



多囊蛋白2离子通道功能及在常染色体显性多囊肾发病中的作用机制*

汪 凯^{1,2,3,4)} 黄 渊^{1,2,3,4)**} 周策凡^{1,2,3,4)} 唐景峰^{1,2,3,4)} 陈兴珍^{1,2,3,4)**}

⁽¹⁾ 湖北工业大学, 科技部/教育部细胞调控与分子药物学科“111”引智基地, 武汉 430068;

⁽²⁾ 湖北工业大学, 发酵工程教育部重点实验室, 武汉 430068;

⁽³⁾ 湖北工业大学, 工业发酵省部共建协同创新中心, 武汉 430068;

⁽⁴⁾ 湖北工业大学, 工业微生物湖北省重点实验室, 武汉 430068)

摘要 多囊蛋白2 (polycystin-2, PC2, 或称 TRPP2, PKD2) 是一种瞬时受体电位通道 (transient receptor potential channel, TRP), 在维持细胞正常的 Ca^{2+} 信号传导中起着关键作用, 也是最常见的单基因常染色体显性遗传多囊肾病 (transient receptor potential channel, ADPKD) 的潜在病因之一。PC2 可自身组装为同源四聚体离子通道或与其他蛋白质形成异源受体-离子通道复合物, 参与调节机械感觉、细胞极性、细胞增殖和凋亡等多种生理功能, 导致囊性细胞从正常的吸收、静止状态转变为病理性分泌、增殖状态。本文阐述了 PC2 蛋白相关结构域以及通道特性在维持细胞内 Ca^{2+} 信号传导中的关键作用, 并总结了 PC2 在细胞膜、纤毛、内质网以及线粒体等特定亚细胞定位形成多囊蛋白复合物, 参与多种细胞分化、增殖、存活和凋亡相关信号通路, 为确定特异性的有效的 ADPKD 干预治疗途径和靶点药物提供新的思考方向。

关键词 多囊蛋白2, 离子通道, 钙离子, 常染色体显性遗传多囊肾病

中图分类号 Q51, R363

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0546

常染色体显性多囊肾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) 是最常见的遗传性肾病之一, 每年造成巨大的公共卫生负担和数十亿美元的直接医疗费用, 据统计其患病率为 1 : 400~1 : 1 000^[1-2]。ADPKD 是一种进行性疾病——病患者初期肾大小形态正常或略大; 伴随着年龄的增长, 病患者肾囊肿数量不断增加, 肾功能渐进性地丧失, 通常发展为终末期肾病 (end-stage renal disease, ESRD)^[3-4]。在 ADPKD 患者中普遍存在 *PKD1* 或 *PKD2* 基因的突变, 像这类由单基因突变而引起严重肾脏疾病的致病方式并不多见。多囊蛋白2 (polycystin-2, PC2 或称 PKD2, TRPP2) 和多囊蛋白1 (polycystin-1, PC1 或称 PKD1, TRPP1) 的突变导致终末期肾病分别约占有 ADPKD 病例的 10% 和 85%^[5]。长期以来, PC1 被

认为是一种化学和机械敏感的蛋白质伴侣, 将细胞间和细胞与基质间的信号传递给细胞膜或内质网膜上的 PC2。在信号传递过程中, PC2 可以独立或与 PC1 协同发挥作用, 以响应流体流量变化来触发细胞内钙释放^[6-7]。PC2 是改变膜电位或细胞内 Ca^{2+} 浓度来充当信号转换器的阳离子通道蛋白, 在疼痛、触摸、温度、光和化学物质等各种感觉中发挥关键作用^[8]。多囊蛋白突变破坏了肾脏细胞内钙离子稳态, 而异常的 Ca^{2+} 信号诱导肾小管细胞大量异常增殖形成充满液体的囊肿, 还伴有囊肿衬里细

* 国家自然科学基金 (31871176, 32000797) 资助项目。

** 通讯联系人。

陈兴珍 Tel: 027-59750472, E-mail: xingzhenchen_hut@163.com

黄渊 Tel: 027-59750472, E-mail: yuanyh113@163.com

收稿日期: 2022-11-29, 接受日期: 2023-03-17

胞周围的间质炎症和纤维化,最终导致慢性多囊肾病发展为终末期肾病^[9]。

PC2在特定亚细胞定位和细胞类型中的功能在全身生理学特别是ADPKD慢性肾病的发生发展中至关重要。PC2定位于与机械信号、细胞极性、细胞增殖和凋亡等多种生理功能相关的特定细胞膜上,在维持细胞正常的Ca²⁺信号传导中起着关键作用。除了渗透阳离子的离子通道功能外,PC2可通过与其他蛋白质,包括TRPP1、TRPV4、TRPC1等TRP家族成员以及两个关键的内质网(ER)钙释放通道肌醇三磷酸受体(InsP3R)和兰尼碱受体(RyR),相互作用来调节细胞内Ca²⁺浓度,这使其成为帮助了解失衡Ca²⁺信号致病机理的研究热点。此外,PC2离子通道的功能和调控机制仍然值得深入研究,这将为确定新的特异性有效的ADPKD治疗途径和靶点药物提供分子基础。

1 PC2的结构

1996年, Mochizuki等^[10]在第4号染色体(4q21-23)上发现了致病基因*PKD2*。*PKD2*编码的PC2蛋白由968个氨基酸组成,包含6个跨膜结构域(S1~S6)、位于S1和S2跨膜结构域之间的特异性多囊蛋白TOP结构域以及细胞质氨基端(N端)和羧基端(C端)(图1)。基于单通道电流记录技术和冷冻电镜(Cryo-EM)蛋白质结构解析确定PC2为瞬时受体电位(transient receptor potential channel, TRP)通道蛋白的亚家族TRPP家族成员。

PC2可自行组装为同源四聚体结构——S1~S4前4个跨膜结构域形成特殊的电压感应结构域(voltage-sensing domain, VSD), S5和S6跨膜结构域以及充当选择性离子过滤器的孔螺旋结构(pore helix, PH1和PH2)构成孔道结构域(pore domain, PD)^[11-12]。4个单独亚基的PD结构四聚体组装成中心离子渗透孔道,每个亚基的VSD结构都与相邻亚基的PD结构进行域交换^[12]。特异性的TOP结构

域(氨基酸242~465)互锁在PC2同源四聚体中形成独特的从外侧接合通道孔的盖状结构^[12],在VSD和PD两者之间充当分子桥,能转移VSD中的电压依赖性构象变化引发孔道结构的开放。其次, TOP结构域也在每个亚基之间形成同型接触,稳定寡聚通道结构^[13-14]。此外,ADPKD患者(<https://pkdb.mayo.edu>)中发现的26个已知PC2蛋白错义突变中, TOP结构域和孔隙螺旋PH1成为两个突变热点区域,反映出其在通道组装或通道门控中的关键作用(图1c)^[15]。

PC2的细胞质N端和C端存在多个与其他蛋白质相互作用或自身离子通道功能相关的关键功能结构域和蛋白质修饰位点。位于N端的SH3结构域(Src homology domain 3)能够识别并结合特定伴侣蛋白,参与调节多种细胞内生化反应^[10]。N端寡聚化结构域(oligomerization domain)也已被证明是PC2功能性四聚体组装所必需的^[16]。PC2的C端还包含多个影响ADPKD囊肿进程的重要结构域,包括Ca²⁺感应EF手形结构域(EF-hand domain, 氨基酸717~790)、内质网滞留序列(ER retention tag, 氨基酸787~820)和卷曲螺旋结构域(coiled-coil domain)。EF手形结构域能感知并结合细胞内Ca²⁺,是Ca²⁺依赖性的PC2离子通道打开的必要条件^[17]。内质网滞留序列使大部分内源性PC2定位于内质网中,参与ER Ca²⁺信号传导调节^[18]。同样,研究发现自然产生的致病PC2突变体R742X缺失内质网滞留序列,主要转移到细胞质膜^[19]。此外,还发现PC1/PC2多囊蛋白复合物中PC2通过C端的卷曲螺旋结构域(氨基酸839~873)形成同源三聚体,该区域与先前报道的参与PC2同源多聚化相互作用的区域(氨基酸839~919)重叠^[20]。虽然PC2的细胞质N端和C端在通道门控的作用可能并不重要,但其存在许多仍需深入研究的蛋白质结构信息,包含通道功能调节、同源四聚体离子通道组装等。

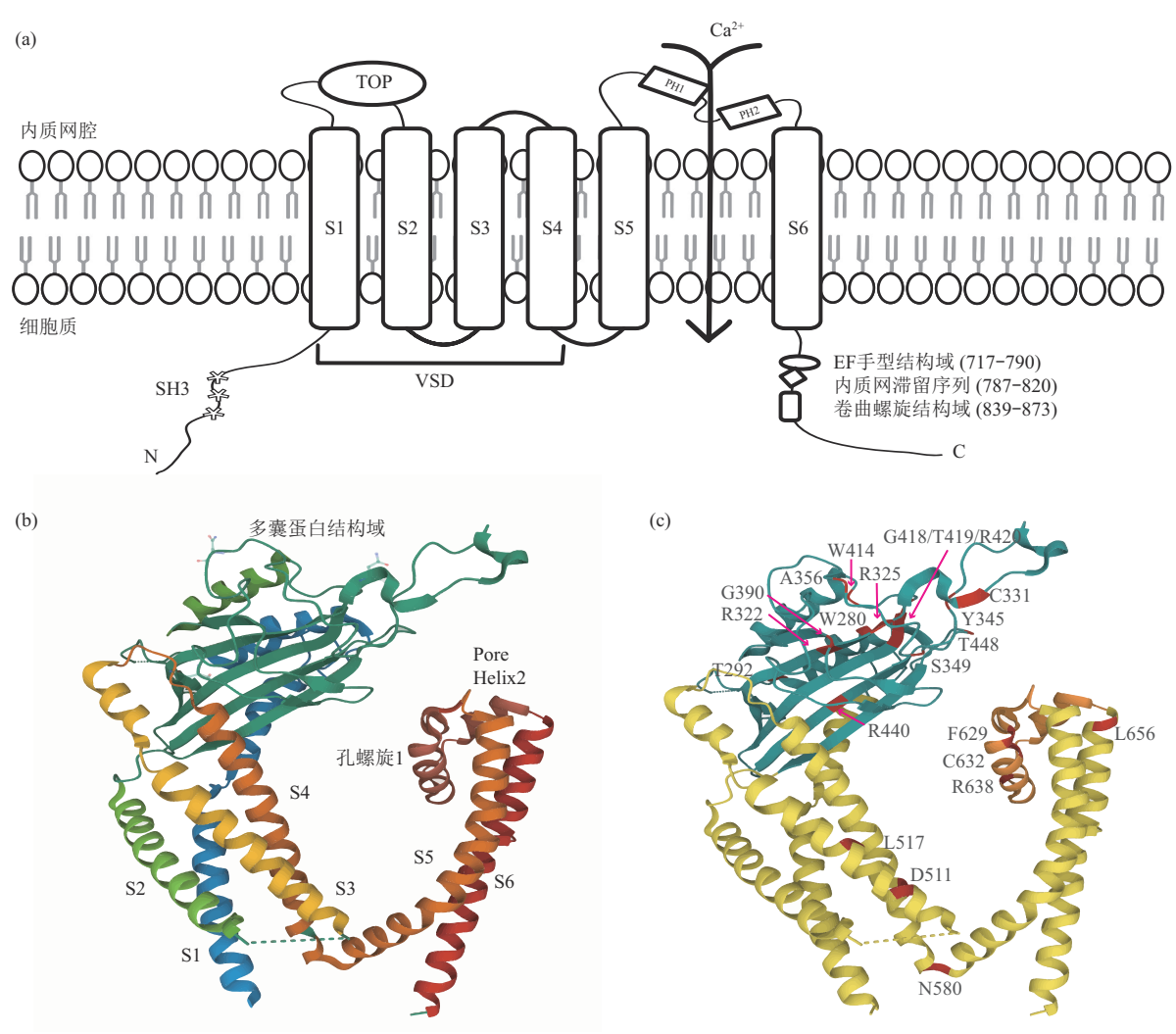


Fig. 1 Protein structure of the transient receptor potential channel polycystin-2

图1 瞬时受体电位通道PC2蛋白结构图

(a) 全长人源PC2蛋白结构示意图。(b) PC2冷冻电镜结构图 (PDB: 5T4D)。示意图和冷冻电镜结构图阐明了PC2蛋白的结构——跨膜结构域 (S1~S6)、特异性多囊蛋白TOP结构域以及细胞质内的N端和C端。PC2通道的离子流经路径解析显示, 离子先经过TOP结构域形成的前孔区进入通道内腔, 再穿过两个主要的选择性过滤器PH1与PH2 (选择性除去部分分子), 最后经过S6跨膜螺旋流进入细胞质内^[21]。(c) ADPKD相关的PC2突变位点分布 (红色)。多囊蛋白结构域 (蓝色) 和孔隙螺旋 (橙色) 是突变富集区域。

2 PC2的离子通道特性

2.1 PC2的阳离子渗透性

1999年, 本课题组证明了TRPP3是一种钙可渗透、钙激活的非选择性阳离子, 这是首次报道TRPP通道成员的通道功能^[22]。随后, 平面双分子脂质膜上重建单通道的电流研究实验证明PC2是一种高电导、非选择性、电压依赖性阳离子通道, 但其离子通道特征不同于TRPP3^[23]。与经典的电压

门控离子通道 (voltage gated calcium channel, VGCC) 相比, PC2对渗透的阳离子没有表现出偏好, 但对Ca²⁺的渗透性高于对其他单价阳离子 (如Na⁺和K⁺) 的渗透性 (渗透率 $P_{Ca}/P_{Na} \approx 0.25$)^[23-24]。Ba²⁺、Mg²⁺、Cs⁺、K⁺和Na⁺的离子浓度水平在内质网腔室和细胞质之间没有显著差异, 但内质网膜周围Ca²⁺存在非常显著的离子浓度梯度, 以至于定位于内质网上的PC2会优先渗透Ca²⁺。因此, 本质上PC2成为内质网膜上Ca²⁺的特定离子通道。进一步

的研究表明, PC2的 Ca^{2+} 渗透性取决于它定位于内质网或初级纤毛(在整个纤毛中测量时,渗透率 $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \approx 0.06$)^[24-25]。此外,计算机模型估计PC2通道闭合状态下的通道孔径约为1 Å^[12, 26],开放状态下的孔径约为1.7 Å^[26-27],多离子抑制状态下的孔径约为1.4 Å^[27]。然而,PC2渗透阳离子尺寸的功能研究表明其开放通道的最小孔径约为11 Å^[28]。这些孔径之间的差异可能的原因是PC2的细胞质N端和C端的构象变化以及可能的蛋白质复合物组装,最终影响其 Ca^{2+} 渗透通道活性。迄今为止,PC2离子通道的激活机制仍然未知。2016年,Pavel等^[29]在卵母细胞中鉴定并表征了绕过激活PC2通道机制的激活突变体F604P,它显示出较大的全细胞阳离子电流^[30]。通过解析PC2激活突变F604P的结构发现,活化的PC2通道在核心S6螺旋在发生了 π 到 α 螺旋旋转,导致疏水性氨基酸L677的重新定位和通道激活^[26]。尽管对PC2门控机制有深入的了解,但到目前为止缺乏特定的激动剂或拮抗剂,导致在体外也难以测量PC2通道电流。未来PC2激动剂或拮抗剂的发现或开发工作,对于进一步了解PC2离子通道活性以及ADPKD中失衡 Ca^{2+} 信号传导非常重要。

2.2 多囊蛋白2的 Ca^{2+} 依赖性

PC2通道的开放频率已被证明受 Ca^{2+} 浓度的调节,但钙调节通道门控的分子机制尚不清楚。在低钙水平下, Ca^{2+} 浓度的增加会导致更高的打开概率,而 Ca^{2+} 浓度的进一步增加会降低通道打开的概率。高浓度 Ca^{2+} (超过1 $\mu\text{mol/L}$)会抑制离子通道活性,最终使PC2产生 Ca^{2+} 钟形响应(bell-shaped calcium-response),而这种 Ca^{2+} 敏感性受酪蛋白激酶II(CK2)在PC2的Ser812位点磷酸化调节^[31]。事实上,虽然PC2 S812A突变体表现出对细胞质 Ca^{2+} 的类似钟形响应,但它对 Ca^{2+} 的敏感性比野生型PC2低10倍。PC2 C端的EF手形结构域负责感知细胞质内 Ca^{2+} 浓度,且其数量和位置决定了钙依赖性的PC2离子通道功能,这与缺失EF手形结构域的致病突变体L703X对 Ca^{2+} 不敏感观察结果一致^[17, 32]。然而,破坏EF手形结构域与 Ca^{2+} 的亲合并不会显著改变纤毛或者内质网上PC2的通道功能或影响囊肿生成,因此EF手形结构域之外可能还存在其他钙结合位点^[33]。多离子抑制状态或高 Ca^{2+}

水平下, Ca^{2+} 可能不是与EF手形结构域识别结合,而与离子渗透孔(PD)的选择性过滤器结合阻塞通道^[27]。

2.3 PC2通道功能调控

PC2的通道功能除了受到细胞质 Ca^{2+} 水平调节外,也受到PC2基因表达水平和多种伴侣蛋白对PC2翻译后修饰的调节。本课题组首先鉴定了一个PC2 3'UTR片段,FUBP1结合PC2 3'UTR中的3FI(核苷酸691~1 044)以抑制PC2翻译^[34]。内质网应激(ER stress)和P-eIF2 α 通过避开抑制的5'UTR的上游开放阅读框(the upstream open reading frame, uORF)上调PC2蛋白表达^[35]。

PC2的细胞质N端和C端已经报道了磷酸化位点(哺乳动物中的Ser76、Ser801、Ser812和Ser829,以及线虫中的Ser534)。PC2的Ser812磷酸化位点最早被确定,这仍然也是至今研究最多的残基(上文中有所论述)。糖原合酶激酶3(GSK-3)介导的PC2 Ser76磷酸化对PC2的亚细胞定位以及维持斑马鱼胚胎前肾发育具有重要生理意义^[36]。蛋白激酶D(PrKD)通过Ser801磷酸化响应细胞外生长因子刺激,导致促进内质网 Ca^{2+} 释放以及细胞增殖过程^[37]。与Ser801位点磷酸化类似,蛋白激酶A(PKA)与蛋白磷酸酶1 α (PP1 α)调节的Ser829磷酸化和去磷酸化,也被认为可增强内质网三磷酸肌醇(InsP3)介导的 Ca^{2+} 释放^[38]。对线虫PC2同源物的研究表明,酪蛋白激酶2(CK2)和钙调神经磷酸酶TAX-6分别调控Ser534的磷酸化和去磷酸化,能影响秀丽隐杆线虫细胞PC2的纤毛定位^[39]。

PC2也已被证明是高度N-糖基化的,所有糖基化天冬酰胺(Asn299、Asn305、Asn328、Asn362和Asn375)都存在于PC2的TOP结构域内。PC2冷冻电镜结构研究表明,这些N-糖基化位点会根据PC2的开放状态而不同地被修饰^[27, 40]。然而,这些糖修饰直接影响通道活性的分子机制仍有待探索。常染色体显性多囊肝病(autosomal dominant polycystic liver disease, ADPLD)的致病蛋白葡萄糖苷酶II β 亚基(GII β 或PRKCSH)参与内质网中PC2的多聚糖加工,促进内质网中PC2糖蛋白向高尔基体的运输,而未折叠或错误折叠的糖蛋白会在内质网相关降解(ERAD)过程中降解或被自噬去

除, 这解释Prkcs^{-/-}小鼠中PC2蛋白表达降低以及ADPLD与ADPKD之间密切的关系^[40-41]。本课题组证明PC2蛋白在ERAD中的降解过程受到泛素-蛋白酶体系统的调节^[42]。

3 PC2与ADPKD

3.1 PC2的细胞运输和成熟

PC2定位于与机械信号、细胞极性、细胞增殖和凋亡等多种生理功能相关的特定细胞膜上——大部分内源性PC2依靠内质网滞留序列保留在内质网中, 而缺失内质网滞留序列的PC2突变体主要靶向质膜(PM)^[18]。此外, 大量文献也报道了PC2在细胞膜表面、初级纤毛和线粒体上的亚细胞定位(下文会重点论述)。PC2在不同生长状态和分化类型细胞中的亚细胞定位是动态的, 可能会与细胞类型特定的伴侣蛋白或结合分子相互作用而发挥不同的功能^[25]。PC2的动态亚细胞定位取决于其生物合成以及囊泡运输, 了解多囊蛋白的表达、成熟和运输有助于了解ADPKD发病机制并为治疗干预提供机遇。

通过胞吐方式, 核糖体上新合成的PC2蛋白质被转换囊泡转运到内质网中并在那里折叠, 随后通过内质网-高尔基体系转运到反式高尔基网络(TGN), 然后TGN中各种线性分选信号有序地将货物从高尔基体运输到最终的目的地, 例如分拣到内体和溶酶体, 或返回到内质网中。蛋白质包被在衣被蛋白COPII(coat protein II)小泡中以“货物”的形式在膜表面之间运输, 小泡从供体膜表面“出芽”, 与靶膜融合后即将货物蛋白卸载到目的地^[43]。在ER中滞留的蛋白质进入高尔基体后通过特殊的信号, 如其C端KDEL序列, 从高尔基体再返回内质网。分选蛋白PACS-1和PACS-2识别PC2 C端上的酸性簇基序(SEED), 参与调控PC2从质膜到高尔基体以及高尔基体到内质网的逆向运输^[44]。PC2的逆向运输使其滞留在内质网上, 也对保持内质网膜体系的稳定十分重要。酪蛋白激酶2(CK2)在S812处的磷酸化促进了PC2/PACS的相互作用, 从而促进了PC2的质膜靶向^[44]。

离开TGN后, 包裹多囊蛋白的囊泡被分拣到中间的囊泡隔室, 如早期或循环的内小体, 然后运输到纤毛基部。与特定部位的纤毛膜融合后, 在纤

毛基部过渡区(TFs)停靠的多囊蛋白通过过渡区(TZ)的扩散屏障进入纤毛^[43]。为了高效运输至纤毛这种特定亚细胞区室, PC2通过N端保守的纤毛靶向RVxP序列独立于PC1向纤毛运输^[45]。本课题组首次评估微管动力学在调节初级纤毛中PC2蛋白功能的作用, 发现PC2通过微管依赖性运动驱动蛋白2亚基KIF3A在初级纤毛中顺向运输^[46]。过去20年的重大技术进步和试剂开发有助于确定PC2多囊蛋白复合物的定位和相关加工成熟机制, 但多囊蛋白成熟和运输的许多细节仍有待解决。主要问题包括不同亚细胞定位的PC2与其他蛋白质组装多囊蛋白复合物的生理功能, 以及这些功能是否与ADPKD发病机制相关。

3.2 PC2与ADPKD中Ca²⁺信号

几乎所有与遗传性人类囊性肾病有关的基因变异都会影响定位于初级纤毛或基体的PC2/PC1多囊蛋白复合物, 并且通常伴有异常纤毛Ca²⁺信号传导, 因此ADPKD历来被称为肾纤毛病^[47-48]。PC1通过C端卷曲螺旋结构域与PC2三聚体组装成3:1化学计量比的蛋白质复合物, 在初级纤毛中充当流量传感器, 通过激活PC2通道以响应流体流量变化来触发细胞内钙释放^[5, 49]。然而冷冻电镜显示复合物结构不包括PC1或PC2的胞质N端或C端^[5], 这表明这两种蛋白质也可以通过其他结构域相互关联。最近, PC1的细胞外N端激活质膜上的PC1/PC2复合物, 表明该复合物作为外旋整流通道在ADPKD中发挥作用^[6]。此外, PC2与其他TRP超家族成员的结构同源性支持存在TRP间相互作用, 例如: PC2通过其C端与TRPC1形成异源二聚体, 响应肾上皮细胞中的G蛋白偶联受体激活信号; PC2与TRPV4组装成2:2化学计量比的异源四聚体, 在纤毛中充当机械和热敏分子传感器^[49-50]。TRPM3也被证明是肾细胞初级纤毛的PC2依赖性通道所必需的^[51]。这些发现证明了PC2多囊蛋白复合物在肾囊肿形成和其他病理中初级纤毛信号传导的重要。最近电生理技术可以直接测量附着或新分离初级纤毛膜中的通道活动, 但多囊蛋白复合物的通道特性以及机械传感如何从纤毛转导到细胞质仍然是研究中备受争议的话题^[52-53]。与此同时, 初级纤毛被认为是Ca²⁺响应式机械传感器的观点受到挑战, 最近的一项研究中未能观察到

初级纤毛 Ca^{2+} 信号传导以响应流动刺激^[54]。因此，未来的工作应检测 PC2 多囊蛋白复合物在其他细胞亚定位的生物学功能。

内质网作为细胞内最重要的 Ca^{2+} 细胞腔室，在蛋白质的合成、修饰、折叠、质量控制和分泌中发挥着关键作用。PC2 通过自身离子通道功能或通过两个关键的内质网钙释放通道三磷酸肌醇受体 (InsP3R) 和兰尼碱受体 (RyR) 通道的相互作用来释放内质网 Ca^{2+} ，激活下游信号 (下文论述)。PC2/InsP3R 相互作用不仅增强了三磷酸肌醇 (InsP3) 介导的 Ca^{2+} 释放，而且激活 PC2 的通道活性^[55]。PC2/InsP3R 的相互作用还与内质网中 PC1 的水平有关，PC1 通过增强 STIM1 与 InsP3R 的结合，并激活 PI3K-Akt 通路来抑制 PC2/IP3R 相互作用，从而导致 ATP 依赖性 Ca^{2+} 信号的减少^[56-57]。基于 RyR2 和 IP3R 螺旋结构域 TM5 和 TM6 的序列同源性，PC2 和 RyR2 之间存在潜在的相互作用关系。PC2 的细胞质 N 端和 C 端结合心脏兰尼碱受体 (RyR2)，调控心肌细胞 Ca^{2+} 释放。有趣的是，PC2 的 N 端是 PC2/RyR2 复合物组装所必需的，C 端的作用是降低 Ca^{2+} 依赖性 RyR2 的通道打开概率。这种调节作用解释了 PC2^{+/-} 小鼠心肌细胞中肌浆网 Ca^{2+} 浓度降低以及自发 Ca^{2+} 振荡频率增强的现象^[58]。PC2 是否与心脏器官外表达的 RyR 亚型 RyR1 和 RyR3 相互作用还有待研究。

最近，PC2 以及 PC2/PC1 多囊蛋白复合物调节的 Ca^{2+} 信号转导对线粒体功能的研究，已将 ADPKD 确定为一种独立于纤毛功能的代谢疾病^[59-60]。PC2 通过线粒体外膜 GTP 酶 MFN2 (mitofusin 2) 调节线粒体内 Ca^{2+} 信号、生物能量学和动力学，促进囊肿形成^[61]。内质网-线粒体交界处上 PC2/InsP3R 复合物可降低内质网中过量释放的钙被线粒体吸收水平，防止线粒体内 Ca^{2+} 过载和细胞凋亡信号激活^[62]。由于细胞质 Ca^{2+} 水平降低，ADPKD 患者的肾小管细胞中累积的受损线粒体生成的过氧化物积累会导致细胞 DNA 损伤，其中包括 PKD 相关基因的第二次突变^[3, 63]。这也可能解释了 ADPKD 患者发生各种癌症的高风险，因为细

胞癌变的必要条件是 DNA 损伤。然而，局限于无法确定 ADPKD 囊肿形成之前肾小管细胞中存在线粒体异常，需要进一步的临床研究来验证抑制线粒体过氧化物积累在治疗 ADPKD 的作用。

3.3 PC2 与 ADPKD 中信号传导

自 2000 年以来，人们就提出了多囊蛋白与细胞存活和细胞死亡之间的联系。在囊性细胞中，PC2 功能性丧失导致来自机械刺激后的初级纤毛、内质网以及质膜等三个细胞腔室的细胞质钙流入减少，刺激钙敏感腺苷酸环化酶 (AC5 和 AC6) 的活性，促进充当第二信使分子的环磷酸腺苷 (cAMP) 生成，促进与细胞生长和增殖相关的下游靶基因表达^[64-65]。cAMP 水平的增加刺激蛋白激酶 A 和激活 Ras/Raf/ERK 通路，也能使 TSC1/TSC2 蛋白复合物失活来激活 mTOR 信号通路，促进囊性细胞的增殖和液体分泌，从而导致囊性细胞的增殖和扩大^[66-67]。在 ADPKD 患者肾细胞的细胞核中 Hippo 信号传导的最终效应分子 YAP 被 cAMP 信号上调，调节囊性细胞的增殖和存活^[68]。囊性细胞中 Ca^{2+} 和 cAMP 之间的不平衡促进了它们从正常的吸收、静止状态转变为病理性分泌、增殖状态，通过恢复细胞内 Ca^{2+} /cAMP 平衡成为有助于预防囊肿形成。最近，PC1/PC2 多囊蛋白复合物被报道作为 Wnt 信号传导的直接或间接受体，在细胞极性和运动性方面发挥作用。Wnt3A 和 Wnt9B 与 PC1 的细胞外结构域结合，并诱导依赖 PC2 离子通道的 Ca^{2+} 流入^[69]。

除了细胞增殖外，ADPKD 的一个典型标志是囊性细胞凋亡的显著增加。PC2 功能性丧失会导致细胞内质网中钙浓度超载，使囊性肾细胞对凋亡刺激敏感。PC2 依赖 PKC ϵ 来激活 JNK1 和 p38 从而上调 c-Jun 的磷酸化和 AP-1 活性，这表明 ADPKD 囊性细胞高凋亡率可能是 JNK 信号被激活的结果^[70-71]。最近，自噬已成为影响 ADPKD 进展的一个可能因素。PC2 通过与自噬关键蛋白质 BECN1 形成复合物诱导自噬^[72]。肾细胞以 PC2 依赖性自噬方式来实现延迟从细胞存活到细胞死亡的转变，导致营养应激期间 ADPKD 细胞的存活率提高^[73]。

增强的细胞增殖过程和细胞凋亡过程使肾囊肿充满多余的液体和死细胞, 导致ADPKD中的肾囊肿发展成终末期肾病 (ESRD)。

大量与多囊蛋白相关的信号通路证实了多囊蛋白在细胞命运中发挥着关键作用, 尤其是细胞分化、增殖、存活和凋亡, 以及最近的自噬, 并突出了开发针对这种慢性疾病的药物疗法的挑战。托伐普坦 (Tolvaptan) 通过减少肾细胞内cAMP水平来控制ADPKD病患者肾脏移植治疗手术前的疼痛症状, 但这种疗法会带来严重的脱水及多尿、多饮等副作用^[74-75]。正在进行的临床试验有希望的分子

药物, 如lixivaptan、bardoxolone、pravastatin、pioglitazon、tesevatinib和CFTR corrector, 预计将取得令人鼓舞的结果^[76]。目前治疗药物托伐普坦和临床试验药物普遍具有生物利用度低或缺乏特异性靶向等典型小分子药物缺点, 随着未来技术的改进以及对PKD分子发病机制的日益了解, 基于肽的配体治疗剂靶向特定PKD细胞的策略可能克服这些挑战^[77]。此外, 健康的生活方式和饮食也被视为最重要的ADPKD治疗选择, 可能通过激活AMPK信号和抑制mTOR信号减缓囊肿的生长^[76, 78] (图2)。

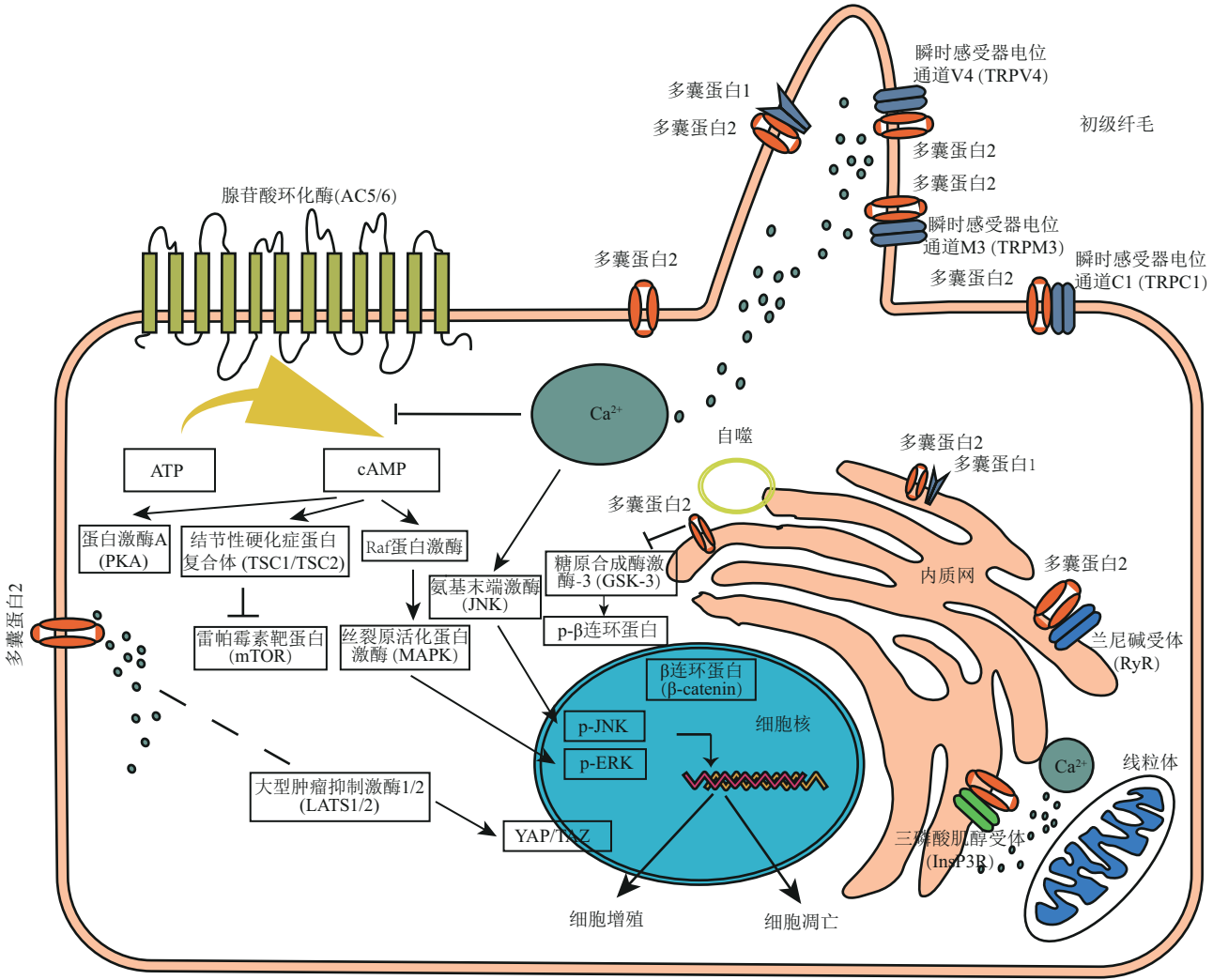


Fig. 2 Signal transduction of Polycystin 2 in ADPKD
图2 PC2在ADPKD中的信号转导

PC2定位于与机械感觉、细胞极性、细胞增殖和凋亡等多种生理功能相关的特定细胞膜上, 在维持细胞正常的信号传导中起着关键作用。

4 展 望

ADPKD的发病机制广泛且极其复杂,但致病蛋白PC2介导的Ca²⁺信号失调被认为在ADPKD的肾囊肿进展中发挥着关键作用。除最为典型的肾囊肿外,ADPKD是一种全身性和多器官性质疾病,表现为肾外器官中出现囊肿(如肝脏、胰腺和脾脏)以及其他受累器官异常(如心血管异常和脑血管动脉瘤)^[9]。目前的研究集中在囊性肾细胞,肾外器官特征在传统上并未受到太多关注。然而,未来更好地了解这些复杂肾外器官特征中的细胞途径可以解释发展某些类型癌症的潜在风险,可以指导移植后的免疫抑制和疾病预防策略。应该注意的是,研究PC1或PC2的研究通常仅限于健康的肾细胞和经历剧烈形态和分子变化的晚期ADPKD囊性细胞,而不是多囊蛋白缺陷的早期ADPKD细胞^[79]。随着ADPKD发病机制的研究以及细胞或动物模型的发展,建立有效的模型将有助于治疗这种无法治愈的疾病。总之,PC2在特定亚细胞定位和细胞类型中的功能对于全身生理学特别是ADPKD慢性肾病的发展进程至关重要,是改善ADPKD等慢性肾病囊肿进展的热门药物开发和治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] Bergmann C, Guay-Woodford L M, Harris P C, *et al.* Polycystic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, **4**(1): 50
- [2] Harris P C, Torres V E. Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med*, 2009, **60**: 321-337
- [3] Ishimoto Y, Inagi R, Yoshihara D, *et al.* Mitochondrial abnormality facilitates cyst formation in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Cell Biol*, 2017, **37**(24): e00337-17
- [4] Zhang Z, Bai H, Blumenfeld J, *et al.* Detection of PKD1 and PKD2 somatic variants in autosomal dominant polycystic kidney cyst epithelial cells by whole-genome sequencing. *J Am Soc Nephrol*, 2021, **32**(12): 3114-3129
- [5] Su Q, Hu F, Ge X, *et al.* Structure of the human PKD1-PKD2 complex. *Science*, 2018, **361**(6406): eaat9819
- [6] Ha K, Nobuhara M, Wang Q, *et al.* The heteromeric PC-1/PC-2 polycystin complex is activated by the PC-1 N-terminus. *Elife*, 2020, **9**: e60684
- [7] Torres V E, Harris P C. Progress in the understanding of polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 2019, **15**(2): 70-72
- [8] Vangeel L, Voets T. Transient receptor potential channels and calcium signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, **11**(6): a035048
- [9] Cornec-Le Gall E, Alam A, Perrone R D. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet*, 2019, **393**(10174): 919-935
- [10] Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, *et al.* PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science*, 1996, **272**(5266): 1339-1342
- [11] Grieben M, Pike A C, Shintre C A, *et al.* Structure of the polycystic kidney disease TRP channel polycystin-2 (PC2). *Nat Struct Mol Biol*, 2017, **24**(2): 114-122
- [12] Shen P S, Yang X, Decaen P G, *et al.* The structure of the polycystic kidney disease channel PKD2 in lipid nanodiscs. *Cell*, 2016, **167**(3): 763-773. e711
- [13] Salehi-Najafabadi Z, Li B, Valentino V, *et al.* Extracellular loops are essential for the assembly and function of polycystin receptor-ion channel complexes. *J Biol Chem*, 2017, **292**(10): 4210-4221
- [14] Vien T N, Wang J, Ng L C T, *et al.* Molecular dysregulation of ciliary polycystin-2 channels caused by variants in the TOP domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(19): 10329-10338
- [15] Gout A M, Martin N C, Brown A F, *et al.* PKDB: polycystic kidney disease mutation database--a gene variant database for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mutat*, 2007, **28**(7): 654-659
- [16] Feng S, Okenka G M, Bai C X, *et al.* Identification and functional characterization of an N-terminal oligomerization domain for polycystin-2. *J Biol Chem*, 2008, **283**(42): 28471-28479
- [17] Kuo I Y, Keeler C, Corbin R, *et al.* The number and location of EF hand motifs dictates the calcium dependence of polycystin-2 function. *FASEB J*, 2014, **28**(5): 2332-2346
- [18] Cai Y, Maeda Y, Cedzich A, *et al.* Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. *J Biol Chem*, 1999, **274**(40): 28557-28565
- [19] Chen X Z, Segal Y, Basora N, *et al.* Transport function of the naturally occurring pathogenic polycystin-2 mutant, R742X. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **282**(5): 1251-1256
- [20] Yu Y, Ulbrich M H, Li M H, *et al.* Structural and molecular basis of the assembly of the TRPP2/PKD1 complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(28): 11558-11563
- [21] Tang L, Gamal El-Din T M, Payandeh J, *et al.* Structural basis for Ca²⁺ selectivity of a voltage-gated calcium channel. *Nature*, 2014, **505**(7481): 56-61
- [22] Chen X Z, Vassilev P M, Basora N, *et al.* Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions. *Nature*, 1999, **401**(6751): 383-386
- [23] González-Perrett S, Kim K, Ibarra C, *et al.* Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(3): 1182-1187
- [24] Kleene S J, Kleene N K. The native TRPP2-dependent channel of murine renal primary cilia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, **312**(1): F96-f108
- [25] Liu X, Vien T, Duan J, *et al.* Polycystin-2 is an essential ion channel subunit in the primary cilium of the renal collecting duct epithelium. *Elife*, 2018, **7**: e33183
- [26] Zheng W, Yang X, Hu R, *et al.* Hydrophobic pore gates regulate ion permeation in polycystic kidney disease 2 and 2L1 channels. *Nat*

- Commun, 2018, **9**(1): 2302
- [27] Wilkes M, Madej M G, Kreuter L, *et al.* Molecular insights into lipid-assisted Ca(2+) regulation of the TRP channel Polycystin-2. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, **24**(2): 123-130
- [28] Anyatonwu G I, Ehrlich B E. Organic cation permeation through the channel formed by polycystin-2. *J Biol Chem*, 2005, **280**(33): 29488-29493
- [29] Pavel M A, Lv C, Ng C, *et al.* Function and regulation of TRPP2 ion channel revealed by a gain-of-function mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(17): E2363-2372
- [30] Wang Z, Ng C, Liu X, *et al.* The ion channel function of polycystin-1 in the polycystin-1/polycystin-2 complex. *EMBO Rep*, 2019, **20**(11): e48336
- [31] Cai Y, Anyatonwu G, Okuhara D, *et al.* Calcium dependence of polycystin-2 channel activity is modulated by phosphorylation at Ser812. *J Biol Chem*, 2004, **279**(19): 19987-19995
- [32] Koulen P, Cai Y, Geng L, *et al.* Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol*, 2002, **4**(3): 191-197
- [33] Vien T N, Ng L C T, Smith J M, *et al.* Disrupting polycystin-2 EF hand Ca(2+) affinity does not alter channel function or contribute to polycystic kidney disease. *J Cell Sci*, 2020, **133**(24): jcs255562
- [34] Zheng W, Shen F, Hu R, *et al.* Far upstream element-binding protein 1 binds the 3' untranslated region of PKD2 and suppresses its translation. *J Am Soc Nephrol*, 2016, **27**(9): 2645-2657
- [35] Yang J, Zheng W, Wang Q, *et al.* Translational up-regulation of polycystic kidney disease protein PKD2 by endoplasmic reticulum stress. *FASEB J*, 2013, **27**(12): 4998-5009
- [36] Streets A J, Moon D J, Kane M E, *et al.* Identification of an N-terminal glycogen synthase kinase 3 phosphorylation site which regulates the functional localization of polycystin-2 *in vivo* and *in vitro*. *Hum Mol Genet*, 2006, **15**(9): 1465-1473
- [37] Streets A J, Needham A J, Gill S K, *et al.* Protein kinase D-mediated phosphorylation of polycystin-2 (TRPP2) is essential for its effects on cell growth and calcium channel activity. *Mol Biol Cell*, 2010, **21**(22): 3853-3865
- [38] Streets A J, Wessely O, Peters D J, *et al.* Hyperphosphorylation of polycystin-2 at a critical residue in disease reveals an essential role for polycystin-1-regulated dephosphorylation. *Hum Mol Genet*, 2013, **22**(10): 1924-1939
- [39] Hu J, Bae Y K, Knobel K M, *et al.* Casein kinase II and calcineurin modulate TRPP function and ciliary localization. *Mol Biol Cell*, 2006, **17**(5): 2200-2211
- [40] Hofherr A, Wagner C, Fedeles S, *et al.* N-glycosylation determines the abundance of the transient receptor potential channel TRPP2. *J Biol Chem*, 2014, **289**(21): 14854-14867
- [41] Olaizola P, Rodrigues P M, Caballero-Camino F J, *et al.* Genetics, pathobiology and therapeutic opportunities of polycystic liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, **19**(9): 585-604
- [42] Liang G, Li Q, Tang Y, *et al.* Polycystin-2 is regulated by endoplasmic reticulum-associated degradation. *Hum Mol Genet*, 2008, **17**(8): 1109-1119
- [43] Hu J, Harris P C. Regulation of polycystin expression, maturation and trafficking. *Cell Signal*, 2020, **72**: 109630
- [44] Köttgen M, Benzing T, Simmen T, *et al.* Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J*, 2005, **24**(4): 705-716
- [45] Geng L, Okuhara D, Yu Z, *et al.* Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif. *J Cell Sci*, 2006, **119**(Pt 7): 1383-1395
- [46] Wu Y, Dai X Q, Li Q, *et al.* Kinesin-2 mediates physical and functional interactions between polycystin-2 and fibrocystin. *Hum Mol Genet*, 2006, **15**(22): 3280-3292
- [47] Ma M. Cilia and polycystic kidney disease. *Semin Cell Dev Biol*, 2021, **110**: 139-148
- [48] Mcconnachie D J, Stow J L, Mallett A J. Ciliopathies and the kidney: a review. *Am J Kidney Dis*, 2021, **77**(3): 410-419
- [49] Thompson C L, Mcfie M, Chapple J P, *et al.* Polycystin-2 is required for chondrocyte mechanotransduction and traffics to the primary cilium in response to mechanical stimulation. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(9): 4313
- [50] Bai C X, Giamarchi A, Rodat-Despoix L, *et al.* Formation of a new receptor-operated channel by heteromeric assembly of TRPP2 and TRPC1 subunits. *EMBO Rep*, 2008, **9**(5): 472-479
- [51] Kleene S J, Siroky B J, Landero-Figueroa J A, *et al.* The TRPP2-dependent channel of renal primary cilia also requires TRPM3. *PLoS One*, 2019, **14**(3): e0214053
- [52] Ta C M, Vien T N, Ng L C T, *et al.* Structure and function of polycystin channels in primary cilia. *Cell Signal*, 2020, **72**: 109626
- [53] Decaen P G, Delling M, Vien T N, *et al.* Direct recording and molecular identification of the calcium channel of primary cilia. *Nature*, 2013, **504**(7479): 315-318
- [54] Delling M, Indzhukulian A A, Liu X, *et al.* Primary cilia are not calcium-responsive mechanosensors. *Nature*, 2016, **531**(7596): 656-660
- [55] Sammels E, Devogelaere B, Mekahli D, *et al.* Polycystin-2 activation by inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release requires its direct association with the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in a signaling microdomain. *J Biol Chem*, 2010, **285**(24): 18794-18805
- [56] Santoso N G, Cebotaru L, Guggino W B. Polycystin-1, 2, and STIM1 interact with IP(3)R to modulate ER Ca release through the PI3K/Akt pathway. *Cell Physiol Biochem*, 2011, **27**(6): 715-726
- [57] Guo J, Zhao R, Zhou M, *et al.* TRPP2 and STIM1 form a microdomain to regulate store-operated Ca(2+) entry and blood vessel tone. *Cell Commun Signal*, 2020, **18**(1): 138
- [58] Anyatonwu G I, Estrada M, Tian X, *et al.* Regulation of ryanodine receptor-dependent calcium signaling by polycystin-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(15): 6454-6459
- [59] Menezes L F, Germino G G. The pathobiology of polycystic kidney disease from a metabolic viewpoint. *Nat Rev Nephrol*, 2019, **15**(12): 735-749
- [60] Allison S J. PC2-mitochondria interactions in PKD. *Nat Rev Nephrol*, 2019, **15**(8): 458
- [61] Kuo I Y, Brill A L, Lemos F O, *et al.* Polycystin 2 regulates

- mitochondrial Ca^{2+} signaling, bioenergetics, and dynamics through mitofusin 2. *Sci Signal*, 2019, **12**(580): eaat7397
- [62] Li Y, Wright J M, Qian F, *et al.* Polycystin 2 interacts with type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca^{2+} signaling. *J Biol Chem*, 2005, **280**(50): 41298-306
- [63] Tran M T, Zsengeller Z K, Berg A H, *et al.* PGC1 α drives NAD biosynthesis linking oxidative metabolism to renal protection. *Nature*, 2016, **531**(7595): 528-532
- [64] Spirli C, Mariotti V, Villani A, *et al.* Adenylyl cyclase 5 links changes in calcium homeostasis to cAMP-dependent cyst growth in polycystic liver disease. *J Hepatol*, 2017, **66**(3): 571-580
- [65] Mehta Y R, Lewis S A, Leo K T, *et al.* “ADPKD-omics”: determinants of cyclic AMP levels in renal epithelial cells. *Kidney Int*, 2022, **101**(1): 47-62
- [66] Yamaguchi T, Wallace D P, Magenheimer B S, *et al.* Calcium restriction allows cAMP activation of the B-Raf/ERK pathway, switching cells to a cAMP-dependent growth-stimulated phenotype. *J Biol Chem*, 2004, **279**(39): 40419-40430
- [67] Margaria J P, Campa C C, De Santis M C, *et al.* The PI3K/Akt/mTOR pathway in polycystic kidney disease: a complex interaction with polycystins and primary cilium. *Cell Signal*, 2020, **66**: 109468
- [68] Müller R U, Schermer B. Hippo signaling-a central player in cystic kidney disease?. *Pediatr Nephrol*, 2020, **35**(7): 1143-1152
- [69] Kim S, Nie H, Nesin V, *et al.* The polycystin complex mediates Wnt/ Ca^{2+} signalling. *Nat Cell Biol*, 2016, **18**(7): 752-764
- [70] Smith A O, Jonassen J A, Preval K M, *et al.* c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling contributes to cystic burden in polycystic kidney disease. *PLoS Genet*, 2021, **17**(12): e1009711
- [71] Arnould T, Sellin L, Benzing T, *et al.* Cellular activation triggered by the autosomal dominant polycystic kidney disease gene product PKD2. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(5): 3423-3434
- [72] Peña-Oyarzun D, Rodriguez-Peña M, Burgos-Bravo F, *et al.* PKD2/polycystin-2 induces autophagy by forming a complex with BECN1. *Autophagy*, 2021, **17**(7): 1714-1728
- [73] Decuypere J P, Van Giel D, Janssens P, *et al.* Interdependent regulation of polycystin expression influences starvation-induced autophagy and cell death. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(24): 13511
- [74] Blair H A. Tolvaptan: a review in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Drugs*, 2019, **79**(3): 303-313
- [75] Patel D M, Dahl N K. Long-term safety of tolvaptan in ADPKD: where do we stand?. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2020, **16**(1): 3-5
- [76] Reiterová J, Tesař V. Autosomal dominant polycystic kidney disease: from pathophysiology of cystogenesis to advances in the treatment. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(6): 3317
- [77] Wang J, Tripathy N, Chung E J. Targeting and therapeutic peptide-based strategies for polycystic kidney disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, **161-162**: 176-189
- [78] Nowak K L, Steele C, Gitomer B, *et al.* Overweight and obesity and progression of ADPKD. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2021, **16**(6): 908-915
- [79] Weydert C, Decuypere J P, De Smedt H, *et al.* Fundamental insights into autosomal dominant polycystic kidney disease from human-based cell models. *Pediatr Nephrol*, 2019, **34**(10): 1697-1715

Polycystin-2 Ion Channel Function and Pathogenesis in Autosomal Dominant Polycystic Kidney*

WANG Kai^{1,2,3,4)}, HUANG Yuan^{1,2,3,4)**}, ZHOU Ce-Fan^{1,2,3,4)},
TANG Jing-Feng^{1,2,3,4)}, CHEN Xing-Zhen^{1,2,3,4)**}

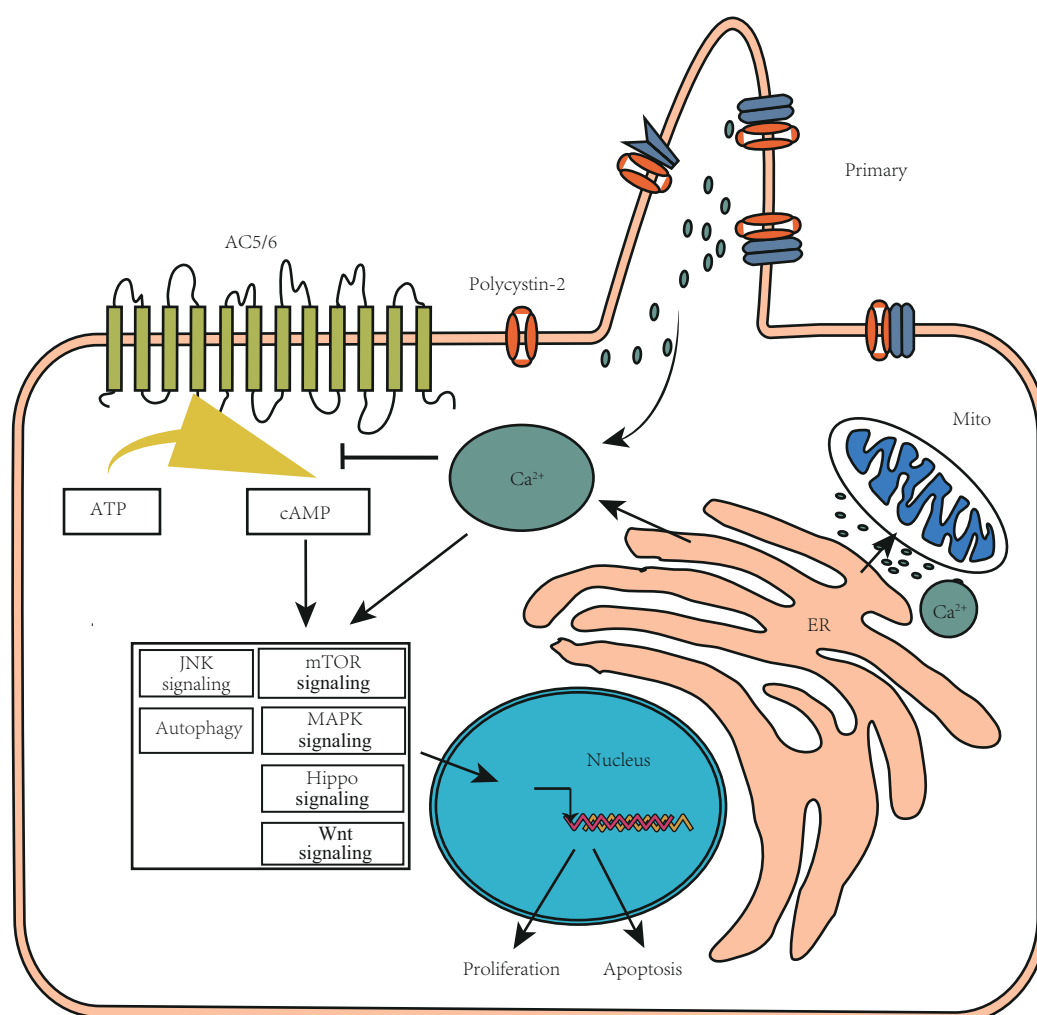
⁽¹⁾National “111” Center for Cellular Regulation and Molecular Pharmaceutics, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;

⁽²⁾Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;

⁽³⁾Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation (Ministry of Education & Hubei Province), Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;

⁽⁴⁾Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31871176, 32000797).

** Corresponding author.

CHEN Xing-Zhen. Tel: 86-27-59750472, E-mail: xingzhenchen_hut@163.com

HUANG Yuan. Tel: 86-27-59750472, E-mail: yuanh113@163.com

Received: November 29, 2022 Accepted: March 17, 2023

Abstract Polycystin-2 (also known as PC2, TRPP2, PKD2) is a major contributor to the underlying etiology of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), which is the most prevalent monogenic kidney disease in the world. As a transient receptor potential (TRP) channel protein, PC2 exhibits cation-permeable, Ca^{2+} -dependent channel properties, and plays a crucial role in maintaining normal Ca^{2+} signaling in systemic physiology, particularly in ADPKD chronic kidney disease. Structurally, PC2 protein consists of six transmembrane structural domains (S1–S6), a polycystin-specific “tetragonal opening for polycystins” (TOP) domain located between the S1 and S2 transmembrane structures, and cytoplasmic N- and C-termini. Although the cytoplasmic N-terminus and C-terminus of PC2 may not be significant in the gating of PC2 channels, there is still much protein structural information that needs to be thoroughly investigated, including the regulation of channel function and the assembly of homotetrameric ion channels. This is further supported by the presence of human disease-associated mutation sites on the PC2 structure. Moreover, PC2 synthesized in the endoplasmic reticulum is enriched in specific subcellular localization *via* membrane transport and can assemble itself into homotetrameric ion channels, as well as form heterotrimeric receptor-ion channel complexes with other proteins. These complexes are involved in a wide range of physiological functions, including the regulation of mechanosensation, cell polarity, cell proliferation, and apoptosis. In particular, PC2 assembles with chaperone proteins to form polycystic protein complexes that affect Ca^{2+} transport in cell membranes, cilia, endoplasmic reticulum, and mitochondria, and are involved in activating cell fate-related signaling pathways, particularly cell differentiation, proliferation, survival, and apoptosis, and more recently, autophagy. This leads to a shift of cystic cells from a normal uptake, quiescent state to a pathologically secreted, proliferative state. In conclusion, the complex structural and functional roles of PC2 highlight its critical importance in the pathogenesis of ADPKD, making it a promising target for therapeutic intervention.

Key words polycystin-2, ion channel, Ca^{2+} , ADPKD

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0546