

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

КОНСТРУИРОВАНИЕ ХИМЕРНОГО ГЕНА РЕНАЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА
С МОДИФИЦИРОВАННЫМ N-КОНЦОМ

В.И. Федченко*, А.А. Калошин, Н.И. Козлова, А.Т. Копылов, А.Е. Медведев

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

Реналаза (RNLS) - недавно открытый белок, который выполняет различные функции внутри и снаружи клеток. Внеклеточная RNLS оказывает защитные эффекты на клетку, действуя, по данным ряда авторов, на свои рецепторные белки, внутриклеточная RNLS проявляет свойства FAD-зависимой оксидоредуктазы (КФ 1.6.3.5). Соотношение внутриклеточных и внеклеточных форм этого белка, а также механизмы и факторы, ответственные за его транспорт из клетки остаются неизвестными. Одним из подходов для изучения этих вопросов может быть создание химерных форм белка с модифицированными фрагментами его аминокислотных последовательностей. В данной работе описан метод конструирования химерного гена RNLS человека, кодирующего RNLS без N-концевого пептида.

Ключевые слова: ПЦР, клонирование, экспрессия, реналаза, сигнальная последовательность

DOI: 10.18097/BMCRM00137

ВВЕДЕНИЕ

Реналаза (RNLS) - недавно открытый белок, который выполняет различные функции внутри и снаружи клеток [1-5]. Внеклеточная RNLS оказывает защитные эффекты на клетку, действуя, по данным ряда авторов, на свои рецепторные белки [6-8]. Внутриклеточная RNLS проявляет свойства FAD-зависимой оксидоредуктазы (КФ 1.6.3.5) [5, 9], кофактор FAD [10] которой может быть "размещён" только в полном размере белке, содержащем N-концевой пептид [2, 11].

Соотношение внутриклеточных и внеклеточных форм этого белка, а также механизмы и факторы, ответственные за его транспорт из клетки, остаются неизвестными. По нашим данным, внеклеточная RNLS человека лишена N-концевого сигнального пептида [11], что свидетельствует в пользу реализации классического механизма ее транспорта во внеклеточное пространство [12].

Одним из подходов для изучения соотношения внутриклеточных и внеклеточных форм RNLS может быть создание химерных форм белка с модифицированными участками его аминокислотных последовательностей. В данной работе описан метод конструирования химерного гена RNLS человека, кодирующего химерный белок, который лишен N-концевого пептида. В основе этого метода лежит т.н. «экзонное конструирование кодирующих последовательностей» [13], которое было апробировано на экспрессии одной из изоформ RNLS человека [14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

В работе были использованы Tersus полимеразы («Евроген», Россия), эндонуклеазы рестрикции BamHI, XhoI и маркеры молекулярной массы («Fermentas», США), Ni-сефароза («GE Healthcare», Швеция), система для очистки фрагментов ДНК (Wizard® SV Gel и PCR Clean-Up) и TA-вектор (pGEM®-T easy vector), реактив

для трансфекции клеток FuGene-6 («Promega», США), прокариотический вектор pET-28a(f+) и E. coli штамм Rosetta (DE3) («Novagen», Великобритания), эукариотический вектор pcDNA4 мус-His (Invitrogen, США), PVDF-фильтры 0,45 мкм («Millipore», США), Олигонуклеотиды для ПЦР и вектор TagGFP2-N («Евроген», Россия). ДМЕМ, глутамин и антибиотики (пенициллин и стрептомицин) («ПанЭко», Россия). Поликлональные антитела овцы были получены против рекомбинантной RNLS человека и предоставлены «Покард» (Россия). Моноклональные антитела против IgG кролика барана, конъюгированные с пероксидазой хрена, были получены из ИМТЭК (Россия). Остальные химические реактивы были приобретены у «Sigma-Aldrich» (США).

Полимеразная цепная реакция ПЦР

ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси содержащей 6.7 мМ трис (pH 8.8), 1.66 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.02% Tween-20, 1 мМ MgCl₂, 0.2 мМ dNTP, 1% глицерин, по 4 мкМ каждого праймера (табл. 1), 50 – 100 нг ДНК-матрицы и 0.5 ед. Tersus-ДНК-полимеразы. Условия ПЦР: денатурация – 95°C в течение 2 мин – 1 цикл; амплификация – 92°C – 20 с, 55°C – 15 с, 72°C – от 30 с до 2-3 мин; количество циклов от 30 до 35; заключительный цикл 72°C – 3 мин. При синтезе (поли)нуклеотидных фрагментов, кодирующих сигнальный пептид и матричный пептид RNLS, время элонгации составило 60 с и 210 с соответственно.

Электрофорез

Электрофорез фрагментов ДНК проводили в 2% агарозном геле с использованием трис-боратного буфера pH 8.0 [15]. Электрофорез в 12% ПААГ проводили в системе Лэммли [16].

Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК из клеток E. coli проводили по методу Kushner [17].



Трансформация клеток

Трансформацию клеток *E. coli* BL-21 штамм (DE3) проводили, согласно протоколу, приведенному Kushner [17]; алиquotы компетентных клеток (по 0,2) мл хранили при -70°C. Трансформацию проводили по стандартному методу Cohen [18], используя 1 мкл вектора pGEM®-T Easy. Трансформированные клетки высевали на чашки с LB-агаром, содержащим 100 мкг/мл ампициллина, необходимым для селекции трансформированных клеток.

Секвенирование ДНК

Секвенирование ДНК проведено компанией «Евроген». Полученную последовательность ДНК соотносили с геном *RNLS* (NM_001031709, GeneBank), используя программу BLAST, доступную на сайте National Center for Biotechnology Information: (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=blastn&BLAST_SPEC=GlobalAln&LINK_LOC=BlastHomeLink#).

Экспрессия гена *RNLS* в прокариотической системе

Экспрессию рекомбинантного гена в прокариотической системе проводили следующим образом. Колонию клеток после трансформации, подрачивали в 4 мл LB-среды с 50 мкг/мл канамицина (Км) в течение ночи. Ночную культуру пересеивали в 200 мл этой же LB среды и наращивали культуру клеток до оптической плотности 0.5–0.7 ед. Затем вносили ИППГ (конечная концентрация 1.0 мМ) и продолжали инкубировать клетки при интенсивном перемешивании еще 3 часа. Биомассу собирали центрифугированием при 5.000 г × 4°C течение 20 мин на Avanti J-E центрифуге («Beckman Coulter», США) и хранили при -20° С.

Экспрессия гена *RNLS* в эукариотической системе

Экспрессию в эукариотической системе рекомбинантных генов (вектора pcDNA4-hRenI и pcDNA4-hRenI(-sp)) проводили в клетках HEK-293T. Клетки HEK-293T были посажены в 10-см чашки Петри в плотности 7 млн. клеток на чашку в ростовой среде DMEM, содержащей 10% FCS, 4 мМ глутамин и антибиотики пенициллин и стрептомицин (50 ед/мл и 50 мкг/мл соответственно), за 5 ч до трансфекции. Для трансфекции готовили смесь трансфекционного реагента FuGene-6 и соответствующего вектора в среде DMEM в соотношении 5 мкг вектора и 15 мкл FuGene-6 на каждую чашку. Контролем эффективности трансфекции служил вектор pTagGFP2-N. Трансфицирующую смесь инкубировали при комнатной температуре 30 мин, с последующим добавлением её в культуру клеток. После 16-часовой инкубации среду, содержащую трансфицирующий реагент и сыворотку, удаляли и заменяли на свежую среду DMEM, содержащую 4 мМ глутамин и антибиотики пенициллин и стрептомицин (50 ед/мл и 50 мкг/мл соответственно), и инкубировали еще сутки. Эффективность трансфекции в контрольной чашке оценивали под микроскопом по экспрессии флуоресцентного маркера TagGFP2, которая составила около 60% клеток. По завершению инкубации монослой

клеток механически счищали с подложки, промывали физраствором, обрабатывали ультразвуком на ледяной бане и хранили при -20° С.

Выделение рекомбинантного белка

Выделение рекомбинантного белка осуществляли методом аффинной хроматографии с использованием Ni-сефарозы в 8 М буферном растворе мочевины, как описано в наших работах [13, 14].

Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг осуществляли, согласно протоколу, приведенному в [19], используя поликлональные антитела овцы к RNLS (полученные нами ранее) и конъюгат пероксидазы хрена с антителами кролика к иммуноглобулинам овцы (ИМТЕК) [11, 12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нуклеотидную последовательность химерного гена *RNLS* человека с модифицированным N-концом (т.е. RNLS, не содержащую N-концевую сигнальную последовательность) получали на матрице ДНК вектора pET-hRenI посредством ее амплификации. Этот вектор был сконструирован нами ранее: в основе его получения лежало т.н. «экзонное конструирование кодирующих последовательностей» [13, 14]. Прямым праймером (Mat-RNLS-for) служила последовательность, которая включала сайт рестрикции BamHI (ggatcc) и Kozak последовательность (aatggaagcg). Обратными праймерами служили (Mat-RNLS-rev(+stop) Mat-RNLS-rev(-stop)), которые включали сайт рестрикции XhoI (ctcgag). Первый обратный праймер содержал стоп-кодон (tag), а у второго отсутствовал стоп-кодон (табл. 1).

Фрагмент ДНК со стоп-кодом в дальнейшем использовали при клонировании в эукариотический вектор pcDNA4 msc-His, а без стоп-кодона – для клонирования в прокариотический вектор pET-28a(f+). Согласно расчетным данным, в результате ПЦР были получены амплификаты фрагмента ДНК с расчетной массой в 1010 пар оснований (п.о.).

Полученные фрагменты ДНК после ПЦР реакции очищали с помощью системы очистки фрагментов ДНК (Wizard), согласно протоколу производителя. Очищенные таким образом ДНК фрагменты встраивали в вектор pGEM®-T Easy, который на 3'-концах содержит выступающий единичный Т-остаток, значительно усиливающий лигирование ПЦР продукта.

Трансформацию клеток *E. coli* BL-21 вектором pGEM®-T Easy со встроенным фрагментом ДНК проводили в полном соответствии с протоколами [18].

Плазмидные ДНК десяти клеточных клонов были выделены и идентифицированы рестрикционным анализом с помощью рестриктаз BamHI/XhoI.

После рестрикционного анализа клоны, содержащие фрагмент ДНК в области 1010 п.о. были подвергнуты секвенированию.

В результате секвенирования во всех исследуемых клонах были выявлены мутационные замены нуклеотидов, которые находились в третьем положении трансляционных триплетов gcC-Ala, atC-Ile и tcG-Ser (табл. 2). В связи с тем, что эти кодоны являлись вырожденными, аминокислотная

Таблица 1. Праймеры, используемые в ПЦР реакции

Праймер	Структура праймера (5' → 3')
Mat-RNLS-for	gagctc ggatcc ga aatggaagcg ctgctgaggagcgag
Mat-RNLS-rev(+stop)	tcgtg ctcgag ctaataataattcttaagctccag
Mat-RNLS-rev(-stop)	tcgtg ctcgag aatataattcttaagctccag

Примечание. В структуре праймеров сайты рестрикции BamHI, XhoI и Kozak последовательность выделены курсивом и жирным шрифтом. Остальные примечания приведены в тексте.

Таблица 2. Вырожденность триплетов для кодонов, кодирующих аминокислоты аланин (Ala), изолейцин (Ile) и серин (Ser).

№	Аминокислота	Положение остатка в аминокислотной последовательности	Исходный/модифицированный кодон	Все вырожденные кодоны аминокислоты
1	Ala	21	gct/gcc	gct, gcc, gca, gcg
2	Ile	100	att/atc	att, atc ata
3	Ser	226	tcc/tcg	agt, agc, tct, tcc, tca, tcg

1 : gag ctc gga tcc gaa atg gaa ggc ctg ctg agg agg cag acg tcc ggt ccc ttg tac ctt
 1 : gag ctc gga tcc gaa atg gaa ggc ctg ctg agg agg cag acg tcc ggt ccc ttg tac ctt
 ORF: M E A L L R R Q T S G P L Y L
 61 : gct gtg tgg gac aag gct gac gac tca ggg gga aga atg act aca gcc tgc agt cct cat
 61 : gct gtg tgg gac aag **gct** gac gac tca ggg gga aga atg act aca gcc tgc agt cct cat
 ORF: A V W D K A D D S G G R M T T A C S P H
 121: aat cct cag tgc aca gct gac ttg ggt gct cag tac atc acc tgc act cct cat tat gcc
 121: aat cct cag tgc aca gct gac ttg ggt gct cag tac atc acc tgc act cct cat tat gcc
 ORF: N P Q C T A D L G A Q Y I T C T P H Y A
 181: aaa aaa cac caa cgt ttt tat gat gaa ctg tta gcc tat ggc gtt ttg agg cct cta agc
 181: aaa aaa cac caa cgt ttt tat gat gaa ctg tta gcc tat ggc gtt ttg agg cct cta agc
 ORF: K K H Q R F Y D E L L A Y G V L R P L S
 241: tcg cct att gaa gga atg gtg atg aaa gaa gga gac tgt aac ttt gtg gca cct caa gga
 241: tcg cct att gaa gga atg gtg atg aaa gaa gga gac tgt aac ttt gtg gca cct caa gga
 ORF: S P I E G M V M K E G D C N F V A P Q G
 301: att tct tca att att aag cat tac ttg aaa gaa tca ggt gca gaa gtc tac ttc aga cat
 301: att tct tca att **atc** aag cat tac ttg aaa gaa tca ggt gca gaa gtc tac ttc aga cat
 ORF: I S S I I K H Y L K E S G A E V Y F R H
 361: cgt gtg aca cag atc aac cta aga gat gac aaa tgg gaa gta tcc aaa caa aca ggc tcc
 361: cgt gtg aca cag atc aac cta aga gat gac aaa tgg gaa gta tcc aaa caa aca ggc tcc
 ORF: R V T Q I N L R D D K W E V S K Q T G S
 421: cct gag cag ttt gat ctt att gtt ctc aca atg cca gtt cct gag att ctg cag ctt caa
 421: cct gag cag ttt gat ctt att gtt ctc aca atg cca gtt cct gag att ctg cag ctt caa
 ORF: P E Q F D L I V L T M P V P E I L Q L Q
 481: ggt gac atc acc acc tta att agt gaa tgc caa agg cag caa ctg gag gct gtg agc tac
 481: ggt gac atc acc acc tta att agt gaa tgc caa agg cag caa ctg gag gct gtg agc tac
 ORF: G D I T T L I S E C Q R Q Q L E A V S Y
 541: tcc tct cga tat gct ctg ggc ctc ttt tat gaa gct ggt acg aag att gat gtc cct tgg
 541: tcc tct cga tat gct ctg ggc ctc ttt tat gaa gct ggt acg aag att gat gtc cct tgg
 ORF: S S R Y A L G L F Y E A G T K I D V P W
 601: gct ggg cag tac atc acc agt aat ccc tgc ata cgc ttc gtc tcc att gat aat aag aag
 601: gct ggg cag tac atc acc agt aat ccc tgc ata cgc ttc gtc tcc att gat aat aag aag
 ORF: A G Q Y I T S N P C I R F V S I D N K K
 661: cgc aat ata gag tca tca gaa att ggg cct tcc ctc gtg att cac acc act gtc cca ttt
 661: cgc aat ata gag tca tca gaa att ggg cct **tcc** ctc gtg att cac acc act gtc cca ttt
 ORF: R N I E S S E I G P S L V I H T T V P F
 721: gga gtt aca tac ttg gaa cac agc att gag gat gtg caa gag tta gtc ttc cag cag ctg
 721: gga gtt aca tac ttg gaa cac agc att gag gat gtg caa gag tta gtc ttc cag cag ctg
 ORF: G V T Y L E H S I E D V Q E L V F Q Q L
 781: gaa aac att ttg cgg ggt ttg cct cag cca att gct acc aaa tgc caa aaa tgg aga cat
 781: gaa aac att ttg cgg ggt ttg cct cag cca att gct acc aaa tgc caa aaa tgg aga cat
 ORF: E N I L P G L P Q P I A T K C Q K W R H
 841: tca cag gtt aca aat gct gct gcc aac tgt cct ggc caa atg act ctg cat cac aaa cct
 841: tca cag gtt aca aat gct gct gcc aac tgt cct ggc caa atg act ctg cat cac aaa cct
 ORF: S Q V T N A A A N C P G Q M T L H H K P
 901: ttc ctt gca tgt gga ggg gat gga ttt act cag tcc aac ttt gat ggc tgc atc act tct
 901: ttc ctt gca tgt gga ggg gat gga ttt act cag tcc aac ttt gat ggc tgc atc act tct
 ORF: F L A C G G D G F T Q S N F D G C I T S
 961: gcc cta tgt gtt ctg gaa gct tta aag aat tat att tag ctc gag cac ga
 961: gcc cta tgt gtt ctg gaa gct tta aag aat tat att tag ctc gag cac ga
 ORF: A L C V L E A L K N Y I *

Рисунок 1. Сравнительная трансляция открытой рамки считывания (ORF) исходной нуклеотидной последовательности с нуклеотидной последовательностью исследуемых клонов. Верхняя нуклеотидная последовательность – последовательность из GenBank (код доступа NM_001031709). Вторая нуклеотидная последовательность - последовательность после секвенирования исследуемых клонов. Нижняя последовательность (ORF) – открытая рамка считывания RNLS (однобуквенный код). Единичные нуклеотидные замены (SNP) выделены жирным шрифтом, заглавными буквами и цветом.

последовательность кодируемого белка RNLS осталась без изменения (рис. 1). Данные мутации в гене RNLS являются следствием сконструированного нами ранее вектора pET-hRenI [14].

Затем кодирующую последовательность химерного гена RNLS человека без N-концевого пептида, не содержащую в гене стоп кодон, вставляли по сайтам рестрикции BamHI/XhoI в вектор pET-28a (+) которым трансформировали клетки *E. coli* Rosetta (DE3). В результате клонирования, рестриционного анализа и последующего секвенирования встроенного фрагмента ДНК был отобран клон, содержащий ген RNLS, названный нами pET28-hRen1(-sp), который не содержал N-концевую сигнальную нуклеотидную

последовательность в кодирующей области и его стоп кодон. Это приводило к включению векторной 6xHis последовательности, используемой при очистке белка. Экспрессию RNLS, лишенной N-концевой сигнальной последовательности, в прокариотической системе проводили на основе вектора pET28-hRen1(-sp) в клетках *E. coli* (штамм DE3 Rosetta). Трансформацию, селекцию и индукцию клеток *E. coli* проводили стандартным методом. Очистку рекомбинантного белка проводили методом хроматографии на Ni-агарозе [14].

Аналогичным образом получали эукариотический вектор, содержащий кодирующую последовательность химерного гена RNLS человека и стоп кодон. Фрагмент

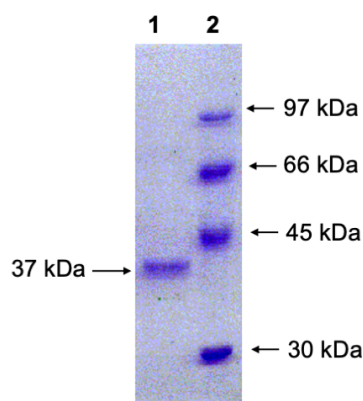


Рисунок 2. Электрофорез в 12% ПААГ химерного белка RNLS человека с модифицированным N-концом, очищенного на Ni-агарозе. Дорожка 1 – RNLS с молекулярной массой 37 кДа. Дорожка 2 – маркеры молекулярного веса: 97 кДа, 66 кДа, 45 кДа и 30 кДа.

ДНК встраивали по сайтам рестрикции BamHI/XhoI в вектор pcDNA4 мус-His которым трансформировали клетки *E. coli* Rosetta (DE3). В результате клонирования, рестриционного анализа рестриктазами BamHI/XhoI и последующего секвенирования встроенного фрагмента ДНК был отобран клон, содержащий ген *RNLS* (названный нами) pcDNA-hRen1(-sp).

Экспрессию RNLS, лишенной N-концевой сигнальной последовательности, в эукариотической системе проводили методом трансфекции генетической конструкции (вектор pcDNA-hRen1(-sp)) в эукариотических клетках HEK-293T стандартным методом [12].

Методом Вестерн блот анализа с использованием поликлональных антител к RNLS было обнаружено, что в контрольных клетках, которые были трансфицированы вектором pcDNA4 мус-His, белок реналазы не выявлялся в клеточном экстракте (рис. 3, дорожка К).

В клетках, трансфицированных вектором pcDNA-hRen1 (в котором ген *RNLS* содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид), белок RNLS в клеточном экстракте детектировался (рис. 3, дорожка 1). При экспрессии в клетках HEK-293T химерного гена *RNLS*, лишенного нуклеотидной последовательности, кодирующей N-концевой сигнальной последовательности (вектор pcDNA-hRen1(-sp)), белок RNLS также обнаруживается в клеточном экстракте (рис. 3, дорожка 2).

Масс-спектрометрический анализ клеточных экстрактов, выполненный с использованием меченого протеотипического пептида RNLS человека с аминокислотной последовательности EGDCNFAPQGSIISK, который включал стабильные изотопы углерода ^{13}C и азота ^{15}N в С-терминальном аминокислотном остатке лизина [20], также подтвердил присутствие химерного белка в трансфицированных клетках (и его отсутствие в контрольных, нетрансфицированных клетках).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выбранная нами ранее стратегия получения кодирующих последовательностей гена хорошо зарекомендовала себя при конструировании химерного гена *RNLS* человека с модифицированным N-концом.

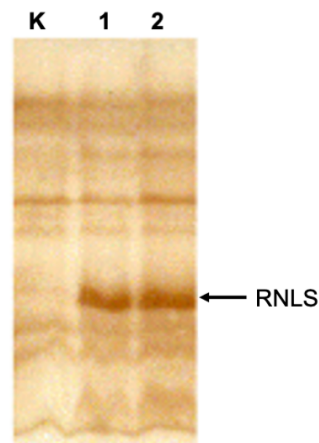


Рисунок 3. Вестерн-блот анализ внутриклеточных белков HEK-293T клеток с использованием поликлональных антител овцы к RNLS и конъюгата пероксидазы хрена с антителами кролика к иммуноглобулинам овцы. К – белки экстракта HEK-293T клеток при трансфекции вектором pcDNA4 мус-His. 1 – белки экстракта HEK-293T клеток при трансфекции вектором pcDNA-hRen1. 2 – белки экстракта HEK-293T клеток при трансфекции вектором pcDNA-hRen1(-sp).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования по клонированию гена *RNLS* и экспрессии рекомбинантного белка выполнены в рамках проекта РФФИ № 20–015–00104.

Масс-спектрометрические исследования выполнены при поддержке Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная работа не содержит каких-либо результатов исследований, проведенных с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

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) 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
- 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. *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**(1), 177–186. DOI: 10.1016/j.bbapap.2015.04.010
- 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
- Kolodczek 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
8. 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
9. Moran G.R., Hoag M.R. (2017) The enzyme: Renalase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **632**, 66–76. DOI: 10.1016/j.abb.2017.05.015
10. 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
11. Fedchenko V.I., Buneeva 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
12. 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
13. 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
14. 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**, (6), 12764–12779. DOI: 10.3390/ijms140612764
15. 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.
16. 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
17. 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.), p. 17, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
18. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2110–2114.
19. Gallagher S., Winston S.E., Fuller S.A., Hurrell J. G.R. (2011) Immunoblotting and Immunodetection. *Current Protocols in Cell Biology* **52**(1), 6.2.1–6.2.28.
20. 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-spectrometry determination of a proteotypic peptide labeled with stable isotopes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **32**(15), 1263–1270, DOI: 10.1002/rcm.8167.

Поступила: 08.09.2020

После доработки: 20.09.2020

Принята к публикации: 20.09.2020

CONSTRUCTION OF A CHIMERIC HUMAN GENE ENCODING RENALASE WITH A MODIFIED N-TERMINUS

*V.I. Fedchenko *, A.A. Kaloshin, N.I. Kozlova, A.T. Kopylov, A.E. Medvedev*

¹Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya Street, Moscow, 119121 Russia;

*e-mail: valfed38@yandex.ru

Renalase (RNLS) is a recently discovered protein that plays different roles inside and outside cells. Extracellular RNLS exhibits protective effects on the cell, acting on its receptor proteins, while intracellular RNLS acts as FAD-dependent oxidoreductase (EC 1.6.3.5). The ratio of the intracellular and extracellular forms of this protein, as well as the mechanisms and factors responsible for its transport from the cell, remain unknown. One of the approaches to studying these issues can be the creation of chimeric forms of this protein with modified fragments of its amino acid sequences. This work describes a method for constructing a chimeric human RNLS gene encoding RNLS without its N-terminal peptid.

Key words: PCR, cloning, expression, renalase, signal sequence

FUNDING

Cloning of the RNLS gene and expression of the recombinant protein was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 20-015-00104). Mass spectrometric studies were performed within the framework of the Basic Research Program of the State Academies of Sciences for 2013–2020

Received: 08.09.2020, revised: 20.09.2020, accepted: 20.09.2020