

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ К РЕКОМБИНАНТНОЙ РЕНАЛАЗЕ

В.И. Федченко^{1}, О.А. Бунеева¹, С.А. Калошина¹, М.В. Медведева², Д.В. Серебряная², А.Е. Медведев¹*¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
111921 Москва, Погодинская ул., 10; * e-mail: valfed38@yandex.ru.²Московский государственный университет, Москва

Реналаза (RNLS) – полифункциональный белок, которому свойственны разные функции внутри и вне клеток. Об уровне RNLS в тканях и биологических жидкостях обычно судят при помощи коммерчески доступных антител, которые обладают различной специфичностью по отношению к целевому белку. В данной работе методом Вестерн блот анализа мы исследовали взаимодействие ряда первичных поликлональных и моноклональных антиреналазных антител с рекомбинантными препаратами RNLS человека и крысы, а также с химерными белками, в которых последовательности RNLS, кодируемые альтернативными экзонами (9 и 10), были слиты с дегидрофолатредуктазой. Для проверки специфичности взаимодействия использовали препараты лактатдегидрогеназы (LDHA и LDHB), для которых недавно обнаружено взаимодействие с некоторыми препаратами антиреналазных антител. Все исследованные поликлональные и моноклональные антитела эффективно взаимодействовали со всеми исследованными препаратами RNLS, включая фрагменты, полученные после обработки полноразмерного рекомбинантного белка протеазами, а также фрагменты, входящие в состав слитого с дегидрофолатредуктазой химерного белка. Препараты LDHA и LDHB также реагировали с антиреналазными антителами, и неспецифическое взаимодействие этих антител с LDHA и LDHB можно было существенно снизить за счет разведения (1:10000 вместо 1:1000, рекомендуемых производителями). При этом поликлональные антитела более эффективно взаимодействовали с полноразмерной рекомбинантной реналазой, а моноклональные антитела более эффективно взаимодействовали с пептидными фрагментами, полученными после обработки целевого белка протеазами (трипсином, химотрипсином и химазой).

Ключевые слова: реналаза; лактатдегидрогеназы А и В; поликлональные и моноклональные антитела к реналазе человека; Вестерн блот анализ

DOI: 10.18097/BMCRM00347

ВВЕДЕНИЕ

Реналаза (RNLS) – полифункциональный белок, которому свойственны разные функции внутри и вне клеток [1–5]. Внутриклеточная RNLS проявляет свойства FAD-зависимой оксидоредуктазы (КФ 1.6.3.5), которая катализирует окисление изомерных форм β -NAD(P)H, восстановленных по 2 или 6 положению никотинамидного кольца (вместо метаболически активного 4 положения) [3]. Внеклеточная RNLS, лишённая N-концевого сигнального пептида и кофактора FAD, проявляет многочисленные регуляторные эффекты при помощи некаталитических механизмов, реализуемых при участии различных рецепторных белков [4–6].

Об уровне RNLS в тканях и биологических жидкостях обычно судят при помощи коммерчески доступных антител [1, 6], которые обладают различной специфичностью по отношению к целевому белку, реже – при помощи масс-спектрометрии с использованием протеотипических пептидов [7–9].

Ранее мы показали, что препараты антиреналазных антител Pokard-RNLS-AB и MA5-31898 в разведении 1:1000, рекомендованном производителем, практически одинаково эффективно взаимодействовали с рекомбинантными белками RNLS человека (RNLS1) и крысы (RNLS-rat), а также химерными белками, аминокислотные последовательности которых кодируются альтернативными экзонами 9 и 10, слитыми с дегидрофолатредуктазой (DHFR; DHFR-RNLS-

9ex и DHFR-RNLS-10ex) [10]. Кроме того, изучение уровня RNLS в сердце нормотензивных и гипертензивных крыс при помощи антиреналазных антител привело к неожиданной идентификации нескольких ферментов миокарда, молекулярная масса которых (лактатдегидрогеназа (LDH), малатдегидрогеназа) находится в диапазоне, свойственном RNLS из различных источников [11].

В данной работе методом Вестерн блот мы проанализировали взаимодействие первичных поликлональных и моноклональных антиреналазных антител, а также вторичных антител (конъюгата антител кролика к иммуноглобулинам овцы и мыши с пероксидазой хрена) с рекомбинантными/химерными белками RNLS человека и крысы (RNLS1, RNLS-rat), а также DHFR-RNLS-9ex и DHFR-RNLS-10ex и протеолитическими фрагментами RNLS1. Кроме того, мы исследовали взаимодействие этих антител с рекомбинантной LDHA и очищенной из мышц кролика LDH(B).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

В работе использовали:

– Pokard-RNLS-AB – поликлональные антиреналазные антитела овцы против полноразмерной рекомбинантной RNLS1 (аминокислотные остатки (а.о.): 1-342), содержащей на N-конце гексагистидиновую метку (6xHis). RNLS1



Таблица 1. Препараты антител, использованные в Вестерн блот анализе

Антитела	Иммуноген RNLS	Характеристика иммуногена	Производитель
Pokard-RNLS-AB	а.а.:1-342	Иммуноген включает последовательности а.а., кодируемые экзонами 1, 2, 3, 4, 5, 7 и 9 RNLS1	«Покард»
MA5-31898	а.а.: 68-242	Иммуноген включает последовательности а.а., кодируемые экзонами 2, 3, 4, 5 и 7 RNLS1 и не содержит а.а. последовательностей, кодируемых экзонами 1 и 9	«Invitrogen»
NBP-52554	а.а.: 68-242	Иммуноген включает последовательности а.а., кодируемые экзонами 2, 3, 4, 5 и 7 RNLS1 не содержит а.а. последовательностей, кодируемых экзонами 1 и 9.	«NOVUS biologicals»

была экспрессирована в клетках *E. coli*, а антитела были наработаны и очищены по запросу авторов «Покард» (Россия);

– MA5-31898 – моноклональные антитела мыши против фрагмента рекомбинантной RNLS1 (а.о.: 68-242), также экспрессированного в клетках *E. coli* («Invitrogen», США). Наличие и положение (N- или C-концевое) 6xHis в клонируемом иммуногене RNLS1 фирма не приводит;

– NBP-52554 – моноклональные антитела мыши против фрагмента рекомбинантной RNLS1 (а.о.: 68-242), экспрессированного в клетках *E. coli* («NOVUS biologicals», США). Наличие и положение (N- или C-концевое) 6xHis в клонируемом иммуногене RNLS1 фирма не приводит;

– P-RAS Iss – конъюгат антител кролика к иммуноглобулинам овцы с пероксидазой хрена и P-RAM Iss – конъюгат антител кролика к иммуноглобулинам мыши с пероксидазой хрена («ИМТЕК», Россия).

Рекомбинантные белки RNLS1 (38 38 кДа) и RNLS2-rat (35 кДа) были наработаны в клетках *E. coli* в виде белков, содержащих N-концевую метку 6xHis [12-15].

Рекомбинантные белки DHFR-RNLS-9ex и DHFR-RNLS-10ex были экспрессированы в клетках *E. coli* в виде фьюжн-белков, содержащих на N-конце 6xHis дигидрофолатредуктазу (dihydrofolatereductase, DHFR) и аминокислотные фрагменты кодируемые альтернативными экзонами RNLS1 (экзон 9) и RNLS2 (экзон 10) соответственно [10]. Расчетная молекулярная масса белка DHFR-RNLS-9ex составляла 28.5 кДа, а DHFR-RNLS-10ex – 25.56 кДа.

LDHA (лактатдегидрогеназу из скелетных мышц кролика) получали, как описано в [16].

Рекомбинантную LDHB (сердечная субъединица лактатдегидрогеназы кролика) экспрессировали в клетках *E. coli* в виде содержащего C-концевую 6xHis метку белка, с помощью которой его выделяли при помощи хроматографии на Ni-агарозе.

Набор белковых маркеров для калибровки молекулярной массы приобретен у «Amersham» (Великобритания), модифицированный трипсин – у «Promega» (США), химаза (химотрипсиноподобный фермент) – у «Sino Biological Inc.» (Китай), химотрипсин – у «Sigma» (США). Остальные реактивы были отечественного производства максимально доступной чистоты.

Обработка рекомбинантной RNLS1 протеазами

RNLS1 инкубировали 2 ед. трипсина в 50 mM TrisHCl буфере, содержащем 10 mM CaCl₂, 1 mM DTT (pH 8.0), при 37°C в течение 10 мин.

RNLS1 инкубировали с 3 ед. химотрипсина в 50 mM TrisHCl буфере, содержащем 10 mM CaCl₂ (pH 8.0) при 37°C в течение 15 мин.

Инкубацию RNLS1 с 3 ед. химазы проводили в 50 mM TrisHCl буфере, содержащем 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT (pH 7.8) при 37°C в течение 15 мин.

Инкубацию останавливали добавлением стандартного SDS-PAGE буфера [17] с последующим нагреванием при 95°C 5 мин.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ).

Электрофорез белков в 12% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) проводили по методу Laemmli [17].

Вестерн-блот анализ взаимодействия белков с антиреналазными антителами

Вестерн блоттинг проводили по методу Gallagher [18] с небольшими модификациями, описанными ранее [19] с использованием препаратов человеческих (Pokard-RNLS-AB) к RNLS1 и моноклональных антител (MA5-31898 и NBP-52554) к RNLS1. В качестве вторичных антител использовали иммуноглобулины кроличьих/овечьих IgG и кроличьих/мышинных IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена («ИМТЕК»). При Вестерн блот анализе производители рекомендуют разводить первичные антитела в 1:1000 раз. Мы также использовали кратное разведение первичных антител в 1:10000, 1:100000 и 1:1000000 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения сравнительного Вестерн блот анализа взаимодействия различных белков RNLS1, RNLS-rat, RNLS1-9ex, RNLS2-10ex, LDHA и LDHB с антителами против реналазы человека были использованы поликлональные антитела (Pokard-RNLS-AB) и моноклональные антитела от различных производителей (MA5-31898, NBP-52554, см. сводную таблицу 1).

Поликлональные антиреналазные антитела Pokard-RNLS-AB, а также моноклональные антитела MA5-31898 и NBP-52554, использованные в рекомендуемом разведении (1:1000), эффективно взаимодействовали как с RNLS1, так и LDHB и LDHA (рис. 1).

Аналогичная ситуация – взаимодействие как с препаратами RNLS человека и крысы (RNLS1, RNLS2-rat), так и LDHB – была и при использовании других

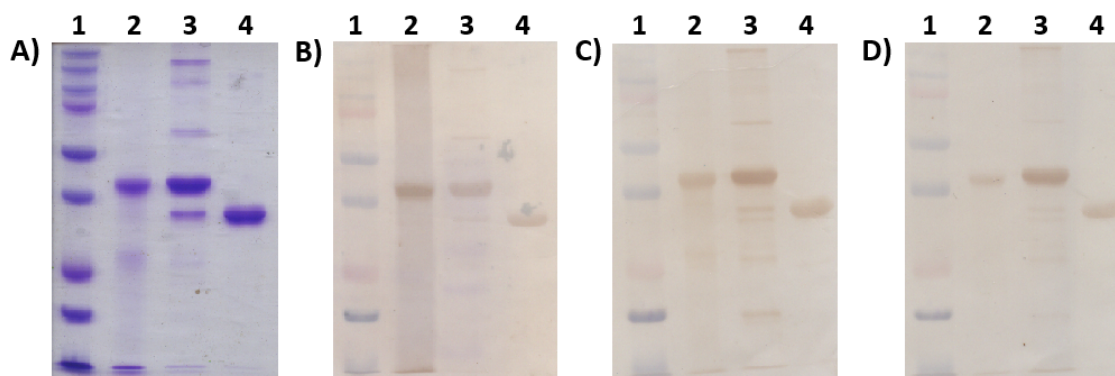


Рисунок 1. Электрофорез в 12 % SDS-ПААГ и Вестерн блот анализ взаимодействия поликлональных антител Pokard-RNLS-AB и моноклональных антител MA5-31898 и NBP-52554 при разведении антител в 1:1000 с белками RNLS1, LDHB и LDHA. А) – гель электрофорез белков в 12 % SDS- ПААГ: дорожки 1) – маркер молекулярной масс белков 250 кДа, 150 кДа, 100 кДа, 75 кДа, 50 кДа, 37 кДа, 25 кДа, 20 кДа, 15 кДа и 10 кДа; 2) – RNLS1; 3) – LDHB; 4) – LDHA. В) – вестерн-блот анализ с антителами Pokard-RNLS-AB. С) – вестерн-блот анализ с антителами MA5-31898. D) – вестерн блот анализ с антителами NBP-52554.

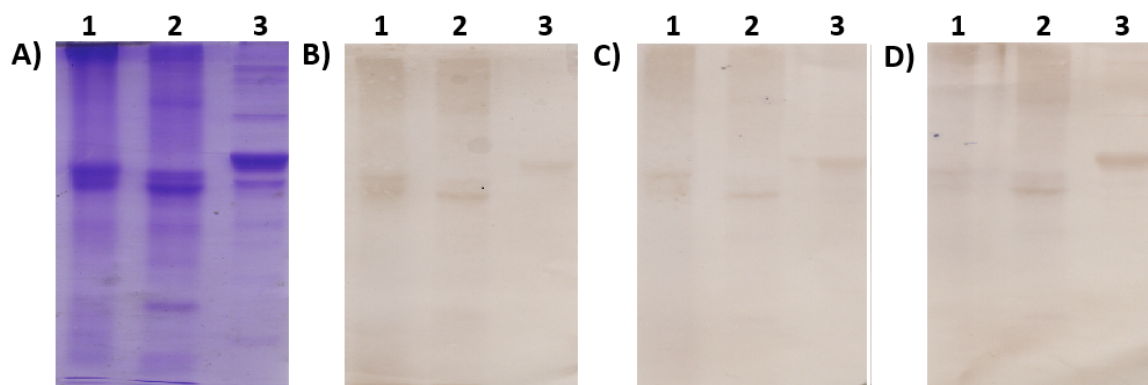


Рисунок 2. Электрофорез в 12 % SDS- ПААГ и Вестерн блот анализ взаимодействия поликлональных антител Pokard-RNLS-AB с белками RNLS1, RNLS2-rat и LDHB при разведении антител в 1:10000, 1:100000 и 1:1000000 (рекомендовано производителем разведение 1:1000 раз). А) - гель электрофорез белков в 12 % SDS- ПААГ: дорожки 1) – RNLS1; 2) – RNLS2-rat; 3) – LDHB. В) – вестерн блот с разведением антител Pokard-RNLS-AB в 1:10000 раз. С) – вестерн блот с разведением антител Pokard-RNLS-AB в 1:100000 раз. D) – вестерн блот с разведением антител Pokard-RNLS-AB 1:1000000.

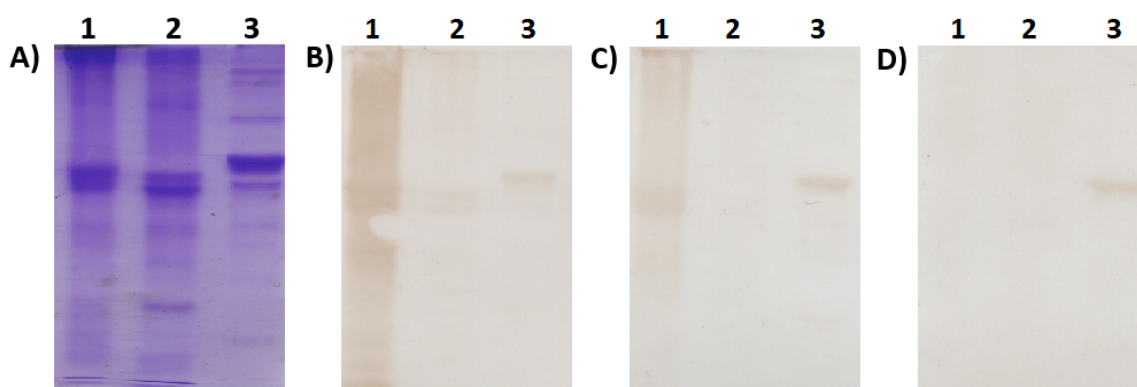


Рисунок 3. Электрофорез в 12 % SDS- ПААГ и Вестерн блот анализ взаимодействия моноклональных антител MA5-31898 с рекомбинантными белками RNLS1, RNLS2-rat и LDHB при разведении антител 1:10000, 1:100000 и 1:1000000 раз. А) – гель электрофорез белков: дорожки 1) – RNLS1; 2) – RNLS2-rat; 3) – LDHB. В) – вестерн блот анализ при разведении антител MA5-31898 1:10000 раз. С) – вестерн блот анализ при разведении антител MA5-31898 1:100000. D) – вестерн блот анализ при разведении антител MA5-31898 1:1000000.

разведений антиреналазных антител (рис. 2). Все они взаимодействовали со всеми исследуемыми препаратами белка практически одинаково; в случае LDHB интенсивность полосы при разведении антител Pokard-RNLS-AB 1:1000000 была даже больше, чем с препаратами RNLS (рис. 2 В,С, D).

Моноклональные антиреналазные антитела MA5-31898 во всех использованных разведениях также

взаимодействовали с рекомбинантными белками RNLS1, RNLS2-rat и LDHB (рисунок 3). При этом Вестерн блот показал, что при разведениях моноклональных антител 1:10000, 1:100000 и 1:1000000 (производителем рекомендовано разведение 1:1000), моноклональные антитела MA5-31898 ведут несколько иначе, чем поликлональные Pokard-RNLS-AB (рис. 3). Так, при разведении 1:10000 антитела MA5-31898 взаимодействовали

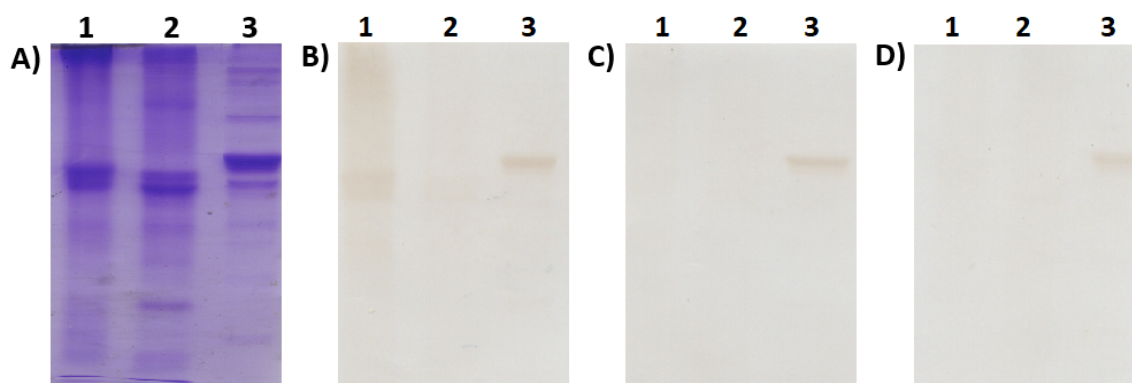


Рисунок 4. Электрофорез в 12 % SDS- ПААГ и Вестерн блот анализ взаимодействия моноклональных антител NBP-52554 с рекомбинантными белками RNLS1, RNLS2-rat и LDHB при разведении антител 1:10000, 1:100000 и 1:1000000. А) – гель электрофорез рекомбинантных белков: дорожки 1) – RNLS1; 2) – RNLS2-rat; 3) – LDHB. В) – вестерн блот при разведении антител NBP-52554 1:10000. С) – вестерн блот при разведении антител NBP-52554 1:100000. D) – вестерн блот при разведении антител NBP-52554 1:1000000.

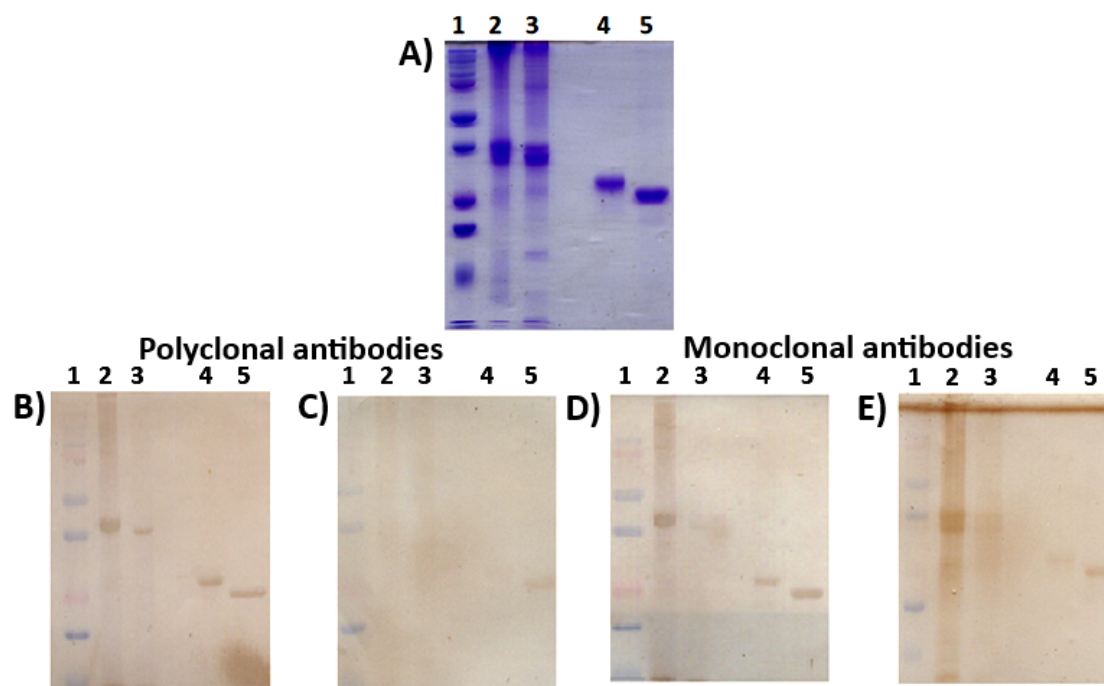


Рисунок 5. Электрофорез в 12 % SDS- ПААГ и Вестерн блот анализ взаимодействия поликлональных антител Pokard-RNLS-AB и моноклональных антител NBP-52554 с белками RNLS1, RNLS2-rat DHFR-RNLS-9ex и DHFR-RNLS-10ex. А) – гель электрофорез в 12 % SDS- ПААГ: дорожки 1) – маркер молекулярной масс белков 250 кДа, 150 кДа, 100 кДа, 75 кДа, 50 кДа, 37 кДа, 25 кДа, 20 кДа, 15 кДа и 10 кДа; 2) – RNLS1; 3) – RNLS2-rat; 4) – DHFR-RNLS-9ex; 5) - DHFR-RNLS-10ex. В) – вестерн блот с антителами Pokard-RNLS-AB при использовании конъюгата антител кролика к иммуноглобулинам овцы. С) – вестерн-блот с антителами Pokard-RNLS-AB при использовании конъюгата антител кролика к иммуноглобулинам мыши. D) – вестерн-блот с антителами NBP-52554 при использовании конъюгата антител кролика к иммуноглобулинам овцы. E) – вестерн-блот анализ взаимодействия антител NBP-52554 при использовании конъюгата антител кролика к иммуноглобулинам овцы.

со всеми исследуемыми белками (рис. 3В); однако при разведении 1:100000 обнаружено взаимодействие антител MA5-31898 с RNLS1 и LDHB (рис. 3С). При разведении в 1:1000000 обнаружено взаимодействие антител MA5-31898 только с белком LDHB (рис. 3D).

Вестерн блот анализ взаимодействия моноклональных антител NBP-52554 с рекомбинантными белками RNLS1, RNLS2-rat и LDHB также выявил определенные особенности при различных разведениях первичных антител (рис. 4).

Так, при разведении антител NBP-52554 1:10000 раз выявляется взаимодействие с целевым белком RNLS1, а также LDHB. (рис. 4 В). При разведениях антител NBP-52554 1:100000 и 1:1000000 выявляется взаимодействие только с LDHB (рис. 4 С,D).

По данным сравнительного BLAST анализа [20], среди использованных в настоящей работе белков высокая идентичность аминокислотных последовательностей обнаружена в случае рекомбинантных RNLS человека и крысы, но не RNLS1 и LDHB (табл. 2). В связи с этим, наличие неспецифических эпитопов в (нецелевых) белках маловероятно. Природа неспецифических взаимодействий исследованных антиреналазных антител с нецелевыми белками требует дальнейшего изучения.

Далее мы исследовали возможный вклад иммуноглобулинов вторичных антител во взаимодействие антиреналазных антител с нецелевыми белками. Это связано с межвидовым отличием иммуноглобулинов, полученных от различных видов животных, в частности конъюгатов антител кролика к иммуноглобулинам овцы и мыши.

Таблица 2. Блест анализ аминокислотных последовательностей RNLS1, RNLS2-rat и LDHB

Белок	Длина белка в а.о.	Сравнение последовательностей	Идентичность
RNLS1	342		
RNLS2-rat	315	RNLS1 - RNLS2-rat	79%
LDHB	334	RNLS1 - LDHB	нет

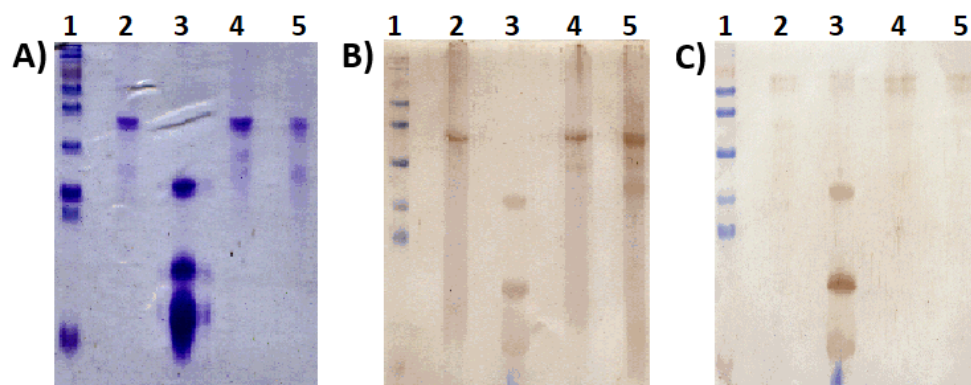


Рисунок 6. Электрофорез в 12 % SDS- ПААГ и Вестерн блот анализ взаимодействия поликлональных антител Pokard-RNLS-AB и моноклональных антител NBP-52554 с белком RNLS1 и его пептидными фрагментами, образующимися после обработки протеазами (химотрипсином, химазой и трипсином). А) – гель электрофорез в 12 % SDS- ПААГ: дорожки 1) – маркер молекулярной масс белков 250 кДа, 150 кДа, 100 кДа, 75 кДа, 50 кДа, 37 кДа, 25 кДа, 20 кДа, 15 кДа и 10 кДа; 2) – RNLS1; 3) – RNLS1 после обработки химотрипсином; 4) – RNLS1 после обработки химазой. 5) – RNLS1 после обработки трипсином. В) – вестерн-блот анализ с антителами Pokard-RNLS-AB. С) – вестерн-блот анализ с антителами NBP-52554.

В этих экспериментах были использованы: (а) первичные поликлональные антитела Pokard-RNLS-AB, полученные от овцы, и конъюгат антител кролика к иммуноглобулинам овцы и мыши; (б) моноклональные антитела NBP-52554, полученные от мыши, и конъюгат антител кролика к иммуноглобулинам мыши и овцы (рис. 5).

При использовании конъюгата антител кролика к иммуноглобулинам овцы в качестве вторичных антител, первичные поликлональные антитела Pokard-RNLS-AB взаимодействовали со всеми исследуемыми белками: RNLS1, RNLS-rat, DHFR-RNLS-9ex и DHFR-RNLS-10ex (рис. 5B, дорожки 2-5). При использовании конъюгата антител кролика к иммуноглобулинам мыши в качестве вторичных антител поликлональные антитела Pokard-RNLS-AB реагировали только на белок DHFR-RNLS-10ex (рис. 5C, дорожка 5).

При использовании конъюгата антител кролика к иммуноглобулинам мыши в качестве вторичных антител первичные моноклональные антитела NBP-52554 взаимодействовали с белками RNLS1, DHFR-RNLS-9ex и DHFR-RNLS-10ex (рис. 5D, дорожки 2-5), а при использовании конъюгата антител кролика к иммуноглобулинам овцы в качестве вторичных антител выявляется заметный ответ на взаимодействие с белками RNLS1 и DHFR-RNLS-10ex (рис. 5E, дорожки 2 и 5).

Это свидетельствует о том, что вторичные антитела могут оказывать существенное влияние на результаты анализа взаимодействия первичных антител с исследуемыми белками.

Исследование взаимодействия поликлональных и моноклональных антиреналазных антител с рекомбинантным белком RNLS1 и его пептидами, образующимися после

обработки RNLS1 протеазами (химотрипсином, химаза и трипсин) показало, что антитела реагировали с пептидными фрагментами RNLS1 (рис. 6). Следует отметить, что в этих экспериментах мы использовали разведение поликлональных и моноклональных антител 1:10000 (вместо рекомендованного производителем разведения антител 1:1000). Поликлональные антитела более эффективно взаимодействовали с полноразмерной RNLS1, чем с ее пептидными фрагментами (рис. 6 В), а моноклональные антитела NBP-52554 более эффективно взаимодействовали с пептидными фрагментами, чем с полноразмерной RNLS1 (рис. 6 С).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе было исследовано взаимодействие моноклональных и поликлональных антиреналазных антител к RNLS1 человека с полноразмерной RNLS1 человека, RNLS крысы (RNLS-rat), слитыми белками, включающими фрагменты реналазы человека, кодируемые альтернативными экзонами (DHFR-RNLS-9ex и DHFR-RNLS-10ex), а также «нереналазными белками» LDHA и LDHB.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что:

1) как поликлональные, так и моноклональные антитела эффективно взаимодействуют с исследуемыми белками RNLS1, RNLS-rat, DHFR-RNLS-9ex и DHFR-RNLS-10ex (рис. 5B,D), а также эффективно взаимодействуют с белками LDHB и LDHA (рис. 1B,C,D);

2) при разведении поликлональных и моноклональных антител в 1:10000, 1:100000 и 1:1000000 раз (производителем рекомендовано разведение антител в 1:1000 раз) антитела также эффективно взаимодействуют с исследуемыми белками RNLS1, RNLS-rat и LDHB (рис. 2, 3, 4);

3) на результат взаимодействия первичных антиреналазных антител с белками оказывает влияние межвидовое отличие конъюгатов иммуноглобулинов вторичных антител (рис. 5);

4) антиреналазные поликлональные и моноклональные антитела эффективно взаимодействуют как с полноразмерной RNLS1, так и ее пептидными фрагментами. При этом взаимодействие поликлональных антител с полноразмерной RNLS1 более эффективно, чем с ее пептидами, а моноклональные антитела более эффективно взаимодействуют с пептидными фрагментами, чем с полноразмерной RNLS1 (рис. 6).

Очевидно, исследования, связанные с анализом уровня RNLS в биологических образцах с применением антиреналазных антител, должны включать независимую валидацию результатов иммунологического анализа, например, с помощью масс-спектрометрии. В исследованиях *in vitro* необходимо адаптировать конкретные рекомендации производителя (прежде всего разведение антител) для максимально возможного снижения неспецифических взаимодействий используемых антител с нецелевыми белками.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной статье не содержится каких-либо исследований с участием людей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

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. Severina, I. S., Fedchenko, V. I., Veselovsky, A. V., & Medvedev, A. E. (2015). The history of renalase from amine oxidase to a α -NAD(P)H-oxidase/anomerase. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 61(6), 667–679. DOI: 10.18097/PBMC20156106667.
3. Moran, G. R., & Hoag, M. R. (2017). The enzyme: renalase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 632, 66–76. DOI: 10.1016/j.abb.2017.05.015

4. 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
5. Kolodecik, T. R., Guo, X., Shugrue, C. A., Guo, X., Desir, G. V., Wen, L., & Gorelick, F. (2024). Renalase peptides reduce pancreatitis severity in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 327(3), G466–G480. DOI: 10.1152/ajpgi.00143.2024
6. Zhang, L., Zang, C.-S., Chen, B., Wang, Y., Xue, S., & Wu, M.-Y. (2023). Renalase regulates renal tubular injury in diabetic nephropathy via the p38MAPK signaling pathway. *FASEB J.*, 37(10), e23188. DOI: 10.1096/fj.202300708R
7. Fedchenko, V., Kopylov, A., Kozlova, N., Buneeva, 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.*, 41(5), 593–603. DOI: 10.1159/000443460
8. Kopylov, A. T., Fedchenko, V. I., Buneeva, O. A., Pyatakova, N. V., Zgoda, V. G., & Medvedev, A. E. (2018). A new method for quantitative determination of renalase based on mass spectrometric determination of a proteotypic peptide labelled with stable isotopes. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 32(15), 1263–1270. DOI: 10.1002/rcm.8167
9. Medvedev, A., Kopylov, A., Fedchenko, V., & Buneeva, O. (2020). Is renalase ready to become a biomarker of ischemia? *Int. J. Cardiol.*, 307, 179. doi: 10.1016/j.ijcard.2019.09.045.
10. Fedchenko, V. I., Kaloshin, A. A., Kaloshina, S. A., Buneeva, O. A., Kopylov, A. T., & Medvedev, A. E. (2025). Interaction of antirenalase antibodies with recombinant human renalases 1 and 2 and their C-terminal regions encoded by the alternative exons. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 71(4), 283–287 DOI: 10.18097/PBMC201608.
11. Fedchenko, V. I., Buneeva, O. A., Kaloshina, S. A., Kopylov, A. T., Medvedeva, M. V., & Medvedev, A. E. (2026). The use of antibodies to study cardiac renalase levels in the normotensive and hypertensive rats. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 72(2), 112–117. DOI: 10.18097/PBMC201668.
12. 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.
13. Fedchenko, V., Kaloshin, A., & Medvedev, A. (2023). Improvement of the exon method for rapid synthesis of cDNA of the rat renalase. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, 6(3), e00201. DOI: 10.18097/BMCRM00201
14. Fedchenko, V., Kaloshin, A., & Medvedev, A. (2024). Generation of C-terminal sequences of human renalase-1 and renalase-2 encoded by alternative exons. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, 7(2), e00228. DOI: 10.18097/bmcr00228
15. Fedchenko, V. I., Kaloshin, A. A., Mezhevskina, 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12764–12779. DOI: 10.3390/ijms140612764
16. Scopes, R. K., & Stoter, A. (1982). Purification of all glycolytic enzymes from one muscle extract. *Methods Enzymol.*, 90(Pt. E), 479–490. DOI: 10.1016/s0076-6879(82)90175-6
17. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. DOI: 10.1038/227680a0
18. Gallagher, S., Winston, S. E., Fuller, S. A., & Hurrell, J. G. (2008). Immunoblotting and immunodetection. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, Chapter 10: Unit 10.8. DOI: 10.1002/0471142727.mb1008s83
19. Fedchenko, V., Kaloshin, A., Kaloshina, S., & Medvedev, A. (2024). Interaction of mouse and sheep polyclonal antibodies with the main forms of human and rat renalase. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, 7(4), e00248 DOI: 10.18097/bmcr00248
20. Protein Sequence Analysis. Retrieved 01.02.2026 from: nih.gov

Поступила: 01.09.2026

После доработки: 23.09.2026

Принята к публикации: 24.09.2026

THE STUDY OF SPECIFICITY OF ANTIRENALASE ANTIBODY INTERACTIONS WITH SOME PROTEINS***V.I. Fedchenko^{1*}, O.A. Buneeva¹, S.A. Kaloshina¹, M.V. Medvedeva², D.V. Serebryanaya², A.E. Medvedev¹***

¹Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya St., Moscow, 119121 Russia; * e-mail: valfed38@yandex.ru.
²Moscow State University, Moscow, Russia

Renalase (RNLS) is a multifunctional protein exhibiting various intracellular and extracellular functions. RNLS levels in tissues and biological fluids are typically assessed using commercially available antibodies, which vary in their specificity to the target protein. In this study we have used Western blot analysis to investigate the interaction of several primary polyclonal and monoclonal anti-renalase antibodies with recombinant human and rat RNLS, as well as with chimeric proteins in which RNLS sequences encoded by alternative exons (9 and 10) were fused to dihydrofolate reductase. To verify interaction specificity, we have used lactate dehydrogenase preparations (LDHA and LDHB), which have recently been shown to interact with certain anti-renalase antibody preparations. All polyclonal and monoclonal antibodies tested interacted effectively with all RNLS preparations examined, including fragments generated by protease treatment of the full-length recombinant protein and fragments contained within the chimeric protein fused to dihydrofolate reductase. LDHA and LDHB preparations also reacted with anti-renalase antibodies; however, the nonspecific interaction of these antibodies with LDHA and LDHB could be significantly reduced by dilution (1:10,000 instead of the 1:1,000 recommended by the manufacturers). Notably, polyclonal antibodies interacted more effectively with full-length recombinant renalase, whereas monoclonal antibodies interacted more effectively with peptide fragments generated by treating the target protein with proteases (trypsin, chymotrypsin, and chymase).

Key words: renalase, lactate dehydrogenases A and B, polyclonal and monoclonal antibodies against human renalase, Western blot analysis

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. 12203010017-5).

Received: 01.09.2026, revised: 23.09.2026, accepted: 24.09.2026