

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Бычков Максим Леонидович

**ВЛИЯНИЕ ПРОТОН-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАНАЛОВ СЕМЕЙСТВА
DEG/ENAC НА РАЗВИТИЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

Специальность 1.5.2. – Биофизика (биол. науки)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

проф., доктор биологических наук

Е.Н. Люкманова

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ:

ВВЕДЕНИЕ	5
ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ	10
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Закисление опухолевого микроокружения как фактор ее прогрессии	11
1.1.1. Регуляция внутри- и внеклеточного pH в нормальных и опухолевых клетках	11
1.1.2. Молекулярные механизмы, способствующие прогрессии опухоли при закислении окружающей среды	13
1.1.3. Основные сенсоры pH опухолевых клеток	16
1.2. Протон-чувствительные каналы семейства DEG/ENaC в развитии опухолей.....	18
1.2.1. Протон-чувствительные каналы семейства DEG/ENaC: экспрессия в тканях и физиологическая роль	18
1.2.2. Особенности строения, фармакологии и механизм работы каналов ASIC	20
1.2.3. Особенности строения, фармакологии и механизм работы каналов DEG/ENaC	23
1.2.4. Сигнальные пути, запускаемые каналами ASIC	26
1.2.5. Таргетирование ASIC1a как перспективная стратегия лечения рака.....	29
1.2.5.1. Таргетирование ASIC1 для терапии глиом.....	30
1.2.5.2. ASIC1a как мишень для терапии лейкемии	31
1.2.5.3. ASIC1a как мишень для терапии аденокарциномы легкого	32
1.2.5.4. Таргетирование ASIC1a для терапии меланом.....	32
1.3. Мамбалгины – ингибиторы ASIC1a – потенциальное средство для терапии опухолей	33
1.3.1. Ингибиторы каналов ASIC1a – особенности и молекулярные механизмы действия	33
1.3.2. Мамбалгины как ингибиторы ASIC1a – строение, фармакология и механизмы действия.....	37
1.3.3. Таргетирование ASIC1a рекомбинантным мамбалгином-2 как перспективная стратегия противоопухолевой терапии	39
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1. Материалы, антитела и олигонуклеотиды	41

2.2. Получение рекомбинантного мамбалгина-2 и его характеристика.....	44
2.3. Электрофизиологические записи в ооцитах <i>X. laevis</i>	45
2.4. Работа с клеточными линиями	46
2.5. ПЦР в реальном времени	47
2.6. Анализ базы данных TCGA	48
2.7. Анализ жизнеспособности клеток	48
2.8. Анализ миграции и инвазии опухолевых и нормальных клеток	51
2.9. Пэтч-кламп на клетках эукариот	51
2.10. Проточная цитофлуориметрия	52
2.11. Экспрессия субъединиц ASIC/ENaC в ооцитах <i>Xenopus laevis</i>	53
2.12. Вестерн-блоттинг, иммунопреципитация и аффинная экстракция.....	54
2.13. Анализ клеточного цикла	56
2.14. Анализ экстернализации фосфатидилсерина	57
2.15. «Нокдаун» генов ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC.....	57
2.16. Флуоресцентная и конфокальная микроскопии	58
2.17. Статистический анализ	61
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1. Молекулярные механизмы адаптации опухолевых клеток к закислению внешней среды.....	62
3.1.1. Экспрессия мРНК активируемых закислением протон-чувствительных каналов повышена в опухолевых клетках	62
3.1.2. Закисление внешней среды активирует в опухолевых клетках протон-чувствительные каналы, содержащие ASIC1a, и про-онкогенные внутриклеточные мессенджеры	66
3.1.3. В опухолевых, но не нормальных клетках, формируется положительная обратная связь между активацией ионных каналов, содержащих ASIC1a, и поверхностной экспрессией сенсоров протонов.....	68
3.1.4. Активация протон-чувствительных каналов стимулирует рост и миграцию опухолевых, но не нормальных клеток	70

3.2. Молекулярные механизмы ингибирования протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a.....	75
3.2.1. Мамбалгин-2 ингибирует активность ASIC1a в ооцитах <i>Xenopus</i> и в опухолевых клетках различного происхождения.....	75
3.2.2. Блокирование входящих протон-чувствительных токов мамбалгином-2 тормозит рост различных опухолевых клеток при закислении внешней среды.....	76
3.2.3. Мамбалгин-2 тормозит миграцию опухолевых клеток при закислении внешней среды.....	83
3.2.4. Механизм ингибирования протон-чувствительных каналов мамбалгином-2 состоит в снижении активности и экспрессии митогенных и про-миграционных факторов.....	87
3.2.5. Ингибирование протон-чувствительных токов и митогенных сигнальных каскадов мамбалгином-2 останавливает деление клеток уменьшая синтез ДНК.....	90
3.2.6. В результате действия мамбалгина-2 на протон-чувствительные токи, митогенные сигнальные каскады и синтез ДНК в опухолевых клетках происходит апоптоз.....	95
3.3. Гетеротример ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC как молекулярная мишень мамбалгина-2 в опухолевых клетках	99
3.3.1. Эффекты мамбалгина-2 в опухолевых клетках опосредованы экспрессией протон-чувствительных каналов, содержащих субъединицы ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC.....	99
3.3.2. Ингибирование прогрессии опухолей мамбалгином-2 достигается за счет связывания с гетерокомплексом из субъединиц ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC	101
3.3.3. Мамбалгин-2 ингибирует гетеротример ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC значительно эффективнее, чем гомотример ASIC1a	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	107
ВЫВОДЫ:	108
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:	109

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ASIC – Протон-чувствительный ионный канал

CA – Карбоангидраза

CAMK – Кальмодулин-зависимая киназа

CD44 и CD133 – Кластер дифференциации 44 и 133

CDK4 и CDK6 – Циклин-зависимые киназы 4 и 6

CML – Хроническая миелогенная лейкемия

DEG/ENaC – Дегенерин/эпителиальные натриевые каналы

EGFR – Рецептор эпидермального фактора роста

ENaC – Эпителиальный натриевый канал

ERK – Киназа, регулируемая внешними стимулами

IC₅₀ – Полумаксимальная концентрация ингибирования

IL – Интерлейкин

MCT-1 – Транспортёр монокарбоксилата 1

MMP – Металлопротеаза матрикса

NFκB – Ядерный фактор каппа Б

NHE1 – Натрий-протонный антипортёр 1

PcTx1 – псалмотоксин 1

PICK1 – Белок, взаимодействующий с протеинкиназой С

PKA – Протеинкиназа А

PKC – Протеинкиназа С

PLC – Фосфолипаза С

Rb – Белок ретинобластомы

STAT – Передатчик сигнала и активатор транскрипции

TRPV – Канал переменного рецепторного потенциала, активируемый валиноидами

VEGF -- Фактор роста эндотелия сосудов

Wnt – Протоонкоген-гомолог Int1

АКТ – Протеинкиназа В

EC₅₀ – Полумаксимальная эффективная концентрация

МФ – медиана флуоресценции

ТСБ – Трис-солевой буфер

ФСБ – Фосфатно-солевой буфер

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования являются одной из ведущих причин смерти населения как в России, так и в мире. Одной из наиболее выраженных особенностей метаболизма опухолей является интенсивный метаболизм в опухолевой массе. В связи с высокой плотностью клеток и недостаточной оксигенацией, в опухолевых клетках активируются метаболические пути, приводящие к образованию кислых продуктов, экстрагирующихся из опухолевых клеток для поддержания нейтрального значения внутриклеточного pH. Это приводит к снижению pH микроокружения опухоли с $\sim 7,4$ до $\sim 5,5 - 6,5$. Клетки опухоли успешно адаптируются к низкому pH окружающей среды за счет активации сенсоров pH, таких как протон-чувствительные катионные каналы семейства дегенерин/эпителиальных натриевых каналов (DEG/ENaC). Каналы семейства DEG/ENaC представляют собой тримеры, состоящие из гомологичных субъединиц ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, ASIC4, α - δ ENaC и др. Субъединичный состав этих каналов определяет их чувствительность к pH и фармакологические свойства. Наиболее чувствительными к падению pH являются каналы ASIC1a, которые экспрессируются в центральной нервной системе, где отвечают за синаптическую пластичность и восприятие боли, а также в не-нейрональных клетках, в которых эти каналы отвечают за регуляцию газообмена, секрецию антител лимфоцитами и дифференцировку кератиноцитов в коже. Эти каналы активируются при падении pH до $\sim 6,4 - 6,6$ и обеспечивают вход в клетку ионов натрия. Входящий ток ионов Na^+ через пору каналов семейства DEG/ENaC является регулятором важнейших клеточных функций в опухолевых клетках, таких как кальциевый гомеостаз, объем и форма клеток, активность митогенных сигнальных путей, таких как Wnt, ERK или p38 MAP-киназных путей, транскрипция генов (посредством β -катенина, транскрипционного фактора NF κ B или путем регулирования созревания малой РНК miR-350) и др. В конечном счете, с активацией каналов семейства DEG/ENaC, содержащих ASIC1a, связана регуляция важных сигнальных путей, способствующих пролиферации и миграции опухолевых клеток.

Экспрессия ASIC1a значительно выше в клетках глиом по сравнению с нормальными астроцитами, а гиперэкспрессия ASIC1a или его активация при закислении внешней среды может приводить к усилению роста, миграции и устойчивости опухолевых клеток к химиотерапии. Более того, показано формирование опухолеспецифичного гетеротримерного Na^+ канала, состоящего из субъединиц ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC, в клетках глиом, но не в нормальных астроцитах. Таким образом, ингибирование работы

ASIC1a содержащих каналов может стать новой перспективной стратегией селективной терапии опухолей.

Есть несколько ингибиторов каналов семейства DEG/ENaC, содержащих субъединицу ASIC1a, которые взаимодействуют либо непосредственно с трансмембранным доменом, либо с участком связывания протонов канала, что приводит к блокировке активации канала или поддержанию канала в десенситизированном состоянии. Однако, такие ингибиторы либо неспецифичны, либо способны потенцировать некоторые каналы DEG/ENaC. Из яда черной мамбы *Dendroaspis polylepis* были выделены белки мамбалгины, которые эффективно ингибируют гомотримерные каналы ASIC1a и гетеротримерные каналы ASIC1a/ASIC2a. Эти белки представлены в виде трех изоформ, отличающихся друг от друга одним аминокислотным остатком, и обозначаемых как мамбалгин-1,2,3. Интересно, что мамбалгины, в отличие от других ингибиторов ASIC1a, являются аллостерическими ингибиторами ASIC1a, взаимодействуют с внешней частью субъединиц канала поддерживая канал в десенситизированном состоянии. Таким образом, мамбалгины являются аллостерическими и специфическими ингибиторами ASIC1a и могут быть использованы не только как инструменты для изучения влияния закисления среды на опухолевые клетки, но и как прототипы новых перспективных противоопухолевых препаратов.

В рамках данной работы показано, что адаптация опухолевых, но не нормальных клеток к закислению окружающей среды осуществляется за счет гиперэкспрессии и активации протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC, которые содержат субъединицу ASIC1a, а также активации митогенных и про-миграционных сигнальных путей. Ингибирование протон-чувствительных ASIC1a-содержащих каналов мамбалгином-2 тормозит рост и миграцию опухолевых клеток, снижая активность про-миграционного транскрипционного фактора SNAI1 и экспрессию CD44 и Frizzled 4, – регуляторов Wnt/ β -катенин-сигнального каскада, который активирует митогенные и про-миграционные сигнальные пути. Это приводит к ингибированию формирования комплекса циклина D1 с циклин-зависимыми киназами CDK4 и CDK6, что тормозит синтез ДНК в опухолевых клетках, останавливает их деление и приводит к индукции в них апоптоза. Более того, в опухолевых клетках происходит формирование гетеротримерного протон-чувствительного канала ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC. Формирование гетеротримерного канала в некоторых нормальных клетках не происходит из-за отсутствия синтеза мРНК соответствующих субъединиц. Мамбалгин-2 взаимодействует с этим каналом в опухолевых клетках и ингибирует ток через канал, индуцированный закислением внешней среды, значительно эффективнее, чем ток через гомотримерный канал ASIC1a. Молекулярное моделирование

подтвердило, что мамбалгин-2 образует более устойчивые ионные и гидрофобные контакты именно с γ -ENaC(-), а не с ASIC1(-) в составе тримерного канала по сравнению с гетеротримером ASIC1.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что таргетирование работы протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC мамбалгином-2 или его миметиками может стать перспективной стратегией терапии опухолей.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью работы является исследование механизмов влияния активации и ингибирования протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC на внутриклеточные сигнальные каскады и развитие опухолевых клеток. Для достижения заявленных целей были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Исследование механизмов влияния закисления внешней среды на активность и экспрессию протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC в клетках различного происхождения;
2. Определение молекулярных механизмов (в частности, с участием внутриклеточных киназ), лежащих в основе эффектов, запускаемых при активации каналов семейства DEG/ENaC в опухолевых клетках;
3. Изучение механизмов влияния ингибитора протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC мамбалгина-2 на состояние клеток и уточнение мишени мамбалгина-2 в них;
4. Изучение влияния ингибирования протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC мамбалгином-2 на активность внутриклеточных сигнальных каскадов, а также митогенных и про-миграционных транскрипционных факторов.
5. Изучение взаимодействия мамбалгина-2 с различными молекулярными мишенями в опухолевых клетках и моделирование комплекса мамбалгина-2 с мишенями.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Закисление опухолевого микроокружения как фактор ее прогрессии

1.1.1. Регуляция внутри- и внеклеточного рН в нормальных и опухолевых клетках

Поддержание оптимального значения рН как внутри, так и вне клеток организма является необходимым для поддержания метаболизма, мембранного потенциала, полимеризации цитоскелета и других процессов, что обеспечивает рост, миграцию клеток и выполнение ими своих функций в организме. При этом, поддержание должного рН внутри клетки как правило обеспечивается за счет различных транспортировщиков протонов, что, в свою очередь изменяет рН окружающей клетку среды. Главными регуляторами внутри- и внеклеточного рН являются ионные каналы следующих типов [1]:

1. Обменники протонов и катионов. Натрий-протонный антипортер 1 (NHE1), способствует выведению протонов из клетки и транспорту ионов натрия внутрь, а водородно-калиевая аденозинтрифосфатаза выводит из клетки ионы калия и закисляет внутриклеточное пространство.
2. H^+ -АТФаза и вакуолярная АТФаза (V-АТФаза), выводящие протоны из клетки.
3. Транспортеры монокарбоксилата (например, MCT1).
4. Переносчики гидрокарбоната (такие, как Cl^- - HCO_3^- обменник (BT) и Na^+ - HCO_3^- ко-транспортер (NBC)).
5. Обменники ионов хлора и органических анионов (AE).
6. Карбоангидразы (CAII, CAIX и CAXII), восстанавливающие уголекислоту до гидрокарбоната и протонов.

Активность этих каналов определяет баланс между вне- и внутриклеточным значением рН как в опухолевых, так и в здоровых клетках. Как правило, рН в цитоплазме нормальных клеток составляет $\sim 7,2$ или ниже, в то время как рН внеклеточной среды примерно равен $7,4$ [2]. В то же время, рН цитоплазмы опухолевых клеток выше, чем цитоплазмы нормальных ($\sim 7,4$ и выше), а внеклеточный рН опухолевого окружения значительно снижен по сравнению со значением у нормальных клеток и составляет $\sim 6,7 - 7,1$ [2–5]. Более того, в случае развития воспаления рН опухолевого микроокружения еще ниже и составляет $\sim 5,5$ [5,6].

Кислый рН внешней среды часто нужен для поддержания нормальной физиологии тканей, например, закисление играет важную защитную роль против бактериальной

инфекции в эпидермисе [7]. Поэтому, в некоторых случаях кислый pH поддерживается и в среде нормальных клеток. Так, pH кератиноцитов в верхних слоях кожи снижен, за счет работы натрий-протонного антипортера, локализацию которого в плазматической мембране клеток обеспечивает фокальная киназа адгезии (ФАК) [8].

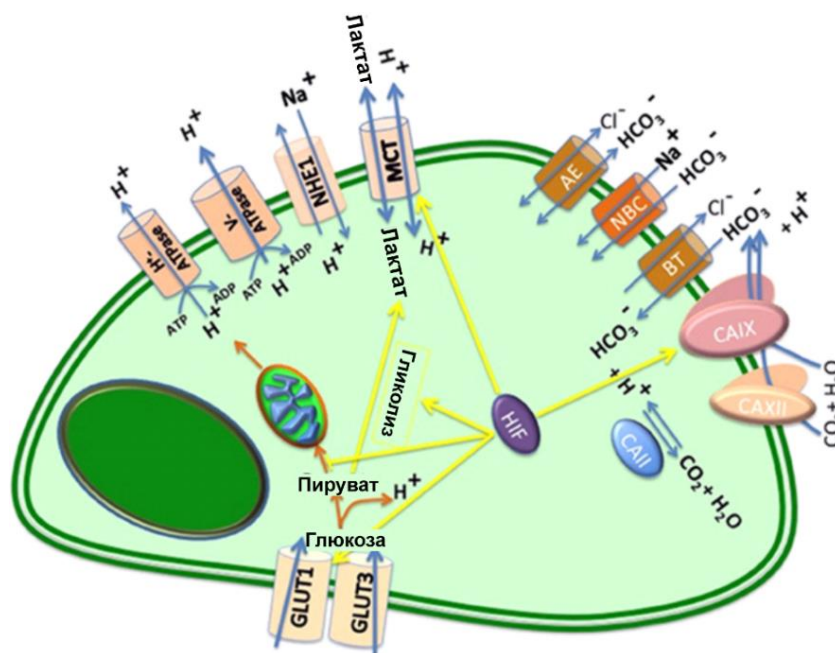


Рис. 1. Модель регуляции внутреннего и внешнего pH в клетках (по [9]). Питательные вещества в клетках метаболизируются до молочной, яблочной кислот с образованием энергии. Протоны, образуемые при этом, как и кислые метаболиты выводятся из клетки через натрий-протонный обменник, транспортер монокарбоксилатов и другие каналы, а углекислота диффундирует через мембрану клеток, на поверхности которой восстанавливается до бикарбоната с образованием протонов. В опухолевых клетках образуется гораздо большее число протонов, которые не удаляются из микроокружения и формируется вокруг неоплазии формируется хронически закисленная микросреда.

Основной причиной закисления внеклеточного pH в окружении опухоли является интенсивный метаболизм в плотной опухолевой массе, вследствие чего клетки опухоли секретируют множество кислых соединений [10,11]. Например, из-за активации гликолиза (т.н. «эффект Варбурга») в клетках опухоли происходит выделение ими молочной кислоты, как продукта аэробного гликолиза, в результате активного глутаминолиза во внеклеточную среду выделяется малат, восстанавливающийся до молочной кислоты (Рис. 1) [10,11]. В результате пентозофосфатного пути в клетках образуется большое количество углекислоты, которая конвертируется карбоангидразой в бикарбонат с образованием протонов, также экспортируемых в межклеточное пространство (Рис. 1) [10,11]. Из-за большей метаболической активности, опухолевые клетки экспортируют значительно большее количество протонов и кислых метаболитов, чем нормальные к закислению внеклеточного окружения в опухоли, и, в свою очередь способствует прогрессии

неоплазий. Если протоны межклеточного пространства могут быть связаны с углекислотой с формированием гидрокарбоната, то протоны внутри клетки депонируются как правило в лизосомах, что обеспечивает активность STAT3, который связывается с лизосомами клеток и запускает на мембране лизосом вакуолярную АТФазу, выводящую избыток протонов цитозоля в лизосомы [12].

1.1.2. Молекулярные механизмы, способствующие прогрессии опухоли при закислении окружающей среды

Закисление внеклеточной среды приводит к активации множества внутриклеточных сигнальных путей и транскрипции генов молекул, которые стимулируют защитную аутофагию, пролиферацию опухолевых клеток, а также их миграцию, инвазию и формированию резистентности опухолевых клеток к химиотерапии, а также васкуляризацию опухоли [10,11,13]. Молекулярные механизмы, запускаемые закислением внешней среды включают увеличение транскрипции генов, стимулирующих пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток, активацию митогенных и про-миграционных внутриклеточных сигнальных каскадов и секрецию в окружающее опухоль пространство про-онкогенных факторов и ферментов, ремоделирующих опухолевый матрикс (Рис. 2).

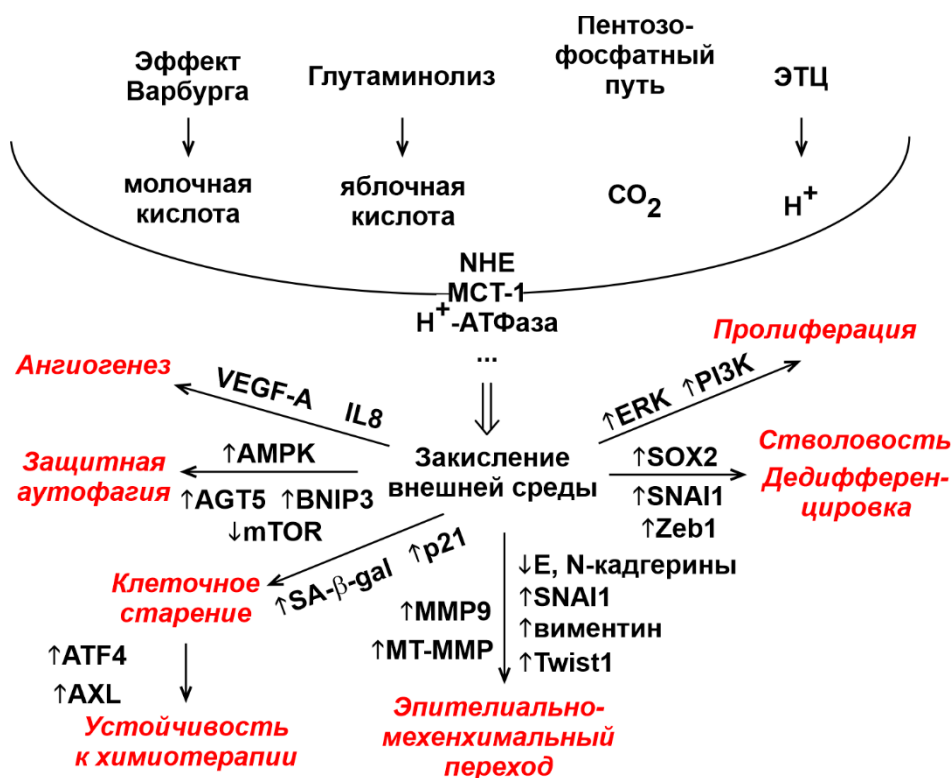


Рис. 2. Молекулярные механизмы адаптации опухолевых клеток к закислению внешней среды (по [10], с изменениями). Опухолевые клетки из-за интенсивного метаболизма закисляют среду. Для того, чтобы выжить в этой среде в них усиливается

экспрессия и активность факторов старения, стволовости, эпителиально-мезенхимального перехода, а также происходит секреция ангиогенных и иммуносупрессивных факторов.

Кислая микросреда влияет на экспрессию некоторых генов, способствующих прогрессии опухолей, например генов кислой сфингомиелиназы в меланоме [14], тромбоцитарного фактора роста эндотелиальных клеток в клетках рака молочной железы человека [15], фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) в клетках глиомы [16], а также интерлейкина-8 (IL8) в клетках аденокарциномы поджелудочной железы человека [17]. Факторы транскрипции AP-1 и NFκB, опосредуют увеличение экспрессии VEGF-A и IL-8 в клетках карциномы поджелудочной железы, что, в свою очередь, стимулирует их рост и миграцию [18,19]. Падение pH приводит к активации транскрипционного фактора SP1 в клетках эпидермоидной карциномы [20]. В клетках меланомы мыши B16 при закислении внешней среды, посредством фосфолипазы D, увеличивается активность ERK и p38 MAP киназы, а также NFκB, что также запускает транскрипцию генов, например MMP-9 [21]. Закисление внешней среды вызывает в клетках мышинной меланомы повышение концентрации внутриклеточного кальция [14], и может стимулировать рост и миграцию опухолевых клеток. Для клеток меланомы также характерна активация защитной аутофагии за счет ингибирования mTOR пути и активации AMPK [22]. Еще один механизм, посредством которого клетки меланомы адаптируются к закислению внешней среды это индукция старения клеток, что приводит к формированию дедифференцированных клеток, устойчивых к химиотерапии за счет активации RAS-ERK и PI3K путей [23]. Старение клеток меланомы при закислении среды также сопровождается увеличением экспрессии SA-β-галактозидазы, белка p21, при этом происходит арест клеточного цикла. Это, в свою очередь, активирует клеточный ответ на стресс, при котором увеличивается активность ATF4 и экспрессия тирозинкиназы AXL, которые обеспечивают устойчивость клеток меланомы к химиотерапии [24].

Падение внешнего pH приводит к нарушению межклеточных контактов за счет активации киназы Src в клетках карциномы печени. Активация Src приводит к деградации E-кадгерина посредством протеинкиназы PKCδ [25]. Нарушение межклеточных контактов, равно как и активность протеолитических ферментов, ремоделирующих матрикс опухоли, могут приводить к миграции и инвазии опухолевых клеток, например, низкий pH внешней среды стимулирует миграцию и инвазию клеток меланомы человека за счет активации MMP-9 [26]. Закисление внешнего пространства уменьшает экспрессию E- и N-кадгерин, при этом увеличивая экспрессию виментина и про-миграционных транскрипционных факторов Twist1 и Acs11 не только в опухолевых, но и в нормальных клетках, таким

образом, закисление внешней среды может способствовать трансформации нормальных клеток [27]. Также, системы транспорта протонов могут регулировать процесс метастазирования при закислении внешней среды. Например, показано, что натрий-протонный обменник NHE1 формирует комплекс с рецептором гиалуроновой кислоты CD44 в опухолевых клетках груди, из-за чего при связывании гиалуроновой кислоты с CD44, NHE1 активируется, pH внеклеточной среды падает, а клетки карциномы груди начинают сильнее мигрировать и метастазировать [28]. Метастазирование этих клеток при активации NHE1 обеспечивают ERK и p38 MAPK сигнальные пути, а также активность металлопротеазы MT1-MMP [29]. Кроме того, закисление внешней среды приводит к увеличению экспрессии гена и активации металлопротеазы MMP-9, а также к увеличению секреции катепсинов В и L в клетках меланомы [14,30,31]. Также, адаптация клеток меланомы приводит к увеличению экспрессии виментина и уменьшению уровня E-кадгерина, что приводит к эпителиально-мезенхимальному переходу в этих клетках и их инвазии [32]. Падение внешнего pH также приводит к формированию у клеток меланомы стволового фенотипа за счет активации транскрипционных факторов SOX2, Zeb1 и SNAI1 [33].

Наконец, падение внешнего pH индуцирует секрецию проангиогенных факторов (VEGF-A и IL8), что способствует метастазированию клеток меланом в легкие [31]. Увеличение секреции про-ангиогенного IL8 мезенхимальными стволовыми клетками опосредует митоген-активируемая протеинкиназа p38 (MAPK) и NF-κB [34]. Кроме про-онкогенных паракринных факторов, лактат, продуцируемых опухолями в результате гликолиза подавляет противоопухолевый иммунитет, например, ингибируя экспорт лактата из Т-клеток [35].

Следует обратить внимание и на то, что низкий pH (~ 6,5) внешней среды опухоли ингибирует поглощение митоксантрона и топотекана, что может также приводить к устойчивости опухолей к химиотерапии [36]. Дополнительным фактором устойчивости клеток к химиотерапии может быть также усиление вымывания лекарств из опухоли при низком pH внешней среды и гипоксии [37].

Таким образом, закисление внешней среды приводит к активации ферментов, ремоделирующих опухолевый матрикс, изменению транскрипции онкогенов, стимулированию роста и миграции опухолевых клеток, а также к секреции ими ангиогенных факторов в окружающую среду. Низкий pH также может способствовать вымыванию противоопухолевых лекарств, снижая эффективность терапии.

1.1.3. Основные сенсоры pH опухолевых клеток

Защеление внешней среды вызывает в нормальных клетках апоптоз, однако опухолевые клетки успешно адаптируются к падению внешнего pH, при увеличивается их пролиферация, миграция и инвазия. Адаптация клеток опухоли к низкому pH внешнего пространства осуществляется при помощи различных сенсоров протонов. К ним относятся G-спаренные белки, а также и ионные каналы, а именно:

1. G-белок-спаренный рецептор 1 (OGR1), который при защелении внешней среды активирует в опухолевых клетках ERK [38].

2. G-белок-спаренный рецептор 4 (ORG4), передающий сигналы через ГТФазу RhoA, запускаящий формирование в клетках стресс-индуцированных актиновых волокон и снижающий подвижность клеток меланомы [39].

3. G-белок спаренный рецептор TDAG8, который стимулирует выживание клеток во внешней защеленной среде и способствует трансформации нормальных фибробластов за счет активации ERK [40,41].

4. Канал переменного рецепторного потенциала TRPV1, обеспечивающий вход ионов Ca^{2+} в клетки при защелении среды до pH $\sim 6,5$. Это вызывает активацию PI3K/AKT/mTOR пути и ERK в опухолевых клетках различного происхождения и регулирует их пролиферацию [42].

5. Канал TRPV4, активирующийся при защелении среды до pH ~ 4 [43].

6. Канонические каналы переменного рецепторного потенциала TRPC4 и TRPC5, активируемые при падении pH до $\sim 6,5$, однако закрывающиеся при дальнейшем его снижении. Эти каналы также запускают в клетках сигналы, опосредованные ионами Ca^{2+} [43].

7. Кальциевый канал эндоплазматического ретикулума TRPP2 с плохо изученной функцией [44].

8. Двупористые калиевые каналы месейства K_{2P} , которые активируются глюкозой, протонами и углекислотой, и регулируют восприятие боли и имеют большое значение в нейропротекции и развитии воспаления в нервной системе [43,45].

9. Ионотропные пуринорецепторы семейства P2X, активируемые АТФ или пуринами при защелении среды и обеспечивающие входящий ток ионов Ca^{2+} в клетку [46].

10. Протон-чувствительные ионные каналы семейства DEG/ENaC (дегенерин/эпителиальные натриевые каналы), представленные субъединицами ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, ASIC4, а также каналами α - δ -ENaC, а также несколько субъединиц каналов HiNaC [47].

Все эти каналы активируются закислением внешней среды, а также некоторыми другими стимулами, и запускают как ионотропные, так и metabotropic внутриклеточные сигнальные пути. Ионотропные сигнальные пути данных каналов связаны как с проникновением непосредственно самих проводимых ионов в клетку (ионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и др.), так и с вторичным высвобождением ионов из внутриклеточных компартментов. Так, например, вход в нейроны ионов натрия при активации каналов семейства DEG/ENaC, может вызывать выход кальция из митохондрий вследствие работы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника [48], а активация кальциевого канала TRPC5 вызывает выход дополнительных ионов кальция из эндоплазматического ретикулума [49]. В целом ионотропные события приводят к увеличению количества ионных вторичных мессенджеров, в роли которых выступает сам кальций [50,51], так и активацией киназных сигнальных каскадов, например ERK посредством кальмодулин-зависимой киназы I (CaMKI) [52]. Также ионотропные события приводят к активации ферментов и метаболизма клеток, например, при входе ионов Na^+ в астроциты, для удаления излишков натрия активируется Na^+/K^+ -АТФаза, вследствие чего расходуется энергия и это интенсифицирует метаболизм клеток [53].

Metabotropic сигнальные пути, активируемые сенсорами закисления в клетках связаны с активацией внутриклеточных сигнальных каскадов из-за непосредственного взаимодействия внутриклеточных доменов ионных каналов с белками-партнерами. Например, TRPV1 взаимодействует с Gαq- и Gαs спаренными рецепторами, и при их стимуляции активируют фосфолипазу C (PLC), запуская выход кальция из эндоплазматического ретикулума и активацию протеинкиназы C (PKC) [54]. А вот ASIC1a связывает и фосфорилирует белок RIP1, что может вызывать некроптоз в нейронах при закислении внешней среды (см. главу 1.7.) [55].

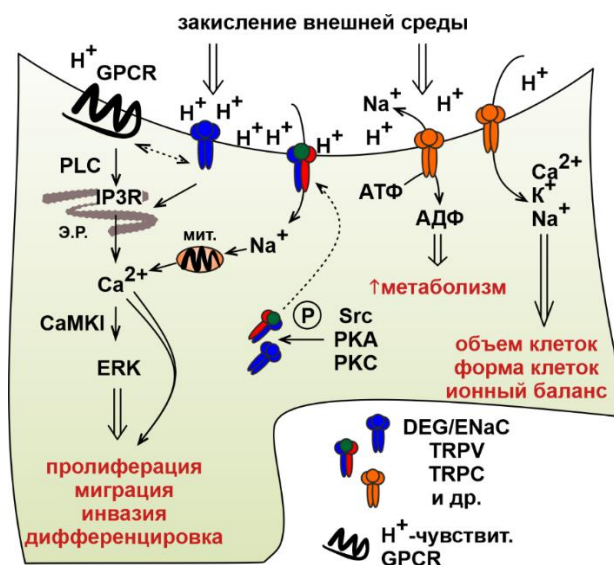


Рис. 3. Схема сигнальных путей, запускаемых в клетках ионными каналами-сенсорами закисления. Сенсоры закисления активируются протонами и запускают в клетках ионотропные и metabotropic сигнальные каскады, регулирующие фенотип и физиологию клеток.

Следует также отметить, что многие внутриклеточные вторичные мессенджеры также регулируют активность сенсоров протонов, так Src, PKA и PKC фосфорилируют TRPV1, увеличивая его поверхностную экспрессию в клетках HEK293 [56,57], а транспорт ASIC1a на клеточную мембрану усиливался при его ко-экспрессии с белком, взаимодействующим с протеинкиназой C (PKC1) [58]. Так же Src, PKA и PKC фосфорилируют TRPV4, увеличивая его активность [59]. Обобщение сигнальных механизмов, активируемых сенсорами закисления приведено на Рис. 3.

Активация сенсоров закисления и внутриклеточных сигнальных механизмов в конечном счете приводит к:

1. Регуляции формы клеток (объем клеток связан с активацией TRPV4, но механизм этого не изучен [59]).

2. Изменению пролиферации и подвижности опухолевых (при активации ASIC1a клетки аденокарциномы легкого быстрее мигрируют при закислении среды [60]) и нормальных (например, рост и миграция стволовых клеток эндотелия регулируются OGR1 [61]) клеток.

3. Дифференцировке клеток (так, TRPC4 контролирует дифференцировку миоцитов [62]).

4. Регулировке воспаления посредством увеличения секреции цитокинов (активация различных ENaC стимулирует секрецию IL-18 и IL-1 β клетками эпителия [63]).

Таким образом, клетки экспрессируют на своей поверхности многочисленные сенсоры протонов, активации которых запускает ионотропные и metabotropic сигнальные пути. При этом, внутриклеточные вторичные мессенджеры и сами регулируют экспрессию и активность сенсоров закисления в клетках. Все эти события обеспечивают адаптацию клеток к падению pH.

1.2. Протон-чувствительные каналы семейства DEG/ENaC в развитии опухолей

1.2.1. Протон-чувствительные каналы семейства DEG/ENaC: экспрессия в тканях и физиологическая роль

Одними из самых важных сенсоров закисления среды являются протон-чувствительные каналы семейства DEG/ENaC, которые представлены двумя подсемействами – протон-чувствительные каналы ASIC и эпителиальные натриевые

амилорид-чувствительные каналы ENaC [47]. ASIC представлены 4 субъединицами ASIC1-4 с гомологией ~ 45–60 %. При этом, ASIC1 и ASIC2 имеют 2 изоформы – ASIC1a, ASIC1b и ASIC2a, ASIC2b, соответственно. ENaC представлены 4 субъединицами α - δ -ENaC с 30 % гомологией аминокислотной последовательности [47,64]. Функционально активные каналы представляют собой тримеры субъединиц, причем это могут быть как гомо- так и гетеротримеры, субъединичный состав каналов определяет их фармакологию, чувствительность к pH и кинетику активации [65].

Каналы ASIC активируются протонами внешней среды, обеспечивая входящий ток катионов в клетку. Канал ASIC1a, широко распространен в центральной и периферической нервных системах, включая большинство отделов головного и спинного мозга, особенно велика экспрессия ASIC1a в амигдале [64,66]. При этом, ASIC1a локализуется в основном в телах нейронов и со-локализуется с постсинаптическим маркером PSD95. В связи с тем, что каналы проводят ионы натрия, они могут вызывать деполяризацию мембраны, обеспечивая таким образом возникновение потенциала действия. Таким образом, ASIC1a как сенсор ацидоза участвует в проведении сигналов, а активность этого канала приводит к увеличению плотности дендритных шипиков и усилению долговременной потенциации в амигдале при увеличении концентрации протонов [67]. Также активность ASIC1a связана с поведенческими реакциями на стресс, проведением сигналов боли и ощущением механических воздействий [64,68,69]. Кроме того, ASIC1a также экспрессируется в периферических тканях, включая артерии, костный мозг, кишечник, язык и мочевой пузырь [66]. ASIC1b, активируемый при закислении pH до ~ 6, специфически экспрессируется в периферической нервной системе и участвует в болевых ощущениях, но точные подтипы нейронов, которые экспрессируют ASIC1b, недостаточно хорошо охарактеризованы [64,66]. ASIC2 (как ASIC2a, так и ASIC2b, не формирующий гомотримеров) экспрессируется в нескольких областях мозга, спинном мозге, а также в периферической нервной системе. ASIC2 в значительной степени экспрессируется в механорецепторах соматосенсорной системы, а также в гладких мышцах дуги аорты, мозговых артериях и мочевом пузыре. ASIC2 является механосенсором, участвует в сокращении гладких мышц [64,66]. ASIC3 экспрессируется в разных типах нейронов центральной нервной системы, нейронах кожи, однако данные пЭТч-кЛЭМпа демонстрируют, что функциональные каналы ASIC3 в основном экспрессируются в мышечных афферентных нейронах ноцицепторов и проприорецепторов спинного мозга [64,66]. Помимо нервной системы, ASIC3 также экспрессируется в определенных периферических тканях и клетках, таких как костный мозг, кишечник, жировая ткань, мочевой пузырь и суставы, но функциональное значение ASIC3 в этих тканях требует дальнейшего изучения [66]. ASIC4 в основном

экспрессируется в головном мозге и гипофизе, а также в нейронах спинного мозга, а также в астроцитах. ASIC4 не формирует функциональных каналов, но при этом, он способен взаимодействовать с ASIC1a и ASIC3, снижая их поверхностную экспрессию, таким образом ASIC4 может выступать как регуляторная субъединица ASIC [66,70].

Эпителиальные каналы ENaC изначально были обнаружены в апикальной мембране, в которой они вместе с Na⁺/K⁺-АТФазой обеспечивают транспорт ионов Na⁺ через базальную мембрану. Данные каналы активируются протеолитически, после отщепления ингибиторного пептида проводят в клетку постоянный ток ионов натрия, оставаясь постоянно открытыми [71], при этом именно активность протеаз регулирует открытие каналов ENaC (см далее). Физиологическая роль этих каналов состоит в поддержании баланса ионов Na⁺ и K⁺ в эпителии, абсорбции ионов Na⁺ в нефронах почки, а также в удалении избытков жидкости из легких. Кроме того, предполагается участие данных каналов в механочувствительности и ощущении кровяного давления [47].

1.2.2. Особенности строения, фармакологии и механизм работы каналов ASIC

Субъединичный состав тримеров ASIC определяет чувствительность тримера к рН, кинетику и фармакологию канала [72–74]. Чувствительность к кислому рН варьируется между различными изоформами следующим образом: каналы ASIC1a и ASIC3 являются наиболее чувствительными, с рН полуактивации (pH₅₀) около 6,4–6,6, каналы ASIC1b занимают промежуточное положение (pH₅₀ 5,9–6,3), а вот каналы ASIC2a наименее чувствительны (pH₅₀ 4,3–4,9) [75]. ASIC2b и ASIC4 не открываются при падении рН внешней среды и, по-видимому, образуют только гетеромерные каналы с другими изоформами, тем самым влияя на функцию канала в целом [70,76,77].

Все члены семейства DEG/ENaC имеют общую пространственную топологию. Субъединица ASIC состоит из внеклеточной части, содержащей 5 функциональных доменов (thumb, finger, β-ball, knuckle и palm домены), приближенных к мембране β-цепей β1-β2 и β11-β12, трансмембранной части из 2 α- цепей – прямой цепи ТМ1 и подогнутой цепи ТМ2, а также внутриклеточной части из N и С концов (Рис. 4А). Домены внеклеточной части формируют сайты связывания протонов, кальция, хлоридов и других лигандов. Для формирования тримера субъединицы ASIC взаимодействуют за счет трансмембранных α-спиралей, а также finger. Thumb и palm доменов. Сайты связывания протонов расположены в середине внеклеточного домена (45 Å над клеточной мембраной) и состоят из четырех пространственно близких пар: Asp238-Asp350 и Glu239-Asp346 из finger и thumb доменов одной и той же субъединицы, а также Glu220-Asp408 из palm домена соседней субъединицы ([65], Рис 3Б). Эти аминокислотные остатки формируют кислотный карман, в который

входят протоны, но важную роль в чувствительности к протонам играют и Glu80-Glu417 palm домена, которые ускоряют десенситизацию и обеспечивают появление постоянного тока [78] Интересно то, что эти остатки консервативны между различными субъединицами ASIC, но при этом обнаруживаются и у нечувствительных к протонам субъединицах, что указывает на возможное существование других сайтов связывания протонов. Это также подтверждается тем, что удаление всех трех пар аминокислот из кислотного кармана не приводит к потере каналом чувствительности к протонам [65,79]. Кислотный карман имеет расширенную конформацию в состоянии покоя с высоким рН и десенсибилизированном состоянии с низким рН и сжатую конформацию в открытом состоянии с низким рН. Стянутая конформация характеризуется сближением боковых цепей аспартата и глутамата для связывания протона, что, в свою очередь, приводит к перестройке внеклеточного домена и трансмембранных цепей для открытия поры канала [80–83].

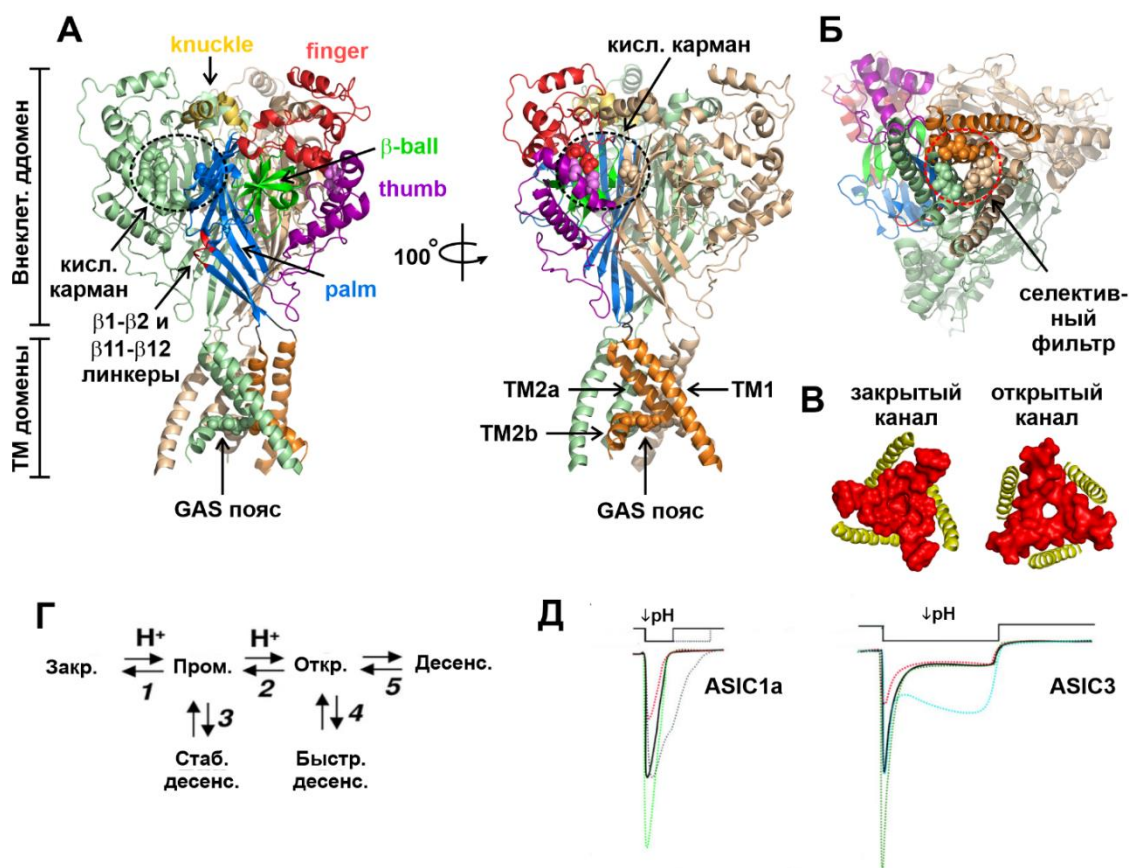


Рис. 4. Структура и механизм работы каналов ASIC1. А – пространственная структура тримера канала в разных положениях (по [65]). Б – селективный фильтр ионов канала ASIC1a (по [65]). В – вид сверху на ASIC1a в закрытом и открытом состоянии (по [84]). Г – модель работы канала (по [85]). Канал находится в закрытом состоянии, но еще до открытия может переходить в состояние стабильной десенситизации. После открытия канала для него характерно только состояние быстрой десенситизации, после которой канал закрывается при возвращении рН в норму. Д – сравнение фармакологии каналов

ASIC1a и ASIC3 ([65]). В отличие от каналов ASIC1a для ASIC3 характерно большее время десенситизации.

Катионы, проводимые каналом в клетку накапливаются в «резервуаре», образованном внеклеточными доменами трех субъединиц, причем этот резервуар расширяется в открытом состоянии, по сравнению с закрытым и десенситизированным [65]. Трансмембранная часть тримера состоит из шести α -спиралей (по две от каждой субъединицы), имеет форму песочных часов и кроме тримеризации образует селективный фильтр для переноса натриевых ионов через мембрану. Трансмембранная часть каждой субъединицы образована двумя α -спиралями: TM1 и TM2. TM1 контактирует с TM2 той же субъединицы, TM1 и TM2 из соседних субъединиц и с липидным окружением, в то время как TM2 выстилает поры канала. TM2 состоит из двух частей (TM2a и TM2b), разделенных тремя остатками - Gly443-Ala444-Ser445, которые называются поясом GAS (рис. 2А, В). При закрытой поре TM2 принимает изогнутую конформацию, образуя «заглушку» поры с другими TM2 из соседних субъединиц. Распрямление TM2 переводит пору в открытое состояние с формированием фильтра ионной селективности, образованного тремя поясами GAS из соседних субъединиц. Фильтр ионной селективности представляет собой самую узкую часть поры и служит для отбора типов ионов, протекающих через канал. Размер фильтра (радиус $\sim 3,6 \text{ \AA}$), что соответствует радиусу гидратированного Na^+ ($\sim 3,8 \text{ \AA}$, для сравнения – радиус гидратированного калия $\sim 4,2 \text{ \AA}$). Последовательность TM2 очень консервативна в ASIC, что указывает на схожую структуру порового домена во всем семействе.

В настоящее время известны структуры канала ASIC1a в состоянии покоя с высоким pH, открытом состоянии с низким pH и десенситизированном состоянии с низким pH [80–83,86,87]. На основании этого был предложен следующий механизм работы канала: при нейтральном pH канал существует в закрытом состоянии с расширенным кислотным карманом и подогнутыми TM2 спиралью трансмембранных доменов субъединиц тримера. При снижении pH внеклеточной среды протоны попадают в открытый кислотный карман, образованный отрицательно заряженными парами аминокислот в thumb-, β -ball- и finger-доменах одной субъединицы и частью palm-домена соседней субъединицы (Рис.4Б,В).

Протоны связываются с парами карбоксилатов в кармане и за счет электростатических взаимодействий, стягивая карман в компактную структуру. Это, приводит к повороту каждой субъединицы тримера против часовой стрелки, при котором цепи $\beta 1$ - $\beta 2$ и $\beta 11$ - $\beta 12$ palm-домена «прижимаются» к мембране, после чего происходит

распрявление ТМ2 α -спиралей в каждой из субъединиц тримера, и открытие поры канала. Через селективный фильтр, образуемый трансмембранными α -спиралями, в клетку проходят ионы натрия. За сотни миллисекунд из-за переориентации цепей $\beta 1$ - $\beta 2$ и $\beta 11$ - $\beta 12$ в исходную конформацию, трансмембранные α -спирали ТМ2 трех субъединиц снова загибаются, переводя канал из своего открытого состояния в десенситизированное еще при низком значении рН (см. модель работы канала на Рис. 4Г). Модель работы канала ASIC1 представлена на Рис 4Г. Согласно этой модели, после входа протонов в кислотный карман, канал переходит в промежуточное состояние с закрытым карманом и закрытой порой, после чего происходит открытие поры канала, а затем его переход в десенситизированное состояние. При возвращении рН к норме, канал закрывается [85]. Ток катионов, который опосредуют функциональные ASIC активируются быстро, но кинетика десенситизации разных субъединиц значительно отличается, особенно велико время десенситизации у субъединиц ASIC3, примерно равное времени проведения тока (Рис. 4Д). Отличительной особенностью тримеров, содержащих ASIC1a является наличие стабильно-десенситизированного состояния канала, при котором одновременно закрыты пора канала и кислотный карман [65]. Это приводит к тому, что когда концентрация протонов в окружающей среде увеличивается незначительно, канал открывается, но на следующее падение внешнего канала реагируют либо значительно слабее, либо вообще отсутствует [88,89]. Данное состояние поддерживается до открытия канала (см. модель работы канала) и достигается за счет конформационных изменений линкеров $\beta 1$ - $\beta 2$ и $\beta 11$ - $\beta 12$. При возвращении рН к физиологическим значениям, цепи $\beta 11$ - $\beta 12$ приходят в исходную, отдаленную от мембраны, конфигурацию, что приводит к высвобождению протонов из кислотного кармана и его открытию. Таким образом, линкеры $\beta 11$ - $\beta 12$ играют важную роль в закрытии канала, выступая в качестве связующего звена между внеклеточным и трансмембранным доменом. расширен, и ТМ-домен не пропускает ионный поток [65]. Следует отметить, что мембранные липиды также вовлечены в регулировку работы ASIC. Так, арахидоновая кислота потенцирует ASIC1a и ASIC3 путем прямого взаимодействия с каналами в сенсорных нейронах крысы, а арахидоновая кислота и лизофосфатидилхолин активируют ASIC3 при нейтральном рН и вызывают болевые ощущения у крыс, что говорит о важной роли липидов в проведении сигналов ASIC [90,91].

1.2.3. Особенности строения, фармакологии и механизм работы каналов DEG/ENaC

Каналы ENaC формируют функциональные тримеры, так же как и ASIC, при этом наиболее интенсивный ток натрия в клетку происходит при формировании тримера из α - β - и субъединиц γ -ENaC [92].

Каналы ENaC и ASIC имеют похожие palm и β -ball домены, однако отличаются knuckle домены каналов, более того для finger домена ENaC характерна вставка из 80 аминокислот. Эта вставка и формирует т.н. домен облегчения открытия канала (GRIP-домен). В самой структуре главные отличия тримеров ENaC от ASIC это более плотное взаимодействие knuckle доменов ENaC с α -цепями finger доменов соседних субъединиц, а также формирование GRIP из антипараллельных β -листов в finger доменах (Рис. 5А) [93].

Еще, в отличие от ASIC у ENaC протон-чувствительный сайт сформирован не отрицательно-заряженными аминокислотами, а ароматическими (в частности, триптофанами и тирозинами thumb доменов субъединиц). При этом, для ENaC, как и для ASIC характерна ключевая роль цепи TM2 в открытии поры канала [93]. Механизм работы ENaC близок к таковому у ASIC, за исключением того, что первоначальным процессом, запускающим конформационные изменения в канале является протеолитическое отщепление одного из β -листов домена протеолитической активации (т.н. P1 петля GRIP домена) [92,93]. Механизм работы и фармакология канала представлены на Рис. 5Б,В. Протеолитическая активация каналов проходит в несколько стадий: на первой стадии α - и γ -субъединицы тримера ENaC расщепляются сериновой протеазой комплекса Гольджи фурином в 2х и 1м месте, соответственно. Это удаляет ингибиторный пептид у α -субъединицы и переводит тримерный канал в средне-активное состояние, после а расщепления γ -субъединицы канала второй протеазой, не связанная с фурином (например, сериновой протеазой калликреин), канал открывается полностью, при этом ток ионов натрия усиливается. Каналы, подвергшиеся процессингу фурином, в которых α -субъединица утратила свой тормозной путь, а γ -субъединица была расщеплена один раз, в целом имеют промежуточную вероятность открытия. Каналы, подвергшиеся процессингу фурином и второй протеазой, где α - и γ -субъединицы утратили свои тормозные тракты, в целом имеют высокую вероятность открытия. Важным предостережением является то, что другие важные факторы, помимо протеаз, влияют на вероятность открытия канала.[94,95].

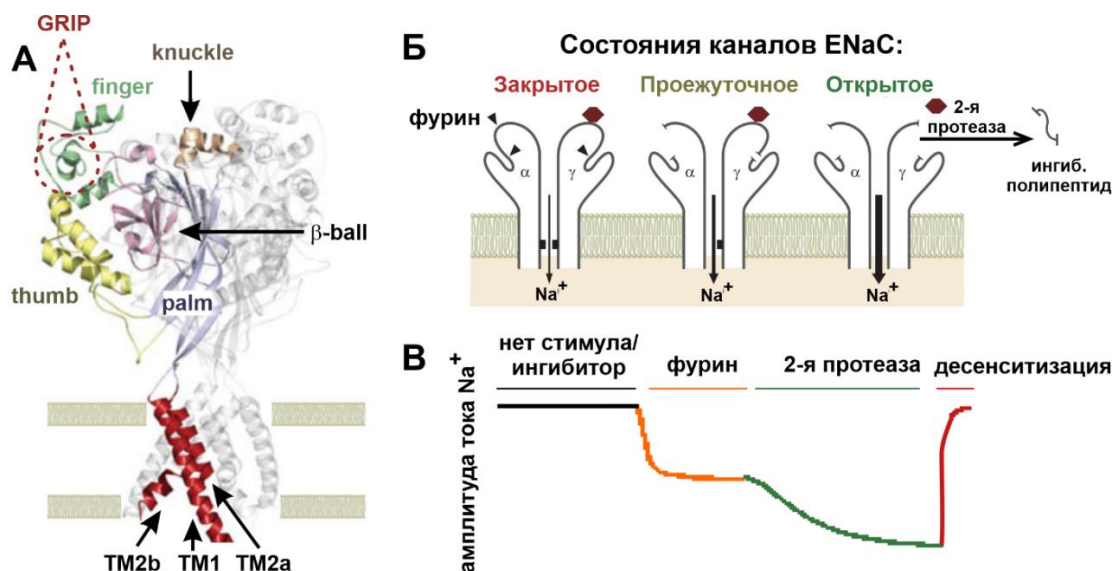


Рис. 5. Структура и механизм работы каналов ENaC. А – пространственная структура канала (по [94]). Пунктиром выделен GRIP домен, обеспечивающий протеолитическую активацию ENaC. Б – Механизм протеолитической активации канала (по [94]). Активация канала происходит по двуступенчатому механизму, в результате активации от субъединиц отщепляются ингибиторные пептиды и канал переходит в постоянно открытое состояние. В – примерная фармакология канала при его активации.

Отличительной особенностью ENaC является то, что они будучи активированными протеиназами остаются открытыми продолжительное время, до тех пор пока не будут убраны с мембраны или десенситизированы при конформационных изменениях palm доменов субъединиц [96].

Следует отметить, что в связи с гомологией структуры, а также принципиальной схожестью селективных фильтров представляется возможным формирование гетерокомплексов между ASIC и ENaC [84]. Более того, связывание α -ENaC с ASIC1a с показано ранее в гибридной системе [97]. Для клеток альвеол при гиперэкспрессии α -ENaC характерно формирование димера α -ENaC с ASIC1a, вследствие чего в клетках появляется катионный ток [97]. Формирование гетерокомплекса из субъединиц ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC подтверждено и на клетках глиомы на поздних стадиях [98,99].

Таким образом, каналы ASIC и ENaC имеют общую пространственную архитектуру и формируют тримеры, которые при активации протонами опосредуют вход в клетку ионами натрия. Для каналов ASIC1a характерно стабильно-десенситизированное состояние, при котором канал, будучи активирован слабым падением pH, не открывается при более серьезном закислении среды.

1.2.4. Сигнальные пути, запускаемые каналами ASIC

Открытие канала ASIC1a приводит к проникновению в клетку ионов натрия, что приводит к активации Na^+/K^+ -АТФазы для выведения избытков натрия и усиливает метаболизм клетки (см. ранее). Однако, многие рН сенсоры при открытии запускают не только ионотропные сигнальные механизмы, но и активируют вторичные мессенджеры посредством непосредственного взаимодействия с ними. Внутриклеточные N и C концы ASIC1a не являются исключением и способны взаимодействовать с некоторыми вторичными мессенджерами посредством интересного механизма. В нормальном состоянии N- и C- концы ASIC1a взаимодействуют друг с другом и ингибируют проведение метаболитных сигналов, но после открытия канала N- и C- концы отдаляются друг от друга, после чего с N концом канала связывается фермент мембранного транспорта NSF (N-этилмалеимид-чувствительный белок) для стабилизации N-конца молекулы. С конец, остающийся в цитоплазме свободным связывает рецепторную серин-треониновую киназу (RIPK1) и активирует ее фосфорилированием, что приводит к некроптозу в нейронах [55,100] (Рис. 6). Другими метаболитными вторичными мессенджерами, взаимодействующими с ASIC являются регулятор мембранного транспорта стоматин, компонент цитоскелета α -актинин, регулятор эндоцитоза AP2, активатор РКС PICK1 и др [101–103]. При этом связывание вторичных мессенджеров достигается за счет их взаимодействия с PZD доменом C-конца ASIC [101] (Рис. 6). Кроме того, ASIC1a может образовывать комплексы с Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназой II (CaMKII) и интегрином- β 1 [104], которые являются важными регуляторами внутриклеточной передачи сигналов и адгезии.

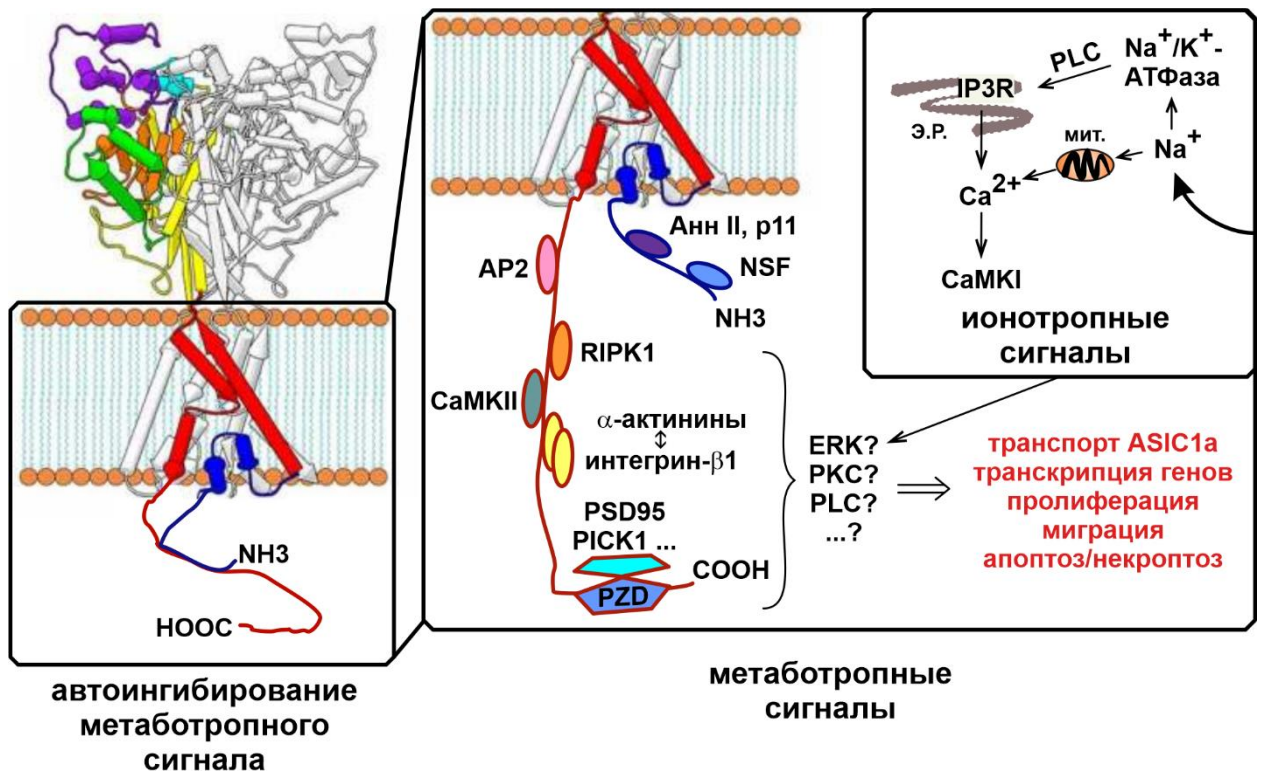


Рис. 6. Схема проведения сигналов каналом ASIC1a. При открытии каналов в клетку входят ионы натрия, что запускает ионотропные события и запуск метаботропных сигнальных путей, опосредованных взаимодействием белков-партнеров с С и N-концами ASIC1a.

При открытии поры канала метаботропные пути могут дополняться активацией вторичных мессенджеров по ионотропным механизмам, общим с другими сенсорами закисления внешней среды. Например, входящий ток ионов натрия может вызывать релиз кальция из митохондрий посредством $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника [48] или активацию IP3 рецепторов через Na^+/K^+ -АТФазу и фосфолипазу С (PLC) [105]. Общая схема сигнальных путей, запускаемых при активации ASIC1a приведена на Рис. 6.

Обобщение белков, которые могут передавать метаботропные сигналы через ASIC1a приведено в таблице 1.

Таблица 1.

Белки-партнеры, которые могут проводить метаботропный сигнал через ASIC1a (по [101]).

Белок-партнер	Сайт связывания	Влияние на катионный ток	Влияние на экспрессию	Функции и влияние на ASIC1a	Ссылки

Стоматин	--	нет	нет	Сборка цитоскелета	[106]
Стоматин-подобный белок 1 (STOML1)	--	Сильно ингибирует	--	Транспорт холестерина Регуляция тока	[107]
Стоматин-подобный белок 3 (STOML3)	--	нет	--	Обеспечивает проведение механических сигналов от ASIC	[108]
α -актинин 1	С-конец	нет	нет	Регулирует десенситизацию	[109]
α -актинин 4	С-конец	ингибирует	нет		
PSD95	--	нет	нет	Усиливает транспорт на мембрану	[110]
AP2	С-конец, близко к мембране	ингибирует	уменьшает	Обеспечивает эндоцитоз рецептора	[102]
PICK1	PZD	усиливает	увеличивает	Активирует РКС	[111]
AKAP150	С-конец	--	--	Усиливает экспрессию посредством РКА	[112]
Легкая цепь аннексина II p11	N-конец	усиливает	увеличивает	Усиливает выход на мембрану	[113]
RIPK1	С-конец	--	--	Активирует некроптоз	[55,100]
NSF	N-конец	--	--	Стабилизирует метаботропный сигналинг	[100]

Следует отметить, что для ASIC1 тоже характерна регуляция активности канала протеазами, однако, в отличие от ENaC, протеазы расщепляют канал ASIC, ингибируя опосредованные им токи. Примером такой регуляции может быть расщепление канала ASIC1 сериновой протеазой матрипазой, которая может служить второй протеазой, активирующей ENaC [114].

Таким образом, ASIC, в том числе и ASIC1a способны взаимодействовать с многими вторичными мессенджерами и передавать различные сигналы по метаболитному пути, при их активации.

1.2.5. Таргетирование ASIC1a как перспективная стратегия лечения рака

В последние годы появилось много данных о роли ASIC1 в прогрессии опухолей. Например, ASIC1, вовлечен в контроль роста, миграции и устойчивости к химиотерапии клеток рака легкого [60], печени [115,116], молочной железы [117] и других карцином [118,119]. В таблице 2 обобщены типы опухолей, в развитии которых принимает участие ASIC1.

Таблица 2.

Участие ASIC1 в развитии опухолей.

Особенности ASIC1	Механизмы, активируемые ASIC1	Влияние на онкопрогрессию	Ссылки
Глиомы			
Повышен, опосредует опухолеспецифический ток	- активация ERK, - ингибирование p21 и p27	Усиление роста Усиление миграции	[99,120–122]
Карциномы печени			
Повышен, связан с неблагоприятным прогнозом	- регуляция α и β -катенина, - активация PI3K/AKT/mTOR пути, - активация кальциевого сигналинга - активация AKT/GSK3 β , - индукция аутофагии.	Усиление роста, Усиление миграции, Эпителиально-мезенхимальный переход, Усиление устойчивости к химиотерапии.	[115,116,116,123–125]
Рак поджелудочной железы			
Повышен	- индукция аутофагии за счет увеличения экспрессии ATG5, - активация кальциевого сигналинга и ГТФазы RhoA, - активация ERK.	Усиление роста, Усиление миграции, Эпителиально-мезенхимальный переход.	[118,126,127]

Рак желудка			
Повышен, экспрессия связана с развитием рака	--	Усиление миграции и инвазии	[128,129]
Рак легкого			
--	- активация кальциевого сигналинга.	Усиление роста, Усиление миграции.	[60]
Рак груди			
Повышен, связан с неблагоприятным прогнозом заболевания	- активация кальциевого сигналинга, - генерация свободных радикалов, - активация NFκB.	Усиление роста, Усиление миграции и инвазии.	[117,130]
Рак простаты			
--	- генерация свободных радикалов, - активация ERK, - активация NFκB, - увеличение экспрессии Twist и SNAI1.	Усиление роста, Усиление миграции.	[131]

Остановимся подробнее на возможности таргетирования ASIC1a в некоторых типах опухолей.

1.2.5.1. Таргетирование ASIC1 для терапии глиом

Глиомы являются наиболее распространенными опухолями головного мозга, которые происходят из глиальных клеток и характеризуются быстрым ростом и высокой инвазивностью. По данным микроэлектродных измерений pH, pH глиомы, выделенной от пациентов, колеблется от 5,8 до 7,1, в то время как медиана pH нормальной ткани головного мозга пациента составляет около 7,1 [4,5]. Закисление способствует пролиферации опухолевых клеток, метастазированию и помогает клеткам неоплазии уйти от противоопухолевого иммунитета [132]. Клетки глиобластом на поздних стадиях отличаются от астроцитов или клеток глиом ранней стадии наличием постоянного тока

катионов [120], который, как было сказано ранее, опосредован гетеротримерными каналами, образованными субъединицами ASIC1a, α - и γ ENaC [98,99]. Подкисление внеклеточного микроокружения приводит к увеличению экспрессии каналов ASIC1/ENaC на поверхности мембран клеток опухолей [98], а входящий ток катионов, опосредованный каналами, содержащими ASIC1a является причиной роста и миграции клеток глиомы [121]. При этом, усиление роста и миграции клеток глиом при активации катионных токов опосредуется ингибированием фосфорилирования киназы ERK1/2 и последующим накоплением белков SKI p21Cip1 и p27Kip1 [121]. В то же время активность синтаксина 1 ингибирует токи катионов, специфические для глиомы при гиперэкспрессии ASIC1 и ASIC2 [120]. ASIC1a избыточно экспрессируется в глиомах по сравнению с нормальной тканью головного мозга (исследования TCGA и GTEX). Таргетирование ASIC1a селективными ингибиторами может стать новой стратегией терапии глиом. Существует несколько лигандов ASIC с антипролиферативной активностью в отношении клеток глиом и глиобластом. Например, антидиуретический препарат амилорид и его аналоги ингибируют как ASIC-опосредованные токи, так и пролиферацию глиобластом *in vitro* [133]. Амилорид также снижает скорость метастазирования мышей *in vivo* [134]. Однако низкая специфичность амилорида ограничивает его применение при лечении глиобластомы. Другим примером природного ингибитора ASIC является токсин пауков псалмотоксин 1 (PsTx1) из *Psalmopoeus cambridgei* [72], который проявляет антипролиферативную активность в отношении клеток глиобластомы за счет ингибирования амилоридчувствительного тока [135] и подавляет пролиферацию и миграцию опухолевых клеток [121]. Однако клиническое использование PsTx1 ограничено его способностью потенцировать ASIC1a человека при физиологических значениях pH [136] и ASIC1b при повышенных концентрациях [137]. Таким образом, поиск и разработка новых селективных лигандов ASIC1a, способных регулировать онкогенез клеток глиомы, остается актуальной задачей.

1.2.5.2. ASIC1a как мишень для терапии лейкемии

Известно, что в клетках лейкемии человека экспрессируются амилорид-чувствительные протон-управляемые Na⁺-каналы ASIC [138]. Более того, анализ данных TCGA (исследования AML и GTEX) показывает, что в клетках острой миелогенной лейкемии экспрессия гена, кодирующего ASIC1 повышена по сравнению с нормальными лимфоцитами. При этом, данных о функциональной активности ASIC1a в клетках хронической миелогенной лейкемии (CML) нет. Несмотря на прогресс в терапии CML, обусловленный разработкой ингибиторов тирозинкиназ, клетки CML часто проявляют

устойчивость к терапии, а при прогрессии формируется пул быстрорастущих и устойчивых к терапии стволовых опухолевых клеток [139]. Несмотря на нейтральный pH крови, при котором не происходит открытия канала ASIC1a, для клеток CML характерна активация некоторых механизмов, опосредующих прогрессию опухолей при закислении внешней среды (активация ERK, прогрессия клеточного цикла, интенсивная регуляция транскрипции генов [140]), поэтому таргетирование ASIC1a в клетках лейкемии имеет смысл с точки зрения модуляции его метаболитной активности.

1.2.5.3. ASIC1a как мишень для терапии аденокарциномы легкого

Рак легкого является одним из наиболее распространенных видов рака в мире с самой высокой частотой ассоциированной с заболеванием заболеваемости и смертности. Закисление характерно и для рака легкого, при этом повышенный уровень молочной кислоты является неблагоприятным прогностическим признаком [141]. Метастазирование клеток аденокарцином легкого при закислении внешней среды опосредуется увеличением экспрессии TGF- β 2, при этом увеличивая фосфорилирование его вторичных мессенджеров SMAD2 и SMAD3 [142]. Следует отметить, что TGF- β 2 также может запускать SMAD-независимые сигнальные внутриклеточные пути [143].

Клетки аденокарциномы легкого экспрессируют ASIC1a на уровне мРНК и белка, при этом закисление среды до pH \sim 6,0 стимулирует пролиферацию и миграцию этих клеток. Молекулярный механизм этого не совсем ясен, но показано, что при активации ASIC1a в клетках аденокарциномы легкого происходит вход ионов кальция, запуская, возможно, кальций-опосредованные митогенные эффекты. Поэтому, таргетирование в клетках аденокарциномы легкого ASIC1a представляется весьма перспективным, но молекулярные механизмы, обеспечивающие

1.2.5.4. Таргетирование ASIC1a для терапии меланом

Меланомы — очень гетерогенная форма рака, характеризующаяся выраженной пролиферацией, инвазией и лекарственной устойчивостью [144]. Все эти процессы сопровождаются в клетках меланомы индукцией гипоксии и повышенным внеклеточным закислением [10,145]. Рост меланомы сопровождается закислением микроокружения опухоли до pH \sim 6,5 [11]. Интересно то, что для клеток меланомы после закисления характерен более агрессивный рост и миграция даже если внеклеточный pH возвращается к физиологическим значениям [11,146]. Эпителиально-мезенхимальный переход клеток меланомы при закислении среды сопровождается повышением активности мезенхимальных маркеров (N-кадгерин, виментин) и факторов транскрипции (Twist, NF-

кВ), а также к усилению активности металлопротеазы-9 [32]. Кроме того, длительное культивирование клеток меланомы в кислой среде вызывает активацию CD133, SOX2 и других молекул, важных для самообновления клеток меланомы [33]. Недавно экспрессия ASIC1 была обнаружена при меланоме и немеланоцитарном раке кожи [147], но роль ASIC1 в прогрессировании меланомы, а также возможность таргетирования ASIC1 селективными ингибиторами в качестве новой терапевтической стратегии терапии меланомы не изучались.

Подводя итог всему вышесказанному, можно констатировать, что использование селективных ингибиторов ASIC1a-содержащих каналов может стать перспективной стратегией селективной терапии глиомы и других видов рака.

1.3. Мамбалгины – ингибиторы ASIC1a – потенциальное средство для терапии опухолей

1.3.1. Ингибиторы каналов ASIC1a – особенности и молекулярные механизмы действия

В настоящее время известно множество лигандов ASIC1a, которые можно разделить на следующие группы:

1. Низкомолекулярные ингибиторы (к ним можно отнести амилорид и его аналоги, такие как фенамил, бензамил, 5-(N,N-диметил)-амилорид и др. [148]). Эти соединения ингибируют широкий спектр ASIC, наиболее сильным блокатором ASIC1a является бензамил ($IC_{50} \sim 3,5 \mu M$).

2. Растительные низкомолекулярные лиганды (такие, как флавоноид кверцетин (ингибирует ASIC1a с $IC_{50} \sim 2,4 \mu M$) и др. [65]).

3. Растительные алкалоиды (к которым можно отнести линдоламин, лигустрозин и дауризолин, которые ингибируют ASIC1a с микромолярной полумаксимальной эффективной концентрацией; растительный морфиноподобный алкалоид синоменин ингибирует ASIC1a с $IC_{50} \sim 300 \text{ нМ}$ и др. [65]).

4. Микробные аминогликозиды (например, стрептомицин и неомицин ингибируют ASIC1a с $IC_{50} \sim 30 \mu M$ [149]).

5. Линейные пептиды - токсины животных (например, токсины яда улиток: пептиды RF-амидного семейства As1a и As2a, потенцирующие ASIC1a и ASIC3, но не ASIC1b или ASIC2a, токсины улитки *Conus textile*, Tx1.1 – Tx1.3, которые ингибируют ASIC3, но потенцируют гетеротример ASIC1a/ASIC3 [65]).

6. Полипептидные токсины животных (в отличие от других токсинов и соединений они имеют большую аффинность к ASIC1a и способны модулировать активность ASIC1a с

наномолярной эффективностью. К таким токсинам относятся псалмотоксин 1, токсин из яда морской анемоны *Heteractis crispa* Hcr1b-2, мамбалгины из яда черной мамбы *Dendroaspis polylepis*, мощный агонист ASIC1a из яда кораллового аспида MitTx, а также ингибиторы ASIC1a из яда паука *Hadronyche infensa* Hi1a и из яда *Heteroscodra maculata* Hm3a).

Основные низкомолекулярные ингибиторы ASIC1a приведены на Рис 7.

Остановимся подробнее на механизмах работы различных ингибиторов ASIC1a. Амилорид действует как неселективный блокатор ASIC с низким сродством к сайту связывания ($IC_{50} = 5\text{--}100 \mu\text{M}$), более того, амилорид способен блокировать другие ионные каналы и обменники. Интересно, что при более высоких концентрациях амилорид может активировать гомотримерные ASIC3 и гетеромерные ASIC3/ASIC1b-каналы, увеличивая токи через них уже в ответ на умеренное закисление внеклеточной среды [79]. Амилорид и его аналоги встраиваются в пору канала, при этом, 3 молекулы могут располагаться между субъединицами в верхней части канала, а одна из них – проникать глубже в пору канала и блокировать его стерически. Еще одно место связывания амилорида может находиться в кислотном кармане канала, при этом, две молекулы амилорида образуют димер, стабилизируемый посредством стекинг-взаимодействия ароматических группировок и противоположно ориентированных гуанидиновых групп [79].

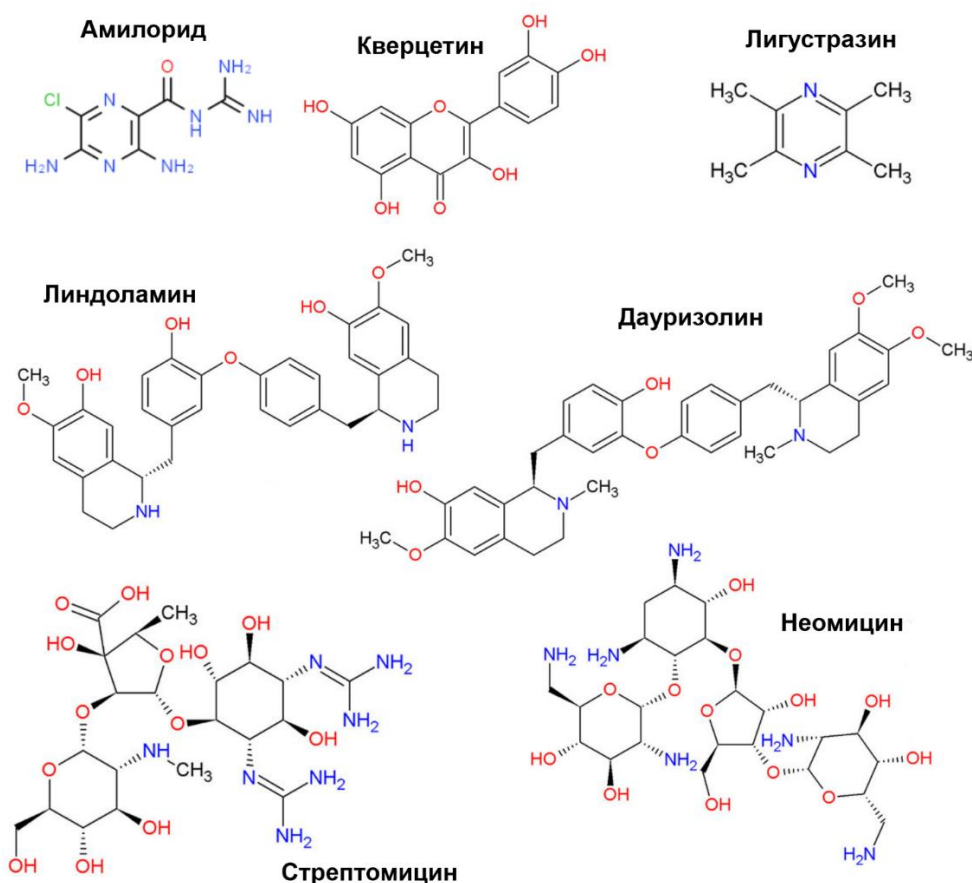


Рис. 7. Основные низкомолекулярные ингибиторы ASIC1a.

Токсин MitTx состоит из двух субъединиц: белка, похожего по строению на протеазу типа Кунитца MitTx- α и белка, похожего на фосфолипазу A2 MitTx- β , которые формируют гетеродимер, активирующий ASIC1 и ASIC2a при pH ниже 6,5 с EC₅₀ в наномолярном диапазоне. При этом MitTx не влиял на ток через ASIC2b и ASIC4. MitTx также слабо активировал гетеромерные ASIC1a/2a и rASIC1a/3 крысы, экспрессируемые в клетках CHO [65]. Для активации канала, гетеродимер MitTx взаимодействует исключительно с одной канальной субъединицей, образуя многочисленные контакты по всей длине thumb-домена от поверхности мембраны до knuckle-домена вблизи мембранного бислоя, а также с β 11- β 12-линкером α -субъединицы. Таким образом, токсин имеет выступающую область контакта с внешней поверхностью канала, но не с его кислотным карманом. При этом субъединицы канала «разъезжаются», а пора поддерживается в открытом состоянии. В то же время селективный фильтр не претерпевает серьезных конформационных изменений [81]. Таким образом, взаимодействие MitTx приводит к тому, что ASIC1a механически стабилизируется в открытом состоянии.

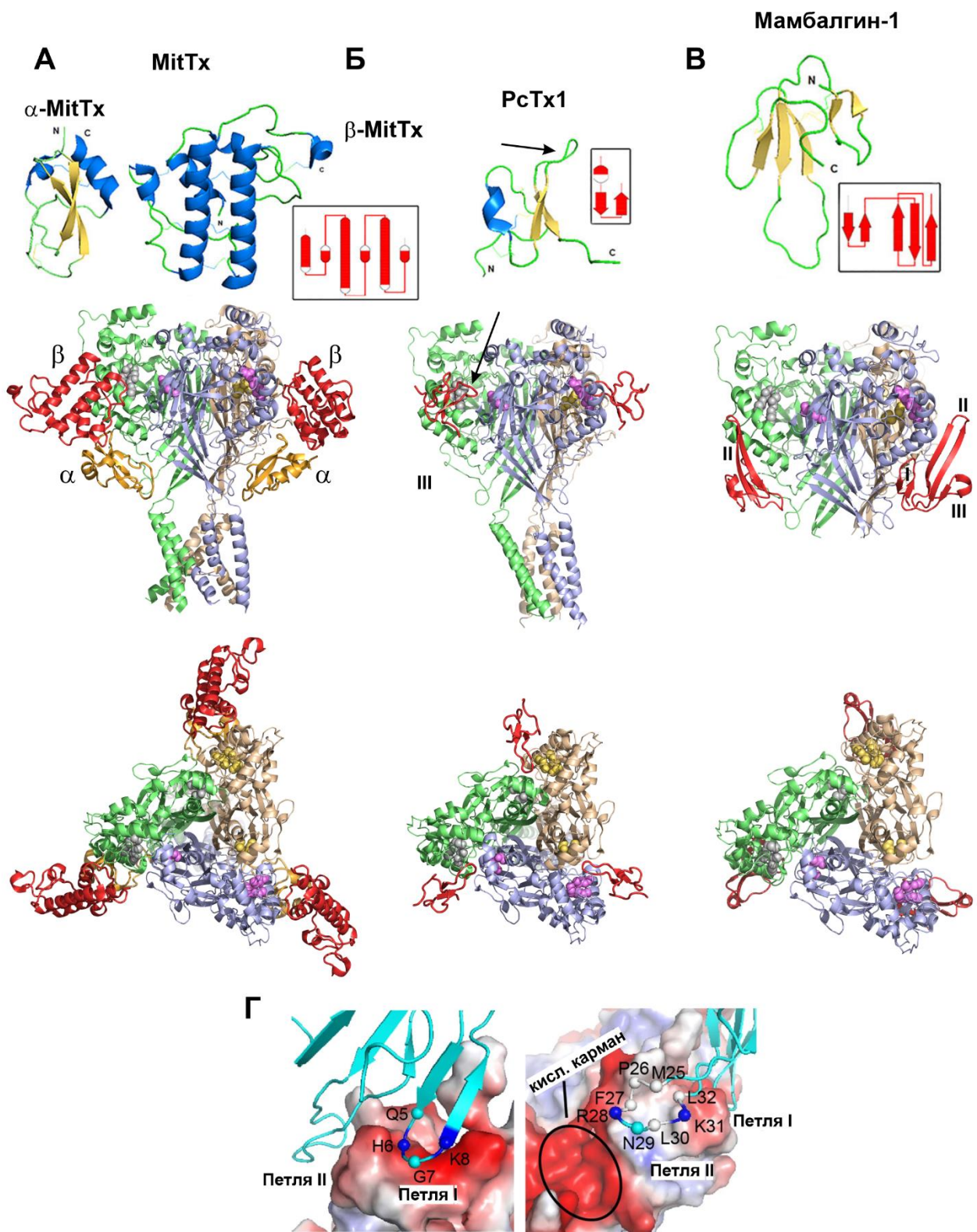


Рис. 8. Механизмы взаимодействия ASIC1a с полипептидными токсинами животных (из [65]). А – взаимодействие токсина MitTx с ASIC1a. Б – Связывание псалмотоксина PсTx1 с ASIC1a. Стрелкой показана часть токсина, проникающая в кислотный карман; В – Взаимодействие мамбалгина-1 с ASIC1a. Рамкой выделены кислотные карманы ASIC1a. Структура токсинов, вид взаимодействия с ASIC1a сбоку и вид на связывание токсинов с рецептором сверху показаны на верхних, центральных и

нижних панелях рисунка, соответственно. Г – интерфейс взаимодействия мамбалгина-1 с внешней частью ASIC1a (из [150]).

PcTx1 является селективным обратимым ингибитором токов через ASIC1a с $IC_{50} \sim 10$ нМ и $\sim 3,2$ нМ для каналов крысы и человека, соответственно. PcTx1 также ингибирует ASIC1a/2b мыши ($IC_{50} \sim 2,64$ нМ) и ASIC1a/2a крысы, но при этом активирует ASIC1b с $EC_{50} \sim 100$ нМ. Взаимодействие псалмотоксина с ASIC1a отличается от такового у MitTx тем, что средняя петля PcTx1 может проникать в кислотный карман рецептора (Рис. 8Б). Связывание PcTx1 с ASIC1a осуществляется гидрофобными участками: кластер из Trp24, Trp7, Phe30, Val32, Val34 и Pro35, который оборачивается вокруг $\alpha 5$ -спирали thumb-домена, тогда как основной кластер из Arg26, Arg27 и Arg28, взаимодействует с кислотным карманом рецептора (а именно с Asp350, Asp238 и Glu220) и с palm-доменом соседней субъединицы [65,79]. Таким образом, PcTx1 взаимодействует одновременно с palm, finger и thumb доменами канала и блокирует их взаимное расположение в состоянии, похожем на десенсибилизированное.

Еще один токсин, ингибирующий ASIC1a, имеет сходство с PcTx1 на 82 % (укорочение по трем С-концевым остаткам и замена пяти остатков), получил название π -TRTX-Hm3a (Hm3a). Он был извлечен из яда звездообразных птицеядов Того (*Heteroscodra maculata*). В целом, фармакологический профиль Hm3a похож на таковой у PcTx1. Hm3a ингибирует вызванные кислотой токи через ASIC1a ($IC_{50} \sim 39,7$ нМ для канала человека), и при этом потенцирует гомотримеры крысиных ASIC1b и гетеромеры ASIC1a/ASIC1b с EC_{50} в наномолярном диапазоне. Этот токсин не оказывает никакого действия на гомомерные rASIC2 или rASIC3 [65]. Механизм его взаимодействия с ASIC1a изучен слабо.

Относительно недавно из яда черной мамбы *Dendroaspis polylepis* были выделены 2 белка, эффективно ингибирующих ASIC1a – мамбалгины 1 и 2. Белок мамбалгин-3 был изолирован из яда зеленой мамбы *Dendroaspis angusticeps* [151,152]. Данные белки отличаются от других токсинов тем, что селективно ингибируют каналы, содержащие ASIC1a и не потенцируют другие субъединицы, что делает их привлекательными в качестве прототипов новых лекарственных средств. Рассмотрим основные особенности мамбалгинов

1.3.2. Мамбалгины как ингибиторы ASIC1a – строение, фармакология и механизмы действия.

Мамбалгины принадлежат к семейству белков Lu6/uPAR и представлены тремя изоформами. Мамбалгин-2 отличается от мамбалгина-1 только одной аминокислотной заменой Tyr/Phe в 4-м положении, а мамбалгин-3 также имеет одну замену Thr/Ile в 23-м

положении по сравнению с мамбалгином-1. Эти пептиды из 57 аминокислот имеют типичную трехпетельную структуру, при которой из β -структурного ядра выступают 3 петли, при этом в отличие от других трехпетельных токсинов змей, для мамбалгинов характерно укорочение I и III петель, и удлинение II (центральной) петли токсина (Рис. 8B). Мамбалгины обратимо ингибируют токи через гомотримеры крысиных ASIC1a, а также гетеротримеры ASIC1a + ASIC2a и ASIC1a + ASIC2b с $IC_{50} \sim 55$ нМ, 246 нМ и 61 нМ, соответственно. Мамбалгины ингибируют ток и через крысиные гомотримеры ASIC1b и гетеротримеры ASIC1a + ASIC1b с $IC_{50} \sim 192$ и 72 нМ, соответственно и через ASIC1a человека с $IC_{50} \sim 127$ –580 нМ [153]. При этом, мамбалгины не ингибируют каналы ASIC2a, ASIC3, ASIC1a/3 и ASIC1b/3 [151] (Рис. 9A).

Изначально, компьютерное моделирование позволило предположить, что мамбалгин-1 ингибирует ASIC1a за счет проникновения в кислотный карман и взаимодействия с thumb-доменом ASIC1a исключительно остатками второй петли (а именно, Phe27, Arg28, Leu32, Ile33 и Leu34) [150,154]. Однако, в 2018 году при помощи криоэлектронной микроскопии была получена структура комплекса мамбалгина-1 с ASIC1a, согласно которой три молекулы мамбалгина-1 связываются с отдельными субъединицами канала, в основном образуя контакты между первой и второй петлями пептида и доменом большого пальца (Рис. 8B). Остатки первой петли мамбалгина-1 (Gln5, His6, Lys8) образуют электростатические контакты с $\alpha 4$ -спиралью thumb-домена канала, тогда как II (центральная) петля взаимодействует с $\alpha 5$ -спиралью thumb-домена за счет электростатических (Arg28, Lys31) и гидрофобных (Met25, Pro26, Phe27, Leu30, Leu32) контактов [150]. После связывания мамбалгина-2 с thumb доменом, последний отклоняется от остальных доменов, раскрывая при этом кислотный карман и не позволяя карману «стянуться» для открытия канала даже в присутствии протонов [150]. Таким образом, мамбалгины, в отличие от других ингибиторов ASIC1a, не связываются с кислотным карманом (как PcTx1) или порой ASIC1a (как амилорид), а действуют как аллостерические ингибиторы ASIC1a. Этот механизм был подтвержден исследованиями сайт-направленного мутагенеза и электрофизиологии мутантов мамбалгина-1 [150] (Рис. 8B). При этом, особенно важны для взаимодействия с ASIC1a лейцины мамбалгинов в 32 и 34 положении, находящиеся в гидрофобном участке петли II.

Взаимодействие мамбалгина-2 с приводит к тому, что канал переходит в десенситизированное состояние и уже слабо активируется при падении pH (Рис. 9B), при этом pH активации канала сдвигается в более кислую сторону (Рис. 9Г).

Таким образом, мамбалгины являются селективными и эффективными аллостерическими ингибиторами протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a субъединицу.

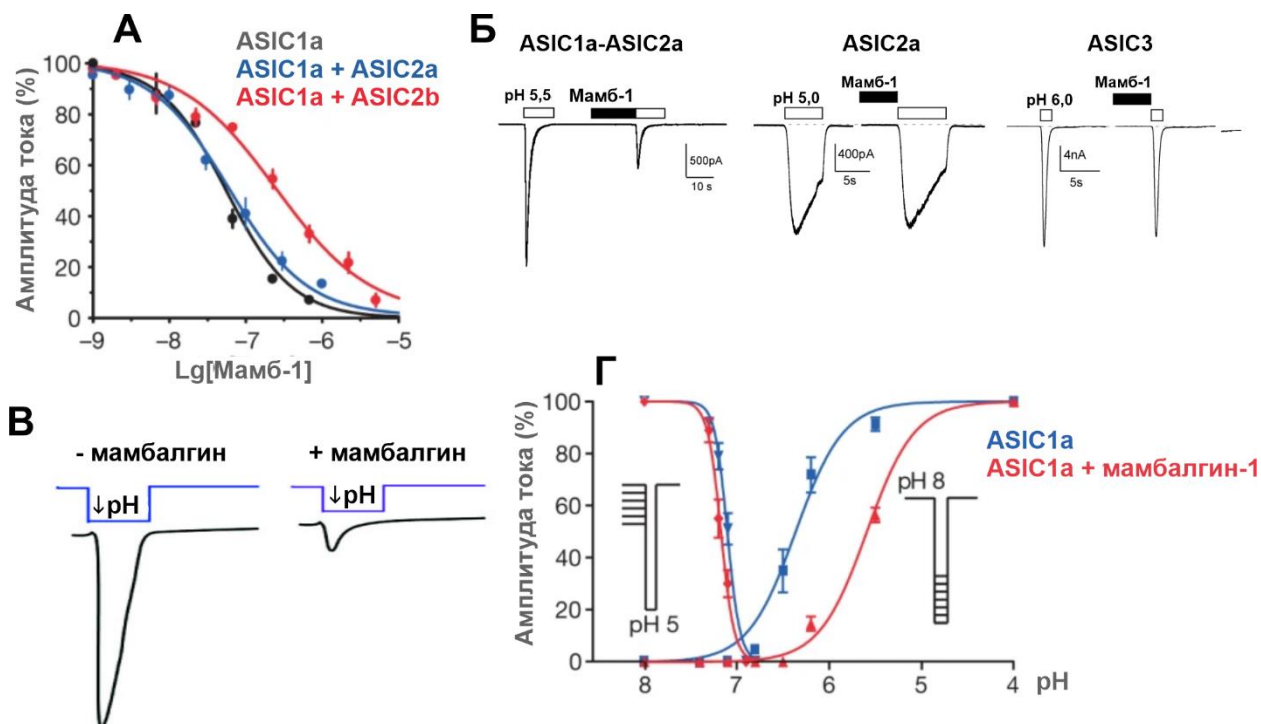


Рис. 9. Ингибирование ASIC1a мамбалгинами. А – кривые ингибирования мамбалгином-1 гомотримеров ASIC1a, и гетеротримеров ASIC1a/ASIC2a и ASIC1a/ASIC2b (ASIC крысы, из [151]). Б – Сравнение влияния мамбалгина-1 на ток через крысиные ASIC1a/ASIC2a, а также ASIC2a и ASIC3 (из [151]). В – Примерное изображение работы канала ASIC1a в десенситизированном состоянии после инкубации с мамбалгином-2 (из [65]). Г – Влияние мамбалгина-1 на pH открытия каналов ASIC1a (из [151]).

1.3.3. Таргетирование ASIC1a рекомбинантным мамбалгином-2 как перспективная стратегия противоопухолевой терапии

Как отмечалось ранее, гиперэкспрессия ASIC1a характерна для многих типов опухолей, и часто коррелирует с неблагоприятным прогнозом течения заболеваний. Поэтому, таргетирование ASIC1a специфическими ингибиторами представляет собой перспективную стратегию для борьбы со злокачественными новообразованиями. Однако, почти все известные ингибиторы ASIC1a либо неспецифичны (как амилорид), либо могут потенцировать другие субъединицы ASIC (как MitTx, PcTx1 и Nm3a). Единственные к настоящему времени известные специфические ингибиторы ASIC1a это мамбалгины. В настоящий момент мамбалгины рассматриваются как перспективные прообразы

обезболивающих средств [151], однако, возможность их использования для контроля онкопрогрессии никем не изучалась. При этом, если механизмы, лежащие в основе адаптации опухолевых клеток к падению рН внешней среды еще слабо изучены, то механизмы, активируемые при ингибировании каналов ASIC1a в клетках опухолей мамбалгином-2 также никем не исследовались.

Ранее, была разработана эффективная система рекомбинантного получения мамбалгина-2, селективного ингибитора каналов, содержащих ASIC1a [155,156]. Данный белок ингибировал крысиный ASIC1a с той же эффективностью, что и природный токсин, и обладал правильной трехпетельной пространственной структурой.

Поэтому, в данной работе проясняются способы адаптации клеток опухоли к падению рН внешней среды, а также исследуются механизмы, запускаемые в опухолевых клетках при ингибировании в них каналов, содержащих ASIC1a мамбалгином-2.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Антитела и олигонуклеотиды

Таблица 3.

Олигонуклеотиды, использованные в работе

Ген	Праймер		Амплико н, п.н.
	Прямой	Обратный	
ПЦР в реальном времени			
<i>βACTIN</i>	CATGTACGTTGCTATCCAG GC	CTCCTTAATGTACGCACG AT	88
<i>GPDH</i>	ACAACCTTTGGTATCGTGGA AGG	GCCATCACGCCACAGTTTC	73
<i>RPL13a</i>	TCAAAGCCTTCGCTAGTCT CC	GGCTCTTTTTGCCCGTATGC	104
<i>ACCN2</i> (ASIC1a)	CGAAGCAGGCATCAAAGTG C	TTTGGATGATAGGGAGCCA CG	642
<i>ACCN1</i> (ASIC2)	CACCAAGACTTCACCACAG TGTTT	TGTAGCGGGTCTCACAGTC A	409
<i>ACCN3</i> (ASIC3)	TACAGAACTGTGCCACCC	GGTCTTCGGAACAGAGCAG A	502
<i>ACCN4</i> (ASIC4)	GAGGAGAGAGACAAGCGG CA	GTCCAGCATGATCTCCAGG C	930
<i>SCNN1A</i> (α-ENaC)	CCAGGCCGCTGCACCT	GCCGATCTTCCAGTCCTTCC	750
<i>SCNN1G</i> (γ-ENaC)	GAGTGACGTGCCAATCAGG A	TCTCCGAAACCACAGATGG C	305
«Нокдаун» генов			
<i>ACCN2</i> (ASIC1a)	AUAUAGAAAUAGAAAUG CAG	GCAUUUUCUAUUUCUAUA UGA	--
	UUUUGUAAAUGUAAAAA GAA	CUUUUACAUUUAACAAA ACU	
	UAUGUAUUGCUCAGAUUU GUU	CAAAUCUGAGCAAUACAU AGG	
<i>SCNN1A</i> (α-ENaC)	ACAUAAACGGGCAAGAUA CAG	GAAUCUUGCCCGUUUAUG UAU	
	UGUUCUUGGAGCAACUUC CUG	GGAAGUUGCUGCAAGAAC AGU	
	UGUUGUUGCAGAAGAACU CGA	GAGUUCUUCUGCAACAAC ACC	
<i>SCNN1G</i> (γ-ENaC)	AAAUUGAAUAACUAAAUC CAU	GGAUUUAGUUAUUCAAUU UUG	
	AGAUUCUUCUUGAUUUUG GCU	CCAAAUCAAGAAGAAUC UGC	
	UCUUUUGCUAUUUAAAAG CAA	GCUUUUAAAUAGCAAAAAG AAG	
Нег. контроль	UUCUCCGAACGUGUCACG U	ACGUGACACGUUCGGAGA A	
	GAAAUUUUAUACAAACUAU CAA	UUGAUAGUUUGUAUAAAU UUC	

	GGAGAUAAUAACGAAUA UAA	UUAUAUUUCGUUAUUAUC UCC	
--	--------------------------	---------------------------	--

Таблица 4.

Антитела, использованные в работе

Целевой белок	Производитель	Каталожный №	Хост	Разбавление
Изучение влияния падения pH на поверхностную экспрессию сенсоров протонов				
ASIC1a	Antibodies- Online, Аахен, Германия	ABIN350049	Овца	1:500
α -ENaC		ABIN1841945	Кролик	
γ -ENaC		ABIN1865926	Мышь	
TRITC Анти- овечие	Jackson ImmunoResearch, Вест Гроув, США	713-025-003	Альпака	
Алеха488 Анти- кроличьи		611-545-215	Осел	
Алеха488 Анти- мышинные		715-545-150	Козел	
Анализ фосфорилирования и экспрессии вторичных внутриклеточных мессенджеров				
CD44	Antibodies- Online	ABIN969026	Мышь	1:500
CD133		ABIN6559815		
Frizzled 4		BIN5693200	Кролик	1:250
SNAI1 (pSer246)		ABIN6256209		
ERK (pThr202/pTyr204)	Bio-Rad	AHP901	Биотинили- рованные	
JNK (Thr183/Tyr185, pThr221/pTyr223)		AHP2693		
PTEN (pSer380)	Cell Signaling, Данверс, США	9551		
AKT (pSer473)	Bio-Rad	AHP2544		
mTOR (pSer2448)	Cell Signaling	2971		
NF κ B p65 (pSer536)	Bio-Rad	AHP1342		1:100
STAT3 (pTyr705)		VMA00899		

TRITC Анти-мышинные	Jackson Immunoresearch	115-025-062	Козел	1:500
TRITC Анти-кроличьи		611-025-215	Осел	
Стрептавидин-фикоэритрин	Bio-Rad	STAR4A	--	
Анализ активности регуляторов клеточного цикла				
циклин D1 (pSer90)	Antibodies-Online	ABIN6271254	Кролик	1:1000
CDK4 (pThr172)		ABIN6271182		
CDK6 (pTyr24)		ABIN319289		
β -актин	R&D Systems	MA8929	Мышь	
HRP Анти-кроличьи	Jackson Immunoresearch	111-035-003	Козел	1:5000
HRP Анти-мышинные		715-035-150	Козел	
Иммунопреципитация				
ASIC1a	Antibodies-Online	ABIN350049	Овца	1:5 (100 мкг Ат для конъюгации с агарозой)
α -ENaC		ABIN1841945	Кролик	1:1000
γ -ENaC		ABIN1865926	Мышь	
HRP Анти-кроличьи	Jackson Immunoresearch	111-035-003	Козел	1:5000
HRP Анти-мышинные		715-035-150	Козел	
Определение мишеней мамбалгина-2				
ASIC1a (для клеток A549)	StressMarq Biosciences, Виктория, Канада	SMC-427	Мышь	1:1000
ASIC1a	Antibodies-Online	ABIN350049	Овца	
α -ENaC		ABIN1841945	Кролик	
γ -ENaC		ABIN1865926	Мышь	

ASIC3 (для клеток mel P)		ABIN3187736	Кролик	
HRP Анти-овечьи	Jackson Immunoresearch	713-035-003	Козел	1:5000
HRP Анти-кроличьи		111-035-003	Козел	
HRP Анти-мышинные		715-035-150	Козел	
Анализ «нокдауна» генов ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC				
ASIC1a	Antibodies-Online	ABIN350049	Овца	1:1000
α -ENaC		ABIN1841945	Кролик	
γ -ENaC		ABIN1865926	Мышь	
TRITC Анти-овечьи	Jackson Immunoresearch	713-025-003	Альпака	1:500
TRITC Анти-кроличьи		111-025-003	Осел	
TRITC Анти-мышинные		615-025-214	Бык	
Изучение локализации субъединиц ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC				
ASIC1a	Antibodies-Online	ABIN350049	Овца	1:500
α -ENaC		ABIN1841945	Кролик	
γ -ENaC		ABIN1865926	Мышь	
TRITC Анти-овечьи	Jackson Immunoresearch	713-025-003	Альпака	
Алеха488 Анти-кроличьи		611-545-215	Осел	
Алеха488 Анти-мышинные		715-545-150	Козел	

2.2. Получение рекомбинантного мамбалгина-2 и его характеристика

Рекомбинантный мамбалгин-2 и два его мутантных варианта с заменами L32A и Leu34A были получены в *E. coli*, как описано ранее. Промытые тельца включения растворяли в буфере, содержащем 8 М мочевины, 0,4 М сульфата натрия, 0,15 М тетрабората натрия, и оставляли на ночь при перемешивании. Очистку сульфитированного мамбалгина-2 проводили на ионообменной смоле ДЭАП-сферонит-ОН (совместная

разработка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов», Санкт-Петербург и ИБХ РАН, Москва, Россия). Сульфитированный белок восстанавливали избытком ДТТ и дополнительно очищали с помощью ВЭЖХ (Jupiter C4, A300, 10 × 250 мм, Phenomenex, градиент ацетонитрила 20–45% в присутствии 0,1% ТФУ в течение 40 мин). Образец лиофилизировали и растворяли в дегазированном буфере ренатурации, содержащем 50 мМ Трис-НСl, 1,5 М мочевины, 0,5 М L-аргинина (рН 8,0) в присутствии восстановленного и окисленного глутатионов (молярном соотношении мамбалгин-2/окисленный глутатион/восстановленных глутатион 1/50/500). Ренатурацию проводили при 4°C в течение 72 часов, после чего мамбалгин-2 очищали с помощью ВЭЖХ (Jupiter C4, A300, 10 × 250 мм, Phenomenex, градиент ацетонитрила 20–45% в присутствии 0,1% ТФУ в течение 40 мин). Образование дисульфидных связей в белке было подтверждено в реакции с реактивом Элмана (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США). 2 (>95%) были подтверждены с помощью электрофореза в ПААГ, ВЭЖХ и MALDI-MS. Правильная пространственная структура была подтверждена 1D ¹H ЯМР-спектроскопией (Рис. 10).

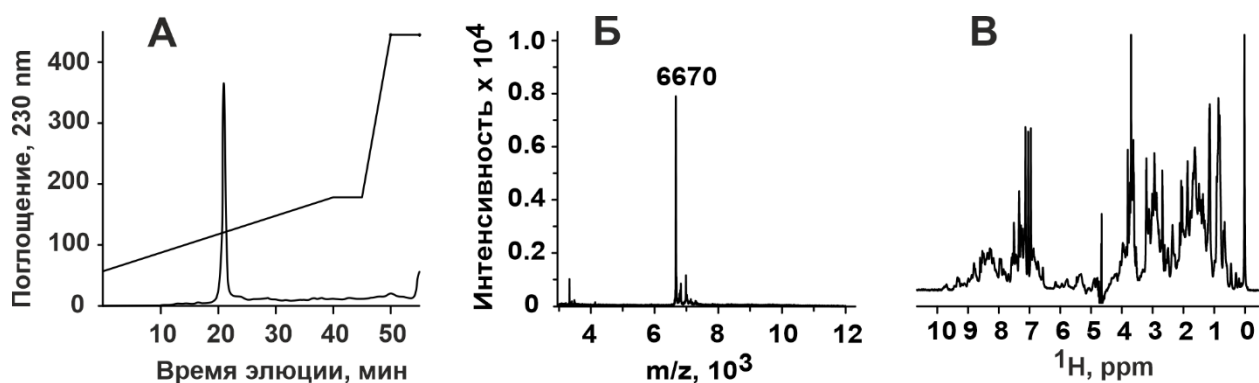


Рис. 10. Характеристика ренатурированного препарата рекомбинантного аналога мамбалгина-2. А – ВЭЖХ-анализ однородности и чистоты препарата мамбалгина-2. Б – Анализ препарата мамбалгина-2 посредством масс-спектрометрии. В – Спектр ¹H-ЯМР препарата мамбалгин-2.

2.3. Электрофизиологические записи в ооцитах *X. laevis*

Исследование проводилось в аккредитованной AAALAC организации в соответствии со стандартами Руководства по уходу и использованию лабораторных животных (8-е издание, Институт лабораторных исследований животных). Все эксперименты с самками лягушек *Xenopus* были одобрены IACUC ИБХ РАН (протокол № 267/2018; дата утверждения: 28 февраля 2019 г).

Запись двухэлектродной фиксации потенциала выполняли с помощью усилителя GeneClamp 500 (Axon Instruments, Сан-Хосе, США) при удерживающем потенциале -50 мВ, как описано ранее (29). а данные фильтровали на частоте 20 Гц и оцифровывали на частоте

100 Гц с помощью АЦП L780 (L-Card, Москва, Россия). Микроэлектроды заполняли 3 М раствором KCl. Использовался внешний раствор ND96 с pH 7,4, который подавали в перфузионную камеру (объем ~50 мкл) самотечной системой по 2,5 мл. /мин. Для индуцирования специфических токов использовали модифицированные растворы ND-96 (в которых 5 мМ HEPES были заменены на 5 мМ MES (pH 5,5) или 10 мМ MOPS (pH 6,6) для крысиного ASIC1a и 5 мМ MES (pH 5,0) как для человеческих ASIC1a, так и для человеческих ASIC1a/ α -ENAC/ γ -ENAC). Во все растворы тестируемых соединений добавляли 0,1% БСА. Для переключения растворов использовалась система клапанов с компьютерным управлением для быстрого нанесения раствора. Кислотные токи вызывали падением pH за 1 с от нейтрального значения 7,4 до 6,6, 5,5 или 5,0 во внешнем растворе ооцитов. Рекомбинантный мамбалгин-2 или его мутанты L32A и L34A наносили на 15 с до и во время активационного импульса для предотвращения неспецифической адсорбции.

Кривая доза-реакция была построена с использованием четырехпараметрического уравнения:

$$F(x) = ((A1 - A2)/(1 + (x/x0)^{nH})) + A2,$$

где F(x) — ответ на данную концентрацию мамбалгина-2; A1 — значение отклика в контроле; A2 — ответ при максимальном ингибировании (% от контроля); x — концентрация мамбалгина-2; x0 — значение IC50; nH — коэффициент Хилла. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения OriginPro 8.6 (OriginLab, Нортгемптон, США) и GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software).

2.4. Работа с клеточными линиями

Клетки глиомы U251 MG, глиобластомы A172, хронической миелогенной лейкемии K562, аденокарциномы легкого A549, трансформированные вирусом SV40 фибробласты легкого WI-38 подлинии 2RA, а также приобретались в коллекции культур клеток позвоночных НИИ Цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Нетрансформированные легочные фибробласты человека HLF-104 (HLF) приобретались в Биолот (Санкт-Петербург, Россия). Клетки аденокарциномы легкого мыши Lewis и их метастазирующая подлиния Lewis P29 (далее P29) были любезно подарены С.Б. Акоповым (ИБХ РАН). Клетки метастатической меланомы mel P человека были получены от пациента Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России и охарактеризованы ранее [157,158]. Трансформированные вирусом SV40 оральные кератиноциты человека Het-1A приобретались в ATCC (Манассас, США). Нетрансформированные астроциты человека были из Cell Applications, (Сан-Диего, США). Первичные клетки глиобластомы были получены от пациента Московского научно-

исследовательского онкологического института имени П. А. Герцена Минздрава РФ, охарактеризованы ранее [159] (обозначены как клетки GBM011).

Клетки U251 MG выращивали в среде IMDM (ПанЭко, Москва, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (GE Healthcare, Чикаго, США), 2 mM L-глутамин (ПанЭко). Клетки A172 и mel P выращивали в среде RPMI-1640 (ПанЭко) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина (ПанЭко). Клетки A549, Lewis и P29 культивировали в среде DMEM производства Биолот с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biowest, Ноле, Франция) и 80 мг/мл гентамицина (Биолот), а клетки WI-38 в среде EMEM (Биолот) с добавлением 1% заменимых аминокислот (Thermo Fisher, Уолтэм, США), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biowest) и 80 мг/мл гентамицина (Биолот). Клетки HLF культивировали в среде EMEM (Биолот), содержащей 10% FBS и 80 мг/мл гентамицина (Биолот). Астроциты человека выращивали в среде Neurobasal A (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс, США) с добавлением G-5 (ПанЭко). Кератиноциты Het-1A человека культивировали в среде BEB (Lonza, Bazel, Швейцария). Перед субкультивированием клеток и проведением экспериментов культуральные флаконы и планшеты предварительно покрывали смесью 0,01 г/л фибронектина (Sigma-Aldrich), 0,03 г/л бычьего коллагена типа I (Sigma-Aldrich) и 0,01 г/л бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich), растворенный в соответствующей культуральной среде. Астроциты выращивали при 37°C во влажной атмосфере с 8% CO₂. Первичную клеточную линию от пациента с глиобластомой GBM011 культивировали не более 10 пассажей в среде DMEM/F12, содержащей 2% добавки B27 (Thermo Fisher), 1% раствор пенициллина-стрептомицина (Thermo Fisher), 2,5 мкг/мл гепарина (Sigma-Aldrich), 20 нг/мл bFGF (Sigma-Aldrich) и 20 нг/мл EGF (Sigma-Aldrich). EGF и bFGF добавляли два раза в неделю, а культуральную среду меняли каждые 7 дней. Все типы клеток регулярно проверяли на отсутствие микоплазменной контаминации с помощью ПЦР-набора (Mycoreport, Евроген, Москва, Россия).

2.5. ПЦР в реальном времени

Тотальную РНК выделяли из клеток U251 MG, A172 и K562 с помощью реагента ExtractRNA (Евроген) и обрабатывали ДНКазой I (Sigma-Aldrich), из остальных клеток РНК выделяли с помощью набора для выделения РНК Bio-Rad Augum (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями производителя. кДНК синтезировали с помощью набора обратной транскриптазы Mint (Евроген). После этого была проведена количественная ПЦР с готовой к использованию смесью SYBR Green HS (Евроген) и праймерами, специфичными к генам *ACCN2*, *ACCN1*, *ACCN3*, *ACCN4*, *SCNN1A* и *SCNN1G* (Евроген, Табл. 3), с использованием

детектирующего амплификатора Roche LightCycler 96 (Roche, Базель, Швейцария). Данные анализировали методом $\Delta\Delta C_t$ на ПО LightCycler SW (Roche), а экспрессию генов нормализовали по экспрессии генов домашнего хозяйства β -ACTIN, GPDH и RPL13A.

2.6. Анализ базы данных TCGA

Доступ к базе данных TCGA GTEX (биопсии здоровой кожи), LUAD (аденокарцинома легкого) и SKCM (первичная и метастатическая меланома) осуществлялся через платформу USCS Xena [160]. Для сравнения экспрессии ASIC и ENaCs в нормальной коже и меланомах приведены данные по экспрессии мРНК генов ACCN2, ACCN1, ACCN3, ACCN4, SCNN1A и SCNN1G, кодирующих ASIC1, ASIC2, ASIC3, ASIC4, α -ENaC и Субъединицы γ -ENaC, соответственно, загружали из исследований GTEX и LUAD для анализа экспрессии генов в образцах здорового легкого и аденокарциномы легкого и GTEX и SKCM для анализа экспрессии генов в образцах здоровой кожи, и образцах первичной, а также метастатической меланом, после чего анализировали с помощью программного обеспечения GraphpadPrism 8.0 (GraphPad Software). Гены, кодирующие субъединицы ASIC1 и ASIC2, обозначены как ACCN2 и ACCN1 соответственно. Для анализа взаимосвязи между экспрессией мРНК каналов семейства DEG/ENaC и вероятностью выживания пациентов с аденокарциномой кожи или метастатической меланомой, пациенты с первичной или метастатической меланомой без гладких участков были разделены на две группы с экспрессией ACCN2, ACCN1, ACCN3, ACCN4, SCNN1A и SCNN1G выше или ниже медианного значения. Кривые выживаемости строили по методу Каплана-Мейера и сравнивали с помощью log-rank теста непосредственно в интерфейсе платформы USCS Xena.

2.7. Анализ жизнеспособности клеток

Для исследования влияния закисления среды на морфологию клеток mel P в клеточную среду добавляли 25 мМ HEPES, pH 6,5 (кислая среда, среда с pH 7,4 обозначена как нейтральная), это значение pH соответствует значению pH очагов меланомы [4] и не токсично для клеток mel P или Het-1A. Для изучения влияния подкисления среды на рост клеток клетки высевали в 6-луночные культуральные планшеты (2×10^5 клеток на лунку) в нормальную или кислую среду и инкубировали в течение 96 ч со сменой среды на нормальную или кислую каждые 48 часов. После этого клетки фотографировали с помощью цифрового микроскопа CloneSelect Imager (80-кратное увеличение, Molecular Devices, Сан-Хосе, США). Затем клетки выдерживали в кислой или нормальной среде и культивировали в кислой или нормальной среде как обычно. Для анализа влияния подкисления на время

удвоения клеток клетки высевали в культуральные флаконы площадью 25 см² (5×10^5 клеток/флакон), открепляли каждые 24 ч 0,5% раствором трипсин-ЭДТА (PanEco) и подсчитывали с помощью счетчика клеток Cell Drop BF (DeNovix, Уилмингтон, США). Кривую роста получали с помощью опции линейной регрессии GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Сан-Диего, США).

Для анализа pH внеклеточной среды, клетки U251 MG, A172, K542, A549, mel P, Het-1A высевали в культуральные 6-луночные планшеты (1×10^5 клеток/лунка) в нейтральной среде и инкубировали 24-72 часа, после чего клетки доставали из CO₂-инкубатора и сразу измеряли pH среды при помощи настольного pH метра OriginStar 211 (Thermo Fisher).

Для изучения влияния мамбалгина-2 на пролиферацию клеток U251 MG, A172 и K562, клетки высевали в 96-луночные культуральные планшеты (5×10^3 клеток/лунка) в нейтральной среде и выращивали в течение 24 ч. После этого мамбалгин-2 (из раствора 10 мМ в 100% ДМСО) растворяли в нейтральной среде и добавляли к клеткам в различных концентрациях, после этого, клетки инкубировали в течение 72 ч с заменой среды на аналогичную каждые 24 часа. Для изучения влияния мамбалгина-2 на рост клеток меланомы mel P, A549, WI-38 и HLF, клетки высевали в 96-луночные культуральные планшеты (5×10^3 клеток/лунка) в среде с pH 6,5 для клеток mel P и Het-1A и 5,5 для клеток A549, WI-38, Lewis, P29, Het-1A и HLF и выращивали в течение 24 ч. После этого мамбалгин-2 (из раствора 10 мМ в 100% ДМСО) растворяли в кислой среде соответствующего pH, и добавляли к клеткам в различных концентрациях, а затем клетки инкубировали в течение 72 ч без замены среды. Для анализа влияния мутантных вариантов мамбалгина-2 с заменами L32A и L34A на рост различных клеток, клетки U251 MG, A172, K562, mel P и Het-1A высевали в 96-луночные культуральные планшеты (5×10^3 клеток/лунка) в среде с pH ~ 7,4 (для клеток U251 MG, A172 и K562) или 6,5 (для клеток mel P и Het-1A), после чего выращивали 24 часа. Затем клетки инкубировали с 1 мМ мамбалгина-2 или с его мутантными вариантами в течение 72 часов с заменой среды каждые сутки (для клеток U251 MG, A172 и K562) или без таковой (для клеток mel P и Het-1A). Для клеток K562, mel P и Het-1A исследовали действие одного мутанта L32A, для клеток U251 MG, A172 – вариантов L32A и L34A. Максимальная концентрация ДМСО не превышала 0,1%. Добавленный ДМСО не влиял на рост клеток. Для исследования апоптоза в клетках U251 MG клетки инкубировали с 10 мМ пан-каспазного ингибитора z-VAD-FMK (Santa-Cruz, Даллас, США) в течение 30 мин. Затем клетки U251 MG дважды промывали свежей средой, добавляли 1 мМ мамбалгина-2 и/или 10 мМ z-VAD-FMK и культивировали далее в течение 72 ч с заменой среды на аналогичную каждые сутки.

Жизнеспособность клеток U251 MG, A172 и K562 изучали с помощью теста на активность митохондриальных редуктаз МТТ. Реагент МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и добавляли в лунки планшета (1 мкг на лунку), затем клетки инкубировали с МТТ в течение 2 ч. После этого кристаллы формазана растворяли в подкисленном изопропанолe и жизнеспособность клеток оценивали спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность на спектрофотометре для микропланшетов Bio-Rad 680 (Bio-Rad, Геркулес, США) при 540 нм с вычитанием фона при 655 нм. Жизнеспособность клеток A549, Lewis, WI-38, HLF, mel P и Het-1A определяли при помощи колориметрического теста на активность митохондриальных редуктаз WST-1 [161]. К клеткам в лунке планшета добавляли WST-1 (водорастворимая соль тетразолия 1; Santa-Cruz) и 1-m-PMS (1-метокси-5-метилфеназин метилсульфат, Santa-Cruz) в концентрациях 0,25 мМ и 5 мМ соответственно в течение 1 ч, а образование окрашенного продукта измеряли при 450 нм с вычитанием фона при 655 нм на спектрофотометре для планшетов Bio-Rad 680 (Bio-Rad). Для сравнения действия мамбалгина-2 на клетки A172, U251 MG, астроциты и первичные клетки глиобластомы GBM011 анализировали жизнеспособность клеток с помощью резазуринового красителя Alamar Blue (DAL1100, Thermo Fisher). Клетки высевали в 96-луночный культуральный планшет (по 6×10^3 клеток на лунку) в нейтральной среде. На следующий день добавили 50 мМ мамбалгина-2 и инкубировали 160 часов без замены среды. Затем лунки планшета добавляли реагент AlamarBlue (по 5 мкл готового раствора) и через 4 часа измеряли флуоресценцию (возбуждение 515–565 нм, эмиссия 570–610 нм) с использованием многорежимного ридера Synergy HTX (BioТек, Уинуски, США). Данные МТТ, WST-1 или Alamar Blue теста были нормированы к усредненному показанию оптической плотности/флуоресценции контрольные лунки, содержащие клетки без добавления соединений. Кривые концентрация-эффект были построены в GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software).

Для получения сфероидов, клетки A549 высевали на 96-луночные планшеты, обработанные поли-2-гидроксиэтилметакрилатом (Sigma-Aldrich, 1×10^3 клеток на лунку) при pH 5,5, через 48 часов к сфероидам добавляли 1 мМ мамбалгина-2 и инкубировали в течение 24 ч. После этого, проводили WST-1 тест, для визуализации сфероидов их окрашивали 0,4% раствором трипанового синего (ПанЭко) и фотографировали на счетчике клеток Cell Drop BF (DeNovix).

Для визуализации влияния мамбалгина-2 на образование колоний проводили анализ кристаллического фиолетового. Вкратце, клетки высевали в 24-луночные планшеты (15×10^4 клеток/лунку), выращивали в течение 24 ч, обрабатывали мамбалгином-2 в

течение 72 ч без замены среды, промывали ФСБ, фиксировали в 70% растворе этанола. окрашивали 1% раствором кристаллического фиолетового и промывали в ФСБ 3 раза. После этого были сделаны фотографии лунок.

2.8. Анализ миграции и инвазии опухолевых и нормальных клеток

Анализ заживления ран *in vitro* (тест на зарастание раны) проводили, как описано ранее [162], с некоторыми изменениями. Клетки A549, WI-38, HLF, Lewis, P29, mel P или Het-1A высевали в 96-луночные планшеты для культивирования клеток в среде с нейтральным pH ~ 7,4, а также с кислым pH ~5,5 для клеток A549, WI-38, HLF, Lewis и P29 и 6,5 для клеток mel P и Het-1A (5×10^4 клеток/лунку) и выращивали в течение 24 часов. Затем среду из лунок заменяли на среду без сыворотки, чтобы свести к минимуму пролиферацию клеток. Через 8 часов по дну лунки проводили царапину стерильным наконечником пипетки на 10 мкл. Затем клетки промывали PBS, обрабатывали 1 или 10 μ M мамбалгина-2 и делали снимки через 0 и 24 ч при 80-кратном увеличении с помощью цифрового микроскопа CloneSelect Imager (Molecular Devices). Центр планшета был отмечен как центральная точка отсчета, чтобы обеспечить регистрацию одной и той же области во время анализа. Были получены цифровые изображения, и площадь царапины была количественно определена с использованием программного обеспечения ImageJ (НИН, Бетезда, США) и программного обеспечения MS Excel (Microsoft, Сиэтл, США) путем измерения % поверхности царапины, занятой мигрирующими клетками. В каждом эксперименте повторные измерения усреднялись.

Для исследования инвазии клеток mel P использовали набор для анализа миграции/хемотаксиса клеток (ab235694, Abcam, Кембридж, Великобритания), основанный на миграции клеток через поры 8 мкм в мембране, покрытой матриксом. Для изучения влияния мамбалгина-2 на инвазию клетки mel P, культивированные в кислой среде в течение 96 ч, высевали в миграционные камеры на 24-луночные планшеты (по 2×10^5 клеток на лунку) в кислой среде и инкубировали с 10 μ M мамбалгина-2 в течение 72 часов без смены среды. Клетки, мигрировавшие через поры диаметром 8 мкм, фотографировали (100-кратное увеличение, микроскоп «Микро-Мед И-ЛЮМ», Санкт-Петербург, Россия) и анализировали жизнеспособность мигрировавших клеток с помощью теста WST-1.

2.9. Пэтч-кламп на клетках эукариот

Трансмембранные ионные токи регистрировали на клетках U251 MG, A549, K562, WI-38 и HLF с использованием методики пэтч-кламп при отведении сигнала от плазматической мембраны всей клетки (конфигурация «целая клетка», whole-cell). Клетки

высевали на стерильные покровные стекла размером 4×4 мм в чашки Петри диаметром 35 мм за 1–2 дня до эксперимента. Записи ионного тока ионов были получены с помощью усилителя Axopatch 200B (Molecular Devices, Сан-Хосе, США), аналого-цифрового интерфейса Digidata 1550A и ПК с программным обеспечением Clampex (Molecular Devices). Боросиликатные микропипетки (BF-150-110-10, Sutter Instruments, Новато, США) вытягивали с помощью пуллера P-97 (Sutter Instrument) до сопротивления 3–6 МОм при заполнении соответствующим внутриклеточным раствором, содержащим 140 мМ К-аспартата, 5 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 2 мМ EGTA/КОН, 20 мМ HEPES/Tris и 0,176 мМ CaCl₂, чтобы установить концентрацию свободных ионов [Ca²⁺]_i в 0,01 мМ. Типичный раствор в камере содержал 145 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂ и 10 мМ HEPES/Tris (pH 7,4). Для внеклеточного раствора в камере с pH 5,5 HEPES/Tris заменили на MES. Для анализа влияния бензамила (Sigma-Aldrich) и мамбалгина-2 на токи в клетках, в раствор с низким pH добавляли 1 мМ (для клеток K562) или 10 мМ (для остальных клеток) бензамила или 1,5 мМ (для клеток U251 MG) или 1 мМ (для остальных клеток) мамбалгина-2. Бесперебойные ионные токи регистрировали при поддержании мембранного потенциала -50 мВ. Данные фильтровали на частоте 200 Гц с помощью фильтра нижних частот и анализировали с использованием программного обеспечения Axon pClamp 10.5 (Molecular Devices).

2.10. Проточная цитофлуориметрия

Для изучения влияния подкисления среды на экспрессию субъединиц ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC клетки mel P высевали в 6-луночные планшеты (2×10^5 клеток на лунку) в нормальной или кислой среде и выращивали в течение 96 ч с заменой каждые 48 часов. После этого клетки фиксировали в 4% параформальдегида в течение 15 мин и последовательно инкубировали с антителами к ASIC1a (овца, 1:500, ABIN350049, Antibodies-Online, Аахен, Германия), α -ENaC (кролик, 1:500, ABIN1841945, Antibodies-Online) или γ -ENaC (мышь, 1:500, ABIN1865926, Antibodies-Online). После этого клетки промывали в ФСБ и инкубировали с TRITC-конъюгированными анти-овечьими (1:500, 713-025-003, Jackson Immunoresearch, Вест Гроув, США), AlexaFluor488-конъюгированным анти-кроличьими (1:500, 611-545-215, Jackson Immunoresearch) или AlexaFluor488-конъюгированными анти-мышьиными (1:500, 715-545-150, Jackson Immunoresearch) антителами соответственно в течение 1 часа, отмывали в ФСБ, и экспрессию рецепторов анализировали с помощью проточного цитометра Beckman Coulter Cytoflex (Beckman Coulter, Бреа, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения Cytoflex 2.4. (Beckman Coulter).

Для анализа влияния подкисления среды на экспрессию и фосфорилирование других клеточных рецепторов или внутриклеточных мессенджеров клетки *mel P* высевали на 24-луночные планшеты (15×10^3 клеток на лунку) в нормальной или кислой среде и культивировали в течение 96 ч с заменой среды через 48 часов. Для анализа влияния мамбалгина-2 на экспрессию и фосфорилирование белков клетки высевали в 24-луночные планшеты (15×10^3 клеток на лунку) в кислой среде, культивировали в течение 24 ч, а затем инкубировали с $1 \mu\text{M}$ мамбалгина-2 в течение 72 ч без смены среды. После инкубации клетки прикрепляли раствором Версена (ПанЭко), фиксировали в 4% параформальдегида в течение 15 мин и инкубировали с первичными мышиными антителами к CD44 (1:500, ABIN969026, Antibodies-Online) и CD133 (1:500, ABIN6559815, Antibodies-Online), первичными кроличьими антителами к Frizzled 4 (1:250, ABIN5693200, Antibodies-Online) и SNAI1 (pSer246) (1:250, ABIN6256209, Antibodies-Online) или с биотинилированными антителами к ERK (pThr202/pTyr204) (1:250, AHP901, Bio-Rad), JNK (Thr183/Tyr185, pThr221/pTyr223) (1:250, AHP2693, Bio-Rad), PTEN (pSer380) (1:250, 9551, Cell Signaling, Данверс, США), АКТ (pSer473) (1:250, AHP2544, Bio-Rad), mTOR (pSer2448) (1:250, 2971, Cell Signaling), NF κ B p65 (pSer536) (1:100, AHP1342, Bio-Rad) и STAT3 (pTyr705) (1:100, VMA00899, Bio-Rad). Перед инкубацией с первичными антителами к ERK, JNK, PTEN, АКТ, mTOR, SNAI (pSer246), NF κ B p65 (pSer536) и STAT3 (pTyr705) клетки *mel P* пермеабелизировали 0,1% Triton X100 в ФСБ в течение 15 мин при комнатной температуре. После инкубации с первичными антителами клетки промывали и инкубировали со вторичными анти-мышиными антителами, конъюгированными с TRITC (115-025-062, Jackson Immunoresearch), анти-кроличьими антителами, конъюгированными с TRITC (611-025-215, Jackson Immunoresearch). или стрептавидин-фикоэритрином (STAR4A, Bio-Rad) в течение 1 часа. После этого клетки промывали PBS и анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Life Technologies, Уолтэм, США). Анализировали не менее 5×10^3 клеток в регионе интереса. Медиану флуоресценции клеток (МФ) нормировали на таковую у клеток, окрашенных только вторичными антителами или стрептавидин-фикоэритрином. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Attune NxT (Life Technologies).

2.11. Экспрессия субъединиц ASIC/ENaC в ооцитах *Xenopus laevis*

Для экспрессии крысиного ASIC1a, линейаризованную плазмиду PCi, содержащую крысиный ASIC1a транскрибировали с использованием системы крупномасштабного производства РНК T7 RiboMAX™ (Promega, Мэдисон, США) в соответствии с протоколом для кэпированных транскриптов, предоставленным производителем из

линеаризованной плазмиды. Извлечение ооцитов *Xenopus* проводили как описано ранее [163]. После дефолликуляции, в ооциты вводили 2,5 – 10 нг мРНК содержащей транскрипт крысиного ASIC1a. Затем, ооциты выдерживали 2–3 сут при 19 °С и до 7 сут при 15 °С в среде ND-96, содержащей 96 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 1,8 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 5 мМ HEPES (pH 7,4) и гентамицин (50 мкг/мл, G1264, Merck, Дармштадт, Германия).

Для экспрессии человеческих гомотримерных каналов ASIC1a и гетеромерных ASIC1a/α-ENAC/γ-ENAC каналов в ооцитах *Xenopus*, линеаризованные плазмиды, содержащие ASIC1a, α-ENAC и γ-ENAC транскрибировали с использованием набора T7 mMESSAGE-mMACHINE Transcription Kit (Thermo Fischer) в соответствии с протоколом для кэпированных транскриптов, предоставленным производителем. Ооциты дефолликулировали и вводили 2,5–10 нг мРНК. Для экспрессии ASIC1a/α-ENAC/γ-ENAC соответствующие мРНК смешивали в молярном соотношении 1:1:1. После инъекции ооциты выдерживали в течение 2–3 дней при 19°С, а затем до 7 дней при 15°С в среде ND-96 с добавлением гентамицина (50 мкг/мл, Merck). Плазмиды, кодирующие ASIC1a, α-ENAC и γ-ENAC человека были любезно предоставлены А. Старущенко (Университет Южной Флориды, Тампа, США).

2.12. Вестерн-блоттинг, иммунопреципитация и аффинная экстракция

Для исследования влияния закисления среды при заблокированных каналах, содержащих субъединицу ASIC1a, клетки U251 MG, A172 и K562 лизировали в буфере RIPA (150 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 5 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 1% NP-40, 1% Triton X-100, 0,5% додецилсульфата натрия) с коктейлем ингибиторов протеазы SIGMAFAST (Sigma-Aldrich), лизаты разбавляли буфером для нанесения на гель (120 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 20% [об./об.] глицерина, 10% [об./об.] меркаптоэтанола, 4 % [мас./об.] додецилсульфата натрия и 0,05% [мас./об.] бромфенолового синего), разделяли электрофорезом в ПААГ, переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Bio-Rad). Мембраны после переноса блокировали в 5% обезжиренном молоке (Sigma-Aldrich) в течение 2 ч. После блокировки, мембраны инкубировали в течение ночи при 4 °С с первичными кроличьими антителами против циклина D1 (pSer90) (1:1000, ABIN6271254, Antibodies-Online), CDK4 (pThr172) (1:1000, ABIN6271182, Antibodies-Online), CDK6 (pTyr24) (1:1000, ABIN319289, Antibodies-Online) или мышинными антителами против β-актина (1:1000, R&D, MAB8929); 3 раза промывали Tris-солевым буфером (ТСБ, 50 мМ Tris, 150 мМ NaCl, pH 7,4) с добавлением 0,1% Tween-20 (Applichem, Дармштадт, Германия) и инкубировали с HRP-конъюгированными вторичными анти-кроличьими антителами (1:5000, 111-035-003, Jackson Immunoresearch) или анти-мышинными (1:5000,

715-035-150, Jackson Immunoresearch) в течение 1 ч (20 °C). После этого мембраны промывали 4 раза ТСБ + 0,1% Tween-20, сигнал HRP регистрировали с помощью хемилюминесцентного субстрата ECL (Bio-Rad,) на хемидокументере ImageQuant LAS500 (GE Healthcare) и проводили количественную оценку с помощью программного обеспечения ImageJ (НИН).

Для определения мишеней, экстрагируемых мамбалгином-2 из клеток A549 и mel P, мамбалгин-2 (1 мг/мл) соединили с NHS-активированной сефарозой 4 Fast Flow (17-0906-01, GE Healthcare) согласно к инструкциям производителя. Смолу, заблокированную 500 мМ этаноламином без какого-либо связанного белка, использовали в качестве отрицательного контроля. Мембранную фракцию белков клеток A549 и mel P (5×10^7 клеток на образец) солюбилизировали в 2% Triton X-100 (A4975, Panreac, Барселона, Испания), разбавленном в 10 раз буфером ТСБ и инкубировали со смолой в течение 16 ч при 4°C в ТСБ. После этого неспецифически связанные белки последовательно вымывали со смолы пятью объемами ТСБ, пятью объемами ТСБ + 1 М NaCl + 0,5% Тритон X-100 и пятью объемами ТСБ + 0,5% Тритон X-100. Специфически связанные белки элюировали пятью объемами 200 мМ глицина (pH 2,6), разводили в буфере для нанесения на гель, разделяли электрофорезом в ПААГ, переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Bio-Rad). Мембраны после переноса блокировали в 5% обезжиренном молоке (Sigma-Aldrich) в течение 2 ч. После блокировки, мембраны инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными мышинными антителами против ASIC1a (1:1000, SMC-427, StressMarq Biosciences, Виктория, Канада, для клеток A549) и γ -ENaC (1:1000, ABIN1865926, Antibodies-Online) кроличьими антителами на α -ENaC (1:1000, ABIN1841945, Antibodies-Online) или ASIC3 (1:1000, ABIN3187736, Antibodies-Online), или овечьими антителами на ASIC1a (1:1000, ABIN350049, Antibodies-Online, для клеток mel P). После инкубации, клетки трижды промывали ТСБ + 0,1% Tween-20 и инкубировали с HRP-конъюгированными вторичными анти-мышинными (1:5000, 715-035-150, Jackson ImmunoResearch), анти-кроличьими (1:5000, 111-035 -003, Jackson ImmunoResearch), либо анти-овечьими (1:5000, 713-035-003, Jackson Immunoresearch) антителами. Затем, мембраны четырежды промывали ТСБ + 0,1% Tween-20 и регистрировали сигнал HRP с помощью ECL-субстрата (Bio-Rad) и хемидокументера ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare).

Для изучения образования гетеротримеров ASIC1/ α -ENaC/ γ -ENaC в клетках A549 100 мкг овечьего антитела на ASIC1a (конечная концентрация 1 мг/мл, ABIN350049, Antibodies-Online) абсорбировали на агарозу, конъюгированную с белком A (10037259, Roche) в соответствии с протоколами производителя. Мембранную фракцию клеток A549 (5×10^7 клеток на образец) солюбилизировали в 2% тритоне X-100 (Panreac) и разбавляли в

10 раз буфером ТСБ. После этого лизаты предварительно очищали пустой агарозой, конъюгированной с белком А (Roche), в течение 4 ч при комнатной температуре, чтобы избежать неспецифического связывания белков с агарозой, а затем инкубировали с агарозой, связанной с антителом ASIC1a, в течение 16 ч при 4°C в ТСБ. Пустую агарозу, блокированную 1% обезжиренным сухим молоком (Sigma-Aldrich), использовали в качестве отрицательного контроля. Неспецифически связанные белки последовательно вымывали со смолы пятью объемами ТСБ, пятью объемами ТСБ + 1 М NaCl + 0,5% Тритон X-100 и пятью объемами ТСБ + 0,5% Тритон X-100. Специфически связанные белки элюировали 10-минутным нагреванием в буфере для нанесения на гель, после чего проводили электрофорез в ПААГ, переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Bio-Rad). Мембраны после переноса блокировали в 5% обезжиренном молоке (Sigma-Aldrich) в течение 2 ч. После блокировки, мембраны инкубировали в течение ночи при 4 °С с первичными кроличьими антителами к α -ENaC (1:1000, ABIN1841945, Antibodies-Online) и мышинными антителами к γ -ENaC (1:1000, ABIN1865926, Antibodies-Online). После инкубации, клетки трижды промывали ТСБ + 0,1% Tween-20 и инкубировали с HRP-конъюгированными вторичными анти-кроличьими (1:5000, 111-035 -003, Jackson ImmunoResearch) или анти-мышинными (1:5000, 715-035-150, Jackson ImmunoResearch) антителами в течение 1 ч (20°C). После этого мембраны четыре раза промывали ТСБ + 0,1% Tween-20 и регистрировали сигнал HRP с помощью ECL-субстрата (Bio-Rad) с использованием хемидокументера ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare).

2.13. Анализ клеточного цикла

Для анализа влияния закисления на клеточный цикл клетки U251 MG, A172, K562, A549, Lewis-P29 и mel P высевали в 6-луночные культуральные планшеты (по 2×10^5 клеток на лунку) в нейтральной (для клеток U251 MG, A172 и K562) или кислой (pH ~ 5,5 для клеток A549, Lewis P29 и 6,5 для клеток mel P) среде выращивали в течение 24 ч и инкубировали с 1 μ M (в случае клеток клетки U251 MG, A172, K562, A549, Lewis-P29), либо 10 μ M (в случае клеток mel P) мамбалгина-2 в течение 72 ч с заменой среды каждые 24 часа (для клеток U251 MG, A172 и K562), либо без смены среды (для клеток A549, Lewis-P29 и mel P). Затем клетки открепляли от лунок 0,5% трипсином-ЭДТА, промывали сбалансированным солевым раствором Эрла и фиксировали в ледяном 70% этаноле в течение 24 ч при -20°C. После фиксации клетки дважды промывали раствором Эрла и экстрагировали ДНК путем 5-минутной инкубации с буфером для экстракции ДНК (200 мМ Na₂HPO₄ с 0,004% Triton X-100, pH 7,8). Затем клетки промывали раствором Эрла, ресуспендировали в растворе для окрашивания ДНК (раствор Эрла, 50 мг/мл иодида

пропидия, 0,2 мг/мл РНКазы А) и анализировали с помощью проточного цитометра FACSCalibur (BD Biosciences, Нью-Джерси, США) в случае клеток U251 MG, A172 и K562, либо с помощью проточного цитометра Attune NxT (Life Technologies) для клеток A549, Lewis P29 и mel P. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Flowing 2.5 (Турку, Финляндия) в случае клеток U251 MG, A172 и K562, либо Attune NxT (Life Technologies) в случае клеток A549, Lewis-P29 и mel P.

2.14. Анализ экстернализации фосфатидилсерина

При исследовании апоптоза в опухолевых клетках был использован аннексин V для обнаружения экстернализации фосфатидилсерина — одного из маркеров раннего апоптоза. Для этого клетки высевали в 6-луночные культуральные планшеты (по 1×10^5 клеток на лунку для клеток U251 MG и A172 и по 2×10^5 клеток на лунку в случае клеток A549, Lewis-P29 и mel P) в нейтральной (для клеток U251 MG и A172) или кислой (pH ~ 5,5 для клеток A549, Lewis-P29 и 6,5 для клеток mel P) среде выращивали в течение 24 ч и инкубировали с 1 μ M (в случае клеток U251 MG, A172, A549, Lewis-P29), либо 10 μ M (в случае клеток mel P) мамбалгина-2 в течение 72 ч с заменой среды каждые 24 часа (для клеток U251 MG и A172), либо без смены среды (для клеток A549, Lewis P29 и mel P). После инкубации клетки отделяли раствором Версена (ПанЭко) и промывали буфером для связывания аннексина (V13246, Thermo Fisher). Затем клетки инкубировали с аннексином V, конъюгированным с Alexa488 (A13201, Thermo Fisher), в течение 20 мин, промывали буфером для связывания аннексина и анализировали с помощью проточного цитометра Novocyte (ACEA Biosciences, Санта-Клара, США) для клеток U251 MG и A172, либо проточного цитометра Attune NxT (Life Technologies) для клеток A549, Lewis P29 и mel P. Данные анализировали с использованием программного обеспечения NovoExpress (ACEA Biosciences) для клеток U251 MG и A172, либо Attune NxT Software (Life Technologies) для клеток A549, Lewis P29 и mel P.

2.15. «Нокдаун» генов ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC

Для блокирования экспрессии эндогенных ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC клетки A549 трансфицировали соответствующими малыми интерферирующими РНК (миРНК) (Табл. 3, Синтол, Москва, Россия). Клетки высевали в 6-луночные культуральные планшеты (2×10^5 клеток/лунку) в нейтральной или кислой среде (pH 5,5) и выращивали в течение 24 часов. Затем смешивали три миРНК к разным частям соответствующих генов (по 1 мкг на лунку для каждой миРНК), разводили в 100 мкл буфера для трансфекции (Pan-Biotech, Айденбах, Германия), инкубировали 5 мин и смешивали с 15 мкл предварительно разведенного

реагента для трансфекции PANfect A-plus (Pan-Biotech). Конечную смесь инкубировали в течение 30 мин и добавляли к клеткам A549. Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 4 ч после чего культуральную среду меняли на свежую. Через 96 ч инкубации клетки открепляли раствором Версена и делили на две части. Первую часть инкубировали в течение часа с первичными овечьими антителами к ASIC1a (1:1000, ABIN350049, Antibodies-Online), кроличьими антителами к α -ENaC (1:1000, ABIN1841945, Antibodies-Online) или мышинными антителами к γ -ENaC (1:1000, ABIN1865926, Antibodies-Online), затем промывали ФСБ и инкубированные с TRITC-конъюгированными вторичными антителами (713-025-003, 111-025-003 и 615-025-214, Jackson ImmunoResearch для ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC, соответственно). Экспрессию поверхностных рецепторов анализировали с использованием проточного цитометра Attune NxT (Life Technologies) для подтверждения нокдауна генов. Вторую часть клеток высевали в 96-луночные культуральные планшеты (5×10^3 клеток на лунку) в нейтральной или кислой среде и инкубировали с разными концентрациями мамбалгина-2 в течение 72 ч без смены среды, а затем проводили анализ WST-1 как описано ранее (см. п. 2.6). Нокдаун ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC не влиял на рост клеток A549 сам по себе как при pH 7,4, так и при 5,5 (Рис. 11).

2.16. Флуоресцентная и конфокальная микроскопии

Для анализа морфологии ядер клетки U251 MG высевали в 96-луночный культуральный планшет (5×10^3 клеток/лунка) в нейтральной среде и инкубировали с 1 μ M мамбалгина-2 и/или 10 μ M z-VAD-FMK в течение 72 ч с заменой среды каждые сутки. После этого ядра клеток окрашивали 1 μ M Хехста 33342 (ПанЭко) и ядра визуализировали при 200-кратном увеличении на флуоресцентном микроскопе Nikon TS-100 (Nikon, Токио, Япония).

Для изучения локализации молекулярных мишеней мамбалгина-2 в клетках mel P клетки высевали на круглые стекла в 24-луночные планшеты (15×10^4 клеток/лунка) в кислой среде (pH ~6,5) и выращивали в течение 24 ч. После этого клетки фиксировали 4% параформальдегида в течение 15 мин, блокировали 2% раствором бычьего сывороточного альбумина в ФСБ в течение 1 ч и инкубировали с первичными овечьими антителами к ASIC1a (1:500, ABIN350049, Antibodies-Online), кроличьими антителами к α -ENaC (1:500, ABIN1841945, Antibodies-Online) или мышинными антителами к γ -ENaC (1:500, ABIN1865926, Antibodies-Online).

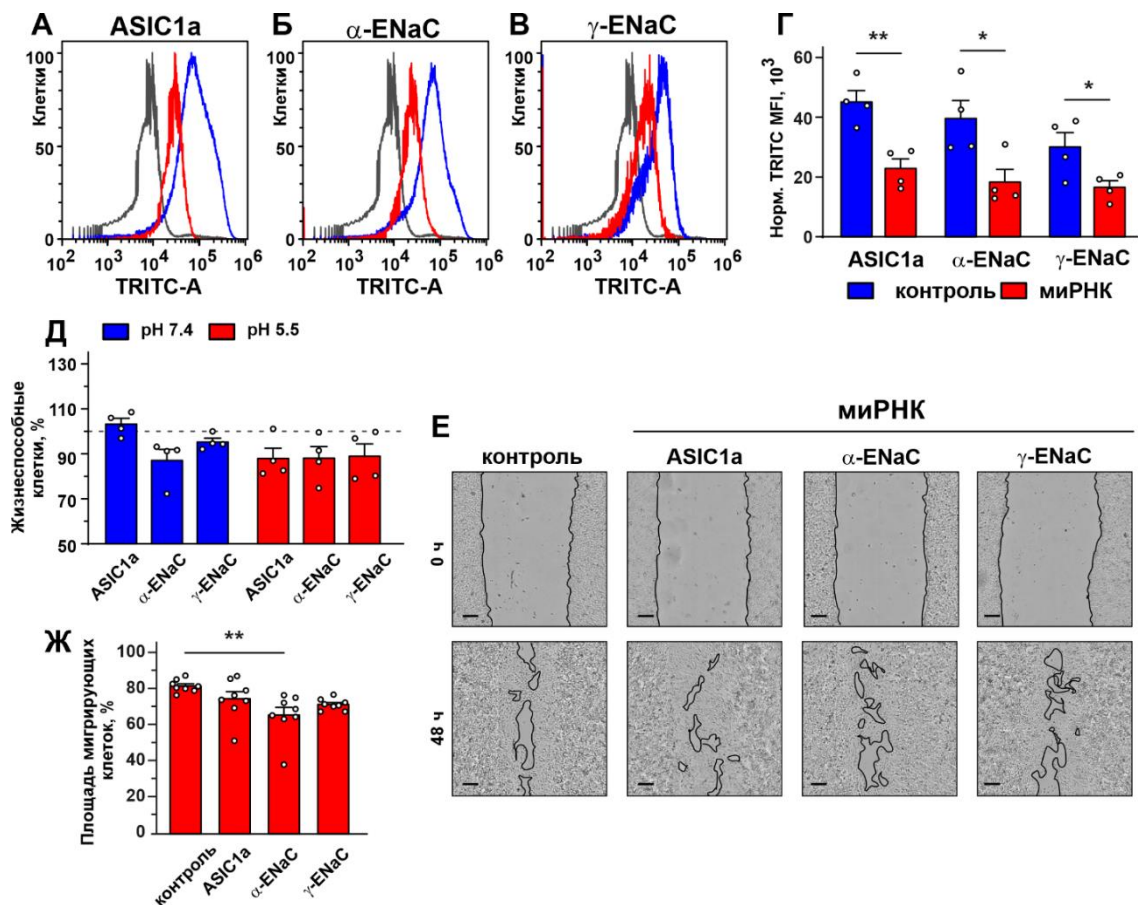


Рис. 11. Влияние нокдауна генов ASIC1a, α-ENaC и γ-ENaC на пролиферацию и миграцию клеток A549. Репрезентативные гистограммы распределения клеток после трансфекции клеток неспецифической контрольной малой интерферирующей РНК (миРНК, контроль) и ASIC1a (А), α-ENaC (Б) и γ-ENaC (В)-специфичной РНК и количественного определения ASIC1a, α-ENaC и γ-ENaC экспрессия после трансфекции миРНК (Г). Данные представлены как нормализованная медиана флуоресценции (МФ) ± SEM (n = 4). * (p < 0,05) и ** (p < 0,01) указывают на достоверное различие между группами данных по двустороннему t-тесту. Д – Влияние нокдауна ASIC1a, α-ENaC и γ-ENaC на жизнеспособность клеток A549. Данные представляют собой % от жизнеспособных клеток, инкубированных с контрольной миРНК ± SEM (n = 4). Е – Репрезентативные изображения ран в монослое клеток A549, инкубированных с контрольными или ASIC1a, α-ENaC и γ-ENaC-специфическими миРНК при pH 5,5. Клетки инкубировали 48 часов, шкала 100 мкм. Ж – Площадь раны, занимаемая мигрирующими клетками A549 после нокдауна ASIC1a, α-ENaC и γ-ENaC. Данные представлены в виде % поверхности раны, занимаемой мигрирующими клетками ± SEM (n = 8), ** (p<0,01) указывает на достоверное различие между группами данных согласно One-way ANOVA с последующим тестом Dunnet.

После этого клетки инкубировали с TRITC-конъюгированным анти-овечьим (1:500, 713-025-003, Jackson ImmunoResearch), AlexaFluor488-конъюгированным анти-кроличьим (1:500, 611-545-215, Jackson ImmunoResearch) или анти-мышиним антителом (1:500, 715-545-150, Jackson ImmunoResearch), и мамбалгином-2, меченным красителем

CF647 (мамбалгин-2/647). Ядра клеток окрашивали Хехстом 33342, после чего клетки заключали в среде ProLong Gold Antifade Mounting Medium (Life Technologies) и визуализировали с помощью инвертированного конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM710 (Carl Zeiss, Йена, Германия) с масляным иммерсионным объективом $\times 60$ (1,4) при увеличении в 600 раз.

2.17. Молекулярное моделирование

Для построения моделей использовались полноразмерные структуры ASIC1, α -ENaC, и γ -ENaC из базы данных AlphaFold с кодами Uniprot P78348, P37088 и P51170 соответственно. Дабы избежать нежелательных артефактов, из структур были удалены неупорядоченные N- и C-концы — использованные в моделях последовательности приведены в таблице 5.

Построение гомо- и гетеротримера выполнялось в PyMOL путём наложения полноразмерных моделей субъединиц на экспериментальную крио-ЭМ структуру 7CFT. Общее положение мамбалгина в модели относительно субъединиц не изменялось. Мамбалгин-1, изначально присутствующий в структуре 7CFT, превращался в мамбалгин-2 с помощью инструмента *mutagenesis* в PyMOL путём замены Y4 на F4.

Таблица 5.

Субъединицы для построения моделей

Субъединица	Код Uniprot	Остатки в модели	Сайты N-гликозилирования
ASIC1	P78348	13-470	368, 395
α -ENaC	P37088	50-593	нет
γ -ENaC	P51170	20-579	209, 497

Добавление N-гликанов к построенным каналам и внедрение в липидный бислой из молекул POPC (пальмитоилолеоилфосфатидилхолина) осуществлялось с помощью инструментов веб-сервиса CHARMM-GUI *Membrane Builder* и *Glycan Reader & Modeller*. В качестве N-гликанов использовался базовый пентасахаридный кор (2 GlcNAc + 3 Man). Расчёты МД выполнялись в пакете GROMACS в силовом поле CHARMM36m с дополнительным набором параметров CHARMM36-WYF для описания π -катионных взаимодействий. Использовалась температура 310 К, баростат Паринелло-Рамана и термостат V-rescale.

Анализ контактов был реализован с помощью процедуры *cont_stat.js* программного пакета IMPULSE. Исследовалось взаимодействие молекул мамбалгина-2 с субъединицами гомо- и гетротримерного каналов. Анализировались ионные, ион-дипольные, π -катионные, стекинговые взаимодействия, водородные связи, и гидрофобные

контакты. Обработка и суммирование выходных данных по временам взаимодействия выполнялась с помощью Python. Были проанализированы данные для рассчитанных 200 и 300 нс траекторий гомо- и гетеротримера соответственно.

2.18. Статистический анализ

Данные представлены как среднее \pm SEM. Количество экспериментов (n) указано в подписях к рисункам. К экспериментальным данным не применялись критерии исключения. Данные были проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа с соответствующим апостериорным тестом множественных сравнений (One-way ANOVA с последующим тестом Dunnet или One-way ANOVA с последующим тестом Tukey), One-sample t-тестом, двусторонним t-тестом или t-тестом Уэлча, что обозначено в подписях к рисункам. Для сравнения кривых регрессии использовался тест GraphPad Prism 8.0 ANCOVA (F-тест). Для сравнения выживаемости пациентов с различной экспрессией ASIC и ENaC использовали log-rank тест. Различия данных считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Анализ проводили с использованием программного обеспечения OriginPro 8.6 (OriginLab) и GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Молекулярные механизмы адаптации опухолевых клеток к закислению внешней среды

3.1.1. Экспрессия мРНК активируемых закислением протон-чувствительных каналов повышена в опухолевых клетках

Активность протон-чувствительных каналов может обеспечивать адаптацию опухолевых клеток к закислению внешней среды, поэтому на первом этапе работы была исследована экспрессия мРНК субъединиц каналов DEG/ENaC (ASIC1a, ASIC2, ASIC3, ASIC4, α -ENaC и γ -ENaC) в нормальных и трансформированных клетках различного происхождения. Анализ при помощи ПЦР в реальном времени выявил, что в клетках глиомы U251 MG, и глиобластомы A172 экспрессируются мРНК, кодирующие все исследуемые субъединицы протон-чувствительных каналов, однако экспрессия ASIC1a не была обнаружена в первичных астроцитах человека (Рис. 12А).

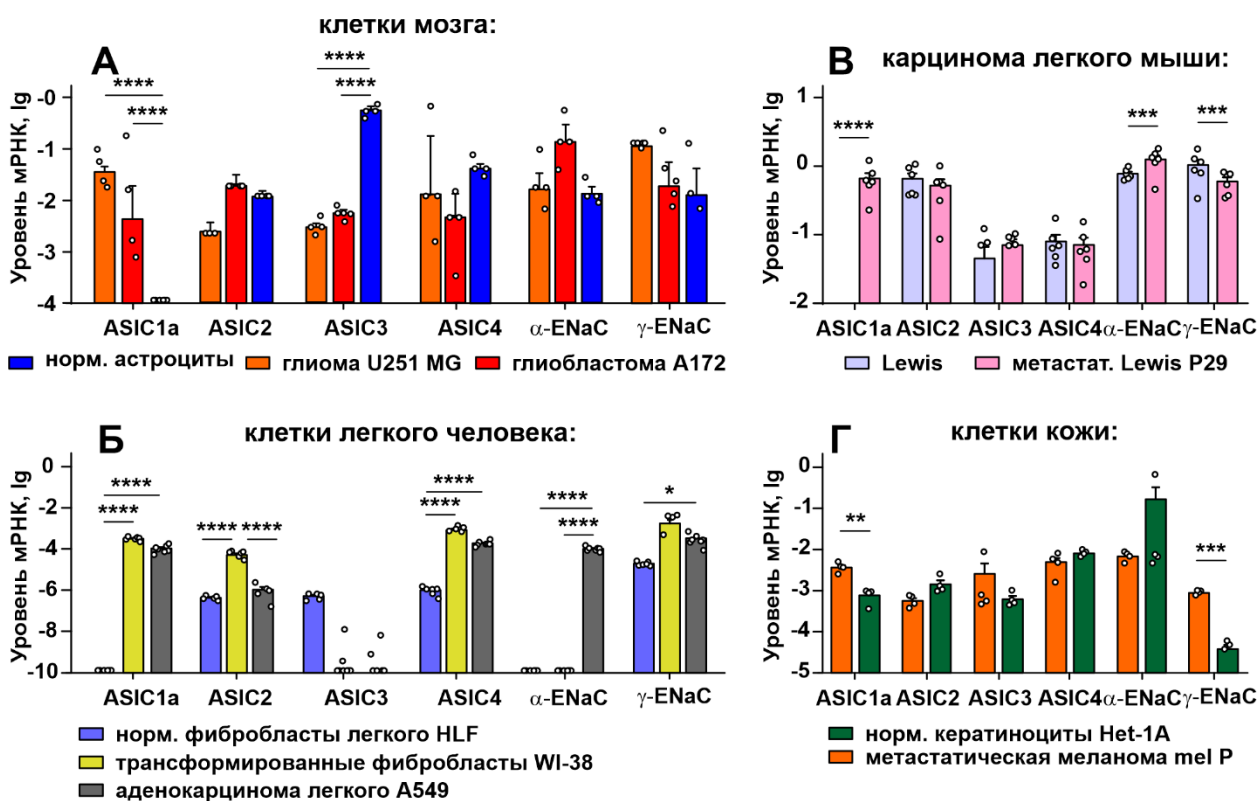


Рис. 12. Анализ экспрессии субъединиц протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC в клетках мозга (А), легкого человека (Б), аденокарциномах легкого мыши (В) и кожи (Г) при помощи ПЦР в реальном времени. Экспрессия гена нормировалась на уровень генов *ATCB*, *GPDH* и *RPL13A* ($n = 3-6$). * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) и **** ($p < 0,0001$) означают достоверное отличие между группами данных согласно двустороннему t-тесту.

При этом, экспрессия ASIC3 была значительно выше в астроцитах по сравнению с клетками опухолей мозга. Клетки хронической миелогенной лейкемии K562 экспрессировали только мРНК ASIC1a, но не обладали мРНК, кодирующими ASIC2, ASIC3 и ASIC4. В клетках аденокарциномы легкого A549 были обнаружены все изучаемые субъединицы каналов DEG/ENaC, кроме ASIC3. В трансформированных фибробластах легкого WI-38 отсутствовала мРНК ASIC3 и α -ENaC, а экспрессия ASIC1a, ASIC2 и ASIC4 была повышена по сравнению с клетками A549. В нормальных первичных фибробластах легкого HLF не экспрессировались ASIC1a и α -ENaC, но была найдена мРНК ASIC3. Экспрессия ASIC2, ASIC4 и γ -ENaC была снижена по сравнению с клетками A549 и WI-38 (Рис. 12Б). Интересно, что в клетках карциномы легкого мыши Lewis, как и в нормальных клетках легкого и мозга, отсутствовала экспрессия ASIC1a, но эта субъединица экспрессировалась в метастатической подлинной клетке Lewis – P29. Экспрессия α -ENaC была повышена, а γ -ENaC, наоборот, понижена в клетках P29 по сравнению с клетками Lewis (Рис. 12Б). Следует отметить, что ASIC4 может уменьшать поверхностную экспрессию ASIC1a, поэтому большее количество ASIC1a в клетках Lewis P29 по сравнению с ASIC4 может быть связано именно с уменьшенным уровнем ASIC4 в клетках [70]. Нормальные кератиноциты Het-1A и клетки метастатической меланомы кожи mel P экспрессируют и содержат мРНК всех изучаемых субъединиц каналов DEG/ENaC, включая ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC, однако уровень мРНК ASIC1a и γ -ENaC в кератиноцитах значительно ниже по сравнению с опухолевыми клетками. Известно, что экспрессия ASIC и ENaC в кератиноцитах необходима для осуществления барьерной функции кожи, а также регуляции дифференцировки кератиноцитов [164,165]. В общем, было обнаружено, что экспрессия ASIC1a, а также α -ENaC, либо γ -ENaC понижена, а в некоторых случаях и отсутствует в нормальных клетках различного происхождения по сравнению с опухолевыми.

Для того, чтобы выяснить физиологическое значение повышенной экспрессии протон-чувствительных каналов в прогрессии опухолей, был проведен биоинформатический анализ экспрессии субъединиц каналов DEG/ENaC в опухолевых и нормальных тканях различного происхождения. Экспрессия ASIC1 и ASIC2 была повышена в аденокарциноме легкого по сравнению с образцами нормального легкого и окружающей тканью аденокарциномы легкого (Рис. 13А). Уровни экспрессии ASIC3 и ASIC4 были значительно ниже в аденокарциноме и окружающих тканях, чем в образцах здоровых легких (Рис. 13А). Экспрессия мРНК, кодирующая субъединицы α -ENaC и γ -ENaC, была выше в окружающей аденокарциному ткани по сравнению с нормальной

тканью, но в аденокарциноме легкого экспрессия мРНК α -ENaC и γ -ENaC была соответственно, выше и ниже по сравнению с нормальной тканью (Рис. 13А).

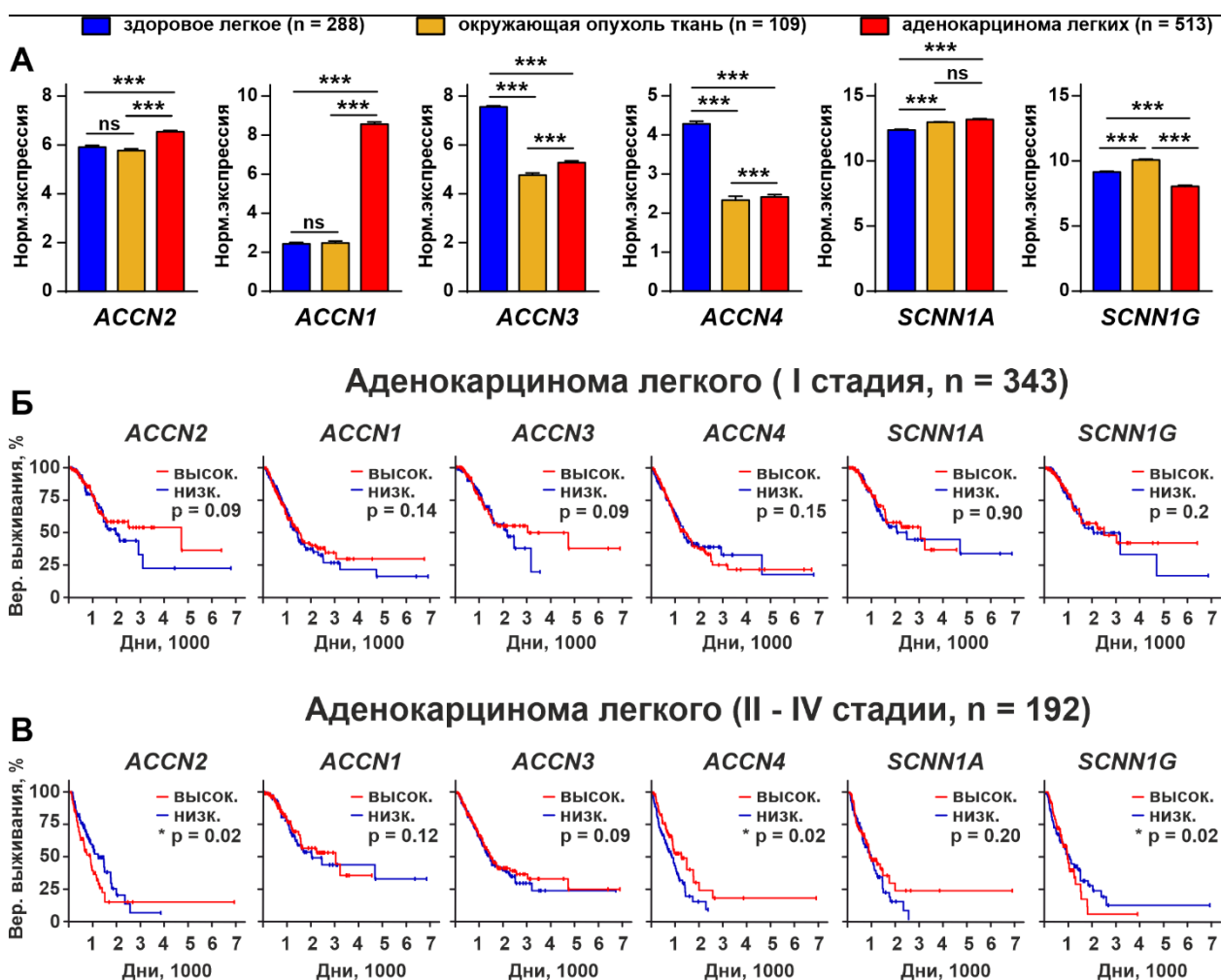


Рис. 13. Биоинформационный анализ экспрессии *ACCN2*, *ACCN1*, *ACCN3*, *ACCN4*, *SCNN1A* и *SCNN1G*, кодирующих ASIC1, ASIC2, ASIC3, ASIC4, α -ENaC и γ -ENaC субъединицы каналов DEG/ENaC, соответственно, у здоровых людей и больных аденокарциномой легкого из баз данных TCGA (исследования GTEX и LUAD). А – Анализ экспрессии генов в биоптатах здорового легкого (исследование GTEX) и в образцах окружающей ткани аденокарциномы легкого, а также в образце аденокарциномы легкого (исследование TCGA LUAD). Данные представлены в виде нормализованной экспрессии генов \pm SEM; * ($p < 0,001$) указывает на значительную разницу между группами данных по One-way ANOVA с последующим тестом Tukey. Б, В – Анализ корреляции между вероятностью выживания больных аденокарциномой легкого на I (Б) и II–IV стадиях (В) и различной экспрессией генов *ACCN2*, *ACCN1*, *ACCN3*, *ACCN4*, *SCNN1A* и *SCNN1G*. * ($p < 0,05$) указывает на достоверную разницу прогноза выживаемости пациентов с высокой (выше медианы) и низкой (ниже медианы) экспрессией генов по log-rank тесту, n.s. - нет достоверной разницы ($p > 0,05$).**

Анализ связи между уровнями экспрессии генов протон-чувствительных каналов ASIC1, ASIC2, ASIC3, ASIC4, α -ENaC, γ -ENaC и выживаемостью пациентов не выявил связи между экспрессией и прогнозом выживаемости пациентов с аденокарциномой

легкого на I стадии обнаружено не было (Рис. 13Б). При этом, прогноз выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого на II-IV стадиях и более низкой экспрессией мРНК ASIC1 и γ -ENaC был лучше, чем у пациентов с высоким уровнем экспрессии ASIC1 и γ -ENaC (Рис. 13В). Низкая экспрессия мРНК, кодирующей ASIC4, коррелировала с худшим прогнозом выживания пациентов с аденокарциномой легкого на II-IV стадиях (Рис. 12В). Экспрессия всех остальных исследованных генов не коррелировала с прогнозом выживаемости больных аденокарциномой легкого на II-IV стадиях. Таким образом, как ASIC1, так и γ -ENaC могут быть вовлечены в прогрессирование аденокарциномы легкого.

Анализ экспрессии ASIC1, ASIC2, ASIC3, ASIC4, α -ENaC и γ -ENaC в биоптатах нормальной кожи и пациентов с меланомами из базы данных TCGA выявил, что экспрессия *ACCN2* в здоровой коже, а также в первичных и метастатических очагах меланомы существенно не различалась, в то время как экспрессия *ACCN1*, *ACCN3*, *ACCN4*, *SCNN1A* и *SCNN1G* была резко снижена в образцах первичной и метастатической меланомы по сравнению с биоптатами нормальной кожи (Рис. 14А).

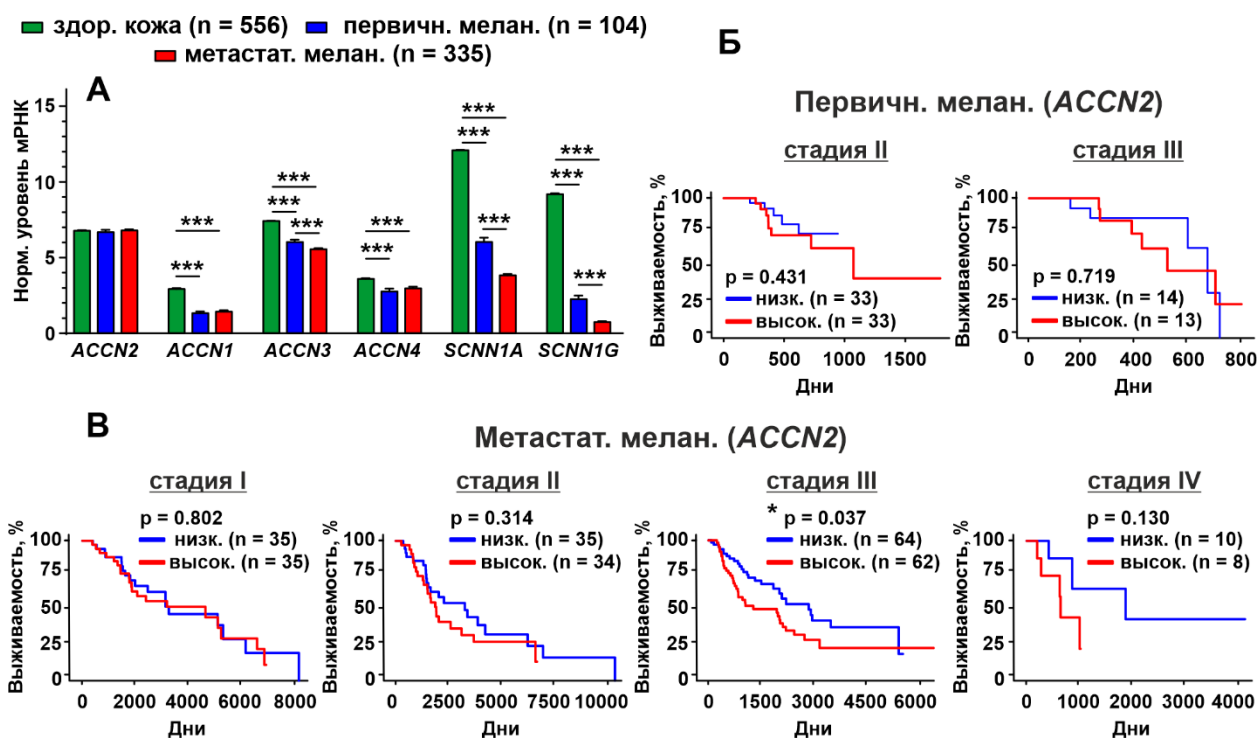


Рис. 14. Биоинформатический анализ экспрессии генов *ACCN2*, *ACCN1*, *ACCN3*, *ACCN4*, *SCNN1A* и *SCNN1G* у здоровых людей и пациентов с первичной и метастатической меланомой из баз данных GTEX и TCGA SKSM. А – Анализ экспрессии генов в биоптатах здоровой кожи (исследование GTEX) и в образцах первичной и метастатической меланомы (исследование TCGA SKSM). Данные представлены как нормализованная экспрессия гена \pm SEM, *** ($p < 0,001$) указывает на значительную разницу между группами данных с помощью One-way ANOVA с последующим Tukey тестом. Б, В – Анализ выживаемости пациентов с первичной (Б) и метастатической (В) меланомой и различной экспрессией гена *ACCN2*. * ($p < 0,05$)

указывает на достоверную разницу между прогнозом выживаемости пациентов с высокой (выше медианы) и низкой (ниже медианы) экспрессией *ACCN2* по данным log-rank теста.

Еще большее снижение экспрессии *ACCN3*, *SCNN1A* и *SCNN1G* по сравнению с нормальной тканью наблюдалось в образцах тканей метастатической меланомы. Таким образом, экспрессия гена, кодирующего субъединицу ASIC1a, повышалась в клетках и первичной и метастатической меланомы относительно других генов, кодирующих субъединицы ASIC и ENaC (Рис. 14А).

Анализ связи между уровнем экспрессии *ACCN2* и прогнозом выживаемости пациентов с первичными и метастатическими меланомами показал, что экспрессия *ACCN2* не коррелировала с прогнозом выживаемости пациентов с первичной меланомой на стадиях II и III (Рис. 14Б). Однако, повышенная экспрессия гена, кодирующего субъединицу ASIC1a, у пациентов с метастатической меланомой на III стадии связана с худшим прогнозом выживаемости (Рис. 14В). То же было характерно и для пациентов с IV стадией меланомы, но разница в прогнозах не достигала статистической значимости. Экспрессия всех других исследованных генов при метастатической меланоме не коррелировала с прогнозом выживания пациентов.

Таким образом, экспрессия мРНК ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC повышена в клетках опухолей по сравнению с нормальными клетками, а повышенная экспрессия гена, кодирующего ASIC1a, связана с худшим прогнозом выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого и метастатической меланомой кожи на поздних стадиях.

3.1.2. Закисление внешней среды активирует в опухолевых клетках протон-чувствительные каналы, содержащие ASIC1a, и про-онкогенные внутриклеточные мессенджеры

Чтобы понять, какие ионные каналы регулируют адаптацию опухолевых клеток к закислению внешней среды, были проведены эксперименты посредством технологии пэтч-кламп при отведении сигнала от плазматической мембраны всей клетки (конфигурация «целая клетка»). Быстрое изменение pH внеклеточной среды приводило к активации протон-чувствительных натриевых токов в клетках глиомы U251 MG, миелогенной лейкемии K562 и аденокарциномы легкого A549 (Рис. 15А-В). Данные токи характеризовались быстрым нарастанием амплитуды до максимального значения (от 7 до 312 пА в зависимости от клеток) и более медленным спадом в ходе десенситизации до стационарного уровня, что характерно для протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a [65,103]. Константа времени десенситизации канала составляла ~ 1,5 сек, что также соответствовало каналам, содержащим ASIC1a [85].

Интересно, что для трансформированных фибробластов легкого, которые экспрессируют ASIC1a и γ -ENaC, но не α -ENaC, также характерно наличие протон-активируемого катионного тока (Рис. 15Г), в то время как в первичных, нетрансформированных фибробластах легкого, не экспрессирующих ни одну из изучаемых субъединиц каналов DEG/ENaC (Рис. 12Б), падение внешнего pH не приводило к появлению входящего тока катионов (Рис. 15Д).

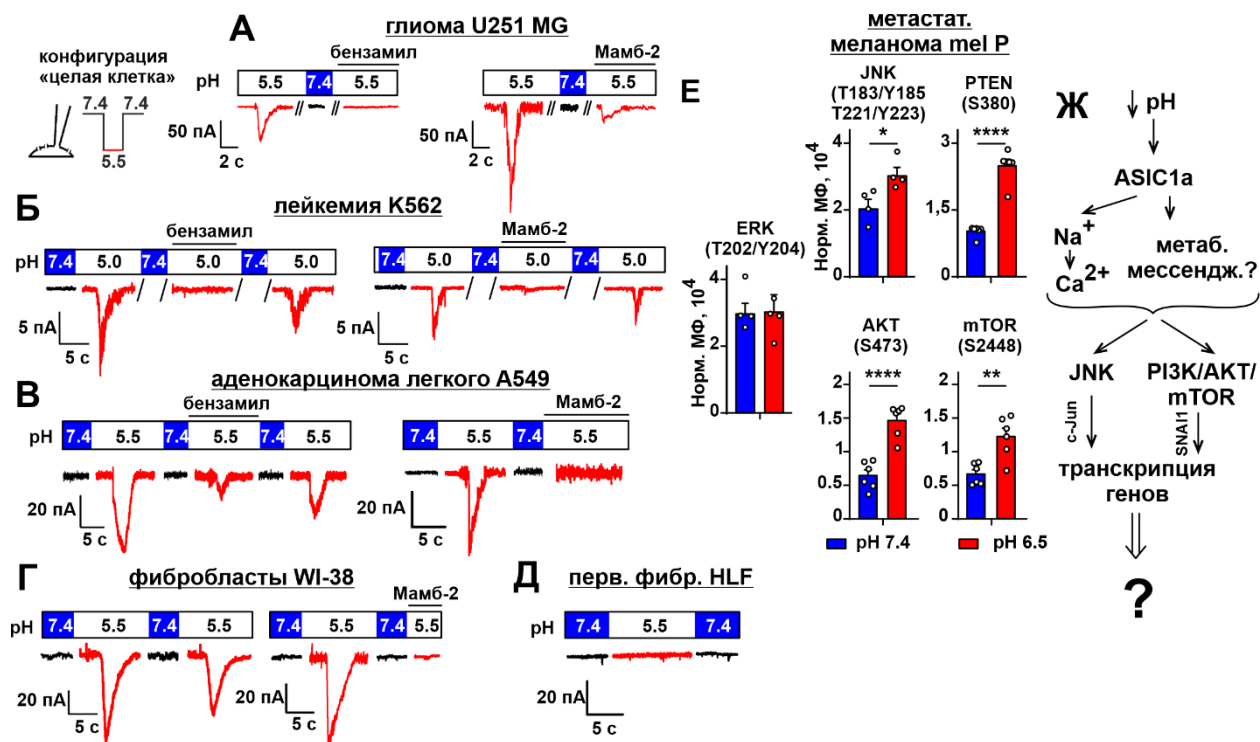


Рис. 15. Влияние рекомбинантного аналога мамбалгина-2 на входящие токи в опухолевых клетках. Анализировали токи, опосредованные ASIC1a в клетках глиомы U251 MG (А), миелогенной лейкемии K562 (Б), аденокарциномы легкого A549 (В), а также в трансформированных фибробластах WI-38 (Г) и фибробластах легкого человека (Д). Е. – Анализ активности JNK, PTEN, АКТ и mTOR в клетках mel P. * (p < 0,05), ** (p < 0,001) и **** (p < 0,0001) означают отличие между группами данных согласно двустороннему t-тесту. Ж. – Схема молекулярного механизма, запускаемого при открытии протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC в опухолевых клетках.

Инкубация клеток опухолей и трансформированных фибробластов с наиболее эффективным селективным ингибитором ASIC1a бензамилем [148] предотвращала появление входящего тока катионов в них (Рис. 15А-Г), то есть катионный входящий ток в опухолевых и трансформированных клетках опосредован именно открытием протон-чувствительных каналов, содержащих субъединицу ASIC1a. Более того, рекомбинантный аналог мамбалгина-2 также ингибировал ток катионов через мембрану клеток, экспрессирующих ASIC1a (Рис. 15А-Г). Таким образом, эффекты закисления на опухолевые, но не на нормальные клетки, опосредуются открытием протон-

чувствительных каналов, содержащих субъединицу ASIC1a. В связи с тем, что при открытии каналов, содержащих ASIC1a, ионы натрия могут запускать выход кальция из внутриклеточных депо [48,105], а также в связи с тем, что ASIC1a может активировать вторичные внутриклеточные мессенджеры и без тока ионов через пору канала [101], с помощью проточной цитофлуориметрии было выяснено, какие внутриклеточные сигнальные каскады, активируются в клетках при открытии ASIC1a-содержащих каналов. При активации ASIC-1a-содержащих каналов, в клетках метастатической меланомы происходила активация онкогенной JNK киназы посредством фосфорилирования триптофана в 183 и тирозина в 185 положении, а также триптофана в 221 и тирозина в 223 положении (Рис. 15Е). Кроме того, закисление внешней среды приводило к инактивации негативного регулятора PI3K/AKT/mTOR пути PTEN посредством его фосфорилирования по серину в положении 380 (Рис. 15Е). Также, активировались митогенные и про-миграционные серин-треониновые киназы AKT и mTOR, однако, при этом не происходило активации про-онкогенной киназы ERK (Рис. 15Е). Отсутствие активации ERK может быть связано с тем, что эта киназа уже активирована в клетках метастатической меланомы [166]. Как JNK, так и PI3K/AKT/mTOR сигнальный путь запускают в опухолевых клетках транскрипцию циклина D1 и активируют циклин-зависимую киназу CDK4 [167,168], что приводит к ингибированию белка ретинобластомы Rb гиперфосфорилированием, что приводит к инициации синтеза ДНК в клетках и прохождению ими клеточного цикла [169]. Кроме того, PI3K/AKT/mTOR путь также ингибирует экспрессию E-кадгерина [170], что увеличивает подвижность и миграцию клеток опухоли (Рис. 15Ж). Интересно и то, что PI3K/AKT/mTOR ограничивает активность JNK [171], таким образом в опухолевых клетках при закислении среды устанавливается баланс между активностью этих митогенных сигнальных каскадов.

Итак, в опухолевых, но не нормальных клетках при падении pH внешней среды происходит открытие протон-чувствительных ионных каналов, содержащих субъединицу ASIC1a, что приводит к активации в них митогенных и про-миграционных вторичных мессенджеров, таких как JNK и PI3K/AKT/mTOR пути, но не ERK.

3.1.3. В опухолевых, но не нормальных клетках, формируется положительная обратная связь между активацией ионных каналов, содержащих ASIC1a, и поверхностной экспрессией сенсоров протонов.

Активация митогенных и про-миграционных внутриклеточных сигнальных мессенджеров в опухолевых клетках при открытии протон-чувствительных каналов может свидетельствовать об адаптации клеток неоплазий к агрессивному микроокружению,

поэтому для выяснения механизмов такой адаптации был проведен сравнительный анализ влияния закисления внешней среды на уровень поверхностной экспрессии сенсоров протонов в нормальных и опухолевых клетках. Посредством проточной цитофлуориметрии было показано, что падение рН внешней среды с $\sim 7,4$ до $\sim 6,5$ приводит к значительному увеличению экспрессии на поверхности опухолевых клеток ASIC1a, а также α -ENaC и γ -ENaC (Рис. 16А-В).

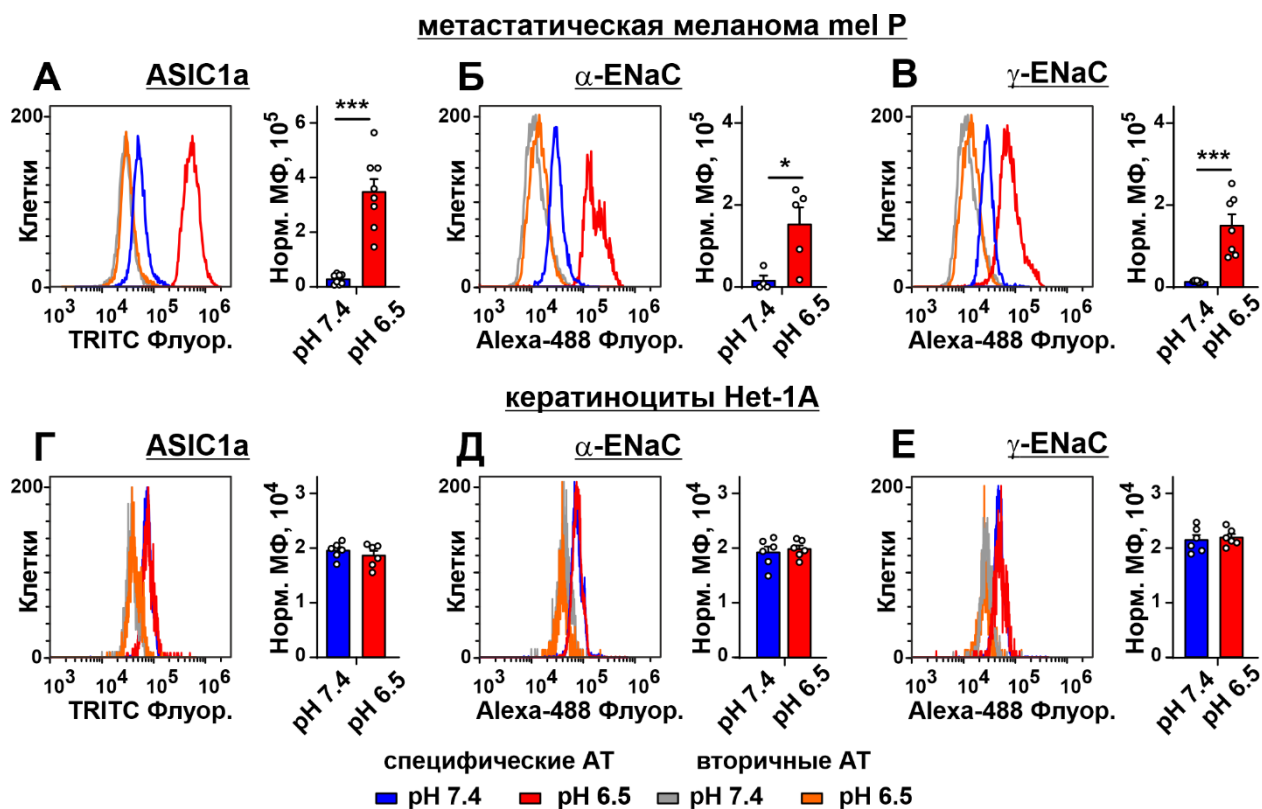


Рис. 16. Анализ влияния закисления внешней среды на поверхностную экспрессию ASIC1a (А, Г), α -ENaC (Б, Д) и γ -ENaC (В, Е) в клетках mel P (А-В) и Het-1A (Г-Е). * ($p < 0,05$) и *** ($p < 0,001$) означают отличие между группами данных согласно двустороннему t-тесту.

При этом, закисление внешней среды не приводило к изменению экспрессии ASIC1a, а также α -ENaC и γ -ENaC в нормальных кератиноцитах Het-1A (Рис. 16Г-Е).

Ранее было показано, что закисление внешней среды приводит к увеличению экспрессии ASIC1 в клетках рака груди [172] и толстой кишки [173]. Интересно и то, что в промоторах генов ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC согласно базе данных Ominer [174] есть потенциальные сайты связывания транскрипционных факторов, NF-I и SP1, которые активируются JNK и PI3K/АКТ/mTOR сигнальными каскадами [175,176]. Это может свидетельствовать о том, что активация JNK и PI3K/АКТ/mTOR в опухолевых клетках

приводит к усилению транскрипции генов, кодирующих ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC, за счет активации транскрипционных факторов.

Полученные результаты свидетельствуют, что адаптация опухолевых, но не нормальных клеток к закислению внешней среды происходит за счет формирования положительной обратной связи между активацией ионных каналов, содержащих ASIC1a, и поверхностной экспрессией сенсоров протонов.

3.1.4. Активация протон-чувствительных каналов стимулирует рост и миграцию опухолевых, но не нормальных клеток

Закисление внешней среды запускало в опухолевых клетках митогенные и про-миграционные пути, поэтому мы изучили каково влияние падения pH на рост и миграцию опухолевых клеток различного происхождения. Падение pH внешней среды до $\sim 5,5$ само по себе не влияло на жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого A549 и легочных фибробластов WI-38, но значительно снижало пролиферацию первичных фибробластов HLF до $\sim 78\%$ относительно клеток, культивируемых при pH $\sim 7,4$ (Рис. 17А).

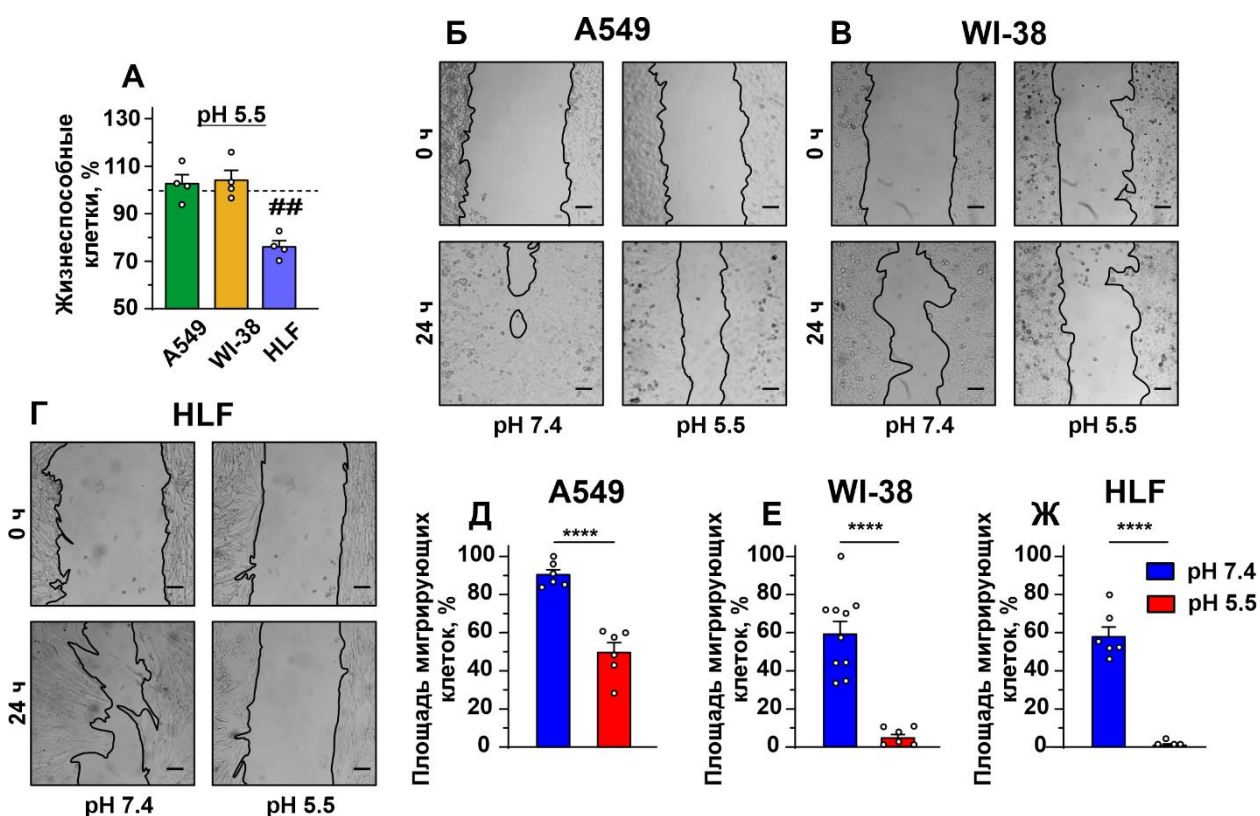


Рис. 17. Влияние закисления pH внешней среды с $\sim 7,4$ до $\sim 5,5$ на жизнеспособность и миграцию жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого A549, иммортализованных фибробластов WI-38 и первичных фибробластов легкого HLF. А – Влияние падения pH внешней среды на жизнеспособность клеток легких Данные нормированы на жизнеспособность клеток, культивируемых при pH 7,4 (штриховая линия) и представлены в виде $\% \pm SEM$ ($n = 4$). ## ($p < 0,01$) указывает на значительное

отличие от контрольных клеток согласно One-sample t-тесту. Б-Г – Репрезентативные изображения царапин для клеток A549 (Б), WI-38 (В) и HLF (Г), шкала = 100 мкм. Д-Ж – Площадь раны, занятая мигрирующими клетками A549 (Д), WI-38 (Е) и HLF (Ж). Данные представлены в виде % поверхности раны, занятой мигрирующими клетками \pm SEM ($n = 6$), **** ($p < 0,0001$) указывает на достоверное различие между группами данных по двустороннему тесту Уэлча.

Кроме того, подкисление среды значительно ингибировало миграцию клеток A549, WI-38 и HLF после 24 ч инкубации, наиболее заметен этот эффект был в клетках HLF, в которых нарушалась целостность монослоя (Рис. 17Б-Ж). Ингибирующий эффект закисления на миграцию клеток усиливался в ряду A549 < WI-38 < HLF. Однако, инкубация клеток A549 в течение 48 ч в кислых условиях восстанавливала миграционную активность клеток, что указывает на успешную адаптацию клеток к кислой среде. (см. далее, Рис. 26). Таким образом, закисление внешней среды ингибировало рост и миграцию нормальных фибробластов легкого, но не клеток аденокарциномы легкого A549, которые экспрессируют ASIC1a и α -ENaC.

Падение pH внешней среды до 6,5 в течение 96 часов не оказывало существенного влияния на жизнеспособность клеток метастатической меланомы mel P и нормальных кератиноцитов Het-1A (Рис. 18А).

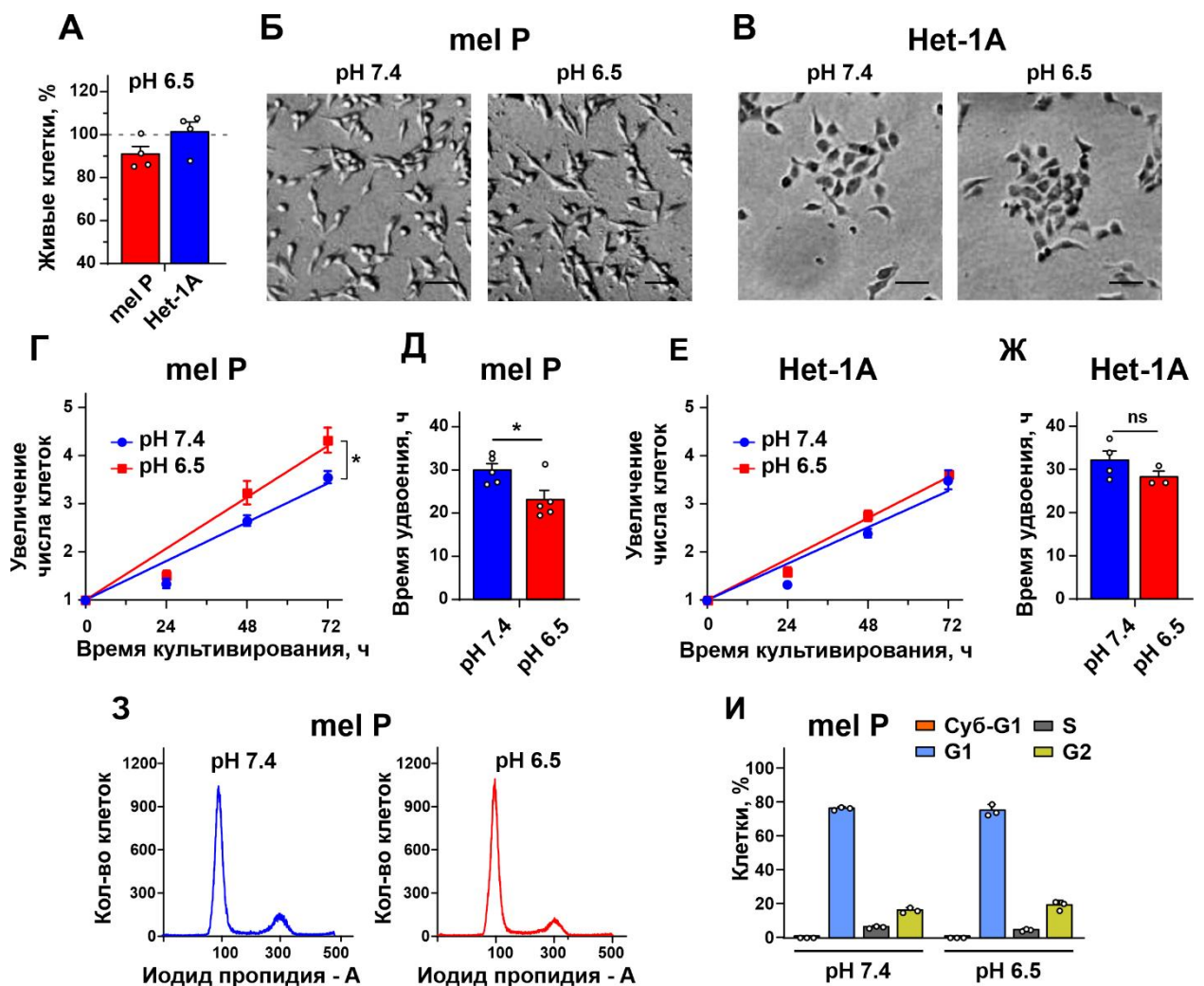


Рис. 18. Влияние закисления клеточной среды на рост и морфологию клеток метастатической меланомы *mel P* и кератиноцитов *Het-1A*. **А** – Влияние закисления клеточной среды на жизнеспособность клеток *mel P* и *Het-1A*. Данные нормированы на жизнеспособность клеток, культивируемых при рН 7,4 (штриховая линия) и представлены в виде % ± SEM (n = 4). **Б, В** – Влияние подкисления клеточной среды на морфологию клеток *mel P* (**Б**) и клеток *Het-1A* (**В**), шкала = 25 мкм; **Г** – Динамика роста клеток *mel P* при культивировании при рН 7,4 и 6,5 (n = 5). * (p < 0,05) указывает на достоверную разницу между наклонами линий регрессии по тесту ANCOVA. **Д** – Время удвоения клеток *mel P*, культивируемых при рН 7,4 и 6,5 (n = 5). * (p < 0,05) указывает на достоверное различие между группами данных по двустороннему t-тесту. **Е** – динамика роста кератиноцитов *Het-1A*, культивируемых при рН 7,4 и 6,5 (n = 3–4). **Ж** – Время удвоения кератиноцитов *Het-1A*, культивируемых при рН 7,4 и 6,5 (n = 3–4). **З** – Репрезентативное распределение популяции ядер клеток *mel P*, культивируемых при рН 7,4 и 6,5; **И** – % клеток в каждой фазе клеточного цикла. Данные представлены в виде % клеток в каждой фазе клеточного цикла ± SEM (n = 3).

Также 96-часовая инкубация клеток *mel P* и *Het-1A* в среде с рН ~ 6,5 не приводила к изменению морфологии клеток (Рис. 18Б,В). Однако, сравнение скорости роста клеток метастатической меланомы и нормальных кератиноцитов уже после 96-часовой адаптации показало, что рост клеток *mel P*, культивируемых при рН 6,5 после 96-часовой адаптации,

была значительно более быстрой по сравнению с клетками mel P, которые культивировали при pH 7,4 (Рис. 18Г). В соответствии с этим время удвоения клеток mel P в кислой среде было ниже примерно на 20% (Рис. 18Д). В отличие от клеток mel P, подкисление среды не влияло на параметры роста кератиноцитов Het-1A после 96-часовой адаптации к закислению (Рис. 18Е,Ж). 96-часовая инкубация клеток mel P в среде с pH ~ 6,5 также не приводила к изменению в прогрессии клеточного цикла клетками метастатической меланомы (Рис. 18З,И).

Анализ миграции клеток посредством теста на застывание раны показал, что подкисление среды значительно увеличивает миграцию клеток mel P, но не кератиноцитов Het-1A (Рис. 19А,Б). Следует отметить, что клетки Het-1A в целом были менее подвижны, чем клетки mel P (Рис. 19А,Б).

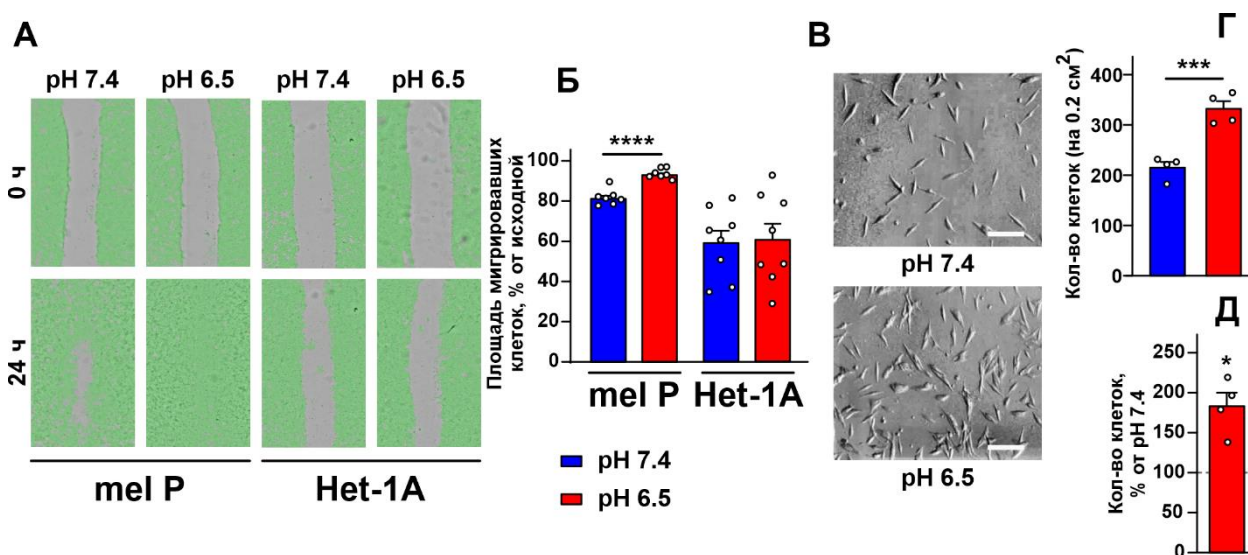


Рис. 19. Влияние подкисления клеточной среды на миграцию и инвазию клеток mel P и Het-1A. А – Репрезентативные изображения ран в монослое клеток mel P и Het-1A, инкубированных при pH 7,4 и 6,5. Б – Площадь царапины, занимаемая мигрирующими клетками mel P и Het-1A. Данные представлены в виде % площади царапины, занятой мигрирующими клетками \pm SEM (n = 7–8), *** (p < 0,001) указывает на достоверное различие между группами данных по двустороннему t-тесту. В – Репрезентативные фазово-контрастные изображения, показывающие клетки mel P, мигрировавшие через 8 мкм поры на дне миграционной камеры при культивировании в среде с pH 7, 4 и 6, 5 (увеличение \times 100, шкала = 20 мкм). Г – Количество клеток mel P, мигрировавших через поры в дне миграционной камеры при культивировании в среде с pH 7,4 и 6,5. Данные представлены как число клеток на $0,2 \text{ см}^2 \pm$ SEM (n = 4). *** (p < 0,001) указывает на достоверное различие между группами данных по двустороннему t-тесту. Д – Количество мигрировавших клеток mel P, культивируемых при pH 6,5, нормализованное к количеству мигрировавших клеток, культивируемых при pH 7,4 (пунктирная линия), согласно WST-1 тесту. Данные представляют собой нормализованное число клеток \pm SEM (n = 4). * (p < 0,05) указывает на значимое отличие от контроля по One-sample t-тесту.

Тест на инвазию клеток с использованием миграционных камер с порами 8 мкм показал, что падение рН внешней среды с ~ 7,4 до ~ 6,5 приводило к увеличению числа клеток *mel P*, мигрировавших через мембрану (Рис. 19В,Г), что также было подтверждено тестом WST-1 (Рис. 19Д).

Закисление внешней среды ингибирует жизнеспособность клеток и вызывает арест клеточного цикла, а также приводит к изменению морфологии клеток первичной меланомы A375 на более стволовую [33], но стимулирует рост, миграцию и инвазию рака молочной железы, легких и печени, а также высокоинвазивной меланомы C8161 и неинвазивной меланомы A375P [30,32,60,115,146,177]. Отсутствие влияния 96-часового закисления среды клеток *mel P* на их рост, миграцию и клеточный цикл свидетельствует об изначально хорошей адаптации клеток метастатической меланомы *mel P* к кислой среде.

Таким образом, усиление роста, миграции и инвазии опухолевых, но не нормальных клеток связано с выработкой в них специфического адаптационного механизма, включающего в себя открытие каналов, содержащих ASIC1a, активацию митогенных сигнальных путей и формирование в клетках положительной обратной связи между активностью содержащих ASIC1a протонных каналов и экспрессией сенсоров протонов на поверхности клеток. Схема данного механизма приведена на Рис. 20.

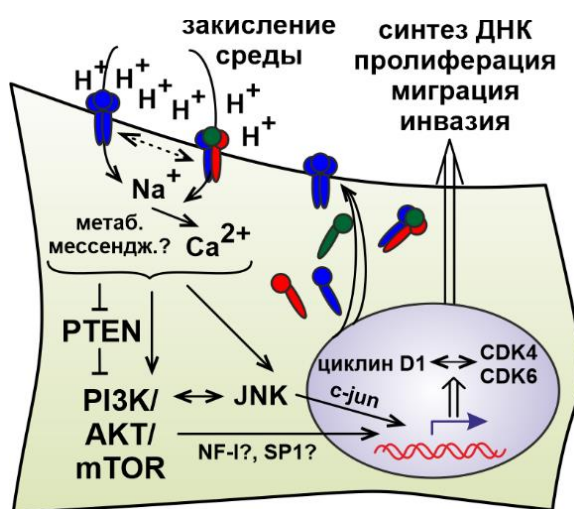


Рис. 20. Молекулярный механизм, запускаемый в опухолевых, но не нормальных клетках, при падении внешнего рН. Падение внешнего рН запускает в опухолевых клетках открытие протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a, активирует в злокачественно-трансформированных клетках митогенные и про-миграционные сигнальные пути JNK и PI3K/AKT/mTOR, а также увеличивает поверхностную экспрессию сенсоров протонов, что приводит к формированию положительной обратной связи между закислением среды и ответом на это клетками.

3.2. Молекулярные механизмы ингибирования протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a

3.2.1. Мамбалгин-2 ингибирует активность ASIC1a в ооцитах *Xenopus* и в опухолевых клетках различного происхождения

Как было сказано ранее, трехпетельный белок мамбалгин-2 из яда черной мамбы *Dendroaspis polylepis* является наиболее селективным и эффективным ингибитором каналов, содержащих ASIC1a [151]. Ранее, посредством гетерологичной экспрессии в *E. coli*, был получен рекомбинантный аналог мамбалгина-2 [155]. Активность мамбалгина-2 была проверена с помощью метода двухэлектродной фиксации потенциала на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих крысиный ASIC1a. Рекомбинантный мамбалгин-2 значительно ингибировал транзистентные катионные токи через ASIC1a при pH 5,5 (Рис. 21А). Ингибирование токов было обратимым, так как после отмывки мамбалгина-2 показатели ответа ооцита на падение pH внешней среды полностью восстанавливались. Мамбалгин-2 в концентрациях >1 μM также полностью ингибировал токи ASIC1a при pH 5,5. Ингибирующий эффект мамбалгина-2 был концентрационно-зависимым, с полумаксимальной ингибирующей концентрацией IC_{50} в 142 ± 12 нМ (Рис. 21Б).

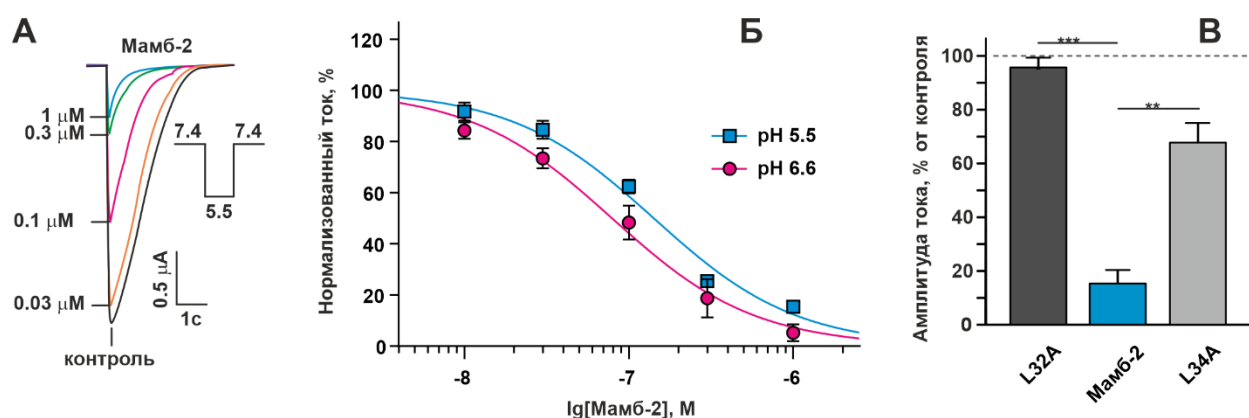


Рис. 21. Влияние рекомбинантного мамбалгина-2 на крысиный ASIC1a, экспрессированный в ооцитах *Xenopus laevis*. А – Репрезентативные ответы, зарегистрированные в отсутствие мамбалгина-2 (контроль) или в присутствии разных концентраций мамбалгина-2, индуцированные изменением pH буфера с 7,4 до 5,5. Б – Кривые ингибирования «доза-ответ» для ASIC1a крысы мамбалгином-2. Согласно уравнению Хилла с IC_{50} 142 ± 12 нМ при падении pH внешней среды до 5,5 ($n = 6$) и 79 ± 9 нМ при падении pH внешней среды до 6,6 ($n = 8$), коэффициент Хилла принимался равным 1,0. Данные представлены в % от контроля (без мамбалгина-2) \pm SEM. В – Сравнение пиковой амплитуды транзистентных токов через крысиные ASIC1a при падении pH внешней среды до 5,5 при инкубации ооцитов с 1 μM мамбалгина-2 или с вариантами,

в которых сделаны замены Leu32Ala и Leu34Ala. Данные представлены в виде нормализованной амплитуды пикового тока, % от контроля \pm SEM ($n = 6$). Контрольный уровень (100%) показан пунктирной линией. ** ($p < 0,01$) и *** ($p < 0,0001$) указывают на значительную разницу между группами данных в соответствии с One-way ANOVA с последующим тестом Dunnett.

Мутантные варианты мамбалгина-2 с аланиновыми заменами остатков Leu32 и Leu34, важных для взаимодействия токсина с ASIC1a [150,154], показали значительно более низкую ингибирующую активность белка по отношению к ASIC1a. Мамбалгин-2 в концентрации 1 μ M ингибировал транзиентный ток через ASIC1a при закислении среды до ~16% от контроля, тогда как мутанты Leu32Ala и Leu34Ala до ~96% и ~69% соответственно (Рис. 21В). Полученные результаты указывают на то, что рекомбинантный аналог мамбалгина-2 демонстрирует ингибирующую активность ASIC1a, близкую к нативному токсину, выделенному из яда *Dendroaspis polylepis* [152].

Также, посредством технологии пэтч-кламп с отведением сигнала от целой клетки, была проанализирована ингибирующая активность мамбалгина-2 на опосредованные открытием каналов, содержащих ASIC1a, входящие катионные токи в клетках. Инкубация клеток глиомы U252 MG с 1,5 μ M мамбалгина-2 (концентрация, при которой токсин ингибирует каналы ASIC1a, экспрессируемые в ооцитах *X. laevis*, до ~8%, Рис. 20Б) приводила к значительному ингибированию вызванных закислением среды до катионных токов (Рис. 15А). Инкубация клеток хронической миелогенной лейкемии K562 с 1 μ M мамбалгина-2, так же, как и для клеток глиом, блокировала катионные токи, вызванные закислением внешней среды (Рис. 15Б). Кроме того, добавление 1 μ M мамбалгина-2 к внеклеточному раствору полностью ингибировало активность каналов при pH 5,5 в клетках карциномы легкого A549 и в иммортализованных фибробластах, экспрессирующих ASIC1a (Рис. 15В,Г). Следует отметить, что так как нормальные фибробласты легкого HLF не экспрессируют ASIC1a, для них нехарактерен входящий ток катионов, активируемый при закислении внешней среды (Рис. 15Д).

Таким образом, рекомбинантный мамбалгин-2 ингибирует ток через каналы ASIC1a с той же эффективностью, что и природный белок. Рекомбинантный мамбалгин-2 избирательно ингибирует входящий катионный ток в клетках, которые экспрессируют функциональные ASIC1a-содержащие каналы.

3.2.2. Блокирование входящих протон-чувствительных токов мамбалгином-2 тормозит рост различных опухолевых клеток при закислении внешней среды

Для того, чтобы выяснить, как опухолевые клетки будут вести себя при блокаде адаптационного механизма к закислению внешней среды мы использовали мамбалгин-2 в

качестве ингибитора ASIC1a и исследовали его влияние на пролиферацию клеток мозга (глиомы U251 MG, глиобластомы A172 и нормальных астроцитов), хронической миелогенной лейкемии (клетки K562), клеток легкого (аденокарциномы человека A549 и мышцы Lewis и их метастатической подлинии P29, а также легочных фибробластов: иммортализованных WI-38 и первичных HLF) и клеток кожи (метастатической меланомы mel P и нормальных кератиноцитов Het-1A).

Тест на жизнеспособность MTT показал, что 1 μ M мамбалгина-2 снижал пролиферацию клеток глиомы U251 MG и глиобластомы A172, причем это снижение становилось значимым для обеих клеточных линий уже через 48 часов инкубации (Рис. 22А). Максимальный ингибирующий эффект (до ~60% по сравнению с необработанными клетками) достигался при 72-часовой инкубации (Рис. 22А). В то же время мамбалгин-2 не влиял на рост нормальных астроцитов человека (Рис. 22А,Е).

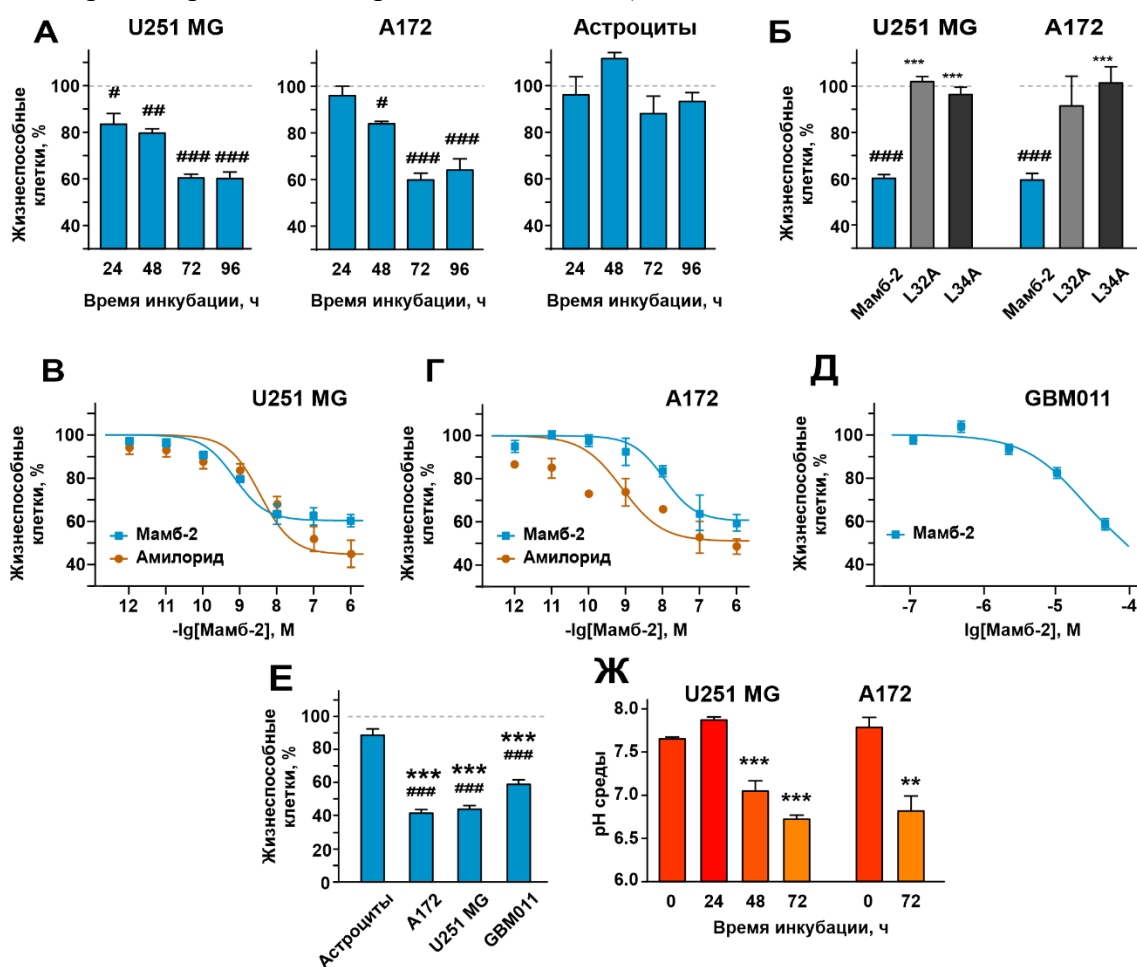


Рис. 22. Влияние мамбалгина-2 на рост клеток глиомы U251 MG, глиобластомы A172, первичной глиобластомы пациента GBM011, а также нормальных астроцитов. А – Влияние 1 μ M мамбалгина-2 на пролиферацию клеток U251 MG, A172 и астроцитов при различном времени инкубации. Данные представлены в % от контроля (необработанные клетки, пунктирная линия) \pm SEM (n = 4). # (p < 0,05), ## (p < 0,01) и ### (p < 0,001) указывают на значительное отличие от контроля в соответствии с One-way

ANOVA с последующим Dunnet тестом. Б – Влияние 1 μM мамбалгина-2 и его мутантов Leu32Ala и Leu34Ala на пролиферацию клеток U251 MG и A172 при 72-часовой инкубации. Данные представлены в % от контроля (необработанные клетки, пунктирная линия) \pm SEM (n = 4). ### (p < 0,001) указывает на значительное отличие от контроля в соответствии с One-way ANOVA с последующим Dunnet тестом. *** (p < 0,001) указывает на достоверное различие в активности мутантов и мамбалгина-2 по данным One-way ANOVA с последующим Dunnet тестом. В, Г, Д – Влияние различных концентраций мамбалгина-2 и амилорида на рост клеток U251 MG (В), A172 (Г) и GBM011 (Д) в течение 72 ч инкубации. Параметры, описывающие кривые «концентрация-эффект» (EC₅₀, A₁), приведены в таблице 5. Данные представлены в виде % от контроля (необработанные клетки) \pm SEM (n = 3–11). Е – Сравнительный анализ влияния 50 μM мамбалгина-2 на рост нормальных астроцитов и опухолевых клеток мозга. Данные представлены в % от контроля (необработанные клетки, пунктирная линия) \pm SEM (n = 4). ## (p < 0,01) и ### (p < 0,001) указывают на значительное отличие от контроля в соответствии с One-way ANOVA с последующим Dunnet тестом. *** (p < 0,001) указывает на достоверное различие мамбалгина-2 по сравнению с действием белка на астроциты согласно One-way ANOVA с последующим Dunnet тестом. Ж – анализ pH культуральной среды при длительном культивировании клеток U251 MG и A172 (n = 4). ** (p < 0,01) и *** (p < 0,001) указывают на значительное отличие от значения pH культуральной среды в начальный момент времени в соответствии с двусторонним t-тестом.

Мамбалгин-2 ингибировал жизнеспособность клеток U251 MG, A172 и GBM011 при 72-часовой инкубации с полумаксимальными эффективными концентрациями в наномолярном диапазоне для клеток U251 MG, A172 и в микромолярном диапазоне для первичных клеток глиобластомы GBM011 (Рис. 22В,Г,Д, Табл. 6). Сравнение действия мамбалгина-2 с действием амилорида показало, что антипролиферативная активность мамбалгина-2 на клетках A172 была слабее, чем у амилорида, а на клетках U251 MG и амилорид, и мамбалгин-2 ингибировали рост клеток с сопоставимой эффективностью (Рис. 22В,Г, Табл. 6).

Таблица 6.

Параметры, описывающие эффект мамбалгина-2 и амилорида на пролиферацию опухолевых клеток различного происхождения.

Клетки	Изнач. pH	Амилорид		Мамбалгин-2	
		A ₁ , %	EC ₅₀ , нМ	A ₁ , %	EC ₅₀ , нМ
U251 MG	7,4	44,84 \pm 4,0	3,6 \pm 0,2	61,78 \pm 1,4	0,5 \pm 0,2
A172		48,06 \pm 4,6	0,8 \pm 0,02	60,15 \pm 3,0	10 \pm 1,6
GBM011		--	--		
K562		55,4 \pm 3,6	--	68,20 \pm 5,8	179,9 \pm 20,8

A549		--	--	76,02 ± 2,0	9,29 ± 0,9
	5,5	--	--	74,82 ± 1,8	0,59 ± 0,1
WI-38		--	--	64,68 ± 5,7	276,5 ± 14,3
Lewis P29		--	--	53,43 ± 3,5	17470 ± 5300
Mel P	6,5	--	--	51,40 ± 2,3	37,3 ± 1,3
Het-1A		--	--	55,40 ± 6,2	1009 ± 170

Для выявления молекулярной мишени мамбалгина-2 в клетках U251 MG и A172 использовали варианты мамбалгина-2 с мутациями Leu32Ala и Leu34Ala со сниженной ингибирующей активностью в отношении ASIC1a. Как и ожидалось, оба мутанта не влияли на пролиферацию клеток U251 MG и A172 (Рис. 22Б), что указывает на ASIC1a как на первичную мишень мамбалгина-2 в клетках глиомы и глиобластомы. Для того, чтобы понять почему мамбалгин-2 ингибировал рост клеток U251 MG и A172, если их изначально высевали при pH 7,4, было проведено измерение pH культуральной среды и выявлено, что культивирование клеток U251 MG и A172 в течение длительного времени приводит к значительному закислению клеточных сред, достигающему значения pH ~6,7 через 72 ч культивирования (Рис. 22Ж), что соответствует pH окружения глиом [4,5].

Для клеток хронической миелогенной лейкемии K562, так же как и для клеток U251 и A172 было характерно закисление внешней среды при 72-часовой инкубации до pH ~ 6,5 (Рис. 22А), а инкубация клеток с мамбалгином-2 в течение 72 ч приводила к сокращению числа жизнеспособных клеток до ~ 70 % по сравнению с необработанными клетками (Рис. 23Б, Табл. 6).

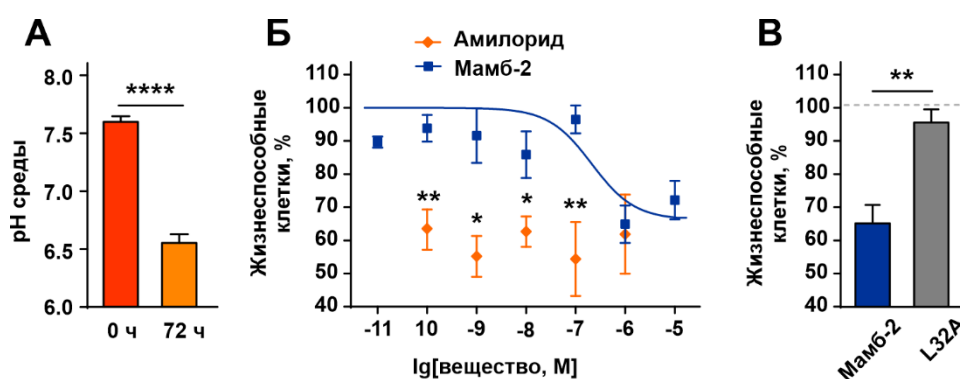


Рис. 23. Влияние мамбалгина-2 на рост клеток K562. А – Изменение pH среды при инкубации клеток в течение 72 часов. Данные приведены как значения pH ± SEM (n = 3); **** (p < 0.0001) указывает на разницу между группами данных согласно двустороннему t-тесту. **Б – Влияние различных концентраций мамбалгина-2 на пролиферацию клеток.** Данные приведены как % от контроля (необработанные клетки) ± SEM (n = 3–6). * (p < 0.05) и ** (p < 0.01) означает различие между группами данных

согласно двустороннему t-тесту. Параметры, описывающие кривые «концентрация-эффект» (EC_{50} , A_1) приведены в таблице 6. В – антипролиферативная активность 1 μ M мамбалгина-2 и его мутантного варианта Leu32A1a. Данные приведены как % от контроля (необработанные клетки, пунктирная линия) \pm SEM (n = 3); ** (p<0.01) означает различие между группами данных согласно двустороннему t-тесту

Мутантный вариант мамбалгина-2, не связывающийся с ASIC1a, как и в случае клеток опухолей мозга, не обладал антипролиферативной активностью на клетках K562 (Рис. 23В).

Мамбалгин-2 снижал пролиферацию клеток A549, культивируемых как при pH 7,4, так и при pH 5,5, до ~75% от контроля (необработанные клетки) после 72-часовой инкубации, при этом полумаксимальная эффективная концентрация белка находилась в наномолярном диапазоне (Рис. 24А, Табл. 6). Максимальное антипролиферативное действие мамбалгина-2 на клетки A549 наблюдалось при концентрации 1 μ M (Рис. 23А). Мамбалгин-2 не влиял на рост аденокарциномы легкого Lewis, которые не экспрессируют ASIC1a (Рис. 11В) как при pH 7,4, так и при pH 5,5, однако, тормозил рост метастатической подлинии Lewis P29 (Рис. 24Б). Мамбалгин-2 не влиял на жизнеспособность фибробластов WI-38, культивируемых в нормальных средах до концентрации 1 μ M, но подавлял их рост до ~65% при культивировании в кислой среде с EC_{50} значительно выше, чем у клеток A549 (Рис. 24В, Табл. 6). Примечательно, что не наблюдалось значительного влияния мамбалгина-2 на рост фибробластов HLF, культивируемых как при pH 7,4, так и при 5,5 (Рис. 24Г).

Следует отметить, что поведение клеток в монослое значительно отличается от поведения клеток в объемных опухолях, что связано с межклеточными взаимодействиями, различиями в pH и разным уровнем экспрессии молекул, ответственных за пролиферацию клеток внутри и вне опухоли [178]. Более того, сигнальные пути, обеспечивающие пролиферацию и миграцию опухолевых клеток могут различаться в монослое и объемных опухолях, что приводит к развитию резистентности к химиотерапевтическим веществам [179], поэтому антипролиферативная активность мамбалгина-2 на аденокарциноме легкого была также проверена с использованием многоклеточных сфероидов из клеток A5493 как 3D модели опухолей. Анализ сфероидов при их окрашивании трипановым синим показал, что в отсутствие мамбалгина-2 сфероиды состоят из жизнеспособных, не проницаемых для красителя клеток, но клетки сфероидов после 24-часовой инкубации с 1 μ M мамбалгина-2, потеряли целостность мембраны и стали проницаемыми для трипанового синего (Рис. 24Д). Анализ жизнеспособности сфероидов при помощи теста WST-1 подтвердил, что мамбалгин-2 ингибировал жизнеспособность клеток в сфероидах до ~37% по сравнению с

необработанными сфероиды (Рис. 24Е). Избирательность действия мамбалгина-2, при которой белок действует только на клетки опухолей мозга и легкого, но не нормальные клетки соотносится с разным спектром субъединиц каналов, экспрессируемых в опухолевых и нормальных клетках – опухолевые клетки экспрессируют мРНК ASIC1a, в то время как для нормальных клеток не характерно ни наличие мРНК этой субъединицы, ни входящий ток, опосредованный каналами ASIC1a.

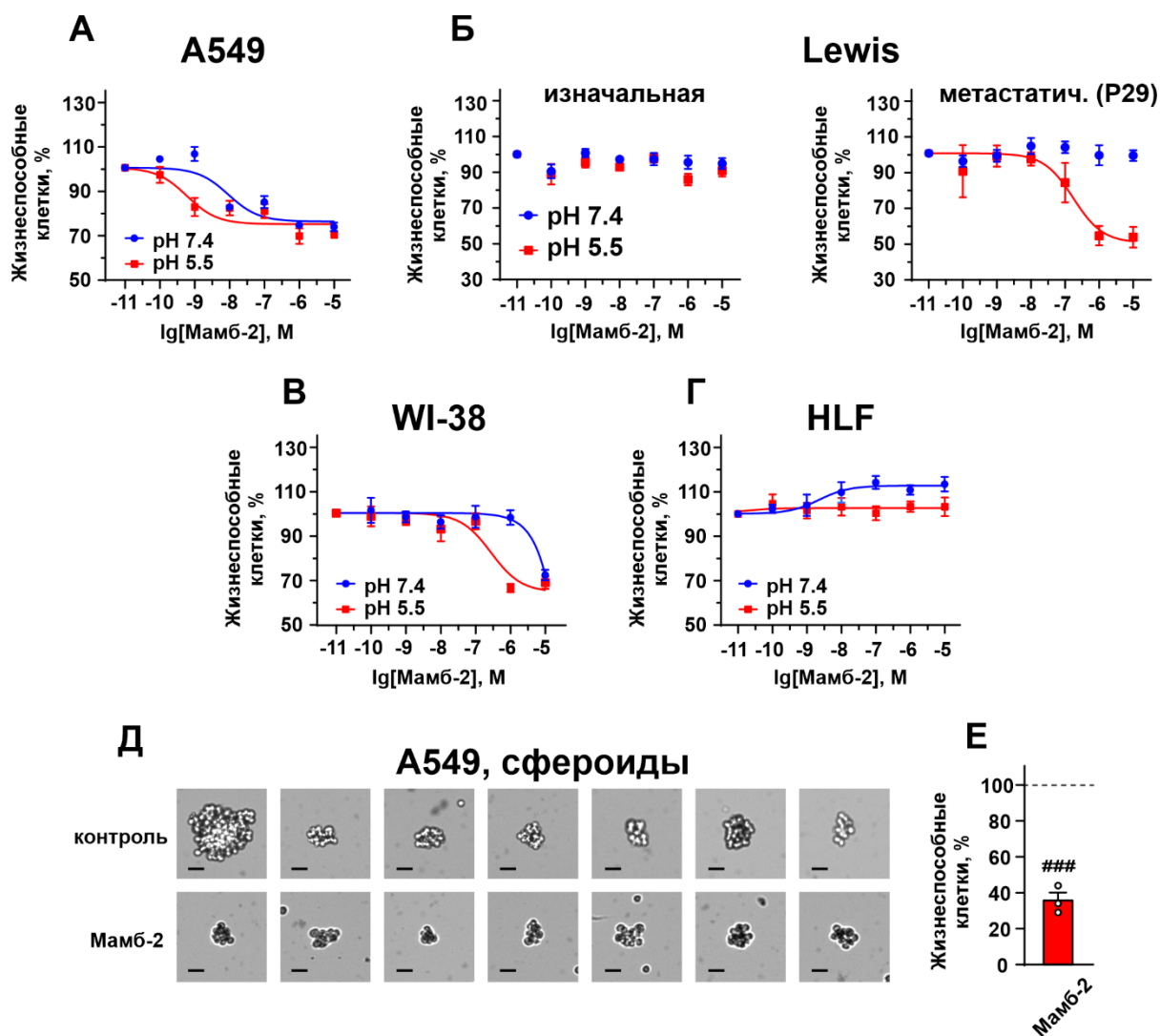


Рис. 24. Влияние мамбалгина-2 на жизнеспособность клеток легкого. А-Г – Анализ действия различных концентраций мамбалгина-2 на жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого человека А549 (А), аденокарциномы легкого мыши Lewis и их метастатической подлинии P29 (Б, левая и правая панели, соответственно), а также иммортализованных легочных фибробластов WI-38 (В) и первичных фибробластов легкого HLF (Г). Клетки культивировали при pH 7,4 и при pH 5,5. Данные представлены в % от контроля (необработанные клетки) ± SEM (n = 4). Параметры, описывающие кривые «концентрация-эффект» (EC₅₀, A₁) приведены в таблице 6. Д – Примеры сфероидов, из клеток А549, инкубированных в отсутствие или в присутствии 1 μМ мамбалгина-2 после окрашивания трипановым синим, шкала 25 мкм. Е – Влияние 1 μМ мамбалгина-2 на жизнеспособность сфероидов, реконструированных из клеток А549.

Данные представлены в % от контроля (необработанные сфероиды) \pm SEM (n = 3). ### (p < 0,001) указывает на разницу между необработанными и обработанными сфероидами согласно One-sample t-тесту.

Первичные фибробласты легких при этом не экспрессируют и мРНК, кодирующую α -ENaC. Аналогичная ситуация наблюдается и в клетках Lewis: изначальные клетки Lewis, устойчивые к мамбалгину-2, не экспрессируют ASIC1a, в то время как клетки метастатической подлинки P29, чувствительные к мамбалгину-2, экспрессируют ASIC1a в очень больших количествах. Однако, мамбалгин-2 также и ингибировал рост иммортализованных фибробластов WI-38, которые экспрессируют ASIC1a на уровне мРНК и функционально-активного канала. Наличие в клетках ASIC1a в клетках WI-38 можно объяснить тем, что они трансформируются вирусом SV40 для увеличения возможного числа пассажей. Эта трансформация может привести к появлению туморогенности за счет инактивации опухолесупрессирующих клеток. белки p53 и Rb, важные для контроля клеточного цикла в эпителиальных клетках [180]. Таким образом, эта клеточная линия занимает «промежуточное» между нормальными и опухолевыми клетками положение, разделяя некоторые свойства раковых и нормальных клеток.

Мамбалгин-2 снижал пролиферацию как клеток метастатической меланомы mel P, так и нормальных кератиноцитов кожи Het-1A, культивируемых при pH 6,5, примерно наполовину относительно контроля, но с разной EC₅₀ – если для клеток метастатической меланомы mel P она составляла ~ 40 нМ, то для кератиноцитов Het-1A уже ~ 1 μ M (Рис. 25А, Табл. 6). В результате, максимальное ингибирующее действие мамбалгина-2 на клетки mel P наблюдалось при концентрации 1 μ M, тогда как максимальное ингибирующее действие токсина на кератиноциты Het-1A наблюдалось при концентрациях значительно более 10 μ M. Это свидетельствует о наличии «фармакологического окна» – диапазона концентраций, при котором мамбалгин-2 ингибирует рост опухолевых клеток, не влияя на пролиферацию нормальных.

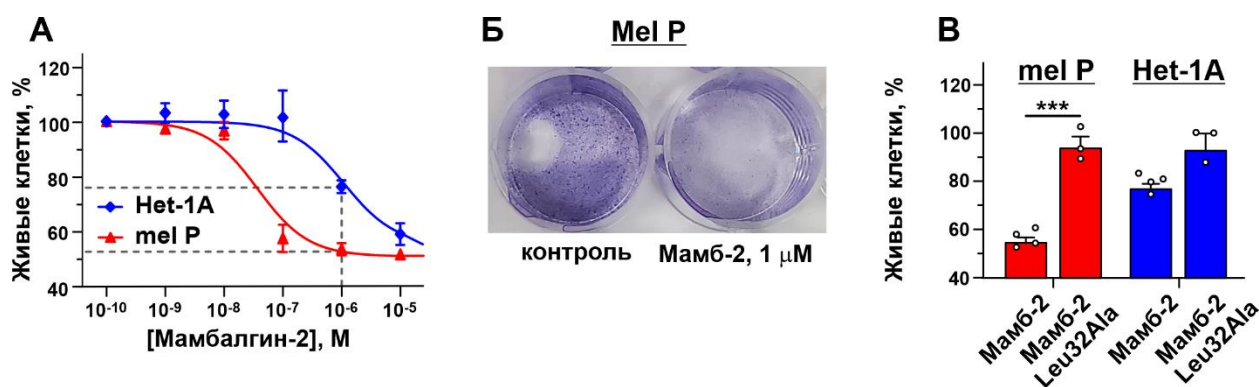


Рис. 25. Влияние мамбалгина-2 на рост клеток метастатической меланомы кожи mel P и нормальных кератиноцитов кожи Het-1A. А – Влияние различных концентраций мамбалгина-2 на клетки Het-1A и mel P, культивируемые при pH 6,5. Параметры, описывающие кривые «концентрация-эффект» (EC₅₀, A₁) приведены в таблице 6. Данные представлены в % от контроля (необработанные клетки) ± SEM (n = 4). Разница между EC₅₀ действия мамбалгина-2 на клетки mel P и Het-1A статистически значима по F-тесту (p < 0,001, n = 4). Б – Изображение, иллюстрирующее образование колоний клетками mel P в отсутствие (контроль) или в присутствии 1 μM мамбалгина-2 согласно анализу кристаллического фиолетового. В – Влияние 1 μM мамбалгина-2 и его мутанта Leu32Ala на пролиферацию клеток mel P и Het-1A. Данные представлены в % от контроля (необработанные клетки, пунктирная линия) ± SEM (n = 3–4). *** (p < 0,001) указывает на достоверное различие активности мутанта и мамбалгина-2 по двустороннему t-тесту.

Анализ формирования колоний клетками mel P при их окрашивании кристаллическим фиолетовым показал, что мамбалгин-2 значительно ингибировал рост клеток (Рис. 25Б). Мутантный вариант мамбалгина-2 Leu32Ala, как и в случае с клетками опухолей мозга и лейкемии, не обладал антипролиферативной активностью ни на клетках метастатической меланомы mel P, ни на кератиноцитах Het-1A (Рис. 25В).

Таким образом, мамбалгин-2 ингибирует рост клеток глиомы, глиобластомы, лейкемии, аденокарциномы легкого, метастатической меланомы кожи, а также иммортализованных легочных фибробластов и нормальных кератиноцитов, если они экспрессируют функционально-активные каналы, содержащие ASIC1a. Тот факт, что мутантный вариант со сниженной способностью связываться с ASIC1a, не влиял на пролиферацию клеток глиомы, глиобластомы, миелогенной лейкемии, а также метастатической меланомы свидетельствует о том, что функциональным эпитопом мамбалгина-2, является центральная петля белка, а точнее, ее гидрофобный участок, содержащий лейцины в 32 и 34 положениях белка. Именно связывание гидрофобного участка центральной петли мамбалгина-2 с α5-спиралью thumb-домена ASIC1a определяет его антипролиферативные свойства.

3.2.3. Мамбалгин-2 тормозит миграцию опухолевых клеток при закислении внешней среды

Так как закисление внешней среды приводит к усилению миграции опухолевых клеток различного происхождения, было проанализировано влияние ингибирования ASIC1a при помощи мамбалгина-2 на подвижность и инвазию клеток аденокарцином легкого человека и мыши A549 и P29, а также клеток метастатической меланомы mel P.

Инкубация клеток аденокарциномы легкого A549 с 1 μM мамбалгина-2 при pH среды ~ 7,4 не влияла на подвижность клеток в тесте на застывание раны (Рис. 26А,В). Однако мамбалгин-2 тормозил миграцию клеток A549 при pH среды ~ 6,5 (Рис. 26Б,В). Как было

отмечено ранее, падение рН среды до 5,5 тормозило миграцию клеток А549 в течение 24 часов, но более длительная – 48-часовая – инкубация клеток в среде с низким рН приводила к их адаптации к закислению и восстановлению подвижности (Рис. 26).

Как и в случае с аденокарциномы легкого человека, 1 μ М мамбалгина-2 тормозил миграцию клеток Lewis P29, причем только при рН 5,5, но не при рН 7,4 (Рис. 27).

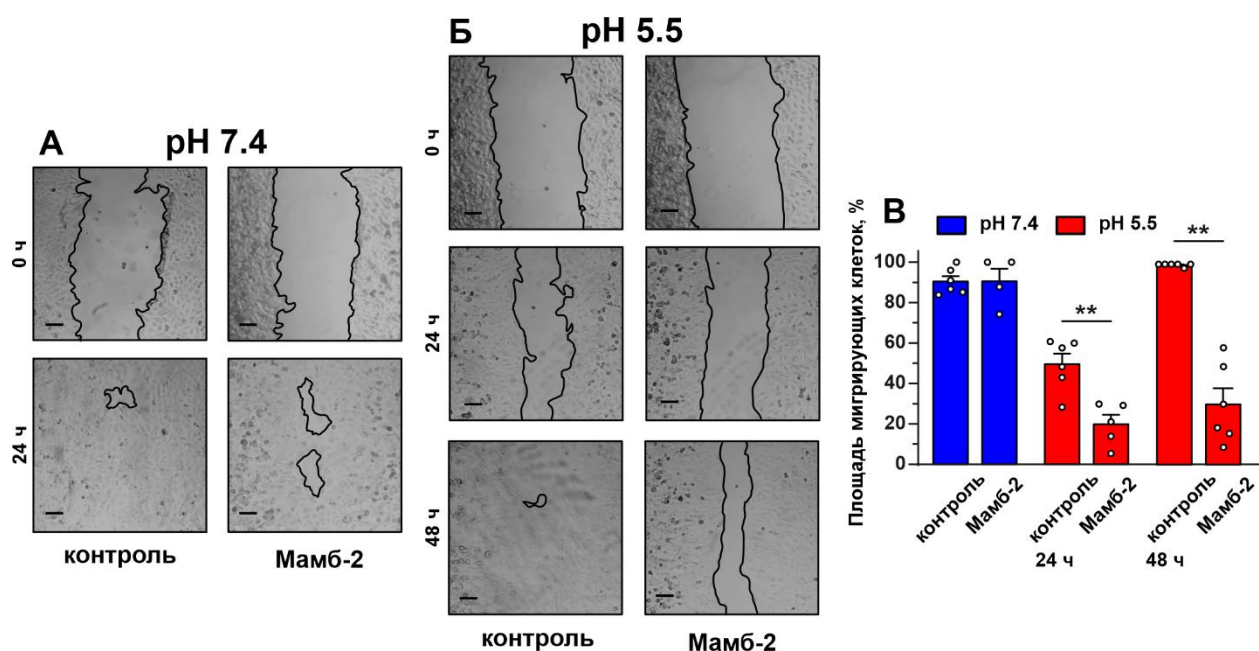


Рис. 26. Влияние мамбалгина-2 на миграцию клеток А549, культивируемых при рН 7,4 и 5,5. А, Б – Репрезентативные изображения ран для клеток А549, инкубированных при рН 7,4 (А) и при рН 5,5 (Б) в отсутствие или в присутствии 1 μ М мамбалгина-2. Клетки инкубировали с мамбалгином-2 при рН 7,4 в течение 24 часов и при рН 5,5 в течение 24 и 48 часов. Шкала 100 мкм. В – Площадь раны, занятая мигрирующими клетками А549. Данные представлены в виде % поверхности раны, занятой мигрирующими клетками \pm SEM (n = 6), ** (p < 0,01) указывает на достоверное различие между группами данных по двустороннему t-тесту.

Мамбалгин-2 также влиял на миграцию клеток mel P, причем если 1 μ М мамбалгина-2 не влиял на подвижность клеток mel P, то белок в концентрации 10 μ М уменьшал площадь мигрирующих клеток более чем в 2 раза по сравнению с контролем (необработанные клетки, Рис. 28А,Б).

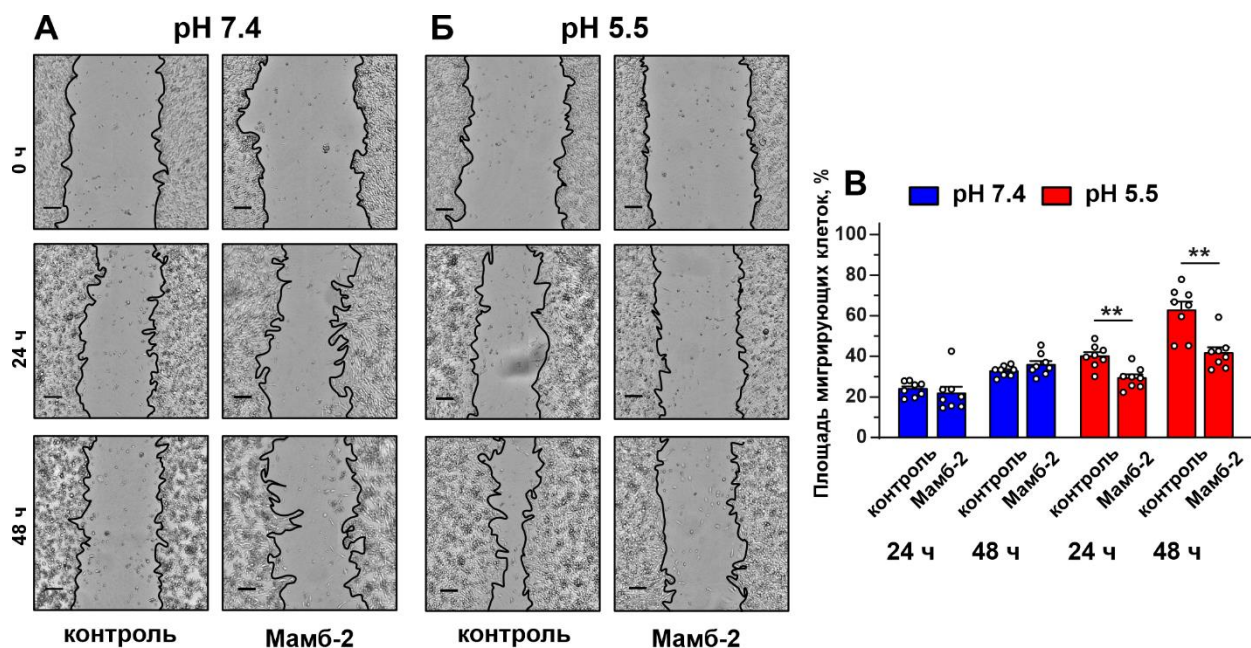


Рис. 27. Влияние мамбалгина-2 на миграцию клеток аденокарциномы легкого мыши Lewis P29, культивируемых при pH 7,4 и 5,5. А,Б – Репрезентативные изображения ран для метастатических клеток Lewis P29, инкубированных при pH 7,4 (А) и при pH 5,5 (Б) в отсутствие или в присутствии 1 μ М мамбалгина-2. Клетки инкубировали с мамбалгином-2 в течение 24 и 48 часов. Шкала 100 мкм. В – Площадь раны, занятая мигрирующими клетками Lewis P29. Данные представлены в виде % поверхности раны, занятой мигрирующими клетками \pm SEM (n = 8), ** (p<0,01) указывает на достоверное различие между группами данных по двустороннему t-тесту.

При этом, ни 1, ни 10 μ М мамбалгина-2 не влияли на миграцию кератиноцитов Нет-1А (Рис. 28А,Б). Тест на клеточную инвазию (проникновение клеток через мембрану с диаметром пор 8 мкм) показал, что 10 μ М мамбалгина-2 значительно снижало количество мигрировавших клеток (Рис. 28Г-Е), что также подтверждалось анализом WST-1 (Рис. 28).

Ранее было показано вовлечение каналов DEG/ENaC в индуцированную ацидозом внешней среды миграцию опухолевых клеток: ASIC1 и α -ENaC опосредуют эпителиально-мезенхимальный переход рака поджелудочной железы [118,181], тогда как ASIC2 способствует инвазии и метастазированию колоректального рака [173]. Участие ASIC1 в процессе эпителиально-мезенхимального перехода было показано для клеток глиобластом, легких, молочной железы и других раковых клеток [60,117,123,134]. Интересно, что ASIC3, экспрессия которого снижена в образцах аденокарциномы легкого по данным биоинформатического анализа, может также регулировать миграцию раковых клеток поджелудочной железы [118].

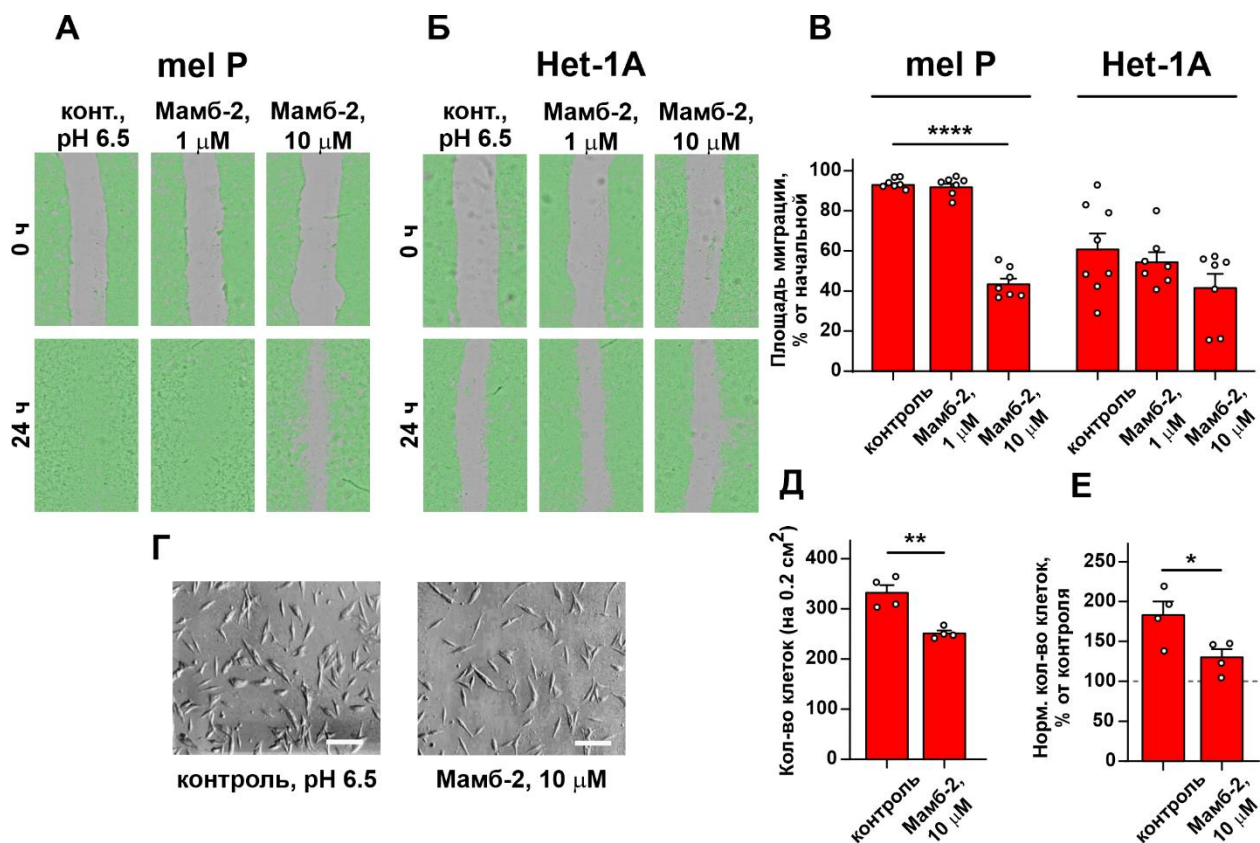


Рис. 28. Влияние мамбалгина-2 на миграцию и инвазию клеток mel P и Het-1A. А,Б – Репрезентативные изображения ран для клеток mel P (А) и Het-1A (Б), инкубированных при pH 6,5 в отсутствие или в присутствии мамбалгина-2. В – Площадь царапин, занимаемая мигрирующими клетками mel P и Het-1A при их культивации в среде с pH 6,5 в отсутствие или в присутствии мамбалгина-2. Данные представлены в виде % площади царапины, занятой мигрирующими клетками \pm SEM (n = 7–8), *** (p < 0,001) указывает на значительную разницу между группами данных с помощью One-way ANOVA с последующим тестом Tukey. Г – Репрезентативные фазово-контрастные изображения, показывающие мигрирующие через поры 8 мкм на дне миграционной камеры клетки mel P (pH среды 6,5) в отсутствие или в присутствии 10 μM мамбалгина-2 (увеличение \times 100, шкала 20 мкм). Д – Количество клеток mel P, мигрировавших через поры 8 мкм на дне миграционной камеры (pH среды 6,5) в отсутствие или в присутствии 10 μM мамбалгина-2. Данные представлены как число клеток на 0,2 см² \pm SEM (n = 4). ** (p < 0,01) указывает на значимое отличие от групп данных по двустороннему t-тесту. Е – Анализ количества мигрировавших клеток mel P (pH среды 6,5) в отсутствие или в присутствии 10 μM мамбалгина-2 с помощью теста WST-1. Данные представляют собой нормализованное на контроль (необработанные клетки, культивируемые при pH 7,4, пунктирная линия) число клеток \pm SEM (n = 4). * (p < 0,05) указывает на значительную разницу между группами данных по двустороннему t-тесту.

Таким образом, известно, что протон-чувствительные каналы DEG/ENaC вовлечены в миграцию и процессы эпителиально-мезенхимального перехода в опухолевых клетках, но таргетирование ASIC1a позволяет ингибировать миграцию и инвазию при закислении внешней среды опухолевых клеток различного происхождения.

3.2.4. Механизм ингибирования протон-чувствительных каналов мамбалгином-2 состоит в снижении активности и экспрессии митогенных и про-миграционных факторов

Так как при адаптации опухолевых клеток к закислению за счет открытия протон-чувствительных каналов активировались митогенные сигнальные пути, было изучено влияние ингибирования ASIC1a на внутриклеточные сигнальные каскады. При помощи проточной цитофлуориметрии на клетках метастатической меланомы было показано, что ингибирование каналов, содержащих субъединицу ASIC1a мамбалгином-2, снижало экспрессию CD44 и Frizzled4 на поверхности опухолевых клеток (Рис. 29А,В).

CD44, обычно активируемый гиалуроновой кислотой, контролирует сборку цитоскелета и регулирует пролиферацию и подвижность клеток [182, р. 44], причем его высокая поверхностная экспрессия коррелирует с неблагоприятным прогнозом течения первичной меланомы [183]. CD44 способствует росту и миграции опухолевых клеток посредством активации EGFR [184], PI3K/AKT/mTOR пути [185] и Wnt/ β -катенин-сигнального каскада [186], после чего β -катенин может активировать транскрипцию циклина D1, запуская синтез ДНК в клетке [187]. Интересно, что CD44 взаимодействует с натрий/протонным обменником NHE1 и участвует за счет этого в эпителиально-мезенхимальном переходе, индуцированном подкислением в клетках рака молочной железы [28].

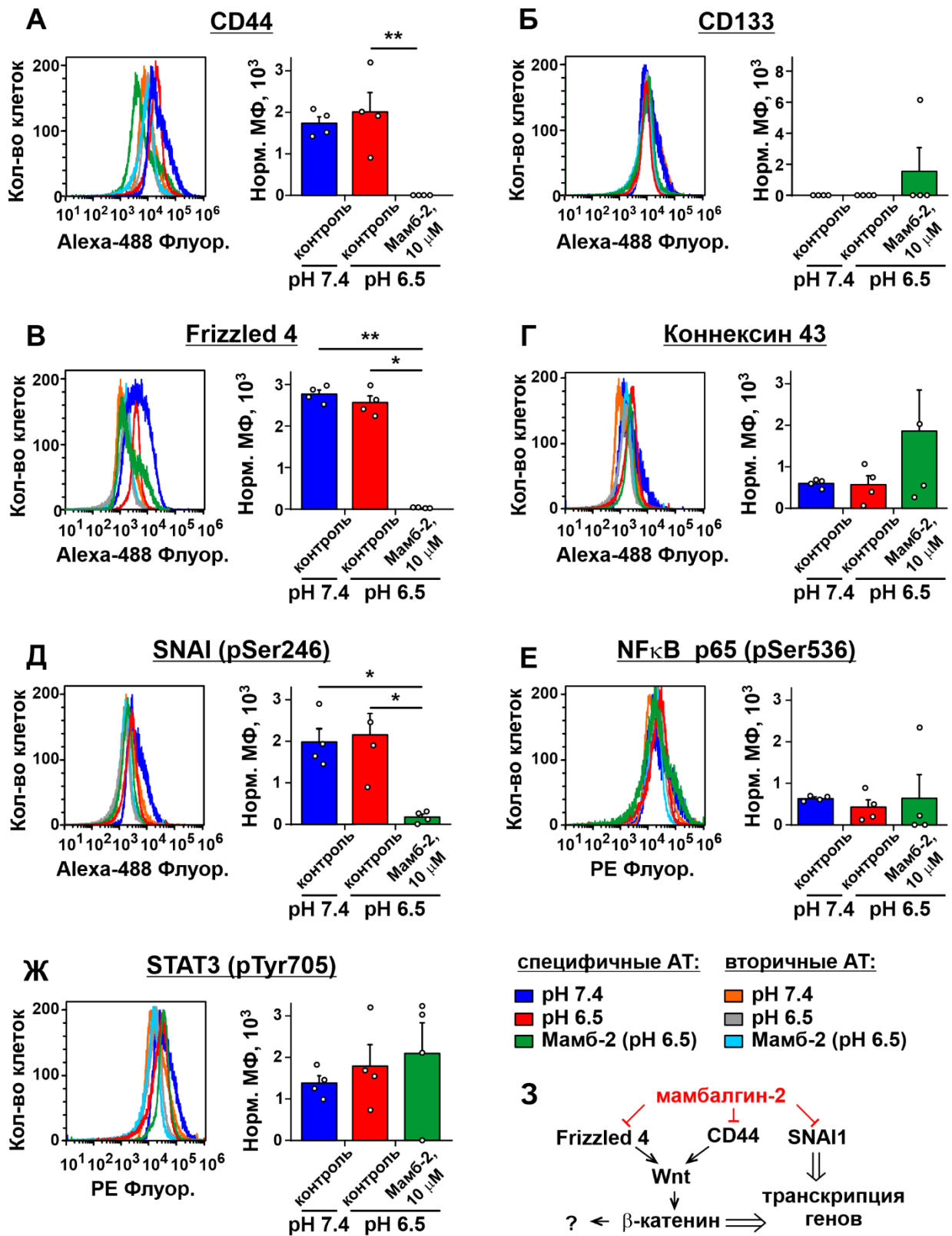


Рис. 29. Анализ влияния падения pH внешней среды до 6,5 (96 часов) и последующей инкубации с 10 μ М мамбалгина-2 (72 часа) на экспрессию и активность молекул, опосредующих онкопрогрессию в клетках метастатической меланомы mel P: CD44 (А), CD133 (Б), Frizzled 4 (В), коннексин 43 (Г), SNAI (pSer246) (Д), NF κ B p65 (pSer536) (Е) и STAT3 (pTyr705) (Ж). Анализ проводили методом проточной цитометрии. Репрезентативные гистограммы распределения клеток после окрашивания

антителами и уровни экспрессии/фосфорилирования показаны на левой и правой панелях рисунков соответственно. Данные представлены как нормализованные медианы флуоресценции (МФ) \pm SEM (n = 4). * (p < 0,05) и ** (p < 0,01) указывают на значительную разницу между группами данных с помощью One-way ANOVA с последующим тестом Tukey. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, окрашенные только вторичными антителами (АТ). 3 – Схема молекулярных механизмов, запускаемых ингибированием каналов семейства DEG/ENaC, содержащих ASIC1a мамбалгином-2 в опухолевых клетках.

Возможно, подавление экспрессии CD44 может также ингибировать его взаимодействие с NHE1 в клетках меланомы, что может привести к нарушению регуляции внутриклеточного баланса рН. Снижение экспрессии CD44, таким образом, приводит к торможению митогенных и про-миграционных механизмов в клетках неоплазии, также, возможно вызывая нарушения в регуляции внутриклеточного баланса рН, что приводит к торможению миграции и роста опухолевых клеток. Frizzled4 является рецептором норрина, который, как и CD44, активирует Wnt/ β -катенин-сигнальный каскад при участии PI3K/AKT/mTOR сигнального пути [188]. Так как Wnt сигнальный путь регулирует транскрипцию многих генов посредством β -катенина, а также усиливает выход кальция из эндоплазматического ретикулума посредством активации IP3 [189], ингибирование этого каскада за счет уменьшения экспрессии CD44 и Frizzled4 приводит к торможению роста и миграции опухолевых клеток.

Ингибирование ASIC1a-содержащих каналов мамбалгином-2 приводило к падению активности транскрипционного фактора SNAI1, что проявилось в уменьшении уровня фосфорилирования белка по серину в 246 положении (Рис. 29Д). SNAI1 стабилизируется при активации сигнального каскада Wnt [190,191], и регулирует транскрипцию многих генов, ответственных за контроль формы и подвижности клеток. Например, SNAI1 ингибирует транскрипцию гена E-кадгерина и усиливает экспрессию виментина, способствуя эпителиально-мезенхимальному переходу в клетках опухоли [192]. Снижение активности SNAI1 приводит к тому, что в клетках увеличивается экспрессия E-кадгерина, усиливающего межклеточные взаимодействия, а также уменьшается уровень виментина, который способствует изменению формы клеток и усиливает их подвижность [192]. Таким образом, снижение активности SNAI1 приводит к ингибированию роста, миграции и инвазии опухолевых клеток.

Мамбалгин-2 не влиял на экспрессию CD133 и коннексина 43, а также на фосфорилирование NF κ B p65 (pSer536) и STAT3 (pTyr705) в клетках mel P (Рис. 29Б,Г,Е,Ж). Кроме того, само по себе закисление внешней среды до рН 6,5 в отсутствие

мамбалгина-2 не приводило к изменению в экспрессии или фосфорилировании исследуемых молекул (Рис. 29).

Таким образом, механизм действия мамбалгина-2 состоит не только в ингибировании открытия протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a, но и в дополнительном к этому уменьшении экспрессии CD44 и Frizzled4, регулирующих Wnt/ β -катенин сигнальный путь, а также ингибировании транскрипции генов посредством уменьшения фосфорилирования транскрипционного фактора SNAI1.

3.2.5. Ингибирование протон-чувствительных токов и митогенных сигнальных каскадов мамбалгином-2 останавливает деление клеток уменьшая синтез ДНК

Снижение транскрипции генов и уменьшение экспрессии митогенных факторов в клетке может влиять на синтез ДНК и нормальное клеточное деление. Для того, чтобы выявить конечные молекулы, затрагиваемые ингибированием каналов, содержащих ASIC1a, была проанализирована экспрессия регуляторов синтеза ДНК в опухолевых клетках и изучено влияние мамбалгина-2 на клеточный цикл в клетках глиомы U251 MG, глиобластомы A172, лейкемии K562, аденокарциномах легкого A549 и Lewis P29, а также в клетках метастатической меланомы mel P.

Для изучения влияния мамбалгина-2 на синтез ДНК в опухолевых клетках, было проанализировано действие белка на фосфорилирование регуляторов клеточного цикла, таких как циклин D1 и циклинзависимые киназы 4 и 6 (CDK4 и CDK6). Вестерн-блоттинг показал, что 72-часовая инкубация клеток глиомы U251 MG с 1 μ M мамбалгина-2 значительно ингибировала фосфорилирование циклина D1 и циклинзависимых киназ CDK4 и CDK6 (Рис. 30А,Б). Инкубация клеток глиобластомы A172 и лейкемии K562 с 1 μ M мамбалгина-2 в течение 72 часов приводила к ингибированию фосфорилирования циклина D1 и CDK4, но не CDK6 (Рис. 30В-Е).

Анализ клеточного цикла показал, что в клетках глиомы U251 MG мамбалгин-2 в течение 72 часов индуцировал снижение числа клеток в фазах клеточного цикла G1 и G2 с ~71% до ~55% и с ~21% до ~2%, соответственно, а также увеличивал количество клеток в S-фазе примерно в 2,4 раза по сравнению с необработанными клетками (Рис. 31А,Б). Эти результаты указывают на остановку клеточного цикла в S-фазе в клетках U251 MG при обработке мамбалгином-2. Кроме того, наблюдалось значительное увеличение популяции суб-G1 при инкубации клеток глиомы с мамбалгином-2 (от ~ 0% до ~ 25%), что указывает на фрагментацию ДНК в клетках U251 MG. В клетках глиобластомы A172 процент клеток в фазах клеточного цикла G1 и S был значительно снижен после 72-часовой инкубации с мамбалгином-2 (с ~ 48% до ~ 41% и с ~ 11% до ~ 5% соответственно), а количество клеток

в фазе G2 было значительно увеличено по сравнению с контролем (с ~ 38% до ~ 47%), что указывает на остановку клеточного цикла в фазе G2/M (Рис. 31В,Г).

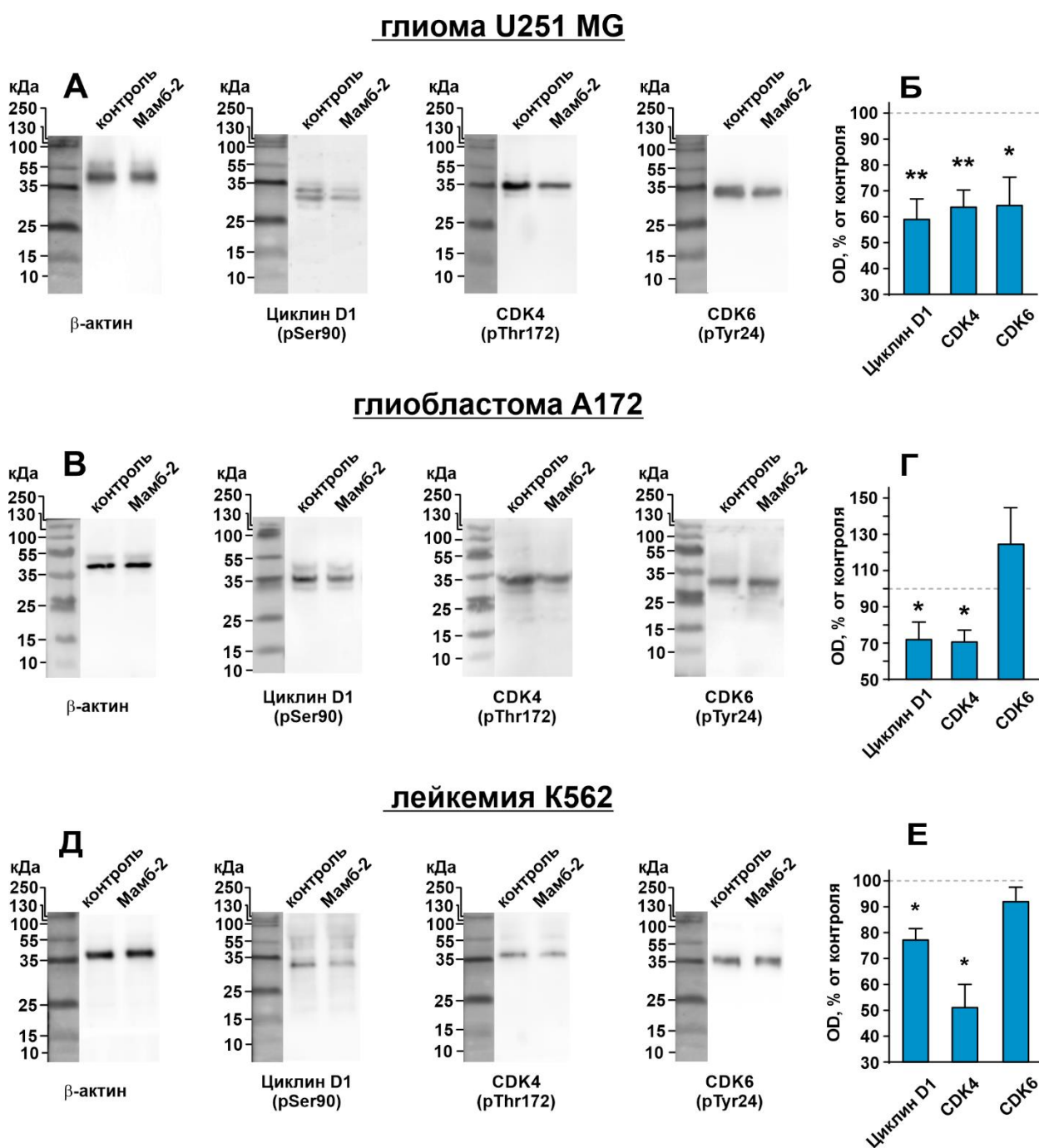


Рис. 30. Влияние мамбалгина-2 на активность регуляторов клеточного цикла в клетках глиомы U251 MG, глиобластомы A172 и лейкемии K562. А, В, Д – Репрезентативные вестерн-блоты, показывающие влияние мамбалгина-2 на фосфорилирование циклина D1 (pSer90) и циклин-зависимых киназ CDK4 (pThr172) и CDK6 (pTyr24) в клетках U251 MG (А), A172 (В) и K562 (Д). Б,Г,Е – Количественный анализ блотов для сравнения фосфорилирования циклина D1 (pSer90), CDK4 (pThr172), CDK6 (pTyr24) при 72-часовой инкубации клеток U251 MG (Б), A172 (Г) и K562 (Е) в отсутствие (контроль) или в присутствии 1 μ M мамбалгина-2. Данные представлены как интенсивности полос, нормализованные к интенсивности полосы β -актина, необработанные клетки взяты в качестве контроля (100%, пунктирная линия) \pm SEM (n =

6). * ($p < 0,05$) и ** ($p < 0,01$) указывают на достоверное различие между контрольными и обработанными мамбалгином-2 клетками по двустороннему t-тесту.

Подобно клеткам U251 MG, наблюдалось увеличение популяции клеток суб-G1 при инкубации с мамбалгином-2 (от ~ 0% до ~ 7%) (Рис. 31В,Г).

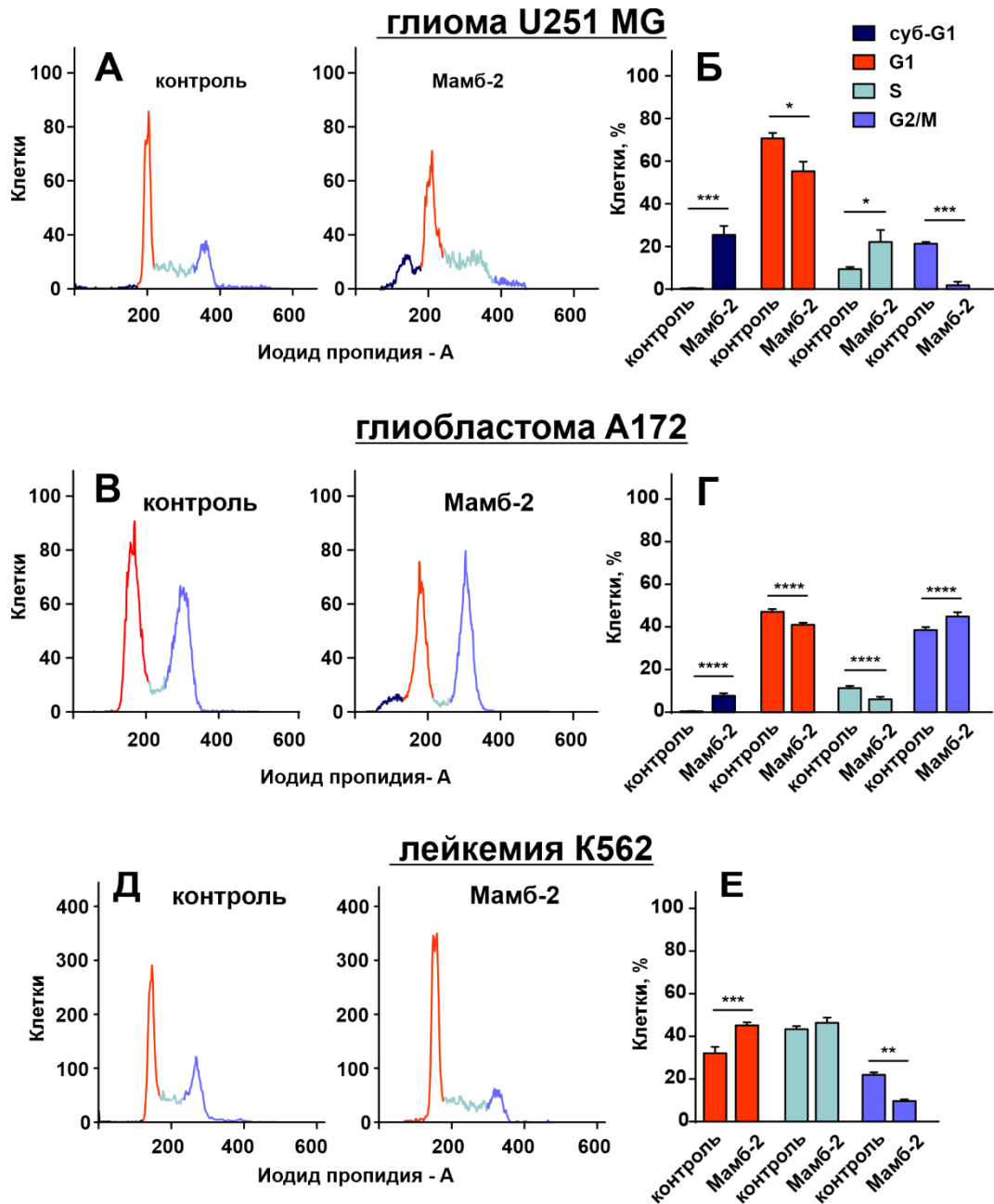


Рис. 31. Влияние мамбалгина-2 на клеточный цикл и активность регуляторов клеточного цикла в клетках глиомы U251 MG, глиобластомы A172 и лейкемии K562. А, В, Д – Репрезентативное распределение популяций ядер клеток U251 MG (А), A172 (В) и K562 (Д) после 72-часовой инкубации в отсутствие (контроль) или в присутствии 1 μ М мамбалгина-2. Б, Г, Е – % клеток в каждой фазе клеточного цикла. Данные представлены в виде % клеток U251 MG (Б), A172 (Г) и K562 (Е) в каждой фазе

клеточного цикла \pm SEM (n = 4). * (p < 0,05), ** (p < 0,01), *** (p < 0,001) и **** (p < 0,0001) указывают на достоверное отличие от контроля по двустороннему t-тесту.

Инкубация клеток лейкемии K562 с 1 μ M мамбалгина-2 в течение 72 часов приводила к увеличению клеток в G1 фазе клеточного цикла на треть, и уменьшению клеток в G2/M фазе клеточного цикла на ~ 54 %, что говорит об аресте клеточного цикла в G1 фазе. При этом, не наблюдалось формирование суб-G1 пика (Рис. 31Д,Е).

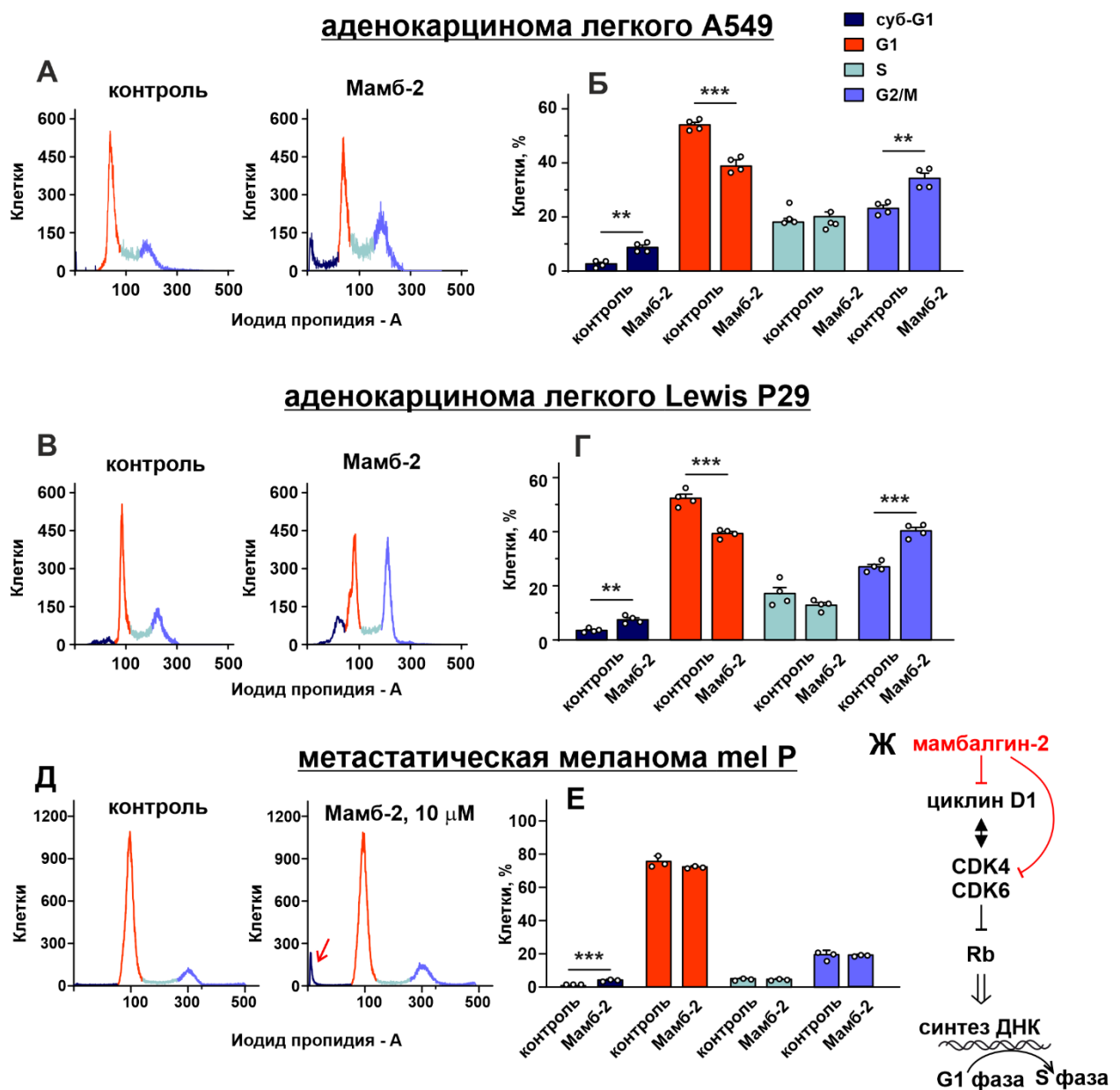


Рис. 32. Влияние мамбалгина-2 на клеточный цикл и активность регуляторов клеточного цикла в клетках аденокарциномы легкого человека A549, мыши Lewis P29 и лейкемии метастатической меланомы mel P. А, В, Д – Репрезентативное распределение популяций ядер клеток U251 MG (А), A172 (В) и K562 (Д) после 72-часовой инкубации в отсутствие (контроль) или в присутствии 1 μ M мамбалгина-2. Б, Г, Е – % клеток в каждой фазе клеточного цикла. Данные представлены в виде % клеток

U251 MG (Б), A172 (Г) и K562 (Е) в каждой фазе клеточного цикла \pm SEM ($n = 4$). * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) и **** ($p < 0,0001$) указывают на достоверное отличие от контроля по двустороннему t -тесту. Ж – Молекулярный механизм остановки клеточного цикла в опухолевых клетках при ингибировании ASIC1a мамбалгином-2.

В клетках аденокарциномы легкого A549 мамбалгин-2 снижал количество клеток в фазе G1 с $\sim 54\%$ до $\sim 38\%$ и увеличивал количество клеток в фазе G2/M с $\sim 23\%$ до $\sim 34\%$, что указывает на остановку клеточного цикла в фазе G2/M (Рис. 32А,Б). Арест клеточного цикла в G2/M фазе также наблюдался и для аденокарциномы легкого Lewis P29 (Рис. 32В,Г). Значительное увеличение популяции суб-G1 (с $\sim 2,7\%$ до $8,8\%$ для клеток A549 и с ~ 3 до 8% для клеток Lewis P29) говорило о фрагментации ДНК клеток. В отличие от исследуемых типов клеток, мамбалгин-2 не вызывал ареста клеточного цикла в клетках метастатической меланомы mel P, тем не менее для этих клеток было характерно появление суб-G1 пика фрагментированной ДНК (Рис. 33Д,Е).

Известно, что ингибирование протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a, псалмотокисном-1 и бензамиллом приводит к торможению роста клеток глиом, а также к аресту клеточного цикла в фазе G0/G1 и инактивацией ингибиторов циклин-зависимых киназ [121]. Остановка клеточного цикла опосредована ингибированием активности регуляторов клеточного цикла: циклинов и циклин-зависимых киназ [193]. Циклин D1 образует комплексы с циклин-зависимыми киназами CDK4 и CDK6, в которых CDK активируются путем фосфорилирования [194]. После активации комплексы циклина D1 с CDK фосфорилируют белок ретинобластомы (Rb-белок, ингибитор синтеза ДНК), что приводит к инактивации Rb-белка и вступлению клеток в S-фазу клеточного цикла [193]. В опухолевых клетках белок Rb обычно ингибируется либо делецией гена Rb, либо амплификации генов CDK4 и CDK6, что способствует их пролиферации [195]. Следовательно, ингибирование активности циклина D1 и CDK может предотвратить инактивацию белка Rb и привести к остановке клеточного цикла. В настоящее время этот подход считается одной из перспективных стратегий лечения опухолей [196]. Снижение фосфорилирования циклина D1 и CDK в клетках U251 MG, A172 и K562, указывает на инактивацию комплексов циклина D1/CDK и, следовательно, на восстановление активности белка Rb и ингибирование таким образом синтеза ДНК (Рис. 32Ж). При этом, снижение фосфорилирования циклинов D1, CDK4 и CDK6 может наблюдаться при остановке клеточного цикла как в G1, так и в S фазах [197–199]. что соответствует наблюдаемому в клетках U251 MG и K562 аресту клеточного цикла. В клетках A172, A549 и Lewis наблюдается несколько иная ситуация: мамбалгин-2 вызывает остановку

клеточного цикла в фазе G2/M. Это различие может быть объяснено разными профилями генной экспрессии в клетках, из-за чего арест клеточного цикла наступает не сразу, а уже после начала синтеза ДНК, как это было ранее описано для липосаркомы и клеток рака молочной железы [200]. Это предположение косвенно подтверждается изначально более низким уровнем клеточной популяции в фазе клеточного цикла G2 в необработанных клетках U251 MG по сравнению с необработанными клетками A172.

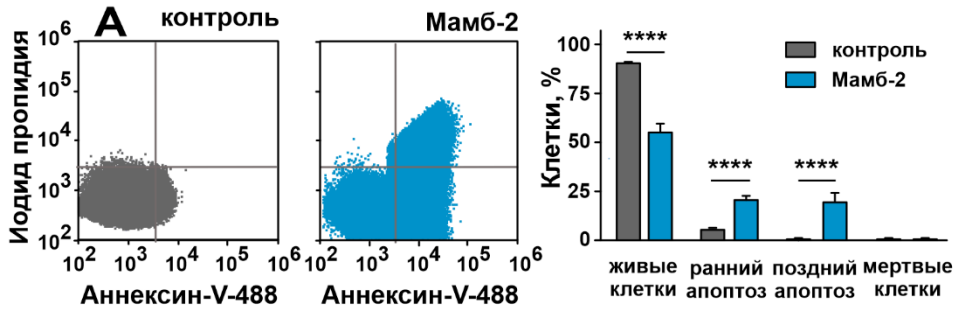
Таким образом, противоопухолевый механизм, активируемый при ингибировании ASIC1a-содержащих каналов мамбалгином-2, включает с себя арест клеточного цикла и ингибирование комплекса, запускающего синтез ДНК в опухолевых клетках (Рис. 32Ж).

3.2.6. В результате действия мамбалгина-2 на протон-чувствительные токи, митогенные сигнальные каскады и синтез ДНК в опухолевых клетках происходит апоптоз

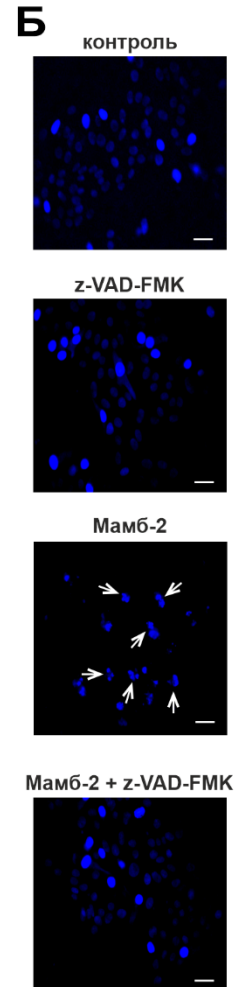
В связи с тем, что фрагментация ДНК характерна для процессов апоптотической гибели клеток, на финальной стадии которой ксапаза 3 расщепляет ДНК ядра [201], был проведен анализ экстернализации фосфатидилсерина на мембране опухолевых клеток. На ранних стадиях апоптоза происходит выход фосфатидилсерина с внутренней на наружную сторону липидного бислоя мембраны, в то время как на поздних стадиях апоптоза целостность мембраны клеток нарушается. При помощи аннексина V был определен % клеток с экстернализованным фосфатидилсерином, а при помощи иодида пропидия - % клеток с разрушенной мембраной. Анализ посредством проточной цитофлуориметрии показал, что количество клеток U251 MG с экстернализованным фосфатидилсерином увеличилось при 72-часовой инкубации с 1 мкМ мамбалгина-2 с ~2,3% до ~22%. Более того, для ~19% клеток U251 MG была характерна не только экстернализация фосфатидилсерина, но и потеря целостности мембраны, так как клетки после обработки мамбалгином-2 стали связывать иодид пропидия (Рис. 33А). Это свидетельствует о поздней стадии апоптоза клеток. Кроме того, мамбалгин-2 увеличивает количество мертвых клеток A172 с ~1% до 5% (рис. 7д, е). В соответствии с этими результатами, с помощью флуоресцентной микроскопии была выявлена фрагментация ядер клеток U251 MG после 72-часовой инкубации с 1 мкМ мамбалгина-2, что подтверждает индукцию в этих клетках апоптоза (Рис. 32Б). Для доказательства индукции апоптоза в опухолевых клетках, использовали необратимый пан-каспазный ингибитор z-VAD-FMK, устранявший антипролиферативный эффект мамбалгина-2 и отменявший фрагментацию ядер клеток U251 MG при действии на них мамбалгина-2 (Рис. 33Б,В). Инкубация клеток A549 и mel P с 1 и 10 мкМ мамбалгина-2, соответственно, приводила к индукции в клетках апоптоза, причем, также как и для клеток

U251 MG, апоптотические клетки находились и на ранней, и на поздней стадии гибели (~ 25 % и ~ 9 % клеток A549; ~ 18 % и ~ 27 % клеток mel P на ранней и поздней стадиях апоптоза, соответственно, Рис. 33Д,Ж). Мамбалгин-2 вызывал ранний апоптоз в клетках A172 и Lewis P29, что выражалось в увеличении клеток с экстернализованным фосфатидилсерином с 0 до ~ 9 и ~ 12%, соответственно (Рис. 33Г,Е). Можно предположить, что индукция апоптоза этим белком является универсальным механизмом его антипролиферативной активности.

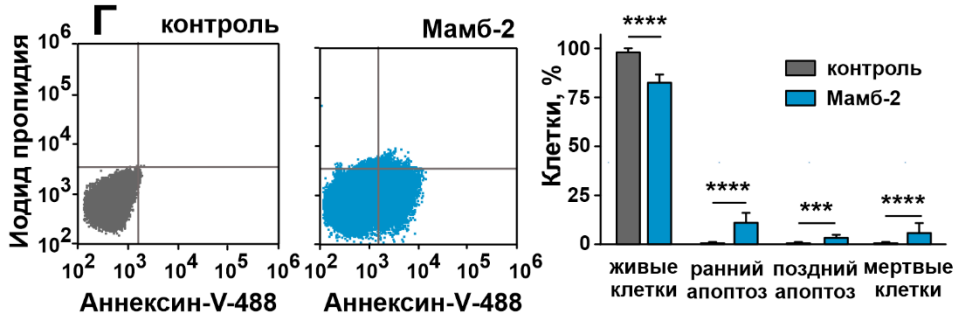
глиома U251 MG



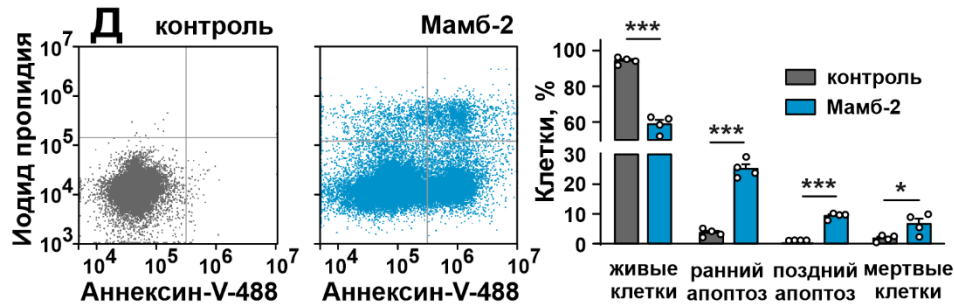
глиома U251 MG



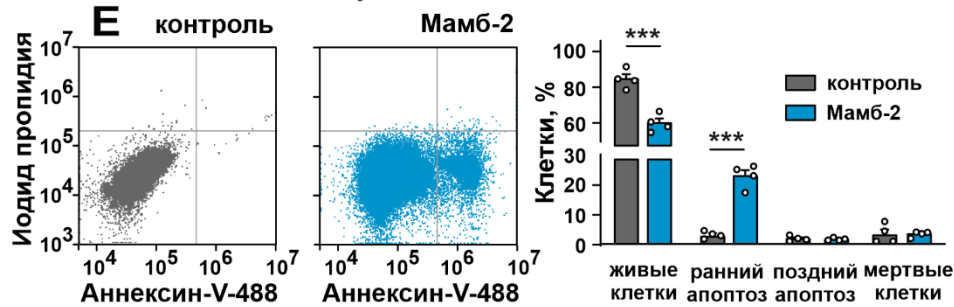
глиобластома A172



аденокарцинома легкого A549



аденокарцинома легкого Lewis P29



метастатическая меланома mel P

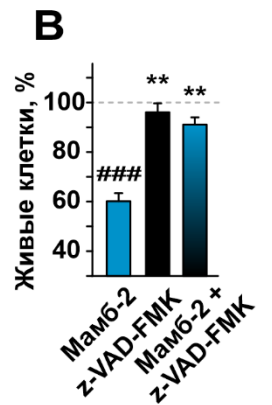
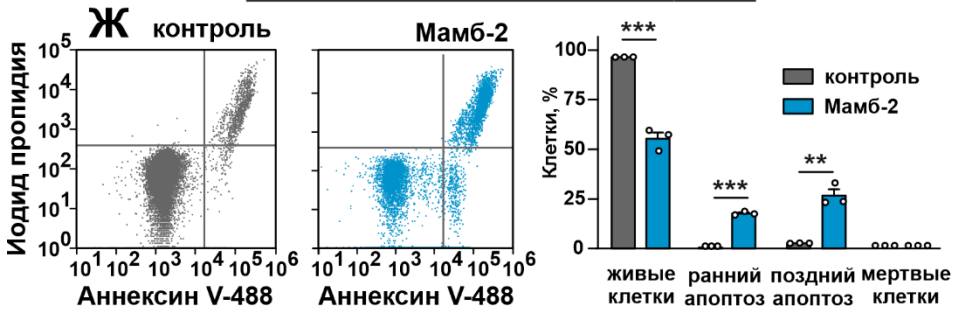


Рис. 33. Анализ индукции апоптоза мамбалгином-2 в опухолевых клетках различного происхождения. А, Г, Д, Е, Ж – Анализ влияния мамбалгина-2 на экстернализацию фосфатидилсерина в клетках глиомы U251 MG (А), глиобластомы A172 (Г), аденокарциномы легкого человека A549 (Д) и мыши Lewis P29 (Е), а также метастатической меланомы mel P (Ж) с помощью проточной цитометрии с аннексином V-488 и йодидом пропидия. Клетки mel P инкубировали с 10 μ M мамбалгина-2, в остальных случаях с 1 μ M мамбалгина-2. Процент клеток с экстернализованным фосфатидилсерином и связанным йодидом пропидия приведен на правых панелях рисунков. Данные представлены в виде % живых, ранних апоптотических, позднеапоптотических и мертвых клеток \pm SEM (n = 3-4). * (p < 0,05), ** (p < 0,01), *** (p < 0,001) и **** (p < 0,0001) указывают на значимое отличие групп друг от друга по двустороннему t-тесту. Б – Репрезентативные изображения морфологии ядер клеток U251 MG после их инкубации с 1 μ M мамбалгина-2 в отсутствие или в присутствии пан-каспазного ингибитора z-VAD-FMK, шкала 10 мкм. В – Влияние мамбалгина-2 и пан-каспазного ингибитора z-VAD-FMK на пролиферацию клеток U251 MG. Данные представлены в % от контроля (необработанные клетки, пунктирная линия) \pm SEM (n = 4). ### (p < 0,001) указывает на значительную разницу между обработанными и необработанными клетками в соответствии с One-sample t-тестом. ** (p < 0,01) указывает на значимое отличие от клеток, обработанных мамбалгином-2, по данным One-way ANOVA с последующим тестом Dunnet.

Подводя итог всему вышеизложенному, можно сказать, что мамбалгин-2 ингибирует катионные токи, опосредованные протон-чувствительными каналами, содержащими субъединицу ASIC1a, в опухолевых клетках различного происхождения (Рис 34).

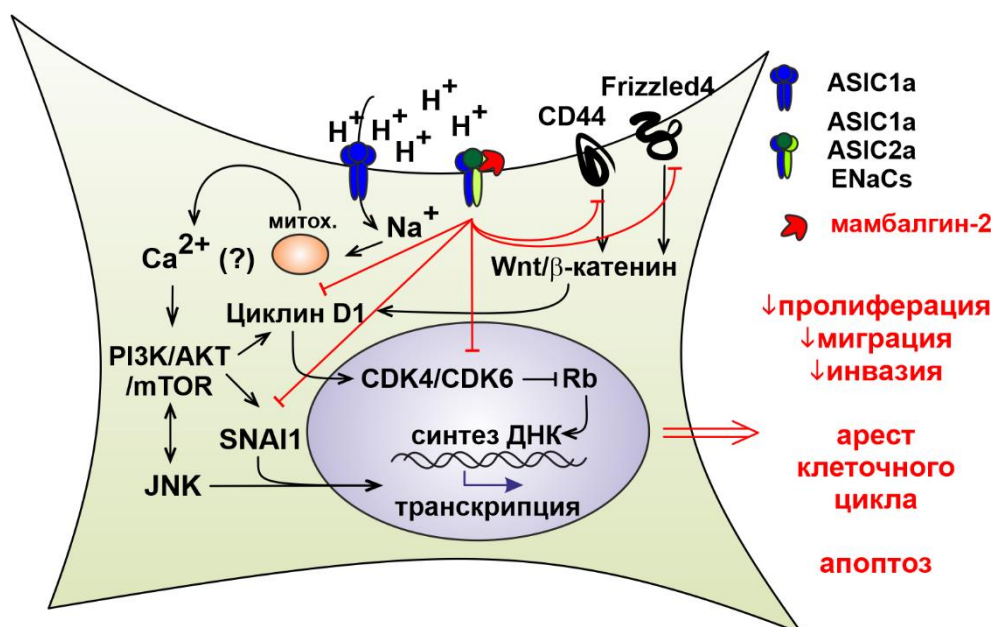


Рис. 34. Схема молекулярного механизма, запускаемого мамбалгином-2 в опухолевых клетках.

Мамбалгин-2 тормозит рост, миграцию и инвазию опухолевых клеток за счет связывания с субъединицей ASIC1a, при этом белок уменьшает экспрессию регуляторов про-онкогенного Wnt/ β -катенин сигнального пути CD44 и Frizzled4, а также ингибирует активность про-миграционного транскрипционного фактора SNAI1. Эти события приводят к уменьшению активности циклина D1 и циклин-зависимых киназ CDK4 и CDK6 в опухолевых клетках, что ингибирует формирование комплекса, запускающего синтез ДНК в клетках. Это приводит к аресту клеточного цикла и индукции апоптоза в опухолевых клетках (Рис. 34).

3.3. Гетеротример ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC как молекулярная мишень мамбалгина-2 в опухолевых клетках

3.3.1. Эффекты мамбалгина-2 в опухолевых клетках опосредованы экспрессией протон-чувствительных каналов, содержащих субъединицы ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC

Известно, что для клеток глиом на поздних стадиях, но не для нормальных астроцитов, характерно формирование опухолевоспецифичного гетеротримера, состоящего из субъединиц ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC [98], кроме того в клетках легкого формируется димер ASIC1 и α -ENaC, который обеспечивает конститутивный входящий ток катионов в клетки [97], поэтому было проведено уточнение мишени мамбалгина-2 в опухолевых клетках.

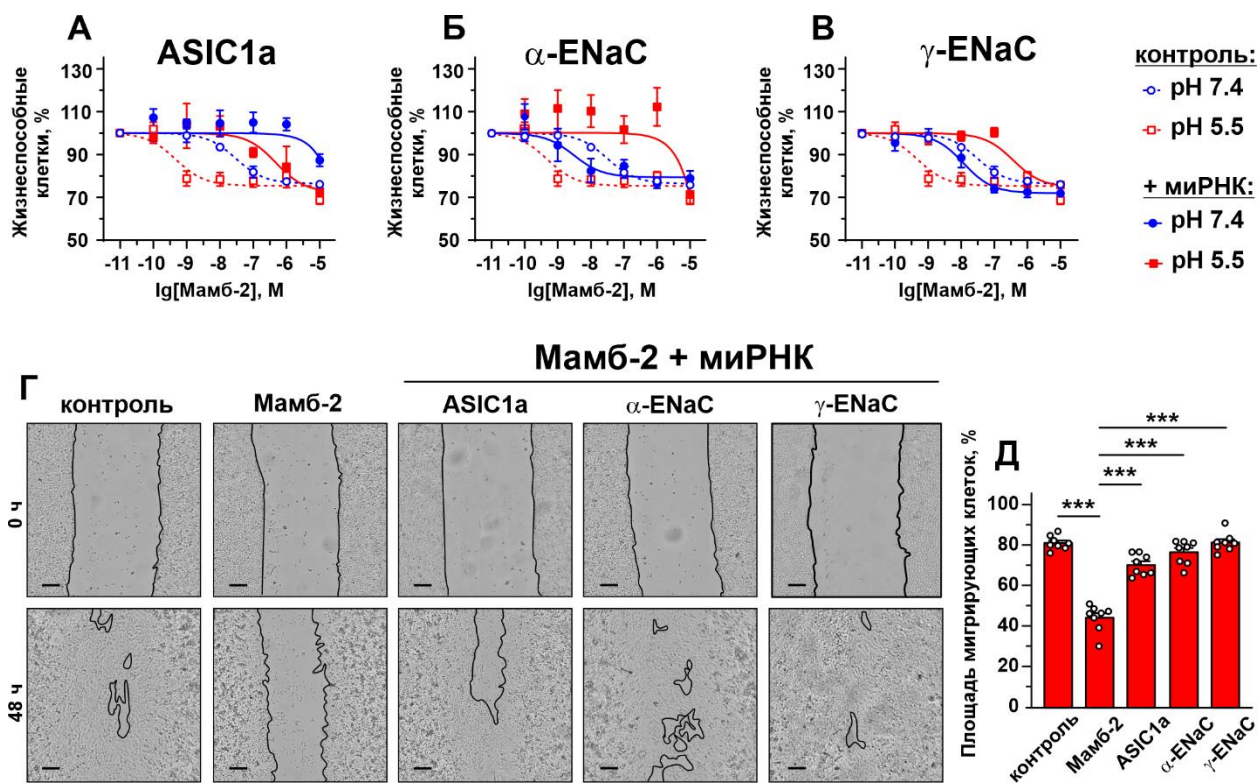


Рис. 35. Влияние «нокдаун» экспрессии ASIC1, α-ENaC и γ-ENaC на активность мамбалгина-2 в клетках рака легкого A549. А-В – Анализ влияния нокдаун генов ASIC1a (А), α-ENaC (Б) и γ-ENaC (В) на рост клеток A549 Г – Репрезентативные фотографии теста на заращание раны, при инкубации клеток A549 с уменьшенной экспрессией ASIC1, α-ENaC и γ-ENaC с 1 μM мамбалгина-2 при pH 5,5. Д – Площадь раны, занимаемая мигрирующими клетками (n = 8), *** (p<0,001) указывает на отличие групп данных по One-Way ANOVA с последующим тестом Tukey.

Для начала, в клетках аденокарциномы легкого был проведен «нокдаун» экспрессии ASIC1a, α-ENaC и γ-ENaC и проанализировано влияние закисления внеклеточной среды на рост и миграцию клеток при инкубации их с мамбалгином-2. Нокдаун ASIC1 полностью отменял антипролиферативную активность мамбалгина-2 при pH 7,4 и значительно снижал ее при pH 5,5 (Рис. 35А, Табл. 7). Подавление экспрессии α-ENaC и γ-ENaC значительно снижало торможение роста клеток A549 при инкубации с мамбалгином-2 при pH 5,5, незначительно увеличивая ее при pH 7,4 (Рис. 35Б,В). Эти результаты показывают, что мамбалгин-2 может регулировать рост клеток A549 даже при нейтральном pH, и этот эффект опосредован именно ASIC1a, но не каналами, содержащими субъединицы ENaC. Возможно, это связано с передачей сигнала через метаботропный механизм. Интересно, что ASIC1a способен фосфорилировать и активировать RIP1 без активации канала протонами [55], поэтому этот канал, возможно, способен и обеспечивать передачу других сигналов без закисления внешней среды.

Таблица 7.

Параметры, характеризующие влияние нокдауна ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC на антипролиферативную активность мамбалгина-2 в клетках A549.

Ген	pH 7.4		pH 5.5	
	A ₁ , %	EC ₅₀ , нМ	A ₁ , %	EC ₅₀ , нМ
Нег. контроль	76.63 ± 1.2	26 ± 1.9	75.42 ± 1.7	0.4 ± 0.02
ASIC1a	--	--	72.35 ± 6.5	507.4 ± 27.7 ^a
α -ENaC	79.44 ± 2.7	3.5 ± 0.4	--	--
γ -ENaC	71.61 ± 1.8	14.15 ± 2.36	74.69 ± 2.6	375.3 ± 25.3 ^a

^a Достоверное отличие между значениями EC₅₀ мамбалгина-2 при нокдауне соответствующего гена и без него согласно F-тесту ($p < 0,001$, $n = 4$).

Анализ миграции показал, что нокдаун экспрессии α -ENaC сам по себе снижал миграцию клеток A549 при pH 5,5, в то время как нокдаун экспрессии ASIC1a и γ -ENaC не изменился (Рис. 11). Нокдаун генов, кодирующих субъединицы ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC, ингибировал антимиграционную активность мамбалгина-2 при pH 5,5, доводя площадь мигрирующих клеток практически до контрольного уровня (Рис. 35Г,Д).

Таким образом, все три субъединицы ASIC1, α -ENaC и γ -ENaC необходимы как для антипролиферативной, так и для антимиграционной функциональной активности мамбалгина-2 в клетках A549 в кислых условиях.

3.3.2. Ингибирование прогрессии опухолей мамбалгином-2 достигается за счет связывания с гетерокомплексом из субъединиц ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC

То, что антипролиферативная и противомиграционная активность мамбалгина-2 опосредуется не только ASIC1, но и α -ENaC и γ -ENaC позволяет предположить дополнительную протон-чувствительную мишень мамбалгина-2 в опухолевых клетках. В пользу этого также говорит и то, что мамбалгин-2 ингибировал пролиферацию фибробластов WI-38, не экспрессирующих α -ENaC, значительно слабее, чем клеток A549, которые экспрессируют α -ENaC.

Чтобы подтвердить образование гетеротримеров ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC, мы провели иммунопреципитацию белков-партнеров ASIC1a из мембранной фракции клеток A549 с использованием агарозы, связанной с антителом против ASIC1a. Вестерн-блоттинг выявил, что субъединицы α -ENaC и γ -ENaC связываются с ASIC1a (Рис. 36А), что указывает на прямое взаимодействие ASIC1a с α -ENaC и γ -ENaC.

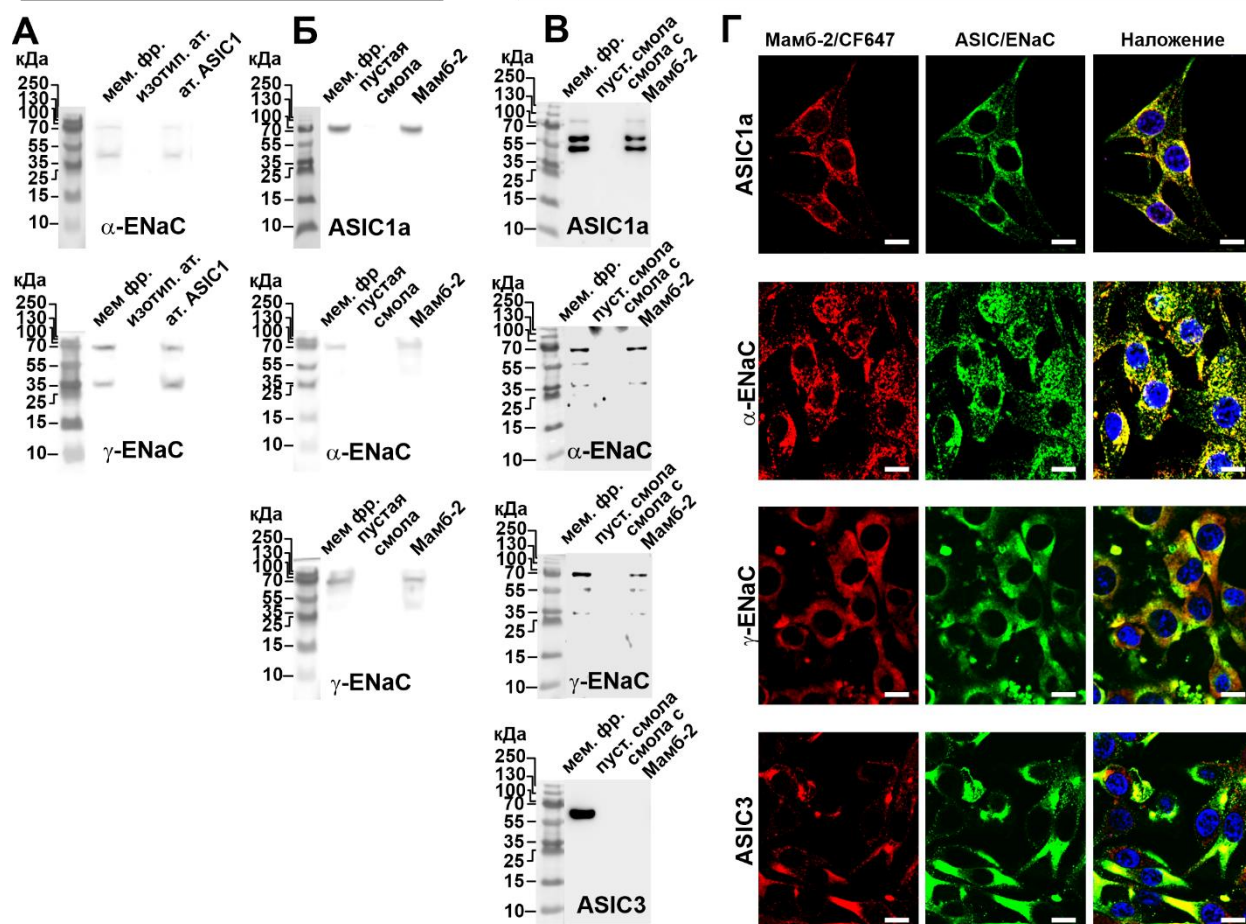


Рис. 36. Анализ молекулярных мишеней мамбалгина-2 в клетках аденокарциномы легкого A549 и метастатической меланомы mel P. А – Анализ субъединиц каналов DEG/ENaC, выделенных из мембранной фракции клеток A549 после иммунопреципитации с антителом на ASIC1 (n = 4). Б – Анализ субъединиц каналов DEG/ENaC, экстрагируемых мамбалгином-2 из мембранной фракции клеток A549 посредством Вестерн-блоттинга (n = 4). В – Анализ субъединиц каналов DEG/ENaC, экстрагируемых мамбалгином-2 из мембранной фракции клеток mel P посредством Вестерн-блоттинга (n = 4). Г – Локализация флуоресцентно-меченого мамбалгина-2/CF647 (красный) и субъединиц ASIC1a, α-ENaC, γ-ENaC и ASIC3 (зеленый). Ядра окрашивали Хехстом 33342 (синий), шкала 10 мкм.

Для выяснения того, взаимодействует ли мамбалгин-2 с субъединицами ASIC1a, α-ENaC и γ-ENaC в клетках A549, была проведена экстракция субъединиц протон-чувствительных каналов-партнеров ASIC1a из мембранной фракции клеток A549 и mel P методом аффинной хроматографии с использованием NHE-сефарозы, конъюгированной с мамбалгином-2. Анализ с помощью Вестерн-блоттинга показал, что мамбалгин-2 экстрагировал субъединицы ASIC1a, α-ENaC и γ-ENaC из мембранной фракции клеток A549 и mel P (Рис. 36Б,В). В клетках метастатической меланомы mel P посредством конфокальной микроскопии была проанализирована локализация флуоресцентно-меченого

мамбалгина-2/CF647 и субъединиц протон-чувствительных каналов. Эксперименты показали, что флуоресцентно-меченный мамбалгин-2 солокализировался с субъединицами ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC, но не с ASIC3 в клетках mel P (Рис. 36Г). ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC солокализировались с мамбалгином-2/CF647 как на мембране клеток, так и внутри них. Однако характер окрашивания мамбалгина-2/CF647 и ASIC3 не коррелировал, причем ASIC3 (и, в меньшей степени γ -ENaC) был локализован в основном внутри клеток. Хотя эти результаты не могут исключить отсутствие взаимодействия между мамбалгином-2/CF647 и ASIC3, они ясно указывают на то, что самого по себе ASIC3 недостаточно для взаимодействия с мамбалгином-2.

В целом, эти данные указывают на образование гетеротримеров ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC в опухолевых клетках и на взаимодействие мамбалгина-2 с этими гетеромерными каналами.

3.3.3. Мамбалгин-2 ингибирует гетеротример ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC значительно эффективнее, чем гомотример ASIC1a

Чтобы окончательно доказать, что гетеротримеры ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC могут быть мишенью для мамбалгина-2, мы изучили способность белка модулировать токи, вызванные падением внешней среды, в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих ASIC1a человека, α -ENaC, и субъединицы γ -ENaC в соотношении 1:1:1 с использованием метода двуэлектродного пэтч-клампа. Мамбалгин-2 ингибировал гетеротримерные каналы человека ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC со значительно более высокой эффективностью, чем гомотримерные каналы ASIC1a (Рис. 37А,Б). Ингибирующее действие мамбалгина-2 на оба типа рецепторов описывалось однокомпонентным уравнением Хилла, характеризующимся следующими параметрами: $IC_{50} = 79 \pm 5$ нМ, $nH = 2,9 \pm 0,5$, $A_1 = 0,23 \pm 0,02$ и $IC_{50} = 0,59 \pm 0,13$ μ М, $nH = 1,6 \pm 0,5$, $A_1 = 0,18 \pm 0,06$ для ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC и ASIC1a, соответственно. Интересно то, что кривые «концентрация-ответ» для амилорида были идентичными для каналов ASIC1a и ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC (Рис. 37В).

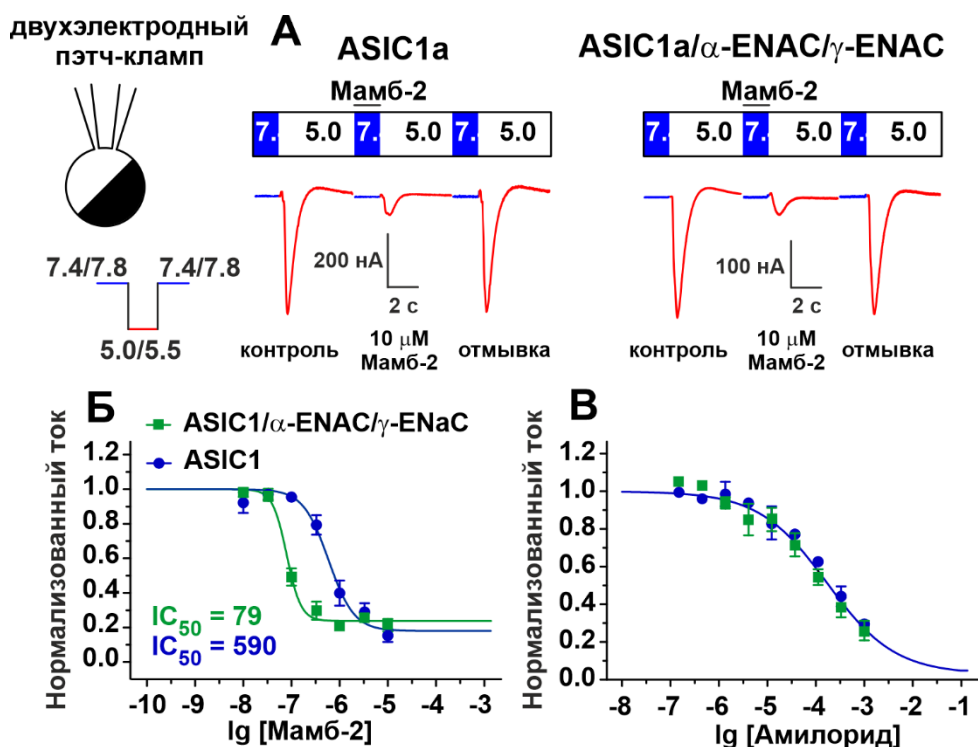


Рис. 37. Анализ действия мамбалгина-2 и амилорида на токи через каналы ASIC1a и ASIC1a/α-ENaC/γ-ENaC, в ооцитах *Xenopus laevis*. А – Репрезентативные токи, в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих гомотример ASIC1a и гетеротример ASIC1a/α-ENaC/γ-ENaC Б, В. – Кривые ингибирования гомо- и гетеротримерных каналов мамбалгином-2 (n = 11, Б) и амилоридом (n = 3, В).

Таким образом, что мамбалгин-2 взаимодействует в опухолевых клетках не только с ASIC1a, но и с α-ENaC и γ-ENaC, которые формируют в опухолевых клетках гетерокомплекс. Мамбалгин-2 ингибирует ток через гетеротримерные каналы ASIC1a/α-ENaC/γ-ENaC значительно эффективнее, чем через гомотримерные каналы ASIC1a.

3.3.4. Мамбалгин-2 формирует более сильные гидрофобные и ионные контакты с γ-ENaC (–), чем с ASIC1 (–) субъединицей.

Для того, чтобы понять причину более эффективного ингибирования мамбалгином-2 гетеротримера ASIC1a/α-ENaC/γ-ENaC по сравнению с гомотримером из ASIC1a, было проведено молекулярное моделирование. Результаты моделирования показали, что взаимодействие по главной (+) субъединице ASIC1 фактически идентично в двух случаях и характеризуется схожими относительными временами жизни контактов. Однако, отличия наблюдаются только для вспомогательной (–) субъединицы. В случае гетеротримера это γ-ENaC, в случае гомотримера — ASIC1.

Среди ионных взаимодействий мамбалгина-2 с γ-ENaC(–) были обнаружены только 2 контакта: D15-K91 и D15-R90, в то время как в случае мамбалгина-2 и ASIC1(–)

выявлен ионный контакт R14-D78 с временем жизни в 3 раза меньшим по сравнению с контактами мамбалгина-2 и γ -ENaC. Таким образом, согласно данным моделирования, мамбалгин-2 формирует более устойчивые ионные взаимодействия именно с γ -ENaC(-), а не с ASIC1(-).

Моделирование не выявило существенных стекингных и π -катионных взаимодействий по вспомогательной субъединице в обоих случаях. Тем не менее, в случае γ -ENaC(-) наблюдался нестабильный π -катионный контакт H13-K91.

Мамбалгин-2 формирует больше устойчивых гидрофобных контактов с γ -ENaC(-), чем с ASIC1(-). Наиболее устойчивые гидрофобные контакты мамбалгина-2 с γ -ENaC(-) и с ASIC1(-) представлены в таблице 8.

Таблица 8.

Наиболее устойчивые контакты мамбалгина-2 с γ -ENaC(-) и с ASIC1(-) по данным молекулярного моделирования.

Мамб2	ASIC1(-)	γ -ENaC(-)
H13	A81	F89
		R90
		K91
R14	V80	F89
	A81	R90
D15	--	K91
M16	A81	K91
	S83	S298
		M299
S39	--	K91

Общий вид гетеротримера ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC и гомотримера ASIC1a, а также основные контакты между мамбалгином-2 и γ -ENaC(-) и с ASIC1(-) приведены на Рис. 38.

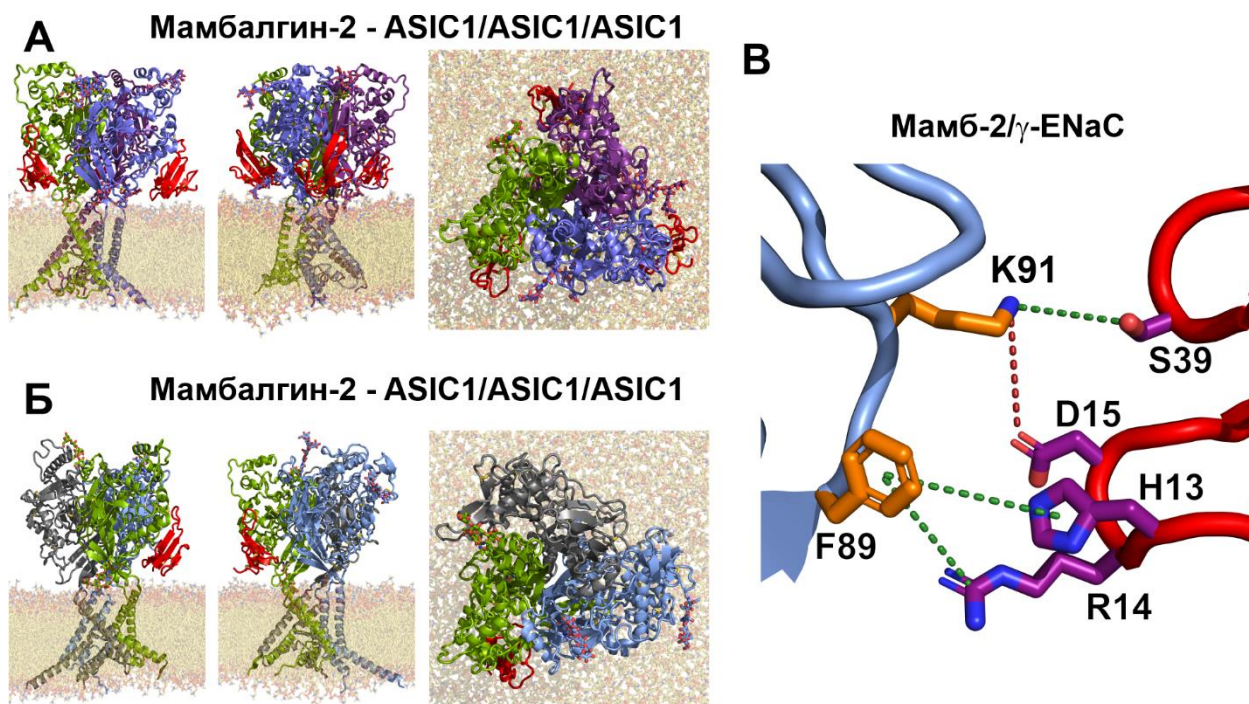


Рис. 38. Моделирование комплекса мамбалгина-2 с гомотримером ASIC1 и гетеротримером α -ENaC/ASIC1/ γ -ENaC. А – Модель гомотримера ASIC1 с мамбалгином-2. Мамбалгин-2 показан красным, субъединицы ASIC1 — зелёным, синим и фиолетовым. Б – Комплекс мамбалгина-2 с гетеротримером α -ENaC/ASIC1/ γ -ENaC. Мамбалгин-2 показан красным, субъединица ASIC1 — зелёным, α -ENaC — серым, γ -ENaC — голубым. Показаны виды комплексов сбоку и сверху. В – Ионные (красная линия) и гидрофобные (зеленые линии) контакты мамбалгина-2 с γ -ENaC. Мамбалгин-2 выделен красным, γ -ENaC – голубым. Остатки, принимающие участие в гидрофобных взаимодействиях мамбалгина-2 с γ -ENaC (выделены оранжевым цветом). Субъединицы α -ENaC, ASIC1 и мембрана не показаны.

Таким образом, более эффективное ингибирование работы гетеротримера ASIC1 α / α -ENaC/ γ -ENaC по сравнению с гомотримером из ASIC1 α может быть обусловлено более сильными ионными и гидрофобными контактами мамбалгина-2 с γ -ENaC(-), чем с ASIC1(-)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано, что закисление внешней среды стимулирует в опухолевых клетках ток катионов, индуцированный активацией протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC, содержащих субъединицу ASIC1a. Экспрессия субъединиц ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC каналов DEG/ENaC повышена в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками. Более того, повышенная экспрессия ASIC1a коррелирует с худшим прогнозом выживаемости пациентов с метастатической меланомой и аденокарциномой легкого. Вход в клетку ионов натрия может запускать выход ионов кальция из эндоплазматического ретикулума и митохондрий.

Активация протон-чувствительных каналов DEG/ENaC в опухолевых клетках приводит к активации JNK киназы и PI3K/AKT/mTOR сигнального пути, что ведет к усилению деления клеток и увеличивает поверхностную экспрессию ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC субъединиц.

Ингибирование ASIC1a-содержащих каналов мамбалгином-2 препятствует появлению в клетках опухолеспецифических катионных токов и тормозит рост и миграцию опухолевых клеток, не влияя на рост первичных нормальных клеток. Мамбалгин-2 ингибирует фосфорилирование митогенного и про-миграционного транскрипционного фактора SNAI1, уменьшает экспрессию регуляторов Wnt-сигнального каскада CD44 и Frizzled 4, и ингибирует формирование комплекса между циклином D1 и циклин-зависимыми киназами CDK4 и CDK6, что в свою очередь приводит к снижению синтеза ДНК, остановке деления опухолевых клеток и индукции в них апоптоза.

Мамбалгин-2 взаимодействует с опухолеспецифическим гетеротримерным каналом, образованным ASIC1a, α -ENaC и γ -ENaC субъединицами протон-чувствительных каналов DEG/ENaC и ингибирует токи через гетеротримерный канал ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC значительно эффективнее, чем через гомотримерный канал ASIC1a. С помощью молекулярного моделирования показано, что мамбалгин-2 образует более устойчивые ионные и полярные/гидрофобные контакты с γ -ENaC(-), а не с ASIC1(-) субъединицей в составе тримерных каналов.

Мамбалгин-2 может стать новым инструментом для изучения молекулярных механизмов, запускаемых в клетках при активации протон-чувствительных каналов, а также прототипом новых противоопухолевых средств.

ВЫВОДЫ:

1. Закисление внешней среды приводит к активации протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a и увеличению активности митогенных и про-миграционных сигнальных путей (JNK и PI3K/АКТ/mTOR путей) в клетках метастатических меланом

2. Падение внешнего рН приводит к увеличению поверхностной экспрессии протон-чувствительных каналов в опухолевых, но не в нормальных клетках.

3. Мамбалгин-2 ингибирует активацию протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a, в опухолевых клетках различного происхождения, тормозит рост и миграцию клеток, ингибирует в них активность митогенных сигнальных молекул SNAI1, CD44 и Frizzled4, а также вызывает арест клеточного цикла и апоптоз.

4. Молекулярной мишенью мамбалгина-2 является опухолеспецифичный гетеротримерный канал, образованный субъединицами ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC. Мамбалгин-2 ингибирует гетеротримерный канал ASIC1a/ α -ENaC/ γ -ENaC значительно эффективнее, чем гомотример, состоящий из субъединиц ASIC1a.

5. По данным молекулярного моделирования, мамбалгин-2 в комплексе с тримерными каналами формирует более устойчивые ионные и полярные/гидрофобные контакты именно с γ -ENaC (–), а не с ASIC1 (–) субъединицей.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Putnam R.W. Chapter 17 - Intracellular pH Regulation // Cell Physiology Source Book (Fourth Edition) / ed. Sperelakis N. San Diego: Academic Press, 2012. P. 303–321.
2. Gerweck L.E., Seetharaman K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer // Cancer Res. 1996. Vol. 56, № 6. P. 1194–1198.
3. Gillies R.J. et al. MRI of the tumor microenvironment // J Magn Reson Imaging. 2002. Vol. 16, № 4. P. 430–450.
4. Hjelmeland A.B. et al. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype // Cell Death Differ. 2011. Vol. 18, № 5. P. 829–840.
5. Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review // Cancer Res. 1989. Vol. 49, № 23. P. 6449–6465.
6. Shi Q. et al. Acidic cellular microenvironment modifies carcinogen-induced DNA damage and repair // Arch Toxicol. 2017. Vol. 91, № 6. P. 2425–2441.
7. Behne M.J. et al. Neonatal development of the stratum corneum pH gradient: localization and mechanisms leading to emergence of optimal barrier function // J Invest Dermatol. 2003. Vol. 120, № 6. P. 998–1006.
8. Ilic D. et al. Focal adhesion kinase controls pH-dependent epidermal barrier homeostasis by regulating actin-directed Na⁺/H⁺ exchanger 1 plasma membrane localization // Am J Pathol. 2007. Vol. 170, № 6. P. 2055–2067.
9. Damaghi M., Wojtkowiak J.W., Gillies R.J. pH sensing and regulation in cancer // Front Physiol. 2013. Vol. 4. P. 370.
10. Dratkiewicz E. et al. Hypoxia and Extracellular Acidification as Drivers of Melanoma Progression and Drug Resistance // Cells. 2021. Vol. 10, № 4. P. 862.
11. Böhme I., Bosserhoff A.K. Acidic tumor microenvironment in human melanoma // Pigment Cell Melanoma Res. 2016. Vol. 29, № 5. P. 508–523.
12. Liu B. et al. STAT3 associates with vacuolar H⁺-ATPase and regulates cytosolic and lysosomal pH // Cell Res. 2018. Vol. 28, № 10. P. 996–1012.
13. Kato Y. et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer // Cancer Cell Int. 2013. Vol. 13. P. 89.
14. Kato Y. et al. Acidic extracellular pH increases calcium influx-triggered phospholipase D activity along with acidic sphingomyelinase activation to induce matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma // FEBS J. 2007. Vol. 274, № 12. P. 3171–3183.

15. Griffiths L. et al. The influence of oxygen tension and pH on the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast tumor cells grown in vitro and in vivo // *Cancer Res.* 1997. Vol. 57, № 4. P. 570–572.
16. Fukumura D. et al. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo // *Cancer Res.* 2001. Vol. 61, № 16. P. 6020–6024.
17. Shi Q. et al. Regulation of interleukin-8 expression by tumor-associated stress factors // *J Interferon Cytokine Res.* 2001. Vol. 21, № 8. P. 553–566.
18. Shi Q. et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells // *Oncogene.* 2001. Vol. 20, № 28. P. 3751–3756.
19. Shi Q. et al. Constitutive and inducible interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic // *Clin Cancer Res.* 1999. Vol. 5, № 11. P. 3711–3721.
20. Torigoe T. et al. Low pH enhances Sp1 DNA binding activity and interaction with TBP // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31, № 15. P. 4523–4530.
21. Kato Y. et al. Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling // *J Biol Chem.* 2005. Vol. 280, № 12. P. 10938–10944.
22. Marino M.L. et al. Autophagy is a protective mechanism for human melanoma cells under acidic stress // *J Biol Chem.* 2012. Vol. 287, № 36. P. 30664–30676.
23. Leikam C. et al. In vitro evidence for senescent multinucleated melanocytes as a source for tumor-initiating cells // *Cell Death Dis.* 2015. Vol. 6. P. e1711.
24. Böhme I., Bosserhoff A. Extracellular acidosis triggers a senescence-like phenotype in human melanoma cells // *Pigment Cell Melanoma Res.* 2020. Vol. 33, № 1. P. 41–51.
25. Chen Y. et al. Acidic extracellular pH induces p120-catenin-mediated disruption of adherens junctions via the Src kinase-PKC δ pathway // *FEBS Lett.* 2011. Vol. 585, № 4. P. 705–710.
26. Martínez-Zaguilán R. et al. Distinct regulation of pH_{in} and [Ca²⁺]_{in} in human melanoma cells with different metastatic potential // *J Cell Physiol.* 1998. Vol. 176, № 1. P. 196–205.
27. Riemann A. et al. Extracellular Acidosis Modulates the Expression of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Markers and Adhesion of Epithelial and Tumor Cells // *Neoplasia.* 2019. Vol. 21, № 5. P. 450–458.
28. Bourguignon L.Y.W. et al. CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion // *J Biol Chem.* 2004. Vol. 279, № 26. P. 26991–27007.

29. Lin Y. et al. NHE1 mediates MDA-MB-231 cells invasion through the regulation of MT1-MMP // *Exp Cell Res.* 2011. Vol. 317, № 14. P. 2031–2040.
30. Martínez-Zaguilán R. et al. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells // *Clin Exp Metastasis.* 1996. Vol. 14, № 2. P. 176–186.
31. Rofstad E.K. et al. Acidic Extracellular pH Promotes Experimental Metastasis of Human Melanoma Cells in Athymic Nude Mice // *Cancer Res.* 2006. Vol. 66, № 13. P. 6699–6707.
32. Peppicelli S. et al. Contribution of acidic melanoma cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition to aggressiveness of non-acidic melanoma cells // *Clin Exp Metastasis.* 2014. Vol. 31, № 4. P. 423–433.
33. Andreucci E. et al. The acidic tumor microenvironment drives a stem-like phenotype in melanoma cells // *J Mol Med.* 2020. Vol. 98, № 10. P. 1431–1446.
34. Bischoff D.S. et al. Acidic pH stimulates the production of the angiogenic CXC chemokine, CXCL8 (interleukin-8), in human adult mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and NF-kappaB pathways // *J Cell Biochem.* 2008. Vol. 104, № 4. P. 1378–1392.
35. Fischer K. et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells // *Blood.* 2007. Vol. 109, № 9. P. 3812–3819.
36. Vukovic V., Tannock I.F. Influence of low pH on cytotoxicity of paclitaxel, mitoxantrone and topotecan // *Br J Cancer.* 1997. Vol. 75, № 8. P. 1167–1172.
37. Lotz C. et al. Role of the tumor microenvironment in the activity and expression of the p-glycoprotein in human colon carcinoma cells // *Oncol Rep.* 2007. Vol. 17, № 1. P. 239–244.
38. Huang W.-C. et al. Extracellular acidification elicits spatially and temporally distinct Ca²⁺ signals // *Curr Biol.* 2008. Vol. 18, № 10. P. 781–785.
39. Castellone R.D. et al. Inhibition of tumor cell migration and metastasis by the proton-sensing GPR4 receptor // *Cancer Lett.* 2011. Vol. 312, № 2. P. 197–208.
40. Ihara Y. et al. The G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) facilitates tumor development by serving as an extracellular pH sensor // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010. Vol. 107, № 40. P. 17309–17314.
41. Sin W.C. et al. G protein-coupled receptors GPR4 and TDAG8 are oncogenic and overexpressed in human cancers: 37 // *Oncogene.* Nature Publishing Group, 2004. Vol. 23, № 37. P. 6299–6303.
42. Li L. et al. The Impact of TRPV1 on Cancer Pathogenesis and Therapy: A Systematic Review // *Int J Biol Sci.* 2021. Vol. 17, № 8. P. 2034–2049.
43. Holzer P. Acid-sensitive ion channels and receptors // *Handb Exp Pharmacol.* 2009. № 194. P. 283–332.

44. Giamarchi A., Delmas P. Activation Mechanisms and Functional Roles of TRPP2 Cation Channels // TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. CRC Press/Taylor & Francis, 2007.
45. Duprat F. et al. The TASK background K²P channels: chemo- and nutrient sensors // Trends Neurosci. 2007. Vol. 30, № 11. P. 573–580.
46. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission // Physiol Rev. 2007. Vol. 87, № 2. P. 659–797.
47. Kellenberger S., Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure // Physiol Rev. 2002. Vol. 82, № 3. P. 735–767.
48. Savic Azoulay I. et al. ASIC1a channels regulate mitochondrial ion signaling and energy homeostasis in neurons // J Neurochem. 2020. Vol. 153, № 2. P. 203–215.
49. Imler E., Zinsmaier K.E. TRPV1 channels: not so inactive on the ER // Neuron. 2014. Vol. 84, № 4. P. 659–661.
50. Rash B.G., Ackman J.B., Rakic P. Bidirectional radial Ca⁽²⁺⁾ activity regulates neurogenesis and migration during early cortical column formation // Sci Adv. 2016. Vol. 2, № 2. P. e1501733.
51. Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. The versatility and universality of calcium signalling // Nat Rev Mol Cell Biol. 2000. Vol. 1, № 1. P. 11–21.
52. Schmitt J.M. et al. Calcium Activation of ERK Mediated by Calmodulin Kinase I* // Journal of Biological Chemistry. Elsevier, 2004. Vol. 279, № 23. P. 24064–24072.
53. Chatton J.-Y., Magistretti P.J., Barros L.F. Sodium signaling and astrocyte energy metabolism // Glia. 2016. Vol. 64, № 10. P. 1667–1676.
54. Salzer I. et al. Nociceptor Signalling through ion Channel Regulation via GPCRs // Int J Mol Sci. 2019. Vol. 20, № 10. P. E2488.
55. Wang Y.-Z. et al. Tissue acidosis induces neuronal necroptosis via ASIC1a channel independent of its ionic conduction // Elife. 2015. Vol. 4. P. e05682.
56. Zhang X., Huang J., McNaughton P.A. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels // EMBO J. 2005. Vol. 24, № 24. P. 4211–4223.
57. Rosenbaum T., Simon S.A. TRPV1 Receptors and Signal Transduction // TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades / ed. Liedtke W.B., Heller S. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2007.
58. Jin W. et al. PICK1 regulates the trafficking of ASIC1a and acidotoxicity in a BAR domain lipid binding-dependent manner // Mol Brain. 2010. Vol. 3. P. 39.
59. Toft-Bertelsen T.L., MacAulay N. TRPing on Cell Swelling - TRPV4 Senses It // Front Immunol. 2021. Vol. 12. P. 730982.

60. Wu Y. et al. Acid-sensing ion channels contribute to the effect of extracellular acidosis on proliferation and migration of A549 cells // *Tumour Biol.* 2017. Vol. 39, № 6. P. 1010428317705750.
61. Ding S. et al. OGR1 mediates the inhibitory effects of acidic environment on proliferation and angiogenesis of endothelial progenitor cells // *Cell Biol Int.* 2019. Vol. 43, № 11. P. 1307–1316.
62. Antigny F. et al. TRPC1 and TRPC4 channels functionally interact with STIM1L to promote myogenesis and maintain fast repetitive Ca²⁺ release in human myotubes // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017. Vol. 1864, № 5. P. 806–813.
63. Scambler T. et al. ENaC-mediated sodium influx exacerbates NLRP3-dependent inflammation in cystic fibrosis // *Elife.* 2019. Vol. 8. P. e49248.
64. Wemmie J.A., Taugher R.J., Kreple C.J. Acid-sensing ion channels in pain and disease // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. Vol. 14, № 7. P. 461–471.
65. Osmakov D.I. et al. Animal, Herb, and Microbial Toxins for Structural and Pharmacological Study of Acid-Sensing Ion Channels // *Front Pharmacol.* 2020. Vol. 11. P. 991.
66. Cheng Y.-R., Jiang B.-Y., Chen C.-C. Acid-sensing ion channels: dual function proteins for chemo-sensing and mechano-sensing // *J Biomed Sci.* 2018. Vol. 25, № 1. P. 46.
67. Kreple C.J. et al. Acid-sensing ion channels contribute to synaptic transmission and inhibit cocaine-evoked plasticity // *Nat Neurosci.* 2014. Vol. 17, № 8. P. 1083–1091.
68. Kellenberger S., Schild L. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCI. structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na⁺ channel // *Pharmacol. Rev.* 2015. Vol. 67, № 1. P. 1–35.
69. Qadri Y.J., Rooj A.K., Fuller C.M. ENaCs and ASICs as therapeutic targets // *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2012. Vol. 302, № 7. P. C943-965.
70. Donier E. et al. Regulation of ASIC activity by ASIC4--new insights into ASIC channel function revealed by a yeast two-hybrid assay // *Eur. J. Neurosci.* 2008. Vol. 28, № 1. P. 74–86.
71. Althaus M., Lawong R.Y. Proteolytic ENaC activation in health and disease-a complicated puzzle // *Pflugers Arch.* 2022. Vol. 474, № 2. P. 177–179.
72. Escoubas P. et al. Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 33. P. 25116–25121.
73. Diochot S. et al. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons // *EMBO J.* 2004. Vol. 23, № 7. P. 1516–1525.

74. Hesselager M., Timmermann D.B., Ahring P.K. pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits // *J Biol Chem*. 2004. Vol. 279, № 12. P. 11006–11015.
75. Boscardin E. et al. The function and regulation of acid-sensing ion channels (ASICs) and the epithelial Na(+) channel (ENaC): IUPHAR Review 19 // *Br. J. Pharmacol*. 2016. Vol. 173, № 18. P. 2671–2701.
76. Deval E. et al. ASIC2b-dependent regulation of ASIC3, an essential acid-sensing ion channel subunit in sensory neurons via the partner protein PICK-1 // *J Biol Chem*. 2004. Vol. 279, № 19. P. 19531–19539.
77. Sherwood T.W. et al. Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death // *J. Neurosci*. 2011. Vol. 31, № 26. P. 9723–9734.
78. Vullo S. et al. Conformational dynamics and role of the acidic pocket in ASIC pH-dependent gating // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017. Vol. 114, № 14. P. 3768–3773.
79. Tikhonov D.B., Magazanik L.G., Nagaeva E.I. Ligands of Acid-Sensing Ion Channel 1a: Mechanisms of Action and Binding Sites // *Acta Naturae*. 2019. Vol. 11, № 1. P. 4–13.
80. Gonzales E.B., Kawate T., Gouaux E. Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors // *Nature*. 2009. Vol. 460, № 7255. P. 599–604.
81. Bacongus I. et al. X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na(+)-selective channel // *Cell*. 2014. Vol. 156, № 4. P. 717–729.
82. Bacongus I., Gouaux E. Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes // *Nature*. 2012. Vol. 489, № 7416. P. 400–405.
83. Yoder N., Yoshioka C., Gouaux E. Gating mechanisms of acid-sensing ion channels // *Nature*. 2018. Vol. 555, № 7696. P. 397–401.
84. Hanukoglu I. ASIC and ENaC type sodium channels: conformational states and the structures of the ion selectivity filters // *The FEBS Journal*. 2017. Vol. 284, № 4. P. 525–545.
85. Komarova M.S. et al. Modulation of Slow Desensitization (Tachyphylaxis) of Acid-Sensing Ion Channel (ASIC)1a // *Cell Mol Neurobiol*. 2022.
86. Jasti J. et al. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH // *Nature*. 2007. Vol. 449, № 7160. P. 316–323.
87. Dawson R.J.P. et al. Structure of the acid-sensing ion channel 1 in complex with the gating modifier Psalmotoxin 1 // *Nat Commun*. 2012. Vol. 3. P. 936.
88. Waldmann R. et al. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing // *Nature*. 1997. Vol. 386, № 6621. P. 173–177.

89. Alijevic O., Kellenberger S. Subtype-specific modulation of acid-sensing ion channel (ASIC) function by 2-guanidine-4-methylquinazoline // *J Biol Chem.* 2012. Vol. 287, № 43. P. 36059–36070.
90. Marra S. et al. Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids // *EMBO J.* 2016. Vol. 35, № 4. P. 414–428.
91. Smith E.S., Cadiou H., McNaughton P.A. Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action // *Neuroscience.* 2007. Vol. 145, № 2. P. 686–698.
92. Noreng S. et al. Molecular principles of assembly, activation, and inhibition in epithelial sodium channel // *Elife.* 2020. Vol. 9. P. e59038.
93. Noreng S. et al. Structure of the human epithelial sodium channel by cryo-electron microscopy // *Elife.* 2018. Vol. 7. P. e39340.
94. Kleyman T.R., Eaton D.C. Regulating ENaC's gate // *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020. Vol. 318, № 1. P. C150–C162.
95. D A., E H., Oj R. ENaC activation by proteases // *Acta physiologica (Oxford, England). Acta Physiol (Oxf),* 2022. Vol. 235, № 1.
96. Roy S. et al. Molecular determinants of desensitization in an ENaC/degenerin channel // *FASEB J.* 2013. Vol. 27, № 12. P. 5034–5045.
97. Trac P.T. et al. Alveolar nonselective channels are ASIC1a/ α -ENaC channels and contribute to AFC // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017. Vol. 312, № 6. P. L797–L811.
98. Kapoor N. et al. Interaction of ASIC1 and ENaC subunits in human glioma cells and rat astrocytes // *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2011. Vol. 300, № 6. P. C1246-1259.
99. Kapoor N. et al. Knockdown of ASIC1 and epithelial sodium channel subunits inhibits glioblastoma whole cell current and cell migration // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, № 36. P. 24526–24541.
100. Wang J.-J. et al. Disruption of auto-inhibition underlies conformational signaling of ASIC1a to induce neuronal necroptosis // *Nat Commun.* 2020. Vol. 11, № 1. P. 475.
101. Cullinan M.M., Klipp R.C., Bankston J.R. Regulation of acid-sensing ion channels by protein binding partners // *Channels (Austin).* 2021. Vol. 15, № 1. P. 635–647.
102. Zeng W.-Z. et al. Molecular mechanism of constitutive endocytosis of Acid-sensing ion channel 1a and its protective function in acidosis-induced neuronal death // *J Neurosci.* 2013. Vol. 33, № 16. P. 7066–7078.
103. Herbert L.M. et al. PICK1/calcineurin suppress ASIC1-mediated Ca²⁺ entry in rat pulmonary arterial smooth muscle cells // *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016. Vol. 310, № 5. P. C390-400.

104. Rooj A.K. et al. Physical and functional interactions between a glioma cation channel and integrin- β 1 require α -actinin // *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2015. Vol. 309, № 5. P. C308–319.
105. Yuan Z. et al. Na/K-ATPase tethers phospholipase C and IP3 receptor into a calcium-regulatory complex // *Mol Biol Cell.* 2005. Vol. 16, № 9. P. 4034–4045.
106. Price M.P. et al. Stomatin modulates gating of acid-sensing ion channels // *J Biol Chem.* 2004. Vol. 279, № 51. P. 53886–53891.
107. Kozlenkov A. et al. Subunit-specific inhibition of acid sensing ion channels by stomatin-like protein 1 // *J Physiol.* 2014. Vol. 592, № 4. P. 557–569.
108. Lapatsina L. et al. Regulation of ASIC channels by a stomatin/STOML3 complex located in a mobile vesicle pool in sensory neurons // *Open Biol.* 2012. Vol. 2, № 6. P. 120096.
109. Schnizler M.K. et al. The cytoskeletal protein alpha-actinin regulates acid-sensing ion channel 1a through a C-terminal interaction // *J Biol Chem.* 2009. Vol. 284, № 5. P. 2697–2705.
110. Hruska-Hageman A.M. et al. PSD-95 and Lin-7b interact with acid-sensing ion channel-3 and have opposite effects on H⁺- gated current // *J Biol Chem.* 2004. Vol. 279, № 45. P. 46962–46968.
111. Hu Z.-L. et al. Disruption of PICK1 attenuates the function of ASICs and PKC regulation of ASICs // *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010. Vol. 299, № 6. P. C1355–1362.
112. Chai S. et al. A kinase-anchoring protein 150 and calcineurin are involved in regulation of acid-sensing ion channels ASIC1a and ASIC2a // *J Biol Chem.* 2007. Vol. 282, № 31. P. 22668–22677.
113. Donier E. et al. Annexin II light chain p11 promotes functional expression of acid-sensing ion channel ASIC1a // *J Biol Chem.* 2005. Vol. 280, № 46. P. 38666–38672.
114. Clark E.B. et al. Proteolytic cleavage of human acid-sensing ion channel 1 by the serine protease matriptase // *J Biol Chem.* 2010. Vol. 285, № 35. P. 27130–27143.
115. Zhang Y. et al. ASIC1a mediates the drug resistance of human hepatocellular carcinoma via the Ca²⁺/PI3-kinase/AKT signaling pathway // *Lab. Invest.* 2017. Vol. 97, № 1. P. 53–69.
116. Zhang Y. et al. ASIC1a stimulates the resistance of human hepatocellular carcinoma by promoting EMT via the AKT/GSK3 β /Snail pathway driven by TGF β /Smad signals // *J Cell Mol Med.* 2022. Vol. 26, № 10. P. 2777–2792.
117. Gupta S.C. et al. Regulation of breast tumorigenesis through acid sensors // *Oncogene.* 2016. Vol. 35, № 31. P. 4102–4111.

118. Zhu S. et al. ASIC1 and ASIC3 contribute to acidity-induced EMT of pancreatic cancer through activating Ca²⁺/RhoA pathway // *Cell Death Dis.* 2017. Vol. 8, № 5. P. e2806–e2806.
119. Xu S. et al. Potential Roles of Amiloride-Sensitive Sodium Channels in Cancer Development // *Biomed Res Int.* 2016. Vol. 2016. P. 2190216.
120. Berdiev B.K. et al. Acid-sensing ion channels in malignant gliomas // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 17. P. 15023–15034.
121. Rooj A.K. et al. Glioma-specific cation conductance regulates migration and cell cycle progression // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287, № 6. P. 4053–4065.
122. Sheng Y. et al. Acid-sensing ion channel 1 (ASIC1) mediates weak acid-induced migration of human malignant glioma cells // *Am J Cancer Res.* 2021. Vol. 11, № 3. P. 997–1008.
123. Jin C. et al. Involvement of acid-sensing ion channel 1 α in hepatic carcinoma cell migration and invasion // *Tumour Biol.* 2015. Vol. 36, № 6. P. 4309–4317.
124. Jin C. et al. Over-expression of ASIC1a promotes proliferation via activation of the β -catenin/LEF-TCF axis and is associated with disease outcome in liver cancer // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 16. P. 25977–25988.
125. Wang Y. et al. ASIC1a promotes acidic microenvironment-induced HCC cells migration and invasion by inducing autophagy // *Eur J Pharmacol.* 2021. Vol. 907. P. 174252.
126. Zhang Q. et al. Down-regulation of ASIC1 suppressed gastric cancer via inhibiting autophagy // *Gene.* 2017. Vol. 608. P. 79–85.
127. Zhu L. et al. ASIC1 inhibition impairs the proliferation and migration of pancreatic stellate cells induced by pancreatic cancer cells // *Neoplasma.* 2021. Vol. 68, № 1. P. 174–179.
128. Heydari-Mehrabadi A. et al. Analysis of Polymorphism and Expression Profile of ASIC1 and IL-6 Genes in Patients with Gastric Cancer // *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018. Vol. 19, № 12. P. 3451–3455.
129. Chen X. et al. Involvement of acid-sensing ion channel 1a in gastric carcinoma cell migration and invasion // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2018. Vol. 50, № 5. P. 440–446.
130. Yang C. et al. Overexpression of acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a) promotes breast cancer cell proliferation, migration and invasion // *Transl Cancer Res.* 2020. Vol. 9, № 12. P. 7519–7530.
131. B C. et al. ERK-mediated NF- κ B activation through ASIC1 in response to acidosis // *Oncogenesis.* 2016. Vol. 5, № 12.
132. Harguindey S. et al. Cellular acidification as a new approach to cancer treatment and to the understanding and therapeutics of neurodegenerative diseases // *Seminars in Cancer Biology.* 2017. Vol. 43. P. 157–179.

133. Hegde M. et al. Amiloride kills malignant glioma cells independent of its inhibition of the sodium-hydrogen exchanger // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004. Vol. 310, № 1. P. 67–74.
134. Matthews H., Ranson M., Kelso M.J. Anti-tumour/metastasis effects of the potassium-sparing diuretic amiloride: an orally active anti-cancer drug waiting for its call-of-duty? // *Int. J. Cancer.* 2011. Vol. 129, № 9. P. 2051–2061.
135. Bubien J.K. et al. Cation selectivity and inhibition of malignant glioma Na⁺ channels by Psalmotoxin 1 // *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2004. Vol. 287, № 5. P. C1282-1291.
136. Hoagland E.N. et al. Identification of a Calcium Permeable Human Acid-sensing Ion Channel 1 Transcript Variant // *J Biol Chem.* 2010. Vol. 285, № 53. P. 41852–41862.
137. Er S.Y. et al. Discovery and molecular interaction studies of a highly stable, tarantula peptide modulator of acid-sensing ion channel 1 // *Neuropharmacology.* 2017. Vol. 127. P. 185–195.
138. Föllner M. et al. PGE₂-induced apoptotic cell death in K562 human leukaemia cells // *Cell. Physiol. Biochem.* 2006. Vol. 17, № 5–6. P. 201–210.
139. Flis S., Chojnacki T. Chronic myelogenous leukemia, a still unsolved problem: pitfalls and new therapeutic possibilities // *Drug Des Devel Ther.* 2019. Vol. 13. P. 825–843.
140. Delgado J. et al. Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies // *Haematologica.* 2020. Vol. 105, № 9. P. 2205–2217.
141. Vlachostergios P.J. et al. Elevated lactic acid is a negative prognostic factor in metastatic lung cancer // *Cancer Biomark.* 2015. Vol. 15, № 6. P. 725–734.
142. Su T. et al. miR-7/TGF-β₂ axis sustains acidic tumor microenvironment-induced lung cancer metastasis // *Acta Pharm Sin B.* 2022. Vol. 12, № 2. P. 821–837.
143. Derynck R., Zhang Y.E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling // *Nature.* 2003. Vol. 425, № 6958. P. 577–584.
144. Miller A.J., Mihm M.C. Melanoma // *N Engl J Med.* 2006. Vol. 355, № 1. P. 51–65.
145. Gurzu S., Beleaua M.A., Jung I. The role of tumor microenvironment in development and progression of malignant melanomas - a systematic review // *Rom J Morphol Embryol.* 2018. Vol. 59, № 1. P. 23–28.
146. Moellering R.E. et al. Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes // *Clin Exp Metastasis.* 2008. Vol. 25, № 4. P. 411–425.
147. Ackermann K. et al. Expression Profiles of ASIC1/2 and TRPV1/4 in Common Skin Tumors: 11 // *International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute,* 2021. Vol. 22, № 11. P. 6024.
148. Leng T.-D. et al. Amiloride Analogs as ASIC1a Inhibitors // *CNS Neurosci Ther.* 2016. Vol. 22, № 6. P. 468–476.

149. Garza A. et al. The aminoglycosides modulate the acid-sensing ionic channel currents in dorsal root ganglion neurons from the rat // *J Pharmacol Exp Ther.* 2010. Vol. 332, № 2. P. 489–499.
150. Sun D. et al. Cryo-EM structure of the ASIC1a–mambalgin-1 complex reveals that the peptide toxin mambalgin-1 inhibits acid-sensing ion channels through an unusual allosteric effect // *Cell Discovery.* 2018. Vol. 4, № 1. P. 1–11.
151. Diochot S. et al. Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain // *Nature.* 2012. Vol. 490, № 7421. P. 552–555.
152. Baron A. et al. Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels // *Toxicon.* 2013. Vol. 75. P. 187–204.
153. Wen M. et al. Site-specific fluorescence spectrum detection and characterization of hASIC1a channels upon toxin mambalgin-1 binding in live mammalian cells // *Chem Commun (Camb).* 2015. Vol. 51, № 38. P. 8153–8156.
154. Mourier G. et al. Mambalgin-1 Pain-relieving Peptide, Stepwise Solid-phase Synthesis, Crystal Structure, and Functional Domain for Acid-sensing Ion Channel 1a Inhibition // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291, № 6. P. 2616–2629.
155. Shulepko M.A. et al. Towards universal approach for bacterial production of three-finger Ly6/uPAR proteins: Case study of cytotoxin I from cobra *N. oxiana* // *Protein Expr. Purif.* 2017. Vol. 130. P. 13–20.
156. Osmakov D.I. et al. Multiple Modulation of Acid-Sensing Ion Channel 1a by the Alkaloid Daurisoline // *Biomolecules.* 2019. Vol. 9, № 8.
157. Mikhaïlova I.N. et al. [Melanoma cell lines as the basis for antitumor vaccine preparation] // *Vestn Ross Akad Med Nauk.* 2005. № 7. P. 37–40.
158. Mikhaylova I.N. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines // *Melanoma Res.* 2008. Vol. 18, № 5. P. 303–313.
159. Le Rhun E. et al. Molecular targeted therapy of glioblastoma // *Cancer Treat. Rev.* 2019. Vol. 80. P. 101896.
160. Goldman M.J. et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform // *Nat Biotechnol.* 2020. Vol. 38, № 6. P. 675–678.
161. Lyukmanova E. et al. Human secreted proteins SLURP-1 and SLURP-2 control the growth of epithelial cancer cells via interactions with nicotinic acetylcholine receptors: Actions of human SLURP proteins on cancer cells // *British Journal of Pharmacology.* 2018. Vol. 175, № 11. P. 1973–1986.

162. Varankar S.S., Bapat S.A. Migratory Metrics of Wound Healing: A Quantification Approach for in vitro Scratch Assays // *Front. Oncol. Frontiers*, 2018. Vol. 8.
163. Shenkarev Z.O. et al. Water-soluble variant of human Lynx1 positively modulates synaptic plasticity and ameliorates cognitive impairment associated with $\alpha 7$ -nAChR dysfunction // *J Neurochem*. 2020. Vol. 155, № 1. P. 45–61.
164. Mauro T.M. et al. Ion channels are linked to differentiation in keratinocytes // *J Membr Biol*. 1993. Vol. 132, № 3. P. 201–209.
165. Yang H.-Y. et al. The epithelial sodium channel mediates the directionality of galvanotaxis in human keratinocytes // *J Cell Sci*. 2013. Vol. 126, № Pt 9. P. 1942–1951.
166. Mirmohammadsadegh A. et al. ERK1/2 is highly phosphorylated in melanoma metastases and protects melanoma cells from cisplatin-mediated apoptosis // *J Invest Dermatol*. 2007. Vol. 127, № 9. P. 2207–2215.
167. Jia X. et al. Roles of the ERK, JNK/AP-1/cyclin D1-CDK4 pathway in silica-induced cell cycle changes in human embryo lung fibroblast cells // *Cell Biol Int*. 2011. Vol. 35, № 7. P. 697–704.
168. Shimura T. et al. Activation of the AKT/cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway in radioresistant cancer stem cells // *Oncogenesis*. 2012. Vol. 1. P. e12.
169. Giacinti C., Giordano A. RB and cell cycle progression // *Oncogene*. 2006. Vol. 25, № 38. P. 5220–5227.
170. Barber A.G. et al. PI3K/AKT pathway regulates E-cadherin and Desmoglein 2 in aggressive prostate cancer // *Cancer Med*. 2015. Vol. 4, № 8. P. 1258–1271.
171. Zhao H.-F., Wang J., Tony To S.-S. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: Alliance or contradiction? (Review) // *Int J Oncol*. 2015. Vol. 47, № 2. P. 429–436.
172. Nakanishi M. et al. Acidic microenvironment induction of interleukin-8 expression and matrix metalloproteinase-2/-9 activation via acid-sensing ion channel 1 promotes breast cancer cell progression // *Oncol Rep*. 2021. Vol. 45, № 3. P. 1284–1294.
173. Zhou Z.-H. et al. The acid-sensing ion channel, ASIC2, promotes invasion and metastasis of colorectal cancer under acidosis by activating the calcineurin/NFAT1 axis // *J Exp Clin Cancer Res*. 2017. Vol. 36, № 1. P. 130.
174. Cutts R.J. et al. O-miner: an integrative platform for automated analysis and mining of -omics data // *Nucleic Acids Res*. 2012. Vol. 40, № Web Server issue. P. W560-568.
175. M M., A D., M P. IGFBP-2 expression in MCF-7 cells is regulated by the PI3K/AKT/mTOR pathway through Sp1-induced increase in transcription // *Growth factors (Chur, Switzerland)*. *Growth Factors*, 2010. Vol. 28, № 4.

176. O'Donnell A., Yang S.-H., Sharrocks A.D. MAP kinase-mediated c-fos regulation relies on a histone acetylation relay switch // *Mol Cell*. 2008. Vol. 29, № 6. P. 780–785.
177. Yang O.C.Y., Loh S.-H. Acidic Stress Triggers Sodium-Coupled Bicarbonate Transport and Promotes Survival in A375 Human Melanoma Cells // *Sci Rep*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 6858.
178. Duval K. et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture // *Physiology (Bethesda)*. 2017. Vol. 32, № 4. P. 266–277.
179. Riedl A. et al. Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses // *J. Cell. Sci*. 2017. Vol. 130, № 1. P. 203–218.
180. Corbet C., Feron O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat // *Nat Rev Cancer*. 2017. Vol. 17, № 10. P. 577–593.
181. Chang J. et al. HOXD9-induced SCNN1A upregulation promotes pancreatic cancer cell proliferation, migration and predicts prognosis by regulating epithelial-mesenchymal transformation // *Mol Med Rep*. 2021. Vol. 24, № 5. P. 819.
182. Zöllner M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? // *Nat Rev Cancer*. 2011. Vol. 11, № 4. P. 254–267.
183. Dietrich A. et al. High CD44 surface expression on primary tumours of malignant melanoma correlates with increased metastatic risk and reduced survival // *Eur J Cancer*. 1997. Vol. 33, № 6. P. 926–930.
184. Perez A. et al. CD44 interacts with EGFR and promotes head and neck squamous cell carcinoma initiation and progression // *Oral Oncol*. 2013. Vol. 49, № 4. P. 306–313.
185. Herishanu Y. et al. Activation of CD44, a receptor for extracellular matrix components, protects chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug induced apoptosis through MCL-1 // *Leuk Lymphoma*. 2011. Vol. 52, № 9. P. 1758–1769.
186. Schmitt M. et al. CD44 functions in Wnt signaling by regulating LRP6 localization and activation // *Cell Death Differ*. 2015. Vol. 22, № 4. P. 677–689.
187. Shtutman M. et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. Vol. 96, № 10. P. 5522–5527.
188. Riccio G. et al. A Negative Allosteric Modulator of WNT Receptor Frizzled 4 Switches into an Allosteric Agonist // *Biochemistry*. 2018. Vol. 57, № 5. P. 839–851.
189. Zhang J. et al. Wnt-PLC-IP3-Connexin-Ca²⁺ axis maintains ependymal motile cilia in zebrafish spinal cord // *Nat Commun*. 2020. Vol. 11, № 1. P. 1860.
190. Yook J.I. et al. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail // *J Biol Chem*. 2005. Vol. 280, № 12. P. 11740–11748.
191. Stemmer V. et al. Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin // *Oncogene*. 2008. Vol. 27, № 37. P. 5075–5080.

192. Lo U.-G. et al. The Role and Mechanism of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Progression // *Int J Mol Sci*. 2017. Vol. 18, № 10. P. E2079.
193. Khleif S.N. et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. Vol. 93, № 9. P. 4350–4354.
194. Gladden A.B., Diehl J.A. Location, location, location: the role of cyclin D1 nuclear localization in cancer // *J. Cell. Biochem*. 2005. Vol. 96, № 5. P. 906–913.
195. Brennan C.W. et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma // *Cell*. 2013. Vol. 155, № 2. P. 462–477.
196. Zhang M. et al. CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development // *Am J Cancer Res*. 2021. Vol. 11, № 5. P. 1913–1935.
197. Huang Z. et al. Induction of cell cycle arrest via the p21, p27-cyclin E,A/Cdk2 pathway in SMMC-7721 hepatoma cells by clioquinol // *Acta Pharm*. 2015. Vol. 65, № 4. P. 463–471.
198. Wolter F. et al. Downregulation of the Cyclin D1/Cdk4 Complex Occurs during Resveratrol-Induced Cell Cycle Arrest in Colon Cancer Cell Lines // *J Nutr*. 2001. Vol. 131, № 8. P. 2197–2203.
199. Rezaei P.F. et al. Induction of G1 cell cycle arrest and cyclin D1 down-regulation in response to pericarp extract of Baneh in human breast cancer T47D cells // *Daru*. 2012. Vol. 20, № 1. P. 101.
200. Dolatabadi S. et al. Cell Cycle and Cell Size Dependent Gene Expression Reveals Distinct Subpopulations at Single-Cell Level // *Front. Genet. Frontiers*, 2017. Vol. 8.
201. Kajstura M. et al. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms // *Cytometry A*. 2007. Vol. 71, № 3. P. 125–131.