

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ ПОЧЕК КРЫС С ПЕПТИДОМ РЕНАЛАЗЫ RP220 И ЕГО ПОТЕНЦИАЛЬНЫМ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИМ ФРАГМЕНТОМ RP224-232: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТЕОМОВ

О.А. Бунеева^{1*}, В.И. Федченко¹, О.В. Гнеденко¹, С.А. Калошина¹,
М.В. Медведева², М.Г. Завьялова¹, А.С. Иванов¹, В.Г. Згода¹, А.Е. Медведев¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: olbuneeva@gmail.com

²Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Реналаза (RNLS) — белок, которому свойственны различные функции внутри и снаружи клеток. Двадцатичленный синтетический пептид, соответствующий аминокислотной последовательности RNLS человека 220–239 (RP220), проявляет ряд фармакологически привлекательных активностей *in vitro* и *in vivo* и может связываться со многими внутриклеточными белками почек. При этом последовательность RP220 содержит несколько участков расщепления внеклеточными и циркулирующими в крови протеазами. В данной работе мы исследовали взаимодействие модельных белков с пептидом реналазы RP220 и синтетическим пептидом, соответствующим аминокислотной последовательности RNLS 224–232 и названным RP224-232. Мы также выполнили протеомное профилирование белков почек нормотензивных крыс с этими пептидами в качестве аффинных лигандов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что оба пептида проявляют практически одинаковое сродство к модельным белкам (пируваткиназе и лактатдегидрогеназе), а протеомные профили почек незначительно отличаются. При этом относительное содержание ряда связавшихся с пептидом RP224-232 белков почек было даже выше, чем в случае использования RP220. Это свидетельствует о том, что протеолитический процессинг RP220 не только не будет приводить к инактивации этого пептида, но будет способствовать появлению дополнительных свойств, которые могут найти фармакологическое применение.

Ключевые слова: реналаза; протеолитический процессинг; реналазные пептиды RP220 и RP224-232; SPR-биосенсор; протеомное профилирование почки крысы

DOI: 10.18097/PBMCR1559

ВВЕДЕНИЕ

Реналаза (RNLS) — открытый двадцать лет назад белок, вовлеченный в регуляцию артериального давления, которому свойственны различные функции внутри и снаружи клеток [1–5]. Внутриклеточная RNLS — FAD-зависимая оксидоредуктаза (КФ 1.6.3.5), которая катализирует реакцию окисления изомерных форм β -NAD(P)H, восстановленных по 2 или 6 положению никотинамидного кольца вместо метаболически активного 4 положения [5, 6]. Внеклеточная RNLS, лишённая N-концевого сигнального пептида в процессе секреции этого белка во внеклеточное пространство, проявляет регуляторные эффекты при помощи некаталитических (и FAD-независимых) механизмов [7–11]. С учётом известных данных об отсутствии в крови интактной (лишённой N-концевого пептида) RNLS [12] и о протеолитическом расщеплении рекомбинантной RNLS при инкубации с плазмой крови здоровых добровольцев [13], становится всё более очевидным, что эффекты внеклеточной RNLS, по-видимому, реализуются пептидами, образующимися в ходе протеолитического процессинга. Одним из наиболее интересных реналазных пептидов, привлекающих внимание исследователей, стал пептид RP220 — 20-членный пептид, соответствующий аминокислотной

последовательности RNLS 220–239 [10, 11]. В пользу его критически важной регуляторной роли свидетельствует тот факт, что именно этот пептид воспроизводит ряд эффектов внеклеточной RNLS [10].

Протеомное профилирование почек нормотензивных (WKY) и гипертензивных (SHR) крыс с использованием RP220 пептида в качестве аффинного лиганда выявило изменения относительного содержания связавшихся с аффинным сорбентом около 200 индивидуальных белков почек гипертензивных крыс по сравнению с почками нормотензивных животных [14]. Связавшиеся с RP220 белки, для которых обнаружено наиболее выраженное увеличение относительного содержания у гипертензивных животных по сравнению с нормотензивными, играют определённую роль в развитии сердечно-сосудистой патологии [14]. Последнее может иметь определённое значение в регуляторных эффектах этого пептида. При этом по данным проведённого анализа аминокислотной последовательности RNLS [13], в районе аминокислотных остатков 220–239 есть потенциальные участки протеазного расщепления. В связи с этим возникает естественный вопрос, насколько может измениться взаимодействие модифицированного протеазами пептида RP220 со своими белками-мишенями.



В данной работе мы исследовали взаимодействие модельных белков с пептидом реналазы RP220 и синтетическим пептидом, соответствующим аминокислотной последовательности RNLS 224–232 и названным RP224-232. Мы также выполнили протеомное профилирование белков почек нормотензивных крыс с этими пептидами в качестве аффинных лигандов.

МЕТОДИКА

Реактивы

В работе использовались следующие реактивы: бромциан-активированная сефароза 4В, гидрокарбонат аммония, дитиотреитол, мочевины, гуанидин гидрохлорид, хлористый натрий, тритон X-100, 4-винилпиридин, Кумасси бриллиантовый синий G-250 (“Merck”, США); муравьиная кислота, ацетат натрия, борная кислота, тетраборат натрия, гидроксид натрия (“Acros Organics”, США), ацетонитрил (“Fisher Chemical”, Великобритания); изопропанол, трифторуксусная кислота (“Fluka”, США); трис-(2-карбоксиил)-фосфин (“Pierce”, США); модифицированный трипсин (mass spectrometry grade, “Promega”, США). Препараты пептида реналазы RP220 и его фрагмента RP224-232 были синтезированы в “ООО Белкиантитела” (Россия). HBS-EP+ (150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% детергент P20, 10 mM HEPES (pH 7,4)); 10 mM ацетатные буферы (pH 4,0, pH 5,0); набор реагентов для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминогруппы (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-HCl (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), 1 M этаноламин-HCl (pH 8,5)) были получены от “Cytiva” (США). Для биосенсорного исследования взаимодействия с пептидами RNLS внутриклеточных белков использовали электрофоретически гомогенные препараты пируваткиназы (ПК) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), выделенные из скелетных мышц кролика [15, 16]. Удельная активность ПК составляла 280 мкмоль/мин на 1 мг белка, ЛДГ — 495 мкмоль/мин на 1 мг белка. Ферменты хранили при 4°C в суспензии сульфата аммония.

Остальные реактивы были отечественного производства максимально доступной чистоты.

Экспериментальные животные

В экспериментах использовали 14-недельных крыс-самцов линии WKY, полученных из питомника лабораторных животных Пушино (филиал Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук). Животных декапитировали под лёгким эфирным наркозом, быстро удаляли почки, которые немедленно замораживали и хранили до исследования при температуре -70°C.

Получение лизатов гомогенатов почек крыс

Ткань почек гомогенизировали при помощи гомогенизатора Heidolph SilentCrusher (Германия) (50000 оборотов в минуту) в 0,05 M калий-фосфатном буфере (pH 7,4) до конечной концентрации 30 мг/мл.

Для оценки относительных количественных изменений содержания белков при подготовке проб использовали одинаковое количество общего белка, которое контролировали с помощью метода Бредфорда [17]. После инкубации в присутствии 3% Тритона X-100 (4°C, 1 ч) лизаты разводили в 3 раза тем же буфером и центрифугировали 30 мин при 16000 g для получения осветлённой надосадочной жидкости.

Аффинная хроматография белков почек крыс с использованием пептидов реналазы RP220 и его протеолитического фрагмента RP224-232, иммобилизованных на бромциан-активированной сефарозе

Подготовку аффинных сорбентов и аффинную хроматографию проводили согласно ранее описанному протоколу [14].

Масс-спектрометрический анализ

Условия масс-спектрометрического анализа подробно приведены в [14, 18]. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием оборудования центра коллективного пользования “Протеом человека” НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича (ИБМХ).

Биосенсорное исследование взаимодействия белков с иммобилизованными пептидами

Анализ взаимодействия исследуемых белков с иммобилизованными пептидами выполняли на оптическом биосенсоре Biacore X-100 (“Cytiva”). Все измерения выполнены при 25°C с использованием оптических чипов CM5 (“Cytiva”), покрытых слоем карбоксиметилированного декстрана. Сигнал биосенсора Biacore X-100 регистрировали в резонансных единицах RU (1 RU соответствует связыванию 1 пг белка на поверхности оптического чипа).

Иммобилизацию пептидов осуществляли путём формирования ковалентных связей между карбоксильными группами на поверхности оптического чипа CM5 и аминогруппами пептида. Карбоксильные группы чипа активировали смесью 0,2 M EDC/0,05 M NHS в течение 7 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Далее инжестировали растворы пептидов реналазы (200 мкг/мл) в 10 mM ацетатном буфере (pH 5,0 для пептида RP220, pH 4,0 для пептида RP224-232) в течение 15 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Непрореагировавшие карбоксильные группы блокировали инъекцией 1 M этаноламин-HCl (pH 8,5) в течение 3 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Исследовали взаимодействие белков с иммобилизованными пептидами в 50 mM фосфатном буфере (pH 7,4), время инъекции 5 мин, скорость потока 10 мкл/мин. Между инъекциями белков поверхность чипа с иммобилизованными пептидами регенерировали промыванием 1 M NaCl в 50 mM фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 0,5 мин при скорости потока 30 мкл/мин. Полученные сенсограммы анализировали с помощью программы BIAevaluation Version 4.1.1 (“Cytiva”).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование взаимодействия модельных внутриклеточных белков (ПК и ЛДГ), ранее идентифицированных в ходе протеомного профилирования препаратов почек крыс, с пептидом RP220 [14], иммобилизованным на CM5 чипе, показало, что данный пептид проявлял умеренное сродство к исследованным белкам (рис. 1, табл. 1). Пептид RP224-232, соответствующий потенциальному протеолитическому фрагменту пептида RP220, также взаимодействовал с исследованными белками, демонстрируя сопоставимое с RP220 сродство (табл. 1). Последнее свидетельствует в пользу того, что наиболее важные в контексте взаимодействия RP220 со своими (во всяком случае, модельными) мишенями аминокислотные последовательности включают остатки 224-VSIDNKKRN-232.

Протеомное профилирование белков почек крысы, связавшихся с пептидом реназы RP220 и с его протеолитическим фрагментом RP224-232, показало, что оба модельных белка принадлежат к общему пулу связавшихся с пептидами белков.

Этот общий пул (2233 белка) существенно превышал группы белков, связавшихся исключительно с пептидом RP220 и с пептидом RP224-232 (16 и 61 соответственно) (рис. 2, табл. 2 и таблицы Дополнительных материалов S1 и S2). В таблице 2 приведены данные по распределению белков, специфически связавшихся с пептидом RP220 и его фрагментом RP224-232, по функциям.

При этом обнаружено достоверное увеличение относительного содержания в 2 и более раз у 29 белков, связавшихся с пептидом RP224-232, по сравнению с аналогичными белками, связавшимися с пептидом RP220. Наибольшее увеличение относительного содержания отмечено для креатинкиназы1 (более, чем в 34 раза), дигидропиримидиназа-подобного белка 2 (более, чем в 26 раз) и митохондриального белка теплового шока 60 кДа (почти в 15 раз). Также заметно увеличилось относительное содержание (в 6–9 раз) связавшихся с фрагментом RP224-232 (по сравнению со связавшимися с полноразмерным пептидом RP220) белков Т-комплекса, малатдегидрогеназы, транскетолазы, белков теплового шока 10 кДа и 70 кДа, цитозольной неспецифической

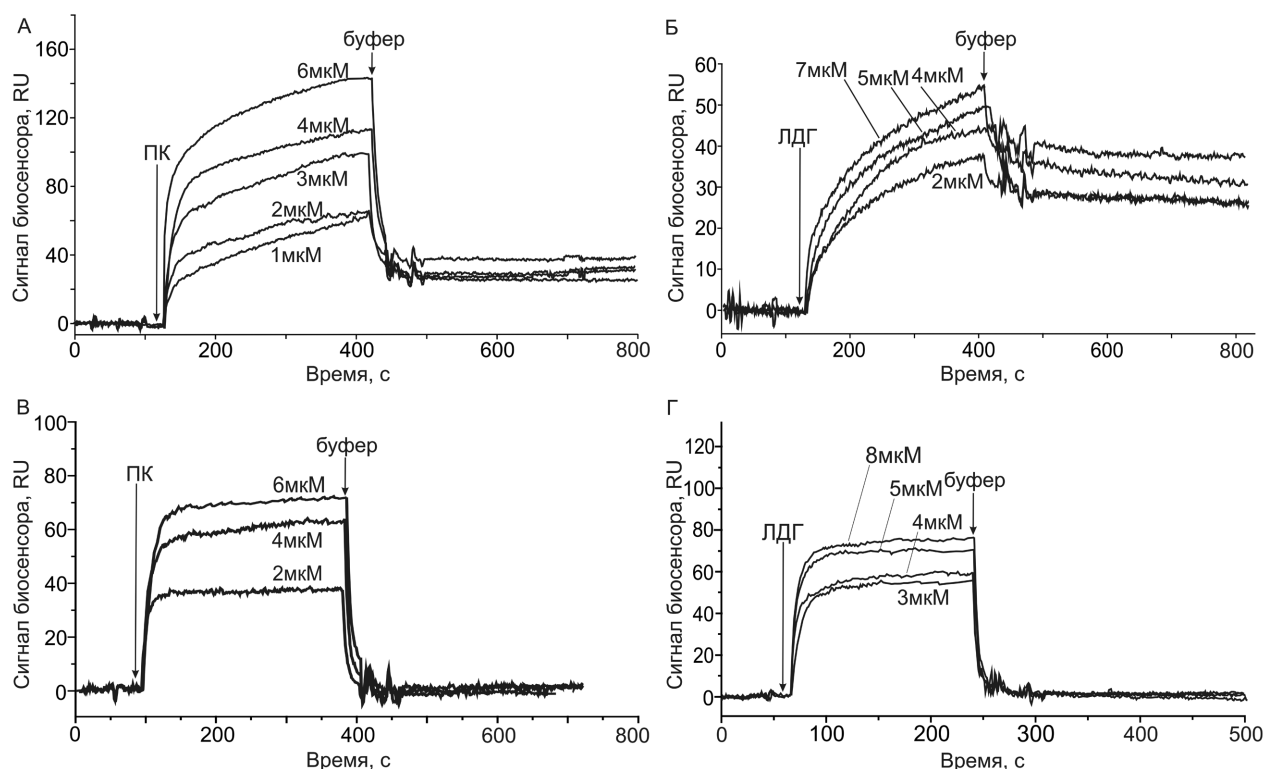


Рисунок 1. Взаимодействие реназных пептидов RP220 (А, Б) и RP224-232 (В, Г), иммобилизованных на чипе оптического биосенсора Biacore, с ПК и ЛДГ из мышц кролика.

Таблица 1. Значения констант диссоциации для комплексов пептидов RP220 и RP224-232 с ПК и ЛДГ

Комплекс	K_d , М	Последовательность пептида и его положение в первичной структуре реназы* человека
RP220/ПК	$1,94 \cdot 10^{-6}$	220-CIRF VSIDNKKRN IESSEIG-239
RP220/ЛДГ	$9,24 \cdot 10^{-7}$	220-CIRF VSIDNKKRN IESSEIG-239
RP224-232/ПК	$3,04 \cdot 10^{-6}$	224- VSIDNKKRN -232
RP224-232/ЛДГ	$1,39 \cdot 10^{-6}$	224- VSIDNKKRN -232

Примечание: * – жирным шрифтом с подчёркиванием выделены аминокислотные остатки, общие для обоих пептидов.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТЕОМОВ СВЯЗАВШИХСЯ С RP220 И RP224-232

Таблица 2. Распределение белков, специфически связавшихся с пептидом RP220 и его фрагментом RP224-232, по функциям

Функции	Белки, связавшиеся исключительно с пептидом RP220	Белки, связавшиеся исключительно с пептидом RP224-232	Увеличение относительного содержания белков, связавшихся с RP224-232, по сравнению с пептидом RP220	Уменьшение относительного содержания белков, связавшихся с RP224-232, по сравнению с пептидом RP220
Генерация энергии и углеводный обмен	0	2	5	0
Цитоскелет, транспорт и экзоцитоз	7	10	5	1
Передача сигнала и регуляция активности ферментов	7	15	1	2
Антиоксидантные и защитные свойства	1	1	8	0
Регуляция экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки	0	14	5	1
Метаболизм белков, аминокислот и других азотистых соединений	2	16	5	0
Метаболизм липидов	0	3	0	0
Всего	17	61	29	4

дипептидазы, рибосомных белков eL30 и uS10, пероксиредоксина 6, бета-субъединицы гемоглобина (рис. 3, Дополнительные материалы, табл. S3). Относительное содержание гистонов H2A, H2B, H1.2 и H4, а также виментина увеличилось приблизительно в 5 раз, относительное содержание альфа и бета субъединиц АТФ синтазы — более, чем в 4 и 3 раза соответственно; относительное содержание рибосомных белков S4 и uL6 и гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина A3 — более, чем в три раза. Более чем в два раза повысилось относительное содержание цитоскелетных белков (тубулин бета, филамин, тяжёлая цепь клатрина) и белка теплового шока 1B из семейства HSP70 (Дополнительные материалы, табл. S3).

Снижение относительного содержания было обнаружено всего для четырёх белков, связавшихся с RP224-232 (по сравнению с RP220). Это аннексин 1 (*Anxa1*, в 10 раз), тяжёлая цепь 9 миозина (*Myh 9*, в 5 раз), родственный Ras белок Rab-11A (*Rab11a*, в 2,3 раза), фактор элонгации 2 (*Eef2*, в 1,5 раза) (рис. 4, Дополнительные материалы, табл. S3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что возможное протеолитическое расщепление двадцатичленного пептида RP220 с образованием нанопептида RP224-232 незначительно влияет на качественный состав фракций белков, связавшихся с этими пептидами. Принимая во внимание данные биосенсорного анализа по взаимодействию модельных белков (ПК и ЛДГ) с иммобилизованными пептидами, можно предположить, что при таком укорочении RP220 сохраняются ключевые аминокислотные остатки



Рисунок 2. Диаграмма Венна: количество белков почек крысы, связавшихся с пептидами RP220 и RP224-232.

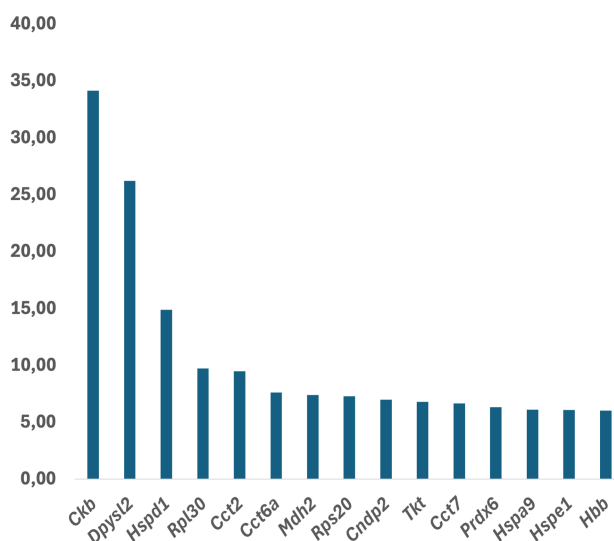


Рисунок 3. Связавшиеся с пептидом RP224-232 белки почек нормотензивных крыс, относительное содержание которых увеличивается по сравнению с белками, связавшимися с пептидом RP220 (обозначены гены белков, изменение относительного содержания которых наиболее выражено, названия белков приведены в таблице S3 Дополнительных материалов).

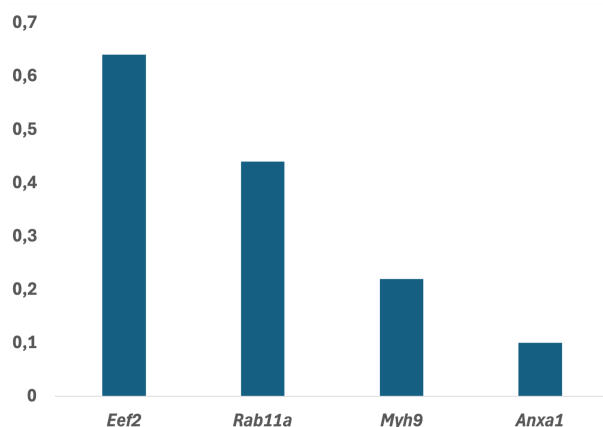


Рисунок 4. Связавшиеся с пептидом RP224-232 белки почек нормотензивных крыс, относительное содержание которых уменьшается по сравнению с белками, связавшимися с пептидом RP220 (обозначены гены белков, названия приведены в таблице S3 Дополнительных материалов).

(VSIDNKKRN), определяющие взаимодействие исследованных пептидов с белками. Следует отметить, что количество белков, связавшихся с иммобилизованным нанопептидом, было для большинства белков выше, чем в случае иммобилизованного RP220. Это позволяет предположить, что дальнейший протеолитический процессинг не только не будет приводить к инактивации этого пептида, но будет способствовать появлению дополнительных свойств (биологических активностей), которые могут найти фармакологическое применение.

БЛАГОДАРНОСТИ

Масс-спектрометрический и биосенсорный анализ белков был выполнен с использованием оборудования и ресурсов ЦКП “Протеом человека” при ИБМХ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили с соблюдением общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным, в соответствии с Приказом Минздрава РФ №199н от 1 апреля 2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

- Xu J., Li G., Wang P., Velazquez H., Yao X., Li Y., Wu Y., Peixoto A., Crowley S., Desir G.V. (2005) Renalase is a novel, soluble monoamine oxidase that regulates cardiac function and blood pressure. *J. Clin. Invest.*, **115**(5), 1275–1280. DOI: 10.1172/JCI24066
- Medvedev A.E., Veselovsky A.V., Fedchenko V.I. (2010) Renalase, a new secretory enzyme responsible for selective degradation of catecholamines: achievements and unsolved problems. *Biochemistry (Moscow)*, **75**(8), 951–958. DOI: 10.1134/S0006297910080018
- Baroni S., Milani M., Pandini V., Pavesi G., Horner D., Aliverti A. (2013) Is renalase a novel player in catecholaminergic signaling? The mystery of the catalytic activity of an intriguing new flavoenzyme. *Curr. Pharm. Des.*, **19**(14), 2540–2551. DOI: 10.2174/1381612811319140005
- Desir G.V., Peixoto A.J. (2014) Renalase in hypertension and kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **29**(1), 22–28. DOI: 10.1093/ndt/gft083
- Moran G.R., Hoag M.R. (2017) The enzyme: renalase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **632**, 66–76. DOI: 10.1016/j.abb.2017.05.015
- Beaupre B.A., Hoag M.R., Roman J., Forsterling F.H., Moran G.R. (2015) Metabolic function for human renalase: oxidation of isomeric forms of beta-NAD(P)H that are inhibitory to primary metabolism. *Biochemistry*, **54**(3), 795–806. DOI: 10.1021/bi5013436
- 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
- Kolodecik 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
- Wang L., Velazquez H., Chang J., Safirstein R., Desir G.V. (2015) Identification of a receptor for extracellular renalase. *PLOS One*, **10**(4), e0122932. DOI: 10.1371/journal.pone.0122932
- 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
- Kolodecik T.R., Guo X., Shugrue C.A., Guo X., Desir G.V., Wen L., Gorelick F. (2024) Renalase peptides reduce pancreatitis severity in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **327**(3), G466–G480. DOI: 10.1152/ajpgi.00143.2024
- Medvedev A., Kopylov A., Fedchenko V., Buneeva O. (2020) Is renalase ready to become a biomarker of ischemia? *Int. J. Cardiol.*, **307**, 179. DOI: 10.1016/j.ijcard.2019.09.045
- 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
- Бунеева О.А., Федченко В.И., Калошина С.А., Завьялова М.Г., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2024) Протеомное профилирование почек нормо- и гипертензивных крыс с использованием реналазного пептида RP220 в качестве аффинного лиганда. *Биомедицинская химия*, **70**(3), 145–155. [Buneeva O.A., Fedchenko V.I., Kaloshina S.A., Zavyalova M.G.,

- Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2024) Proteomic profiling of renal tissue of normo- and hypertensive rats with the renalase peptide RP220 as an affinity ligand. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **70**(3), 145–155.] DOI: 10.18097/PBMC20247003145
15. *Scopes R.K., Stoter A.* (1982) Purification of all glycolytic enzymes from one muscle extract. *Methods Enzymol.*, **90 Pt E**, 479–490.
16. *Buneeva O., Kopylov A., Gnedenko O., Medvedeva M., Veselovsky A., Ivanov A., Zgoda V., Medvedev A.* (2023) Proteomic profiling of mouse brain pyruvate kinase binding proteins: a hint for moonlighting functions of PKM1? *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(8), 7634. DOI: 10.3390/ijms24087634
17. *Bradford M.M.* (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
18. *Бунеева О.А., Копылов А.Т., Гнеденко О.В., Медведева М.В., Капица И.Г., Иванова Е.А., Иванов А.С., Медведев А.Е.* (2021) Изменение митохондриального субпротеома Rpn13-связывающих белков мозга мыши под действием нейротоксина МФТП и нейропротектора изатина. *Биомедицинская химия*, **67**(1), 51–65. [*Buneeva O.A., Kopylov A.T., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Ivanov A.S., Medvedev A.E.* (2021) Changes in the mitochondrial subproteome of mouse brain Rpn13-binding proteins induced by the neurotoxin MPTP and the neuroprotector isatin. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **67**(1), 51–65.] DOI: 10.18097/PBMC20216701051

Поступила в редакцию: 20. 01. 2025.
После доработки: 07. 02. 2025.
Принята к печати: 10. 02. 2025.

INTERACTION OF RAT KIDNEY PROTEINS WITH THE RENALASE PEPTIDE RP220 AND ITS POTENTIAL PROTEOLYTIC FRAGMENT RP224-232: A COMPARATIVE PROTEOMIC ANALYSIS

O.A. Buneeva^{1}, V.I. Fedchenko¹, O.V. Gnedenko¹, S.A. Kaloshina¹, M.V. Medvedeva², M.G. Zavyalova¹, A.S. Ivanov¹, V.G. Zgoda¹, A.E. Medvedev¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: olbuneeva@gmail.com

²Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

Renalase (RNLS) is a protein playing different roles inside and outside cells. A 20-mer synthetic peptide corresponding to the human RNLS amino acid sequence 220–239 (RP220) exhibits a number of pharmacologically attractive activities *in vitro* and *in vivo* and can bind to many renal intracellular proteins. The RP220 sequence contains several cleavage sites for extracellular and circulating proteases. Here, we investigated the interaction of model proteins with the renalase peptide RP220 and a synthetic peptide corresponding to the amino acid sequence of RNLS 224–232, named RP224-232. We also performed affinity-based proteomic profiling of normotensive rat kidney samples with these peptides as affinity ligands. The obtained results indicate that both peptides exhibit almost the same affinity for model proteins (pyruvate kinase and lactate dehydrogenase), and the kidney proteomic profiles differ slightly. At the same time, the relative content of a number of kidney proteins bound to the RP224-232 peptide was even higher than in the case of using RP220. This suggests that proteolytic processing of RP220 does not inactivate this peptide; moreover, it could contribute to the formation of shorter peptides with additional pharmacological activities.

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

Keywords: renalase; proteolytic processing; renalase peptides RP220 and RP224-232; SPR biosensor; proteomic profiling of rat kidney

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: 20.01.2025; revised: 07.02.2025; accepted: 10.02.2025.