

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ПОЛУЧЕНИЕ С-КОНЦЕВЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ РЕНАЛАЗЫ-1 И РЕНАЛАЗЫ-2 ЧЕЛОВЕКА, КОДИРУЕМЫХ АЛЬТЕРНАТИВНЫМИ ЭКЗОНАМИ

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

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Погодинская ул., д.10; *e-mail: valfed38@yandex.ru

Описан метод получения С-концевых аминокислотных последовательностей, слитых с дигидрофолатредуктазой (DHFR) и специфичных для изоформ реналазы RNLS1 и RNLS2. Он включает синтез нуклеотидных последовательностей альтернативных экзонов RNLS1-9ex и RNLS2-10ex, определяющих различия первичной структуры этих белков, их слияние (т.н. фьюжн) с кодирующей последовательностью *DHFR* и экспрессию данных генетических конструкций в клетках штамма-производителя *E. Coli* Rosetta. В результате хроматографической очистки на колонке, содержащей Ni-сефарозу, были получены высокоочищенные препараты рекомбинантных белков ReI-9ex и ReI-10ex с электрофоретической чистотой около 95%.

Ключевые слова: реналаза (RNLS); альтернативные экзоны гена *RNLS*; изоформы реналазы RNLS1 и RNLS2; клонирование; экспрессия; очистка белка

DOI: 10.18097/BMCRM00228

ВВЕДЕНИЕ

Реналаза (RNLS) – открытый в 2005 г. белок, который играет разные роли внутри и снаружи клеток [1-5]. Внутриклеточная RNLS представляет собой FAD-зависимую оксидоредуктазу (КФ 1.6.3.5) [5, 6], которая осуществляет окисление изомерных форм β -NAD(P)H, восстановленных по 2 или 6 положению никотинамидного кольца вместо метаболически активного 4 положения [7]. Внеклеточная RNLS, лишённая своего N-концевого пептида и кофактора FAD, проявляет различные защитные эффекты при помощи некаталитических механизмов [8-11]. Детекция RNLS в крови свидетельствует в пользу того, что этот белок может дистантно действовать на клетки различных органов [11].

Основными формами RNLS человека служат RNLS1 и RNLS2 [12, 13], которые отличаются С-концевой аминокислотной последовательностью, кодируемой альтернативными экзонами (рис. 1). Поскольку обе RNLS реагируют с антителами к RNLS1 [12], это серьезно осложняет их анализ в организме в норме и при патологии.

Одним из подходов к решению данной проблемы может быть создание антител к изоформ специфичным С-концевым аминокислотным последовательностям RNLS1 и RNLS2, кодируемым альтернативными экзонами.

В данной работе мы описываем метод получения С-концевых аминокислотных последовательностей RNLS1 и RNLS2, слитых с дигидрофолатредуктазой – белком-ферментом, часто используемым для формирования слитых (т.н. фьюжн) пептидных последовательностей для наработки и последующего иммунологического применения коротких пептидов [14].

МЕТОДИКА

Реактивы

В работе использованы следующие реагенты: набор Tersus-ДНК полимеразы («Евроген», Россия), эдонуклеазы рестрикции BglII, PstI, ДНК маркеры («Ферментас», Латвия), маркеры молекулярной массы белка («BOI-RAD», США). Ni-сефароза («GE Healthcare», Швеция), система для

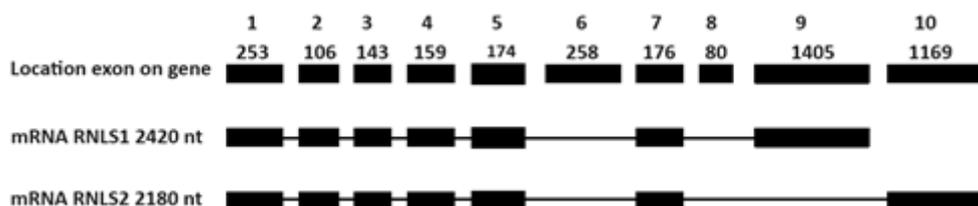


Рисунок 1. Экзонная организация гена RNLS (NC_000010.11). Показано расположение 10 экзонов гена RNLS с указанием их длины (782 п.о., 106 п.о., 143 п.о., 159 п.о., 174 п.о., 285 п.о., 176 п.о., 90 п.о., 1409 п.о. и 1169 п.о.). Транскрипционный вариант мРНК RNLS1 (NM_001031709.2) с 2420 н. включает 1, 2, 3, 4, 5, 7 и 9 экзоны. Транскрипционный вариант мРНК RNLS2 (NM_018363.3) с 2180 н. включает 1, 2, 3, 4, 5, 7 и 10 экзоны.



Таблица 1. Праймеры, используемые в ПЦР при получении RNLS-1-9ex и RNLS-2-10ex

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')
Re1-9ex-прямой	ATA AGA TCT ACA AAT GCT GCT GCC AAC
Re1-9ex-обратный	ATA CTG CAG TCA AAT ATA ATT CTT TAA AGC TTC CGA
Re2-10ex-прямой	ATA AGA TCT CCA AGT GCT GGT GTG ATT C
Re2-10ex-обратный	ATA CTG CAG TCA GAT GGG AAA TCC AAT CGC C

Примечание. Сайты рестрикции BglIII и PstI в нуклеотидной последовательности праймеров выделены жирным шрифтом.

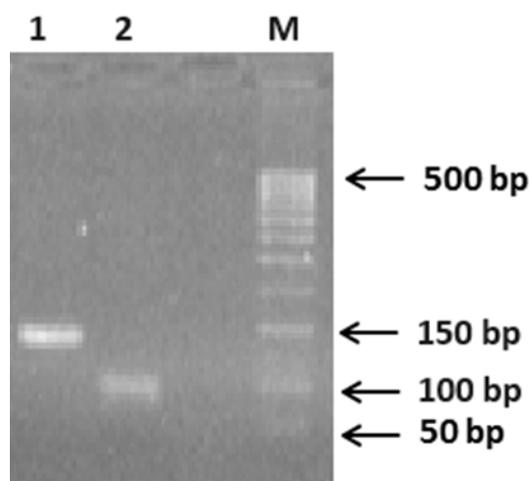


Рисунок 2. Электрофорез в 2 % агарозном геле ДНК ампликонов. 1- ДНК ампликон 147 п.о. от 9-го экзона. 2 - ДНК ампликон 87 п.о. от 10-го экзона. М - ДНК маркер: 50 п.о., 100 п.о., 150 п.о., 200 п.о., 250 п.о., 300 п.о., 350 п.о., 400 п.о., 450 п.о., 500 п.о.

очистки фрагментов ДНК Wizard® SVGel и PCR Clean-Up («Promega», США), вектор pGEM-T («Promega», США), вектор pQE-40 («Novagen», Великобритания). Олигонуклеотиды для ПЦР были синтезированы по запросу «Евроген» (табл. 1). *E. coli* штамм Rosetta (DE3) получен из «Novagen». Остальные реактивы приобретены в «Sigma-Aldrich» (США).

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Реакцию проводили в индивидуальных пробирках «Eppendorf» для ПЦР реакции емкостью 500 мкл в объеме 20 мкл. Реакционная смесь содержала: Tersus ПЦР буфер, 0.2 мМ dNTP; прямой и обратный праймеры по 4 мкМ, 50 нг матричной ДНК и 0.5 ед. Tersus-ДНК-полимеразы. Синтез RNLS1-9ex и RNLS2-10ex осуществляли на матрице ДНК вектора pET-RenI и вектора pET-RenII соответственно, которые были получены нами ранее [12, 15]. Условия ПЦР реакции были следующие: денатурация – 95°C в течение 3 мин – 1 цикл; синтез ДНК ампликонов – 92°C – 20 с, 55°C – 15 с, 72°C – от 60 с – 30 циклов; заключительный цикл 72°C – 3 мин.

Электрофорез фрагментов ДНК

Электрофорез фрагментов ДНК проводили в 2% агарозном геле с использованием трис-боратного буфера pH 8.0 [16].

Секвенирование ДНК

Секвенирование проведено по запросу в фирме «Евроген». Полученную последовательность ДНК

соотносили с геном реналазы (NM_001031709 и NM_018363, GeneBank), используя программу BLAST, доступную на сайте National Center for Biotechnology Information.

Трансформация клеток *E. coli*

Трансформацию проводили по методу Kushner с модификациями, описанными ранее [12, 15, 17].

Выделение рекомбинантного белка, кодируемых RNLS1-9ex и RNLS2-10ex

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 [12, 15, 17, 18].

Электрофорез белков в ПААГ

Электрофорез белков проводили в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для клонирования альтернативных экзонов RNLS1-9ex и RNLS2-10ex гена RNLS в вектор pQE40 по сайтам рестрикции BglIII и PstI было синтезировано 2 пары праймеров. Эти экзоны кодируют аминокислотные последовательности, определяющие структурные различия RNLS1 и RNLS2. Нуклеотидные последовательности этих праймеров приведены в таблице 1. Прямые праймеры (Re1-9ex-for и Re2-10ex-for) содержали сайт рестрикции BglIII. Обратные праймеры Re1-9ex-rev и Re2-10ex-rev – сайт рестрикции PstI

При синтезе RNLS1-9ex методом ПЦР использовали прямой праймер Re1-9ex-for и обратный праймер Re1-9ex-rev. Матрицей ДНК служил плазмидный вектор pET-RenI. ПЦР реакцию проводили по протоколу, который был нами ранее отработан [12, 15].

В результате ПЦР реакции получали ДНК ампликон с расчетным размером 147 п.о. (рис. 2 дорожка 1).

При синтезе ДНК 10 экзона RNLS2 ПЦР методом использовали прямой праймер Re2-10ex-for и обратный праймер Re2-10ex-rev. Матрицей ДНК служил плазмидный вектор pET-RenII. В результате ПЦР реакции получали ДНК ампликон с расчетным размером 87 п.о. (рис. 2, дорожка 2). Анализ продукта ПЦР реакции (ДНК ампликоны) проводили методом электрофореза в 2% агарозном геле.

После электрофореза в 2% агарозном геле ДНК ампликоны RNLS1-9ex и RNLS2-10ex очищали системой Wizard (система очистки фрагментов ДНК из агарозного геля), следуя протоколу производителя. Очищенные ДНК ампликоны RNLS1-9ex и RNLS2-10ex клонировали в

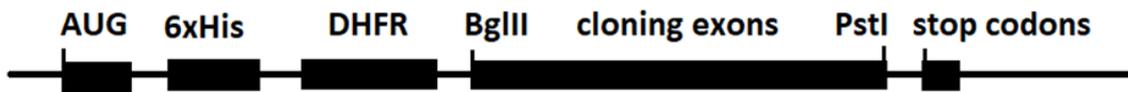


Рисунок 3. Схема клонирования в вектор pQE40 RNLS1-9ex и RNLS2-10ex по сайтам рестрикции BglIII и PstI. Объяснения приведены в тексте.

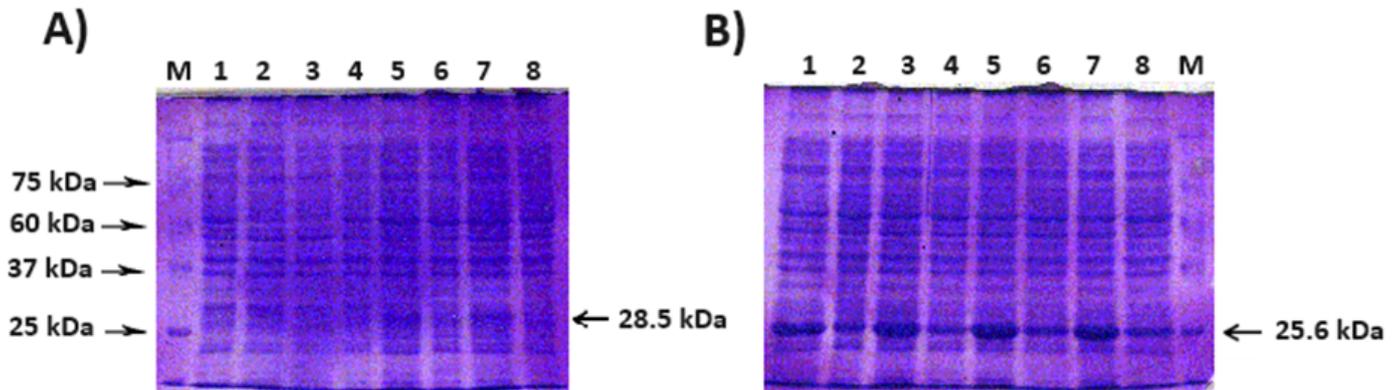


Рисунок 4. Контрольная экспрессия векторов pQE-ReI-9ex и pQE-ReII-10ex в клетках *E. coli* штамм Rosetta в восьми клонах. А-(клоны 1-8) – тотальный белок клеток *E. coli* после индукции ИПТГ в клонах содержащие вектор pQE-ReI-9ex. Б-(клоны 1-8) – тотальный белок клеток *E. coli* после индукции ИПТГ в клонах содержащие вектор pQE-ReII-10ex. М - маркеры молекулярной массы белков 75 кДа, 60 кДа, 37 кДа и 25 кДа указаны слева. Справа указан размер рекомбинантного белка ReI-9ex с расчетной молекулярной массой 28.5 кДа и с рекомбинантного белка ReII-10ex с расчетной молекулярной массой 25.6 кДа соответственно.

плазмидный вектор в pGEM-T. Процедура клонирования, отбор клонов и секвенирование подробно было описано нами ранее [12, 15].

Секвенированные последовательности RNLS1-9ex и RNLS2-10ex сравнивали с последовательностями из базы данных RNLS1 (NM_001031709.2) и RNLS2 (NM_018363.3) методом BLAST анализа [12, 15, 17].

ДНК, содержащие нуклеотидные последовательности RNLS1-9ex и RNLS2-10ex в векторе pGEM-T, вырезали по сайтам рестрикции BglIII/PstI и переклонировали по этим же сайтам в вектор pQE40. Вектор pQE40 был выбран потому, что, во-первых, он кодирует перед N-концом 6xHis участок, необходимый для очистки рекомбинантного белка и, во-вторых, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок дигидрофолатредуктазу (dihydrofolatereductase; DHFR) с молекулярной массой около 20 кДа. Этот белок обычно используют в качестве т.н. добавочного фьюжн белка при экспрессии полипептидов (рис. 3) [14].

В результате клонирования RNLS1-9ex и RNLS2-10ex в плазмидный вектор pQE40 были получены два экспрессионных вектора, обозначены как pQE-ReI-9ex и pQE-ReII-10ex соответственно.

Экспрессия гена RNLS в прокариотической системе

Экспрессию рекомбинантных генов в плаزمидях pQE-ReI-9ex и pQE-ReII-10ex в *E. coli* штамм Rosetta проводили по протоколу, используемому ранее [12, 15].

В результате клонирования были отобраны по восемь клонов, содержащих экспрессионные вектора. При контрольной экспрессии рекомбинантного белка в клетках *E. coli* с индукцией ИПТГ, содержащего вектор pQE-ReI-9ex, был отобран клон №5, содержащий максимальный экспрессионный белок ReI-9ex в области 28.5 кДа (рис. 4 А, дорожка 5). При контрольной экспрессии вектора pQE-ReII-10ex клетках *E. coli* был отобран клон №3,

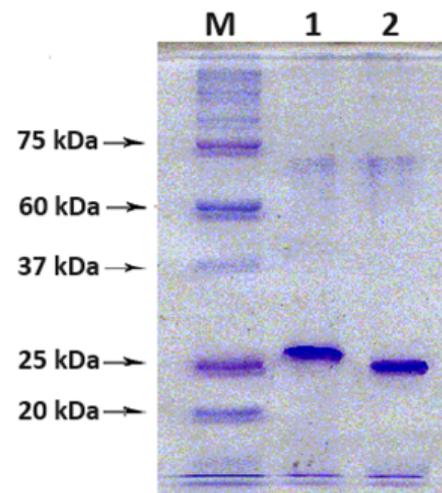


Рисунок 5. Электрофорез в 12% ПААГ рекомбинантных белков клеток. М – маркеры молекулярной массы белков 75 кДа, 60 кДа, 37 кДа и 25 кДа. 1 – белок ReI-9ex с расчетной молекулярной массой 28.5 кДа после очистки на колонке с Ni-Sepharose; 2 – белок ReII-10ex с расчетным молекулярным весом 25.6 кДа.

содержащий максимальный экспрессионный белок ReII-10ex в области 25.6 кДа (рис 4-В, дорожка 3). Отобранные клоны №3 и №5, содержащие максимально экспрессируемый белок ReI-9ex и ReII-10ex соответственно, были использованы для наработки и очистки рекомбинантного белка.

Выделение рекомбинантного белка

Очистку рекомбинантного белка ReI-9ex и ReII-10ex осуществляли методом аффинной хроматографии с использованием Ni-сефарозы в 8 М буферном растворе мочевины, как было описано ранее в наших работах [12, 15, 17, 18]. Полученные в результате хроматографической очистки препараты белка анализировали электрофоретически

в 12% ПААГ (рис. 5). После очистки были получены рекомбинантные белки ReI-9ex и ReII-10ex с высокой долей очистки (около 95% чистоты), которые будут использованы в дальнейших исследованиях.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате клонирования экзонов RNLS1-9ex и RNLS2-10ex в pQE40 вектор были получены экспрессионные векторы pQE-ReI-9ex и pQE-ReII-10ex, в которых генетические конструкции ReI-9ex и ReII-10ex были слиты с DHFR. В результате их экспрессии в клетках *E. coli* штамм Rosetta, были получены рекомбинантные белки ReI-9ex и ReII-10ex с молекулярными массами 28.5 кДа и 25.6 кДа, соответствующие молекулярным массам целевых белков. В результате хроматографической очистки на колонке, содержащей Ni-сефарозу, были получены высокоочищенные препараты рекомбинантных белков ReI-9ex и ReII-10ex с электрофоретической чистотой около 95%. При использовании этих белков для получения антител против С-концевых последовательностей RNLS1 и RNLS2 человека, следует помнить, что уровень RNLS в крови человека, по данным разных авторов (см. например, таблицу 1 в [20]), варьирует от 20 нг/мл до 4260 нг/мл. С одной стороны, это существенно выше уровня DHFR (<10 нг/мл [21]). С другой – возможное взаимодействие DHFR с антителами к так называемым фьюжн белкам можно скорректировать предварительной обработкой анализируемых биологических жидкостей коммерчески доступными препаратами антителами к DHFR.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.) (№ 122030100170-5).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная работа не включает исследования, в которых в качестве объекта выступали люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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

2. 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

3. Baroni, S., Milani, M., Pandini, V., Pavesi, G., Horner, D., Aliverti, A. (2013) Is renalase 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

4. 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

5. Moran, G.R. (2016) The catalytic function of renalase: A decade of phantoms. *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**(1), 177-186. DOI: 10.1016/j.bbapap.2015.04.010

6. Moran, G.R., Hoag, M.R. (2017) The enzyme: Renalase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **632**, 66-76. DOI: 10.1016/j.abb.2017.05.015

7. Beaupre, B.A., Hoag, M.R., Roman, J., Forstlerling, F.H., Moran, G.R. (2015) Metabolic Function for Human Renalase: Oxidation of Isomeric Forms of beta-NAD(P)H that Are Inhibitory to Primary Metabolism. *Biochemistry* **54**(3), 795-806. DOI: 10.1021/bi5013436

8. 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

9. Kolodceik, 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

10. 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

11. Pointer, T.C., Gorelick, F.S., Desir, G.V. (2021) Renalase: A Multi-Functional Signaling Molecule with Roles in Gastrointestinal Disease. *Cells*, **10**, 2006. DOI: 10.3390/cells10082006.

12. Fedchenko, V.I., Kaloshin, A.A., Mezhvikina, L.M., Buneeva, O.A., 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), 12764-1279. DOI: 10.3390/ijms140612764

13. Desir, G.V. (2022) Renalase: discovery, biology, and therapeutic applications. *Trans Am Clin Climatol Assoc.*, **132**, 117-125.

14. Iwakura, M., Kokubu, T., Ohashi, S. (1993) Immunological application of the dihydrofolate reductase handle carrying a small peptide, leucine enkephalin. *J. Biochem.* **114**(6), 885-889. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124272.

15. 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

16. 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.

17. 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/bmcrm00137

18. 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

19. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685. DOI: 10.1038/227680

20. Fedchenko, V.I., Veselovsky, A.V., Kopylov, A.T., Kaloshina, S.A., Medvedev, A.E. (2022) Renalase may be cleaved in blood. Are blood chymotrypsin-like enzymes involved? *Medical Hypotheses*, **165**, 110895, DOI: 10.1016/j.mehy.2022.110895

21. Hernández-Preciado M.R., Morán-Moguel, M.C., Dávalos-Rodríguez, I.P., Enriquez-Barajas, C.M., Valdovinos-Maravilla, J.P., Díaz-Pérez, A.L., Silva-Castro, D.E., González-López, L., Gámez-Nava, J.I., Aceves-Aceves, M.A., Salazar-Paramo, M. (2019) miRNA-24 Gene Sequence, DHFR -829C-T Genotypes, and Methotrexate Response in Mexican Patients with Rheumatoid Arthritis. *Genet. Test Mol. Biomarkers*. **23**(3), 223-227. DOI: 10.1089/gtmb.2018.0226

Поступила: 25.05.2024
После доработки: 21.06.2024
Принята к публикации: 22.06.2024

GENERATION OF C-TERMINAL SEQUENCES OF HUMAN RENALASE-1 AND RENALASE-2 ENCODED BY ALTERNATIVE EXONS

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

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

A method for generation of C-terminal amino acid sequences fused to dihydrofolate reductase (DHFR) and specific for RNLS1 and RNLS2 isoforms of renalase is described. It includes synthesis of nucleotide sequences of alternative exons of RNLS1-9ex and RNLS2-10ex, determining the differences in the primary structure of these proteins, their fusion with the coding sequence of *DHFR* and expression of these genetic constructs in cells of the *E. coli* Rosetta cells. Chromatographic purification on a column containing Ni Sepharose resulted in highly purified preparations of recombinant ReI-9ex and ReII-10ex proteins with an electrophoretic purity of about 95%.

Key words: renalase (RNLS); alternative exons of the *RNLS* gene; RNLS1 and RNLS2 isoforms of renalase; cloning; expression; protein purification

FUNDING

The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030). (no. 122030100170-5).

Received: 25.05.2024, revised: 21.06.2024, accepted: 22.06.2024