

ОБЗОРЫ

УДК 577.21; 617-089.5

©Коллектив авторов

ИСТОРИЯ РЕНАЛАЗЫ ОТ АМИНОКСИДАЗЫ ДО α -NAD(P)H-ОКСИДАЗЫ/АНОМЕРАЗЫ

*И.С. Северина, В.И. Федченко, А.В. Веселовский, А.Е. Медведев**

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

Реналаза – недавно обнаруженный белок, которому отводят важную (хотя и не очень понятную на сегодняшний день) роль в регуляции артериального давления. В данном обзоре суммированы собственные и литературные данные, накопленные со времени первой публикации (2005 г.) о структурных и возможных каталитических свойствах реналазы. Первоначальные данные о FAD-зависимой аминоксидазной активности, не были подтверждены в независимых экспериментах в других лабораториях. К тому же для предполагаемой аминоксидазной активности реналазы крови необходим флавиновый кофактор, присутствие которого у циркулирующей в крови реналазы до сих пор не было обнаружено. Более того, экскретируемая в мочу реналаза лишена N-пептида, без которого связывание FAD невозможно. Данные группы Aliverti о связывании реналазой NAD(P)H и проявлении этим ферментом диафоразной активности, стимулировало исследование реналазы как NAD(P)H-оксидазы, которая катализирует реакцию соокисления катехоламинов. Однако физиологическое значение такого рода внеклеточной катехоламин-метаболизирующей активности неясно, если принять во внимание существование гораздо более эффективных систем (таких как NAD(P)H-оксидаза нейтрофилов, ксантинооксидаза/ксантин) в системе циркуляции, способных осуществлять реакции соокисления. Недавно описана α -NAD(P)H-оксидазная/аномеразная активность этого белка, которая также способствует окислительному превращению изомеров β -NADH, оказывающих ингибиторное действие на активность внутриклеточных NAD-зависимых дегидрогеназ. Однако и её возможный вклад в антигипертензивную активность реналазы непонятен. Таким образом, не вызывающая сомнения антигипертензивная активность этого белка до сих пор остается феноменом с неясным биохимическим механизмом, а функции внутриклеточной и циркулирующей в крови реналаз, по-видимому, различаются.

Ключевые слова: реналаза, N-концевой пептид, FAD-связывающий домен, каталитические функции, антигипертензивное действие

DOI: 10.18097/PBMC20156106667

ВВЕДЕНИЕ

Минуло без малого десять лет с первого сообщения группы Desig об открытии нового секреторного белка, участвующего в регуляции артериального давления и катализирующего деградацию циркулирующих в плазме крови катехоламинов [1]. Оно вызвало живой интерес в научном сообществе [2-6]. Почему важен именно циркулирующий в крови фермент? Дело в том, что все ферменты, так или иначе вовлечённые в обмен катехоламинов [7], локализованы внутри клеток. Поэтому, очевидно, что попавшие в кровоток катехоламины, будут беспрепятственно оказывать регуляторные (в том числе и нежелательные) воздействия на различные органы и системы

организма. Потенциальный вклад присутствующих в крови ферментов в катаболизм циркулирующих катехоламинов [7] ничтожен, поэтому новый фермент мог бы занять важную катаболическую нишу в защите организма от избытка циркулирующих катехоламинов. Если молекулярно-генетические исследования (в том числе и на животных с выключенным разными способами геном реналазы) свидетельствуют о несомненной ассоциации между развитием гипертонии и нарушением экспрессии этого белка [4, 8-13], то механизмы антигипертензивного действия реналазы до сих пор не установлены. При этом обнаруженные в одной лаборатории каталитические активности, как правило, не подтверждаются в независимых исследованиях, проведённых в других лабораториях (см. ниже).

* - адресат для переписки

ИСТОРИЯ РЕНАЛАЗЫ ОТ АМИНОКСИДАЗЫ ДО α -NAD(P)Н ОКСИДАЗЫ/АНОМЕРАЗЫ

В данном обзоре суммированы собственные и литературные данные, накопленные со времени первой публикации [1] о структурных и возможных каталитических свойствах реналазы. Изменения уровня этого белка в крови и моче при различных (пато)физиологических состояниях рассмотрены в недавних работах [14-21].

1. СТРУКТУРА РЕНАЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

1.1. Структура и транскрипционные варианты гена реналазы человека

По последним данным NCBI Reference Sequence (Entrez Gene ID: 55328), ген реналазы человека (RNLS) локализован на минус цепи хромосомы 10q23.33 (NC_000010.11) и включает 309991 пар оснований (п.о.). По данным компьютерного анализа NCBI (gene prediction method), ген реналазы содержит 10 экзонов и включает два основных транскрипционных варианта реналазу-1 (Рен-1) и реналазу-2 (Рен-2), а также пять других транскрипционных форм реналазы, обозначаемых на рисунке 1 как Рен-Х1, Рен-Х2, Рен-Х3, Рен-Х4 и Рен-Х5 (рис. 1). Экзоны расположены на хромосоме в следующем порядке: первый экзон (с 309991 нуклеотида (н.) по 309210 н.) включает все сплайсинговые варианты мРНК, но содержит три стартовые точки синтеза мРНК: 30991 н. – экзон-1 = 789 п.о. (для сплайсинговых вариантов мРНК Рен-Х5 и Рен-Х3); 309462 н. – экзон-1 = 253 п.о. (для сплайсинговых вариантов мРНК Рен-1 и Рен-2)

и 309388 н. – экзон-1 = 179 п.о. (для сплайсинговых вариантов мРНК Рен-Х1, Рен-Х2 и Рен-Х4). Начальная точка инициации трансляции одна и та же, начинается с 309327 н. и содержит 118 н. первого экзона.

Группой индийских ученых в гене реналазы-1 (Рен-1) идентифицированы две основные промоторные области, локализованные на расстоянии -485 до -399 п.о. и -252 до -150 п.о. от начала экзона-1 – 309462 н. (обозначенного как +1) [22]. Поскольку у реналазы-2 (Рен-2) начальная точка инициации трансляции одна и та же, то эти промоторные области скорее всего участвуют в экспрессии мРНК Рен-2.

Второй экзон = 106 п.о. (с 308444 н. по 308339 н.) присутствует в сплайсинговых вариантах мРНК Рен-1, Рен-2, Рен-Х1, Рен-Х2 и Рен-Х4. Третий экзон = 143 п.о. (с 307846 н. по 307704 н.) присутствует в сплайсинговых вариантах мРНК Рен-1, Рен-2, Рен-Х1, Рен-Х2 и Рен-Х4. Четвёртый экзон = 159 п.о. (с 299198 н. по 299040 н.) присутствует в сплайсинговых вариантах мРНК Рен-1, Рен-2, Рен-Х1, Рен-Х2, Рен-Х4 и Рен-Х5). Пятый экзон = 174 п.о. (с 88862 н. по 88689 н.) присутствует в сплайсинговых вариантах мРНК Рен-1, Рен-2, Рен-Х1, Рен-Х2, Рен-Х4 и Рен-Х5). Шестой экзон = 285 п.о. (с 69945 н. по 69661 н.) присутствует в сплайсинговых вариантах мРНК Рен-Х4). Седьмой экзон = 176 п.о. (с 40778 н. по 40603 н.) необходим для сплайсинговых вариантов мРНК Рен-1, Рен-2, Рен-Х1, Рен-Х3 и Рен-Х5). Восьмой экзон = 90 п.о. (с 35613 н. по 35524 н.) необходим для сплайсингового варианта мРНК Рен-Х1.

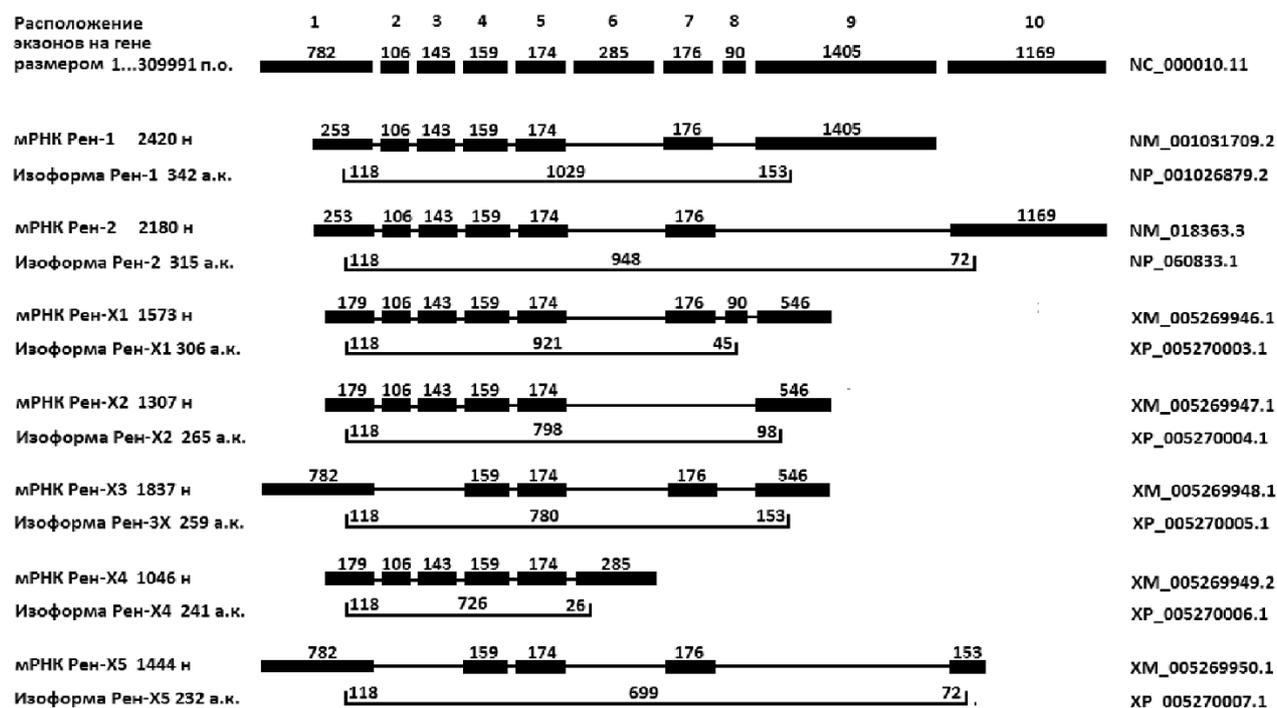


Рисунок 1. Схема экзонной организации гена реналазы человека (RNLS), по данным компьютерного анализа NCBI. На рисунке показано расположение 10 экзонов гена с указанием их длины (782, 106, 143, 159, 174, 285, 176, 90, 1409 и 1169 п.о.), а также возможные варианты сплайсинга мРНК реналазы и их белковые изоформы: два основных транскрипта реналазы (Рен-1 и Рен-2) и их белковые изоформы (342 а.к. и 315 а.к.), а также побочные сплайсинговые варианты мРНК (Рен-Х1, Рен-Х2, Рен-Х3, Рен-Х4 и Рен-Х5) и их белковые изоформы (306 а.к., 265 а.к., 259 а.к., 241 а.к. и 232 а.к., соответственно).

Девятый экзон = 1405 п.о. (с 11643 н. по 10239 н.) необходим для сплайсинговых вариантов мРНК Рен-1, Рен-Х1, Рен-Х2 и Рен-Х3). У Рен-Х1, Рен-Х2 и Рен-Х3 девятый экзон = 546 п.о. и заканчивается на 11098 н.. Десятый экзон = 1169 п.о. (с 1169 н. по 1 н.) необходим для сплайсинговых вариантов мРНК Рен-2 и Рен-Х5). У Рен-Х5 девятый экзон = 153 п.о. и заканчивается на 1017 н.. Все транскрипционные варианты реналазы имеют одну и ту же стартовую точку транскрипции 118 нуклеотид от конца первого экзона (309327 н. в гене реналазы).

Мы детально описали различные транскрипционные варианты гена реналазы человека, исходя из данных NCBI GenBank, поскольку данные по сплайсинговым вариантам транскрипции мРНК и различных изоформ реналаз у исследователей расходятся. По данным аналогичного анализа группы Desir [23], речь идёт о наличии, по крайней мере, четырёх альтернативных сплайсинговых мРНК, с наиболее высокой степенью экспрессии изоформы реналазы-1 содержащей 342 а.к. и кодируемого экзонами 1-4, 6-7 и 9. Это соотносится с данными GenBank по Рен-1, но с той лишь разницей, что меняются положение 5-го и 6-го экзона, то есть 1-5, 7 и 9 экзоны. Аналогичная ситуация связана с изоформой реналазы-2, содержащей 315 а.к. в которую входят 1-4, 6-7 и 10 экзоны (по данным [23]) и Рен-2 содержит 1-5, 7 и 10 экзоны (по данным GenBank). Если учесть, что нуклеотидная последовательность экзона-6 (по данным Desir) аналогична экзону-5 (по данным GenBank), то различий в структуре реналазы-1 и реналазы-2 нет. Существенные отличия возникают для других изоформ реналазы. Так, реналаза-3, содержит 232 а.к. и включает 1, 4, 6-7 и 9 экзоны (по данным [23]), а изоформа Рен-Х5 в 232 а.к. содержит 1, 4-5, 7 и 10 экзоны (по данным GenBank). Если учесть, что экзон-6 (по [23]) соответствует экзону-5 (GenBank), то отличие для Рен-Х5 составляет экзон-10.

Замена 5-го и 6-го экзона распространяется на все изоформы реналазы и не влияют на их структуру кроме изоформы реналазы-4, которая включает экзоны 5-9 [23]. Позднее, группа Desir [24] увеличила число альтернативных изоформ реналазы до семи, исключив изоформу реналазы-4. По их данным, изоформы реналазы (1-3) остаются теми же, изоформа реналазы-4 (200 а.к.) содержит 1, 4, 6 и 9 экзоны; изоформа реналазы-5 (181 а.к.) содержит 1, 6, 7 и 9 экзоны; изоформа реналазы-6 (163 а.к.) содержит 1, 4, 6 и 8 экзоны; изоформа реналазы-7 (139 а.к.) содержит 6, 7 и 9 экзоны [24].

Аналогичные данные приводит группа Aliverti [25], не исключая при этом существования 11-го экзона и транскрипционных вариантов, отличных от вышеописанных.

К сказанному следует добавить, что на сегодняшний день получены убедительные доказательства о присутствии в тканях и клетках человека основного транскрипционного варианта реналазы (Рен-1) и соответствующего белкового продукта [23, 25]. Реналаза-2 человека была

клонирована и экспрессирована в прокариотической системе в виде рекомбинантного белка, содержащего С-концевой гексагистидиновый кластер [26]. Хотя конкретные человеческие клетки, экспрессирующие этот белок еще остаются неизвестными, Хи и соавт. в самой первой публикации по реналазе [1] обнаружили в мышечных клетках человека виды мРНК реналазы размером около 2,4 тысяч оснований (т.п.о.), которые являются наиболее вероятными кандидатами, ответственными за экспрессию реналазы-2 [26].

1.2. Структура белка реналазы человека

Анализ нуклеотидной последовательности мРНК реналаз позволяет выделить несколько функциональных доменов в кодируемых ими белках. Все известные изоформы реналазы содержат N-концевую последовательность, которая включает область сигнального пептида (1-17 а.к.), ответственного за секрецию этих белков во внеклеточное пространство, и участок связывания FAD (3-42 а.к.). Присутствие FAD было экспериментально подтверждено для рекомбинатных вариантов реналазы-1 [27-31] и реналазы-2 [31].

Первая статья, посвященная структуре реналазы, появилась в 2011 году [28]. Группой Aliverti в *E. coli* была экспрессирована, выделена и впоследствии получена в кристаллическом виде изоформа-1 реналазы человека. Методом рентгеноструктурного анализа была расшифрована пространственная структура этого белка (код PDB 3QJ4). В качестве шаблона для расшифровки авторы использовали пространственную структуру оксидазы из *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (код PDB 3KKJ), как наиболее близкую по аминокислотной последовательности [28]. В этом контексте необходимо отметить, что в основном расшифровка пространственной структуры рентгенографическим методом в настоящее время проводится с использованием известной пространственной структуры белка. Укладку последнего используют в качестве шаблона, по которому подстраивают структуру исследуемого белка на основе дифракционной картины рентгеновских лучей, полученной от кристалла этого белка.

Структура оксидазы из *Ps. syringae* была получена в результате выполнения проекта NorthEast Structural Genomics Consortium (NESGC) (<http://www.nesg.org/>), в котором устанавливаются структуры белков, в том числе даже тех, для которых не установлены их функции. В числе белков с неизвестной функцией была и оксидаза из *Ps. syringae*. Идентичность между этой оксидазой и реналазой составляет 19,5%.

Позднее группа Moran в рамках выдвинутой гипотезы о роли реналазы как α -NAD(P)H-аномеразы получили кристаллы оксидазы из *Ps. syringae* в комплексе с NAD⁺ и NADH [32]. Таким образом, на сегодняшний день можно считать, что известны четыре структуры реналазы: одна – человека и три – бактериальные.

Несмотря на низкую идентичность, бактериальная реналаза и реналаза человека имеют очень близкую

пространственную структуру (RMSD по C- α атомам составляет около 2 Å). Структура реналазы представляет собой вытянутую глобулу (размеры примерно 60×35×35 Å), которую условно можно разделить на два субдомена (рис. 2). Одним из них является FAD-связывающий субдомен, в котором расположен никотинадениловый фрагмент FAD с рибозо-фосфатной частью. Оксазолиновый фрагмент FAD расположен между этими двумя субдоменами в глубине глобулы. Активный центр реналазы является открытым, только диметилбензойный фрагмент оксазолинового кольца закрыт от растворителя.

Архитектура FAD-связывающего домена основана на укладке Россмана, в которую входит центральный β -лист, состоящего из шести тяжей, окружённых с одной стороны тремя длинными α -спиралями, а с другой – тремя короткими α -спиралями и небольшим β -листом. Другой субдомен сформирован центральным β -листом, окруженным тремя α -спиралями. Следует отметить, что аминокислотная последовательность N-концевого сигнального пептида перекрывается с укладкой Россмана (8-13 а.к.) (G-A-G-M-T-G). Последняя представляет собой динуклеотид-связывающую область, состоящую из последовательно расположенных β -тяжа, α -спирали и второго β -тяжа (β_1 - α - β_2). Обязательным условием является наличие последовательности G-X-G-X-X-G (где X – любая аминокислота) между первым тяжем и спиралью. Эта укладка определяет нековалентное взаимодействие белка с рибозо-фосфатной частью динуклеотида (FAD). Отщепление сигнального пептида (например, в ходе секреции), а также делеции в области FAD-связывающего домена (как в случае транскрипционного варианта B4DJW3, см. рис. 2) должно неминуемо приводить к нарушению структуры этого белка, сопровождаемому потерей способности связывать FAD.

Общая структура укладки полипептидной цепи реналазы позволяет отнести её к суперсемейству

белков, содержащих FAD/NAD(P)-связывающий домен. Однако в отличие от большинства близких структурных гомологов, у реналазы отсутствует дополнительный субдомен, который, как например у моноаминоксидаз, закрывает активный центр от растворителя.

Активный центр реналазы является открытым. Дно его образовано оксазолиновым кольцом FAD. В активном центре реналазы человека выделяют два участка. Первый образован ароматическими аминокислотами (Y62, Y214 и F223), расположенными слева и снизу на рисунке 2. Противоположная сторона активного центра в основном сформирована положительно-заряженными гидрофильными остатками (R193, R222, H245 и Q292). В отличие от реналазы человека, у бактериальной реналазы этот положительно-заряженный участок отсутствует: у бактериального белка остатки аргинина заменены на аспаргат и треонин. Однако при этом Q292 реналазы человека ближе всего совмещён в пространстве с R280.

В комплексах бактериальной реналазы NADH (субстрат аномеразной реакции, см раздел 2.4) и NAD⁺ (продукт реакции) занимают очень близкие позиции в активном центре фермента. Хотя авторы [32] отметили слабую электронную плотность, соответствующую NAD⁺, что указывает на высокую подвижность продукта реакции, это совпадает с результатами экспериментов группы Aliverti, которые показали, что рекомбинантная реналаза человека характеризуется высоким значением K_d для NAD⁺ (~2 мМ). В активном центре никотинамидный фрагмент NADH и NAD⁺ располагается параллельно оксазолиновому кольцу FAD, при этом вторая позиция основания располагается непосредственно над N5 оксазолинового кольца (расстояние 3,6 Å), что способствует переносу водорода. Схожее расположение никотинамидного фрагмента NAD и оксазолинового кольца было обнаружено и для ряда NAD и FAD-зависимых ферментов (см. например,

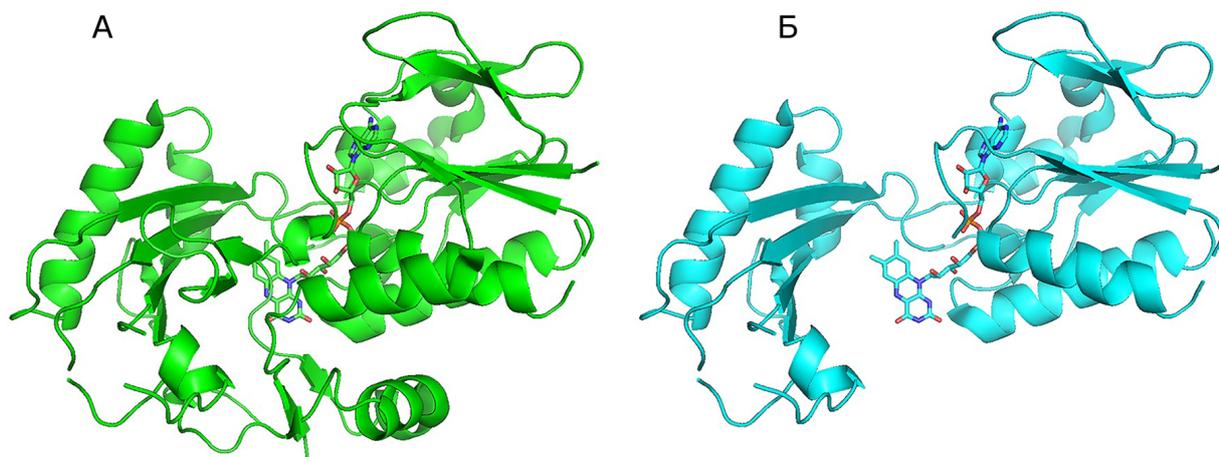


Рисунок 2. А - Структура реналазы-1 человека, содержащей кофактор FAD (код PDB 3QJ4). Б - Предварительная модель транскрипционного варианта реналазы, в котором отсутствует участок от 40 до ~130 остатка (код UniProt B4DJW3). В этой модели молекула FAD (наличие её в структуре варианта B4DJW3 неизвестно) встроена по аналогии с кристаллической структурой реналазы-1. Оксазолиновое кольцо кофактора свободно расположено в активном центре, плохо взаимодействуя с белковой глобулой.

[32] и приведённую там литературу). ADP-фрагменты обоих лигандов занимают одинаковые позиции в комплексах, причем аденил располагается на поверхности белковой глобулы. Это так же совпадает с данными группы Aliverti о том, что при связывании NADH никотинамидный фрагмент взаимодействует с оксазолиновым кольцом и вызывает его спектральные изменения, а адениловый фрагмент вносит основной вклад в энергию связывания [28].

Наибольшей подвижностью в активном центре бактериальной реналазы обладает R280. Авторы [32] полагают, что этот аминокислотный остаток может выполнять ту же роль, что и R193 в человеческой реналазе. В свободном ферменте (код PDB 3KKJ) гуанидиновая группа аргинина располагается напротив оксазолинового кольца FAD. При связывании NADH эта группа отодвигается в сторону, освобождая место для NADH. В комплексе с NAD⁺ наблюдается дальнейший отход этой группы на периферию активного центра, вероятно всего, в результате отталкивания положительных зарядов NAD⁺ и гуанидиновой группы. Было высказано предположение, что взаимодействие одноименных зарядов может способствовать выходу продукта реакции NAD⁺ из активного центра, хотя в полученных пространственных структурах комплексов NADH и NAD⁺ занимают идентичные позиции.

1.3. Сопоставление аминокислотных последовательностей реналаз из разных организмов

В настоящее время в UniProtKB (релиз от ноября 2015 года) находятся данные по аминокислотным последовательностям реналаз (рассматривались последовательности длиной более 200 а.к.), относящихся к 33 видам из разных таксономических групп, начиная от гидры и до человека. Среди позвоночных имеются последовательности для трёх видов рыб, двух видов пресмыкающихся, тринадцати видов птиц; остальные последовательности относятся к представителям класса млекопитающих (летучие мыши, грызуны, приматы). В большинстве случаев эти последовательности не полные, у них часто не хватает больших фрагментов с N- или C-концов. В части Swiss-Prot реналаза представлена только для трёх организмов (человек, мышь, крыса).

Их сопоставление друг с другом выявило ряд особенностей для каждого вида (рис. 3). У человека достоверно установлено две изоформы реналазы (реналаза-1 и реналаза-2). Различия между ними заключается только на C-конце. Как уже указывалось выше, последним в кДНК реналазы-1 является девятый, а в кДНК реналазы-2 – десятый экзон. В пространственной структуре реналазы-1 белковый продукт этого экзона располагается в FAD-связывающем домене и формирует два последних β-тяжа (крайние тяжи в β-слое укладки Россмана) и C-концевую α-спираль, которая закрывает рибозо-фосфатный мостик FAD от растворителя. C-концевые аминокислотные последовательности, реналазы-1 и реналазы-2 имеет низкую гомологию между собой. Предсказание

вторичных структур для реналазы-2 показало, что C-концевой участок должен представлять собой два β-тяжа, соединённые неупорядоченным участком. Это означает, что, по-видимому, в реналазе-2 формируются два тяжа, которые участвуют в β-слое укладки Россмана, но у неё отсутствует последняя α-спираль.

Кроме того, в UniProtKB присутствует запись об изоформе реналазы, показанной на белковом уровне (F6XA08), в которой присутствуют только первые 175 остатков, представляющие собой FAD-связывающий субдомен. На транскрипционном уровне показана ещё одна форма реналазы (код B4DJW3), в которой отсутствует участок от 40 до ~130 остатка. В результате, у формы B4DJW3 должен отсутствовать участок белка, с которым связывается оксазолиновое кольцо FAD, то есть при трансляции данного транскрипционного варианта образующийся белковый продукт не сможет связать FAD и, следовательно, не сможет функционировать как флавопротеин (рис. 2). Кроме того, у этой изоформы C-концевой участок идентичен реналазе-2. В UniProtKB есть также две записи с последовательностями реналазы длиной примерно 50 остатков. У шимпанзе на транскрипционном уровне доказано существование двух изоформ, эквивалентных реналазам 1 и 2 человека.

У крысы обнаружена только одна форма реналазы. Она содержит 315 остатков, то есть по длине она больше напоминает реналазу-2 человека. Однако по аминокислотной последовательности C-концевой участок является высокомолекулярным для участка в реналазе-1 человека, формирующего два последних β-тяжа, то есть в пространственной структуре реналазы крысы должна отсутствовать последняя α-спираль, которая (как указывалось выше) закрывает рибозо-фосфатный мостик FAD от растворителя.

У мыши обнаружено две изоформы реналазы. Первая, основная изоформа реналазы мыши, по длине и по аминокислотной последовательности (в том числе и по C-концевой части) близка к реналазе-1 человека. У второй изоформы реналазы мыши (для которой нет подтверждения на белковом уровне) отсутствует участок от 41 до 123 остатков (нумерация по изоформе 1 мыши), и в этом плане она близка к изоформе реналазы человека B4DJW3.

Принимая во внимание, что реналазы мыши и крысы являются популярным объектом исследований [1, 12, 20, 21, 33-38], сравнительный анализ известных аминокислотных последовательностей человека и лабораторных животных показывает, что необходимо с большой осторожностью относиться к экстраполяции данных, полученных на лабораторных животных, на человека.

2. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АКТИВНОСТИ РЕНАЛАЗЫ

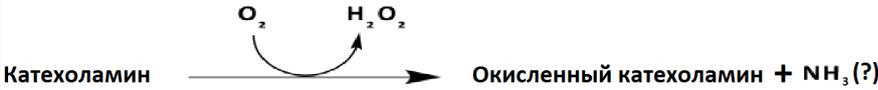
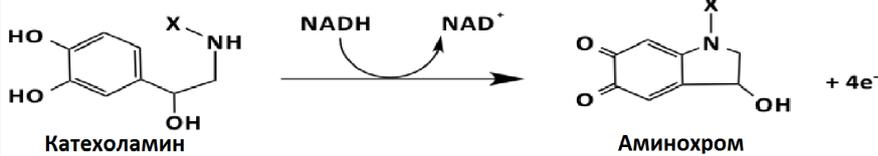
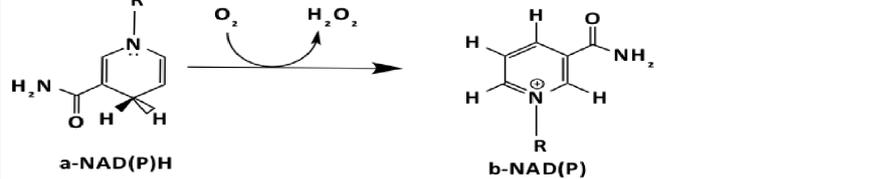
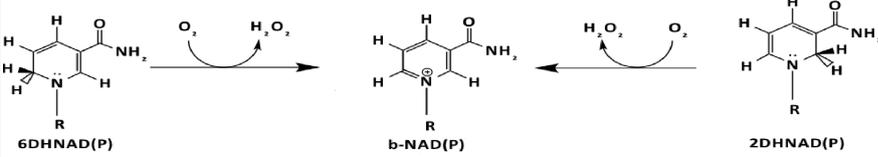
В разное время на реналазу “примеряли” несколько видов каталитических активностей, которые суммированы в таблице.

ИСТОРИЯ РЕНАЛАЗЫ ОТ АМИНОКСИДАЗЫ ДО α -NAD(P)H ОКСИДАЗЫ/АНОМЕРАЗЫ

SP Q5VYX0 RNLS_HUMAN	MAQVLIVGAGMTGSLCAALLRRQTSGLPLYLAVWDKAEDSGGRMTTACSPHNPQCTADLGA	60
SP Q5VYX0-2 RNLS_HUMAN	MAQVLIVGAGMTGSLCAALLRRQTSGLPLYLAVWDKAEDSGGRMTTACSPHNPQCTADLGA	60
TR F6XA08 F6XA08_HUMAN	MAQVLIVGAGMTGSLCAALLRRQTSGLPLYLAVWDKAEDSGGRMTTACSPHNPQCTADLGA	60
TR B4DJW3 B4DJW3_HUMAN	MAQVLIVGAGMTGSLCAALLRRQTSGLPLYLAVWDKAEDS-----	39
SP Q5U2W9 RNLS_RAT	MFRVLVVGAGLTGSLCAALLRKEITAPLYLALWDKAGDIGGRMTTANSPHNPRCTADLGA	60
SP A7RDN6 RNLS_MOUSE	MSRVLVVGAGLTGSLCAALLRKEITAPLYLGLWDKGGDIGGRMITASSPHNPRCTADLGA	60
SP A7RDN6-2 RNLS_MOUSE	MSRVLVVGAGLTGSLCAALLRKEITAPLYLGLWDKGGDIG-----	40
	* :*:****:*****: :.****.:***. *	
SP Q5VYX0 RNLS_HUMAN	QYITCTPHYAKKHQRFYDELLAYGVLRLPSSPIEGMVMKEGDCNFVAPQGISSIIKHYLK	120
SP Q5VYX0-2 RNLS_HUMAN	QYITCTPHYAKKHQRFYDELLAYGVLRLPSSPIEGMVMKEGDCNFVAPQGISSIIKHYLK	120
TR F6XA08 F6XA08_HUMAN	QYITCTPHYAKKHQRFYDELLAYGVLRLPSSPIEGMVMKEGDCNFVAPQGISSIIKHYLK	120
TR B4DJW3 B4DJW3_HUMAN	-----	
SP Q5U2W9 RNLS_RAT	QYITCTPHYAKKHQNFYEELLAHGILEPLTSPKGMVEKESNFVAPHGVSSIIKYYLK	120
SP A7RDN6 RNLS_MOUSE	QYITCSPHYVKEHQNFYEELLAHGILKPLTSPKGMKGEKESNFVAPQGFSSVIKYYLK	120
SP A7RDN6-2 RNLS_MOUSE	-----	
SP Q5VYX0 RNLS_HUMAN	ESGAEVYFRHRVTQINLRDDKWEVSKQTGSPEQFDLIVLTMVPVEILQLQGDITTLISEC	180
SP Q5VYX0-2 RNLS_HUMAN	ESGAEVYFRHRVTQINLRDDKWEVSKQTGSPEQFDLIVLTMVPVEILQLQGDITTLISEC	180
TR F6XA08 F6XA08_HUMAN	ESGAEVYFRHRVTQINLRDDKWEVSKQTGSPEQFDLIVLTMVPVEILQLQGDITTT-----	175
TR B4DJW3 B4DJW3_HUMAN	--GAEVYFRHRVTQINLRDDKWEVSKQTGSPEQFDLIVLTMVPVEILQLQGDITTLISEC	97
SP Q5U2W9 RNLS_RAT	ESGAEVFLRQCVTQINLRDNKWEVSEDGTGQFDLIVLTMPPAQIILGLQGDIVNLISER	180
SP A7RDN6 RNLS_MOUSE	KSGAEVSLKHCVTQIHLKDNKWEVSDTGSAEQFDLIVLTMPPAQIILELQGDIVNLISER	180
SP A7RDN6-2 RNLS_MOUSE	---AEVSLKHCVTQIHLKDNKWEVSDTGSAEQFDLIVLTMPPAQIILELQGDIVNLISER	97
	*** :: : ****.*:*:***** :*** :****.:****.*:* *****..	
SP Q5VYX0 RNLS_HUMAN	QRQQLEAVSYSSRYALGLFYEAGTKIDVPWAGQYITSNPCIRFVSIIDNKKRNIESSEIGP	240
SP Q5VYX0-2 RNLS_HUMAN	QRQQLEAVSYSSRYALGLFYEAGTKIDVPWAGQYITSNPCIRFVSIIDNKKRNIESSEIGP	240
TR F6XA08 F6XA08_HUMAN	-----	
TR B4DJW3 B4DJW3_HUMAN	QRQQLEAVSYSSRYALGLFYEAGTKIDVPWAGQYITSNPCIRFVSIIDNKKRNIESSEIGP	157
SP Q5U2W9 RNLS_RAT	QRQQLASVSYSSRYALGLFYEAGMKIDVPWAGQYITSNPCIRFISIDSKRNTESECCGP	240
SP A7RDN6 RNLS_MOUSE	QREQLKSVSYSSRYALGLFYEAGMKIGVPWSCRYSLSSHPCICFISIDNKKRNIESSECCGP	240
SP A7RDN6-2 RNLS_MOUSE	QREQLKSVSYSSRYALGLFYEAGMKIGVPWSCRYSLSSHPCICFISIDNKKRNIESSECCGP	157
SP Q5VYX0 RNLS_HUMAN	SLVIHTTVPFVGVTYLEHSIEDVQELVFQQLLENILPGLPQPIATKCQKWRHSQVTNAAANC	300
SP Q5VYX0-2 RNLS_HUMAN	SLVIHTTVPFVGVTYLEHSIEDVQELVFQQLLENILPGLPQPIATKCQKWRHSQVPSAGVIL	300
TR F6XA08 F6XA08_HUMAN	-----	
TR B4DJW3 B4DJW3_HUMAN	SLVIHTTVPFVGVTYLEHSIEDVQELVFQQLLENILPGLPQPIATKCQKWRHSQVPSAGVIL	217
SP Q5U2W9 RNLS_RAT	LLVHTTVPFVGVTHLEHSEEDVQELITQQLETILPGLPPPVAATKCWKWYSQVTNSAANS	300
SP A7RDN6 RNLS_MOUSE	SVVIQTTVPFVGVQHLEASADVQKLMIQQLETILPGLPQPVATICHKWTYSQVTSSVSDR	300
SP A7RDN6-2 RNLS_MOUSE	SVVIQTTVPFVGVQHLEASADVQKLMIQQLETILPGLPQPVATICHKWTYSQVTSSVSDR	217
SP Q5VYX0 RNLS_HUMAN	PGQMTLHHPFLACGGDFTQSNFDGCITSALCVLEALKNYI	342
SP Q5VYX0-2 RNLS_HUMAN	G----CAKSPWMAIG--FPI-----	315
TR F6XA08 F6XA08_HUMAN	-----	
TR B4DJW3 B4DJW3_HUMAN	G----CAKSPWMAIGFPI-----	232
SP Q5U2W9 RNLS_RAT	PGQMTLHLNPFLLIYI-----	315

Рисунок 3. Вывороченные аминокислотные последовательности реналаз человека, крысы и мыши (по данным UniProtKB, релиз от ноября 2015 года).

Таблица. Типы предполагаемых реакций, катализируемых реналазой (адаптировано из [41] с дополнениями).

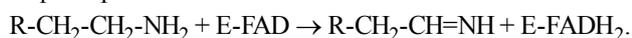
№	Тип предполагаемой реакции	Определяемый продукт реакции	Ссылки
1	 <p>Катехоламин $\xrightarrow{O_2}$ Окисленный катехоламин + NH₃(?) + H₂O₂</p>	H ₂ O ₂	[1]
2	NAD(P)H + H ⁺ тетразолий \longrightarrow NAD(P) ⁺ + формазан	Формазан	[28]
3	 <p>NADH + 2O₂ $\xrightarrow{\text{катехоламин зависимый}}$ NAD⁺ + 2O₂⁻ $\xrightarrow{\text{Катехоламин}}$ Аминохром</p>	H ₂ O ₂ , Адренохром	[11], [20], [45]
4	 <p>Катехоламин \xrightarrow{NADH} Аминохром + H₂O₂ + 4e⁻</p>	H ₂ O ₂ , Дофаминохром, Норадренилохром, Адренохром	[46]
5	 <p>a-NAD(P)H $\xrightarrow{O_2}$ b-NAD(P) + H₂O₂</p>	FADH ₂ [*] , NAD(P), O ₂ , H ₂ O ₂	[29], [30]
6	 <p>6DHNAD(P) $\xrightarrow{O_2}$ b-NAD(P) + H₂O₂</p>	NADH	[52]

Примечание. Знак вопроса показывает, что типичный продукт аминокислотной реакции - NH₃ - не был определен (строка 1). Для удобства рибозо-фосфатная часть никотинамидных коферментов обозначена R (строки 5 и 6). * - кофактор, восстановленный в ходе реакции.

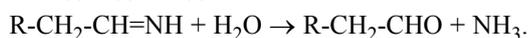
2.1 Реналаза как аминоксидаза

Аминокислотная последовательность реналазы содержит область, свойственную FAD-зависимым моноаминоксидазам (MAO) А и Б – [1], – ферментам, катализирующим реакцию окислительного дезаминирования медиаторных аминов в центральной нервной системе и периферических тканях [33]. Хотя гомология аминокислотной последовательности реналазы и MAO (А и Б) не превышает 13%, наличие пусть и более чем скромного сходства аминокислотных последовательностей, по-видимому, и послужило обнадеживающим стимулом для последующих исследований каталитического механизма действия реналазы как аминоксидазы [1, 35].

В контексте данной проблемы следует напомнить, что в катализируемом MAO процессе окислительного дезаминирования биогенных аминов выделяют две полуреакции ([39] и многие другие). Сначала происходит ферментативное (Е) дегидрирование субстрата с образованием имина и восстановлением кофактора FAD:



Затем имин в реакции с водой превращается в альдегид с выделением аммиака:



Во второй полуреакции восстановленный фермент (E-FADH₂) окисляется молекулярным кислородом с образованием пероксида водорода: E-FADH₂ + O₂ → E-FAD + H₂O₂. Эта реакция и является скоростью лимитирующей, а один из её продуктов – пероксид водорода – часто используется для определения активности этого фермента.

Авторы, впервые описавшие реналазу как аминоксидазу, оценивали каталитическую активность этого белка именно по образованию пероксида водорода [1]. Используя этот подход, они показали, что в крови доноров реналаза проявляет низкую каталитическую активность, а в моче активность реналазы существенно (на два порядка) выше [1]. Более того, они сообщили об очистке каталитически активной реналазы из мочи здоровых добровольцев; процедура очистки включала фракционирование сульфатом аммония с последующей аффинной хроматографией на агарозе с иммобилизованными антителами против реналазы [1]. По их данным, препараты реналазы, очищенной из мочи человека, были представлены двумя формами с молекулярными массами 35 кДа и 67-75 кДа, что позволило предположить возможную димеризацию реналазы. Наше исследование показало, что реналаза мочи человека, полученная в ходе аналогичной двухэтапной очистки

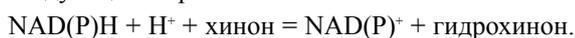
(при помощи фракционирования сульфатом аммония и последующего этапа аффинной хроматографии с иммобилизованными антителами против реналазы), действительно содержит 2 белка с молекулярной массой 35 и 66 кДа [40]. Однако в ходе масс-спектрометрического анализа первый был идентифицирован как реналаза, а второй – как сывороточный альбумин [40].

При этом наша попытка определить аминоксидазную активность с использованием в качестве субстрата меченого фенилэтиламина (^{14}C)РЕА не увенчалась успехом: следовая РЕА-деаминазная активность очищенного препарата реналазы не изменялась при добавлении увеличивающихся количеств этого белка (Федченко и др., неопубликованные данные). В связи с этим необходимо отметить, что попытки других авторов определить аминоксидазную активность реналазы независимыми методами (в том числе полярографическим, по потреблению кислорода, а также по редокс-превращениям кофактора FAD) также не увенчались успехом [27, 41, 42].

С чем связаны эти противоречия? Прежде всего, следует отметить, что в отличие от известных MAO (А и Б), образование пероксида водорода было обнаружено только в присутствии субстратов, способных подвергаться автоокислению (дофамин, норадреналин, адреналин). Сложность определения аминоксидазной активности по образованию пероксида водорода в случае использования катехоламинов в качестве субстратов усугубляется тем, что в физиологических условиях их автоокисление может протекать достаточно интенсивно. Автоокисление адреналина (точнее торможение этого процесса) используется даже при определении активности супероксиддисмутазы [43, 44]. Поэтому, очевидно, прав Moran, указывая в своём недавнем обзоре на необходимость использования соответствующих контролей [41], которые в пионерских исследованиях по регистрации аминоксидазной активности реналазы не были поставлены.

2.2. Реналаза – как диафораз

Строго говоря, DT-диафораз – это NAD(P)H дегидрогеназа, флавопротеиновый фермент, с 1965 по 2005 г., фигурировавший в классификации ферментов (IUBMB Enzyme Nomenclature) под номером 1.6.99.2, а с 2005 – КФ 1.6.5.2 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/6/5/2.html>). Суммарное уравнение диафоразной реакции выглядит следующим образом:



В широком смысле, термином диафораз обозначают флавиновые ферменты, катализирующие реакцию переноса восстановительных эквивалентов с восстановленных никотинамидных коферментов NADH или NADPH на различные красители типа тетразолия. Такой способ регистрации ферментативной активности широко практикуется в тех случаях, когда истинный акцептор электронов

неизвестен или очень дорог.

Используя рекомбинантную реналазу, экспрессированную в клетках штамма Rosetta(DE3) *E. coli*, трансформированного плазмидами pET-SUMO-RNLS (несущей ген дикого типа реналазы и мутантный ген реналазы, содержащей замену в положении 37 Asp) [27], авторы обнаружили низкую диафоразную активность реналазы [28]. Белок характеризовался более низким значениям k_{cat} , но более высоким значением соотношения k_{cat}/K_m при использовании NADH чем при NADPH. В анаэробных условиях инкубации реналазы с NADH или NADPH происходило восстановление FAD [28]. Хотя сами авторы отмечали, что результаты исследования не дают ответа на вопрос о каталитической активности реналазы, именно эта работа и определила направление дальнейших поисков физиологически значимой каталитической активности реналазы. Группа Aliverti показала, что белок может взаимодействовать с восстановленными никотинамидными коферментами и что обнаруженная диафоразная активность характеризуется низкими величинами K_m для NADH (18 мкМ) и NADPH (175 мкМ), свойственными для многих оксидоредуктаз. Эти результаты послужили отправной точкой для нового витка исследований каталитических свойств реналазы.

2.3. Реналаза как NAD(P)H-зависимая оксидаза катехоламинов

Как отмечали первооткрыватели реналазы, аминоксидазная активность этого белка очень невелика для того, чтобы оказывать сколько-нибудь значимое влияние на метаболизм катехоламинов [11]. Модифицировав протокол получения миллиграммовых количеств немодифицированной (то есть не содержащей дополнительных меток) рекомбинантной реналазы в клетках *E. coli*, группа Desig сообщила о том, что скорость аминоксидазной реакции, катализируемой этим белком, существенно возрастала в присутствии NADH [11, 45]. Авторы предложили следующей механизм катаболизма катехоламинов при участии реналазы: NADH вызывает восстановление кофактора FAD. Последующее окисление FADH₂ молекулярным кислородом сопровождается генерацией супероксидного анион-радикала, который и окисляет катехоламины. В пользу этого предположения свидетельствовал тот факт, что добавление в систему супероксиддисмутазы, но не каталазы предупреждало окисление катехоламинов [11]. В пользу предложенного каталитического механизма действия свидетельствовало и количественное обнаружение в качестве продукта реакции аминохромов (адренохрома, норадренохрома дофаминохрома) [46].

Параллельно данный протокол был использован для определения NADH-зависимой активности реналазы в крови и моче пациентов с трансплантацией почек [20]. Даже если абстрагироваться от серьезных критических замечаний методического толка по постановке многочисленных контролей на реакцию автоокисления катехоламинов [41], интерпретация

этих результаты вызывает несколько важных возражений: (1) предложенная Desir схема реакции [11] требует присутствия в крови и моче не только NADH, но и полноразмерной реналазы (то есть реналазы, содержащей N-концевой сигнальный пептид), содержащей нековалентно связанный FAD; (2) биологический смысл реакции соокисления катехоламинов в катализируемой реналазой реакции не вполне ясен, так как в крови есть гораздо более мощные генераторы пероксида водорода, образующегося через формирование супероксиданиона (ксантиноксидаза, NADPH-оксидаза нейтрофилов) [47-51]; (3) что служит донором электронов в крови для восстановления FAD в отсутствие восстановленных никотинамидных коферментов, ведь по данным группы Desir, реакция протекает и в отсутствие NADH, добавление которого только ускоряет этот процесс в 4-6 раз [11, 45].

На эти вопросы пока нет ответа. К тому же данная активность не была подтверждена в прямых экспериментах с рекомбинантной реналазой, проведённых в другой лаборатории [42].

2.4. Реналаза – как α -NAD(P)H-оксидаза/аномераза

Используя рекомбинантную реналазу-1 человека, экспрессированную в клетках *E. coli* и содержащую N-концевую гексагистидиновую метку, группа Morgan исследовала взаимодействие этого белка с β -NAD(P)H – потенциальным субстратом ферментативных реакций, описанных в литературе для реналазы [29, 30, 32, 41, 42]. При добавлении высоких концентраций NADPH в анаэробных условиях было зарегистрировано быстрое восстановление флавинового кофактора. В аэробных условиях взаимодействие реналазы с NADPH сопровождалось потреблением кислорода, половина которого регенерировала при добавлении каталазы [29]. Последнее свидетельствовало в пользу образования пероксида водорода. Анализируя компоненты реакционной смеси при помощи ВЭЖХ и ¹H-ЯМР, авторы обнаружили, что α -NAD(P)H, присутствовавший в качестве примеси в растворах β -NAD(P)H, служил субстратом реналазной реакции, а β -NAD(P)⁺ – её продуктом. Это позволило охарактеризовать выявленную каталитическую активность реналазы как α -NAD(P)H-оксидазную/аномеразную. С учётом (значительно) более высокого сродства реналазы к восстановленным формам никотинамидных коферментов, показанного в двух независимых лабораториях [25, 28-30], механизм реакции может быть описан двумя полу-реакциями: (i) связывание α -аномера NAD(P)H с реналазой приводит к восстановлению флавинового кофактора и высвобождению окисленного никотинамидного кофермента в β -форме; (ii) последующее окисление FADH₂ молекулярным кислородом регенерирует FAD и завершает каталитический цикл реналазы образованием пероксида водорода.

Недавно группа Morgan показала, что реналаза осуществляет окислительное превращение изомеров

β -NADH (2-дигидро-NAD и 6-дигидро-NAD), оказывающих ингибиторное действие на активность исследованных NAD-зависимых дегидрогеназ – лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, с образованием окисленной формы β -NAD и пероксида водорода [32, 52]. По мнению авторов, это позволяет осуществить превращение метаболически неактивных форм восстановленных никотинамидных коферментов в окисленные формы, которые могут участвовать в дегидрогеназных реакциях. Приведённые аргументы в пользу “новой” каталитической активности и, соответственно, биологической роли реналазы как α -NAD(P)H-оксидазы/аномеразы достаточно убедительны, особенно если учесть, что α -NADH был выделен в своё время из микроорганизмов и тканей млекопитающих [53]. В этом контексте особенно важно, что замена β -NADH на α -NADH оказывала существенное влияние на поведение NADH-зависимых реакций [54, 55]. При этом в литературе пока нет данных в пользу образования изомеров β -NADH, проявляющих свойства ингибиторов дегидрогеназ (2-дигидро-NAD и 6-дигидро-NAD) *in vivo*. Они появляются в результате неферментативного восстановления β -NAD, например, борогидридом натрия (см. [29] и приведённую там литературу). Может ли аналогичный сценарий быть реализован *in vivo*, еще только предстоит выяснить.

3. ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ И ВНЕКЛЕТОЧНАЯ РЕНАЛАЗА

Все рассмотренные каталитические активности реналазы, требуют присутствия кофактора FAD, который может быть “размещён” только в полноразмерном белке, содержащем N-концевой пептид. Между тем присутствие FAD во внеклеточной реналазе, определяемой в биологических жидкостях человека до сих пор никем не было продемонстрировано. Реналаза была обнаружена в крови и моче при помощи Western блот анализа [1, 13] или ИФА тестов [17-20, 56-59], которые не позволяют определить ни N-концевой последовательности, ни сам кофактор. Desir и др. [11] упомянули в своем обзоре, что реналаза(1) человека, выделенная из крови, содержит N-концевой сигнальный пептид; однако никаких доказательств, подтверждающих это заявление не было. Кроме того, молекулярная масса человеческой реналазы, выделенной из мочи [31], была немного ниже, чем расчётная молекулярная масса полноразмерной реналазы.

Используя рекомбинантную полноразмерную реналазу(1) в качестве контроля триптических паттернов, мы обнаружили, что в реналазе мочи, выделенной при помощи иммуноаффинной хроматографии, N-концевой пептид отсутствует, в то время как в рекомбинантном белке этот пептид чётко определялся [31]. Отсутствие N-концевого сигнального пептида исключает возможность связывания FAD укороченным белком (рис. 4).

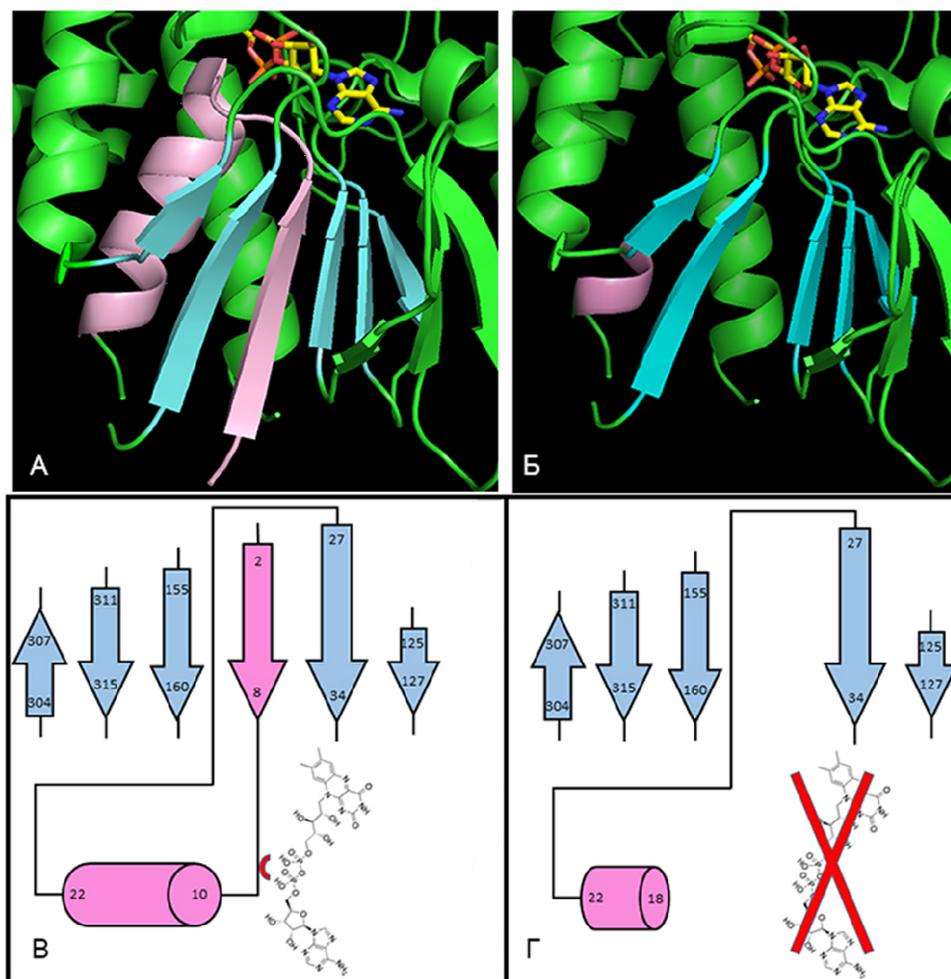


Рисунок 4. Пространственные структуры (А, Б) полноразмерной реналазы (А), реналазы с удалённым N-концевым пептидом (Б) и схематическое представление укладки Россмана в этих белках (В,Г). α -Спираль показаны в виде цилиндров, β -тяжи - в виде стрелок. N-концевой пептид, участвующий в образовании укладки Россмана, выделен розовым цветом. Видно, что удаление N-концевого пептида приводит к нарушениям укладки реналазы, определяющей связывание FAD. Числа внутри цилиндров и стрелок обозначают положения аминокислотных остатков в последовательности реналазы. (Адаптировано из [31]).

Анализ кристаллической структуры реналазы, показал [31], что остатки 2-21 (отсутствующие в усечённой реналазе) являются важными составляющими кладки Россмана (образованной аминокислотными остатками 2-32), которая участвует в связывании рибозо-фосфатного фрагмента кофактора FAD (рис. 4). Отсутствие этого пептида приводит к исчезновению укладки Россмана (распаду β -слоя на две части, исчезновению остатков, участвующих в связывании рибозо-фосфатного фрагмента) и неспособности реналазы связывать FAD (рис. 4).

В настоящее время неизвестно, где произошло отщепление N-концевого пептида. С одной стороны, отщепление сигнального пептида, как правило, происходит в ходе транслокации новосинтезированных секреторных белков эндоплазматического ретикулума [60]. Правда, Desir и др. упоминают в обзоре [11], что ими обнаруженная полноразмерная реналаза, секретируется клетками 293Т. Однако, конкретные экспериментальные доказательства этого утверждения

не приведены. С другой стороны, расщепление может происходить в системе циркуляции или при экскреции в мочу. В этом контексте уместно напомнить, что в уропротеоме обнаружено много протеаз [61], и некоторые известные белки (например, альбумин) подвергаются протеолизу при хранении образцов мочи [62]. Поскольку в наших экспериментах реналазу выделяли сразу же после получения проб мочи, протеолитическое расщепление реналазы во время хранения образцов мочи *ex vivo* может быть исключено. Тем не менее, в любом случае, очевидно, что периодически появляющиеся в литературе сообщения о каталитической активности реналазы мочи [20, 33], не могут быть обусловлены FAD-зависимыми реакциями.

Это, по-видимому, свидетельствует о том, что внутриклеточная и внеклеточная реналазы выполняют различные функции в организме, причём механизмы действия внеклеточной реналазы не связаны с FAD.

4. АНТИГИПЕРТЕНЗИВНЫЙ ЭФФЕКТ

Исследования возможных каталитических механизмов действия реналазы, рассмотренные выше, а также анализ ассоциации полиморфизма гена реналазы с различными заболеваниями (гипертония, диабет) [63-67] уровня реналазы в крови больных [17-20, 56-59] отодвинули на второй план возможные механизмы антигипертензивного действия реналазы. Между тем, это едва и не единственный пример в истории реналазы (за исключением детекции FAD у полноразмерного белка), когда данные, полученные двумя независимыми группами (Desir и Aliverti) совпали: введение реналазы крысам вызывает снижение артериального давления [1, 27]. В контексте очевидной смены каталитической парадигмы (реналаза – α -NAD(P)H-оксидаза/аномераза, а не оксидаза катехоламинов) гипотензивный эффект реналазы может быть связан с продуктами реакции: пероксидом водорода и β -NAD(P)⁺, которые проявляют гипотензивные свойства. Пероксид водорода является эффективным средством, вызывающим расслабление аорты морской свинки, сокращение которой было предварительно стимулировано норадреналином [68]. В диапазоне концентраций от 1 до 100 мкМ пероксид водорода также вызывал дозо-зависимое расслабление брыжеечной артерии кролика, сокращение которой было предварительно стимулировано норадреналином [69]. Аналогичные результаты были получены в экспериментах с фрагментами венечных артерий человека: пероксид водорода способствовал так называемой потоковой вазодилатации (flow-induced vasodilatation) [70]. Пероксид водорода оказывал модулирующее действие на индуцированный адреномиметиком фенилэфрином сократительный ответ аорты гипертензивных крыс [71].

Другой продукт катализируемой реналазой реакции – β -NAD(P)⁺, – при определённых условиях может проявлять гипотензивные свойства. Например, было показано, что в дополнение к АТФ и норадреналину, электрическая стимуляция сосудистых и несосудистых препаратов приводила к высвобождению соединений нуклеотидной природы, среди которых преобладал β -NAD [72]. Оказалось, что при раздражении нерва происходит выброс β -NAD с одновременным снижением высвобождения норадреналина, что может быть расценено как новый механизм контроля гладких мышцах автономной нервной системой.

Другие возможные механизмы антигипертензивного действия реналазы [11] с каталитической FAD-зависимой активностью реналазы, очевидно, не связаны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За десять лет, прошедшие с момента открытия реналазы, были накоплены важные данные по структуре этого белка, особенностях экспрессии кодирующего его гена и функциональных последствиях у экспериментальных животных при его выключении

[11]. Сейчас становится всё более очевидным, что внеклеточная и внутриклеточная реналазы играют различные роли. Внутриклеточный белок содержит нековалентно связанный FAD и участвует в окислительно-восстановительных реакциях (α -NAD(P)H-оксидаза/аномераза). Присутствие FAD во внеклеточной реналазе до сих пор никем не показано, а для реналазы мочи можно считать установленным фактом, что потеря N-концевого пептида фактически исключает возможность связывания FAD [31]. Снижение уровня циркулирующих в крови катехоламинов, очевидно, не связано с их деградацией реналазой. На это указывает явное несоответствие между содержанием в крови катехоламинов и реналазы, которая, судя по данным ИФА, присутствует в значительном избытке по отношению к катехоламинам [73]. Именно этим можно объяснить тот факт, что в последнее время всё большее внимание привлекают пептиды, представляющие фрагменты аминокислотной последовательности реналазы [74, 75]. Недавно показано, что такие пептиды защищают клетки НК-2 от токсического действия цисплатина, а для циркулирующей в крови реналазы даже описан белок, играющий роль рецептора [76]. Насколько эти результаты позволят пролить свет на действительную роль, которую играет реналаза в организме, покажет будущее. Однако уже сейчас становится ясно, что анализ белков, взаимодействующих с реналазой, может внести существенный вклад в выяснении роли этого “загадочного” белка в организме.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы и гранта РФФИ 14-04-00624

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. Luft F.C. (2005) Cell Metab., **1**, 358-360.
3. Boomsma F., Tipton K.F. (2007) J. Neural Transm., **114**, 775-776.
4. 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.
5. Ghosh S.S., Krieg R.J., Sica D.A., Wang R., Fakhry I., Gehr T. (2009) Pediatr Nephrol., **24**, 367-377.
6. Медведев А.Е., Веселовский А.В., Федченко В.И. (2010) Биохимия, **75**, 1045-1054.
7. Eisenhofer G., Kopin I.J., Goldstein D.S. (2004) Pharmacol Rev., **56**, 331-349.
8. Shi W.B., Wang H.Y. (2015) Int. J. Clin. Exp. Med., **8**, 9505-9511.
9. Xu J., Desir G.V. (2007) Curr. Opin. Nephrol. Hypertens., **16**, 373-378.
10. Desir G.V. (2012) Pediatr Nephrol., **25**, 719-725.
11. Desir G.V., Wang L., Peixoto A.J. (2012) J. Amer. Soc. Hypertens., **6**, 417-426.
12. Fedchenko V., Globa A., Buneeva O., Medvedev A. (2013) Med. Sci. Monit. Basic Res., **19**: 267-270.

13. Desir G.V., Peixoto A.J. (2014) *Nephrol. Dial. Transplant.*, **29**, 22-28.
14. Malyszko J., Malyszko J.S., Mikhailidis D.P., Rysz J., Zorawski M., Banach M. (2012) *J. Hypertens.*, **30**, 457-462.
15. Malyszko J., Malyszko J.S., Rysz J., Mysliwiec M., Tesar V., Levin-Iaina N., Banach M. (2012) *Angiology*, **64**, 181-187.
16. Malyszko J., Bachorzewska-Gajewska H., Dobrzycki S. (2015) *Adv. Med. Sci.*, **60**, 41-49.
17. Wang Y., Liu F.Q., Wang D., Mu J.J., Ren K.Y., Guo T.S., Chu C., Wang L., Geng L.K., Yuan Z.Y. (2014) *Medicine (Baltimore)* **93** (6), e44.
18. Wang Y., Chu C., Ren J., Mu J.J., Wang D., Liu F.Q., Ren K.Y., Guo T.S., Yuan Z.Y. (2014) *Kidney Blood Press. Res.*, **39**, 497-506.
19. Wang Y., Wang D., Chu C., Mu J.J., Wang M., Liu F.Q., Xie B.Q., Yang F., Dong Z.Z., Yuan Z.Y. (2015) *Cardiology*, **130**, 242-248.
20. Quelhas-Santos J., Soares-Silva I., Fernandes-Cerqueira C., Simões-Silva L., Ferreira I., Carvalho C., Coentrão L., Vaz R., Sampaio-Maia B., Pestana M. (2014) *Exp. Biol. Med.* (Maywood), **239**, 502-508.
21. Quelhas-Santos J., Pestana M. (2014) *Curr. Hypertens. Rev.*, **10**, 166-170.
22. Sonawane P.J., Gupta V., Sasi B.K., Kalyani A., Natarajan B., Khan A.A., Sahu B.S., Mahapatra N.R. (2014) *Biochemistry*, **53**, 6878-6892.
23. Desir G.V. (2009) *Kidney Int.*, **76**, 366-370.
24. Guo X., Wang L., Velazquez H., Safirstein R., Desir G.V. (2014) *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **23**, 513-518.
25. Baroni S., Milani M., Pandini V., Pavesi G., Horner D., Aliverti A. (2013) *Curr. Pharm. Des.*, **19**, 2540-2551.
26. Fedchenko V.I., Kaloshin A.A., Mezhevnikina L.M., Buneeva O.A., Medvedev A.E. (2013) *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 12764-12779.
27. Pandini V., Ciriello F., Tedeschi G., Rossoni G., Zanetti G., Aliverti A. (2010) *Protein Expr. Purif.*, **72**, 244-253.
28. Milani M., Ciriello F., Baroni S., Pandini V., Canevari G., Bolognesi M., Aliverti A. (2011) *J. Mol. Biol.*, **411**, 463-473.
29. Beaupre B.A., Carmichael B.R., Hoag M.R., Shah D.D., Moran G.R. (2013) *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 13980-13987.
30. Beaupre B.A., Hoag M.R., Carmichael B.R., Moran G.R. (2013) *Biochemistry*, **52**, 8929-8937.
31. Fedchenko V.I., Buneeva O.A., Kopylov A.T., Veselovsky A.V., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2015) *Int. J. Biol. Macromol.*, **78**, 347-353.
32. Hoag M.R., Roman J., Beaupre B.A., Silvaggi N.R., Moran G.R. (2015) *Biochemistry*, **54**, 3791-3802.
33. Li G., Xu J., Wang P., Velazquez H., Li Y., Wu Y., Desir G.V. (2008) *Circulation*, **117**, 1277-1282.
34. Wang Y., Xie B.Q., Gao W.H., Yan D.Y., Zheng W.L., Lu Y.B., Cao Y.M., Hu J.W., Yuan Z.Y., Mu J.J. (2015) *Kidney Blood Press Res.*, **40**, 605-613.
35. Li X., Lin M., Xie Z., Huang R., Chen A.F., Jiang W. (2015) *Herz*, Nov 26. [Epub ahead of print]
36. Zheng W.L., Wang J., Mu J.J., Liu F.Q., Yuan Z.Y., Wang Y., Wang D., Ren K.Y., Guo T.S., Xiao H.Y. (2015) *Exp. Biol. Med.* (Maywood), Nov 8. [Epub ahead of print]
37. Quelhas-Santos J., Sampaio-Maia B., Simões-Silva L., Serrão P., Fernandes-Cerqueira C., Soares-Silva I., Pestana M. (2013) *J. Hypertens.*, **31**, 543-552.
38. Gu R., Lu W., Xie J., Bai J., Xu B. (2011) *PLoS One*, **6**(1), e14633.
39. Горкин В.З., Медведев А.Е. (1995) в кн.: Белки и пептиды т.1, М.: Наука, с. 83-88.
40. Федченко В.И., Бунеева О.А., Копылов А.Т., Калошин А.А., Аксенова Л.Н., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2012) *Биомед. химия*, **58**, 599-607.
41. Moran G.R. (2015) *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, 177-186.
42. Beaupre B.A., Hoag M.R., Moran G.R. (2015) *Arch. Biochem. Biophys.*, **579**, 62-66.
43. Sun M., Zigman S. (1978) *Anal. Biochem.*, **90**, 81-89.
44. Сирота Т.В. (2015) *Биомед. химия*, **61**, 115-124.
45. Desir G.V., Tang L., Wang P., Li G., Sampaio-Maia B., Quelhas-Santos J., Pestana M., Velazquez H. (2012) *J. Am. Heart Assoc.*, **1**(4), e002634.
46. Quelhas-Santos J., Sampaio-Maia B., Remião F., Serrão P., Soares-Silva I., Desir G.V., Pestana M. (2015) *Open Hypertension Journal*, **7**, 14-18.
47. Berry C., Hamilton C.A., Brosnan M.J., Magill F.G., Berg G.A., McMurray J.J.V., Dominiczak A.F. (2000) *Circulation*, **101**, 2206-2212.
48. Guzik T.J., Mussa S., Gastaldi D., Sadowski J., Ratnatunga C., Pillai R., Channon K.M. (2002) *Circulation*, **105**, 1656-1662.
49. Kalinowski L., Malinski T. (2004) *Acta Biochim Pol.*, **51**, 459-469.
50. Chung H.Y., Baek B.S., Song S.H., Kim M.S., Im Huh J., Shim K.H., Kim K.W., Lee K.H. (1997) *Age*, **20**, 127-140.
51. Desco M.-C., Asensi M., Marquez R., Martínez-Valls J., Vento M., Pallardo F.V., Sastre J., Vina J. (2002) *Diabetes*, **51**, 1118-1124.
52. Beaupre B.A., Hoag M.R., Roman J., Forsterling F.H., Moran G.R. (2015) *Biochemistry*, **54**, 795-806.
53. Kaplan N.O., Ciotti M.M., Stolzenbach F.E., Bacher N.R. (1955) *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 815-816.
54. Miyake Y., Gaylor J.L. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 7345-7352.
55. Smith S.L., Burchall J.J. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4619-4623.
56. Malyszko J., Zbroch E., Malyszko J.S., Koc-Zorawska E., Mysliwiec M. (2011) *Transplant. Proceed.*, **43**, 3004-3007.
57. Zbroch E., Koc-Zorawska E., Malyszko J., Mysliwiec M. (2013) *Renal Fail.*, **35**, 673-679.
58. Wang F., Li J., Xing T., Xie Y., Wang N. (2015) *Clin. Exp. Nephrol.*, **19**, 92-98.
59. Rybi-Szuminska A., Michaluk-Skutnik J., Osipiuk-Remza B., Kossakowska A., Wasilewska A. (2014) *Pediatr. Nephrol.*, **29**, 2191-2195.
60. Agarraberes F.A., Dice J.F. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1513**, 1-24.
61. Adachi J., Kumar C., Zhang Y., Olsen J.V., Mann M. (2006) *Genome Biol.* **7** (9), R80.
62. Kania K., Byrnes E.A., Beilby J.P., Webb S.A., Strong K.J. (2010) *Ann. Clin. Biochem.*, **47**(Pt. 2), 151-157.
63. Shi W.B., Wang H.Y. (2015) *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **8**, 9505-9511.
64. Wang Y., Chu C., Ren J., Mu J.J., Wang D., Liu F.Q., Ren K.Y., Guo T.S., Yuan Z.Y. (2014) *Kidney Blood Press Res.*, **39**, 497-506.
65. Zhang R., Li X., Liu N., Guo X., Liu W., Ning C., Wang Z., Sun L., Fu S. (2013) *Neuromolecular Med.*, **15**, 396-404.
66. Buraczynska M., Zukowski P., Buraczynska K., Mozul S., Ksiazek A. (2011) *Neuromolecular Med.*, **13**(4), 321-327.
67. 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. (Berl)*, **85**, 877-885.
68. Fujimoto S., Mori M., Tsushima H. (2003) *Eur. J. Pharmacol.*, **459**, 65-73.
69. Fujimoto S., Asano T., Sakai M., Sakura K., Takagi D., Yoshimoto N., Itoh T. (2001) *Eur. J. Pharmacol.*, **412**, 291-300.

70. Miura H., Bosnijak J.J., Ning G., Saito T., Miura M., Gutterman D.D. (2003) *Circ. Res.*, **92**, e31-40.
71. 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.
72. Smyth L., Babalova J., Mondosa M., Lew C. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 48895-49903.
73. Medvedev A.E. (2015) *Cardiology*, **131**, 53-54.
74. Guo X., Wang L., Velazquez H., Safirstein R., Desir G.V. (2014) *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **23**, 513-518.
75. Wang L., Velazquez H., Moeckel G., Chang J., Ham A., Lee H.T., Safirstein R., Desir G.V. (2014) *J. Am. Soc. Nephrol.*, **25**, 1226-1235.
76. Wang L., Velazquez H., Chang J., Safirstein R., Desir G.V. (2015) *PLoS ONE*, **10**(4), e0122932.

Поступила: 11. 07. 2015.

THE HISTORY OF RENALASE FROM AMINE OXIDASE TO α -NAD(P)H-OXIDASE/ANOMERASE

I.S. Severina, V.I. Fedchenko, A.V. Veselovsky, A.E. Medvedev

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

Renalase is a recently discovered secretory protein, which plays a certain (still poorly understood) role in regulation of blood pressure. The review summarizes own and literature data accumulated since the first publication on renalase (2005). Initial reports on FAD-dependent amine oxidase activity of this protein were not confirmed in independent experiments performed in different laboratories. In addition, proposed amine oxidase activity of circulating extracellular renalase requires the presence of FAD, which has not been detected either in blood or urinary renalase. Moreover, renalase excreted into urine lacks its N-terminal peptide, which is ultimately needed for accommodation of the FAD cofactor. Results of the Aliverti's group on NAD(P)H binding by renalase and weak diaphorase activity of this protein stimulated further studies of renalase as NAD(P)H oxidase catalyzing reaction of catecholamine co-oxidation. However, physiological importance of such extracellular catecholamine-metabolizing activity (demonstrated in one laboratory and not detected in another laboratory) remains unclear due to existence of much more active enzymatic systems (e.g. neutrophil NAD(P)H oxidase, xanthine oxidase/xanthine) in circulation, which can perform such co-oxidation reactions. Recently α -NAD(P)H oxidase/anomerase activity of renalase, which also promotes oxidative conversion of β -NADH isomers inhibiting activity of NAD-dependent dehydrogenases, has been described. However, its possible contribution to the antihypertensive effect of renalase remains unclear. Thus, the antihypertensive effect of renalase still remains a phenomenon with unclear biochemical mechanism(s) and functions of intracellular and extracellular (circulating) renalases obviously differ.

Key words: renalase, N-terminal peptide, FAD-binding domain, catalytic functions, antihypertensive effect