargetP-2.0, SignalP-5.0, SecretomeP 2.0a), показало, что сигнальный пептид гена *PRL*, соединенный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей

матричный пептид RNLS, давал классический сигнал, свойственный секреторным белкам.

При конструировании химерного гена мы использовали ранее апробированный нами метод «экзонное конструирование кодирующих последовательностей» [14], который был использован при конструировании одной из изоформ *RNLS* человека [15].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

В работе были использованы: Tersus полимераза («Евроген», Россия), эдонуклеазы рестрикции *BamHI*, *XhoI* («Fermentas», США), Ni-сефароза («GE Healthcare», Швеция), система для очистки фрагментов ДНК (Wizard® SV Gel и PCR Clean-Up) и TA-вектор (pGEM®-T easyvector) («Promega», США), плазмидный экспрессионный вектор pET-28a(f⁺) и *E. coli* штамм Rosetta (DE3) («Novagen», Великобритания). Олигонуклеотиды для ПЦР были синтезированы в «Синтол» (Россия). Остальные химические реактивы были приобретены у «Sigma-Aldrich» (США).

Биоинформатический анализ

Биоинформатический анализ N-концевой сигнальной последовательности RNLS, в которой возможность взаимодействия с кофактором FAD была бы минимальна при сохранении секреторного потенциала химерного белка, осуществляли с применением веб-сервисов Phobios



Таблица 1. Предсказание наличия сигнального пептида (SP) у химерных реналаз.

Protein	Phobius	TargetP-2.0	SignalP-5.0	SecretomeP 2.0a
RNLS	Non cytoplasmic	Mitochondrial	SP-	0,622; SP+
RNLS without N-terminus	Non cytoplasmic	SP-	SP-	0.645; SP-
Albumin	Non cytoplasmic	SP-	SP-	0.556; SP-
Prolactin	Non cytoplasmic	SP+	SP+	0.799; SP+
ACE	Non cytoplasmic	SP+	SP+	0.879; SP+
Integrin	Non cytoplasmic	SP+	SP+	0.738; SP+
Serpin	Non cytoplasmic	SP+	SP+	0.652; SP+
Thrombin	Non cytoplasmic	SP+	SP+	0.745; SP+

Примечание. В SecretomeP 2.0a (предсказывает неклассические секретируемые белки) секретируемые белки должны иметь оценку >0.6 и отсутствие сигнального пептида)

(<https://phobius.sbc.su.se/>) [16], TargetP-2.0, (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0>) [17], SignalIP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalIP-5.0>) [18], SecretomeP 2.0a (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SecretomeP-2.0>) [19]. Аминокислотные последовательности химерных реналаз получали путем добавления к последовательности реналазы человека (изоформа 1) (UniProtIDQ5VYX0), у которой были удалены N-концевые 17 аминокислотных остатков (aa) (предсказанный сигнальный пептид), сигнальных пептидов внеклеточных белков человека. Длину и последовательности таких пептидов получали из соответствующих этим белкам записей в UniProt. Для полученных химерных белков была предсказана их клеточная локализация программами WolfProt (<https://wolfsort.hgc.jp/>), ELSPred () [20], Hum-mPLoc2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/hum-multi-2/>) [21], и BaCellLo (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/>) [22]. Изменения во вторичных структурах полученных химерных белков оценивали с использованием программ Jpred 4 (<https://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>) [23], psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) [24], GOR4 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_gor4.html) [25] и SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html) [26].

Получение геномной ДНК человека.

Геномную ДНК человека получали из лимфоцитов крови человека, полученной от здорового донора, фенол-хлороформ экстракцией, как было описано нами ранее [14, 15].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси в условиях реакции, описанной ранее [13-15], за исключением условия времени элонгации. Время элонгации при синтезе (поли) нуклеотидных фрагментов, кодирующих сигнальный пептид гена пролактина и структурный пептид (матричный пептид) RNLS, составило 60 с и 210 с соответственно.

Электрофорез фрагментов ДНК

Электрофорез фрагментов ДНК проводили в 2% агарозном геле с использованием трис-боратного буфера pH 8.0 [27]. Электрофорез в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) проводили по методу Лэммли [28].

Трансформация клеток *E. coli*

Трансформацию проводили по методу Kushner [29] с модификациями, описанными ранее [13-15].

Выделение рекомбинантного белка

Выделение и очистку рекомбинантного белка осуществляли методом аффинной хроматографии с использованием Ni-сефарозы в 8 М буферном растворе мочевины, как описано в наших предыдущих работах [14, 30].

Секвенирование ДНК

Секвенирование проводили на капиллярном ДНК секвенаторе (AppliedBiosystems 310 DNA analyzer, «AppliedBiosystems», США) с использованием BigDyeTerminator v 3.1 CycleSequencingKit («Thermo Scientific», США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Полученную последовательность ДНК соотносили с геном реналазы (NM_001031709, GeneBank), используя программу BLAST, доступную на сайте National Center for Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Экспрессия гена RNLS в прокариотической системе

Экспрессию рекомбинантного гена в прокариотической системе (*E. coli* штамм DE3 Rosetta) проводили, используя ранее приведенные протоколы [13-15].

Выделение рекомбинантного белка

Выделение рекомбинантного белка осуществляли методом аффинной хроматографии с использованием Ni-сефарозы в 8 М буферном растворе мочевины [15, 30].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При конструировании химерного гена RNLS, кодирующего N-концевую сигнальную последовательность секреторных белков, не связывающих FAD, были использованы: 1) альбумин (albumin, код доступа NM_000477 (SP – 1-18)) с сигнальным пептидом в 18 aa; 2) пролактин (prolactin, PRL), код доступа NM_000948 с сигнальным пептидом в 28 aa; 3) ангиотензин превращающий

Таблица 2. Предсказание клеточной локализации реналазы с N-концевым пептидом от других белков

Protein	WolfProst	ELSPred	Hum-mPLoc2.0	BaCelLo
RNLS	Plasma membrane	Extracellular protein	Extracellular protein	Secretory
RNLS without N-terminus	Cytoplasmic, nuclear protein	Cytoplasmic protein	Extracellular protein	Mitochondrial
Albumin	Cytoplasmic protein	Extracellular protein	Cytoplasmic protein, Extracellular protein	Cytoplasmic protein
Prolactin	Extracellular protein	Cytoplasmic protein	Extracellular protein	Secretory protein
ACE	Plasma membrane	Cytoplasmic protein	Extracellular protein	Secretory protein
Integrin	Extracellular protein	Cytoplasmic protein	Extracellular protein	Secretory protein
Serpin	Plasma membrane	Cytoplasmic protein	Extracellular protein	Secretory protein
Thrombin	Extracellular protein	Extracellular protein	Extracellular protein	Secretory protein

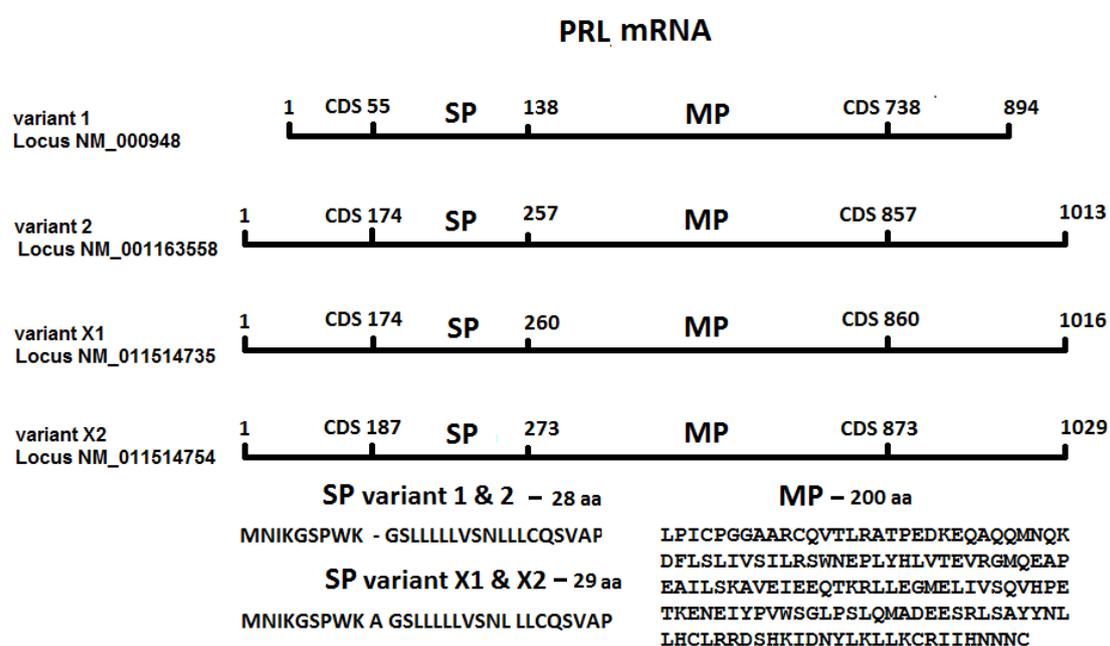


Рисунок 1. Матричные РНК (mRNA) изомеров гена RPL. mRNA variant 1 содержит 894 нуклеотида и включает кодирующую область (CDS) 55-738 нуклеотида, в которой содержатся 84 нуклеотида в SP и 600 нуклеотидов в MP. mRNA variant 2 содержит 1013 нуклеотидов и CDS 174-857 нуклеотида, в которой содержатся 84 нуклеотида в SP и 600 нуклеотидов в MP. mRNA variant X1 содержит 1016 нуклеотидов и CDS 174-860 нуклеотида, в которой содержатся 87 нуклеотидов в SP и 600 нуклеотидов в MP. mRNA variant X2 содержит 1029 нуклеотидов и CDS 187-873 нуклеотида, в которой содержатся 84 нуклеотида в SP и 600 нуклеотидов в MP.

фермент I (ACE, angiotensin I-converting enzyme, код доступа NM_000948 (SP 1-109)); 4) интегрин (ITGB1, integrin subunit beta 1, код доступа NM_033668) с сигнальным пептидом в 20 aa; 5) серпин (SERPINA1, serpin, код доступа NM_001002236 (SP - 1-24)); 6) тромбин (thrombin, код доступа NM_000506) с сигнальным пептидом в 24 aa.

Предсказание несколькими программами наличия сигнального пептида у химерных реналаз (сигнальный пептид исследуемых белков, соединенный с матричным пептидом *RNLS*) показало, что в большинстве случаев программы распознают наличие сигнального пептида (табл. 1). Предсказание субклеточной локализации химерных белков так же указывало, что такие белки будут экскретироваться из клетки (табл. 2).

Исходя из этих данных, нами была выбрана сигнальная последовательность гена *PRL*. При конструировании химерного гена (сигнальная последовательность, кодируемая *PRL*⁺ матричный пептид, кодируемый *RNLS*)

была использована ранее разработанная нами «экзонная» стратегия клонирования генов [13, 15]. Согласно банку данных, ген пролактина (*PRL*) расположен на хромосоме 6 (код доступа NG_029819) и содержит 6 экзонов. Ген *PRL* человека имеет четыре транскрипционных варианта: вариант 1 – код доступа NM_000948; вариант 2 – код доступа NM_001163558; вариант X1 – код доступа XM_011514753; вариант X2 – код доступа XM_011514754 [31]. mRNA различных изомеров гена *PRL* имеют различную длину, но кодируют один и тот же белок с сигнальной аминокислотной последовательностью (SP) 28 aa и 29 aa и одинаковой матричный пептид содержащий 200 aa. SP последовательность изомеров вариантов 1 и 2 содержит 28 aa, а изомеры варианта X1 и X2 содержат 29 aa, т.е. отличаются на одну aa, которая находится в SP в положении 10 (рис. 1).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид, начинается во втором и заканчивается

Таблица 3. Праймеры, используемые в ПЦП химерного гена RNLS

Primer	Primer sequence (5' → 3')
SP-PRL-for	ctggtc-ggatcc-gaatggaa - aacatcaaaggatcgccatggaaa g-ggtcctctctgctgctgctg
SP-PRL-rev	ctgctctctcagcagcgcggggccacgctctggca c
Mat-RNLS-for	gcgctgctgaggagg cag acg
Mat-RNLS-rev	cagacg-ctc gag-ctaaatataattctttaagcttc c

Примечание. В структуре праймеров нуклеотиды, выделенные жирным шрифтом, определяют область перекрытия сигнальной последовательности гена PRL и матричной последовательности гена RNLS. Нуклеотиды сайта рестрикции BamHI и XhoI подчеркнуты. Kozak последовательность выделена курсивом и жирным шрифтом.

в третьем экзоне гена *PRL*. Для синтеза полной сигнальной последовательности *PRL* методом ПЦП был синтезирован прямой праймер (SP-PRL-for) который включал: сайт рестрикции BamHI, Kozak последовательность, нуклеотидную сигнальную последовательность *PRL* первого экзона и начало сигнальной последовательности от второго экзона (табл. 3). Обратный праймер (SP-PRL-rev) содержал конец нуклеотидной последовательности пролактина от второго экзона и начало последовательности матричного пептида *RNLS* (табл. 3).

Нуклеотидную последовательность матричной части гена *RNLS* получали из сконструированного нами ранее вектора pET-hRenI [15]. Прямым праймером (Mat-RNLS-for) служила последовательность, комплементарная 18 нуклеотидам конца сигнальной последовательности *PRL* и 18 нуклеотидам начала матричной нуклеотидной последовательности *RNLS*. Обратный праймером (Mat-RNLS-rev) служила последовательность, включающая XhoI сайт рестрикции и 25 нуклеотидов конца матричного гена *RNLS* (табл. 1).

Фрагмент ДНК сигнальной последовательности гена *PRL* получали в два этапа методом ПЦП с использованием праймеров SP-PRL-for и SP-PRL-rev. На первом этапе ПЦП синтеза сигнальной последовательности гена пролактина проводили на матрице ДНК человека, полученной из лимфоцитов крови. При анализе продукта реакции в 2% агарозном геле ампликоны визуально не обнаруживали. Для увеличения выхода ампликона проводили второй раунд амплификации, в тех же самых условиях, но с использованием в качестве ДНК-матрицы 1 мкл ампликона от первого раунда амплификации. Анализ ампликонов в 2% агарозном геле показал видимую полосу ДНК фрагмента с размером 120 пар оснований (п.о.) (рис. 2, дорожка 3), что соответствует теоретическим расчетным данным (см. банк данных, например код доступа NM_000948).

Синтез матричной ДНК гена *RNLS* проводили методом ПЦП с использованием праймеров Mat-RNLS-for и Mat-RNLS-rev (табл. 3).

В качестве матрицы ДНК использовали вектор pET-hRenI, полученный нами ранее. В результате анализа продукта ПЦП-реакции в 2% агарозном геле явно выявлялась полоса в 990 п.о., которая соответствует расчетным данным (рис. 2, дорожка 2).

При получении химерной ДНК, состоящей из сигнальной последовательности *PRL* и матричной последовательности *RNLS*, в ПЦП-реакции использовали праймеры SP-PRL-for и Mat-RNLS-rev, фланкирующие концы которых содержали сайты рестрикции BamHI и XhoI соответственно. В качестве ДНК-матрицы использовали по 1 мкл ампликонов от синтеза ДНК сигнальной последовательности пролактина и матричной

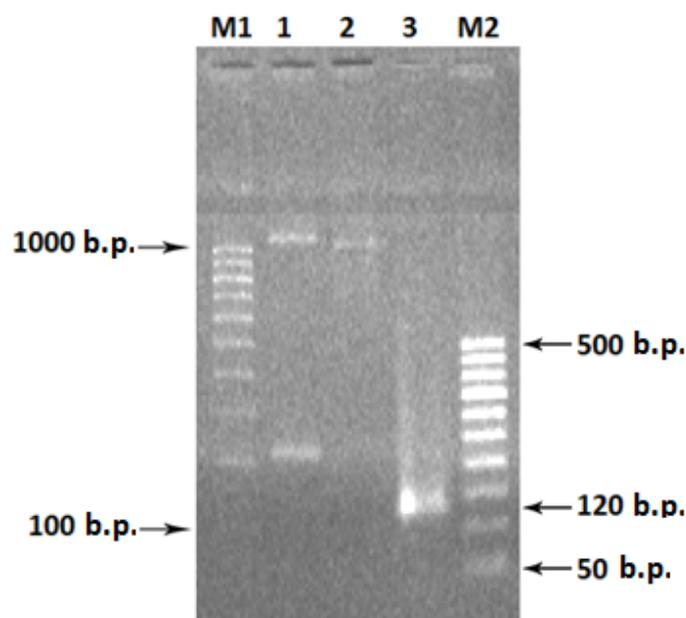


Рисунок 2. Электрофорез в 2% агарозном геле фрагментов ДНК ПЦП реакций (слева направо). M1) - ДНК маркеры: 100 п.о., 200 п.о., 300 п.о., 400 п.о., 500 п.о., 600 п.о., 700 п.о., 800 п.о., 900 п.о., 1000 п.о. 1) - 1092 п.о., химерная ДНК (фрагмент ДНК гена PRL соединенная с фрагментом матричной ДНК RNLS. 2) - 990 п.о., фрагмент матричной ДНК гена RNLS. 3) - 120 п.о., фрагмент ДНК гена PRL. M2) - ДНК маркеры: 50 п.о., 100 п.о., 150 п.о., 200 п.о., 250 п.о., 300 п.о., 350 п.о., 400 п.о., 450 п.о., 500 п.о.

последовательности *RNLS*. В результате ПЦП реакции был получен фрагмент ДНК в 1092 п.о., который соответствовал расчетным данным (рис. 1, дорожка 1).

Полученный химерный фрагмент ДНК после ПЦП реакции очищали согласно протоколу производителя с помощью системы очистки фрагментов ДНК («Wizard»). Очищенный таким образом фрагмент ДНК встраивали в вектор pGEM®-T Easy и трансформировали им клетки *E. coli* BL-21 (DE3). Плазмидные ДНК из трансформированных клонов подвергали рестриktionному анализу по сайтам BamHI/XhoI. Векторы, содержащие встроенный фрагмент ДНК в области 1100 п.о., были секвенированы. Соответствие нуклеотидной последовательности анализировали с сигнальной последовательностью гена *PRL* человека (код доступа NM_000948) и нуклеотидной последовательностью матричного пептида RNLS (код доступа NM_001031709). Анализ показал, что кодирующая последовательность химерного гена *RNLS* соответствовала сигнальной нуклеотидной последовательности изомеров вариантов 1 и 2 гена *PRL* и состояла из 84 нуклеотидов и

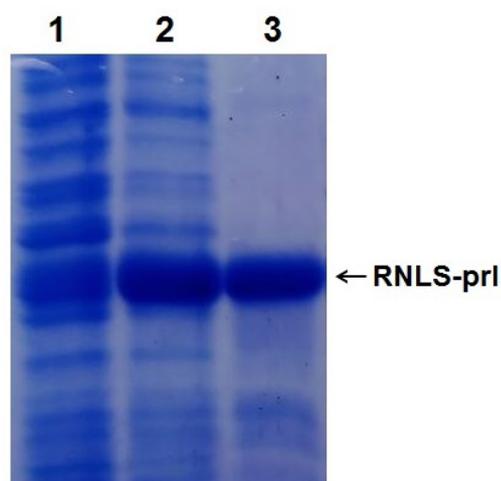


Рисунок 3. Электрофорез в 12 % ПААГ белков клеток *E. coli* при экспрессии гена химерной RNLS (вектор pET-PRL-RenI): 1 – тотальный белок клеток *E. coli* (штамм DE3 Rosetta) без индукции; 2 – тотальный белок после индукции клеток ИПТГ; 3 – белок RNLS с сигнальной последовательностью гена *PRL* (RNLS-pri) после очистки на колонке Ni-Sepharose.

матричной нуклеотидной последовательности гена *RNLS* сконструированного нами вектора pET-hRenI. Таким образом, выбранная нами стратегия получения кодирующих последовательностей гена является приемлемой при конструировании химерных генов [31].

Далее, фрагмент ДНК 1100 п.о. встраивали по сайтам BamHI/XhoI в вектор pET-28a(+) и затем трансформировали клетки *E. coli*. В результате проведенного клонирования с последующим рестриктивным анализом и секвенированием был получен клон, содержащий матричный ген *RNLS* с сигнальной последовательностью гена *PRL*, обозначенный как pET-PRL-RenI. Экспрессию вектора pET-PRL-RenI проводили в прокариотической системе в клетках *E. coli* (штамм DE3 Rosetta), которая давала хороший выход целевого белка. Очистку рекомбинантного белка проводили методом хроматографии на Ni-Sepharose [30]. После очистки был получен рекомбинантный белок (RNLS-pri) с расчетной молекулярной массой 42.9 кДа (рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе сконструирована химерная генетическая конструкция, кодирующая RNLS человека, у которой «родная» сигнальная последовательность, участвующая в связывании кофактора FAD, а также секреции этого белка из клетки, была заменена на N-концевую сигнальную последовательность секреторного белка пролактина. Эта генетическая конструкция была экспрессирована в клетках *E. coli* (штамм DE3 Rosetta) с хорошим выходом целевого белка.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Здоровые добровольцы дали информированное согласие на использование их образцов крови в исследовательских целях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования выполнены в рамках проекта РФФИ №20–015–00104.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Xu, J., Li, G., Wang, P., Velazquez, H., Yao, X., Li, Y., Wu, Y., Peixoto, A., Crowley, S., Desir, G.V. (2005) Renalase is a novel, soluble monoamine oxidase that regulates cardiac function and blood pressure. *J. Clin. Invest.*, **115**(5), 1275–1280. DOI: 10.1172/JCI24066
- Medvedev, A.E., Veselovsky, A.V., Fedchenko, V.I. (2010) Renalase, a new secretory enzyme responsible for selective degradation of catecholamines: achievements and unsolved problems. *Biochemistry (Moscow)*, **75**(8), 951–958. DOI: 10.1134/S0006297910080018
- Baroni, S., Milani, M., Pandini, V., Pavesi, G., Horner, D., Aliverti, A. (2013) Isrenalase a novel player in catecholaminergic signaling? The mystery of the catalytic activity of an intriguing new flavoenzyme. *Curr. Pharm. Des.*, **19**, 2540–2551. DOI: 10.2174/1381612811319140005
- Desir, G.V., Peixoto, A.J. (2014) Renalase in hypertension and kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **29**(1), 22–28. DOI: 10.1093/ndt/gft083
- Moran, G.R. (2016) The catalytic function of renalase: A decade of phantoms. *BiochimBiophysActa*, **1864**(1), 177–186. DOI: 10.1016/j.bbapap.2015.04.010
- Moran, G.R., Hoag, M.R. (2017) The enzyme: Renalase. *Arch. BiochemBiophys*, **632**, 66–76. DOI: 10.1016/j.abb.2017.05.015
- Milani, M., Ciriello, F., Baroni, S., Pandini, V., Canevari, G., Bolognesi, M., Aliverti, A. (2011) FAD-binding site and NADP reactivity in human renalase: a new enzyme involved in blood pressure regulation. *J. Mol. Biol.*, **411**(2), 463–473. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.06.010
- Fedchenko, V.I., Buneva, O.A., Kopylov, A.T., Veselovsky, A.V., Zgoda, V.G., Medvedev, A.E. (2015) Human urinary renalase lacks the N-terminal signal peptide crucial for accommodation of its FAD cofactor. *International Journal of Biological Macromolecules*, **78**, 347–353. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.04.023
- Wang, Y., Safirstein, R., Velazquez, H., Guo, X.J., Hollander, L., Chang, J., Chen, T.M., Mu, J.J., Desir, G.V. (2017) Extracellular renalase protects cells and organs by outside-in signalling. *J Cell Mol Med.*, **21**(7), 1260–1265. DOI: 10.1111/jcmm.13062
- Kolodcecik, T.R., Reed, A.M., Date, K., Shugrue, C.A., Patel, V., Chung, S.L., Desir, G.V., Gorelick, F.S. (2017) The serum protein renalase reduces injury in experimental pancreatitis. *J. Biol. Chem.*, **292**(51), 21047–21059. DOI: 10.1074/jbc.M117.789776
- Wang, L., Velazquez, H., Chang, J., Safirstein, R., Desir, G.V. (2015) Identification of a receptor for extracellular renalase. *PLoS One*, **10**, e0122932. DOI: 10.1371/journal.pone.0122932
- Fedchenko, V., Kopylov, A., Kozlova, N., Buneva, O., Kaloshin, A., Zgoda, V., Medvedev, A. (2016) Renalase Secreted by Human Kidney HEK293T Cells Lacks its N-Terminal Peptide: Implications for Putative Mechanisms of Renalase Action. *Kidney Blood Press Res.*, **41**, 593–603. DOI: 10.1159/000443460
- Fedchenko, V.I., Kaloshin, A.A., Kozlova, N.I., Kopylov, A.T., Medvedev, A.E. (2020) Construction of a chimeric human gene encoding renalase with a modified N-terminus. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **3**(3), e00137. DOI: 10.18097/BMCR00137
- Fedchenko, V.I., Kaloshin, A.A. (2019) A simplified method for obtaining cDNA of low-copy and silent eukaryotic genes using human renalase as an example. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **2**(2), e00101. DOI: 10.18097/BMCR00101
- Fedchenko, V.I., Kaloshin, A.A., Mezhevnikina, L.M., Buneva, O., Medvedev, A.E. (2013) Construction of the Coding Sequence of the Transcription Variant 2 of the Human Renalase Gene and Its Expression in the Prokaryotic System. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, (6), 12764–7779. DOI: 10.3390/ijms140612764
- Käll, L., Krogh, A., Sonnhammer, E.L.L. (2007) Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.*, **35**, W429–32. DOI: 10.1093/nar/gkm256
- Juan, J., Armenteros, A., Salvatore, M., Winther, O. (2019) OI of Emanuelsson, Gunnar von Heijne, Arne Elofsson, and Henrik Nielsen. Detecting Sequence Signals in Targeting Peptides Using Deep Learning. *Life Science Alliance*, **2** (5), e201900429. DOI: 10.26508/lsa.201900429
- Juan, J., Armenteros, A., Konstantinos, D., Tsirigos, C.K.S., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., Heijne, G., Nielsen, H. (2019) Signal P 5.0

- improves signal peptide predictions using deep neural networks, *Nature Biotechnology*, **37**, 420-423, DOI: 10.1038/s41587-019-0036-z
19. *Bendtsen, J., Kiemer, D. L., Fausbøll, A., Brunak, S.* (2005) Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiology*, **5**, 58. DOI: 10.1186/1471-2180-5-58
20. *Bhasin, M., Raghava, G.P.* (2004) ESLpred: SVM-based method for subcellular localization of eukaryotic proteins using dipeptide composition and PSI-BLAST. *Nucleic Acids Res.* **32**(suppl_2), W414-419. DOI: 10.1093/nar/gkh350
21. *Shen, H.-B., Chou, K.-C.* (2009) A top-down approach to enhance the power of predicting human protein subcellular localization: Hum-mPLoc 2.0, *Analytical Biochemistry*, **394**, 269-274. DOI: 10.1016/j.ab.2009.07.046
22. *Pierleoni, A., Martelli, P.L., Fariselli, P., Casadio, R.* (2006) BaCellLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics*, **15**:22(14), e408-416. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl222
23. *Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., Barton, G.J.* (2006) JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.*, **43**(W1), W389–W394. DOI: 10.1093/nar/gkv332
24. *Buchan, D.W.A., Jones, D.T.* (2019) The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Res.*, **47**(W1), W402-W407. DOI: 10.1093/nar/gkz297
25. *Garnier, J., Giblat, J.-F., Robson, B.* (1996) GOR secondary structure prediction method version IV. *Methods in Enzymology* R.F. Doolittle Ed., **266**, 540-553.
26. *Geourjon, C., Deleage, G.* (1995) SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.*, **11**(6), 681-684. DOI: 10.1093/bioinformatics/11.6.681
27. *Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.Y., Kim, Y.H.* (2012) Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp.*, **62**, e3923, DOI: 10.3791/3923.
28. *Laemmli, U.K.* (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685. DOI: 10.1038/227680a0
29. *Kushner, S. R.* (1978) An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. In: *Genetic engineering* (Boyer H.B. and Nicosia S., eds.), Elsevier, North-Holland, Amsterdam, p. 17
30. *Fedchenko, V.I., Kaloshin, A.A., Kaloshina, S.A., Medvedev, A.E.* (2021) Expression and isolation of N-terminal truncated human recombinant renalase in prokaryotic cells. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **4**(3), e00158. DOI: 10.18097/BMCRM00158
31. *Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., and Nagy, G.* (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.*, **80**, 1523–1631. DOI: 10.1152/physrev.2000.80.4.1523
31. *Fedchenko, V.I., Kaloshin, A.A.* (2019) A simplified method for obtaining cDNA of low-copy and silent eukaryotic genes using human renalase as an example. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **2**(2), e00101. DOI: 10.18097/BMCRM00101

Поступила:	14.06.2022
После доработки:	21.06.2022
Принята к публикации:	23.06.2022

CONSTRUCTION AND EXPRESSION OF THE CHIMERIC HUMAN RENALASE GENE ENCODING THE N-TERMINAL SIGNAL SEQUENCE OF THE SECRETORY PROTEIN PROLACTIN

V.I. Fedchenko, A.A. Kaloshin, A.V. Veselovsky A.E. Medvedev*

Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: valfed38@yandex.ru

Renalase (RNLS) is a protein that performs various protective functions both inside and outside cells. Intracellular RNLS is a FAD-dependent oxidoreductase (EC 1.6.3.5). Extracellular RNLS lacking an N-terminal peptide does not interact with FAD and exhibits various protective effects on the cell through interaction with receptor proteins. The mechanisms and factors responsible for RNLS transport out of the cell are not fully understood. It is well known that the signal sequence plays a key role in the classical mechanism of protein transport outside cells. One of the approaches to study the secretion of RNLS from the cell can be the creation of chimeric forms of the protein with a modified N-terminal amino acid signal sequence. Bioinformatics analysis showed that the signal sequence of the prolactin gene (PRL), connected to the template sequence of the RNLS gene, gave the classic signal characteristic of secretory proteins. On this basis, this paper describes: (i) a method for constructing the human RNLS gene in which the N-terminal sequence encoded by the RNLS gene was replaced by the N-terminal sequence encoded by the PRL gene; (ii) expression of this chimeric genetic construct.

Key words: PCR; cloning; expression; renalase; prolactin; signal sequence

FUNDING

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 20–015–00104)

Received: 14.06.2022, revised: 21.06.2022, accepted: 23.06.2022