

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ РЕНАЛАЗНЫХ ПЕПТИДОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК HepG₂ И PC3

*В.И. Федченко, Г.Е. Морозевич, А.Е. Медведев**

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

Реналаза (RNLS) — недавно открытый белок, который играет разные роли внутри и снаружи клеток. Внутриклеточная RNLS представляет собой FAD-зависимую оксидоредуктазу (КФ 1.6.3.5), в то время как внеклеточная RNLS, лишённая своего N-концевого пептида и кофактора FAD, проявляет различные защитные эффекты при помощи некаталитических механизмов. Накапливается всё больше данных, что RNLS плазмы/сыворотки не является интактным белком, секретируемым во внеклеточное пространство, а экзогенная рекомбинантная RNLS эффективно разрушается при кратковременной инкубации с образцами плазмы человека. Некоторые синтетические аналоги последовательности RNLS (например, пептид Дезира RP-220 — 20-членный пептид, соответствующий аминокислотной последовательности RNLS 220–239) влияют на выживаемость клеток. Это свидетельствует о том, что пептиды RNLS, образующиеся в ходе протеолитического процессинга, могут обладать собственной биологической активностью. Основываясь на результатах недавнего биоинформатического анализа потенциальных сайтов расщепления RNLS (Fedchenko et al., Medical Hypotheses, 2022) мы исследовали действие шести пептидов, соответствующих нескольким фрагментам аминокислотной последовательности RNLS, включая RP-220 и его фрагмент (RP-224), на жизнеспособность двух линий раковых клеток человека: HepG₂ (гепатома) и PC3 (рак предстательной железы). Два пептида RNLS (RP-207 и RP-220) концентрационно-зависимым образом снижали жизнеспособность клеток HepG₂. Наиболее выраженный и статистически значимый эффект (30–40% торможение роста клеток) отмечен при концентрации каждого пептида 50 мкМ. В экспериментах с клетками PC3 пять из шести пептидов RNLS оказывали влияние на жизнеспособность клеток. При этом RP-220 и RP-224 снижали жизнеспособность клеток, однако концентрационной зависимости этого эффекта в диапазоне исследованных концентраций (1–50 мкМ) не наблюдалось. Три других пептида RNLS (RP-207, RP-233, RP-265) повышали жизнеспособность клеток PC3 на 20–30%, но зависимости этого эффекта от концентрации исследуемых пептидов обнаружено не было. Полученные данные свидетельствуют о том, что некоторые пептиды, образующиеся в ходе протеолитического расщепления RNLS, могут влиять на жизнеспособность различных клеток, однако проявление и направленность эффекта (увеличение или снижение жизнеспособности клеток) зависят от типа клеток, на которые они действуют.

Ключевые слова: реналаза (RNLS); RNLS пептиды; жизнеспособность клеток; клетки HepG₂ и PC3

DOI: 10.18097/PBMC20236903184

ВВЕДЕНИЕ

Реналаза (RNLS) — открытый в 2005 г. секреторный белок, который выполняет различные функции внутри и снаружи клеток [1–5]. Внутриклеточная RNLS проявляет свойства FAD-зависимой оксидоредуктазы (КФ 1.6.3.5) [5, 6], которая осуществляет окисление изомерных форм β -NAD(P)H, восстановленных по 2 или 6 положению никотинамидного кольца вместо метаболически активного 4 положения [7]. При этом кофактор FAD может быть “размещён” только в полноразмерном белке, содержащем N-концевой пептид [8, 9]. Одновременно этот же N-концевой пептид рассматривается как сигнал внеклеточной локализации белка, который отщепляется в ходе секреции этого белка во внеклеточное пространство [10]. Внеклеточная RNLS, лишённая N-концевого пептида, неспособна связывать FAD [9]. Она оказывает различные защитные эффекты на клетку посредством взаимодействия на рецепторные белки [11–14]. Детекция RNLS в крови свидетельствует в пользу того, что этот белок может дистантно действовать на резидентные клетки различных органов [14].

Однако, по нашим данным, в крови не определяется внутримолекулярный фрагмент, соответствующий аминокислотным остаткам (а.о.) 100–116 последовательности RNLS [15, 16]. В прямых экспериментах было показано, что кратковременная инкубация рекомбинантной RNLS с препаратами плазмы крови приводит к существенному снижению уровня полноразмерного белка [17]. Всё это, очевидно, свидетельствует в пользу того, что поступающая в кровеносное русло RNLS подвергается протеолитическому процессингу [17], а образующиеся при этом RNLS пептиды обладают собственной биологической активностью. Биоинформатический анализ, проведённый при помощи программ Peptide Cutter и Pro cleave, выявил потенциальные сайты расщепления, а также протеолитические ферменты, способные (или не способные), осуществлять процессинг RNLS [17]. В связи с этим представляла интерес выборочная оценка действия некоторых из таких пептидов на жизнеспособность клеток. Ранее уже было показано, что пептид Дезира RP-220 (20-членный пептид, соответствующий аминокислотной последовательности RNLS 220–239) влияет на выживаемость клеток [14].

Таблица. Пептиды RNLS, использованные в работе

№	Пептид RNLS	Положение пептида в аминокислотной последовательности RNLS	Размер, а.о.
1	RP-104 – NFVAPQGISSIKHYLK	104–120	17
2	RP-207 – DVPWAGQYITSNPCIR	207–222	16
3	RP-220 – CIRFVSIDNKKRNIESSEIG	220–239	20
4	RP-224 – VSIDNKKRN	224–232	9
5	RP-233 – IESSEIGPSLVIHITTVFPGV	233–252	20
6	RP-265 – LVFQQLLENILPGLPQP	265–280	16

В данной работе мы исследовали действие шести пептидов, соответствующих нескольким фрагментам аминокислотной последовательности RNLS, включая пептид Дезира RP-220 и его фрагмент (RP-224), на жизнеспособность двух линий раковых клеток человека: HepG₂ (гепатома) и PC3 (рак предстательной железы).

МЕТОДИКА

В работе использовали клеточные линии PC3 (андроген-независимая аденокарцинома предстательной железы) и HepG₂ (карцинома печени), поддерживаемые в коллекции клеточных культур Института биомедицинской химии. Их культивировали в среде RPMI-1640 (в случае PC3) или DMEM (в случае HepG₂) (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone®, “ThermoScientific”, США), 2 mM L-глутамин (“ПанЭко”) и 1% гентамицина (“Биохимик”, Россия). Пептиды RNLS, аминокислотные последовательности которых приведены в таблице, синтезированы в фирме “БелкиАнтитела” (Россия). МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) получен от “Sigma-Aldrich” (США). Все вещества растворяли в деионизованной воде.

Культивирование клеток и определение их жизнеспособности при помощи МТТ теста

Клетки высевали в 96-луночный планшет (“Costar”, США) в количестве 2×10^4 клеток/100 мкл на лунку и культивировали 24 ч при 37°C в атмосфере CO₂ (5%). После этого среду удаляли и в свежей среде роста (100 мкл) добавляли тестируемые соединения в конечных концентрациях 1 мкМ; 5 мкМ; 10 мкМ; 25 мкМ; и 50 мкМ. Клетки инкубировали с пептидами RNLS 72 ч в тех же условиях.

Влияние исследуемых пептидов RNLS на жизнеспособность клеток оценивали при помощи МТТ-теста [18]. Вкратце, после инкубации с пептидами среду удаляли и в каждую лунку добавляли 100 мкл МТТ (1 мг/мл) в культуральной среде. После этого планшеты дополнительно инкубировали в течение 3 ч при температуре 37°C в атмосфере CO₂. Далее из планшетов удаляли среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида для растворения образовавшихся кристаллов формазана, образовавшихся в живых клетках. Оптическую плотность определяли при 570 нм с помощью планшетного анализатора GENiosPlus (“TECAN”, Швейцария). Все приведённые данные представляют результаты трёх-четырёх параллельных экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Два из шести протестированных пептидов RNLS (RP-207 и RP-220) снижали жизнеспособность клеток HepG₂ концентрационно-зависимым образом (рис. 1а). Наиболее выраженный и статистически значимый эффект (30–40% торможение роста клеток) отмечен при максимальной концентрации каждого пептида (50 мкМ). Примечательно, что пептид RP-224, содержащий девять аминокислотных остатков, входящих в пептид Дезира (RP-220), практически не оказывал никакого влияния на жизнеспособность клеток HepG₂.

В экспериментах с клетками PC3 пять из шести пептидов RNLS, оказывали влияние на жизнеспособность клеток (рис. 1б). При этом RP-220 и RP-224 снижали жизнеспособность клеток, однако концентрационной зависимости этого в диапазоне исследованных концентраций (1–50 мкМ) эффекта не наблюдалось. Три других пептида RNLS (RP-207, RP-233, RP-265) повышали жизнеспособность клеток PC3 на 20–30%, но зависимости этого эффекта от концентрации исследуемых пептидов обнаружено не было. В отличие от экспериментов на клетках HepG₂, действие RP-220 и RP-224 на клетки PC3 было сопоставимым. Отсутствие концентрационной зависимости действия RNLS пептидов на клетки PC3 требует отдельного изучения. Вполне возможно, что для выявления дозозависимого эффекта потребуется изменить время культивирования клеток с исследуемыми пептидами.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу того, что некоторые пептиды, образующиеся в ходе протеолитического расщепления RNLS, могут влиять на жизнеспособность различных клеток, однако проявление и направленность эффекта (увеличение или снижение жизнеспособности клеток) зависят от типа клеток, на которые они действуют.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная работа не связана с исследованиями с использованием людей и животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

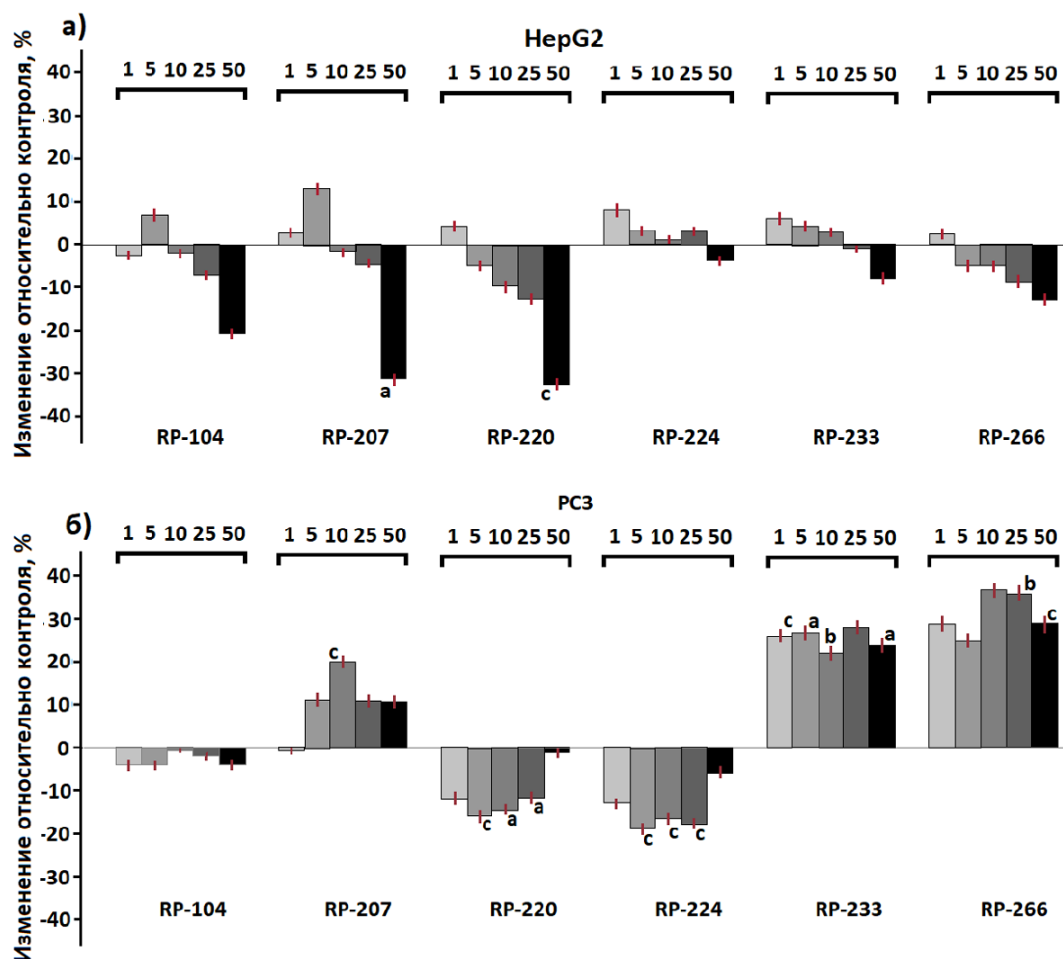


Рисунок. Влияние пептидов RNLS на жизнеспособность клеток HepG₂ (а) и PC3 (б). Буквами указана значимость различий с контролем: а – $p < 0,05$; б – $p < 0,02$; с – $p < 0,01$.

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
- 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**, 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. (2016) The catalytic function of renalase: A decade of phantoms. *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**(1), 177-186. DOI: 10.1016/j.bbapap.2015.04.010
- 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.
- Milani M., Ciriello F., Baroni S., Pandini V., Canevari G., Bolognesi M., Aliverti A. (2011) FAD-binding site and NADP reactivity in human renalase: A new enzyme involved in blood pressure regulation. *J. Mol. Biol.*, **411**(2), 463-473. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.06.010
- Fedchenko V.I., Buneeva O.A., Kopylov A.T., Veselovsky A.V., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2015) Human urinary renalase lacks the N-terminal signal peptide crucial for accommodation of its FAD cofactor. *Int. J. Biol. Macromol.*, **78**, 347-353. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.04.023
- Fedchenko V., Kopylov A., Kozlova N., Buneeva O., Kaloshin A., Zgoda V., Medvedev A. (2016) Renalase secreted by human kidney HEK293T cells lacks its N-terminal peptide: Implications for putative mechanisms of renalase action. *Kidney Blood Press. Res.*, **41**, 593-603. DOI: 10.1159/000443460
- 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

12. 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
13. Wang L., Velazquez H., Chang J., Safirstein R., Desir G.V. (2015) Identification of a receptor for extracellular renalase. *PLoS One*, **10**, e0122932. DOI: 10.1371/journal.pone.0122932
14. Pointer T.C., Gorelick F.S., Desir G.V. (2021) Renalase: A multi-functional signaling molecule with roles in gastrointestinal disease, *Cells*, **10**, 2006. DOI: 10.3390/cells10082006
15. Kopylov A.T., Fedchenko V.I., Buneeva O.A., Pyatakova N.V., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2018) A new method for quantitative determination of renalase based on mass spectrometric determination of a proteotypic peptide labelled with stable isotopes, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **32**, 1263-1270. DOI:10.1002/rcm.8167
16. 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
17. 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
18. Морозевич Г.Е., Козлова Н.И., Сусова О.Ю., Лупатов А.Ю., Берман А.Е. (2017) Гиперэкспрессия интегрина $\alpha 5\beta 1$ усиливает резистентность клеток MCF-7 карциномы человека к доксорубину путем торможения протеинкиназы Erk. *Биохимия*, **82**(9), 1309-1317. [Morozovich G.E., Kozlova N.I., Susova O.Y., Lupatov A.Y., Berman A.E. (2017) Hyperexpression of integrin $\alpha 5\beta 1$ promotes resistance of MCF-7 human breast carcinoma cells to doxorubicin via ERK protein kinase down-regulation. *Biochemistry (Moscow)*, **82**(9), 1017-1024.] DOI: 10.1134/S0006297917090048

Поступила в редакцию: 15. 05. 2023.
 После доработки: 30. 05. 2023.
 Принята к печати: 01. 06. 2023.

THE EFFECT OF RENALASE-DERIVED PEPTIDES ON VIABILITY OF HepG₂ AND PC3 CELLS

V.I. Fedchenko, G.E. Morozovich, A.E. Medvedev*

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

Renalase (RNLS) is a recently discovered protein, which plays different roles inside and outside cells. Intracellular RNLS is a FAD-dependent oxidoreductase (EC 1.6.3.5), while extracellular RNLS lacks its N-terminal peptide, FAD cofactor, and exhibits various protective effects in a non-catalytic manner. Certain evidence exists, that plasma/serum RNLS is not an intact protein secreted into the extracellular space, and exogenous recombinant RNLS is effectively degraded during short-term incubation with human plasma samples. Some synthetic analogues of the RNLS sequence (e.g. the Desir's peptide RP-220, a 20-mer peptide corresponding to the RNLS sequence 220–239) have effects on cell survival. This suggests that RNLS-derived peptides, formed during proteolytic processing, may have own biological activity. Based on results of a recent bioinformatics analysis of potential cleavage sites of RNLS (Fedchenko et al., *Medical Hypotheses*, 2022) we have investigated the effect of four RNLS-derived peptides as well as RP-220 and its fragment (RP-224) on the viability of two cancer cell lines: HepG₂ (human hepatoma) and PC3 (prostate cancer). Two RNLS-derived peptides (RP-207 and RP-220) decreased the viability of HepG₂ cells in a concentration dependent manner. The most pronounced and statistically significant effect (30–40% inhibition of cell growth) was observed at 50 μ M concentration of each peptide. In the experiments with PC3 cells five of six RNLS-derived peptides had a significant impact on the cell viability. RP-220 and RP-224 decreased cell viability; however, no concentration dependence of this effect was observed in the range of concentrations studied (1–50 μ M). Three other RNLS-derived peptides (RP-207, RP-233, and RP-265) increased viability of PC3 cells by 20–30%, but no concentration-dependence of this effect was found. Data obtained suggest that some RNLS-derived peptides may influence the viability of various cells and manifestation and direction of the effect (increase of decrease of the cell viability) is cell-type-specific.

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

Key words: renalase (RNLS); RNLS-derived peptides; cell viability; HepG₂ and PC3 cells

Funding. The work was carried out within the framework of the Long-Term Program of Fundamental Scientific Research in the Russian Federation (2021–2030) (No. 122030100170-5).

Received: 15.05.2023; revised: 30.05.2023; accepted: 01.06.2023.