

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИРЕНАЛАЗНЫХ АНТИТЕЛ С РЕКОМБИНАНТНЫМИ РЕНАЛАЗАМИ ЧЕЛОВЕКА 1 И 2 И ИХ С-КОНЦЕВЫМИ ОБЛАСТЯМИ, КОДИРУЕМЫМИ АЛЬТЕРНАТИВНЫМИ ЭКЗОНАМИ

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

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

Исследовали взаимодействие антиренилазных антител с полноразмерными рекомбинантными ренилазами человека RNLS1 и RNLS2, а также фрагментами этих белков, кодируемыми альтернативными экзонами 9 и 10 и экспрессированными в виде слитых (fusion) с дигидрофолатредуктазой (DHFR) белков в клетках *Escherichia coli*. В работе использовали созданные по нашему запросу поликлональные антитела к полноразмерной рекомбинантной RNLS1 (аминокислотные остатки (а.о.) 1–342), а также коммерчески доступные моноклональные антитела к фрагменту ренилазы (а.о. — 18–342), специфичному для изоформы RNLS1. По данным Вестерн-блот анализа, антитела взаимодействовали не только с препаратами рекомбинантных RNLS1 и RNLS2, но и со слитыми (фьюжен) белками, содержащими С-концевые последовательности, специфичные для этих изоформ (DHFR-RNLS-9ex и DHFR-RNLS-10ex). Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследованные антитела помимо своих непосредственных мишеней “узнавали” и другие белковые конструкции RNLS1 и RNLS2, отсутствующие в иммуногенах, использованных для выработки антител.

Ключевые слова: поликлональные и моноклональные антиренилазные антитела; ренилаза-1 человека (RNLS1); ренилаза-2 человека (RNLS2); С-концевые области, кодируемые альтернативными экзонами; фьюжен белки DHFR-RNLS-9ex и DHFR-RNLS-10ex

DOI: 10.18097/PBMC1608

ВВЕДЕНИЕ

Ренилаза (RNLS) — открытый в 2005 г. белок, которому свойственны различные функции внутри и снаружи клеток [1–5]. Внутриклеточная RNLS — FAD-зависимая оксидоредуктаза (КФ 1.6.3.5), ответственная за окисление изомерных форм β -NAD(P)H, восстановленных по 2 или 6 положению никотинамидного кольца (вместо метаболически активного 4 положения) [2, 5, 6]. Внеклеточная RNLS, теряющая N-концевой сигнальный пептид в процессе секреции этого белка во внеклеточное пространство, осуществляет регуляторные эффекты при помощи некаталитических (и FAD-независимых) механизмов [7–10].

Согласно представленной в GenBank информации [11], ген ренилазы локализован на 10 хромосоме в позиции GRCh38.p14 и состоит из 411796 нуклеотидов DNA (NC_000010.11). По данным автоматизированного вычислительного анализа с использованием метода прогнозирования генов BestRefSeq, возможно существование нескольких транскрипционных вариантов гена *RNLS*.

Основной транскрипционный вариант (1), кодирующий изоформу RNLS1, включает семь экзонов (нуклеотиды: 1..246, 1012..1117, 1610..1752, 10258..10416, 220594..220767, 268678..268853, 297813..299217); его мРНК, насчитывающая 2409 нуклеотидов (NM_001031709.3), кодирует белковый продукт (NP_001026879.2), состоящий

из 342 аминокислотных остатков (а.о.) с расчётной молекулярной массой 37,85 кДа (рис. 1). Эта изоформа преимущественно обнаруживается в клубочках и проксимальных канальцах, а также в кардиомиоцитах, печени и скелетных мышцах [1], и периферических нервах, жировой ткани и надпочечниках [12, 13].

Транскрипционный вариант 2, кодирующий изоформу RNLS2, также включает семь экзонов (нуклеотиды: 1..246, 1012..1117, 1610..1752, 10258..10416, 220594..220767, 268678..268853, 308287..309457); его мРНК, состоящая из 2175 нуклеотидов (NM_018363.4), кодирует белковый продукт из 315 а.о. с расчётной молекулярной массой 34,95 кДа. Транскрипционный вариант 2, кодирующий RNLS2, имеет 6 экзонов, идентичных транскрипционному варианту 1, и отличается от него последним (десятым) экзоном, кодирующим С-концевой участок этого белка (рис. 1). В скелетных мышцах человека была выявлена мРНК RNLS(2?) длиной около 2,4 тыс. нуклеотидов, соответствующая по длине транскрипционному варианту 2 [1]. С помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР) в надпочечниках человека, в левом желудочке и гипоталамусе также были обнаружены несколько специфичных транскриптов изоформы RNLS2 [12, 13]. Однако за исключением рекомбинантной RNLS2 человека, экспрессированной в клетках *Escherichia coli* [13, 14], о белковом продукте RNLS2 практически ничего не известно.



ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИТЕЛ С ФРАГМЕНТАМИ РЕНАЛАЗ 1 И 2

Экзоны	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Число нуклеотидов в экзоне	782	106	143	159	174	285	176	90	1405	1169
Изоформа RNLS1 342 а.о.	253 39	106 36	143 47	159 53	174 58		176 59		1405 50	
Изоформа RNLS2 315 а.о.	253 39	106 36	143 47	159 53	174 58		176 59			1169 23

Рисунок 1. Экзонная организация гена *RNLS* (NC_000010.11). *RNLS* содержит 311794 нуклеотида и включает 10 экзонов (782, 106, 143, 159, 174, 285, 176, 90, 1405 и 1169 нуклеотидов). Изоформа *RNLS1* (NM_001031709.2) включает экзоны 1, 2, 3, 4, 5, 7 и 9, которые кодируют 342 а.о. Каждый экзон кодирует 39, 36, 47, 53, 58 и 50 а.о. соответственно. Изоформа *RNLS2* (NM_018363.3) включает экзоны 1, 2, 3, 4, 5, 7 и 10, которые кодируют 315 а.о. Каждый экзон кодирует 39, 36, 47, 53, 59 и 23 а.о. соответственно.

Неясно, прежде всего, в какой мере многочисленные результаты определения RNLS в биологических жидкостях и тканях человека [7, 8, 15] могут отражать изоформ-специфичные сдвиги этого белка.

Уровень белка RNLS в клетках и биологических жидкостях количественно оценивают при помощи коммерчески доступных антител, обычно моноклональных антител к RNLS человека, с использованием метода иммуоферментного анализа (ИФА) или метода Вестерн-блот анализа [7, 8, 15, 16]. Относительно недавно был предложен метод масс-спектрометрического определения RNLS с использованием протеотипического пептида, меченного стабильными изотопами; этот пептид включает 100–116 а.о., общие для основных форм этого белка [17].

Для получения (коммерчески доступных) антиренилазных антител обычно используют синтетические пептиды RNLS различной длины, реже полноразмерные рекомбинантные RNLS1, экспрессированные в клетках *E. coli*, например [18]. В связи с этим остаётся неясным, насколько полученные антитела могут быть специфичны в отношении RNLS1 и RNLS2.

Ранее нами было показано, что поликлональные антитела против полноразмерной RNLS1 практически одинаково взаимодействовали с рекомбинантной RNLS1 человека и с рекомбинантной RNLS крысы [19].

Целью данной работы было исследование взаимодействия рекомбинантных RNLS1 и RNLS2, а также С-концевых последовательностей этих белков, кодируемых альтернативными 9 и 10 экзонами и полученных в виде слитых (fusion) с дигидрофолатредуктазой белков (DHFR-RNLS-9ex и DHFR-RNLS-10ex) [20] с двумя видами антиренилазных антител.

МЕТОДИКА

Реактивы

В работе использовали антитела: (1) Pokard-RNLS-AB — поликлональные антиренилазные антитела овцы, наработанные по запросу авторов фирмой “Покард” (Россия). В качестве иммуногена была использована полноразмерная рекомбинантная RNLS1 (а.о. 1–342), содержащая на N-конце добавочную

гексагистидиновую (6xHis) метку; целевой белок был экспрессирован в клетках *E. coli* [13, 21]; (2) PAC845Hu01 — моноклональные антитела мыши (“Cloud-Clone Corp.”, США) против фрагмента рекомбинантной RNLS1 (а.о. Ala18–Ile342), экспрессированной в клетках *E. coli*. Наличие и положение (N- или С-концевое) а.о. остатка, содержащего 6xHis метку, в клонируемом иммуногене RNLS1, производитель не приводит; (3) P-RAS Iss — конъюгат антител кролика к иммуноглобулинам овцы с пероксидазой хрена и (4) P-RAM Iss — конъюгат антител кролика к иммуноглобулинам мыши с пероксидазой хрена (оба произведены “ИМТЕК”, Россия).

Набор белковых маркеров для калибровки молекулярной массы приобретен у (“Amersham”, Великобритания). Остальные реактивы были отечественного производства максимальной доступной чистоты.

Выделение рекомбинантных белков RNLS1, RNLS2, DHFR-RNLS-9ex и DHFR-RNLS-10ex

Рекомбинантные белки RNLS1 и RNLS2 были экспрессированы в клетках *E. coli*, в виде белков, содержащих N-концевую гексагистидиновую (6xHis) метку [13, 21]. Молекулярная масса RNLS1 составила 38 кДа, а RNLS2 — 35 кДа. Рекомбинантные белки DHFR-RNLS-9ex и DHFR-RNLS-10ex были экспрессированы в клетках *E. coli* в виде слитых (fusion) белков, содержащих на N-конце 6xHis и дигидрофолатредуктазу (dihydrofolatereductase — DHFR). Общая молекулярная масса DHFR-RNLS-9ex составила 28,5 кДа, а DHFR-RNLS-10ex — 25,5 кДа [20]. 9 экзон RNLS1 кодирует пептид в 50 а.о., а 10 экзон RNLS2 кодирует пептид в 23 а.о. (рис. 1). Выделение и очистку рекомбинантных белков осуществляли методом аффинной хроматографии с использованием Ni-агарозы в 8 М буферном растворе мочевины, как описано нами ранее [22].

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ)

Электрофорез белков проводили в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (sodium dodecyl sulfate, SDS) по методу Laemmli [23]. На гелевую дорожку наносили исследуемый образец с общим количеством белка 8 мкг.

Вестерн-блот анализ

Вестерн-блоттинг с белковыми препаратами (RNLS1, RNLS2, DHFR-RNLS-9ex и DHFR-RNLS-10ex) проводили по методу Gallagher и соавт. с небольшими модификациями, описанными ранее [13, 24], используя в качестве антиренилазных антител Pokard-RNLS-AB и PAC845Hu01. Вторичными антителами в этих экспериментах служили P-RAS Iss и P-RAM Iss.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

RNLS1 — основная (если не единственная) форма ренилазы, обнаруженная в ряде органов человека как на уровне мРНК, так и белка [25, 26]. Для количественного определения белка RNLS1 используют различные антиренилазные антитела, которые дают далеко не всегда сопоставимые в разных лабораториях результаты.

В наших экспериментах для проведения сравнительного Вестерн-блот анализа взаимодействия белков RNLS1 и RNLS2, DHFR-RNLS-9ex и DHFR-RNLS-10ex были использованы поликлональные антитела Pokard-RNLS-AB и моноклональные антитела PAC845Hu01.

Иммуногеном для получения антител Pokard-RNLS-AB служила рекомбинантная полноразмерная RNLS1, содержащая на N-конце гексагистидиновую метку; целевой белок был экспрессирован в клетках *E. coli* (табл. 1).

Для получения моноклональных антител PAC845Hu01 производитель (“Cloud-Clone Corp.”) использовал полипептидный фрагмент, содержащий

а.о. Ala18–Ile342 RNLS1, который также был экспрессирован в клетках *E. coli*. При этом данные о наличии и положении добавочной N- или C-концевых а.о. последовательностей, содержащей 6xHis метку, в описании иммуногена RNLS1, использованного для получения антител, не представлены.

Для изучения взаимодействия антител с исследуемыми белками на электрофорез в 14% ПААГ в присутствии SDS на дорожку наносили образец белка с общим количеством белка 8 мкг. На геле представлены препараты рекомбинантных белков с молекулярной массой RNLS1 — 38 кДа, RNLS2 — 35 кДа, DHFR-RNLS-9ex — 28,50 кДа и DHFR-RNLS-10ex — 25,56 кДа (рис. 2А; дорожки 2, 3, 4 и 5, соответственно).

Последующий Вестерн-блот анализ взаимодействия антиренилазных антител показал, что как поликлональные антитела Pokard-RNLS-AB (рис. 2Б), так и моноклональные антитела PAC845Hu01 (рис. 2В) практически одинаково эффективно взаимодействовали со всеми исследованными препаратами белков (рис. 2Б,В; дорожки 2, 3, 4 и 5), включая рекомбинантный фьюжн-белок (DHFR-RNLS-10ex), содержащий аминокислотную последовательность фермента DHFR, слитую с C-концевым пептидом RNLS2, кодируемым альтернативным экзоном RNLS2. Другими словами, исследованные антитела помимо своих непосредственных мишеней “узнавали” и другие белковые конструкции, отсутствующие в иммуногенах, использованных для выработки антител. Причины этого явления требуют дальнейшего изучения.

Таблица 1. Препараты антител, использованные в Вестерн-блот анализе

Антитела	Иммуноген RNLS	Комментарий	Производитель
Pokard-RNLS-AB	а.о.: 1–342	Иммуноген, включающий а.о., кодируемые экзонами 1, 2, 3, 4, 5, 7 и 9 RNLS1 (рис. 1), экспрессирован в клетках <i>E. coli</i>	«Покард», Россия
PAC845Hu01	а.о.: 18–342	Иммуноген не содержит сигнальную а.о. экзона 1 и включает полностью а.о., кодируемые экзонами 2, 3, 4, 5, 7 и 9 RNLS1 (рис. 1); экспрессирован в клетках <i>E. coli</i>	«Cloud-Clone Corp.», США

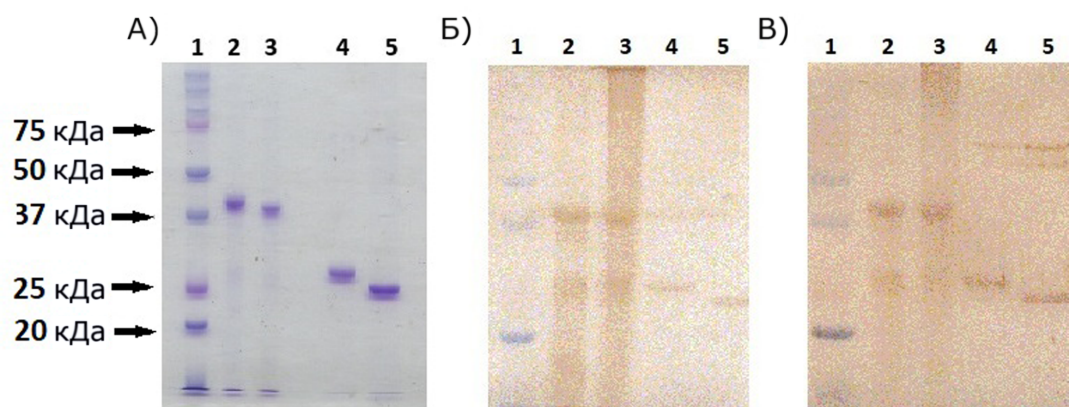


Рисунок 2. Взаимодействие антител с препаратами ренилазы: А – электрофорез белков в 14% ПААГ в присутствии SDS: 1 – маркеры белков различной молекулярной массы. Слева рисунка указана молекулярная масса белка: 75 кДа, 60 кДа, 37 кДа, 25 кДа и 20 кДа. 2 – RNLS1 с молекулярной массой 38 кДа. 3 – RNLS2 с молекулярной массой 35 кДа. 4 – DHFR-RNLS-9ex с молекулярной массой 28,50 кДа. 5 – DHFR-RNLS-10ex с молекулярной массой 25,56 кДа. Б, В – Вестерн-блот анализ взаимодействия антител Pokard-RNLS-AB и PAC845Hu01 с препаратами RNLS, обозначенными как на рисунке 2А.

Возможно, именно недостаточная специфичность препаратов антител к RNLS объясняет выраженные вариации (достигающие нескольких порядков) в уровне этого белка, определенного при помощи коммерческих наборов для ИФА в тканях и биологических жидкостях человека, известные в литературе [14, 16, 27, 28].

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья 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**(5), 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
- 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
- Kolodcic 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
- Guo X., Wang L., Velazquez H., Safirstein R., Desir G.V. (2014) Renalase: its role as a cytokine, and an update on its association with type 1 diabetes and ischemic stroke. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **23**(5), 513–518. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000044
- 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**(14), 2540–2551. DOI: 10.2174/1381612811319140005
- Serwin N.M., Wiśniewska M., Cecerska-Heryć E., Safranow S., Skwirczyńska E., Dołęgowska B. (2020) Serum-to-urine renalase ratio and renalase fractional excretion in healthy adults and chronic kidney disease patients. *BMC Nephrology*, **21**(1), 77. DOI: 10.1186/s12882-020-01737-5
- 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
- Wang F., Wang N.-S., Xing T., Cao Y., Xiang H.-Y. (2009) The cloning and expression of renalase and the preparation of its monoclonal antibody. *J. Shanghai Jiaotong Univ. (Sci.)*, **14**(3), 376–379. DOI: 10.1007/s12204-009-0376-9
- Федченко В.И., Калошин А.А., Веселовский А.В., Медведев А.Е. (2022) Конструирование и экспрессия химерного гена реналазы человека, кодирующего N-концевую сигнальную последовательность секреторного белка пролактина. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **5**(2), e00175. [Fedchenko V.I., Kaloshin A.A., Veselovsky A.V., Medvedev A.E. (2022) Construction and expression of the chimeric human renalase gene encoding the N-terminal signal sequence of the secretory protein prolactin. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **5**(2), e00175.] DOI: 10.18097/BMCRM00175
- National Center for Biotechnology Information. Retrieved July 11, 2025 from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=55328
- Hennebry S.C., Eikelis N., Socratous F., Desir G., Lambert G., Schlaich M. (2010) Renalase, a novel soluble FAD-dependent protein, is synthesized in the brain and peripheral nerves. *Mol. Psychiatry*, **15**(3), 234–236. DOI: 10.1038/mp.2009.74
- 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), 12764–1279. DOI: 10.3390/ijms140612764
- 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
- Serban-Feier L.F., Cuiban E., Gogosoiu E.B., Stepan E., Radulescu D. (2024) Renalase potential as a marker and therapeutic target in chronic kidney disease. *Biomedicines*, **12**(8), 1715. DOI: 10.3390/biomedicines12081715
- Lee I.-T., Sheu W.H.-H. (2018) Serum renalase levels are predicted by brain-derived neurotrophic factor and associated with cardiovascular events and mortality after percutaneous coronary intervention. *J. Clin. Med.*, **7**(11), 437. DOI: 10.3390/jcm7110437
- 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
- Thermo Fischer Scientific. Retrieved April 1, 2025 from: <https://www.thermofisher.com/antibody/primary/target/renalase/filter/antigenspecies/Human/uniprot/Q5VYX0-1?activeTab=antigens>
- Федченко В.И., Калошин А.А., Калошина С.А., Медведев А.Е. (2024) Взаимодействие поликлональных антител мыши и овцы с основными формами реналазы человека и крысы. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **7**(4), e00248. [Fedchenko V.I., Kaloshin A.A., Kaloshina S.A., Medvedev A.E. (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/BMCRM00248
20. Федченко В.И., Калошин А.А., Медведев А.Е. (2024) Получение С-концевых последовательностей реналазы-1 и реналазы-2 человека, кодируемых альтернативными экзонами. Biomedical Chemistry: Research and Methods, 7(2), e00228. [Fedchenko V.I., Kaloshin A.A., Medvedev A.E. (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/BMCRM00228
21. Федченко В.И., Калошин А.А. (2019) Упрощенный метод получения кДНК низкокопийных и молчащих эукариотических генов на примере реналазы человека. Biomedical Chemistry: Research and Methods, 2(2), e00101. [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
22. Федченко В.И., Калошин А.А., Калошина С.А., Медведев А.Е. (2021) Особенности экспрессии и выделения укороченной рекомбинантной реналазы в прокариотических клетках. Biomedical Chemistry: Research and Methods, 4(3), e00158. [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(3), e00158.] DOI: 10.18097/BMCRM00158
23. 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
24. 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
25. Северина И.С., Федченко В.И., Веселовский А.В., Медведев А.Е. (2015) История реналазы от аминоксидазы до α -NAD(P)H-оксидазы/аномеразы. Биомедицинская химия, 61(6), 667–679. [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
26. 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
27. Baek S.H., Cha R.-H., Kang S.W., Park C.W., Cha D.R., Kim S.G., Yoon S.A., Kim S., Han S.-Y., Park J.H., Chang J.H., Lim C.S., Kim Y.S., Na K.Y. (2019) Circulating renalase predicts all-cause mortality and renal outcomes in patients with advanced chronic kidney disease. Korean J. Intern. Med., 34(4), 858–866. DOI: 10.3904/kjim.2017.058
28. Knop W., Serwin N.M., Cecerska-Heryć E., Grygorcewicz B., Dołęgowska B., Gomółka A., Wiśniewska M., Ciechanowski K. (2021) Elevated levels of renalase, the β -NAD(P)H isomerase, can be used as risk factors of major adverse cardiovascular events and all-cause death in patients with chronic kidney disease. Biomolecules, 11(10), 1514. DOI: 10.3390/biom11101514

Поступила в редакцию: 15.07.2025.
После доработки: 14.08.2025.
Принята к печати: 21.08.2025.

INTERACTION OF ANTIRENALASE ANTIBODIES WITH RECOMBINANT HUMAN RENALASES 1 AND 2 AND THEIR C-TERMINAL REGIONS ENCODED BY THE ALTERNATIVE EXONES

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

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

The interaction of antirenalase antibodies with full-length recombinant human renalases RNLS1 and RNLS2, as well as fragments of these proteins encoded by alternative exons 9 and 10 and expressed as fusion proteins with dihydrofolate reductase (DHFR) in *Escherichia coli* cells has been investigated. In this study we used custom made polyclonal antibodies to the full-length recombinant RNLS1 (amino acid residues (aa) 1–342), created by our request, as well as commercially available monoclonal antibodies to the renalase fragment (aa 18–342), specific for the RNLS1 isoform. According to Western blot analysis, the antibodies interacted not only with recombinant RNLS1 and RNLS2 preparations, but also with fusion proteins containing C-terminal sequences specific for these isoforms (DHFR-RNLS-9ex and DHFR-RNLS-10ex). The results obtained indicate that the studied antibodies, in addition to their direct targets, also “recognized” other protein constructs of RNLS1 and RNLS2, which were absent in the immunogen preparations used for antibody generation.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Keywords: polyclonal and monoclonal antirenalase antibodies; human renalase-1 (RNLS1); human renalase-2 (RNLS2); C-terminal regions encoded by alternative exons, fusion proteins DHFR-RNLS-9ex and DHFR-RNLS-10ex

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. 122030100170-5).

Received: 15.07.2025; revised: 14.08.2025; accepted: 21.08.2025.