

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ МЫШИ И ОВЦЫ С ОСНОВНЫМИ ФОРМАМИ РЕНАЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА И КРЫСЫ

В.И. Федченко, А.А. Калошин, С.А. Калошина, А.Е. Медведев*Научно-исследовательский институт, биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Погодинская ул., 10; * e-mail: valfed38@yandex.ru.

Исследовали взаимодействие поликлональных антиренилазных антител овцы и мыши, полученных при иммунизации полноразмерными белками ренилазы человека (RNLS1-human) и крысы (RNLS2-rat) соответственно. Целевые рекомбинантные белки экспрессировали в клетках *E. coli* и выделяли при помощи хроматографии на Ni-агарозе. Поликлональные антитела овцы против ренилазы-1 человека более эффективно взаимодействовали с RNLS1-human, чем с RNLS2-rat. Поликлональные антитела мыши против ренилазы крысы эффективно взаимодействовали с RNLS2-rat, но не с RNLS1-human. Полученные результаты свидетельствуют о преимущественной селективности взаимодействия антител именно с белками, против которых они были получены. Это следует учитывать при выборе коммерчески доступных препаратов антител для количественной иммунодетекции целевых белков в биологических объектах.

Ключевые слова: : поликлональные антитела; ренилаза-1 человека (RNLS1-human); ренилаза-2 крысы (RNLS2-rat)**DOI:** 10.18097/BMCRM00248

ВВЕДЕНИЕ

Ренилаза (RNLS) – белок, которому свойственны различные функции внутри и снаружи клеток [1-3]. Внутриклеточная RNLS – FAD-зависимая оксидоредуктаза (КФ 1.6.3.5), катализирующая окисление изомерных форм β -NAD(P)H, восстановленных по 2 или 6 положению никотинамидного кольца вместо метаболически активного 4 положения [4]. Внеклеточная RNLS, теряющая в ходе секреции N-концевой пептид, ответственный за связывание FAD [5], оказывает различные защитные эффекты на клетку посредством взаимодействия с рецепторными белками [6-7].

Количественно уровень белка RNLS в биологических тканях/клетках обычно оценивается при помощи Вестерн-блот анализа с использованием коммерчески доступных антител (например, [8]). Их получают, иммунизируя животных при помощи синтетических пептидов, соответствующих определенным фрагментам аминокислотной последовательности (см. например, [9]). Ввиду вариабельности аминокислотных последовательностей RNLS из различных биологических источников, эффективность взаимодействия полученных антител с целевыми белками может существенно отличаться.

В данной работе мы исследовали взаимодействие поликлональных антиренилазных антител овцы и мыши, полученных при иммунизации полноразмерными белками ренилазы человека (RNLS1-human) и крысы (RNLS2-rat) соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что мышиные антитела против полноразмерной RNLS2-rat взаимодействуют более избирательно с этой формой ренилазы крысы, чем антиренилазные антитела овцы, взаимодействующие с исследованными препаратами ренилазы человека и крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

Поликлональные антитела овцы против полноразмерной рекомбинантной RNLS1 человека (RNLS1-human) были получены и очищены в «Покард» (Россия). Моноклональные антитела против кроличьего/овечьего IgG и кроличьего/мышинного IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена, произведены «ИМТЕК» (Россия). Набор белковых маркеров для калибровки молекулярной массы приобретены у «Amersham» (Великобритания). Остальные химические реактивы, если не оговорено особо, были получены от «Sigma-Aldrich» (США).

Рекомбинантные белки

Получение рекомбинантных белков приведено в наших предыдущих публикациях [10-13]. Обе ренилазы (RNLS1-human и RNLS2-rat) были экспрессированы в клетках *E. coli* в виде белков, содержащих C-концевую гексагистидиновую метку, с помощью которой в результате хроматографической очистки на Ni-сефарозе, были получены высокоочищенные препараты рекомбинантных белков с электрофоретической чистотой около 90-95%.

Получение поликлональных антител мыши против крысиной рекомбинантной ренилазы крысы (RNLS2-rat)

Для получения поликлональных антител к рекомбинантной RNLS2-rat проводили трехкратную внутрибрюшинную иммунизацию мышей, используя в качестве адьюванта гель гидроксида алюминия. Препарат



рекомбинантной RNLS2-rat, предназначенный для иммунизации, предварительно сорбировали на адьюванте, для чего его разводили в физиологическом растворе натрия хлорида до конечной концентрации 100 мкг/мл с добавлением 100 мкг геля гидроксида алюминия. Сорбцию осуществляли в течение 14 ч при 4-7°C. Для иммунизации использовали восемь самок белых беспородных мышей весом 16-18 г, которым вводили препарат в объеме 0,5 мл. Одна иммунизирующая доза содержала 50 мкг RNLS2-rat и 50 мкг адьюванта гидроксида алюминия. Интервал между первой и второй иммунизациями составлял две недели, а между второй и третьей – четыре недели. В качестве контроля использовали не иммунизированное животное той же партии, что и опытные мыши.

Через две недели после третьей иммунизации из шейной вены мышей отбирали кровь, из которой получали сыворотку, использованную в дальнейших экспериментах.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ)

Электрофорез белков проводили в 12% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS, sodium dodecyl sulfate) по методу Laemmli [14].

Вестерн блот анализ

Иммуноблоттинг проводили по методу Gallagher и соавт. [15] с небольшими модификациями, описанными ранее [16], с использованием препаратов поликлональных антител овцы против RNLS1-human и мыши против RNLS2-rat. В качестве вторичных антител использовали моноклональные антитела против кроличьих/овечьих IgG и кроличьих/мышинных IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена («ИМТЕК»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

RNLS1-human – основная (если не единственная) форма реналазы, обнаруженная в ряде органов человека как на уровне мРНК, так и белка [1-3]. Количественное определение белка RNLS1 предусматривает использование антиреналазных антител, которые дают далеко не всегда сопоставимые в разных лабораториях результаты [16].

Для основного транскрипционного варианта реналазы крысы (RNLS2-rat) известны данные об изменении уровня мРНК в тканях крыс со спонтанной гипертензией, по сравнению с нормотензивными животными [17], которые до сих пор не подтверждены на уровне белка.

По данным электрофореза в 12% ПААГ в присутствии SDS, очищенные рекомбинантные RNLS1-human и RNLS2-rat представлены белками, молекулярные массы которых соответствуют расчетным 37,85 кДа и 34,95 кДа соответственно (рис. 1А).

Вестерн блот анализ показал, что поликлональные антитела овцы против реналазы-1 человека взаимодействовали как с RNLS1-human, так и с RNLS2-rat; однако взаимодействие с рекомбинантным белком человека было более выраженным (рис. 1В). Иная картина обнаружена в ходе Вестерн блот анализа с поликлональными антителами мыши против RNLS2-rat, которые фактически не детектировали рекомбинантный белок человека (рис. 1С).

Аминокислотные последовательности этих белков, по данным программы Blast [18], характеризуются

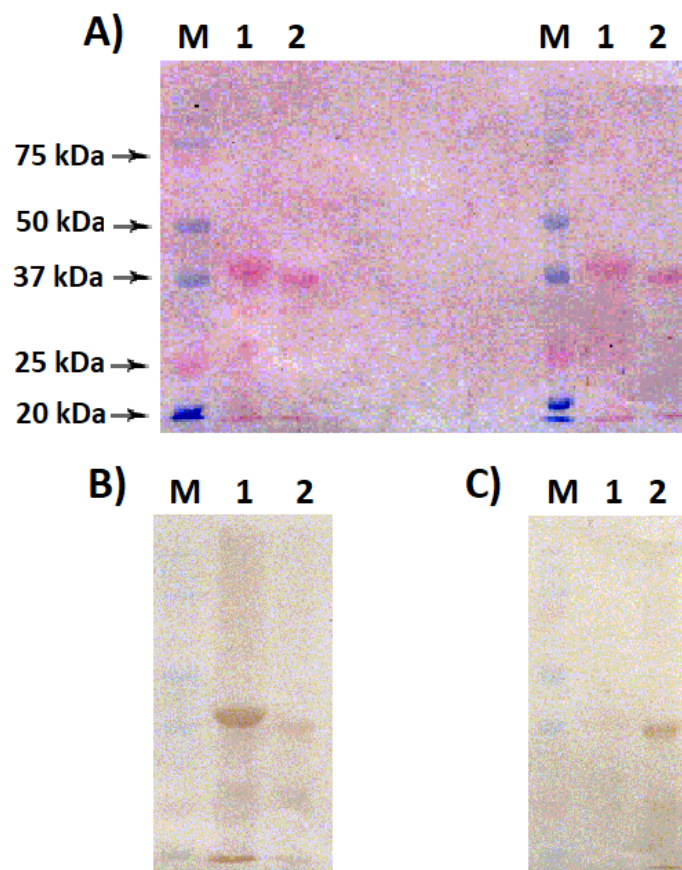


Рисунок 1. А - электрофорез в 12 % SDS- ПААГ рекомбинантных белков RNLS1-human и RNLS2-rat после переноса на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивания Понсо S. 1) – RNLS1-human. 2) – RNLS2-rat. М) – маркер молекулярной массы белка 75 кДа, 50 кДа, 37 кДа, 25 кДа, и 20 кДа. В – Вестерн блот анализ взаимодействия поликлональных антител против RNLS1-human с RNLS1-human и RNLS2-rat. С – Вестерн блот анализ взаимодействия поликлональных антител против RNLS2-rat с RNLS1-human и RNLS2-rat.

значительным сходством (рис. 2), которого, тем не менее, оказывается недостаточным для одинаково эффективного взаимодействия с использованными в данной работе антителами. Возможно, выявленные различия могут быть связаны с видовой специфичностью самих антител, а также различий, определяемых «несовпадающих» аминокислотных остатков исследуемых белков (RNLS1-human и RNLS2-rat). Это следует учитывать в контексте количественного определения RNLS1-human и RNLS2-rat в биологических образцах, основанного на использовании антител.

В более широком плане, выявленные различия результатов Вестерн блот анализа свидетельствуют о необходимости более тщательного выбора препаратов антител для количественной иммунодетекции целевых белков в биологических объектах.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей; иммунизацию мышей препаратами реналазы крысы осуществляли с соблюдением всех общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным.

RNLS1-human	MAQVLIVGAGMTGSLCAALLRRQTSGLYLAVDKAEDESGGRMTTACSPHNPQCTADLGA	60
	<i>M +VL+VGAG+TGSLCAALLR++ + PLYLA+WDKA D GGRMTTA SPHNP+CTADLGA</i>	
RNLS2-rat	MFRVLVVGAGLTGSLCAALLRKEITAPLYLALWDKAGDIGGRMTTANSPHNPCTADLGA	60
RNLS1-human	QYITCTPHYAKKHQRFYDELLAYGVLRLSSPIEGMVMKEGDCNFVAPQGISSIIKHLYLK	120
	<i>QYITCTPHYAKKHQ FY+ELLA+G+L PL+SPI+GM +KEG+ NFVAP G+SSIIK+YLK</i>	
RNLS2-rat	QYITCTPHYAKKHQNFYEELLAHGILEPLTSPIKGMEVKEGESNFVAPHGVSIIKYYLK	120
RNLS1-human	ESGAEVYFRHRVTQINLRDDKWEVSKQTGSPEQFDLIVLTMFVPEILQLQGDITTLISEC	180
	<i>ESGAEV+ R VTQINLRD+KWEVS+ TGS +QFDL++LTMP P+IL LQGDI LISE</i>	
RNLS2-rat	ESGAEVFLRQCVTQINLRDNKWEVSEDTGSTQQFDLVILTMAPQILGLQGDIVNLISER	180
RNLS1-human	QRQQLEAVSYSSRYALGLFYEAGTKIDVPWAGQYITSNPCIRFV SIDNKKRNIESSEIGP	240
	<i>QRQQLE +VSYSSRYALGLFYEAG KIDVPWAGQYITSNPCIRF+SID+KKRN ESSE GP</i>	
RNLS2-rat	QRQQLASVSYSSRYALGLFYEAGMKIDVPWAGQYITSNPCIRFISIDSKKRNTESSECGP	240
RNLS1-human	SLVIHTTVPFVGVTYLHESIEDVQELVFQOLENLPGLPQPIATKCKQKWRHSQVTNAAAANC	300
	<i>LV+HTTVPFVGV+LEHS EDVQEL+ QOLE ILPGLP P+ATKC KWR+SQVTN+AAAN</i>	
RNLS2-rat	LLVVHTTVPFVGVTHLHSEEDVQELITQOLETILPGLPPPVA TKCWKWRYSQVTNSAANS	300
RNLS1-human	PGQMTLHHKPFL	312
	<i>PGQMTLH PFL</i>	
RNLS2-rat	PGQMTLHLNPFL	312

Рисунок 2. Blast-анализ аминокислотных последовательностей RNLS1-human и RNLS2-rat. RNLS1-human – аминокислотная последовательность реналазы-1 человека. RNLS2-rat – аминокислотная последовательность реналазы-2 крысы. Курсивом выделены совпадающие аминокислотные остатки RNLS1-human и RNLS2-rat, приведенные между последовательностями RNLS человека и крысы.

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

- 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
- 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
- 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
- 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 Press Res.* **41**, 593-603. DOI: 10.1159/000443460
- 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
- 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**(51), 21047–21059. DOI: 10.1074/jbc.M117.789776.
- 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
9. Retrieved 01.10.2024 from <https://www.abcam.com/en-us/products/primary-antibodies/renalase-antibody-ab31291>
10. Fedchenko, V.I., Kaloshin, A.A., Mezhevnikina, 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
11. 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
12. Fedchenko, V., Kaloshin, A., Medvedev, A. (2023). Improvement of the exon method for rapid synthesis of cDNA of the rat renalase gene. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **6**(3), e00201. DOI: 10.18097/BMCRM0020
13. Fedchenko, V., Kaloshin, A., Medvedev, A. (2024). Generation of C-terminal sequences of human renalase-1 and renalase-encoded by alternative exons. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **7**(2), e00228. DOI: 10.18097/BMCRM00228
14. 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
15. 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.
16. 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
17. Fedchenko, V., Globa, A., Buneeva, O., Medvedev, A. (2013) Renalase mRNA levels in the brain, heart, and kidneys of spontaneously hypertensive rats with moderate and high hypertension. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* **19**, 267-270. DOI: 10.12659/MSMBR.889540
18. Retrieved 01.10.2024 from <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Поступила: 04.09.2024

После доработки: 27.09.2024

Принята к публикации: 01.10.2024

INTERACTION OF MOUSE AND SHEEP POLYCLONAL ANTIBODIES WITH THE MAIN FORMS OF HUMAN AND RAT RENALASE

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

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

The interaction of sheep and mouse polyclonal antirenalase antibodies obtained by immunization with full-length human (RNLS1-human) and rat (RNLS2-rat) renalases, respectively, has been studied. The target recombinant proteins, RNLS1-human and RNLS2-rat, were expressed in *E. coli* cells and isolated by Ni-agarose chromatography. Sheep polyclonal antibodies against RNLS1-human interacted more effectively with both RNLS1-human than with RNLS2-rat. Mouse polyclonal antibodies against RNLS2-rat effectively interacted mainly with RNLS2-rat, but not with RNLS1-human. The data obtained indicate the preferential selectivity of the antibody interaction with the proteins against which they were obtained. This should be taken into consideration in the case of selection of commercially available antibody preparations for quantitative immunodetection of target proteins in biological objects.

Key words: polyclonal antibodies; human renalase-1 (RNLS1-human); rat renalase-2 (RNLS2-rat)

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) (№ 122030100170-5).

Received: 04.09.2024, revised: 27.09.2024, accepted: 01.10.2024