

УДК 577.352.465

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРА CaCCinh-A01 НА АКТИВНОСТЬ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ХЛОРНЫХ КАНАЛОВ ANO6

© 2024 г. Д. О. Колесников^{а, #}, Е. Р. Григорьева^{а, #}, М. А. Номеровская^а, Д. С. Решетин^а,

А. В. Шалыгин^{а, *}, Е. В. Казначеева^{а, **}

^а Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*e-mail: shalygin.alexey@gmail.com; **e-mail: evkazn@incras.ru

[#] Равный вклад

Поступила в редакцию 14.11.2023

После доработки 05.12.2023

Принята к публикации 08.12.2023

Белки семейства аноктаминов (ANO) формируют кальций-зависимые хлорные каналы (CaCC) и фосфолипидные скрамблазы. Белок ANO6 (TMEM16F), совмещающий в себе функции кальций-зависимой скрамблазы и ионного канала, рассматривается в качестве молекулярной мишени для лечения нарушений свертываемости крови, COVID-19-ассоциированной пневмонии, нейродегенеративных заболеваний и других патологий. В качестве потенциального фармакологического препарата рассматривается CaCCinh-A01, являющийся блокатором каналов семейства ANO. Ранее эффект данного блокатора был исследован с использованием методов оценки интегральных токов ионов через мембрану, что не позволяло оценивать активность отдельных каналов. Поэтому остается неизвестным, какие характеристики каналов подвержены изменению под действием блокатора: вероятность открытого состояния, амплитуда тока через открытый канал, время жизни открытого состояния канала. Регистрируя одиночные нативные каналы ANO6 в клетках HEK293, мы показали, что действие блокатора обусловлено уменьшением как амплитуды тока через одиночные каналы ANO6, так и их времени жизни, что, в свою очередь, ведет к снижению вероятности открытого состояния каналов. Полученные данные позволяют объяснить механизм снижения интегрального тока каналов ANO6 при действии блокатора CaCCinh-A01.

Ключевые слова: CaCCinh-A01, кальций-зависимые хлорные каналы (CaCC), ANO6 (TMEM16F), метод локальной фиксации потенциала, регистрация одиночных каналов, клетки HEK293.

DOI: 10.31857/S0233475524020046, **EDN:** xugahu

ВВЕДЕНИЕ

Кальций-зависимые хлорные каналы (CaCC) участвуют в регуляции множества внутриклеточных процессов. Каналы образованы белками семейства аноктаминов (ANO). В семействе выделяют три гомолога, формирующих CaCC: хлорные каналы ANO1 (TMEM16A) и ANO2 (TMEM16B), участвующие в секреции экзокринных желез и работе нервной системы, а также белок ANO6, совмещающий функции ионного канала и фосфолипидной скрамблазы [1–3].

Часть установленных функций ANO6, таких как слияние клеток при формировании трофобласта, регуляция активации лимфоцитов, участие в коагуляции крови, связаны с его скрамблазной активностью [2, 4, 5]. Другие функции, например, минерализация костной ткани, связаны с канальной активностью ANO6 [6]. В последние годы

интерес к белкам семейства аноктаминов и к данному белку, в частности, сильно возрос в связи с ролью ANO6 во многих патофизиологических процессах, в том числе в образовании синцития легочной ткани при тяжелом течении COVID-19, нарушении свертываемости крови, развитии нейродегенеративных заболеваний и в других патологиях [2, 7–9]. Таким образом, CaCC, в частности ANO6, представляют собой важную мишень для фармакологических препаратов.

В последние годы был разработан ряд селективных блокаторов CaCC, среди которых можно выделить вещество CaCCinh-A01. Ингибитор эффективно подавляет ток через CaCC ANO1 ($IC_{50} = 7.35$ мкМ) и ANO6 ($IC_{50} = 10$ мкМ) [10, 11]. CaCCinh-A01 связывается с внеклеточной стороной канала [11]. Методами молекулярной динамики было показано, что связывание CaCCinh-A01 вызывает переход

канала в закрытое состояние [11]. Данное вещество представляет особый интерес для разработки лекарственных препаратов для лечения патофизиологических состояний, связанных с нарушением работы каналов CaCC [11, 12].

Блокатор CaCCinh-A01 подавляет активность каналов ANO6 не только при добавлении с наружной стороны мембраны, но и при добавлении с внутриклеточной стороны [13]. Механизм действия блокатора с внутриклеточной стороны на настоящий момент является предметом дискуссий.

Подавление интегрального тока через CaCC может быть связано со следующими факторами: уменьшением вероятности открытого состояния канала, времени жизни или амплитуды тока через одиночный канал. В настоящий момент неизвестно, на какой именно параметр тока одиночных каналов влияет вещество CaCCinh-A01 при добавлении с внутриклеточной стороны мембраны.

Ранее мы зарегистрировали одиночные нативные CaCC ANO6 в клетках HEK293 [14, 15]. В работе мы использовали эти каналы в качестве модельного объекта для изучения влияния применения CaCCinh-A01 с внутриклеточной стороны на активность эндогенных каналов CaCC.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная культура. Работа была проведена на клетках линии HEK293 из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировались на модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) (Россия, ПанЭко) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 1% пенициллина, 1% стрептомицина и 1% *L*-глутамина. Клетки пересеивали на покровные стекла (3 × 3 мм) за 16–48 ч до проведения опытов.

Реактивы. Все используемые реактивы произведены Sigma Aldrich (США). CaCCinh-A01 разводили в DMSO до концентрации 20 мМ, хранили при температуре –20°C. Через 3 мес хранения при –20°C действие блокатора на активность каналов ANO6 снижалось, вероятно, в связи с деградацией блокатора.

Электрофизиологические измерения токов. Токи через одиночные каналы регистрировали методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации inside-out с использованием усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments, США). Оцифровку данных осуществляли при помощи АЦП-ЦАП Digidata 1322A (Axon Instruments, США) с частотой дискретизации 5 кГц. Сигнал обрабатывали при помощи встроенного в усилитель

низкочастотного фильтра Бесселя 2 кГц. Для анализа амплитуды тока, вероятности открытого состояния каналов и презентации данных записи дополнительно фильтровали при 110 Гц. При анализе времени открытого состояния каналов дополнительная фильтрация не применялась, при этом не учитывались события короче 0.5 мс.

Раствор регистрирующей пипетки содержал: 105 мМ CaCl₂; 10 мМ Tris-HCl, pH 7.4. Расчет концентрации свободного кальция [Ca²⁺]_i проводили в программе Max Chelator (Stanford University, США). Внутриклеточный раствор с расчетным содержанием свободных ионов кальция 100 нМ [Ca²⁺]_i содержал: 130 мМ Cs-глутамат, 3.3 мМ CaCl₂, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ MgATP, 10 мМ EGTA, 10 мМ HEPES, pH 7.2. Внутриклеточный раствор с расчетным содержанием свободных ионов кальция 10 мкМ [Ca²⁺]_i содержал: 130 мМ Cs-глутамат, 9.82 мМ CaCl₂, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ MgATP, 10 мМ EGTA, 10 мМ HEPES, pH 7.2. Эксперименты проводились при комнатной температуре. Сопротивление стеклянных микропипеток составляло 7–15 МОм. Смена внеклеточного раствора осуществлялась за 10 с. В течение этого времени регистрация токов не производилась.

Для количественной оценки активности каналов использовали величину (NP_o), где N – число каналов, а P_o – вероятность открытого состояния канала. NP_o = (I)/i, где (I) – среднее значение тока через фрагмент мембраны, (i) – амплитуда тока через открытый канал. Для анализа использовали среднее NP_o, измеренное в течение 30-ти секундного интервала до и после аппликации блокатора.

Статистическая обработка данных. Обработка данных выполнялась в программе Origin2018 (Originlab, США) и Clampfit 10.3 (Molecular Devices, США). Данные проверяли на нормальность тестом Шапиро–Уилка, на равенство дисперсий тестом Левена. Для сравнения парных данных использовали односторонний парный тест Стьюдента. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего. Различия считались значимыми, если *p* < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Добавление ингибитора CaCCinh-A01 к внутриклеточной стороне мембраны клеток HEK293 снижает вероятность открытого состояния каналов CaCC ANO6

Ранее при изучении эффективности действия CaCCinhA01 на активность каналов CaCC проводились исследования с оценкой интегрального ионного тока без анализа активности одиночных каналов. Нами были описаны электрофизиологические

свойства одиночных каналов ANO6 в клетках HEK293 [14]. Данный подход позволяет нам выявить механизмы подавления интегрального тока блокаторм.

Опыты проводили в конфигурации inside-out, активируя каналы CaCC ANO6 добавлением 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ при фиксированном потенциале на мембране +40 мВ. При активации каналов ANO6 мы добавляли 20 мкМ ингибитора CaCCinh-A01 к внутриклеточной стороне мембраны (рис. 1а). Применение блокатора незначительно меняло вольт-амперные характеристики одиночных каналов ANO6 (рис. 1б, [14]). Для оценки влияния блокатора CaCCinh-A01 на вероятность открытого состояния каналов CaCC мы рассчитывали NP_o .

NP_o каналов CaCC ANO6, активированных 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$, составляла 1.30 ± 0.59 ($n = 5$). После добавления 20 мкМ ингибитора CaCCinh-A01 значение NP_o снижалось на 36% до 0.83 ± 0.51 ($n = 5$) (рис. 1в).

Полученные нами данные отличаются от данных, опубликованных группой Канцельманна [13]. Так, было показано, что CaCCinh-A01 подавлял

активность каналов эффективнее, чем в нашем исследовании — примерно на 70%. Возможное отличие в полученных экспериментальных данных может быть связано как с выбором объекта исследований, так и с дизайном эксперимента. Группа Канцельманна использовала в качестве объекта клетки линии Jurkat и A549. Известно, что эффективность CaCCinh-A01 различается в разных клеточных линиях [16]. Кроме того, в своей работе авторы добавляли блокатор к внутриклеточной стороне мембраны только на несколько секунд, после чего блокатор отмывали, что приводило к восстановлению активности каналов [13]. Мы оценивали активность каналов на протяжении как минимум 30 с после добавления. Также мы использовали раствор с большей концентрацией ионов кальция, чем в работе группы Канцельманна.

Таким образом, мы показали, что в наших условиях применение блокатора CaCCinh-A01 с внутриклеточной стороны мембраны приводит к снижению вероятности открытого состояния каналов ANO6 в клетках HEK293.

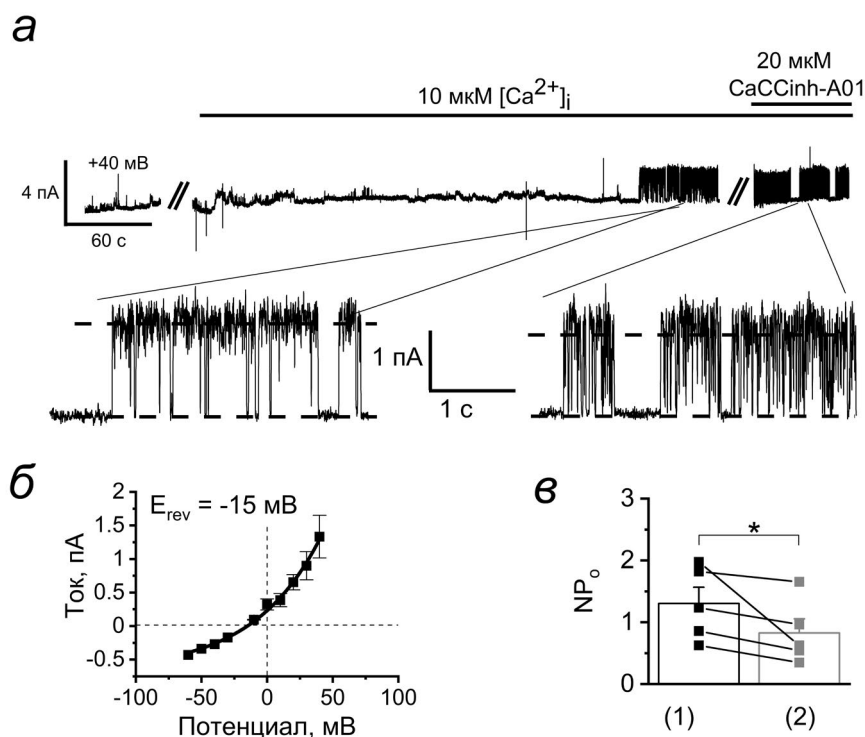


Рис. 1. Влияние CaCCinh-A01 на вероятность открытого состояния одиночных каналов ANO6 клеток HEK293. Для анализа использовали эксперименты, проведенные в конфигурации inside-out, при потенциале +40 мВ. а — Фрагмент записи тока через каналы CaCC ANO6 после добавления 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ и последующей аппликации 20 мкМ CaCCinh-A01. Расширенные фрагменты записи токов и амплитудные гистограммы указаны под фрагментом записи тока. б — Вольт-амперная характеристика каналов CaCC ANO6 после добавления 20 мкМ CaCCinh-A01 к внутриклеточной стороне мембраны. в — Вероятность открытого состояния каналов CaCC ANO6, активированных добавлением 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$, в интервалах 30 с непосредственно до (1, черные квадраты) и после применения CaCCinh-A01 (2, серые квадраты) ($p < 0.05$).

Снижение вероятности открытого состояния каналов CaCC ANO6 при действии CaCCinh-A01 обусловлено уменьшением времени жизни открытого состояния каналов

Снижение вероятности открытого канала может быть обусловлено несколькими факторами: либо уменьшается время жизни канала, либо канал реже открывается. Для оценки влияния ингибитора CaCCinh-A01 на время жизни каналов ANO6 клеток HEK293 мы сравнивали время открытого состояния каналов на промежутках длительно — 8 с до и сразу после добавления блокатора (рис. 2а, 2б).

Мы обнаружили, что добавление 20 мкМ CaCCinh-A01 уменьшает время жизни каналов CaCC ANO6, активированных 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$, на 34% с 1.43 ± 0.33 мс ($n = 4$) до 0.94 ± 0.17 мс ($n = 4$, $p < 0.05$) (рис. 2в).

Снижение времени открытого состояния каналов на 34% коррелировало с уменьшением вероятности открытого состояния каналов (рис. 1в — снижение на 36%). Исходя из полученных данных, мы можем заключить, что CaCCinh-A01 снижает вероятность открытого состояния каналов ANO6 при добавлении к внутриклеточной стороне мембраны, в первую очередь, за счет уменьшения времени жизни канала в открытом состоянии.

Ингибитор CaCCinh-A01 снижает амплитуду тока через одиночные каналы CaCC ANO6

Величина интегрального тока через плазматическую мембрану зависит не только от вероятности открытого состояния и времени жизни, но также и от амплитуды тока через каналы. Для оценки влияния CaCCinh-A01 на амплитуду тока через каналы ANO6 мы сравнили амплитуду тока через канал непосредственно перед добавлением и сразу после применения ингибитора в конфигурации inside-out.

Амплитуда тока через каналы ANO6 при потенциале +40 мВ, активированные аппликацией 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$, составляла 1.44 ± 0.22 пА ($n = 4$). После добавления ингибитора CaCCinh-A01 амплитуда тока через каналы ANO6 уменьшилась на 10%, до 1.29 ± 0.18 пА ($n = 4$, $p < 0.05$) (рис. 3).

Таким образом, наши данные позволяют предположить, что подавление интегрального тока через каналы ANO6 при воздействии ингибитора связано как с уменьшением времени жизни каналов, что приводит к снижению вероятности их открытого состояния, так и с изменением амплитуды тока через каналы.

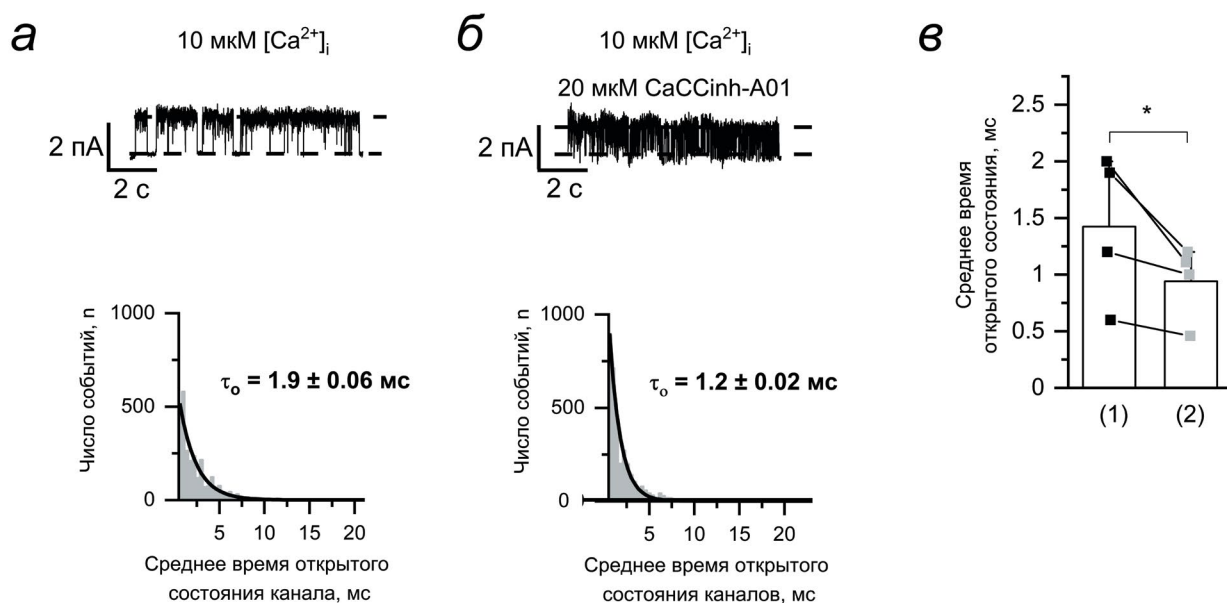


Рис. 2. Влияние CaCCinh-A01 на время жизни открытого состояния одиночных каналов ANO6 клеток HEK293. Для анализа использовали эксперименты, проведенные в конфигурации inside-out, при потенциале +40 мВ. а — Фрагмент записи тока через одиночные CaCC ANO6, активированные 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$. б — Фрагмент записи тока через одиночные CaCC ANO6 в присутствии 20 мкМ CaCCinh-A01. Соответствующие гистограммы времени жизни каналов приведены под фрагментами записи тока. в — Суммарный график, отражающий изменение времени жизни одиночных каналов CaCC ANO6 при добавлении 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ (1, черные квадраты) и после последующей аппликации 20 мкМ CaCCinh-A01 (2, серые квадраты) ($n = 4$, $p < 0.05$).

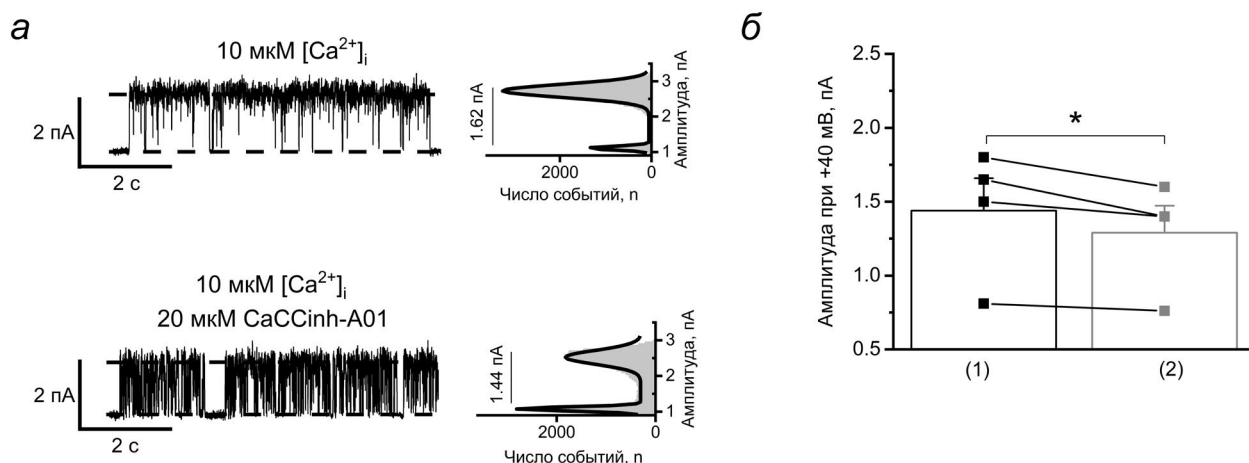


Рис. 3. Влияние CaCCinh-A01 на амплитуду тока через каналы CaCC ANO6 клеток HEK293. Для анализа использовали эксперименты, проведенные в конфигурации inside-out, при потенциале +40 мВ. *а* – Расширенные фрагменты записи тока каналов CaCC ANO6, активированных 10 мкМ [Ca²⁺]_i до и после добавления 20 мкМ CaCCinh-A01. Амплитудные гистограммы указаны рядом с фрагментами записи тока. *б* – График изменения амплитуды тока через каналы CaCC ANO6 до (1, черные квадраты) и после (2, серые квадраты) применения ингибитора CaCCinh-A01 ($p < 0.05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что при воздействии блокатора CaCCinh-A01 с внутриклеточной стороны мембраны клеток HEK293 происходит уменьшение тока через каналы ANO6 за счет уменьшения времени жизни открытого состояния и амплитуды тока через каналы. В свою очередь, уменьшение времени жизни каналов ANO6 ведет к снижению их вероятности открытого состояния. Полученные данные объясняют механизмы действия блокатора на каналы ANO6.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22–24–00761).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kalienkova V., Clerico Mosina V., Paulino C. 2021. The groovy TMEM16 family: Molecular mechanisms of lipid scrambling and ion conduction. *J. Mol. Biol.* **433**, 166941.
2. Yang H., Kim A., David T., Palmer D., Jin T., Tien J., Huang F., Cheng T., Coughlin S.R., Jan Y.N., Jan L.Y. 2012. TMEM16F forms a Ca²⁺-activated
3. Kostitskii A.Y., Machtens J.P. 2021. Molecular mechanisms of ion conduction and ion selectivity in TMEM16 lipid scramblases. *Nat. Commun.* **12**, 2826.
4. Zhang Y., Le T., Grabau R., Mohseni Z., Kim H., Natale D.R., Feng L., Pan H., Yang H. 2020. TMEM16F phospholipid scramblase mediates trophoblast fusion and placental development. *Sci. Adv.* **6**, 19.
5. Ousingawat J., Wanitchakool P., Kmit A., Romao A.M., Jantarajit W., Schreiber R., Kunzelmann K. 2015. Anoctamin 6 mediates effects essential for innate immunity downstream of P2X7 receptors in macrophages. *Nat. Commun.* **6**, 6245.
6. Ousingawat J., Wanitchakool P., Schreiber R., Wueling M., Vortkamp A., Kunzelmann K. 2015. Anoctamin-6 controls bone mineralization by activating the calcium transporter NCX1. *J. Biol. Chem.* **290**, 6270–6280.
7. Cabrita I., Benedetto R., Schreiber R., Kunzelmann K. 2019. Niclosamide repurposed for the treatment of inflammatory airway disease. *JCI Insight.* **4**, e128414.
8. Braga L., Ali H., Secco I., Chiavacci E., Neves G., Goldhill D., Penn R., Jimenez-Guardeño J.M., Ortega-Prieto A.M., Bussani R., Cannata A., Rizzari G., Collesi C., Schneider E., Arosio D., Shah A.M., Barclay W.S., Malim M.H., Burrone J., Giacca M. 2021. Drugs that inhibit TMEM16 proteins block SARS-CoV-2 spike-induced syncytia. *Nature.* **594**, 88–93.
9. Zhang Y., Li H., Li X., Wu J., Xue T., Wu J., Shen H., Li X., Shen M., Chen G. 2020. TMEM16F aggravates neuronal loss by mediating microglial phagocytosis of

- neurons in a rat experimental cerebral ischemia and reperfusion model. *Front. Immunol.* **11**, 1144.
10. De La Fuente R., Namkung W., Mills A., Verkman A.S. 2008. Small-molecule screen identifies inhibitors of a human intestinal calcium-activated chloride channel. *Mol. Pharmacol.* **73**, 758–768.
 11. Shi S., Guo S., Chen Y., Sun F., Pang C., Ma B., Qu C., An H. 2020. Molecular mechanism of CaCCinh-A01 inhibiting TMEM16A channel. *Arch. Biochem. Biophys.* **695**, 108650.
 12. Taylor K.A., Mahaut-Smith M.P. 2019. A major interspecies difference in the ionic selectivity of megakaryocyte Ca^{2+} -activated channels sensitive to the TMEM16F inhibitor CaCCinh-A01. *Platelets.* **30**, 962–966.
 13. Martins J.R., Faria D., Kongsuphol P., Reisch B., Schreiber R., Kunzelmann K. 2011. Anoctamin 6 is an essential component of the outwardly rectifying chloride channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 18168–18172.
 14. Kolesnikov D., Perevostnikova A., Gusev K., Glushankova L., Kaznacheyeva E., Shalygin A. 2021. Electrophysiological properties of endogenous single Ca^{2+} activated Cl-channels induced by local Ca^{2+} entry in HEK293. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 4767.
 15. Kolesnikov D.O., Nomerovskaya M.A., Grigorieva E.R., Reshetin D.S., Skobeleva K.V., Gusev K.O., Shalygin A.V., Kaznacheyeva E.V. 2024. Calcium chelation independent effects of BAPTA on endogenous ANO6 channels in HEK293T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **693**, 149378. doi 10.1016/j.bbrc.2023.149378.
 16. Tian X.Q., Ma K.T., Wang X.W., Wang Y., Guo Z.K., Si J.Q. 2018. Effects of the calcium-activated chloride channel inhibitors T16Ainh-A01 and CaCCinh-A01 on cardiac fibroblast function. *Cell Physiol. Biochem.* **49**, 706–716.

The Mechanism of Calcium-Activated Chloride ANO6 Channel Inhibition by CaCCinh-A01

© 2024 г. D. O. Kolesnikov^{1, #}, E. R. Grigorieva^{1, #}, M. A. Nomerovskaya¹, D. S. Reshetin¹, A. V. Shalygin^{1, *}, E. V. Kaznacheyeva^{1, **}

¹*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

^{*}*e-mail: shalygin.alexey@gmail.com; **e-mail: evkzn@incras.ru*

[#]*These authors contributed equally*

Proteins of the anoctamine family (ANO) form calcium-activated chloride channels (CaCC) and phospholipid scramblases. The ANO6 (TMEM16F) protein, which combines the functions of a calcium-dependent scramblase and those of an ion channel, is considered as a molecular target for the treatment of blood clotting disorders, COVID-19-associated pneumonia, neurodegenerative diseases, and other pathologies. CaCCinh-A01, which is a channel blocker of the ANO family, is studied as a potential pharmacological drug. Previously, the effect of this inhibitor was studied using methods representing the integral ion current through the membrane, which does not allow the properties of single channels to be distinguished. Therefore, it remains unknown which characteristics of single channels are sensitive to the blocker: channel open probability, the current amplitude, or the dwelling time of the channel open state. By registration of single ANO6 channels in HEK293 cells, we showed that the action of the inhibitor is due to a decrease in both the current amplitude and the open state dwelling time of single ANO6 channels, which, in turn, leads to a decrease in their open state probability. Thus, we have characterized the mechanism of current reduction through ANO6 channels by the inhibitor CaCCinh A01.

Keywords: CaCCinh-A01, calcium-activated chloride channels (CaCC), ANO6 (TMEM16F), patch-clamp, single-channel recording, HEK293 cells