

©Федченко, Медведев

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ,  
КОДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТЫ КАТАБОЛИЗМА КАТЕХОЛАМИНОВ И РЕНАЛАЗУ,  
В ТКАНЯХ НОРМОТЕНЗИВНЫХ И ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС<sup>#</sup>**

**В.И. Федченко, А.Е. Медведев\***

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, Погодинская ул. 10; эл. почта: professor57@yandex.ru

Проведён сравнительный анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты катаболизма катехоламинов (моноаминоксидазы А и Б (МАО А и МАО Б), катехол-О-метилтрансферазу (КОМТ)) и реналазу в тканях мозга, сердца и почек крыс со спонтанной гипертензией (SHR) и контрольных нормотензивных крыс Wistar-Kyoto (WKY). Среди исследованных тканей уровень мРНК генов, кодирующих ключевые ферменты деградации катехоламинов (МАО А, МАО Б, КОМТ), был наивысшим в сердце нормотензивных крыс WKY. У крыс SHR уровень мРНК этих генов был ниже ( $p < 0,05-0,01$ ), однако сходных изменений в исследованных тканях в зависимости от уровня гипертензии отмечено не было. Относительный уровень экспрессии мРНК исследованных генов, нормированный по уровню мРНК актина, варьировал в довольно широких пределах. В сердце и почках относительный уровень мРНК КОМТ значительно превышал относительный уровень мРНК и МАО А, и МАО Б. В мозге различия в уровнях мРНК МАО А, мРНК МАО Б и мРНК КОМТ были не столь выражены. Однако во всех изученных тканях уровень мРНК реналазы был намного (в 10-20 и более раз) ниже любого из мРНК исследованных генов. С учётом известных корреляций между уровнем мРНК и соответствующего белка-продукта, выявленных для многих генов, это, очевидно, свидетельствует о том, что при реализации любого из каталитических сценариев, “написанных” в разное время для реналазы, данный белок не может вносить сколько-нибудь существенного вклада в деградацию катехоламинов. Представляется также маловероятным, что и продукты реналазной реакции –  $\beta$ -NAD(P)<sup>+</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – могут оказывать гипотензивное действие из-за низкого уровня экспрессии кодирующего реналазу гена.

**Ключевые слова:** реналаза, экспрессия гена, гены моноаминоксидаз и катехол-О-метилтрансферазы, крысы SHR и WKY

**DOI:** 10.18097/PBMC20176304312

## ВВЕДЕНИЕ

Реналаза – недавно обнаруженный белок, которому отводят важную роль в регуляции артериального давления [1-6]. Исходное предположение о том, что ранее неизвестный белок реналаза участвует в каталитической деградации циркулирующих катехоламинов, способствуя тем самым нормализации артериального давления, вызвало живой интерес в научном сообществе [2, 7-10]. Дело в том, что все известные на сегодняшний день ферменты, так или иначе вовлеченные в обмен катехоламинов [2], локализованы внутри клеток. Поэтому попавшие в кровоток катехоламины, будут беспрепятственно оказывать регуляторные (в том числе и нежелательные) воздействия на различные органы и системы организма. С учётом того, что вклад присутствующих в крови ферментов в катаболизм циркулирующих катехоламинов ничтожен [2], новый фермент (реналаза) мог бы занять важную катаболическую нишу в защите организма от избытка циркулирующих катехоламинов. Однако, дальнейшие исследования показали, что полноразмерная реналаза, существующая в клетках в виде флавопротеина, теряет N-концевой пептид в ходе секреции из клеток в межклеточное пространство [11] и в таком виде выделяется с мочой [12]. Лишённый N-концевого пептида

белок не может связывать кофактор FAD и, следовательно, осуществлять постулированное в ранних работах FAD-зависимое каталитическое окисление катехоламинов [12].

Недавно обнаружено, что полноразмерная реналаза осуществляет FAD-зависимое окислительное превращение изомеров  $\beta$ -NADH (2-дигидро-NAD и 6-дигидро-NAD), оказывающих ингибиторное действие на активность NAD-зависимых дегидрогеназ с образованием окисленной формы ( $\beta$ -NAD<sup>+</sup>) и пероксида водорода [6, 13-15]. В связи с очевидной сменой каталитической парадигмы (реналаза – оксидаза изомеров  $\beta$ -NADH, а не оксидаза катехоламинов) гипотензивный эффект реналазы может быть связан с продуктами реакции (пероксидом водорода и  $\beta$ -NAD(P)<sup>+</sup>), которые и проявляют гипотензивные свойства.

Например, пероксид водорода является эффективным средством, вызывающим расслабление аорты морской свинки, сокращение которой было предварительно стимулировано норадреналином [16]. В диапазоне концентраций от 1 мкМ до 100 мкМ пероксид водорода также вызывал дозо-зависимое расслабление брыжеечной артерии кролика, сокращение которой было предварительно стимулировано норадреналином [17]. Аналогичные

<sup>#</sup> - авторы посвящают эту работу памяти д.б.н. А.Г. Глобы, внёсшего значительный вклад в наши исследования экспрессии генов в тканях экспериментальных животных.

результаты были получены в экспериментах с фрагментами венечных артерий человека: пероксид водорода способствовал так называемой потоковой вазодилатации (flow-induced vasodilatation) [18]. Пероксид водорода оказывал модулирующее действие на индуцированный адреномиметиком фенилэфрином сократительный ответ аорты гипертензивных крыс [19]. Другой продукт, катализируемой реналазой реакции, –  $\beta$ -NAD(P)<sup>+</sup>, – при определённых условиях также может проявлять гипотензивные свойства. Например, было показано, что в дополнение к АТР и норадреналину, электрическая стимуляция сосудистых и несосудистых препаратов приводила к высвобождению соединений нуклеотидной природы, среди которых преобладал  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> [20]. Оказалось, что при раздражении нерва происходит выброс  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> с одновременным снижением высвобождения норадреналина, что может быть расценено как новый механизм контроля гладких мышц автономной нервной системой.

Насколько скоординированным может быть действие ферментов обмена катехоламинов и реналазы, оказывающей потенциальное гипотензивное действие при помощи рассмотренных выше механизмов, остается неясным. Одним из подходов, позволяющих оценить возможное функциональное взаимодействие, является сравнительный анализ экспрессии генов, кодирующих интересующие белки. Ранее мы установили существенное изменение уровня мРНК реналазы в мозге и некоторых периферических тканях крыс со спонтанной гипертензией (крысы SHR), которое зависело от тяжести гипертензии [21]. В данной работе мы провели сравнительный анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты катаболизма катехоламинов (моноаминоксидазы А и Б, катехол-О-метилтрансферазу) и реналазу в тканях мозга, сердца и почек крыс SHR и контрольных нормотензивных крыс Wistar-Kyoto (WKY).

## МЕТОДИКА

В работе использовали 12-14-ти недельных крыс-самцов WKY (n = 6, артериальное давление 120 мм рт. ст.) и SHR (n = 5, артериальное давление 140 мм рт. ст.; n = 5, артериальное давление 180 мм рт. ст.), которые были получены из Питомника лабораторных животных (филиал Института биорганической химии им. Шемякина и Овчинникова РАН, Пущино, Россия). Исследования проводили с соблюдением этических норм и правил проведения работ с лабораторными животными. После декапитации крыс под лёгким эфирным наркозом быстро удаляли мозг, сердце и почки, используя для выделения тотальной РНК кору левого и правого полушарий (5-10 мг), а также ткани левого желудочка и почек (по 5-10 мг).

Тотальную РНК выделяли с использованием стандартных наборов SV Total RNA Isolation System (“Promega”, США), следуя рекомендациям производителя.

Образцы РНК обрабатывали ДНКазой по инструкции (“Sigma-Aldrich”, США). Концентрацию РНК определяли спектрометрическим методом с использованием спектрофотометра ND-1000 (“NanoDrop Technologies, Inc.”, США).

Образцы тотальной мРНК (3-5 мкг) использовали для синтеза кДНК, который проводили при помощи набора Extension System-AMV Revertase Transcriptase Kit (“Promega”) и олиго d (T) 10 праймеров. Амплификацию генов, кодирующих моноаминоксидазу А (МАО А), моноаминоксидазу Б (МАО Б), катехол-О-метилтрансферазу (КОМТ), реналазу, а также референсного гена бета-актина проводили с использованием праймеров (“Синтол”, Россия), нуклеотидные последовательности которых приведены в таблице.

ПЦР в реальном времени (real-time PCR) проводили при следующих условиях: (1) денатурация –

Таблица. Нуклеотидные последовательности праймеров и флуоресцентных проб

Название гена и номер доступа в NCBI.	Последовательность праймеров (5'-3') и TaqMan пробы меченные флуоресцентным красителем (5'-3').	Размер ампликона (п.о.)
b-actin NM_031144	Прямой праймер: AGCCATGTACGTAGCCATCCA Обратный праймер: TCTCCGGAGTCCATCACAATG TaqMan флуоресцентно меченная проба: FAM-TGTCCCTGTATGCCTCTGGTCGTACCAC-BHQ1	81
Renalase XM_006231293	Прямой праймер: AGCGCAACACAGAGTTCATCA Обратный праймер: TGTGACTCCAAATGGGACGG TaqMan флуоресцентно меченная проба: R6G-ATGTGGCCCATTTGCTGGTGGTCCATAC-BHQ2	71
MAOA NM_033653	Прямой праймер: CAGGCCACATGTTTCGACGTA Обратный праймер: CAGACAACAGTTTGGCAGCA TaqMan флуоресцентно меченная проба: R6G-CCTGAGATGCCGCCTCCAATCACG-BHQ2	72
MAOB NM_013198	Прямой праймер: GCAGAGGTCCAGACTCAGTG Обратный праймер: CCACCACGATCACATCGCAT TaqMan флуоресцентно меченная проба: R6G-AGCAGAGGAGAGAGCCTGAAACCTG-BHQ2	87
COMT NM_012531	Прямой праймер: GTCTCCTGTTGTTGGCCCTC Обратный праймер: GCAGCACGTACTCAAACCAG TaqMan флуоресцентно меченная проба: R6G-TTGCGACACCTGGGGCTGGGGCT-BHQ2	84

95°C, 180 с, (2) отжиг – 60°C, 40 с, (3) элонгация – 72°C, 15 с. Число циклов (37 циклов) было оптимизировано для логарифмической фазы амплификации каждого гена [21].

В контрольных пробах, не содержащих ДНК (так называемых NTC, no template control), амплификации не происходило.

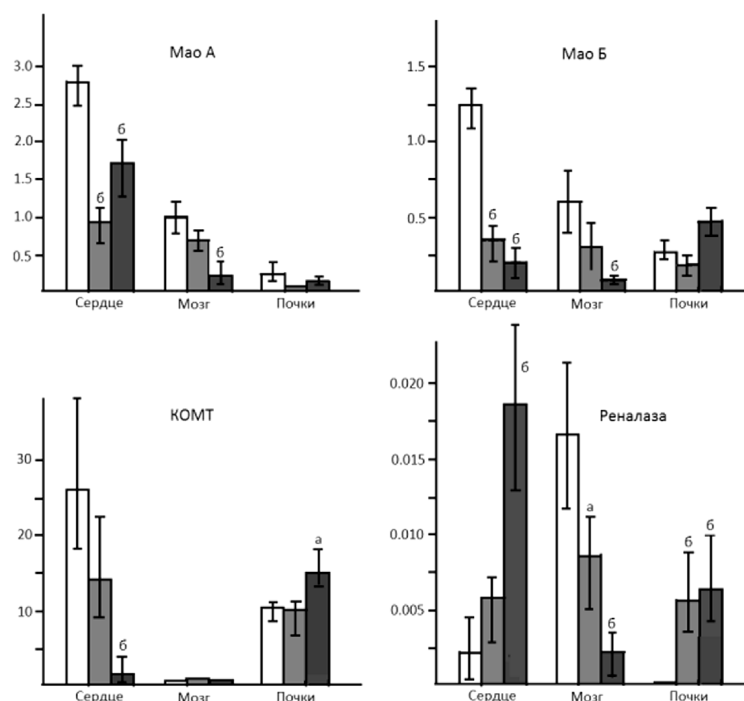
Количество копий мРНК определяли методом ПЦР в реальном времени с помощью детекции TaqMan пробы на приборе CFX96 real-time PCR detection system (“BioRad”, США), детали которого были описаны ранее [22]. Результаты нормировали по экспрессии гена “домашнего хозяйства” бета-актина и обрабатывали с использованием программы, предоставленной поставщиком прибора ПЦР в реальном времени (“BioRad”).

Статистические различия между группами оценивали по непараметрическому критерию t-Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с ранее полученными данными [21], экспрессия реналазы обнаружена в мозге, сердце и почках крыс SHR и WKY (рисунок). При этом уровень мРНК реналазы в сердце и почках увеличивался с увеличением артериального давления. В мозге была отмечена противоположная тенденция: уровень мРНК реналазы был выше у нормотензивных крыс WKY, чем у крыс SHR особенно с высоким уровнем артериального давления.

Исследование мРНК генов, кодирующих ключевые ферменты деградации катехоламинов (MAO А, MAO Б, КОМТ), показало их наивысший уровень в сердце нормотензивных крыс WKY. У крыс SHR уровень мРНК этих генов был ниже ( $p < 0,05-0,001$ ), однако сходных изменений в исследованных тканях в зависимости от уровня гипертензии отмечено не было. При этом обращает на себя внимание тот факт, что относительный уровень экспрессии мРНК исследованных генов, нормированный по уровню мРНК актина, варьировал в довольно широких пределах. В сердце и почках относительный уровень мРНК КОМТ значительно превышал относительный уровень мРНК и MAO А, и MAO Б. В мозге различия в уровнях мРНК MAO А, мРНК MAO Б и мРНК КОМТ были не столь выражены. Однако во всех изученных тканях уровень мРНК реналазы был намного (в 10-20 и более раз!) ниже любого из мРНК исследованных генов. С учётом известных корреляций между уровнем мРНК и соответствующего белка-продукта, выявленных для многих генов [23-25], это, очевидно, свидетельствует о том, что при реализации любого из каталитических сценариев, “написанных” в разное время для реналазы [1, 3-6,15], данный белок не может вносить сколько-нибудь существенного вклада в деградацию катехоламинов. Представляется также маловероятным, что и продукты реналазной реакции –  $\beta$ -NAD(P)<sup>+</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – могут оказывать значительного гипотензивного действия из-за низкого уровня экспрессии кодирующего реналазу гена.



**Рисунок.** Относительный уровень экспрессии генов MAO А, MAO Б, КОМТ и реналазы в тканях мозга, сердца и почек нормотензивных крыс (WKY) и крыс со спонтанной гипертензией (SHR): белые столбики - нормотензивные крысы, серые столбики - крысы SHR с умеренной гипертензией (артериальное давление 140 мм рт. ст.); тёмные столбики - крысы SHR с высокой гипертензией (артериальное давление 180 мм рт. ст.). Уровень экспрессии генов в тканях крыс нормировали по уровню экспрессии референсного гена бета-актина. Буквами обозначены статистически достоверные различия в экспрессии изученных генов между нормотензивными крысами и крысами со спонтанной гипертензией: а -  $p < 0,05$ , б -  $p < 0,01$ .

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг. и частично поддержана грантом РФФИ (№17-04-00484а).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Xu J., Li G., Wang P., Velazquez H., Yao X., Li Y., Wu Y., Peixoto A., Crowley S., Desir G.V. (2005) J. Clin. Invest., **115**, 1275-1280.
2. Медведев А.Е., Веселовский А.В., Федченко В.И. (2010) Биохимия, **75**, 951-958.
3. Desir G.V., Wang L., Peixoto A.J. (2012) J. Amer. Soc. Hypertens., **6**, 417-426.
4. Baroni S., Milani M., Pandini V., Pavesi G., Horner D., Aliverti A. (2013) Curr. Pharm. Des., **1**, 2540-2451.
5. Северина И.С., Федченко В.И., Веселовский А.В., Медведев А.Е. (2015) Биомед. химия, **61**, 667-679. DOI: 10.18097/PBMC20156106667.
6. Moran G.R. (2016) Biochim. Biophys. Acta, **1864**, 177-186.
7. Luft F.C. (2005) Cell Metab., **1**, 358-360.
8. Boomsma F., Tipton K.F. (2007) J. Neural Transm., **114**, 775-776.
9. Zhao Q., Fan Z., He J., Chen S., Li H., Zhang P., Wang L., Hu D., Huang J., Qiang B., Gu D. (2007) J. Mol. Med., **85**, 877-885.
10. Ghosh S.S., Krieg R.J., Sica D.A., Wang R., Fakhry I., Gehr T. (2009) Pediatr. Nephrol., **24**, 367-377.
11. Fedchenko V., Kopylov A., Kozlova N., Buneeva O., Kaloshin A., Zgoda V., Medvedev A. (2016) Kidney Blood Pressure Research, **41**, 593-603.
12. Fedchenko V.I., Buneeva O.A., Kopylov A.T., Veselovsky A.V., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2015) Int. J. Biol. Macromolecules, **78**, 347-353.
13. Hoag M.R., Roman J., Beaupre B.A., Silvaggi N.R., Moran G.R. (2015) Biochemistry, **54**, 3791-3802.
14. Beaupre B.A., Hoag M.R., Roman J., Forsterling F.H., Moran G.R. (2015) Biochemistry, **54**, 795-806.
15. Moran G.R., Hoag M.R. (2017) Arch. Biochem. Biophys., <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2017.05.015>
16. Fujimoto S., Mori M., Tsushima H. (2003) Eur. J. Pharmacol., **459**, 65-73.
17. Fujimoto S., Asano T., Sakai M., Sakura K., Takagi D., Yoshimoto N., Itoh T. (2001) Eur. J. Pharmacol., **412**, 291-300.
18. Miura H., Bosnjak J.J., Ning G., Saito T., Miura M., Gutterman D.D. (2003) Circ. Res., **92**, e31-40.
19. Sliva B.A., Permoman L., Grando M.D., Amarai J.H., Tanus-Santos J.E., Bendhack L.M. (2013) Eur. J. Pharmacol., **721**, 193-200.
20. Smyth L., Babalova J., Mondosa M., Lew C. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 48895-49903.
21. Fedchenko V., Globa A., Buneeva O., Medvedev A. (2013) Medical Science Monitor Basic Research, **19**, 267-270.
22. Fedchenko V., Globa A., Kaloshin A., Kapitsa I., Nerobkova L., Val'dman E., Buneeva O., Glover V., Medvedev A. (2008) Medical Science Monitor, **14**, BR269-BR273.
23. Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R. (1999) Mol. Cell. Biol., **19**, 1720-1730.
24. Gry M., Rimini R., Strömberg S., Asplund A., Pontén F., Uhlén M., Nilsson P. (2009) BMC Genomics, **10**, 365.
25. Edfors F., Danielsson F., Hallström B.M., Käll L., Lundberg E., Pontén F., Forsström B., Uhlén M. (2016) Mol Syst Biol., **12**, 883.

Поступила: 11. 05. 2017.  
Принята к печати: 26. 06. 2017.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF EXPRESSION OF GENES ENCODING ENZYMES OF CATECHOLAMINE CATABOLISM AND RENALASE IN TISSUES OF NORMOTENSIVE AND HYPERTENSIVE RATS

V.I. Fedchenko, A.E. Medvedev

Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: professor57@yandex.ru

Comparative analysis of expression of genes encoding enzymes of catecholamine catabolism (monoamine oxidases A and B (MAO A and MAO B) and catechol-O-methyl transferase (COMT)) and renalase has been carried out in tissues of normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats and spontaneously hypertensive rats (SHR). Among investigated tissues the highest level of mRNA of genes encoding key enzymes of catecholamine catabolism (MAO A, MAO B, COMT) was found in the heart of WKY rats. In SHR the mRNA levels of these genes were lower ( $p < 0.05-0.01$ ), however, no similar changes were observed in the tissues studied in dependence of hypertension. The relative mRNA levels of the studied genes normalized versus actin mRNA significantly varied. In heart and kidney the relative level of COMT mRNA significantly exceeded the relative levels of both MAO A mRNA and MAO B mRNA. In the brain differences in mRNAs of MAOA, MAOB, and COMT were less pronounced. However, in all examined tissue the renalase mRNA level was much (at least 10-20-fold) lower than any other mRNA studied. Taking into consideration known correlations between mRNAs and corresponding protein products reported in the literature for many genes these results suggest that in the case of any catalytic scenarios proposed or even proved for renalase this protein cannot contribute to catecholamine degradation. It is also unlikely that the products of renalase reaction,  $\beta$ -NAD(P)<sup>+</sup> and hydrogen peroxide, can exhibit a hypotensive effect due to low expression of the renalase encoding gene.

**Key words:** renalase, gene expression, genes encoding monoamine oxidases and catechol-O-methyl transferase, SHR and WKY rats