

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ ПОЧЕК НОРМО- И ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС С ФРАГМЕНТАМИ РЕНАЛАЗНОГО ПЕПТИДА RP220

О.А. Бунеева\*, В.И. Федченко, С.А. Калошина, М.Г. Завьялова, В.Г. Згода, А.Е. Медведев

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

Реналаза (RNLS) — вовлечённый в регуляцию артериального давления белок, которому свойственны различные функции внутри и снаружи клеток. Двадцатичленный пептид RP220, соответствующий аминокислотной последовательности RNLS человека 220–239, воспроизводит ряд эффектов внеклеточной RNLS и может связываться со многими внутриклеточными белками почек. Последовательность RP220 содержит несколько участков расщепления внеклеточными протеазами, в том числе с образованием пептидов RP224-232 и RP233-239. Целью настоящей работы было протеомное профилирование ткани почек нормотензивных крыс Wistar Kyoto (WKY) и крыс со спонтанной гипертензией SHR (spontaneously hypertensive rats), полученных на основе WKY, с использованием потенциальных протеолитических фрагментов (RP224-232 и RP233-239) пептида RP220 в качестве аффинных лигандов, в сравнении с данными для исходного пептида RP220. Полученные результаты свидетельствуют о том, что относительное содержание связавшихся с RNLS-пептидами белков SHR крыс по сравнению с таковым у крыс WKY наиболее ярко изменяется у пептида RP224-232. Практически все эти белки, за редким исключением, ассоциированы с сердечно-сосудистой патологией, многие с гипертензией. Таким образом, протеолитический процессинг RP220 приводит не к инактивации данного пептида, но к изменению его лигандных/регуляторных свойств, а также репертуара потенциальных белков-партнёров и, следовательно, белок-белковых взаимодействий, которые могут иметь возможное фармакологическое применение.

**Ключевые слова:** реналаза; пептиды реналазы RP220, RP224-232 и RP233-239; артериальная гипертензия; крысы WKY и SHR; протеомное профилирование ткани почек

**DOI:** 10.18097/PBMCR1567

### ВВЕДЕНИЕ

Реналаза (RNLS) — открытый двадцать лет назад секреторный белок, участвующий в регуляции артериального давления, который оказывает регуляторные эффекты при помощи каталитических и некаталитических механизмов [1–5]. Полноразмерная внутриклеточная RNLS — FAD-зависимая оксидоредуктаза (КФ 1.6.3.5), которая катализирует реакцию окисления изомерных форм  $\beta$ -NAD(P)H, восстановленных по 2 или 6 положению никотинамидного кольца вместо метаболически активного 4 положения [6]. Лишённая N-концевого сигнального пептида внеклеточная RNLS, по-видимому, подвергается протеолитическому процессингу [7] с образованием RNLS-пептидов, которые и опосредуют эффекты этого внеклеточного белка.

Одним из наиболее интересных пептидов RNLS, привлекающих внимание исследователей, стал пептид RP220 — 20-членный пептид, соответствующий аминокислотной последовательности RNLS 220–239 [5, 8]. В пользу его критически важной регуляторной роли свидетельствует тот факт, что именно этот пептид воспроизводит ряд эффектов внеклеточной RNLS [5, 8]. Следует отметить, что последовательность RP220 содержит несколько

участков расщепления внеклеточными и циркулирующими в крови протеазами, которые могут образовывать несколько пептидов, включая RP224-232 и RP233-239, соответствующие фрагментам последовательности RNLS 224–232 и 233–239, соответственно [7, 9].

Биосенсорное исследование взаимодействия модельных внутриклеточных белков, связывающихся с пептидом RP220 [10], показало, что пептид RP224-232 также взаимодействовал с исследованными модельными белками, демонстрируя сопоставимое с RP220 сродство. Последнее свидетельствовало в пользу того, что аминокислотные последовательности, наиболее важные в контексте взаимодействия RP220 со своими (во всяком случае, модельными) мишенями, включали остатки 224-VSIDNKKRN-232 [9].

Это позволило предположить, что возможное протеолитическое расщепление двадцатичленного пептида RP220 с образованием пептида RP224-232 незначительно влияет на качественный состав фракций белков, связавшихся с этими пептидами [9]. Однако взаимодействие RP233-239 с потенциальными тканевыми мишенями исследовано не было. В связи с этим целью настоящей работы было сравнительное протеомное профилирование ткани почек нормотензивных и гипертензивных крыс с использованием пептидов RP224-232 и RP233-239.



## МЕТОДИКА

*Реактивы*

В работе использовали: бромциан-активированную сефарозу 4В, гидрокарбонат аммония, дитиотреитол, мочевины, гуанидин гидрохлорид, хлористый натрий, тритон X-100, 4-винилпиридин, Кумасси бриллиантовый синий G-250 (“Merck”, США); муравьиную кислоту, ацетат натрия, борную кислоту, тетраборат натрия, гидроксид натрия (“Acros Organics”, США), ацетонитрил (“Fisher Chemical”, Великобритания); изопропанол, трифторуксусную кислоту (“Fluka”, США); трис-(2-карбоксиэтил)-фосфин (“Pierce”, США); модифицированный трипсин (mass spectrometry grade, “Promega”, США). Девятичленный пептид RNLS RP224-232 (VSIDNKKRN) и семичленный пептид RNLS RP233-239 (IESSEIG), аминокислотные последовательности которых соответствуют фрагментам пептида реналазы человека RP220-239 (CIRFVSIDNKKRNIESSEIG), были синтезированы в фирме “БелкиАнтитела” (Россия). Чистота каждого из этих пептидов составляла 98%. Остальные реактивы были отечественного производства максимально доступной чистоты.

*Экспериментальные животные*

В экспериментах использовали 14-недельных крыс-самцов нормотензивных крыс линии Wistar Kyoto (WKY) (n=6; артериальное давление 110–120 мм рт. ст.) и крыс со спонтанной гипертензией (SHR) (spontaneously hypertensive rats) (n=5; артериальное давление 180+ мм рт. ст.), полученных из питомника лабораторных животных Пушкино (филиал Института биорганической 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 (50000 оборотов в минуту) в 0,05 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4) (буфер А) и разводили этим буфером 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 Bradford [11]. 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 фрагментов пептида RP220, иммобилизованного на бромциан-активированной сефарозе 4В*

Ковалентное связывание фрагментов RP224-232 и RP233-239 пептида RP220 с бромциан-активированной сефарозой 4В (CNBr-сефароза) осуществляли

согласно стандартному протоколу иммобилизации белков/пептидных лигандов [12]. Для определения неспецифически связывающихся с аффинным сорбентом белков использовали контрольную бромциан-активированную сефарозу, которую подвергали тем же процедурам, но без добавления пептидов RNLS.

К аффинному носителю, промытому буфером А, добавляли лизат ткани почек крыс с концентрацией 2 мг/мл. Образцы инкубировали в течение ночи в суспензии (1:1) при 4°C и осторожном перемешивании (при добавлении коктейля ингибиторов протеаз в концентрации, рекомендованной производителем). Последующие процедуры осуществляли при комнатной температуре. После отмывания неспецифически связавшихся белков буфером А с 0,3 М NaCl до исчезновения белка в промывных водах (контроль по D<sub>280</sub>) проводили элюцию 0,2 М глициновым буфером, pH 2,8, содержащим 0,5 М NaCl (скорость элюции составляла 0,5 мл/мин). Элюат концентрировали до объёма 250 мкл с помощью мембранных фильтров Amicon Ultra, как рекомендовано производителем. Затем осаждали белки смесью хлороформ-этанол, как описано в [13].

*Идентификация и сравнение относительного содержания связавшихся с иммобилизованными фрагментами пептида RP220 белков крыс линии WKY и SHR*

Подготовку проб для масс-спектрометрического анализа (восстановление дисульфидных связей, алкилирование сульфгидрильных групп и трипсинолиз) проводили на мембранных центрифужных фильтрах, как описано в [14].

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с использованием оборудования центра коллективного пользования “Протеом человека” (Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ)). Условия масс-спектрометрического анализа подробно приведены в [15].

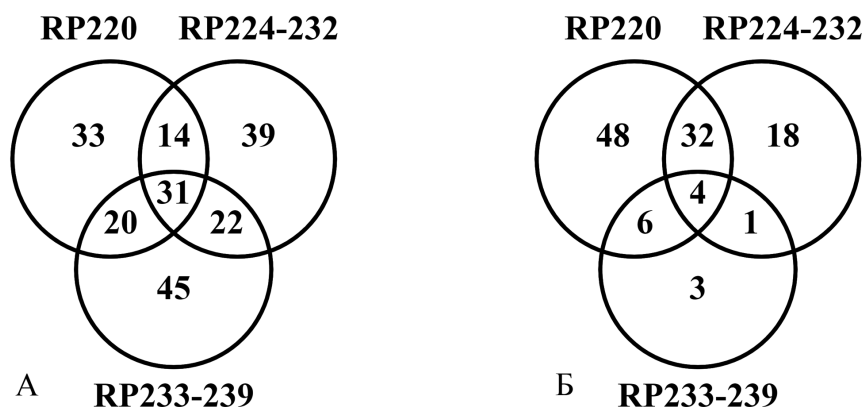
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Протеомное профилирование связавшихся с фрагментами пептида RP220 белков почек нормотензивных крыс и крыс со спонтанной гипертензией (SHR) выявило достаточно большое количество белков, относительное содержание которых увеличивалось в случае гипертензивных животных. Для пептида RP224-232 этот показатель составлял 106, для пептида RP233-239 — 118 (табл. 1, рис. 1, табл. S1 и S3 Дополнительных материалов). В обоих случаях это количество было несколько больше, чем в случае пептида RP220 (98) [10]. Во всех трёх случаях среди белков, относительное содержание которых увеличивалось у крыс SHR, преобладали белки, вовлечённые в регуляцию экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки. При этом количество связавшихся с пептидом RP220 белков, относительное содержание которых снижалось у крыс SHR, было

Таблица 1. Распределение RP220-, RP224-232- и RP233-239-связывающихся белков почек, относительное содержание которых изменяется у крыс SHR, по функциям\*

Функции	Количество белков с увеличенным относительным содержанием у крыс SHR по сравнению с WKY			Количество белков с уменьшенным относительным содержанием у крыс SHR по сравнению с WKY		
	RP220	RP224-232	RP233-239	RP220	RP224-232	RP233-239
Генерация энергии и углеводный обмен	14	16	23	8	6	1
Цитоскелет, транспорт и экзоцитоз	12	9	19	30	25	3
Передача сигнала и регуляция активности ферментов	10	8	10	10	4	2
Антиоксидантные и защитные свойства	15	16	21	8	5	1
Регуляция экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки	33	49	33	31	14	6
Метаболизм белков, аминокислот и других азотистых соединений	10	5	8	3	1	0
Метаболизм липидов	4	3	4	0	0	1
Всего	98	106	118	90	55	14

Примечание. \*Составлена по результатам данных, приведённых в таблицах Дополнительных материалов S1–S4. Данные по пептиду RP220 взяты из статьи [10].



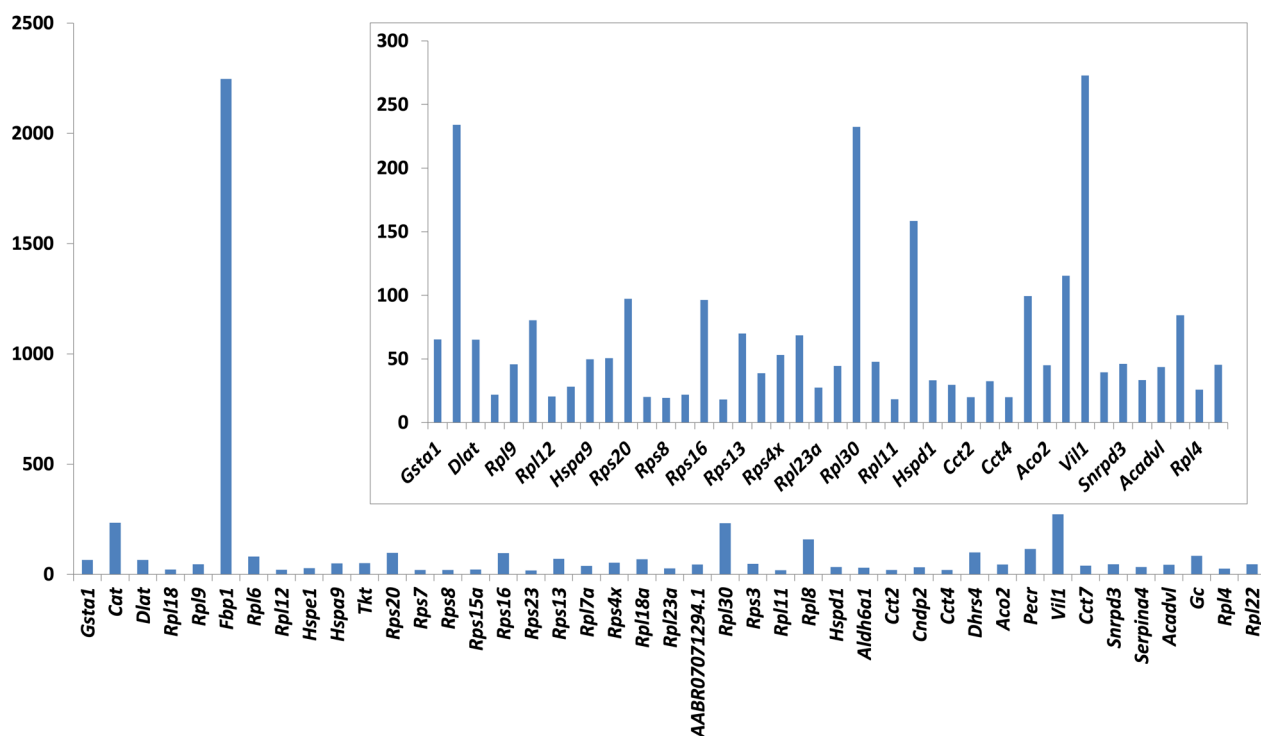
**Рисунок 1.** Связавшиеся с пептидом RP220 и его фрагментами RP224-232 и RP233-239 белки, относительное содержание которых изменяется для почек гипертензивных крыс по сравнению с почками нормотензивных животных. **А** – увеличение относительного содержания. **Б** – уменьшение относительного содержания.

значительно выше, чем в случае его фрагментов RP224-232 и RP233-239 (соответственно 90, 55 и 14) (табл. 1, рис. 1, табл. S2 и S4 Дополнительных материалов). Как в случае пептида RP220, так и в случае его фрагмента RP224-232 преобладали белки, вовлечённые в регуляцию экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки, а также белки цитоскелета, транспорта и экзоцитоза (табл. 1).

Белки, относительное содержание которых выше у крыс SHR, равномерно распределяются по множествам общих для всех трёх пептидов RP220, RP224-232 и RP233-239 и индивидуальным множествам для каждого из этих пептидов (31, 33, 39 и 45 белков соответственно). Сорок пять общих белков с изменяющимся относительным содержанием у гипертензивных животных по сравнению с нормотензивными (WKY) крысами выявлено для пептида RP220 и его фрагмента RP224-232; 51 общий белок соответственно у пептида RP220 и его фрагмента RP233-239 (рис. 1А). Количество белков с уменьшающимся относительным содержанием у крыс SHR, общее для пептида RP220 и

его фрагмента RP224-232 (36 белков), было также сравнимо с числом соответствующих белков, сорбент-специфичных для пептида RP220 (48), и превышает число белков, специфичных для пептида RP224-232 (18). В случае пептида RP233-239 количество белков с уменьшающимся относительным содержанием у крыс SHR по сравнению с крысами WKY незначительно (всего 14) (табл. 1, рис. 1Б).

Изменение относительного содержания белков у крыс SHR по сравнению с крысами WKY особенно наглядно проявляется в случае фрагмента RP224-232. Например, для фруктозо-1,6-бисфосфатазы 1 происходит увеличение относительного содержания более чем в 2000 раз. Значительно увеличивается относительное содержание рибосомных белков 60S субчастицы: L4, L6, L7a, L8, L9, L11, L12, L18, L18a, L22, L23a, L30 (от 20 до более чем в 230 раз), а также рибосомных белков 40S субчастицы: S3, S4, S7, S8, S12, S13, S15a, S20, S23, S25 (от 20 до почти в 100 раз) (табл. 2, рис. 2). Относительное содержание связавшейся с пептидом RP224-232 каталазы возрастает у гипертензивных крыс



**Рисунок 2.** Связавшиеся с пептидом RP224-232 белки почек гипертензивных крыс, относительное содержание которых увеличивается по сравнению с контрольными животными (обозначены гены, кодирующие белки, изменение относительного содержания которых наиболее выражено). На врезке – то же без фруктозо-1,6-бисфосфатазы 1.

**Таблица 2.** Связавшиеся с пептидом RP224-232 белки почек крысы, относительное содержание которых увеличивается у гипертензивных животных по сравнению с нормотензивными в 18 и более раз

№	Номер в базе Uniprot	Ген по Uniprot	Название белка по Uniprot	Функции	Локализация	Кратное увеличение		Роль при сердечно-сосудистой патологии
						RP224-232	RP220	
1	P00502	<i>Gsta1</i>	Glutathione S-transferase alpha-1	4	Ц	65,325	—	—
2	P04762	<i>Cat</i>	Catalase	4	П, Мх, ЭПР	233,931	—	[16]
3	P08461	<i>Dlat</i>	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	1	Мх	65,208	—	[17, 18]
4	P12001	<i>Rpl18</i>	60S ribosomal protein L18	5	Ц, ЭПР	21,946	4,708	[19–22]
5	P17077	<i>Rpl9</i>	60S ribosomal protein L9	5	Ц	45,834	2,780	[19–22]
6	P19112	<i>Fbp1</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	1	Ц	2246,794	159,786	[23–25]
7	P21533	<i>Rpl6</i>	60S ribosomal protein L6	5	Ц, ЭПР	80,472	10,585	[19–22]
8	B2RYU2	<i>Rpl12</i>	60S ribosomal protein L12	5	Ц	20,468	2,842	[19–22]
9	P26772	<i>Hspe1</i>	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	4	Мх	28,237	2,487	[26]
10	P48721	<i>Hspa9</i>	Stress-70 protein, mitochondrial	4	Мх, Я	49,776	6,783	[27]
11	P50137	<i>Tkt</i>	Transketolase	1	Ц	50,538	4,387	[28]
12	A0A0H2UHG7	<i>Rps20</i>	40S ribosomal protein S20	5	Ц, Я	97,196	1,552	[19–22]
13	B5DEL9	<i>Rps7</i>	40S ribosomal protein S7	5	Ц	20,036	0,254	[19–22]
14	B2RYR8	<i>Rps8</i>	40S ribosomal protein S8	5	Ц	19,428	—	[19–22]
15	P62246	<i>Rps15a</i>	40S ribosomal protein S15a	5	Ц	21,890	1,697	[19–22]
16	P62250	<i>Rps16</i>	40S ribosomal protein S16	5	Ц	96,403	3,646	[19–22]
17	P62268	<i>Rps23</i>	40S ribosomal protein S23	5	Ц, ЭПР	18,155	—	[19–22]

Таблица 2. Связавшиеся с пептидом RP224-232 белки почек крысы, относительное содержание которых увеличивается у гипертензивных животных по сравнению с нормотензивными в 18 и более раз (продолжение)

№	Номер в базе Uniprot	Ген по Uniprot	Название белка по Uniprot	Функции	Локализация	Кратное увеличение		Роль при сердечно-сосудистой патологии
						RP224-232	RP220	
18	P62278	<i>Rps13</i>	40S ribosomal protein S13	5	Ц	70,031	1,998	[19–22]
19	F1M013	<i>Rpl7a</i>	60S ribosomal protein L7a	5	Ц	38,699	4,383	[19–22]
20	X1W137	<i>Rps4x</i>	40S ribosomal protein S4	5	Ц	53,085	—	[19–22]
21	P62718	<i>Rpl18a</i>	60S ribosomal protein L18a	5	Ц	68,526	9,815	[19–22]
22	P62752	<i>Rpl23a</i>	60S ribosomal protein L23a	5	Ц, Я	27,412	—	[19–22]
23	F1M6F4	<i>AABR07071294.1</i>	40S ribosomal protein S25	5	Ц	44,576	—	[19–22]
24	P62890	<i>Rpl30</i>	60S ribosomal protein L30	5	Ц	232,335	—	[19–22]
25	P62909	<i>Rps3</i>	40S ribosomal protein S3	5	Ц, М, Мх, Я	47,671	1,557	[19–22]
26	P62914	<i>Rpl11</i>	60S ribosomal protein L11	5	Ц, Я	18,267	1,141	[19–22]
27	P62919	<i>Rpl8</i>	60S ribosomal protein L8	5	Ц	158,494	—	[19–22]
28	P63039	<i>Hspd1</i>	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	4	Мх	33,250	—	[29]
29	G3V7J0	<i>Aldh6a1</i>	Aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	6	Мх, Я	29,684	9,952	[30]
30	Q5XIM9	<i>Cct2</i>	T-complex protein 1 subunit beta	4	Ц	19,979	0,403	—
31	Q6Q0N1	<i>Cndp2</i>	Cytosolic non-specific dipeptidase	6	Ц	32,478	—	—
32	Q7TPB1	<i>Cct4</i>	T-complex protein 1 subunit delta	4	Ц	19,860	2,344	[30]
33	Q8VID1	<i>Dhrs4</i>	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4	7	П	99,405	—	—
34	Q9ER34	<i>Aco2</i>	Aconitate hydratase, mitochondrial	1	Мх	44,971	4,512	[31]
35	Q9WVK3	<i>Pecr</i>	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	7	П	115,331	—	—
36	B5DFA0	<i>Vil1</i>	Vil1 protein	2	Ц	272,801	144,387	—
37	D4AC23	<i>Cct7</i>	T-complex protein 1 subunit eta	4	Ц	39,470	—	[30]
38	M0R907	<i>Snrpd3</i>	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	5	Ц, Я	46,080	—	—
39	Q5M8C3	<i>Serpina4</i>	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 4	3	Ц	33,328	—	[32, 33]
40	P45953	<i>Acadvl</i>	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	7	Мх	43,635	—	[34]
41	P04276	<i>Gc</i>	Vitamin D-binding protein	2	С	84,305	—	[35]
42	Q6P3V9	<i>Rpl4</i>	60S ribosomal protein L4	5	Ц	25,888	—	[19–22]
43	P47198	<i>Rpl22</i>	60S ribosomal protein L22	5	Ц	45,322	2,552	[19–22]

Примечание. Здесь и в таблицах 3–5 цифры в колонке “функции” обозначают следующие функциональные группы белков: 1. Белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена. 2. Белки, участвующие в образовании цитоскелета, транспорте и экзоцитозе. 3. Белки, участвующие в передаче сигнала и регуляции активности ферментов. 4. Антиоксидантные и защитные белки/ферменты. 5. Белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки. 6. Ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений. 7. Ферменты, участвующие в метаболизме липидов.

Локализация белков: Ц – цитоплазма, Я – ядро, М – мембраны, ПМ – плазматическая мембрана, Мх – митохондрии, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, Ве – везикулы, П – пероксисомы, С – секретируемые белки.

Здесь и в таблицах 3–5 данные по изменению относительного содержания белков почек гипертонических животных (по сравнению с контрольными), связавшихся с пептидом RP220, взяты из статьи [10].

Для удобства поиска названия белков приведены в том виде, в котором они фигурируют в базе данных Uniprot.

Статистическая величина  $-\text{LOG}(P\text{-значение})$  для показателей относительного содержания белков, связавшихся с пептидом RP224-232, в пределах диапазона значений (2,13–7,57), более подробные данные приведены в таблице S1 Дополнительных материалов.

более, чем в 230 раз, глутатион-S-трансферазы альфа-1 — более чем в 65 раз, дигидролипоилтранс-ацетилазного компонента пируватдегидрогеназного комплекса — в 65 раз, транскетолазы — в 50 раз, дегидрогеназы/редуктазы 4 семейства SDR — почти в 100 раз, пероксисомной транс-2-еноил-коэнзим А редуктазы — в 115 раз, виллина — более чем в 270 раз, витамин Д-связывающего белка — в 84 раза, митохондриальной аконитатгидратазы — в 45 раз, ацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот с очень длинной цепью — почти в 44 раза, малого ядерного рибонуклеопротеина Sm D3 — в 46 раз (табл. 2, рис. 2). В 20–40 раз увеличивается относительное содержание различных субъединиц Т-комплекса, в 20–50 раз — относительное содержание ряда белков теплового шока (табл. 2, рис. 2).

При этом практически все связавшиеся с пептидными фрагментами RP220 белки, изменяющие своё относительное содержание у крыс SHR по сравнению с контрольными животными, за редким исключением, имеют отношение к развитию сердечно-сосудистой патологии (соответствующие литературные ссылки приведены в таблицах 2–5). Например, фруктозо-1,6-бисфосфатаза — один из регуляторных ферментов глюконеогенеза; её содержание повышено при метаболическом синдроме. На моделях с участием животных показано, что нарушения в метаболизме фруктозы приводят не только к ожирению и диабету, но и к гипертензии [23–25].

Обращает на себя внимание увеличение относительного содержания у крыс SHR большого количества рибосомных белков, связавшихся с пептидом RP224-232. Известно, что, помимо участия в процессе трансляции, рибосомные белки выполняют множество экстра-рибосомных функций, связанных с пролиферацией, дифференциацией, репарацией ДНК, апоптозом и другими клеточными процессами. Дисфункция рибосомных белков связана с развитием онкологических, гематологических, метаболических и в том числе сердечно-сосудистых заболеваний [19–22]. В частности, показана роль рибосомного белка L17 в регуляции пролиферации клеток гладкой мускулатуры сонной артерии [36].

Относительное содержание ключевого антиоксидантного фермента каталазы, связавшейся с пептидом RP224-232, увеличивается у крыс SHR более чем в 230 раз. Есть данные о том, что сверхэкспрессия каталазы в клетках проксимальных канальцев почек у особой линии трансгенных мышей приводила к нормализации окислительного стресса, предотвращала гипертензию, нормализовала уровень экспрессии ангиотензин-превращающего фермента 2, улучшала клубочковую фильтрацию, предотвращала альбуминурию, гипертрофию почек, тубулоинтерстициальный фиброз, апоптоз, подавляла экспрессию профиброзных и проапоптотических генов [16].

Среди связавшихся с пептидом RP224-232 белков, относительное содержание которых уменьшается у крыс SHR, выделяется стратифин (уменьшение в 250 раз) (табл. 3, рис. 3). Заметно

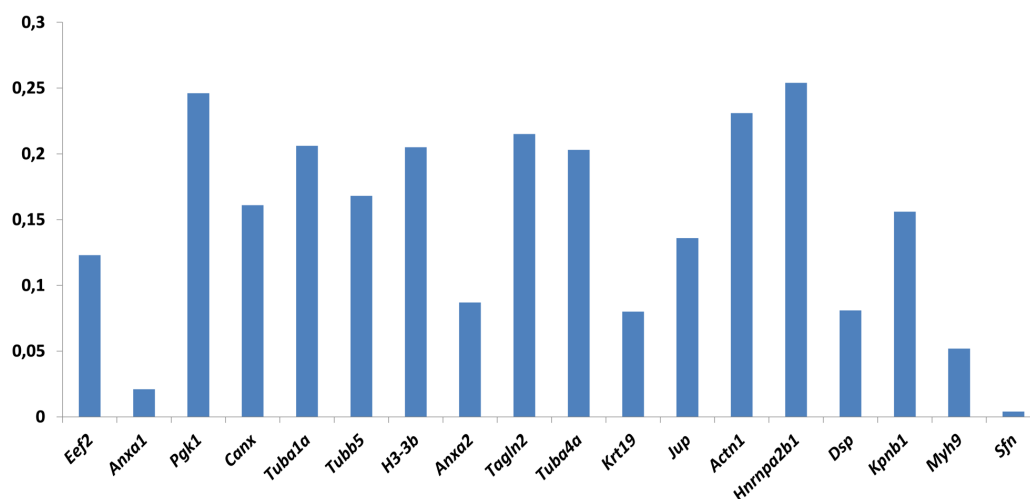
снижено относительное содержание связавшихся с RP224-232 аннексинов A1 и A2, тяжёлой цепи миозина 9, калнексина, 5 цепи тубулина бета, фактора элонгации 2 (в 48, 12, 19, 6, 6, 8 раз соответственно) (табл. 3, рис. 3).

Стратифин (14-3-3 сигма) относится к семейству 14-3-3 белков, которые участвуют в регуляции многочисленных внутриклеточных процессов. Повышенный уровень стратифина выявлен в клетках эндотелия пациентов и у линии крыс с лёгочной гипертензией. Интенсивно изучаются мишени сигнальных путей, активируемых с участием этого белка [50]. Аннексин A1 — глюкокортикоид-регулируемый белок с противовоспалительным и регуляторным действием, препятствует возрастным изменениям сердечно-сосудистой системы и регулирует артериальное давление. Мыши, лишённые гена аннексина A1, демонстрируют структурные и функциональные сердечно-сосудистые нарушения: высокое артериальное давление, нарушение сердечной деятельности, гипертрофию сердца, заметное ремоделирование сосудов, воспаление и преждевременное старение [38]. Миозин 9 — клеточный миозин, играющий роль в цитокинезе, реорганизации цитоскелета, секреции и других клеточных процессах. Показана корреляция между гипертензией и генным полиморфизмом тяжёлой цепи миозина 9 у больных хронической почечной болезнью в Китае [49].

Из таблиц 2 и 3 видно, что в случае пептида RP224-232 (фрагмента пептида RP220) практически во всех случаях кратность изменения относительного содержания белков у гипертонических крыс по сравнению с контрольными животными превышает таковую для исходного пептида RP220, чего нельзя сказать о фрагменте RP233-239 по сравнению с исходным пептидом RP220 (табл. 4 и 5).

Относительное содержание каталазы, глутатион-S-трансферазы альфа-1, дигидролипоилтранс-ацетилазного компонента пируватдегидрогеназного комплекса у крыс SHR увеличивается по сравнению с контрольными в случае пептида RP224-232 в 234 раза, в 65 раз и в 65 раз соответственно, а в случае пептида RP220 вообще не меняется. Относительное содержание фруктозо-1,6-бисфосфатазы 1, связавшейся с пептидом RP224-232, увеличивается у крыс SHR по сравнению с контрольными почти в 2247 раз, а в случае пептида RP220 — в 159 раз. В случае 40S рибосомного белка S20 эта разница составляет почти 65 раз, в случае транскетолазы — более чем 11 раз, и так далее (табл. 2). То же самое можно сказать и для белков, чьё относительное содержание уменьшается у крыс SHR по сравнению с контролем. В случае пептида RP220 это уменьшение почти для всех белков гораздо менее заметно, чем в случае его фрагмента RP224-232 (табл. 3).

Для пептида RP233-239 изменения относительного содержания связавшихся с ним белков у крыс SHR не столь очевидны, как для пептида RP224-232. Наиболее выражено увеличение относительного содержания у фруктозо-1,6-бисфосфатазы 1 (почти в 43 раза), каталазы (в 21 раз),



**Рисунок 3.** Связавшиеся с пептидом RP224-232 белки почек гипертонических крыс, относительное содержание которых уменьшается по сравнению с контрольными животными (обозначены гены белков, изменение относительного содержания которых наиболее выражено).

**Таблица 3.** Связавшиеся с пептидом RP224-232 белки почек крысы, относительное содержание которых уменьшается у гипертонических животных по сравнению с контрольными в 4 и более раз

№	Номер в базе Uniprot	Ген по Uniprot	Название белка по Uniprot	Функции	Локализация	Кратное уменьшение		Роль при сердечно-сосудистой патологии
						RP224-232	RP220	
1	P05197	<i>Eef2</i>	Elongation factor 2	5	Ц, Я	0,123	0,240	[37]
2	P07150	<i>Anxa1</i>	Annexin A1	2	ПМ, Ц	0,021	0,237	[38]
3	P16617	<i>Pgk1</i>	Phosphoglycerate kinase 1	1	Ц	0,246	0,466	[39]
4	P35565	<i>Canx</i>	Calnexin	4	ЭПР	0,161	0,353	[40]
5	P68370	<i>Tuba1a</i>	Tubulin alpha-1A chain	2	Ц, Мх	0,206	—	[41]
6	P69897	<i>Tubb5</i>	Tubulin beta-5 chain	2	Ц	0,168	—	[41]
7	P84245	<i>H3-3b</i>	Histone H3.3	5	Я	0,205	0,296	[42]
8	Q07936	<i>Anxa2</i>	Annexin A2	2	ПМ, С	0,087	0,323	[43]
9	Q5XFX0	<i>Tagln2</i>	Transgelin-2	2	Ц	0,215	0,292	[44]
10	Q5XIF6	<i>Tuba4a</i>	Tubulin alpha-4A chain	2	Ц	0,203	0,338	[41]
11	Q63279	<i>Krt19</i>	Keratin, type I cytoskeletal 19	2	Ц	0,080	—	—
12	Q6P0K8	<i>Jup</i>	Junction plakoglobin	2	Ц, М	0,136	1,989	[45]
13	Q9Z1P2	<i>Actn1</i>	Alpha-actinin-1	2	Ц, М, ПМ	0,231	—	[46]
14	A7VJC2	<i>Hnrnpa2b1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	5	Ц, Я, С	0,254	—	[47]
15	F1LMV6	<i>Dsp</i>	Desmoplakin	2	ПМ, М	0,081	—	[48]
16	P52296	<i>Kpnb1</i>	Importin subunit beta-1	3	Ц, Я	0,156	0,128	—
17	Q62812	<i>Myh9</i>	Myosin-9	2	Ц, Ве	0,052	—	[49]
18	G3V9A3	<i>Sfn</i>	Stratifin	5	Ц, Я	0,004	—	[50]

Примечание. Статистическая величина  $-\text{LOG}(\text{P-значение})$  для показателей относительного содержания белков, связавшихся с пептидом RP224-232, в пределах диапазона значений (1,67–6,44), более подробные данные приведены в таблице S2 Дополнительных материалов.

оксидазы средне- и длинноцепочечных 2-гидроксимonoкарбоновых кислот (в 13 раз), аргининосукцинатсинтазы (в 11 раз), транскетолазы (в 9 раз) (табл. 4, рис. 4). Уменьшение относительного содержания белков, связавшихся с этим пептидом, у крыс SHR незначительно (менее, чем в 4 раза по сравнению с контролем) (табл. 5, рис. 5).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

RP220 — 20-членный пептид, который соответствует фрагменту аминокислотной последовательности RNLS, включающей остатки 220–239, и воспроизводит ряд эффектов [5, 8]. Он содержит несколько участков для потенциального

# БЕЛКИ ПОЧЕК, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С ПЕПТИДНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ RP220

Таблица 4. Связавшиеся с пептидом RP233-239 белки почек крысы, относительное содержание которых увеличивается у гипертонических животных по сравнению с контрольными в 2 и более раз

№	Номер в базе Uniprot	Ген по Uniprot	Название белка по Uniprot	Функции	Локализация	Кратное увеличение		Роль при сердечно-сосудистой патологии
						RP233-239	RP220	
1	O70351	<i>Hsd17b10</i>	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	7	Мх	4,919	—	—
2	P02761	<i>Mup</i>	Major urinary protein	3	Ц, С	8,589	19,433	[51]
3	P04762	<i>Cat</i>	Catalase	4	П, Ц	21,061	—	[16]
4	P05065	<i>Aldoa</i>	Fructose-bisphosphate aldolase A	1	Ц	6,666	—	[52]
5	Q6LDS4	<i>Sod1</i>	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	4	Ц, Я	6,793	—	[53, 54]
6	P07756	<i>Cps1</i>	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	6	Мх, Я	8,299	—	[55]
7	P08461	<i>Dlat</i>	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	1	Мх	8,805	—	[18]
8	P09034	<i>Ass1</i>	Argininosuccinate synthase	6	Ц	11,096	12,192	[56]
9	P17077	<i>Rpl9</i>	60S ribosomal protein L9	5	Ц	4,488	2,780	[19, 20]
10	P17764	<i>Acat1</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondria	7	Мх	2,348	—	[57]
11	P19112	<i>Fbp1</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	1	Ц	42,678	159,814	[58]
12	P49242	<i>Rps3a</i>	40S ribosomal protein S3a	5	Ц, Я	3,639	—	[19, 20]
13	P50137	<i>Tkt</i>	Transketolase	1	Ц	9,717	4,387	—
14	P62271	<i>Rps18</i>	40S ribosomal protein S18	5	Ц	4,293	—	[19–22]
15	P62718	<i>Rpl18a</i>	60S ribosomal protein L18a	5	Ц	8,270	9,817	[19–22]
16	P62755	<i>Rps6</i>	40S ribosomal protein S6	5	Ц, Я	4,647	—	[19–22]
17	P98158	<i>Lrp2</i>	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	3	ПМ, ЭПР, М	5,253	117,621	[59–61]
18	Q07523	<i>Hao2</i>	2-Hydroxyacid oxidase 2	7	П	13,392	202,39	[62]
19	Q60587	<i>Hadhb</i>	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	7	Мх	4,854	9,666	[63]
20	Q63716	<i>Prdx1</i>	Peroxiredoxin-1	4	Ц	5,015	10,14	[64–66]
21	Q9ER34	<i>Aco2</i>	Aconitate hydratase, mitochondrial	1	Мх	4,510	4,512	[31]
22	Q9Z0V6	<i>Prdx3</i>	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	4	Ц, ЭПР, Мх	5,577	—	—
23	D4ACB8	<i>Cct8</i>	T-complex protein 1 subunit theta	4	Ц, Мх	4,536	2,294	—
24	P20760	<i>Igg-2a</i>	Ig gamma-2A chain C region	4	Ц	4,468	—	—
25	Q6P3V9	<i>Rpl4</i>	60S ribosomal protein L4	5	Ц	6,506	—	[19–22]

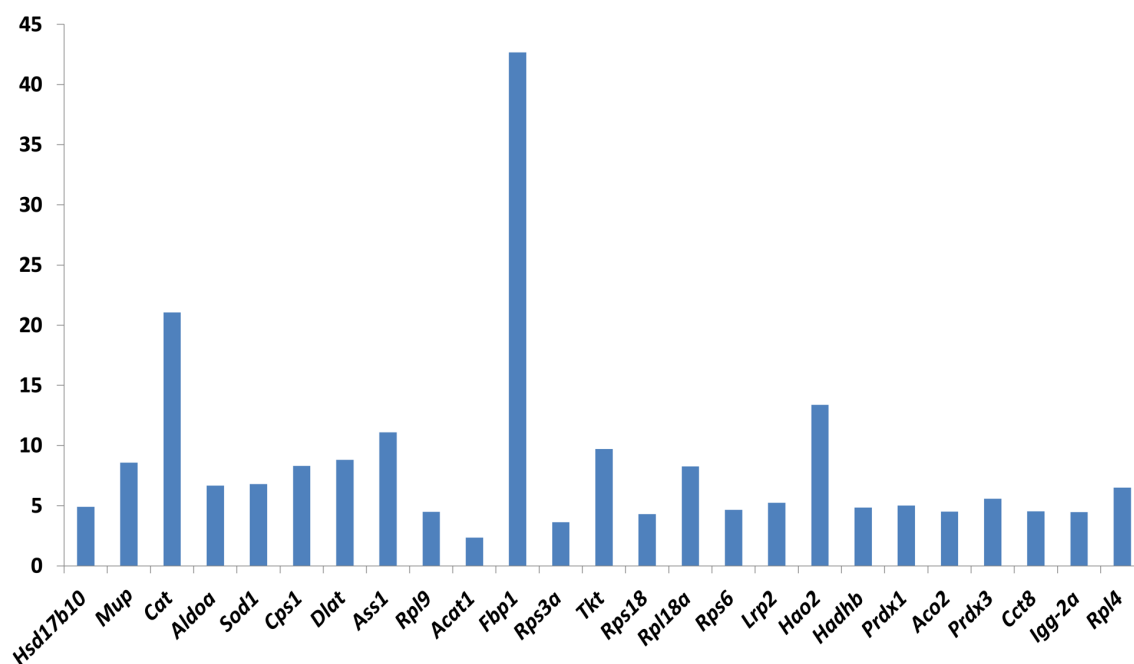
Примечание. Статистическая величина -LOG(P-значение) для показателей относительного содержания белков, связавшихся с пептидом RP233-239, в пределах диапазона значений (1,11–4,29), более подробные данные приведены в таблице S3 Дополнительных материалов.

расщепления внеклеточными и циркулирующими в крови протеазами, которые, по-видимому, могут образовывать несколько пептидов, включая RP224-232 и RP233-239 [7, 9].

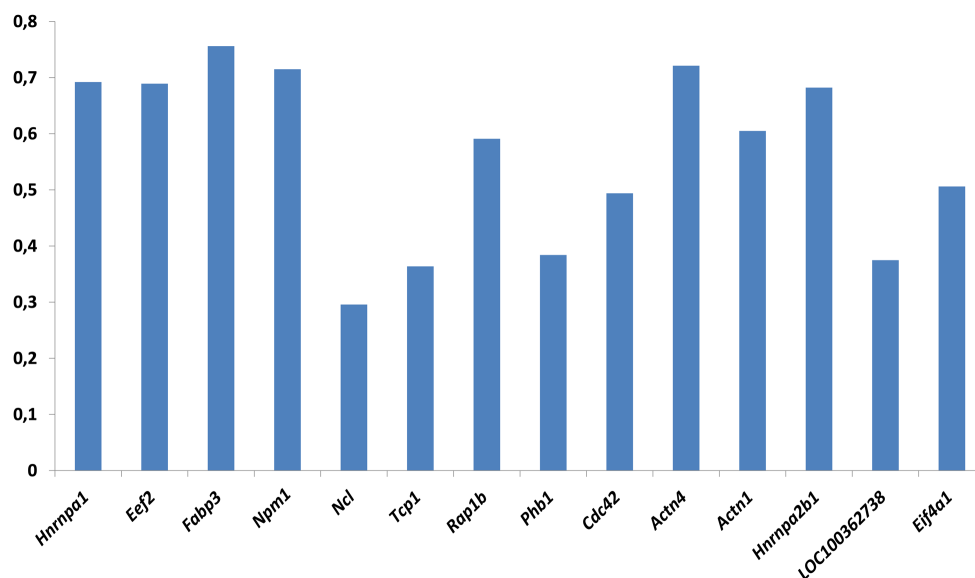
В данной работе мы продемонстрировали, что изменение относительного содержания связавшихся с исследованными пептидами RNLS белков гипертонических (SHR) крыс по сравнению с таковым у нормотензивных (WKY) животных наиболее ярко проявляется у пептида RP224-232.

Многие из этих белков ассоциированы с сердечно-сосудистой патологией, в том числе с гипертонией. Это свидетельствует в пользу того, что протеолитический процессинг RP220 приводит не к инактивации данного пептида, но к изменению его лигандных/регуляторных свойств, а также репертуара потенциальных белков-партнёров и, следовательно, белок-белковых взаимодействий, которые могут иметь возможное фармакологическое применение.





**Рисунок 4.** Связавшиеся с пептидом RP233-239 белки почек гипертонических крыс, относительное содержание которых увеличивается по сравнению с контрольными животными (обозначены гены белков, изменение относительного содержания которых наиболее выражено).



**Рисунок 5.** Связавшиеся с пептидом RP233-239 белки почек гипертонических крыс, относительное содержание которых уменьшается по сравнению с контрольными животными (обозначены гены белков, изменение относительного содержания которых наиболее выражено).

## БЛАГОДАРНОСТИ

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

## 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”.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

# БЕЛКИ ПОЧЕК, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С ПЕПТИДНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ RP220

Таблица 5. Связавшиеся с пептидом с пептидом RP233-239 белки почек крысы, относительное содержание которых уменьшается у гипертонических животных по сравнению с контрольными

№	Номер в базе Uniprot	Ген по Uniprot	Название белка по Uniprot	Функция	Локализация	Кратное уменьшение		Роль при сердечно-сосудистой патологии
						RP233-239	RP220	
1	P04256	<i>Hnrnpa1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	5	Ц, Я, С	0,692	0,262	[67]
2	P05197	<i>Eef2</i>	Elongation factor 2	5	Ц, Я	0,689	0,239	[37]
3	P07483	<i>Fabp3</i>	Fatty acid-binding protein, heart	7	Ц	0,756	—	[68]
4	P13084	<i>Npm1</i>	Nucleophosmin	5	Я, Ц, Мх	0,715	0,430	[69]
5	P13383	<i>Ncl</i>	Nucleolin	5	Ц, Я	0,296	—	[70]
6	P28480	<i>Tcp1</i>	T-complex protein 1 subunit alpha	4	Ц, Мх	0,364	—	[30]
7	Q62636	<i>Rap1b</i>	Ras-related protein Rap-1b	3	ПМ, Ц, М	0,591	0,361	[71]
8	P67779	<i>Phb1</i>	Prohibitin 1	3	ПМ, М, Мх, Я	0,384	0,282	[72]
9	Q8CFN2	<i>Cdc42</i>	Cell division control protein 42 homolog	2	Ц, М, ПМ	0,494	0,399	[73]
10	Q9QXQ0	<i>Actn4</i>	Alpha-actinin-4	2	Ц, Я	0,721	0,589	[46]
11	Q9Z1P2	<i>Actn1</i>	Alpha-actinin-1	2	Ц, М, ПМ	0,605	0,472	[46]
12	A7VJC2	<i>Hnrnpa2b1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	5	Ц, Я, С	0,682	0,283	[47]
13	M0RD14	<i>LOC100362738</i>	Pyruvate kinase	1	Ц	0,375	0,537	—
14	Q6P3V8	<i>Eif4a1</i>	ATP-dependent RNA helicase	5	Ц	0,506	0,071	—

Примечание. Статистическая величина -LOG(P-значение) для показателей относительного содержания белков, связавшихся с пептидом RP233-239, в пределах диапазона значений (1,00–3,56), более подробные данные приведены в таблице S4 Дополнительных материалов.

## 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
- Медведев А.Е., Веселовский А.В., Федченко В.И. (2010) Реналаза — новый секреторный фермент, осуществляющий селективную деградацию катехоламинов: достижения и проблемы. *Биохимия*, **75**(8), 1045–1054. [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
- 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
- Wang Y., Safirstein R., Velazquez H., Guo X.-J., Hollander L., Chang J., Chen T.-M., Mu J.-J., Desir G.V. (2017) Extracellular renalase protects cells and organs by outside-in signalling. *J. Cell. Mol. Med.*, **21**(7), 1260–1265. DOI: 10.1111/jcmm.13062
- Pointer T.C., Gorelick F.S., Desir G.V. (2021) Renalase: a multi-functional signaling molecule with roles in gastrointestinal disease. *Cells*, **10**(8), 2006. DOI: 10.3390/cells10082006
- Moran G.R., Hoag M.R. (2017) The enzyme: renalase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **632**, 66–76. DOI: 10.1016/j.abb.2017.05.015
- Fedchenko V.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
- 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
- Бунеева О.А., Федченко В.И., Гнеденко О.В., Калошина С.А., Медведева М.В., Завьялова М.Г., Иванов А.С., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2025) Взаимодействие белков почек крыс с пептидом реналазы RP220 и его потенциальным протеолитическим фрагментом RP224-232: сравнительный анализ протеомов. *Биомедицинская химия*, **71**(1), 65–70. [Buneeva O.A., Fedchenko V.I., Gnedenko O.V., Kaloshina S.A., Medvedeva M.V., Zavyalova M.G., Ivanov A.S., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2025) Interaction of rat kidney proteins with the renalase peptide RP220 and its potential proteolytic fragment RP224-232: a comparative proteomic analysis. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **71**(1), 65–70.] DOI: 10.18097/PBMCR1559
- Бунеева О.А., Федченко В.И., Калошина С.А., Завьялова М.Г., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2024) Протеомное профилирование почек нормо- и гипертонических 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

11. 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: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
12. 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
13. Akins R., Tuan R. (1995) Ultrafast Protein Determinations Using Microwave Enhancement. In: *The Protein Protocols Handbook* (Walker J.M., ed.). Springer Protocols Handbooks. Humana Press, pp. 23–30. DOI: 10.1385/1-59259-169-8:23
14. Wiśniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods*, **6**(5), 359–362. DOI: 10.1038/nmeth.1322
15. Бунеева О.А., Федченко В.И., Калошина С.А., Завьялова М.Г., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2024) Сравнительный протеомный анализ почечной ткани нормотензивных и гипертензивных крыс. *Биомедицинская химия*, **70**(2), 89–98. [Buneeva O.A., Fedchenko V.I., Kaloshina S.A., Zavyalova M.G., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2024) Comparative proteomic analysis of renal tissue of normotensive and hypertensive rats. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **70**(2), 89–98.] DOI: 10.18097/PBMC20247002089
16. Shi Y., Lo C.-S., Chenier I., Maachi H., Filep J.G., Ingelfinger J.R., Zhang S.-L., Chan J.S.D. (2013) Overexpression of catalase prevents hypertension and tubulointerstitial fibrosis and normalization of renal angiotensin-converting enzyme-2 expression in Akita mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **304**(11), F1335–F1346. DOI: 10.1152/ajprenal.00405.2012
17. Wang L., Hou E., Wang Z., Sun N., He L., Chen L., Liang M., Tian Z. (2014) Analysis of metabolites in plasma reveals distinct metabolic features between Dahl salt-sensitive rats and consomic SS.13(BN) rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **450**(1), 863–869. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.06.089
18. Quinonez S.C., Thoene J.G. (1993) Dihydrolipoamide Dehydrogenase Deficiency. In: *GeneReviews®* (Adam M.P., Feldman J., Mirzaa G.M., Pagon R.A., Wallace S.E., Amemiya A., eds.). University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
19. Kang J., Brajanovski N., Chan K.T., Xuan J., Pearson R.B., Sanij E. (2021) Ribosomal proteins and human diseases: molecular mechanisms and targeted therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **6**, 323. DOI: 10.1038/s41392-021-00728-8
20. Bhavsar R.B., Makley L.N., Tsonis P.A. (2010) The other lives of ribosomal proteins. *Hum. Genomics*, **4**(5), 327–344. DOI: 10.1186/1479-7364-4-5-327
21. Zhou X., Liao W.-J., Liao J.-M., Liao P., Lu H. (2015) Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *J. Mol. Cell Biol.*, **7**(2), 92–104. DOI: 10.1093/jmcb/mjv014
22. Wang W., Nag S., Zhang X., Wang M.-H., Wang H., Zhou J., Zhang R. (2015) Ribosomal proteins and human diseases: pathogenesis, molecular mechanisms, and therapeutic implications. *Med. Res. Rev.*, **35**(2), 225–285. DOI: 10.1002/med.21327
23. Visinoni S., Khalid N.F.I., Joannides C.N., Shulkes A., Yim M., Whitehead J., Tiganis T., Lamont B.J., Favaloro J.M., Proietto J., Andrikopoulos S., Fam B.C. (2012) The role of liver fructose-1,6-bisphosphatase in regulating appetite and adiposity. *Diabetes*, **61**(5), 1122–1132. DOI: 10.2337/db11-1511
24. Polak-Iwaniuk A., Harasim-Symbor E., Golaszewska K., Chabowski A. (2019) How hypertension affects heart metabolism. *Front. Physiol.*, **10**, 435. DOI: 10.3389/fphys.2019.00435
25. Khitan Z., Kim D.H. (2013) Fructose: a key factor in the development of metabolic syndrome and hypertension. *J. Nutr. Metab.*, **2013**, 682673. DOI: 10.1155/2013/682673
26. Maciel L., de Oliveira D.F., Monnerat G., Campos de Carvalho A.C., Nascimento J.H.M. (2020) Exogenous 10 kDa-heat shock protein preserves mitochondrial function after hypoxia/reoxygenation. *Front. Pharmacol.*, **11**, 545. DOI: 10.3389/fphar.2020.00545
27. Lopez-Campistrous A., Hao L., Xiang W., Ton D., Semchuk P., Sander J., Ellison M.J., Fernandez-Patron C. (2008) Mitochondrial dysfunction in the hypertensive rat brain: respiratory complexes exhibit assembly defects in hypertension. *Hypertension*, **51**(2), 412–419. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.102285
28. Wang C., Zhang L., Zhang Q., Zheng H., Yang X., Cai W., Zou Q., Lin J., Zhang L., Zhong L., Li X., Liao Y., Liu Q., Chen L., Li Y. (2024) Transketolase drives the development of aortic dissection by impairing mitochondrial bioenergetics. *Acta Physiol*, **240**(4), e14113. DOI: 10.1111/apha.14113
29. Duan Y., Tang H., Mitchell-Silbaugh K., Fang X., Han Z., Ouyang K. (2020) Heat shock protein 60 in cardiovascular physiology and diseases. *Front. Mol. Biosci.*, **7**, 73. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00073
30. Lee M.-J., Stephenson D.A., Groves M.J., Sweeney M.G., Davis M.B., An S.-F., Houlden H., Salih M.A.M., Timmerman V., de Jonghe P., Auer-Grumbach M., di Maria E., Scaravilli F., Wood N.W., Reilly M.M. (2003) Hereditary sensory neuropathy is caused by a mutation in the delta subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (Cct4) gene. *Hum. Mol. Genet.*, **12**(15), 1917–1925. DOI: 10.1093/hmg/ddg198
31. Dikalov S.I., Ungvari Z. (2013) Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **305**(10), H1417–H1427. DOI: 10.1152/ajpheart.00089.2013
32. Shashidhar K.N., Lakshmaiah V., Muninarayana C., Nallagangula K.S. (2021) Quantitative ELISA for SERPINA4/kallistatin. *BioTechniques*, **71**(5), 556–565. DOI: 10.2144/btn-2018-0194
33. Krishna S.M., Li J., Wang Y., Moran C.S., Trollope A., Huynh P., Jose R., Biros E., Ma J., Golledge J. (2021) Kallistatin limits abdominal aortic aneurysm by attenuating generation of reactive oxygen species and apoptosis. *Sci. Rep.*, **11**, 17451. DOI: 10.1038/s41598-021-97042-8
34. Cox K.B., Liu J., Tian L., Barnes S., Yang Q., Wood P.A. (2009) Cardiac hypertrophy in mice with long-chain acyl-CoA dehydrogenase or very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Lab. Invest*, **89**(12), 1348–1354. DOI: 10.1038/labinvest.2009.86
35. Jeong H.Y., Park K.M., Lee M.J., Yang D.H., Kim S.H., Lee S.-Y. (2017) Vitamin D and hypertension. *Electrolyte Blood Press.*, **15**(1), 1–11. DOI: 10.5049/EBP.2017.15.1.1
36. Smollock E.M., Korshunov V.A., Glazko G., Qiu X., Gerloff J., Berk B.C. (2012) Ribosomal protein L17, Rpl17, is an inhibitor of vascular smooth muscle growth and carotid intima formation. *Circulation*, **126**(20), 2418–2427. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.125971

37. Liu R., Proud C.G. (2016) Eukaryotic elongation factor 2 kinase as a drug target in cancer, and in cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.*, **37**(3), 285–294. DOI: 10.1038/aps.2015.123
38. Singh J., Jackson K.L., Tang F.S., Fu T., Nowell C., Salimova E., Kiriazis H., Ritchie R.H., Head G.A., Woodman O.L., Qin C.X. (2024) The pro-resolving mediator, annexin A1 regulates blood pressure, and age-associated changes in cardiovascular function and remodeling. *FASEB J.*, **38**(3), e23457. DOI: 10.1096/fj.202301802R
39. Pan C.-H., Chien Y.-C., Sung M.-S., Huang H.-Y., Sheu M.-J., Wu C.-H. (2021) Pathological role of phosphoglycerate kinase 1 in balloon angioplasty-induced neointima formation. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(16), 8822. DOI: 10.3390/ijms22168822
40. Balhara M., Neikirk K., Marshall A., Hinton A. Jr., Kirabo A. (2024) Endoplasmic reticulum stress in hypertension and salt sensitivity of blood pressure. *Curr. Hypertens. Rep.*, **26**(6), 273–290. DOI: 10.1007/s11906-024-01300-9
41. Shi X., Jiang X., Chen C., Zhang Y., Sun X. (2022) The interconnections between the microtubules and mitochondrial networks in cardiocerebrovascular diseases: implications for therapy. *Pharmacol. Res.*, **184**, 106452. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106452
42. Goldman J.A., Kuzu G., Lee N., Karasik J., Gemberling M., Foglia M.J., Karra R., Dickson A.L., Sun F., Tolstorukov M.Y., Poss K.D. (2017) Resolving heart regeneration by replacement histone profiling. *Dev. Cell*, **40**(4), 392–404.e5. DOI: 10.1016/j.devcel.2017.01.013
43. Pascal A., Gallaud E., Giet R., Benaud C. (2022) Annexin A2 and Ahnak control cortical NuMA-dynein localization and mitotic spindle orientation. *J. Cell Sci.*, **135**(9), jcs259344. DOI: 10.1242/jcs.259344
44. Szelenberger R., Jóźwiak P., Kacprzak M., Bijak M., Zielińska M., Olender A., Saluk-Bijak J. (2022) Variations in blood platelet proteome and transcriptome revealed altered expression of transgelin-2 in acute coronary syndrome patients. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(11), 6340. DOI: 10.3390/ijms23116340
45. Li J., Swope D., Raess N., Cheng L., Muller E.J., Radice G.L. (2011) Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of  $\beta$ -catenin signaling. *Mol. Cell. Biol.*, **31**(6), 1134–1144. DOI: 10.1128/MCB.01025-10
46. Nouredine M., Mikolajek H., Morgan N.V., Denning C., Loughna S., Gehmlich K., Mohammed F. (2025) Structural and functional insights into  $\alpha$ -actinin isoforms and their implications in cardiovascular disease. *J. Gen. Physiol.*, **157**(2), e202413684. DOI: 10.1085/jgp.202413684
47. Li X., Shi S., Li Z., Wang Y., Qi X., Zhang R., Liu Z., Cheng Y. (2024) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 promotes myocardial fibrosis by regulating the miR-221-3p/FOXO4-mediated inflammation. *Clin. Transl. Med.*, **14**(3), e1616. DOI: 10.1002/ctm2.1616
48. Brandão M., Bariani R., Rigato I., Bauce B. (2023) Desmoplakin cardiomyopathy: comprehensive review of an increasingly recognized entity. *J. Clin. Med.*, **12**(7), 2660. DOI: 10.3390/jcm12072660
49. Liu L., Wang C., Mi Y., Liu D., Li L., Fan J., Nan L., Jia N., Du Y. (2016) Association of MYH9 polymorphisms with hypertension in patients with chronic kidney disease in China. *Kidney Blood Press. Res.*, **41**(6), 956–965. DOI: 10.1159/000452597
50. James J., Dejesus V., Rafikova O., Rafikov R. (2024) Abstract 4146556: Stratifin is a critical target in pulmonary hypertension. *Circulation*, **150**(Suppl\_1), A4146556–A4146556. DOI: 10.1161/circ.150.suppl\_1.4146556
51. Gómez-Baena G., Armstrong S.D., Halstead J.O., Prescott M., Roberts S.A., McLean L., Mudge J.M., Hurst J.L., Beynon R.J. (2019) Molecular complexity of the major urinary protein system of the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Sci. Rep.*, **9**, 10757. DOI: 10.1038/s41598-019-46950-x
52. Li Y., Zhang D., Kong L., Shi H., Tian X., Gao L., Liu Y., Wu L., Du B., Huang Z., Liang C., Wang Z., Yao R., Zhang Y. (2018) Aldolase promotes the development of cardiac hypertrophy by targeting AMPK signaling. *Exp. Cell Res.*, **370**(1), 78–86. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.06.009
53. Sato M., Yanagisawa H., Nojima Y., Tamura J., Wada O. (2002) Zn deficiency aggravates hypertension in spontaneously hypertensive rats: possible role of Cu/Zn-superoxide dismutase. *Clin. Exp. Hypertens.*, **24**(5), 355–370. DOI: 10.1081/ceh-120004797
54. Yanagisawa H., Sato M., Nodera M., Wada O. (2004) Excessive zinc intake elevates systemic blood pressure levels in normotensive rats — potential role of superoxide-induced oxidative stress. *J. Hypertens.*, **22**(3), 543–550. DOI: 10.1097/00004872-200403000-00017
55. El-Khazragy N., El Barbary M., Fouad H., Abdelgawad A., Rabie D. (2021) Association between genetic variations in carbamoyl-phosphate synthetase gene and persistent neonatal pulmonary hypertension. *Eur. J. Pediatr.*, **180**(9), 2831–2838. DOI: 10.1007/s00431-021-04053-8
56. Guerreiro J.R., Lameu C., Oliveira E.F., Klitzke C.F., Melo R.L., Linares E., Augusto O., Fox J.W., Lebrun I., Serrano S.M.T., Camargo A.C.M. (2009) Argininosuccinate synthetase is a functional target for a snake venom anti-hypertensive peptide: role in arginine and nitric oxide production. *J. Biol. Chem.*, **284**(30), 20022–20033. DOI: 10.1074/jbc.M109.021089
57. Zhou T., Yang H., Wang H., Luo N., Xia Y., Jiang X. (2022) Association between ACAT1 rs1044925 and increased hypertension risk in Tongdao Dong. *Medicine (Baltimore)*, **101**(49), e32196. DOI: 10.1097/MD.00000000000032196
58. Bonnet S., Paulin R. (2019) Involvement of PFKFB3 in pulmonary arterial hypertension pathogenesis. Is it all about glycolysis? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **200**(5), 532–534. DOI: 10.1164/rccm.201902-0394ED
59. Calvier L., Herz J., Hansmann G. (2022) Interplay of low-density lipoprotein receptors, LRP6, and lipoproteins in pulmonary hypertension. *JACC Basic Transl. Sci.*, **7**(2), 164–180. DOI: 10.1016/j.jacbts.2021.09.011
60. Longoni M., Kantarci S., Donnai D., Pober B.R. (1993) Donnai-Barrow Syndrome. In: *GeneReviews®* (Adam M.P., Feldman J., Mirzaa G.M., Pagon R.A., Wallace S.E., Amemiya A., eds.). University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
61. Sendra J., Llorente-Cortés V., Costales P., Huesca-Gómez C., Badimon L. (2008) Angiotensin II upregulates LDL receptor-related protein (LRP1) expression in the vascular wall: a new pro-atherogenic mechanism of hypertension. *Cardiovasc. Res.*, **78**(3), 581–589. DOI: 10.1093/cvr/cvn043
62. Barawkar D.A., Meru A., Bandyopadhyay A., Banerjee A., Deshpande A.M., Athare C., Koduru C., Khose G., Gundu J., Mahajan K., Patil P., Kandalkar S.R., Niranjan S., Bhosale S., De S., Mukhopadhyay S., Chaudhary S., Koul S., Singh U., Chugh A., Palle V.P., Mookhtiar K.A., Vacca J., Chakravarty P.K., Nargund R.P., Wright S.D., Roy S., Graziano M.P., Singh S.B., Cully D., Cai T.-Q. (2011) Potent and selective inhibitors of long chain l-2-hydroxy acid oxidase reduced blood pressure in DOCA salt-treated rats. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2**(12), 919–923. DOI: 10.1021/ml2001938

63. Meng C., Jin X., Xia L., Shen S.-M., Wang X.-L., Cai J., Chen G.-Q., Wang L.-S., Fang N.-Y. (2009) Alterations of mitochondrial enzymes contribute to cardiac hypertrophy before hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *J. Proteome Res.*, **8**(5), 2463–2475. DOI: 10.1021/pr801059u
64. Jeong S.-J., Park J.-G., Oh G.T. (2021) Peroxiredoxins as potential targets for cardiovascular disease. *Antioxidants (Basel)*, **10**(8), 1244. DOI: 10.3390/antiox10081244
65. Jiang L., Gong Y., Hu Y., You Y., Wang J., Zhang Z., Wei Z., Tang C. (2020) Peroxiredoxin-1 overexpression attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2020**, 2405135. DOI: 10.1155/2020/2405135
66. Zhou M., Guo J., Li S., Li A., Fang Z., Zhao M., Zhang M., Wang X. (2023) Effect of peroxiredoxin 1 on the regulation of trophoblast function by affecting autophagy and oxidative stress in preeclampsia. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **40**(7), 1573–1587. DOI: 10.1007/s10815-023-02820-0
67. Zhang L., Chen Q., An W., Yang F., Maguire E.M., Chen D., Zhang C., Wen G., Yang M., Dai B., Luong L.A., Zhu J., Xu Q., Xiao Q. (2017) Novel pathological role of hnRNPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) in vascular smooth muscle cell function and neointima hyperplasia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **37**(11), 2182–2194. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.310020
68. Furuhashi M. (2019) Fatty acid-binding protein 4 in cardiovascular and metabolic diseases. *J. Atheroscler. Thromb.*, **26**(3), 216–232. DOI: 10.5551/jat.48710
69. Rao C., Liu B., Huang D., Chen R., Huang K., Li F., Dong N. (2021) Nucleophosmin contributes to vascular inflammation and endothelial dysfunction in atherosclerosis progression. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **161**(5), e377–e393. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2019.10.152
70. Fang L., Shen Z., Zhang Y., Mao Z., Huang D., Lou C. (2025) Nucleolin in the cell membrane promotes Ang II-mediated VSMC phenotypic switching by regulating the AT1R internalization function: nucleolin promotes Ang II-mediated VSMC phenotypic switching. *Biol. Direct*, **20**(1), 24. DOI: 10.1186/s13062-025-00615-0
71. Lakshmikanthan S., Zieba B.J., Ge Z.-D., Momotani K., Zheng X., Lund H., Artamonov M.V., Maas J.E., Szabo A., Zhang D.X., Auchampach J.A., Mattson D.L., Somlyo A.V., Chrzanowska-Wodnicka M. (2014) Rap1b in smooth muscle and endothelium is required for maintenance of vascular tone and normal blood pressure. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **34**(7), 1486–1494. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303678
72. Mattox T.A., Psaltis C., Weihbrecht K., Robidoux J., Kilburg-Basnyat B., Murphy M.P., Gowdy K.M., Anderson E.J. (2021) Prohibitin-1 is a dynamically regulated blood protein with cardioprotective effects in sepsis. *J. Am. Heart Assoc.*, **10**(14), e019877. DOI: 10.1161/JAHA.120.019877
73. Wu L., Li H., Chen H., Fan C., Lu Y., Wei R., Yang G., Jia Y. (2023) The clinical utility of circulating cell division control 42 in small-vessel coronary artery disease patients undergoing drug-coated balloon treatment. *BMC Cardiovasc. Disord.*, **23**, 496. DOI: 10.1186/s12872-023-03476-5

Поступила в редакцию: 24. 03. 2025.  
После доработки: 08. 04. 2025.  
Принята к печати: 16. 04. 2025.

## INTERACTION OF KIDNEY PROTEINS OF NORMAL AND HYPERTENSIVE RATS WITH FRAGMENTS OF RENALASE PEPTIDE RP220

*O.A. Buneeva\*, V.I. Fedchenko, S.A. Kaloshina, M.G. Zavyalova, V.G. Zgoda, A.E. Medvedev*

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

Renalase (RNLS) is a protein involved in the regulation of blood pressure; it has various functions inside and outside cells. The twenty-membered peptide RP220, corresponding to the amino acid sequence of human RNLS 220–239, reproduces a number of effects of extracellular RNLS and can bind to many intracellular proteins in the kidney. The RP220 sequence contains several cleavage sites for extracellular proteases, which could potentially produce RP224-232 and RP233-239 peptides. The aim of this work was to perform proteomic profiling of kidney tissue from normotensive Wistar Kyoto (WKY) rats and spontaneously hypertensive rats (SHR) derived from WKY, using potential proteolytic fragments (RP224-232 and RP233-239) of the RP220 peptide as affinity ligands, and to compare these proteomic profiles with the profiles obtained using the parent RP220 peptide. The obtained results indicate that the relative content of proteins bound to the RNLS peptides in SHR, compared to that in WKY rats, changes most significantly in the case of the RP224-232 peptide. Almost all of these proteins, with a few exceptions, are associated with cardiovascular pathology, many with hypertension. The results of our work indicate that proteolytic processing of RP220 does not lead to the inactivation of this peptide, but to a change in its ligand/regulatory properties, as well as the repertoire of potential protein partners and, consequently, protein-protein interactions that may have possible pharmacological application.

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

**Keywords:** renalase; renalase peptides RP220, RP224-232, and RP233-239; arterial hypertension; WKY and SHR rats; proteomic profiling of kidney tissue

**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 24.03.2025; revised 08.04.2025; accepted 16.04.2025.