

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ И ВЫДЕЛЕНИЯ УКРОЧЕННОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ РЕНАЛАЗЫ В ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

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

Реналаза (RNLS) – флавопротеин, N-концевой пептид которого (1-17 аминокислотных остатка (а.о.)) выполняет несколько важных функций. В клетках он участвует в формировании так называемой укладки Россмана (2-35 а.о.), необходимой для «размещения» кофактора FAD и выполнения каталитических функций 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 не может связывать FAD и поэтому выполняет различные некаталитические функции. В данной работе мы осуществили экспрессию генетической конструкции, кодирующей лишённую N-концевого сигнального пептида RNLS (tRNLS), в клетках *E. coli* Rosetta (DE3). Как и в случае полноразмерной RNLS, рекомбинантная tRNLS накапливается в тельцах включения в нерастворимой форме, которая может быть переведена в растворимую форму в присутствии высокой концентрации мочевины или гуанидинхлорида. При этом, в отличие от полноразмерной RNLS, которая солюбилизовалась в присутствии 8 М мочевины, более эффективная солюбилизация tRNLS была достигнута в присутствии 6 М гуанидинхлорида.

Ключевые слова: реналаза; экспрессия белка; тельца включения; растворение белков; выделение

DOI: 10.18097/BMCRM00158

ВВЕДЕНИЕ

Реналаза (RNLS) – флавопротеин, N-концевой пептид которого (аминокислотные остатки (а.о.) 1-17 полипептидной цепи) выполняет несколько важных функций [1-3]. Он участвует в формировании так называемой укладки Россмана (2-35 а.о.), необходимой для «размещения» кофактора FAD в третичной структуре этого белка [3]. Такая полноразмерная RNLS функционирует как FAD-зависимая оксидоредуктаза (КФ 1.6.3.5) [4]. При секреции RNLS во внеклеточное пространство этот пептид отщепляется и образующаяся укороченная внеклеточная RNLS не может связывать FAD [3, 5] и выполняет различные некаталитические функции [6-9]. Для их изучения используют различные подходы, предусматривающие химический синтез пептидов, воспроизводящих определенные аминокислотные последовательности RNLS [10], а также создание химерного гена, кодирующего RNLS с модифицированным N-концом [11].

Используя экзоновый метод сборки кодирующих нуклеотидных последовательностей [12], были получены генетические конструкции, содержащие ген полноразмерной RNLS человека и кодирующую нуклеотидную последовательность RNLS человека, лишённую N-концевого сигнального пептида (tRNLS) [11], а также осуществлена экспрессия полноразмерной RNLS в бактериальных [12] и эукариотических клетках [5]. В данной работе мы осуществили экспрессию генетической конструкции, кодирующей tRNLS с C-концевой гексагистидиновой последовательностью, в бактериальных клетках *E. coli* Rosetta (DE3). Как и в случае полноразмерной RNLS, рекомбинантная tRNLS накапливается в тельцах включения в нерастворимой форме, которая может быть переведена в

растворимую форму в присутствии высокой концентрации мочевины или гуанидинхлорида. Однако в отличие от полноразмерной RNLS, которая солюбилизовалась в присутствии 8 М мочевины, более эффективная солюбилизация tRNLS была достигнута в присутствии 6 М гуанидинхлорида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

В работе были использованы следующие реагенты: канамицин сульфат, додецилсульфат натрия (SDS) («Serva», Германия); изопропил-β-D-тиогактопиранозид (ИПТТ) («ThermoScientific», США); гуанидинхлорид (GdnHCl) и мочевины («Amresco», США); Ni-Sepharose («GE Healthcare», Швеция); мочевины («Amresco», США); Остальные химические реактивы были приобретены у «Sigma» (США). Клетки *E. coli* штамм Rosetta (DE3) были приобретены у «Novagen» (Великобритания).

Электрофорез

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

Трансформация клеток *E. coli* штамм Rosetta (DE3) плазмидными векторами

Плазмидными векторами pET-hRen и pET-hRen(-sp), полученные нами ранее [12], трансформировали клетки *E. coli* штамм Rosetta (DE3) согласно протоколу [14, 15], используя



1 мкл вектора. Трансформированные клетки высевали на чашки с LB-агаром, содержащим канамицин (50 мкг/мл), необходимый для селекции трансформированных клеток. После ночи инкубации при 37°C отдельные колонии инокулировали в 4 мл LB-среды, содержащей 50 мкг/мл канамицина и инкубировали в течение ночи при 37°C.

Наработка биомассы клеток E. coli, содержащих рекомбинантный белок RNLS

Затравочную культуру клеток *E. coli* штамм Rosetta (DE3) использовали для инокуляции 50 мл LB-среды, содержащей канамицин (50 мкг/мл). Затравочную культуру выращивали 12 ч в термостатированном шейкере Ecotron («Infors», Швейцария) при частоте вращения 180 об/мин и температуре 37°C. Для наработки биомассы культуру клеток *E. coli* штамм Rosetta (DE3) высевали в 5 л колбу, содержащую 1 л LB-среды с канамицином (50 мкг/мл), и продолжали культивирование в прежних условиях до достижения значений оптической плотности при длине волны 600 нм (OD_{600}) 0.6 ед. (1.5-2 ч). Затем вносили ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и продолжали культивирование в прежних условиях, примерно 3.5 ч. Полученную биомассу (примерно 1.5 г) осаждали в центрифуге Avanti J-E с ротором JA-14 («BeckmanCoulter», США) 10 мин при скорости 4000 об/мин и температуре 4°C. При необходимости биомассу хранили при -20°C. Присутствие целевого продукта оценивали в лизате целых клеток с помощью 12% SDS-PAGE и визуализации с помощью окрашивания Кумасси R-250.

Получение тельца включения (ТВ)

Осадок бактериальной биомассы (1.5 г), содержащий рекомбинантный белок, ресуспендировали в литическом буфере (фосфатно-солевой буфер: 5 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол). Суспензию подвергали ультразвуковой дезинтеграции на приборе 130-Watt Ultrasonic Processor («Cole-Parmer», США) при 130 Вт и кГц трижды по 30 с с интервалом 90 с во льду. Затем проводили осаждение в центрифуге AvantiJ-Ec ротором JA-20 («Beckman Coulter») 20 мин при 10000 об/мин и температуре 4°C. Супернатант удаляли, полученный осадок растворяли в буфере для ферментативной обработки (10 мМ NaCl, 6 мМ MgCl₂, 10 мМ CaCl₂, 40 мМ Tris-HCl, pH 8.0), а затем добавляли 6 мкл РНКазы-А (10 мг/л) и 15 мкл ДНКазы-І (10 мг/мл). Суспензию инкубировали 15 мин при температуре 37°C. Повторную обработку суспензии ультразвуком и ее последующее центрифугирование проводили как описано выше. Супернатант удаляли, а полученный осадок ресуспендировали в промывочном буфере (фосфатно-солевой буфер: 5 мМ ЭДТА, 20% сахароза, 1% Triton X-100) и инкубировали 10 мин при температуре 4°C, а затем центрифугировали, как описано выше. Супернатант удаляли и собирали осадок, содержащий ТВ. Для 1.5 г биомассы, полученной из 1 л культуральной среды, использовали по 30 мл всех растворов. При необходимости осадок ТВ хранили при -20°C.

Выделение рекомбинантного RNLS

Для выделения рекомбинантного белка ТВ солибилизировали при помощи буфера А, содержащего

8 М мочевины, 0.1 М NaH₂PO₄, 0.01 М Tris-HCl, pH 8.0. или буфера В, содержащего 6 М GdnHCl, 0.1 М NaH₂PO₄, 0.01 М Tris-HCl, pH 8.0. Препараты ТВ, полученные из 1 л культуральной среды, обрабатывали 100 мл соответствующего буфера.

Солюбилизацию рекомбинантного белка из ТВ осуществляли в течение суток при комнатной температуре при 120-160 об/мин, используя шейкер Ecotron. Нерастворившиеся компоненты ТВ удаляли центрифугированием (центрифуга AvantiJ-Ec ротором JA-20 («Beckman Coulter») при 10000 об/мин и комнатной температуре дважды по 30 мин. К осветленному раствору, полученному после центрифугирования, добавляли 2 мл суспензии Ni-сефарозы. Смесь инкубировали 1 ч при комнатной температуре в шейкере Ecotron при частоте вращения 40 об/мин. После этого раствор переносили в колонку для хроматографии и проводили хроматографию с использованием системы BiologicLP («Bio-Rad», Германия). Перед хроматографированием колонку промывали 200 мл буфера С, содержащего 8 М мочевины, 0.1 М NaH₂PO₄, 0.01 М Tris-HCl, pH 6.3, а затем 50 мл буфером D, содержащим 8 М мочевины, 0.1 М NaH₂PO₄, 0.01 М Tris-HCl, pH 5.9.

Рекомбинантный белок с колонки элюировали буфером E, содержащим 8 М мочевины 0.1 М NaH₂PO₄, 0.01 М Tris-HCl, pH 4.5. Белок собирали при пиковом значении хроматограммы. Рефолдинг собранного рекомбинантного белка осуществляли с помощью ступенчатого диализа против нескольких перемен этого же буферного раствора с понижением концентрации мочевины от 8 М до 6 М, 4 М, 2 М и 1 М, а затем в буфере без мочевины (50 мМ Tris-HCl, pH 9.0). Диализ проводили при температуре 4°C.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически (Genesys 6, «ThermoScientific», США) при длине волны 280 нм. При расчете концентрации рекомбинантных белков использовали коэффициент экстинкции 0.98, который был рассчитан в программе OMIGA.

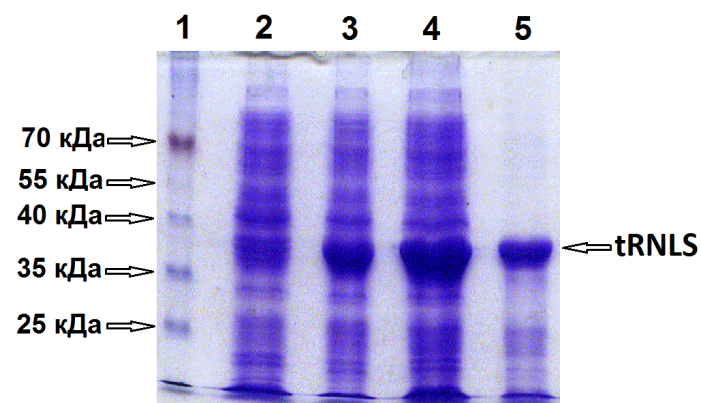


Рисунок 1. Анализ белковых продуктов, полученных в результате экспрессии в клетках *E. coli* штамма Rosetta (DE3) вектора pET-hRen(-sp). Дорожки: 1 – белковый маркер молекулярных весов (стрелками отмечены фрагменты маркера размером 70 кДа, 55 кДа, 45 кДа, 35 кДа и 25 кДа); 2 – белки продуцента, полученные при выращивании биомассы без индукции ИПТГ; 3 – белки продуцента при индуцировании ИПТГ; 4 – тельца включения, содержащие рекомбинантный белок tRNLS; 5 – хроматографически очищенный рекомбинантный белок укороченной tRNLS.

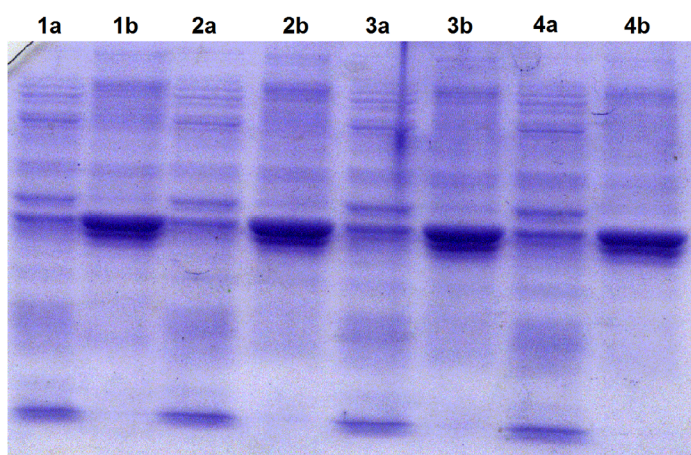


Рисунок 2. Анализ растворимости рекомбинантной укороченной RNLS (tRNLS) в ТВ в буфере, содержащем 8 М мочевины. а – супернатант после центрифугирования ТВ; б – осадок после центрифугирования ТВ. Дорожки: 1 – инкубация в течение 15 мин; 2 – инкубация в течение 30 мин; 3 – инкубация в течение 1 ч; 4 – инкубация в течение 12 ч.

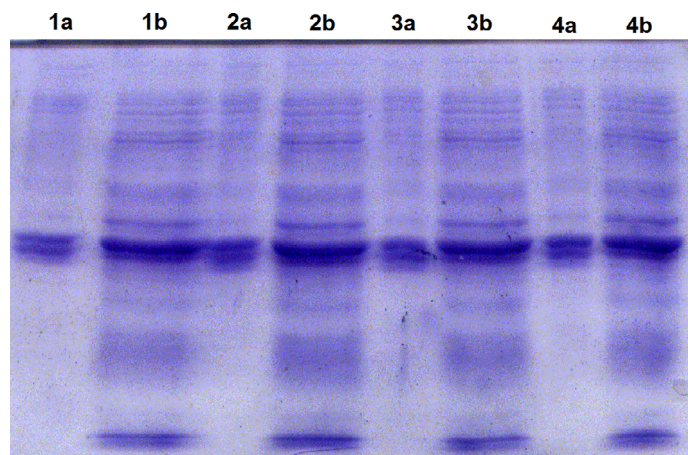


Рисунок 3. Анализ растворимости рекомбинантной укороченной RNLS (tRNLS) в ТВ в буфере, содержащем 6 М GdnHCl. а – супернатант после центрифугирования ТВ; б – осадок после центрифугирования ТВ. Дорожки: 1 – инкубация в течение 15 мин; 2 – инкубация в течение 30 мин; 3 – инкубация в течение 1 ч; 4 – инкубация в течение 12 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения свойств полноразмерной RNLS и RNLS, лишенной N-концевого сигнального пептида (tRNLS), нами были сконструированы вектора для их экспрессии в бактериальной системе [11, 12, 16].

Обычно при экспрессии рекомбинантных белков в клетках *E. coli* белки нарабатываются в избыточном количестве и образуют нерастворимые агрегаты, известные как ТВ [17, 18]. Ранее в клетках *E. coli* штамм *Rosetta* (DE3) нами был экспрессирован полноразмерный белок RNLS, целевой продукт которой также накапливался именно в виде ТВ [12, 19]. При разрушении клеток ТВ легко можно отделить от других компонентов клеток. Однако дезагрегация ТВ без необратимой денатурации белка является трудоемкой задачей. Поскольку ТВ содержат относительно чистые и интактные рекомбинантные белки, существует несколько подходов очистки рекомбинантных белков. Обычно рекомбинантные белки образуют агрегированные формы, поэтому они денатурируются и растворяются при высокой концентрации денатурирующих агентов, таких как мочевина, GdnHCl или ионные детергенты, такие как N-лауроилсаркозин или SDS. Эти химические реагенты применяют для уменьшения нековалентных взаимодействий между молекулами белка. Кроме того, добавляют дитиотреитол или 2-меркаптоэтанол для уменьшения образования нежелательных наружных или внутримолекулярных дисульфидных связей.

Рефолдинг денатурированных белков (перевод развернутой формы белка в активные белки) происходит за счет удаления денатуранта. Эффективность рефолдинга оценивают по биологической активности данного белка, например, по его ферментативной активности. Процедура удаления денатуранта из денатурированных белков является ключевым этапом для эффективного восстановления активности белка. Используют различные подходы к переводу неактивных белков в активные, такие как хроматографические или нехроматографические стратегии [20-22]. Для рефолдинга tRNLS мы воспользовались методом ступенчатого диализа. При диализе химически денатурированный белок повторно

укладывается в свою нативную третичную структуру. Уменьшение концентрации денатурирующего агента приводит к постепенной укладке третичной структуры белка. Ступенчатый диализ способствует медленному уменьшению концентрации денатурирующего агента и, в конечном итоге, приводит к хорошему выходу рефолдинга, т.е. не приводит к неправильной укладке и агрегации белков из-за уменьшения контакта между открытыми гидрофобными поверхностями [23, 24].

Ранее препаративные количества полноразмерной рекомбинантной RNLS были получены из ТВ, которые солибилизировали в течение ночи при помощи буферного раствора, содержащего 8 М мочевины, с последующей хроматографией на Ni-Sepharose [12]. При экспрессии белка tRNLS (лишенной N-концевой сигнальной последовательности) в клетках *E. coli* штамма *Rosetta* (DE3) (вектор pET-hRen(-sp)) также успешно происходило формирование ТВ, в которых накапливался целевой белок (рис. 1, дорожки 3 и 4).

Однако при использовании буфера, содержащего 8 М мочевины (буфер А) рекомбинантный белок укороченной RNLS (tRNLS) не переводился из ТВ в растворимую форму (рис. 2). Перевод tRNLS из ТВ в растворимую форму достигался при использовании 6 М GdnHCl (рис. 3). Для определения растворимости tRNLS в ТВ исследовали растворение белка в 8 М буферном растворе мочевины (буфер А) и в 6 М буферном растворе GdnHCl (буфер В). Аликвоты ТВ, содержащие буферы А и В, инкубировали 15 мин, 30 мин, 1 ч и 12 ч в термостатированном шейкере Ecotron при 180 об/мин и температуре 37°C. После инкубации каждый препарат центрифугировали и отделяли супернатант и осадок. Полученные осадки растворяли в буфере А, объем которого был равен супернатантам и анализировали при помощи SDS-PAGE. Оказалось, что инкубация ТВ в присутствии 8 М мочевины не приводила к растворению целевого рекомбинантного продукта даже после 12-часовой инкубации. Практически весь рекомбинантный белок tRNLS оставался в осадке (рис. 2). В то же время использование 6 М GdnHCl способствовало растворению значительной части рекомбинантного белка уже в течение 15 мин (рис. 3,

дорожки 1a и 1b), а в течение 12 ч происходило растворение большей его части (рис.3, дорожки 4a и 4b).

Для полного перевода RNLS в растворимую форму инкубацию в буфере В осуществляли в течение суток в шейкере Escotron при частоте вращения 120-160 об/мин при комнатной температуре. Растворимую форму tRNLS осветляли дважды центрифугированием и добавляли суспензию Ni-Sepharose. Полученный раствор переносили в колонку для хроматографии и проводили хроматографию. С колонки рекомбинантный белок элюировали при pH 4.5 буфером E, содержащим 8 М мочевины.

Рефолдинг химерного белка tRNLS, полученного после хроматографии, осуществляли при помощи ступенчатого диализа с постепенным понижением концентрации мочевины до 6 М, затем до 4 М, потом до 2 М и до 1 М мочевины при pH 9.0. На последнем этапе диализ проводили в растворе (50 мМ Tris-HCl, pH 9.0), не содержащем мочевины (см. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ). Следует отметить, что при концентрировании рекомбинантного белка из разбавленных растворов, в которых проводится рефолдинг, белок часто вновь выпадает в осадок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспрессия рекомбинантных RNLS в клетках *E. Coli* Rosetta (DE3) приводит к накоплению целевого продукта в ТВ в нерастворимой форме, перевод которого в растворимую форму для последующей хроматографической очистки на Ni-Sepharose может быть достигнут при использовании высоких (молярных) концентраций мочевины или GdnHCl. При этом, в отличие от полноразмерной RNLS, которая солюбилизировалась в присутствии 8 М мочевины (буфер А), более эффективная солюбилизация tRNLS была достигнута в присутствии 6 М GdnHCl (буфер В). После хроматографии на Ni-Sepharose в присутствии 8 М мочевины рефолдинг как RNLS, так и tRNLS может быть достигнут при помощи диализа при pH 9.0. с постепенным понижением концентрации мочевины.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования выполнены в рамках проекта РФФИ №20-015-00104.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная работа не содержит каких-либо исследований с участием людей или с 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**, 1275-1280. DOI: 10.1172/JCI24066
- 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

- 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
- 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
- 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
- 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. *Biomed Khim.* 2015, **61**(6), 667-679. DOI: 10.18097/PBMC20156106667
- 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
- Pointer, T.C., Gorelick, F.S., Desir, G.V. (2021) Renalase: a multi-functional signaling molecule with roles in gastrointestinal disease. *Cells*, **10**(8), 2006. DOI: 10.3390/cells10082006
- 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
- 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/bmcr00137
- 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**, 12764-12779. DOI: 10.3390/ijms140612764
- 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
- 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.
- 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.
- 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
- Khomenko, V.A., Sidorin, E.V., Bakholdina, S.I., Naberezhnykh, G.A., Kim, N.Y., Stenkova, A.M., Chernysheva, N.Y., Isaeva, M.P., Solov'eva, T.F. (2019) Inclusion Bodies of Recombinant OmpF Porin from *Yersinia pseudotuberculosis*: Properties and Structural Characterization. *Biochemistry (Mosc)*, **84**(6), 672-685. DOI: 10.1134/S0006297919060105
- Park, A.R., Jang, S.W., Kim, J.S., Park, Y.G., Koo, B.S., Lee, H.C. (2018) Efficient recovery of recombinant CRM197 expressed as inclusion bodies in *E. coli*. *PLoS One*. **3**(7), e0201060. DOI: 10.1371/journal.pone.0201060
- Pandini, V., Ciriello, F., Tedeschi, G., Rossoni, G., Zanetti G., Aliverti A. (2010) Synthesis of human renalase1 in *Escherichia coli* and its purification as a FAD-containing holoprotein. *Protein Expr. Purif.*, **72**, 244-253.
- Eiberle, M.K.; Jungbauer, A. (2010) Technical refolding of proteins: Do we have freedom to operate? *Biotechnol. J.* **5**(6), 547-559. DOI: 10.1002/biot.201000001
- Gautam, S., Dubey, P., Rather, G.M., Gupta, M.N. (2012) Non-chromatographic strategies for protein refolding. *Recent Pat Biotechnol.*, **6**(1), 57-68. DOI: 10.2174/187220812799789172
- Machold, C., Schlegel, R., Buchinger, W., Jungbauer, A. (2005) Matrix assisted refolding of proteins by ion exchange chromatography. *J. Biotechnol.* **117**, 83-97. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.01.004
- Clark, E.D.B. (2001) Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**, 207-202
- Marston, F.A.O. (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **240**, 1-12.

Поступила: 02.09.2021
 После доработки: 17.09.2021
 Принята к публикации: 20.09.2021

**EXPRESSION AND ISOLATION OF N-TERMINAL TRUNCATED HUMAN RECOMBINANT RENALASE
IN PROKARYOTIC CELLS***V.I. Fedchenko*, A.A. Kaloshin, S.A. Kaloshina, A.E. Medvedev*

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

Renalase (RNLS) is a flavoprotein in which its N-terminal peptide (residues 1-17) has several important functions. In cells, it participates in the formation of the so-called Rossmann fold (residues 2-35), needed for «accommodation» of the FAD cofactor and for performing the catalytic functions of RNLS as a FAD-dependent oxidoreductase (EC 1.6.3.5). RNLS secretion into the extracellular space is accompanied by cleavage of this peptide. The resultant truncated extracellular RNLS cannot bind FAD and therefore performs various noncatalytic functions. In this work, we have performed expression of the genetic construct encoding RNLS lacking its N-terminal signal peptide (tRNLS) in *E. coli* Rosetta (DE3) cells. The recombinant protein was accumulated in inclusion bodies in an insoluble form, which could be solubilized in the presence of a high concentration of urea or guanidine chloride. In contrast to full-length RNLS, which was effectively solubilized in the presence of 8 M urea, tRNLS was preferentially solubilized in the presence of 6 M guanidine chloride.

Key words: : renalase; protein expression; inclusion bodies; protein solubilization; isolation

FUNDING

This work was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research (project number 20-015-00104).

Received: 02.09.2021, revised: 17.09.2021, accepted: 20.09.2021