

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)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Диссертация подготовлена в Отделе биоинженерии Государственного Научного Центра  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической  
химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ  
РАН).

**Научный  
руководитель  
(консультант)**

— *Люкманова Екатерина Назымовна, д.б.н., заведующий лабораторией  
биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов  
Государственного Научного Центра Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской  
академии наук (ИБХ РАН)*

**Официальные  
оппоненты**

— *к.б.н. Скоблов Михаил Юрьевич, заведующий лабораторией  
функциональной геномики ФГБНУ «Медико-генетический  
научный центр»  
д.б.н. Остроумова Ольга Сергеевна, доцент, заведующий  
лабораторией ионных каналов клеточных мембран Института  
цитологии РАН  
проф. РАН, д.б.н. Шидловский Юлий Валерьевич, заведующий  
лабораторией регуляции экспрессии генов Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Института  
биологии гена РАН*

Защита диссертации состоится «13» апреля 2023 г. в 14 часов 00 минут на заседании  
диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени  
М.В.Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 24, биологический  
факультет МГУ, кафедра биофизики, ауд. «Новая».

E-mail:

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ  
имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале:  
<https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.5/2407>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат физико-математических наук



П.В. Фурсова

# ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

## Актуальность проблемы

Злокачественные новообразования являются одной из ведущих причин смертности среди населения как в России, так и в мире. Одной из наиболее выраженных особенностей метаболизма опухолей является закисление внешней среды, поэтому ингибирование молекул, позволяющих опухолям адаптироваться к кислому микроокружению, может стать новой стратегией терапии опухолей. Однако, к настоящему времени не до конца понятно, посредством каких именно молекул опухоли адаптируются к кислому pH микроокружения. Кроме того, не до конца изучены внутриклеточные сигнальные каскады, запускаемые в опухолевых клетках при падении pH внешней среды и используемые опухолями для адаптации к агрессивному микроокружению.

Протон-чувствительные каналы семейств ASIC (acid-sensing ion channel) и ENaC (epithelial sodium channel), относятся к большому надсемейству амилорид-чувствительных дегенерин/эпителиальных Na<sup>+</sup>-каналов (DEG/ENaC). Эти каналы в клеточной мембране имеют структуру гомо- или гетеро-тримеров и являются важными сенсорами pH, которые активируются при его снижении и одними из первых реагируют на закисление внешней среды клеток. Однако, эффекты, возникающие в опухолевых клетках при активации протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC, вызванной закислением внешней среды, ранее практически не изучались. В настоящее время не установлено какую роль в адаптации опухолей к закислению играют каналы семейства DEG/ENaC, какие внутриклеточные сигнальные пути и реакции запускаются при активации этих каналов, и какие именно представители семейства DEG/ENaC вовлечены в реакцию на закисление в разных типах опухолей.

Участие протон-чувствительных каналов в поддержании метаболизма опухолей косвенно подтверждается тем, что неселективные блокаторы каналов DEG/ENaC амилорид и псалмотоксин ингибируют рост глиом и карцином. Однако эти молекулы обладают низкой селективностью и системной токсичностью, что делает необходимым поиск новых более селективных инструментов как для изучения механизмов адаптации опухоли к закислению, так и для разработки новых терапевтических препаратов. Примером селективных ингибиторов протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC являются трехпетельные белки мамбалгины из яда черной мамбы *Dendroaspis polylepis*. Однако, возможность регуляции развития опухолевых клеток с помощью мамбалгинов ранее не изучалась.

Таким образом, изучение механизмов и уточнение сигнальных путей, опосредующих адаптацию опухолевых клеток к закислению внешней среды, а также исследование возможности контроля за развитием опухолевых клеток путем ингибирования каналов семейства DEG/ENaC селективными антагонистами мамбалгинами, являются актуальными задачами биофизики, которые могут лечь в основу разработки противоопухолевых препаратов нового типа.

## Цели 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.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

В работе показано, что адаптация опухолевых клеток к закислению внешней среды происходит за счет запуска комплексного механизма, на первом этапе которого происходит активация протон-чувствительных каналов, содержащих субъединицу ASIC1a. В нормальных клетках экспрессия субъединиц этих каналов (например, ASIC1a,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC) снижена по сравнению с опухолевыми, а в некоторых случаях даже отсутствует. При активации протон-чувствительных каналов в опухолевых клетках запускаются ускоряющие клеточный рост сигнальные пути (такие как JNK и PI3K/AKT/mTOR). В конечном итоге, открытие протон-чувствительных каналов в опухолевых клетках запускает положительную обратную связь, которая выражается в увеличении экспрессии субъединиц протон-чувствительных каналов на поверхности клетки. Эти события усиливают рост и миграцию опухолевых, но не нормальных клеток.

Ингибирование ASIC1a-содержащих каналов мамбалгином-2 препятствует адаптации опухолевых клеток к закислению окружающей среды за счет уменьшения активности внутриклеточных сигнальных каскадов, обеспечивающих синтез ДНК, деление и миграцию клеток, что ведет к остановке деления клеток и индукции в них апоптоза.

Противоопухолевые эффекты мамбалгина-2 наряду с ASIC1a, опосредуются субъединицами протон-чувствительных каналов  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC. Показано, что молекулярной мишенью мамбалгина-2 в опухолевых клетках является гетеротримерный канал ASIC1a/ $\alpha$ -ENaC/ $\gamma$ -ENaC, ингибирование которого происходит значительно эффективнее, чем ингибирование гомотримерного канала ASIC1a. Более сильное ингибирующее действие мамбалгина-2 на гетеротример ASIC1a/ $\alpha$ -ENaC/ $\gamma$ -ENaC, чем на гомотример из ASIC1a объясняется формированием большего числа ионных и гидрофобных контактов мамбалгина-2 с субъединицей  $\gamma$ -ENaC, чем с субъединицей ASIC1a.

Все результаты, изложенные в работе получены впервые. Данные о механизмах участия протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC в развитии опухолевых клеток представляют интерес как для фундаментальной

науки, так и могут быть использованы для разработки новых стратегий терапии злокачественных неоплазий.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Закисление внешней среды и активация протон-чувствительных каналов, содержащих субъединицу ASIC1a, приводят к увеличению активности митогенных сигнальных путей и стимулируют рост и миграцию опухолевых клеток.

2. Падение внешнего pH приводит к увеличению поверхностной экспрессии субъединиц ASIC1a,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC.

3. Ингибирование протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a, мамбалгином-2 тормозит рост и миграцию опухолевых клеток, снижая активность митогенных сигнальных путей. Мамбалгин-2 ингибирует формирование комплекса циклина D1 с циклин-зависимыми киназами CDK4 и CDK6, что останавливает деление опухолевых клеток и приводит к индукции апоптоза.

4. В опухолевых, но не в нормальных клетках, происходит формирование гетеротримерного протон-чувствительного канала ASIC1a/ $\alpha$ -ENaC/ $\gamma$ -ENaC, который является мишенью действия мамбалгина-2. Мамбалгин-2 ингибирует ток через гетеротримерный канал при значительно меньших концентрациях, чем ток через гомотример ASIC1a за счет более сильных ионных и полярных/гидрофобных контактов с субъединицей  $\gamma$ -ENaC.

### **Публикация и апробация работы**

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 4 статьях в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертаций. Результаты работы докладывались на 9 научных конференциях, включая 19-й и 21-й Всемирные конгрессы международного общества токсикологии (Ереван, 2018 и Абу-Даби, 2022), международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2021), Международная конференция «Регуляция протеостаза при раке» (Санкт-Петербург, 2019), Всероссийская конференция по молекулярной онкологии с международным участием (Москва, 2019), международные конференции «Биомембраны (Долгопрудный, 2016 и 2018), VI молодёжная конференция по молекулярной и клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2018), российско-германский симпозиум «Молекулярная нейробиология сегодня и завтра» (Москва, 2017). Результаты работы обсуждались на межлабораторном семинаре отдела биоинженерии ИБХ РАН (Москва, 2022) и на заседании кафедры Биофизики Биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова.

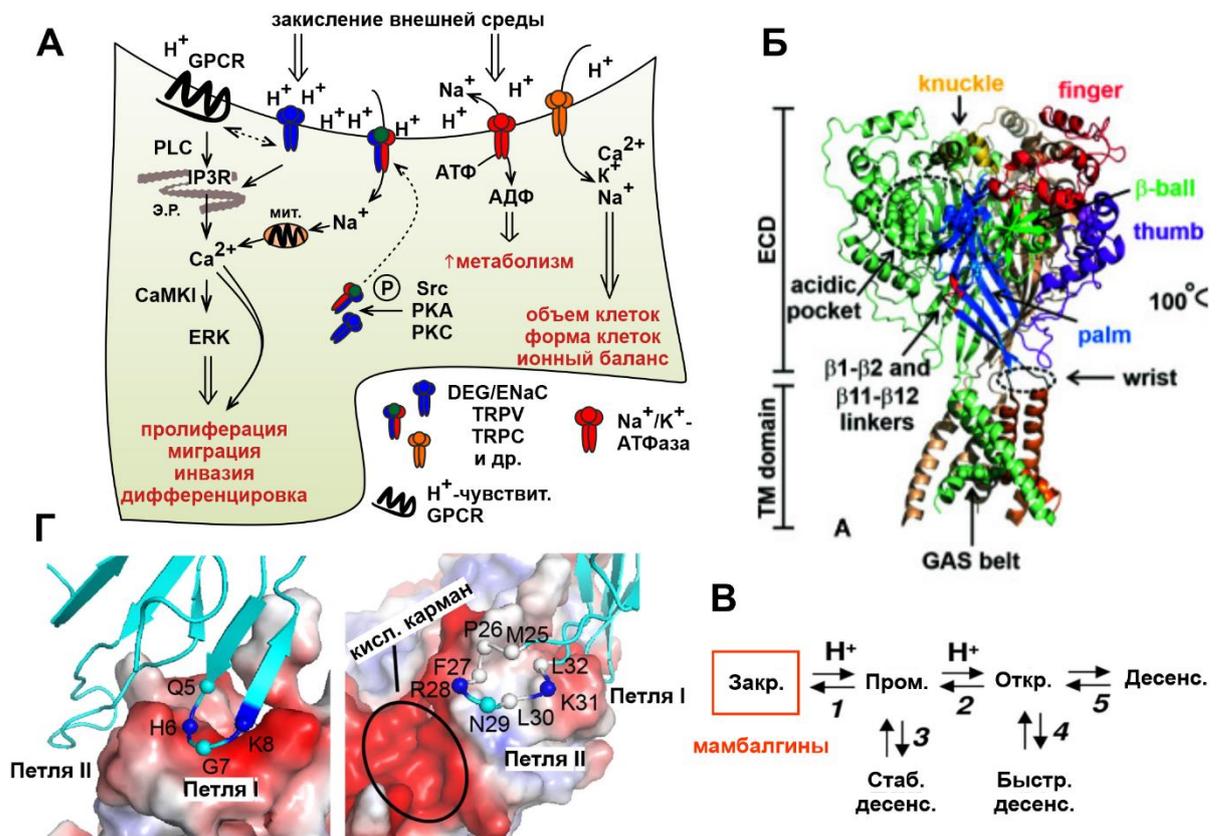
### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 117 страницах и содержит 38 рисунков, 8 таблиц и 201 источник литературы.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

## Введение

Характерной особенностью опухолей является интенсивный метаболизм в опухолевой массе, что приводит к снижению pH микроокружения опухоли с  $\sim 7,4$  до  $\sim 5,5 - 6,5$  (Рис. 1А). 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,  $\alpha$ - $\delta$  ENaC и др (Рис. 1Б). Субъединичный состав этих каналов определяет их чувствительность к pH и фармакологические свойства. Наиболее чувствительными к падению pH являются каналы ASIC1a, которые активируются при падении pH до  $\sim 6,4 - 6,6$  и обеспечивают вход в клетку ионов натрия. Активация ASIC1a запускает передачу внутриклеточного сигнала посредством ионотропных и метаболитных механизмов, регулирующих пролиферацию и миграцию клеток (Рис. 1А).



**Рис. 1. ASIC1a как сенсор закисления внеклеточной среды в опухолевых клетках.** А. Молекулярные механизмы, запускаемые в опухолевых клетках при закислении внешней среды. Б. Структура гомотримерного канала ASIC1a. В. Модель работы ASIC1a-содержащих каналов. Мамбалгины стабилизируют закрытое состояние канала за счет поддержания кислотного кармана в закрытой конформации. Г. Сайт взаимодействия мамбалгина-1 с внешними  $\alpha$ -спиралями ASIC1a.

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 (Xu et al., 2016). Более того, показано формирование опухолеспецифичного гетеротримерного Na<sup>+</sup> канала, состоящего из субъединиц ASIC1a,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC, в клетках глиом, но не в нормальных астроцитах (Karoor et al., 2009; Rooj et al., 2012). Таким

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

Есть несколько ингибиторов каналов, содержащих субъединицу ASIC1a, однако, они либо неспецифичны, либо способны потенцировать протон-чувствительные каналы. 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 обозначаются как мамбалгин-1,2,3. Мамбалгины взаимодействуют с внешней частью канала ASIC1a и поддерживают канал в закрытом состоянии (Рис. 1В), при этом особенно важными для взаимодействия с ASIC1a являются остатки лейцина мамбалгинов в 32 и 34 положении, находящиеся в гидрофобном участке центральной петли белка (Рис. 1Г).

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.

## Результаты

### 1. Молекулярные механизмы адаптации опухолевых клеток к закислению внешней среды

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

Протон-чувствительные каналы экспрессируются в не-нейрональных клетках и могут обеспечивать адаптацию опухолевых клеток к закислению внешней среды. Анализ экспрессии субъединиц протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC при помощи ПЦР в реальном времени выявил, что в опухолевых клетках различной природы (глиома, глиобластома, метастатическая меланома и аденокарцинома легкого) экспрессируются мРНК, кодирующие различные субъединицы протон-чувствительных каналов (Рис. 2 А-В).

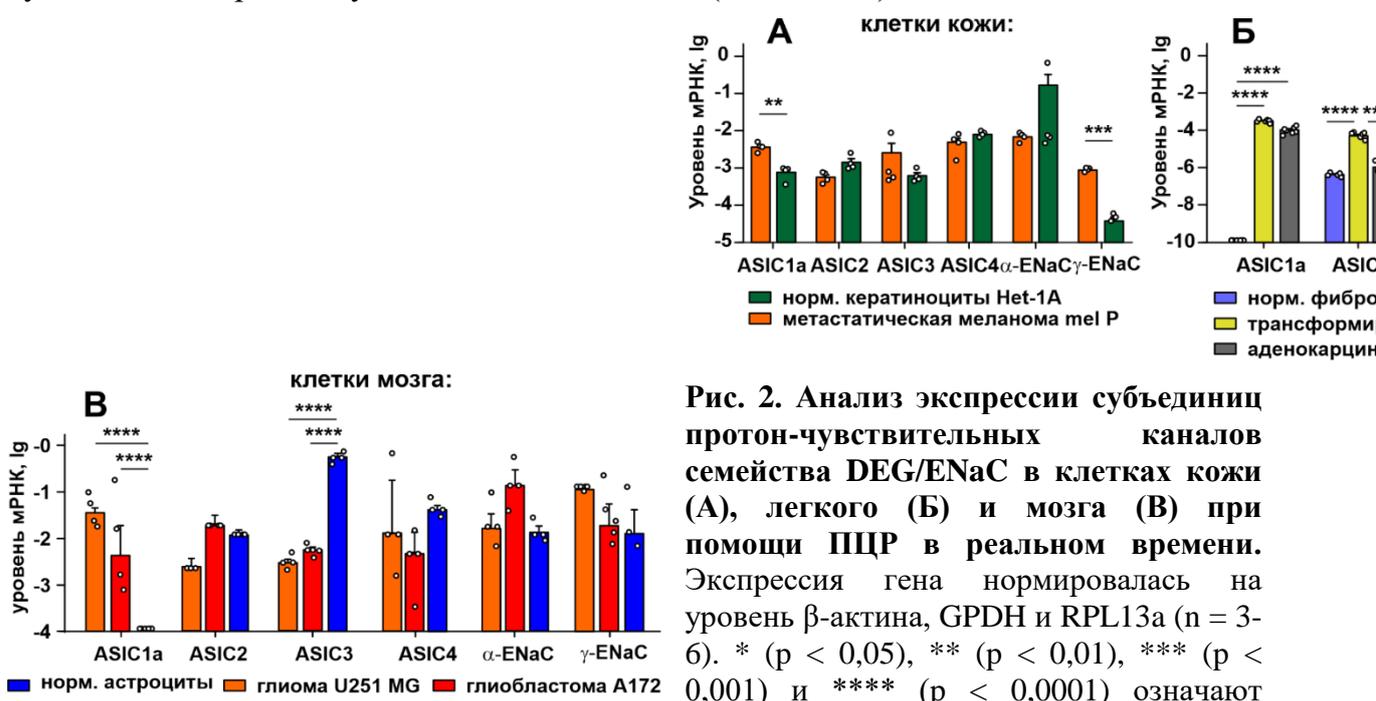


Рис. 2. Анализ экспрессии субъединиц протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC в клетках кожи (А), легкого (Б) и мозга (В) при помощи ПЦР в реальном времени. Экспрессия гена нормировалась на уровень  $\beta$ -актина, GPDH и RPL13a (n = 3-6). \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001) и \*\*\*\* (p < 0,0001) означают

достоверное отличие между группами данных согласно двустороннему t-тесту.

При этом, экспрессия ASIC1a,  $\alpha$ -ENaC или  $\gamma$ -ENaC субъединиц в опухолевых клетках повышена по сравнению с нормальными клетками. Более того, в фибробластах легкого и астроцитах не экспрессируется ASIC1a, также в легочных фибробластах значительно снижена и экспрессия  $\gamma$ -ENaC.

Кератиноциты Het-1A экспрессируют и ASIC1a, и субъединицы  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC, однако уровень мРНК ASIC1a и  $\gamma$ -ENaC в них значительно ниже по сравнению с опухолевыми клетками. Экспрессия ASIC1a и  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC в кератиноцитах необходима для осуществления барьерной функции кожи, а также регуляции дифференцировки кератиноцитов.

Для того, чтобы выяснить физиологическое значение повышенной экспрессии протон-чувствительных каналов в прогрессии опухолей, был проведен биоинформатический анализ показавший, что повышение экспрессии мРНК ASIC1 коррелирует с меньшим временем жизни пациентов, страдающих от метастатической меланомы и аденокарциномы легкого на поздних стадиях, при которых для опухолей как раз характерно закисление внешней среды и индукция воспаления (Рис. 3).

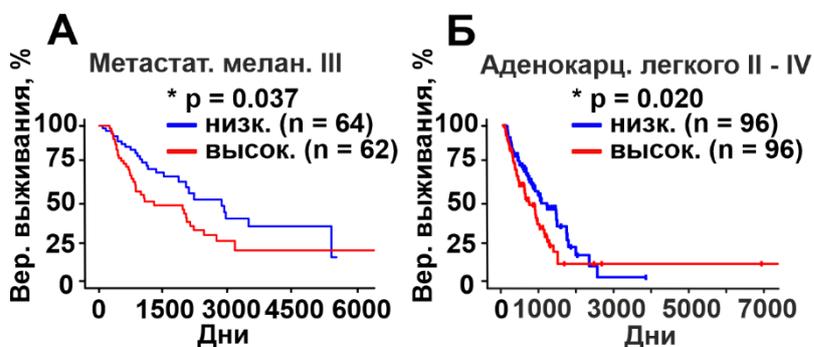


Рис. 3. Биоинформатический анализ корреляции выживаемости пациентов с метастатической меланомой III стадии (А) и аденокарциномы легкого (II – IV стадии) с уровнем экспрессии гена, кодирующего ASIC1 (ACCN2). Пациентов делили

на две группы – с уровнем экспрессии гена выше и ниже медианного значения. Статистический анализ выживаемости пациентов проводили по методу Каплана–Мейера. \* (p < 0,05) означает отличие в продолжительности жизни пациентов согласно log-rank тесту.

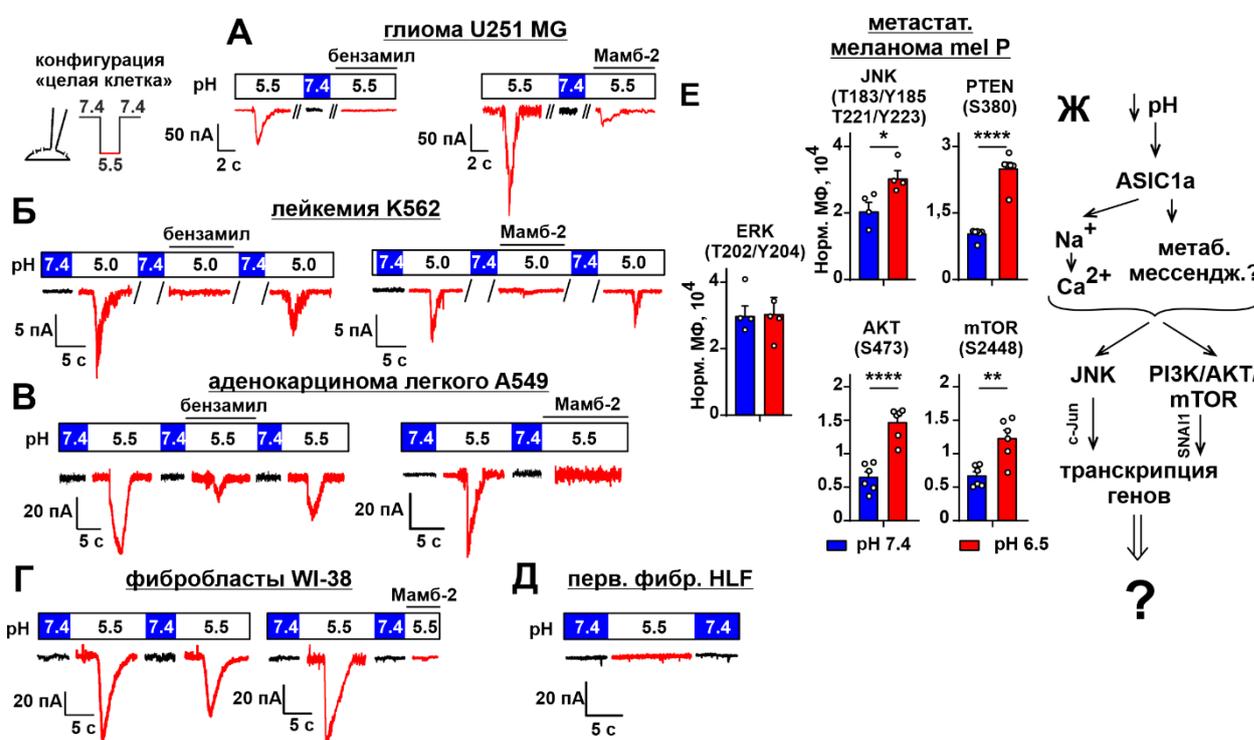
Полученные результаты говорят о том, что в активация протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a, в опухолевых клетках различного происхождения может быть обусловлена их повышенной экспрессией. А связь между повышенной экспрессией ASIC1a и меньшим временем жизни пациентов с опухолями свидетельствует о более агрессивном характере неоплазий на поздних стадиях, именно при которых ярко проявляются эффекты закисления опухолевого микроокружения.

## 1.2. При закислении внешней среды в опухолевых клетках активируются протон-чувствительные каналы, содержащие ASIC1a, и внутриклеточные мессенджеры, стимулирующие прогрессию опухолей

Чтобы понять, какие ионные каналы регулируют адаптацию опухолевых клеток к закислению внешней среды, были проведены эксперименты посредством технологии патч-кламп при отведении сигнала от плазматической мембраны всей клетки. Быстрое изменение pH внеклеточной среды приводило к активации протон-чувствительных натриевых токов в клетках глиомы, миелогенной лейкемии и аденокарциномы легкого (Рис. 4А-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. Константа времени десенситизации канала составляла ~ 1,5 сек, что соответствует каналам, содержащим ASIC1a<sup>1</sup>.

Интересно, что для трансформированных фибробластов легкого, которые экспрессируют ASIC1a и  $\gamma$ -ENaC, но не  $\alpha$ -ENaC, также характерно наличие протон-активируемого катионного тока (Рис. 4Г), в то время как в первичных, нетрансформированных фибробластах легкого, не экспрессирующих ни одну из изучаемых субъединиц каналов DEG/ENaC, падение внешнего pH не приводило к появлению входящего тока катионов (Рис. 4Д). Инкубация клеток опухолей и трансформированных фибробластов с селективным ингибитором ASIC1a бензамил предотвращала появление входящего тока катионов в них (Рис. 4А-Г), то есть катионный входящий ток в опухолевых и трансформированных клетках опосредован именно открытием протон-чувствительных каналов, содержащих субъединицу ASIC1a.



**Рис. 3. Влияние рекомбинантного аналога мамбалгина-2 на входящие токи в опухолевых клетках.** Анализировали токи, опосредованные ASIC1a в клетках глиомы U251 MG (А), миелогенной лейкемии K562 (В), 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. Молекулярный механизм, запускаемый при открытии протон-чувствительных каналов семейства DEG/ENaC в опухолевых клетках.

<sup>1</sup> Изучение входящих токов через мембрану опухолевых клеток проводили совместно с группой ионных механизмов клеточной сигнализации НИИ Цитологии РАН (Санкт-Петербург, Сударикова А.В., Васильева В.Ю., Чубинский-Надеждин В.И.).

Рекомбинантный аналог мамбалгина-2<sup>2</sup> также ингибировал ток катионов через мембрану клеток, экспрессирующих ASIC1a (Рис. 4А-Г). Таким образом, эффекты закисления на опухолевые, но не на нормальные клетки, опосредуются открытием протон-чувствительных каналов, содержащих субъединицу ASIC1a.

Открытие ASIC1a-содержащих каналов, и вызванный этим вход ионов натрия в клетку может запускать выход кальция из митохондрий за счет активации митохондриального натрий-кальциевого обменника. Кроме того, внутриклеточный домен ASIC1 может также связывать различные сигнальные белки, активируя внутриклеточные вторичные мессенджеры, не связанные с током ионов через пору канала. Для выяснения внутриклеточных сигнальных каскадов, активируемых в клетках при открытии ASIC1a-содержащих каналов, была использована проточная цитофлуориметрия. В результате было показано, что при открытии в опухолевых клетках ASIC-1a содержащих каналов, в клетках метастатической меланомы происходит активация онкогенной JNK киназы посредством фосфорилирования триптофана в 183 и тирозина в 185 положении, а также триптофана в 221 и тирозина

в 223 положении. Кроме того, закисление внешней среды приводило к инактивации негативного регулятора PI3K/АКТ/mTOR пути PTEN посредством его фосфорилирования по серину в положении 380, а также активации митогенных и про-миграционных серин-треониновых киназ АКТ и mTOR. Как JNK, так и PI3K/АКТ/mTOR сигнальный путь запускают в опухолевых клетках транскрипцию циклина D1 и активируют циклин-зависимую киназу CDK4, что приводит к инициации синтеза ДНК в клетках и прохождению ими клеточного цикла. Кроме того, PI3K/АКТ/mTOR путь также ингибирует экспрессию E-кадгерина, что увеличивает подвижность и миграцию клеток опухоли. Следует отметить, что PI3K/АКТ/mTOR ограничивает активность JNK, таким образом в опухолевых клетках при закислении среды устанавливается баланс между активностью этих митогенных сигнальных каскадов.

Таким образом, в опухолевых, но не нормальных клетках при закислении внешней среды происходит открытие протон-чувствительных ионных каналов, содержащих субъединицу ASIC1a, что приводит к активации в них митогенных и про-миграционных вторичных мессенджеров, в частности киназ.

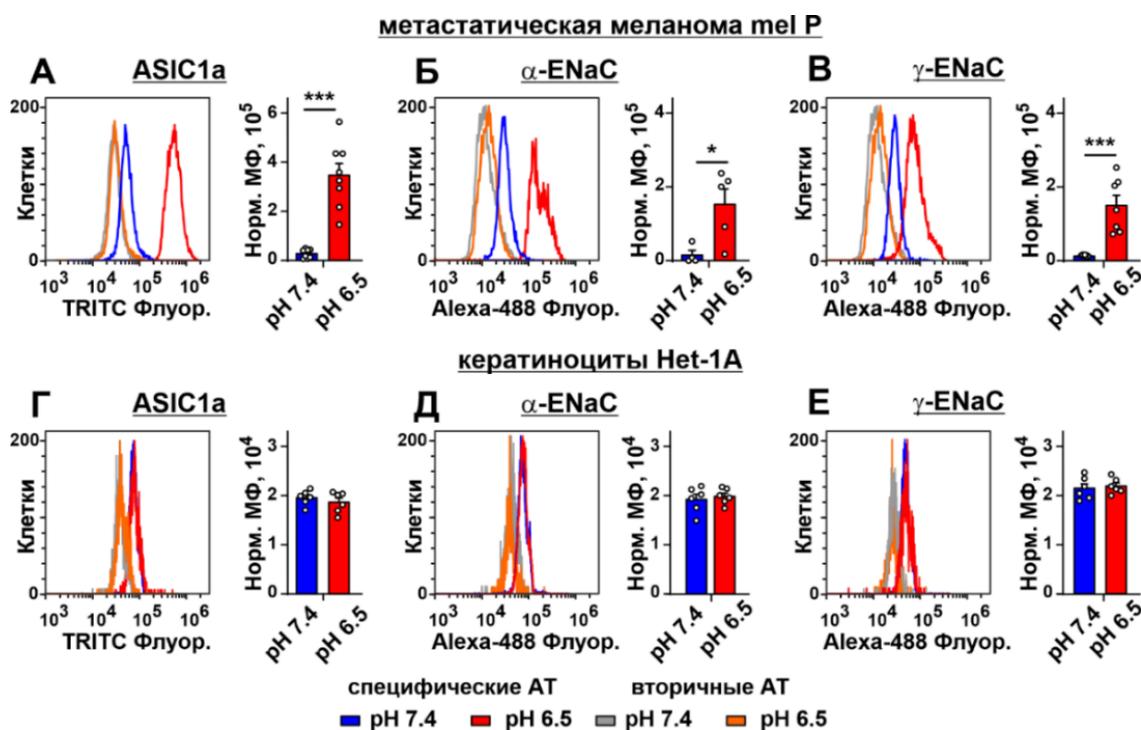
### **1.3. В опухолевых, но не нормальных клетках активация протон-чувствительных каналов приводит к росту поверхностной экспрессии сенсоров протонов.**

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

---

<sup>2</sup> Рекомбинантный мамбалгин-2 получали совместно с лабораторией биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов ИБХ РАН (Москва, Шулепко М.А.). Характеризацию препарата мамбалгина-2 осуществляли совместно с лабораторией структурной

Посредством проточной цитофлуориметрии было показано, что падение pH внешней среды приводит к значительному увеличению экспрессии на поверхности опухолевых клеток ASIC1a, а также  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC (Рис. 5А-В).



ностную экспрессию ASIC1a (А, Г),  $\alpha$ -ENaC (Б, Д) и  $\gamma$ -ENaC (В, Е) в клетках mel P (А-В) и Het-1А (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  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC в нормальных кератиноцитах Het-1А (Рис. 5В-Е). Интересно, что экспрессия сенсоров протонов в клетках усиливается транскрипционными факторами, которые активируются при JNK и PI3K/АКТ/mTOR сигнальных каскадах.

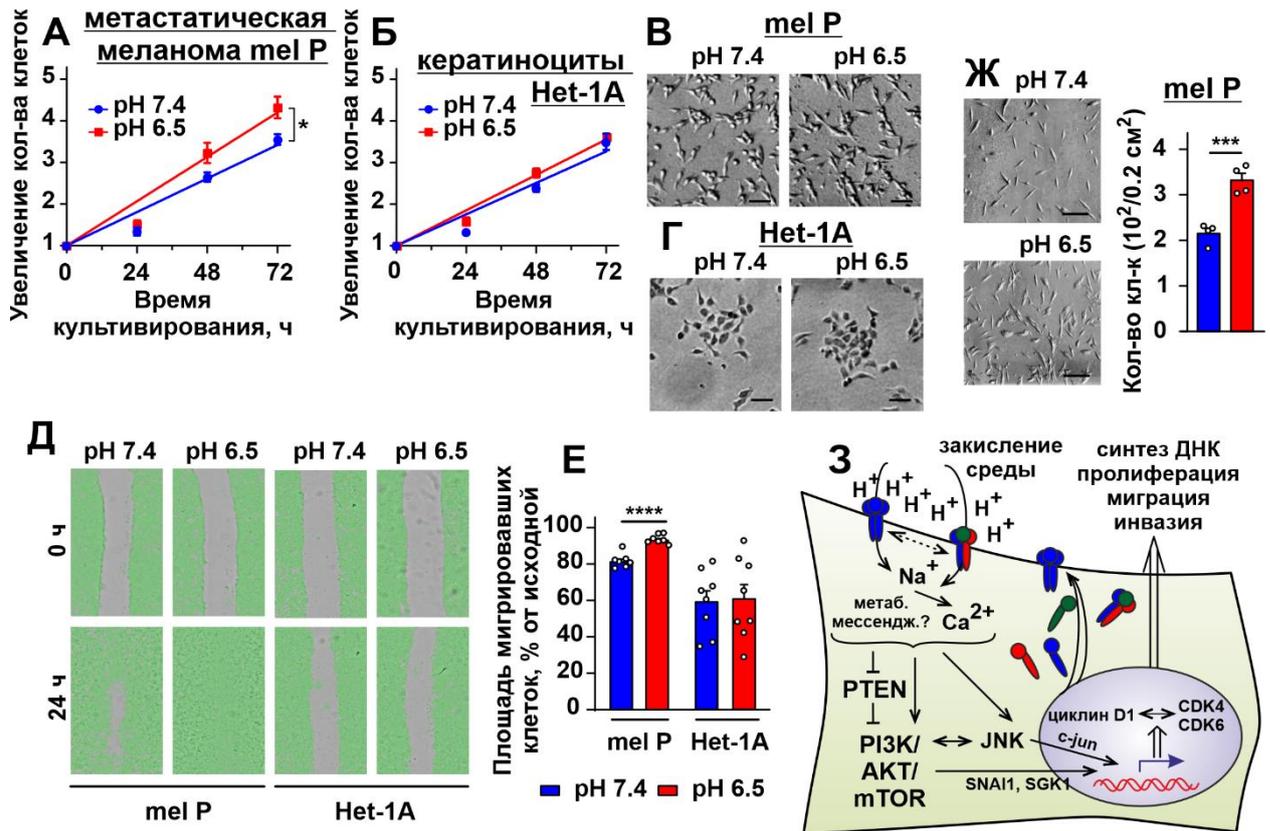
Полученные результаты свидетельствуют, что адаптация опухолевых, но не нормальных клеток к закислению внешней среды происходит за счет формирования положительной обратной связи между активацией ионных каналов, содержащих ASIC1a, и поверхностной экспрессией сенсоров протонов.

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

Адаптационный механизм, активируемый в опухолевых клетках при падении внешнего pH, в конечном счете стимулировал как рост клеток опухоли, приводя к уменьшению их времени удвоения (Рис. 6А). Однако, закисление внешней среды не влияло на рост нормальных клеток с пониженной экспрессией ASIC1a и  $\gamma$ -ENaC (Рис. 6Б). При этом, опухолеспецифическая адаптация к закислению внешней среды не влияла на морфологию как нормальных клеток, так и клеток неоплазии (Рис. 6В,Г). Изучение подвижности клеток в монослое показало, что закисление внешней среды также усиливало миграцию опухолевых, но не нормальных клеток

(Рис. 6Д,Е). Кроме того, адаптация клеток опухоли к закислению приводила также к усилению их инвазии, при котором большее количество клеток проходило через пористую мембрану (Рис. 6Ж).

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 (Рис. 6З).

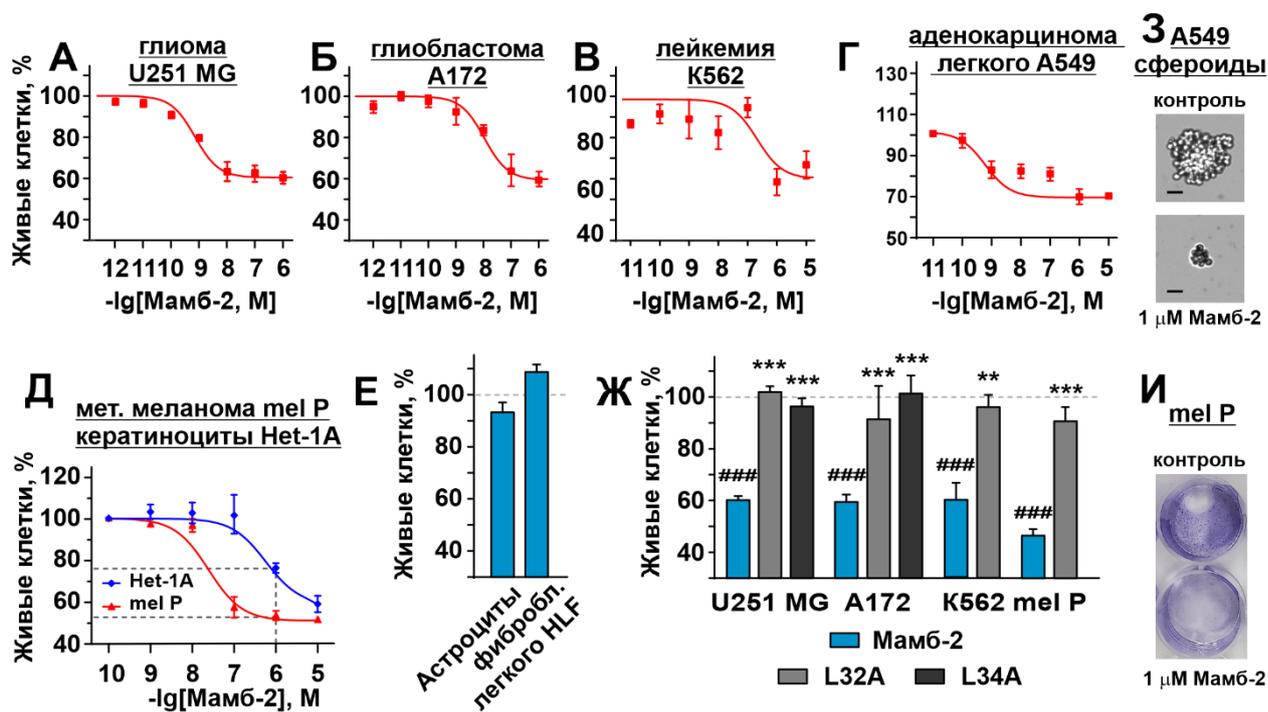


**Рис. 6.** Влияние закисления внешней среды на рост клеток метастатической меланомы mel P и нормальных кератиноцитов. А, Б. Динамика роста клеток mel-P (А) и Het-1A (Б) при культивировании при рН 7,4 и 6,5 (n = 5). \* (p < 0,05) указывает на разницу между наклонами линий регрессии по F-тесту. В, Г. Влияние подкисления клеточной среды на морфологию клеток mel P (В) и клеток Het-1A (Г), шкала 25 мкм. Д. Репрезентативные фотографии теста на зарастание раны, при инкубации клеток mel P (слева) и Het-1A (справа) при рН 7,4 и 6,5. Е. Площадь раны, занимаемая мигрирующими клетками (n = 7-8), \*\*\*\* (p < 0,0001) указывает на различие между группами данных по двустороннему t-тесту. Ж. Репрезентативные изображения, клеток mel P, мигрировавших через поры 8 мкм при рН 7, 4 и 6, 5 (шкала = 20 мкм). Количество мигрировавших через дно камеры клеток (n = 4). \*\*\* (p < 0,001) указывает на различие между группами данных по двустороннему t-тесту. З. Схема опухолеспецифического адаптационного механизма, активируемого при закислении внешней среды.

## 2. Молекулярные механизмы ингибирования протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a

## 2.1. Блокирование входящих протон-чувствительных токов мамбалгином-2 тормозит рост и миграцию опухолевых клеток при закислении внешней среды

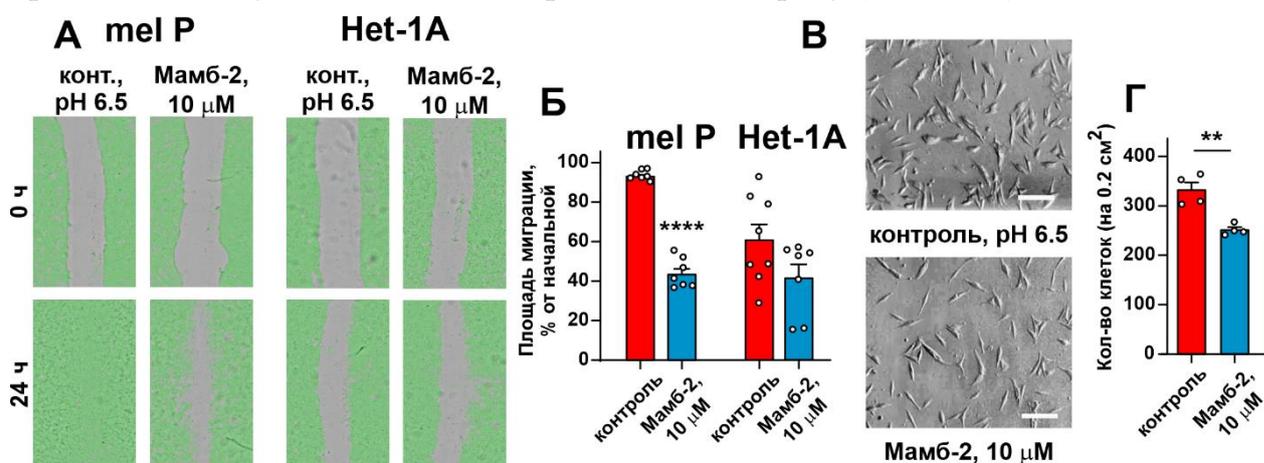
Для того, чтобы выяснить, как опухолевые клетки будут вести себя при блокаде адаптационного механизма к закислению внешней среды, нами был использован рекомбинантный аналог ингибитора ASIC1a-содержащих протон-чувствительных каналов мамбалгин-2. Анализ пролиферации клеток по активности митохондриальных редуктаз МТТ и WST-1 тестами показал, что мамбалгин-2 тормозил рост опухолевых клеток различного происхождения на ~ 50 – 60 % с полумаксимальными эффективными концентрациями в наномолярном диапазоне (Рис. 7А-Д).



**Рис. 7.** Влияние мамбалгина-2 на рост опухолевых и нормальных клеток при закислении среды. А-Д. Действие мамбалгина-2 на рост клеток U251 MG (А), A172 (Б), K562 (В), A549 (Г), mel P и Het-1A (Д) при 72-часовой инкубации. Е. Влияние мамбалгина-2 на рост нормальных астроцитов и фибробластов легкого HLF (n = 4-6). # (p < 0,05), ## (p < 0,01) и ### (p < 0,001) означают отличие данных от контроля по One-sample t-тесту. Ж. Влияние мамбалгина-2 и его мутантных вариантов с заменами L32A и L34A на жизнеспособность опухолевых клеток. #### (p < 0,001) означает отличие данных от контроля по One-sample t-тесту, \*\* (p < 0,01) и \*\*\* (p < 0,001) означают отличие группы данных от эффекта мамбалгина согласно двустороннему t-тесту. З – влияние мамбалгина-2 на рост сфероидов из клеток A549. И – влияние мамбалгина-2 на формирование колоний клетками mel P.

При этом, мамбалгин-2 не влиял на пролиферацию нормальных астроцитов, не экспрессирующих ASIC1a и фибробластов легкого, в которых нет ни ASIC1a, ни  $\alpha$ -ENaC (Рис. 7Е). Торможение роста кератиноцитов, которые экспрессируют ASIC1a,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC достигается при значительно больших концентрациях мамбалгина-2 (Рис. 7Д), что свидетельствует о наличии «фармакологического окна» - диапазона концентраций, при котором мамбалгин-2 тормозит рост опухолевых, но не нормальных клеток. Мутантный вариант мамбалгина-2, в которых лейцины в положениях 34 и 32 заменены на аланины, и которые из-за

этого не способны взаимодействовать с ASIC1a, не влияли на рост опухолевых клеток, что свидетельствует о взаимодействии мамбалгина-2 с ASIC1a в чувствительных к белку клетках. Полученный результат также говорит о том, что мамбалгин-2 взаимодействует с ASIC1a посредством гидрофобного участка центральной петли, и именно связывание гидрофобного участка с  $\alpha 5$ -спиралью thumb домена ASIC1a определяет его антипролиферативные свойства. Мамбалгин-2 также подавлял рост мультиклеточных сфероидов из клеток аденокарциномы легкого и предотвращал формирование колоний клетками метастатической меланомы (Рис. 73,И). Ингибирование ASIC1a-содержащих каналов мамбалгином-2 подавляло миграцию клеток меланомы, не влияя на подвижность кератиноцитов (Рис. 8А,Б). Также, мамбалгин-2 ингибировал инвазию клеток меланомы, тормозя прохождение опухолевых клеток через 8-мкм мембрану (Рис. 8В,Г).

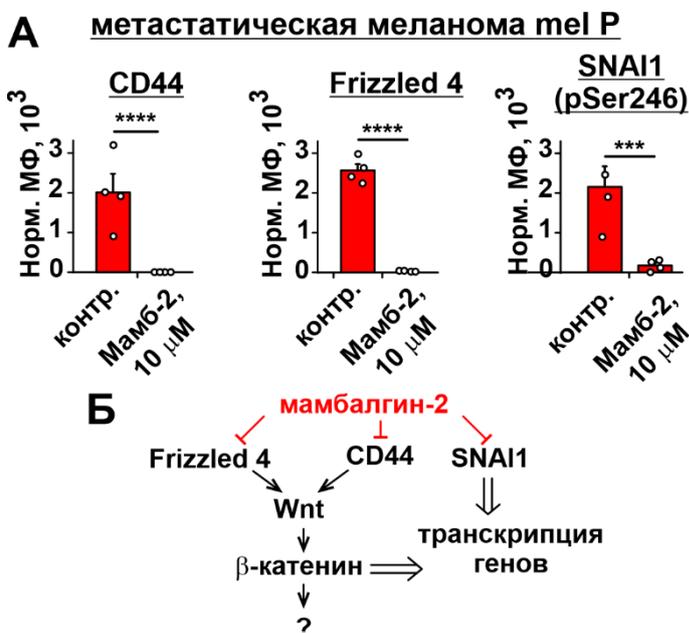


**Рис. 8. Влияние мамбалгина-2 на миграцию и инвазию клеток mel P и подвижность кератиноцитов Het-1A.** А. Репрезентативные фотографии теста на заращивание раны, при инкубации клеток mel P (слева) и Het-1A (справа) без и с 10 мкМ мамбалгина-2 при pH 6,5. Б. Площадь раны, занимаемая мигрирующими клетками (n = 7), \*\*\*\* (p < 0,0001) указывает на отличие от контроля по двустороннему t-тесту. В. Репрезентативные изображения, клеток mel P, мигрировавших через поры 8 мкм в отсутствие и присутствии 10 мкМ мамбалгина-2 при pH 6,5 (шкала = 20 мкм). Количество мигрировавших через дно камеры клеток (n = 4). \*\* (p < 0,01) указывает на различие между группами данных по двустороннему t-тесту.

Таким образом, открытие протон-чувствительных каналов ASIC1a запускает в опухолевых, но не нормальных клетках комплексную адаптацию к закислению, в то время как аллостерическое ингибирование ASIC1a-содержащих каналов за счет взаимодействия гидрофобного участка центральной петли мамбалгина-2 с  $\alpha 5$ -спиралью thumb домена ASIC1a тормозит процессы онкопрогрессии при закислении среды. То, что при действии мамбалгина-2 в опухолевых клетках не активируются протон-чувствительные токи, говорит о нарушении адаптационного механизма клеток опухолей на самой ранней стадии, однако сильный эффект может быть объяснен только дополнительным действием на митогенные и сигнальные пути в клетках.

## 2.2. 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, приводило к падению активности транскрипционного фактора SNAI1, что проявилось в уменьшении уровня фосфорилирования белка по серину в 246 положении (Рис. 9). SNAI1 стабилизируется при активации сигнального каскада Wnt, 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. 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. Таким образом, снижение активности SNAI1 приводит к ингибированию роста, миграции и инвазии опухолевых клеток.



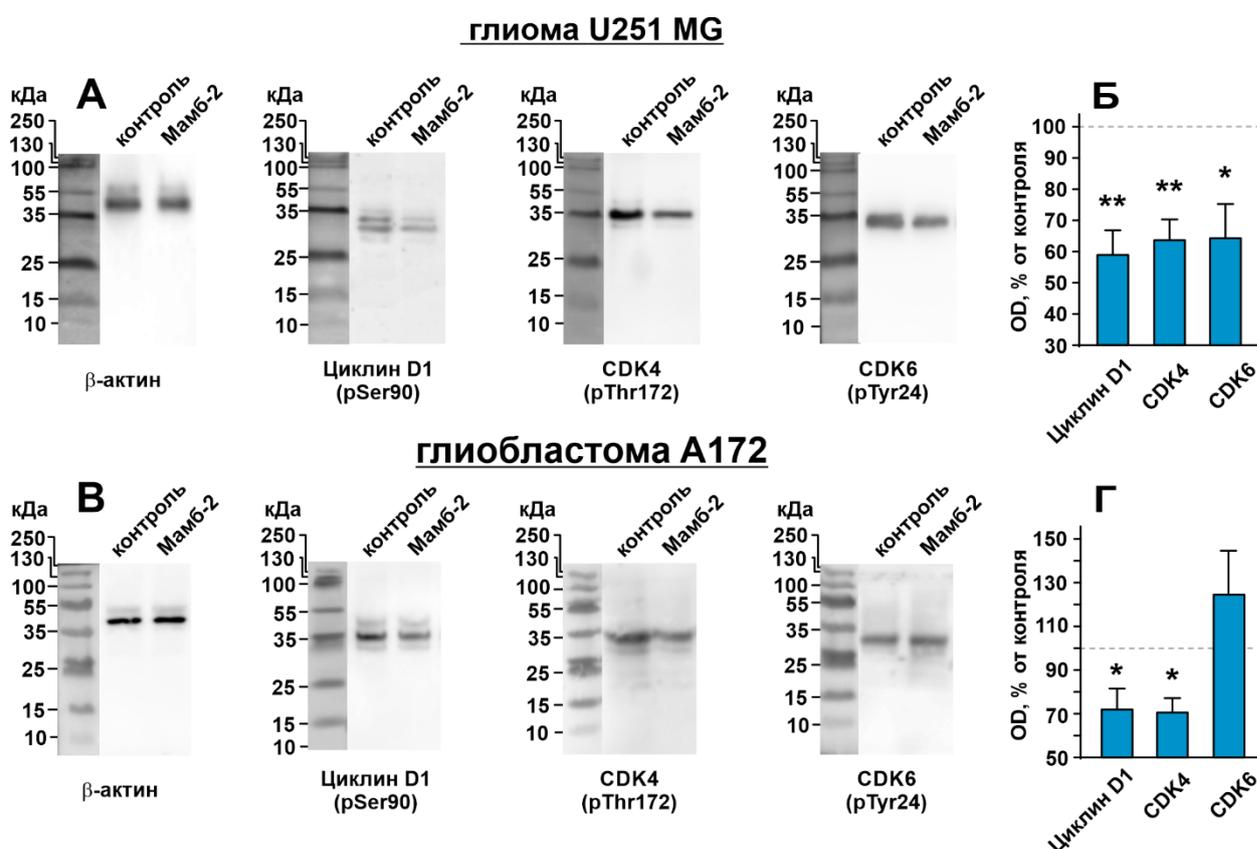
**Рис. 9. Анализ влияния блокировки открытия ASIC1a-содержащих каналов мамбалгином-2 на экспрессию и активность факторов, регулирующих рост и миграцию в клетках mel P. А – анализ экспрессии и активности про-онкогенных факторов проточной цитофлуориметрией. \*\*\* (p < 0,001) и \*\*\*\* (p < 0,0001) означают отличие между группами данных согласно двустороннему t-тесту. Б. – молекулярные механизмы, запускаемые ингибированием каналов семейства DEG/ENaC, содержащих ASIC1a мамбалгином-2 в опухолевых клетках.**

Также ингибирование ASIC1a-содержащих каналов мамбалгином-2 снижало экспрессию CD44 и Frizzled4 на поверхности опухолевых клеток (Рис. 9). CD44 способствует росту и миграции опухолевых клеток посредством активации EGFR, PI3K/АКТ/mTOR пути и Wnt/β-катенин-сигнального каскада, после чего β-катенин может активировать транскрипцию циклина D1. Снижение экспрессии CD44, таким образом, приводит к торможению митогенных и про-миграционных механизмов в клетках неоплазии. Frizzled4 является рецептором норрина, который, как и CD44, активирует Wnt/β-катенин-сигнальный каскад. Так как Wnt сигнальный путь регулирует транскрипцию многих генов посредством β-катенина, а также усиливает выход кальция из эндоплазматического ретикулума посредством активации IP3, ингибирование этого каскада за счет уменьшения экспрессии CD44 и Frizzled4 приводит к торможению роста и миграции опухолевых клеток. Таким образом, механизм эффекторного действия мамбалгина-2 состоит не только в ингибировании открытия протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a,

но и в дополнительном к этому уменьшении активности митогенных и про-миграционных сигнальных каскадов и транскрипции генов.

### 2.3. 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 опухолевых клетках.



**Рис. 10.** Анализ фосфорилирования циклина D1 и циклин-зависимых киназ CDK4 и CDK6 в клетках глиомы U251 (А,Б) и глиобластомы A172 (В,Г). А, В – репрезентативные изображения Вестерн-блоттинга, показывающего влияние закисления среды на фосфорилирование циклина D1, циклин-зависимых киназ CDK4 и CDK6 при ингибировании ASIC1a-содержащих каналов в клетках глиомы U251 MG (А) и глиобластомы A172 (Б). В,Г – количественный анализ уровней экспрессии циклина D1, циклин-зависимых киназ CDK4 и CDK6 при ингибировании ASIC1a-содержащих каналов в клетках глиомы U251 MG (В) и глиобластомы A172 (Г) \* ( $p < 0,05$ ) и \*\* ( $p < 0,01$ ) указывают на отличие от контроля (необработанные клетки без блокады канала) по двустороннему t-тесту.

Посредством Вестерн-блоттинга было показано, что в опухолевых клетках различного происхождения при ингибировании ASIC1a мамбалгином-2, закисление внешней среды приводило к снижению фосфорилирования серина 90 у циклина D1, а также триптофана 172 и тирозина 24 у циклин-зависимой киназы

CDK4, соответственно (Рис. 10). В клетках глиомы при падении рН внешней среды падало фосфорилирование серина 90 у циклина D1 и триптофана 172 у циклин-зависимой киназы CDK4, но также уменьшалось и фосфорилирование CDK6. Циклин D1 образует комплекс с циклин-зависимыми киназами CDK4 и CDK6, в составе которого активирует их, после чего комплексы инактивируют белок ретинобластомы Rb гиперфосфорилированием (например, по серинам в положениях 608, 795, 807 и др.), что запускает транскрипцию генов, отвечающих за синтез ДНК и переходу клеток из G1 в S-фазу. Таким образом, ингибирование образования данного комплекса будет способствовать уменьшению синтеза ДНК и аресту клеточного цикла. Действительно, анализ клеточного цикла при помощи окрашивания ДНК иодидом пропидия показал, что в клетках U251 MG и K562 ингибирование ASIC1a мамбалгином-2 приводило к аресту клеточного цикла в S и G1 фазах, соответственно, а в клетках A549 и A172 арест клеточного цикла отмечался в G2/M фазе (на Рис. 11А,Б показан арест клеточного цикла в клетках U251 MG и A172).

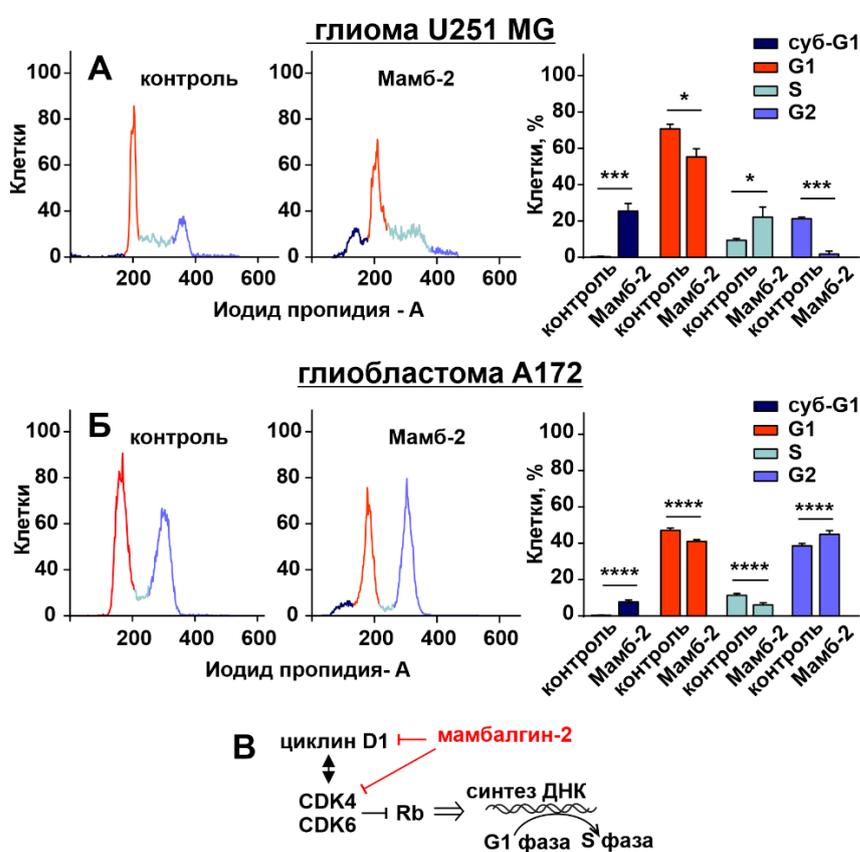


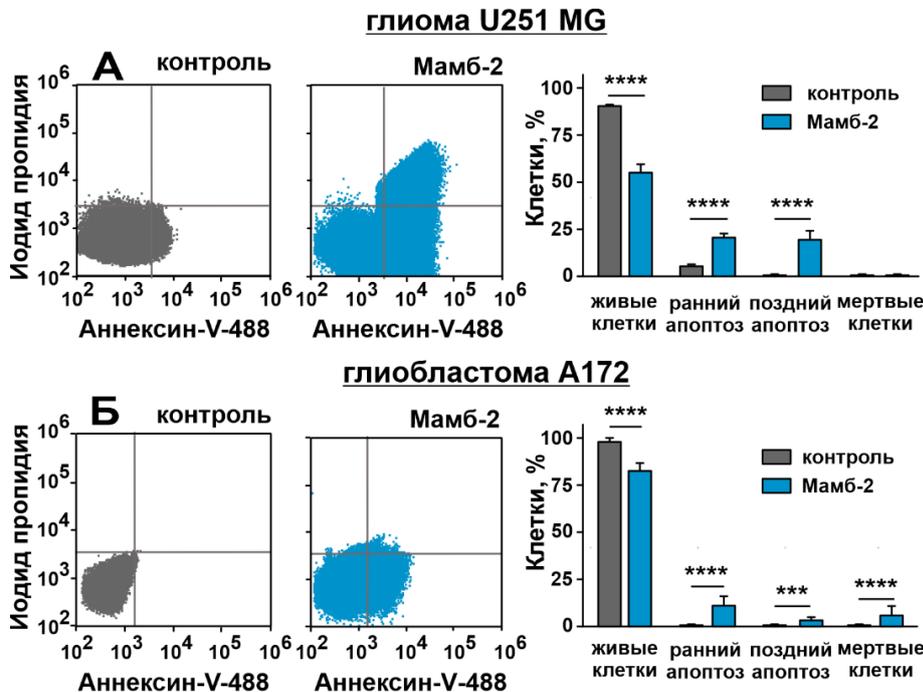
Рис. 10. Анализ влияния ингибирования ASIC1a-содержащих каналов мамбалгином-2 на прохождение клеточного цикла клетками U251 MG (А) и A172 (Б). Гистограммы распределения ядер клеток при их окрашивании иодидом пропидия и % клеток в каждой фазе клеточного цикла (слева и справа, соответственно). \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001) и \*\*\*\* (p < 0,0001) указывают на различие между группами данных по двустороннему t-тесту. В – молекулярный механизм ареста клеточного цикла в опухолевых клетках при закислении среды и

блокаде ASIC1a.

Арест клеточного цикла на разных стадиях может быть связан с различным репертуаром генов, экспрессируемых субпопуляциями клеток линий разного происхождения. Интересно, что в случае клеток U251 MG, A172 (Рис. 11) и A549 наблюдалось образование суб-G1 пика, что свидетельствует о фрагментации ДНК в клетках.

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

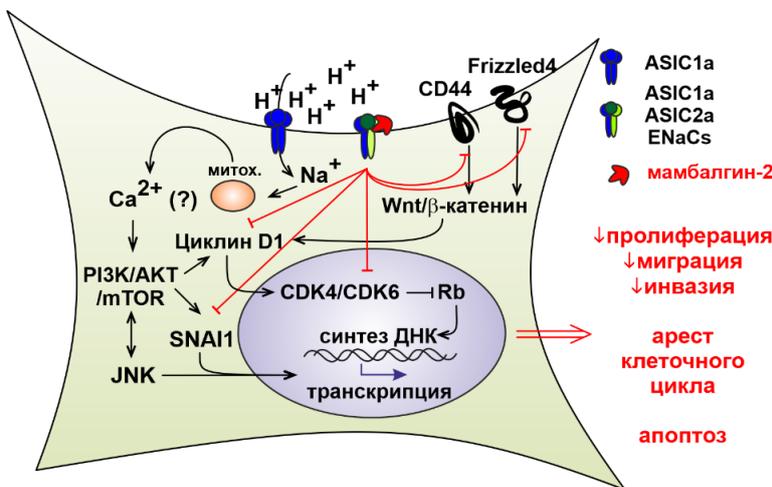
В связи с тем, что фрагментация ДНК характерна для процессов апоптотической гибели, был проведен анализ экстернализации фосфатидилсерина на мембране опухолевых клеток. Проточная цитометрия с Alexa488-меченным аннексином V, связывающим маркер раннего апоптоза фосфатидилсерин на поверхности клетки и пропидием иодида, проникающим только в клетку с разрушенной мембраной, показал, что в клетках глиомы, аденокарциномы легкого и меланомы происходит индукция апоптоза (на Рис. 12 представлен анализ индукции апоптоза в клетках U251 MG и A172).



**Рис.12. Анализ экстернализации фосфатидилсерина в клетках U251 MG (А) и A172 (Б).** Репрезентативные распределения клеток по окрашиванию аннексином V-488 и иодидом пропидия и % клеток на разных стадиях апоптоза показаны на левых и правых панелях, соответственно. \* (p < 0,05), \*\*\* (p < 0,001) и \*\*\*\* (p < 0,0001) означают отличие

между контрольными и обработанными мамбалгином-2 клетками согласно двустороннему t-тесту.

Это проявляется в увеличении количества клеток, с экстернализованным фосфатидилсерин, при этом у части таких клеток уже наблюдалось и разрушение целостности мембраны, и они связывали как аннексин V, так и иодид пропидия, что говорит уже о поздних стадиях апоптоза, при которых происходит



не только экстернализация фосфатидилсерина, но и разрушение структурной целостности мембраны клетки.

**Рис. 13. Молекулярные механизмы, запускаемые в опухолевых клетках при падении рН внешней среды и ингибировании каналов DEG/ENaC, содержащих субъединицу ASIC1a.**

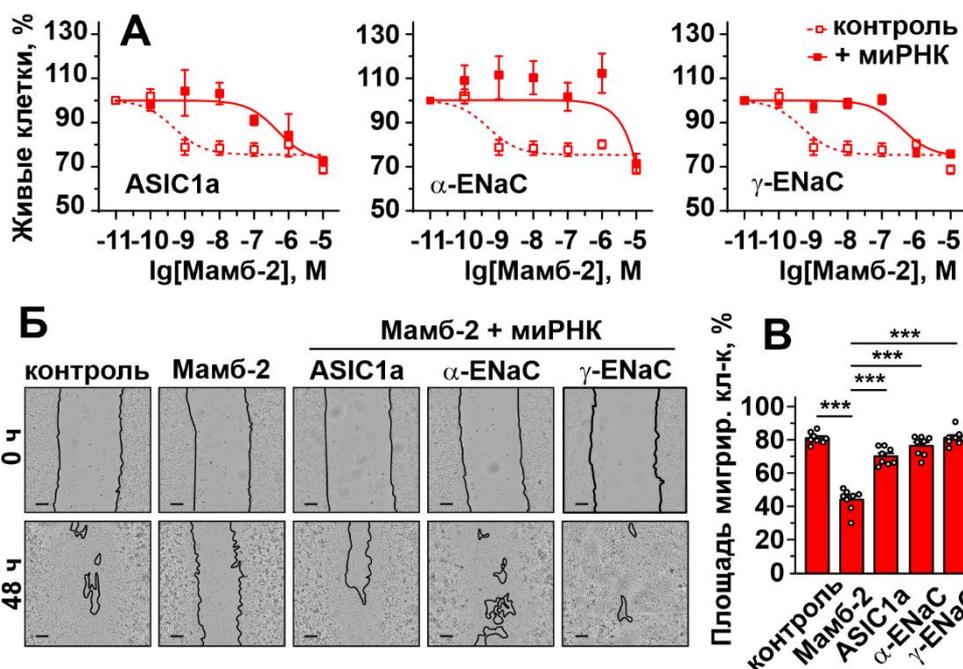
Для клеток глиобластомы наблюдалась только экстернализация фосфатидилсерина, что говорит о ранних стадиях апоптоза (Рис. 12Б).

Таким образом, ингибирование ASIC1a-содержащих протон-чувствительных каналов не позволяет клеткам адаптироваться к кислой среде, что приводит к блокированию в них протон-чувствительных токов, уменьшению активности митогенных и про-миграционных сигнальных путей, останавливает клеточное деление, приводя к апоптозу (Рис. 13).

### 3. Гетеротример ASIC1a/ $\alpha$ -ENaC/ $\gamma$ -ENaC как молекулярная мишень мамбалгина-2 в опухолевых клетках

#### 3.1. Эффекты мамбалгина-2 в опухолевых клетках опосредованы экспрессией протон-чувствительных каналов, содержащих субъединицы ASIC1a, $\alpha$ -ENaC и $\gamma$ -ENaC

Известно, что для клеток глиом на поздних стадиях, но не для нормальных астроцитов, характерно формирование опухолевоспецифичного гетеротримера, состоящего из субъединиц ASIC1a,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC, поэтому в рамках работы было проведено уточнение мишени мамбалгина-2 в опухолевых клетках. Для этого в клетках аденокарциномы легкого был проведен «нокдаун» экспрессии ASIC1a,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC и проанализировано влияние закисления внеклеточной среды на рост и миграцию клеток при инкубации их с мамбалгином-2.



**Рис. 14.** Влияние «нокдауна» экспрессии ASIC1,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC на активность мамбалгина-2 в клетках рака легкого A549. А. Анализ влияния нокдауна генов ASIC1,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC на рост клеток A549. Б. Репрезентативные фотографии теста на заращание раны, при инкубации клеток

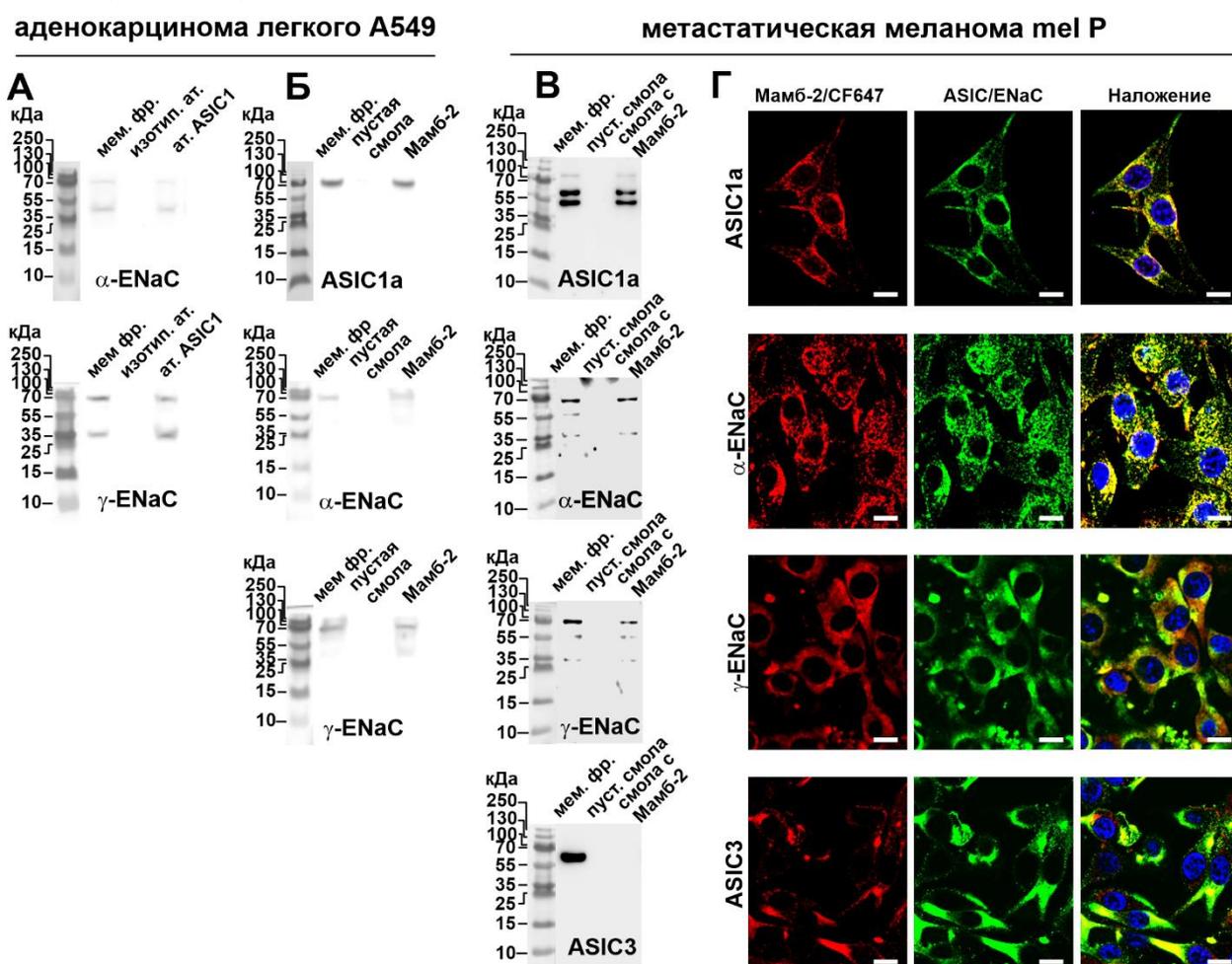
A549 с уменьшенной экспрессией ASIC1,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC с 10 мкМ мамбалгина-2 при pH 5,5. В. Площадь раны, занимаемая мигрирующими клетками (n = 8), \*\*\* (p < 0,001) указывает на отличие групп данных по One-Way ANOVA/Tukey.

Нокдаун ASIC1a значительно уменьшал как торможение роста и миграции клеток при ингибировании каналов ASIC1a мамбалгином-2, что указывает на вовлечение ASIC1a в контроль роста и миграции клеток аденокарциномы легкого при низких значениях pH (Рис. 14). Однако, как «нокдаун»  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC, так же, как и ASIC1a, приводил к отмене антипролиферативного и противомиграционного эффектов

мамбалгина-2 на клетках A549 (Рис. 14). Это указывает на то, что эффекты, связанные с аллостерическим ингибированием протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a субъединицу, опосредует не только ASIC1a, но и  $\alpha$ -, а также  $\gamma$ -ENaC.

### 3.2. Ингибирование прогрессии опухолей мамбалгином-2 достигается за счет связывания с гетерокомплексом из субъединиц ASIC1a, $\alpha$ -ENaC и $\gamma$ -ENaC

Формирование гетерокомплекса между ASIC1a,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC было подтверждено при помощи иммунопреципитации мембранной фракции клеток аденокарциномы легкого со смолой, конъюгированной с антителами к ASIC1a. Выявлено, что ASIC1a в мембранной фракции клеток связывался и с  $\alpha$ -ENaC и с  $\gamma$ -ENaC (Рис. 15А).



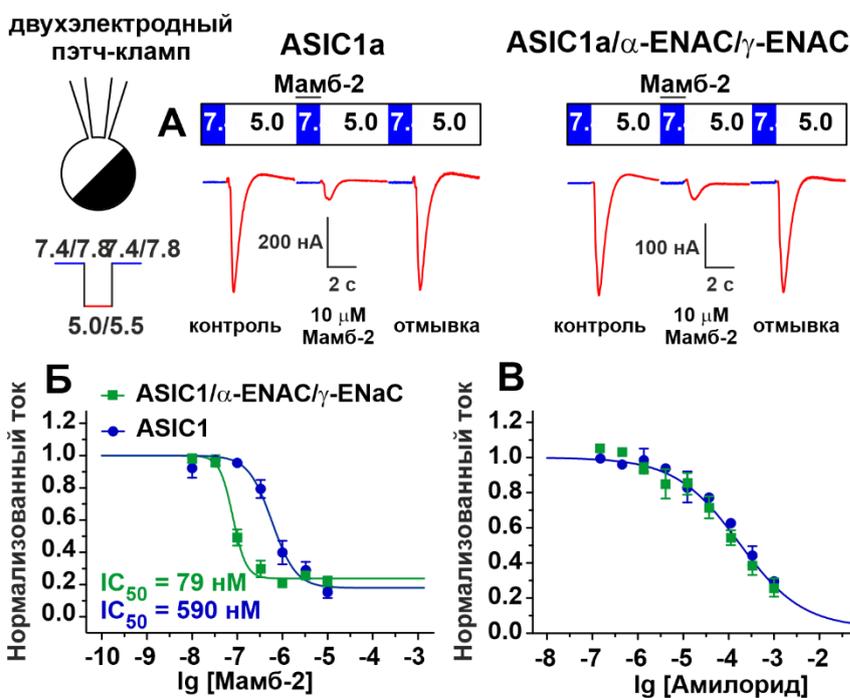
**Рис. 15.** Анализ молекулярных мишеней мамбалгина-2 в опухолевых клетках. А. Анализ субъединиц каналов DEG/ENaC, выделенных из мембранной фракции клеток A549 после иммунопреципитации с антителом на ASIC1 (n = 4). Б. Анализ субъединиц, экстрагируемых мамбалгином-2 из мембранной фракции клеток A549 посредством Вестерн-блоттинга (n = 4). В. Анализ субъединиц, 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,  $\alpha$ -ENaC,  $\gamma$ -ENaC и ASIC3 (зеленый). Ядра окрашивали Хехстом 33342 (синий), шкала 10 мкм.

Для изучения возможности взаимодействия мамбалгина-2 с тремя субъединицами каналов семейства DEG/ENaC, мамбалгин-2 был конъюгирован с NHS-сефарозой и проинкубирован с мембранной фракцией клеток аденокарциномы легкого и метастатической меланомы. Вестерн-блоттинг показал,

что мамбалгин-2 связывался в мембранных фракциях обоих типов клеток как с ASIC1a, так и с  $\alpha$ -ENaC, и с  $\gamma$ -ENaC (Рис. 15Б,В). Конфокальная микроскопия показала, что в клетках метастатической меланомы флуоресцентно-меченный мамбалгин-2/Alexa-647 со-локализовался с субъединицами ASIC1a,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC, но не ASIC3 (Рис. 15Г). Полученные результаты указывают на то, что торможение прогрессии опухолей при ингибировании протон-чувствительных каналов мамбалгином-2 опосредуется его взаимодействием с гетерокомплексом, содержащим ASIC1a,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC.

### 3.3. Мамбалгин-2 ингибирует гетеротример ASIC1a/ $\alpha$ -ENaC/ $\gamma$ -ENaC значительно эффективнее, чем гомотример ASIC1a

Для сравнения эффективности аллостерического ингибирования мамбалгином-2 гомотримеров из субъединиц ASIC1a и гетеротримера, состоящего из ASIC1a/ $\alpha$ -ENaC/ $\gamma$ -ENaC были проведен двухэлектродный пэтч-кламп в ооцитах *Xenopus laevis*, показавший, что мамбалгин-2 значительно эффективнее ингибирует гетеротример из ASIC1a,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC, чем гомотримерный ASIC1a (Рис. 16А,Б)<sup>3</sup>.



Полумаксимальная концентрация ингибирования для гетеро и гомотримеров составляла  $\sim 79$  и  $590$  нМ, соответственно. При этом, блокатор поры протон-чувствительных каналов амилорид ингибировал ток через гомо- и гетеротримеры с одинаковой полумаксимальной эффективностью в  $\sim 168$  мкМ (Рис. 16Б). Таким образом, именно взаимодействие мамбалгина-2 с аллостерическим сайтом внешней части thumb домена ASIC1a позволяет эффективнее ингибировать работу протон-чувствительных каналов, содержащих ASIC1a.

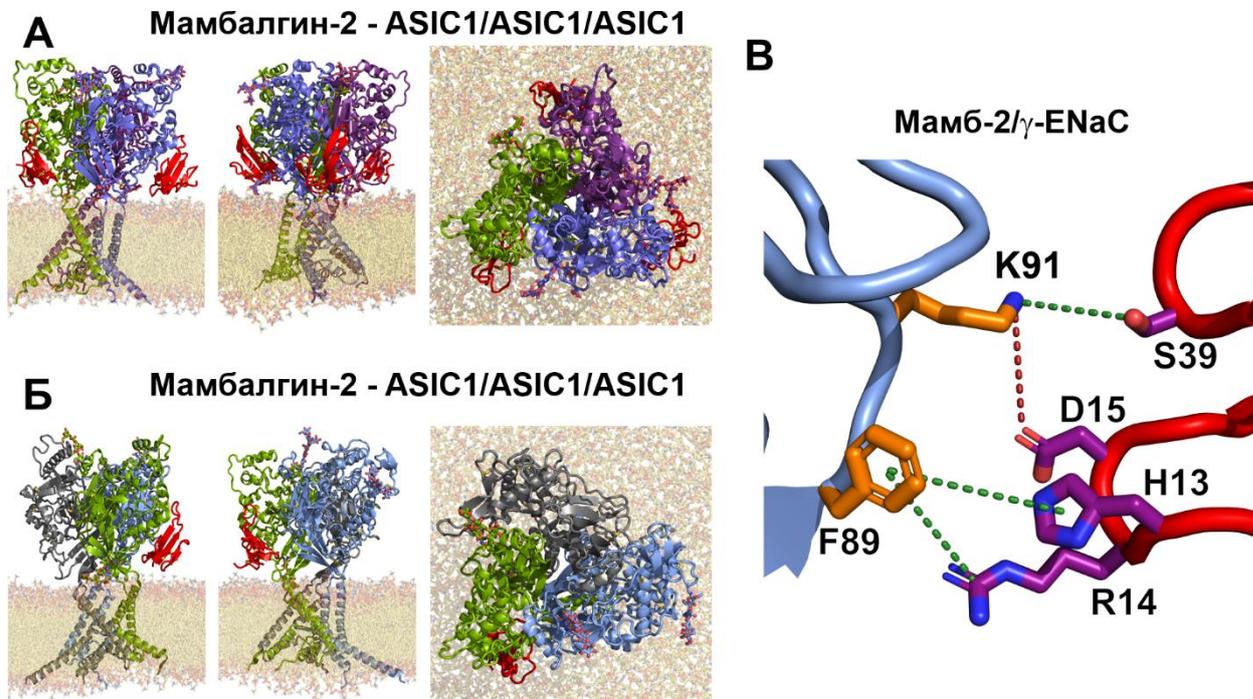
### 3.4. Мамбалгин-2 формирует более устойчивые ионные и гидрофобные контакты с гетеротримером ASIC1a/ $\alpha$ -ENaC/ $\gamma$ -ENaC по сравнению с гомотримером ASIC1a

Для выяснения причины более эффективного ингибирования тока через гетеротример ASIC1a/ $\alpha$ -ENaC/ $\gamma$ -ENaC, чем через гомотример ASIC1a, было

3 Исследование активности мамбалгина-2 на ооцитах *X. laevis* проведено совместно с Осмаковым Д.И. и Кошелевым С.А. (лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН) и Кульбацким Д.С. (лаборатория биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов ИБХ РАН).

проведено молекулярное моделирование взаимодействия мамбалгина-2 с двумя этими каналами<sup>4</sup>. Согласно полученным данным, мамбалгин связывается с гомотримером ASIC1a на интерфейсе между главной (+) и вспомогательной (-) субъединицами. Наложение структуры субъединицы  $\gamma$ -ENaC на место ASIC1a(-) позволило предположить появление дополнительных сильных контактов между «головой» молекулы мамбалгина-2 и  $\gamma$ -ENaC. Эти контакты объясняют большую аффинность мамбалгина-2 к гетеротримеру  $\alpha$ -ENaC/ASIC1/ $\gamma$ -ENaC в сравнении с гомотримером ASIC1a.

Расчеты молекулярной динамики (МД) показали, что мамбалгин-2 сходным образом взаимодействует с главной (+) субъединицей интерфейса, в случае гетеротримерного и гомотримерного каналов представленной ASIC1a, и эти взаимодействия характеризуются схожими временами жизни контактов. Однако, для вспомогательной (-) субъединицы, представленной  $\gamma$ -ENaC и ASIC1a, соответственно, наблюдались значительные отличия (Рис. 17А,Б). В частности, между молекулой мамбалгина-2 и  $\gamma$ -ENaC(-) наблюдались дополнительные ионные взаимодействия D15-K91 и D15-R90. Кроме того, с субъединицей  $\gamma$ -ENaC(-) формировалось большее число устойчивых полярных и гидрофобных контактов нежели с ASIC1a(-), например, Н13 мамбалгина-2 кратковременно взаимодействует с А81 в ASIC1, но формирует устойчивый контакт с F89 в  $\gamma$ -ENaC. В комплексе мамбалгин-2/гетеротример также наблюдалось дополнительное взаимодействие S39-K91 (Рис. 17А,В).



**Рис. 17. Моделирование комплекса мамбалгина-2 с гомотримером ASIC1a и гетеротримером  $\alpha$ -ENaC/ASIC1a/ $\gamma$ -ENaC.** А – Модель комплекса ASIC1/мамбалгин-2. Мамбалгин-2 показан красным, субъединицы ASIC1 — зелёным, синим и фиолетовым. Б – Комплекс  $\alpha$ -ENaC/ASIC1/ $\gamma$ -ENaC/мамбалгин-2. Мамбалгин-2 показан красным, субъединица ASIC1 — зелёным,  $\alpha$ -ENaC — серым,  $\gamma$ -ENaC — голубым. Показан вид комплексов сбоку и сверху.

---

<sup>4</sup> Молекулярное моделирование проведено совместно с Заиграевым М.М. (лаборатория структурной биологии ионных каналов ИБХ РАН).

В – Ионные (красная линия) и полярные/гидрофобные (зеленые линии) контакты мамбалгина-2 с  $\gamma$ -ENaC. Основная цепь молекулы мамбалгин-2 показана красным,  $\gamma$ -ENaC – голубым. Субъединицы  $\alpha$ -ENaC, ASIC1 и мембрана не показаны.

Таким образом, мамбалгин-2 в комплексе с тримером канала формирует более устойчивые ионные и гидрофобные контакты с  $\gamma$ -ENaC(–), а не с ASIC1(–) субъединицей.

## 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,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -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,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -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,  $\alpha$ -ENaC и  $\gamma$ -ENaC субъединицами протон-чувствительных каналов DEG/ENaC и ингибирует токи через гетеротримерный канал ASIC1a/ $\alpha$ -ENaC/ $\gamma$ -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  $\gamma$ -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/AKT/mTOR путей) в клетках метастатических меланом

2. Падение внешнего pH 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/ $\alpha$ -ENaC/ $\gamma$ -ENaC. Мамбалгин-2 ингибирует гетеротримерный канал ASIC1a/ $\alpha$ -ENaC/ $\gamma$ -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  $\gamma$ -ENaC (-), а не с ASIC1 (-) субъединицей.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи:

1. Sudarikova A.V.\*, Bychkov M.L.\*, Kulbatskii D.S.\*, Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Shlepova O.V., Shulepko M.A., Koshelev S.G., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. Mambalgin-2 inhibits lung adenocarcinoma growth and migration by selective interaction with ASIC1/ $\alpha$ -ENaC/ $\gamma$ -ENaC heterotrimer. *Front Oncol*, 2022, 12:904742. (\*одинаковый вклад авторов).
2. Bychkov M.L., Kirichenko A.V., Shulepko M.A., Mikhaylova I.N., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova, E.N. Mambalgin-2 inhibits growth, migration, and invasion of metastatic melanoma cells by targeting the channels containing an ASIC1a subunit whose up-regulation correlates with poor survival prognosis. *Biomedicines*, 2021, 9:1324.
3. Bychkov M.L., Shulepko M.A., Osmakov D.A., Andreev Y.A., Sudarikova A.V., Vasileva V.Y., Pavlyukov M.S., Latyshev Y.A., Potapov A.A. Kirpichnikov M.P., Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N. Mambalgin-2 induces cell cycle arrest and apoptosis in glioma cells via interaction with ASIC1a. *Cancers*, 2020, 12(7):1837.
4. Bychkov M.L., Shulepko M.A., Vasileva V.Y., Sudarikova A.V., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. ASIC1a inhibitor mambalgin-2 suppresses the growth of leukemia cells by cell cycle arrest. *Acta Naturae*, 2020, 12(2):101–16.

### Материалы конференций:

1. Bychkov M.L., Sudarikova A.V., Kulbatskii D.S., Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Shlepova O.V., Shulepko M.A., Koshelev S.G., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. In search of selective anticancer drugs: ASIC1/ $\alpha$ -ENaC/ $\gamma$ -ENaC heterotrimer is a new target of Mambalgin-2 from *Dendroaspis polylepis*. 21<sup>st</sup> IST World Congress, Абу-Даби, ОАЭ, 2022, Abstract book:4.
2. Бычков М.Л., Шулепко М.А., Васильева В.Ю., Сударикова А.В., Кирпичников М.П., Люкманова Е.Н. ингибитор ASIC1a мамбалгин-2 тормозит рост клеток лейкемии, вызывая арест клеточного цикла. *Биотехнология: состояние и перспективы развития*, Москва, Россия, 2021. Москва. Сборник тезисов:234.
3. Bychkov M.L., Shulepko M.A., Vasylieva V.Y., Shlepova O.V., Sudarikova A.V., Lyukmanova E.N. Mambalgin-2 selectively inhibits proliferation of ASIC1a-expressing cancer cells. *The regulation of proteostasis in cancer*, Санкт-Петербург, Россия, 2019, *Cell Death Discovery*, 2020, 6(S1):RPC05.
4. Bychkov M.L., Shulepko M.A., Andreev Y.A., Osmakov D.I., Lyukmanova E.N. Three-finger toxin Mambalgin-2 from *Dendroaspis polylepis* venom reduces the growth of glioblastoma cells by inhibition of ASIC1a channels. 19<sup>th</sup> IST World Congress, Ереван, Армения, 2018, *Toxicon*, 2019, 159:S24.
5. Шлепова О.В., Бычков М.Л., Шулепко М.А., Васильева В.Ю., Сударикова А.В., Люкманова Е.Н. Подавление пролиферации глиом с помощью рекомбинантных белков семейства Луб/uPAR. *Всероссийская Конференция по молекулярной онкологии с международным участием*. Москва, Россия, 2019, *Успехи молекулярной онкологии*, 12:166-167.
6. Bychkov M.L., Kulbatskii D.S., Shlepova O.V., Loktyushov E.V., Gibadullina O.R., Shulepko M.A., Lyukmanova E.N. Recombinant analogue of Mambalgin-2 from *Dendroaspis polylepis* inhibits proliferation of glioblastoma cells. *Биомембраны-2018*, Долгопрудный, Россия, 2018, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 50(6):533.
7. Shulepko M.A., Bychkov M.L., Osmakov D.A., Andreev Y.A., Lyukmanova E.N. Mambalgin-2 from *Dendroaspis polylepis* venom, specific ASIC1a blocker channels, inhibits the growth of glial tumor cells. VI молодёжная конференция по молекулярной и клеточной биологии, Санкт-Петербург, Россия, 2018, *Сборник тезисов*:127-128.

8. Shulepko M.A., Vychkov M.L., Andreev Y.A., Osmakov D.I., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. Antiproliferative activity of mambalgin-2 from the venom of *Dendroaspis polylepsis* on glioblastoma U251MG cells. *Российско-германский симпозиум «Молекулярная нейробиология сегодня и завтра»*, Москва, Россия, 2017, Сборник тезисов:40
9. Shulepko M.A., Vychkov M.L., Andreev Y.A., Osmakov D.I., Lyukmanova E.N. Recombinant mambalgin-2 from the venom of *Dendroaspis polylepsis* reduces proliferation of human glioblastoma U251MG cells. *Биомембраны-2016*, Долгопрудный, Россия, Сборник тезисов:153.

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075-15-2020-773).*