

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ПРОТЕОЛИЗУ ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ И УКОРОЧЕННОЙ ФОРМ РЕКОМБИНАНТНОЙ РЕНАЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА, ЭКСПРЕССИРОВАННЫХ В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ

В.И. Федченко\*, А.А. Калошин, С.А. Калошина, А.Т. Копылов, А.Е. Медведев

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

Реналаза (RNLS) – флавопротеин, N-концевой пептид которого (аминокислотные остатки (а.о.) 1-17) выполняет ряд важных функций. В клетках он участвует в формировании укладки Россмана (2-35 а.о.), необходимой для связывания кофактора FAD и проявления ферментативной активности RNLS в качестве FAD-зависимой оксидоредуктазы (КФ 1.6.3.5). При секреции RNLS во внеклеточное пространство этот пептид отщепляется, а образующаяся укороченная внеклеточная RNLS уже не может связывать FAD, и поэтому многочисленные эффекты, описанные в литературе, осуществляются некаталитическими механизмами. В данной работе мы исследовали чувствительность к трипсинолизу двух рекомбинантных форм RNLS человека, экспрессированных в прокариотических клетках: (а) полноразмерной RNLS, содержащей кофактор FAD; (б) укороченной RNLS, лишенной N-концевого пептида 1-17 (truncated RNLS, tRNLS), неспособной связывать кофактор FAD. Трипсин (1 ед./20 мкл среды) эффективно расщеплял обе формы реналазы (RNLS и tRNLS). При воздействии более низкой концентрации трипсина (0.01 ед./20 мкл среды) полноразмерная RNLS была более устойчива к трипсину, чем tRNLS. Мы предполагаем, что различная чувствительность RNLS и tRNLS, по-видимому, определяется присутствием кофактора FAD в полноразмерном рекомбинантном белке, который способствует формированию пространственной структуры, более устойчивой к действию некоторых протеаз.

**Ключевые слова:** реналаза, трипсин, протеолиз**DOI:** 10.18097/BMCRM00164

## ВВЕДЕНИЕ

RNLS – недавно открытый многофункциональный белок [1], играющий разные роли внутри и снаружи клеток. Внутри клеток полноразмерная RNLS действует как FAD-зависимая оксидоредуктаза, катализирующая окисление никотинамидных коферментов, образующихся при неспецифическом восстановлении  $\beta$ -NAD(P)<sup>+</sup> [2]. Секреция RNLS во внеклеточное пространство сопровождается удалением N-концевого пептида, который необходим для размещения кофактора FAD, поэтому внеклеточная укороченная RNLS (truncated RNLS, tRNLS) не может осуществлять FAD-зависимые функции [3]. Считают, что внеклеточные RNLS проявляют различные защитные эффекты посредством неферментативных механизмов [4]. Механизмы действия внеклеточной RNLS остаются предметом активного изучения [4-7]. Следует отметить, что ряд синтетических пептидов, воспроизводящих некоторые аминокислотные фрагменты последовательности RNLS, проявляют биологическую активность в модельных клеточных системах, свойственную полноразмерной рекомбинантной RNLS [6]. Если принять во внимание наши данные об отсутствии протеотипического пептида RNLS (100-116 аминокислотные остатки (а.о.) последовательности) в плазме крови [8], это свидетельствует в пользу того, что внеклеточная RNLS подвергается дальнейшему протеолитическому процессингу, а биологические эффекты, приписываемые этому белку, обусловлены действием образовавшихся пептидов.

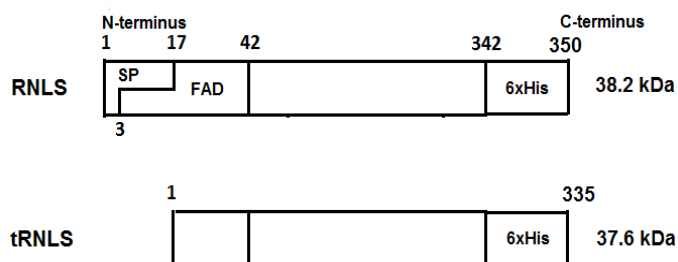
Целью данной работы было изучение чувствительности полноразмерной RNLS и укороченной tRNLS к действию трипсина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## Реагенты

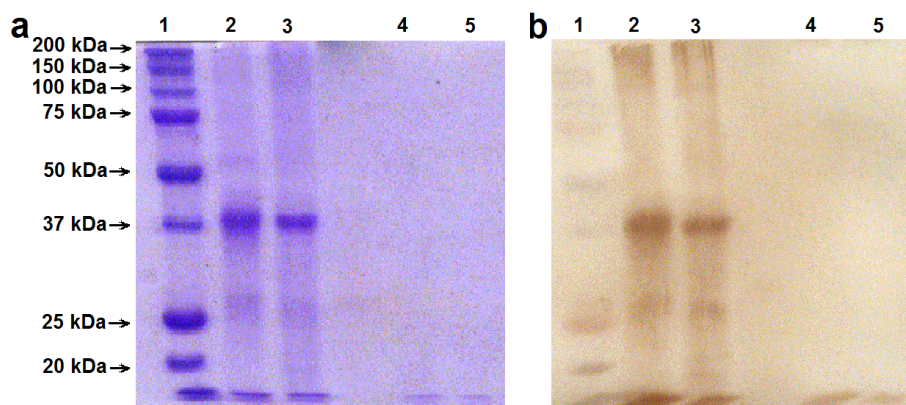
В работе использовали реактивы производства «Sigma-Aldrich» (США), а также белковые маркеры молекулярной массы PageRuler™ PrestainedProteinLadder от 2 кДа до 250 кДа производства «Bio-Rad» (США). Полноразмерная рекомбинантная реналаза человека (RNLS) [9, 10] и рекомбинантная реналаза человека, лишенная N-концевого сигнального пептида (tRNLS) [11], были получены в прокариотической системе в виде белков, содержащих C-концевую гексагистидиновую метку (рис. 1), при помощи которой эти белки были очищены на Ni-агарозе [9, 11, 12]. Масс спектрометрический анализ рекомбинантной полноразмерной RNLS, экспрессированной в такой системе, выявил присутствие кофактора FAD в препарате этого белка (неопубликованные данные).

Индивидуальные поликлональные антитела овцы были получены против антигена полноразмерной человеческой

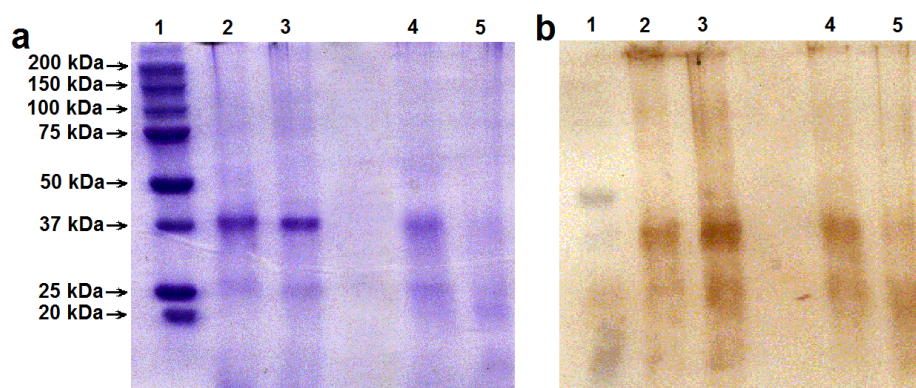


**Рисунок 1.** Две формы реналазы, использованные в данной работе. SP – сигнальный пептид.





**Рисунок 2.** SDS-PAGE электрофорез (a) и Вестерн-блот анализ (b) двух форм рекомбинантных реназа человека, инкубированных в присутствии 1 ед. трипсина. (1) – маркеры молекулярных масс, (2) – 0.2 мкг RNLS, (3) – 0.2 мкг tRNLS, (4) - 0.2 мкг RNLS инкубация с 1 ед. трипсина, (5) - 0.2 мкг tRNLS инкубация с 1 ед. трипсина.



**Рисунок 3.** SDS-PAGE электрофорез (a) и Вестерн-блот анализ (b) двух форм рекомбинантных реназа человека, инкубированных в присутствии 0.01 ед. трипсина. (1) – маркеры молекулярных масс, (2) – 0.2 мкг RNLS, (3) – 0.2 мкг tRNLS, (4) – 0.2 мкг RNLS инкубация с 0.01 ед. трипсина, (5) – 0.2 мкг tRNLS инкубация с 0.01 ед. трипсина.

рекомбинантной RNLS человека и очищены в «Покард» (Россия). Моноклональные антикроличьи/овечьи IgG-антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, были приобретены в «ИМТЭК» (Россия).

#### Протеолиз рекомбинантной реназазы трипсином

Протеолиз рекомбинантных реназа (RNLS, tRNLS) человека трипсином проводили в объеме 20 мкл с добавлением 0.2 мкг реназазы в трипсиновом буфере («Sigma-Aldrich»), содержащем 1 ед. или 0.01 ед. трипсина. После инкубации в течение 30 мин при 37°C реакцию останавливали нагреванием при 90°C в течение 5 мин, а реакционную смесь использовали для электрофореза в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии SDS (SDS-PAGE).

#### Электрофорез

Электрофорез проводили в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии SDS в системе Лэммли [13].

#### Вестерн-блоттинг

Вестерн-блоттинг проводили по стандартному протоколу, описанному в [14], с небольшими модификациями, описанными в [9]. После блоттинга нитроцеллюлозные мембраны иммуноокрашивали

хромогенным субстратом 3,3'-диаминобензидином с использованием первичных антител овцы против RNLS и моноклональных антител IgG против кролика/овцы, конъюгированных с пероксидазой хрена.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения возможной протеолитической деградации реназа в крови человека мы исследовали действия трипсина на две формы реназа (RNLS, tRNLS). Первая форма – рекомбинантная форма реназазы (RNLS) была получена нами ранее [9, 10]. Она включает в себя N-концевой сигнальный пептид (1-17 а.о.), отвечающий за секрецию реназазы из клеток и участвующий в формировании т.н. укладки Россмана (2-35 а.о.), необходимой для «размещения» кофактора FAD (3-42 а.о.), и C-концевой гистидиновый остаток 6xHis(8 а.о.), необходимый для выделения белка с помощью Ni-аффинной хроматографии [12] (рис. 1). Вторая полученная нами форма реназазы лишена N-концевого сигнального пептида (1-17 а.о.) (tRNLS) [11] (рис. 1).

Инкубация препаратов очищенных рекомбинантных реназа человека (RNLS и tRNLS) с трипсином (1 ед.) приводит полному исчезновению этих белков на электрофореграмме и иммуноблоте (рис. 2; ср. дорожки 2 и 4, 3 и 5). При снижении концентрации трипсина в среде инкубации на два порядка (0.01 ед.) полноразмерная RNLS демонстрировала большую устойчивость к действию этой

протеазы, в то время как tRNLS практически полностью подвергалась расщеплению (рис. 3; ср. дорожки 2 и 4, 3 и 5).

Мы предполагаем, что различная чувствительность RNLS и tRNLS к действию низкой концентрации трипсина, по-видимому, определяется присутствием кофактора FAD в полноразмерном рекомбинантном белке, который способствует формированию пространственной структуры, более устойчивой к действию некоторых протеаз.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная работа не содержит каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов исследования

## 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**, 1275-1280. DOI: 10.1172/JCI24066
- Moran, G.R., Hoag, M.R. (2017) The enzyme: Renalase, *Arch Biochem Biophys.*, **632**, 66-76. DOI: 10.1016/j.abb.2017.05.015
- 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 Pressure Research*, **41**, 593-6034.

- 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
- Kolodecik, 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**, 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
- 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**, 1260-1265. DOI: 10.1111/jcmm.13062
- 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
- Fedchenko, V.I., Kaloshin, A.A., Mezhevikina, 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**, 12764-12779. DOI: 10.3390/ijms140612764
- 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
- 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
- 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**, e00158. DOI: 10.18097/bmcrm00158
- 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
- Gallagher, S., Winston, S.E., Fuller, S.A., Hurrell, J.G.R. (2011) Immunoblotting and immunodetection. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **52**, 6.2.1-6.2.28. DOI: 10.1002/0471143030.cb0602s52

Поступила: 09.03.2022  
После доработки: 10.04.2022  
Принята к публикации: 14.04.2022

## THE STUDY OF SENSITIVITY TO PROTEOLYSIS OF FULL-LENGTH AND TRUNCATED FORMS OF RECOMBINANT HUMAN RENALASE EXPRESSED IN THE PROKARYOTIC SYSTEM

V.I. Fedchenko\*, A.A. Kaloshin, S.A. Kaloshina, A.T. Kopylov, A.E. Medvedev

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

Renalase (RNLS) is a flavoprotein; its N-terminal peptide (amino acid residues 1-17) performs various important functions. Inside cells, it is involved in the Rossmann fold formation (residues 2-35), which is necessary for the binding of the FAD cofactor and the manifestation of the enzymatic activity of RNLS as a FAD-dependent oxidoreductase (EC 1.6.3.5). When RNLS is secreted into the extracellular space, this peptide is cleaved off, and the resulting truncated extracellular RNLS can no longer bind FAD and, therefore, numerous effects described in the literature are carried out by non-catalytic mechanisms. In this work, we have investigated the sensitivity to trypsinolysis of two recombinant forms of human RNLS expressed in prokaryotic cells: (a) full-length RNLS containing the FAD cofactor; (b) a truncated RNLS lacking the 1-17 N-terminal peptide (truncatedRNLS, tRNLS) unable to bind the FAD cofactor. Trypsin (1 unit/20  $\mu$ L of medium) effectively cleaved both forms of renalase (RNLS and tRNLS). When exposed to a lower concentration of trypsin (0.1 U/20  $\mu$ L of medium), full length RNLS was more trypsin resistant than tRNLS. We suggest that the different sensitivity of RNLS and tRNLS is apparently determined by the presence of the FAD cofactor in the full-length recombinant protein, which contributes to the formation of a spatial structure that is more resistant to the action of certain proteases.

**Key words:** renalase, trypsin, proteolysis

## FUNDING

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

Received: 09.03.2022, revised: 10.04.2022, accepted: 14.04.2022