



Pannexin1离子通道的结构与功能研究进展*

郑翔¹⁾ 叶升²⁾ 赵伟^{1,3)} 陈渊^{1)**}⁽¹⁾ 浙江农林大学林业与生物技术学院, 杭州 311300; ⁽²⁾ 天津大学生命科学学院, 天津 300072;⁽³⁾ 浙江省特色中药资源保护与创新利用重点实验室, 杭州 311300)

摘要 Pannexin1 (PANX1) 是一个可以通透包括ATP在内的多种化合物以及离子的离子通道蛋白. 它可以在细胞凋亡、炎症等多种生理现象中起到重要的作用, 被认为是一个具有潜力的治疗靶点. 若要将其当作治疗靶点, 需要对其作为离子通道的特性有较为深刻的认识. 此前针对该离子通道的研究有诸多限制, 随着近几年冷冻电镜技术的发展, 对离子通道的研究发展到了一个新的阶段. 受益于冷冻电镜技术, PANX1蛋白的结构被解析出来, 包括激活机制、离子通路以及小分子抑制剂的阻断机制在内的多个问题有了阶段性的解答. 本文旨在从结构生物学的角度, 介绍该离子通道的一些基础特性, 并分析目前该蛋白质研究上所遇到的问题, 为将来的工作提出重点研究目标.

关键词 Pannexin1, 冷冻电镜, 结构生物学

中图分类号 Q5, Q6, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0444

1 Pannexin1通道的概况

细胞间传递信号通常是通过缝隙连接 (gap junction) 完成的. 在脊椎动物中, 缝隙连接由相对应的细胞质膜上各6个连接子 (connexins) “头碰头”组合而成^[1]. 而在无脊椎动物中也发现了一类蛋白质叫做innexins, 与连接子结构相似但是序列并不相似. 之后又发现了一种离子通道蛋白, 其序列与innexins具有同源性, 被称为pannexins^[2]. 目前已知Pannexins家族包含3个蛋白质, 分别是pannexin1 (PANX1)、pannexin2 (PANX2) 和pannexin3 (PANX3). PANX2和PANX3与PANX1拥有类似的拓扑结构, 都有4个跨膜螺旋. 然而它们的生理功能与PANX1的差别较大. PANX2主要在神经系统中表达, 并且有证据显示其与神经元的分化有关^[3]. 还有报道认为, 在神经细胞中, PANX1和PANX2存在共定位现象^[4-5]. PANX3被发现于皮肤与骨骼的发育过程中起作用^[6]. 由于PANX2和PANX3相对于PANX1功能更加特殊, 并且是组织特异性表达, 所以针对它们的研究相对较少, 本文不做赘述.

PANX1是一个离子通道蛋白, 广泛存在于哺

乳动物细胞质膜以及内质网膜上, 一般会以同源寡聚物的状态出现. 有研究发现PANX1和压力敏感通道SWELL1拥有较高的同源性^[7-8]. 与传统的缝隙连接不同, PANX1并不具有“头碰头”的特性, 而是单独形成孔道行使功能, 受翻译后修饰、亚细胞定位以及组织分布的调控^[9-11]. 其在人体内是广谱表达的, 在许多器官、血液以及免疫系统中存在^[6, 12-13]. 该离子通道既可以通透ATP和一些荧光染料之类的大分子^[14-15], 也可以通透NO³⁻、Cl⁻和谷氨酸这样的小分子或者离子^[16-18].

经研究发现, PANX1蛋白所涉及到的功能非常多, 目前已知的有: 与凋亡细胞清除相关, 在该过程中PANX1会释放出ATP作为信号吸引巨噬细胞来吞噬凋亡小体^[19]; 在白细胞迁移的过程中起作用, 这一过程涉及到1型TNF受体的激活以及Src家族激酶介导的PANX1磷酸化^[20]; 在NLRP3炎症小体的组装过程中发挥作用^[21]; 在出血性脑

* 浙江农林大学科研发展基金(2013FR032)和浙江省基础公益研究计划(LGF18H280002)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0571-63732700, E-mail: ychen@zafu.edu.cn

收稿日期: 2020-12-20, 接受日期: 2021-04-15

损伤和中风的过程中也起到一定作用, 这一系列过程被认为与 NMDA 受体以及 Src 家族激酶有关^[22-24]; 与吗啡的戒断反应有关系, 在吗啡戒断期间, 胶质细胞上 PANX1 介导的 ATP 释放会导致戒断反应的产生, 使用广谱的 PANX1 抑制剂可以明显抑制戒断反应的产生^[25]; 树突细胞的迁移过程中该蛋白质也行使了功能, 在受伤的细胞释放 ATP 之后, 树突细胞会和巨噬细胞一样被招募到受伤部位, 这个过程离不开 P2X7 受体以及 PANX1 通道的作用^[26]; 脂肪细胞摄取葡萄糖的过程被胰岛素所调节, 而 PANX1 通道的活性在这个过程中至关重要, 抑制 PANX1 会降低脂肪细胞的体外葡萄糖摄取^[27]; 此外在角化细胞分化、血压恒定以及关节痛中该离子通道也发挥功能^[6, 28-29].

PANX1 与 innexins 还有 connexins 一样都拥有 4 个跨膜螺旋, 之前有报道称其为一个六聚体^[30], 并且有 N-乙酰糖基化修饰^[31]. 但是近来随着冷冻电镜技术的逐渐成熟, PANX1 的结构被解析出来, 研究者们发现在生理状态下 PANX1 呈现同源七聚体的寡聚状态^[32-37]. 每个亚基大致可以分为 3 个部分, 胞外结构域 (extracellular domain, ECD)、跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD) 和 C 端胞内结构域 (intracellular domain, ICD) (图 1). 胞外结构域由两段连接肽段构成, 它们分别连接第一和第二跨膜螺旋以及第三和第四跨膜螺旋. 这两个连接肽段之间存在两对二硫键, 起到稳定结构的作用. 而跨膜结构域主要由 4 个跨膜螺旋组成, 其中第一个跨膜螺旋与 N 端胞内区相连. 胞内区主要由 3 个部分组成: 连接第二和第三个跨膜螺旋的肽段、N 端胞内结构域以及 C 端胞内结构域. 其中在

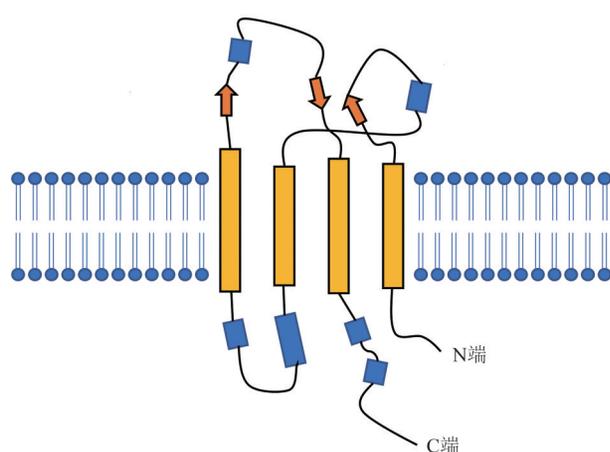


Fig. 1 Topological structure of PANX1

图1 PANX1的拓扑结构

黄色图形表示跨膜螺旋; 橙色图形表示 β 折叠; 蓝色图形表示 α 螺旋.

C 端胞内结构域中存在一个胱天蛋白酶 (caspase) 酶切位点, 该位点的存在对于该蛋白质功能至关重要, 将在后文中详细描述.

2 PANX1通道的激活

2.1 钾离子激活

早期的工作认为, 细胞外的钾离子可能是激活该离子通道的主要离子. Silverman 等^[38]发现, 当细胞外的钾离子浓度累积到接近 100 mmol/L 时, 随着钾离子浓度的更进一步提高, PANX1 通道便会开放; Santiago 等^[39]则发现高浓度的细胞外钾离子可以在海马切片中激活 PANX1; Wang 等^[40]发现在爪蟾卵母细胞中, 胞外的钾离子会导致 ATP 释放从而造成大电导电流. 并且从该通道的电压依赖性来看, 该离子通道的开放并不是由于质膜去极化影响造成的, 更可能是胞外钾离子直接造成的结果^[41]. 具体的胞外钾离子浓度升高导致通道开放机制有待进一步研究.

而最近的研究却在这个推论上提出了明显不同的观点. Nielsen 等^[42]的工作发现, 在细胞外高钾的环境下, 在爪蟾卵母细胞中表达的鼠源 PANX1 离子通道不能促进乙啡叮吸收, 也不能观察到明显的电流变化. Ruan 等^[32]在解析蛋白质结构时发现, 钾离子存在与否对 PANX1 的结构并没有出现明显的影响; 而 Jin 等^[35]的工作显示, 在 HEK293T 细胞胞外高钾的情况下并不能观察到明显的 ATP 释放. 因此, 在之前的工作中该离子通道显示出的胞外钾离子激活的特性有待更进一步的验证.

2.2 C端caspase酶切激活方式

在人源 PANX1 离子通道的第 376 个氨基酸残基天冬氨酸和 377 个氨基酸残基谷氨酸残基之间存在一个 caspase 酶切位点. 目前已有的研究表明, caspase 3 和 caspase 7 两种酶能够参与 PANX1 蛋白的切割修饰^[19, 43]. 而在细胞正常的生理状态下, C 端序列可能与离子通道的孔道结合, 从而达到自抑制的效果. 因此, PANX1 离子通道还拥有个独特不可逆的激活方式, 就是通过 caspase 切割该位点, 使 C 端序列脱离, 孔道开放, 从而达到激活的效果. 这种激活方式常见于细胞凋亡的过程中, 被激活的 caspase3 或者 caspase7 两种酶作用于 PANX1 的 C 端酶切位点, 离子通道开放后释放核苷酸, 从而吸引巨噬细胞来吞噬凋亡的细胞^[19]. Caspase3 酶切激活 PANX1 离子通道已经在膜片钳实验中得到证实^[43]. 遗憾的是, 在最近的冷冻电镜结构解析结

果中, C端序列区域的电子密度几乎不能被观察到, 提示这一段序列拥有较强的柔性, 没有直接观察到C端序列和离子通道孔道的结合方式. 此外, 除了caspase3和caspase7之外, 还有报道在脂多糖诱导的骨髓源性巨噬细胞焦亡过程中, caspase11也可以通过同一位点激活PANX1离子通道^[44].

2.3 胞内钙离子激活

PANX1还可以通过一些G蛋白偶联受体被激活, G蛋白偶联受体结合配体后导致下游内质网中钙离子释放, 胞质内钙离子浓度上升, 从而使PANX1被激活.

Locovei等^[45]在爪蟾卵母细胞中共表达PANX1和P2Y1/P2Y2受体都会出现ATP诱导的PANX1电流, 而对单独表达PANX1离子通道的细胞使用ATP诱导则不能出现明显的电流. 在同一项工作中, 使用内面向外式膜片钳 (inside-out patch) 实验时发现, 胞质侧加入钙离子也可以使PANX1电流上升. 这暗示了P2Y1或P2Y2介导的PANX1激活与钙离子有关, 但是这一结果并未被进一步证实, 而且不能证明钙离子是否能不通过受体直接激活PANX1. 除此之外, PAR1/3受体也和ATP诱导的PANX1电流上升有关^[46-47].

钙离子激活PANX1的相关机制目前尚不清楚, 并且从其结构分析, 在胞内侧并没有发现典型的钙离子结合域. 最近的几个冷冻电镜结构也并没有提到在钙离子存在的条件下其构象有变化. 相关机制有待更进一步的研究.

2.4 磷酸化激活

PANX1还可以被以磷酸化为主的翻译后修饰激活. 有证据显示, 在海马锥体神经元中, NMDA受体可以通过Src家族激酶介导的方式激活PANX1^[23, 48-49]. 在这些研究工作中, NMDA会诱导PANX1产生电流, 并且该电流会被PANX1的抑制剂减弱. 值得一提的是, Src家族激酶的抑制剂也能使这一电流减弱. 研究者使用一种特异性识别磷酸化的抗体, 检测出PANX1潜在的磷酸化位点可能是Y308^[23]. 而在Ruan等^[32]最近的研究结果中, 发现一些会被磷酸化的酪氨酸残基位于胞内结构域的下端, 说明磷酸化可能会改变PANX1的C端结构. 在炎症反应中, 白细胞通过静脉微循环迁移的过程中也发现了PANX1的TNF- α 磷酸化激活方式. 在该过程中, Src家族激酶同样起了作用, 该激活方式下PANX1的磷酸化位点可能为Y198. 此外还有一个较有争议的结果也显示Src家族激酶

在PANX1磷酸化激活中发挥作用, 那就是P2X7受体诱导的PANX1激活^[50]. 目前通过Src家族激酶介导PANX1激活的具体机制不甚清楚, 不同的受体所介导的通道激活过程中磷酸化位点也不同, 所以有必要在将来的研究中把这一部分作为工作的重点来探究.

除了Src家族激酶之外, 有文献提出还有其他的激酶可以调控PANX1通道的活动. JNK (c-Jun N-terminal kinase) 被报道在大鼠肝细胞瘤中与PANX1的活动有关, 使用JNK抑制剂处理细胞会出现ATP释放减少的现象. 但目前尚不清楚这个现象中是否还涉及其他蛋白质, 因为并没有证据显示是JNK直接作用于PANX1^[51].

Poornima等^[52]发现蛋白激酶G也可能参与PANX1的调控. 他们的工作显示, HEK293细胞中表达的鼠源PANX1通道电流可以被NO抑制, 而该现象可以通过抑制鸟苷酸环化酶或者蛋白激酶G来消除, 所以他们猜测NO可以抑制蛋白激酶G诱导的PANX1活动, 同时该工作认为磷酸化位点是S206.

2.5 其他激活方式

除了上述激活方式外, 还有一些工作也提到其他的激活方式. 有研究显示pH可能也可以调节PANX1的活性^[53]. 该工作发现, 在N2a细胞株中表达的斑马鱼PANX1蛋白对于溴化乙锭的吸收会受到胞外酸碱度的影响, 在酸性条件下减少吸收而碱性条件下增加吸收. 但是ATP释放或者电流是否也受pH值影响还有待验证, 其他生物来源的PANX1是否有类似现象也还有待确认. 此外还有工作表明低血氧症状可以激活人的红细胞质膜PANX1从而释放ATP^[54].

还有一些其他的受体可能也会激活PANX1. 例如CXCR4趋化因子受体^[55]、 α 1肾上腺素受体^[28]以及胰岛素受体^[27]. 由于相关的研究并不多, 这里不做赘述.

3 PANX1离子通道的电导

PANX1的电导特性相较于一些常见的离子通道而言有一些特殊. 这种离子通道在不同的激活条件下拥有不同的电导状态, 甚至在单一的激活条件下也存在多种开放状态并存.

PANX1是一个ATP释放通道, 并且ATP释放造成的电流往往具有较大的电导. 在2004年, Bao等^[14]在非洲爪蟾卵母细胞中表达了人源PANX1,

之后使用单通道膜片钳记录了该通道的电导, 在钾离子的条件下呈现出较大电导 (475 pS 和 550 pS) 的通道特性, 而在未表达 PANX1 的细胞中没有观察到电流. 较为特殊的是, 在该项工作中, PANX1 被发现有多种不同的开放状态, 并且表达了 PANX1 的卵母细胞在细胞外高钾条件下可以释放 ATP. 2006 年, Thompson 等^[15] 在大鼠的海马神经元中观察到 PANX1 的电流可以达到 550 pS; 2011 年, Kienitz 等^[13] 在大鼠心肌细胞中表达了外源 PANX1, 观察到了较大的电流 (约 300 pS). 这些结果都证明了 PANX1 离子通道的单通道电流电导较大. 但是这些工作中揭示离子通道特性不尽相同, 不仅能在单个离子通道上就观察到多种亚电导状态, 在不同的激活条件下, 该通道的开放时长也不等.

早期的研究一般都认为 PANX1 蛋白是一个具有单一大电导电流的离子通道, 然而随着研究的深入, 还发现了该离子通道的小电导电流^[16-17]. 该离子通道的小电导电流并不是由于 ATP 的释放造成, 在小电导的电流发生时, 并没有观察到 ATP 的释放. 这种小电导的电流在 C 端没有被 caspase 处理的情况下也能存在, 究竟是有其他的离子通路存在或者是因为 C 端并未完全堵住孔道, 并无证据能够解释. 而当 PANX1 的结构被解析出来后, 提供了一些相关的思路, 具体将在后文中阐述.

4 PANX1 的抑制剂

一直以来有关 PANX1 的抑制剂研究都是一个重点. 考虑到该离子通道所涉及的功能较多, 表达相对广谱, 所以被视为很有潜力的治疗靶点.

目前为止, 研究最为深入的小分子抑制剂是 Carbenoxolone (CBX), 随着相关的结构被解析出来, CBX 的作用机制也被揭示出来. CBX 本身是作为一个典型的缝隙连接抑制剂而被用于阻断 PANX1 的, 其抑制效果明显^[56-57]. 之后, Michalski 等^[58] 通过设计 PANX1 和 PANX3 (PANX3 不受 CBX 抑制) 的嵌合体, 发现 CBX 抑制 PANX1 的关键靶点在其第一个胞外区, 其中最关键的氨基酸残基是 W74. 2020 年的多个冷冻电镜结果也证实了这一点. 从 PANX1 结构来看, W74 处于胞外侧孔道中半径最小的位置, 此处由 7 个色氨酸围成, 其孔道半径在 4.7 Å 左右, 足够让 ATP 等分子通过. 而通过与不含有 CBX 的结构进行比较, 发现在加入了 CBX 之后, W74 附近的孔道明

显电子密度较高^[32, 35], 并且 W74 突变之后, CBX 就不能抑制 PANX1. 这些结果进一步佐证了 CBX 的结合位点就是 W74. 由于分辨率的限制, 目前已有的结果中不能观察到 CBX 与 W74 具体是如何结合的, 猜测是由 W74 上的芳香侧链与 CBX 上的类固醇核心相互作用, 同时 R75 的侧链与 CBX 末端的两个羧基相互作用. 而 CBX 与 PANX1 胞外侧 W74 的结合, 堵住了孔道, 导致各类小分子和离子不能通过该离子通道, 从而起到了抑制的作用.

除了 CBX 之外, Poon 等^[59] 发现一种喹诺酮类抗生素 trovafloxacin 是一种新的 PANX1 抑制剂. 这种药物本身作为一种很有潜力的抗生素, 在临床实验中却造成了致命的副作用, 导致了儿童死亡. 而实验表明经过 trovafloxacin 处理的细胞, 由于 PANX1 被抑制会形成更小的凋亡小体, 也许和其毒性有关. 该工作提到, 由于细菌耐药性的增强, 现在全球面临抗生素短缺的问题, 如果能够深入研究 trovafloxacin 的毒性机制, 可能会加快喹诺酮类药物的研究, 使其成为一类新的可用于治疗的抗生素. 之后关于该种抑制剂的相关研究并不多见, 而且对于 PANX1 的抑制与其毒理特性之间的具体关系也没有被进一步的证实, 所以针对该种抑制剂的研究仅止于此.

除此之外, 该离子通道还有一些其他的抑制剂, 比如丙磺舒 (probenecid)、食用蓝色一号 (brilliant blue FCF, 一种食用色素)、氟灭酸 (flufenamic acid)、安体舒通 (spironolactone) 以及镉离子等等. 目前有关这几种抑制剂的研究较少, 是否有必要做更进一步的研究还不太明确, 这里不做赘述.

5 PANX1 的孔道和底物通路

根据当前的研究, 可以提出 PANX1 的一种门控机制以及底物电导的通路模型. PANX1 孔道在距离胞外端不远处就收缩到了最窄, 也就是之前提到过的 7 个色氨酸以及精氨酸组成的部分, 其孔道半径在 4.7 Å 左右. 这一个区域的刚性较强, 不同的文献中在这一部分的结构几乎一致. 这一区域主要带正电, 所以通道倾向于透过带负电的底物, 也可以与 CBX 相结合. 而研究者还发现, 当在这一区域设计点突变, 使其正电荷变为负电荷^[58], 此时 PANX1 的电压依赖性和离子选择性丧失, 所以认为该处主要通过带电性质以及尺寸来筛选底物, 在激活之后并不会改变自身结构.

孔道中在 W74 更靠近胞内区的形形成了第二个收缩环, 该处位于跨膜区中心. 这个区域最窄的一环由 7 个异亮氨酸组成. 需要注意的是, 这个地方可能是因为刚性不够强, 也有可能是在离子通道不同的状态下该区域构象会发生改变, 不同团队的工作在这里显示出一定的差异性. 有的工作中并没有提到该处在孔道中形成第二个收缩环, 即使是提到了该处的几篇文章中测量出的直径差异也较大 (13~19 Å). 而在比这个收缩环更靠近胞内区的孔道部分, 不同的结果差异性更大, 孔道的组成和孔径都有一定差异. 究其根本, 有两个可能的原因:

a. 在 TM1 之前一段 N 端序列的结构具有较高的柔性, 有的结构显示该片段位于胞内区, 有结构显示该片段处在孔道中 (仅有 Ruan 等^[32]的结果显示 N 端的一部分螺旋嵌套在第一和第二个跨膜螺旋之间), 而有的结构显示这一段的电子密度缺失.

b. 除了 N 端序列之外, C 端序列更长, 且灵活性更高. 上文曾经提到, C 端序列在非激活状态下可能会插进孔道中与孔道结合从而达到自抑制效果. 而 C 端序列的绝大部分电子密度都是缺失的, 说明其灵活性很高, 考虑到其在被 caspase 酶切前会插在孔道中, 所以可以理解不同的结果孔道中近胞内侧的区域差别如此之大.

上文提到, PANX1 本身除了通透 ATP 所带来的大电导电流外, 还存在非 ATP 造成的小电导电流. 在未经 caspase 处理的离子通道上所观察到的小电导电流, 其底物通路是否也和 ATP 的通路一致? Ruan 等^[32]提出了一个不同于主要孔道的另外一条缝隙作为离子的通路. 该通路位于 PANX1 的胞内区域与跨膜区域相连的一条缝隙, 该缝隙内有几个带正电的侧链, 可以结合阴离子, 在非 ATP 造成的小电导电流过程中起到重要作用, 可以使非水化的氯离子通过. 而在这个过程中, N 端序列与第一个跨膜螺旋之间的一段具有较高灵活度的连接肽段, 是作为门控机制中的主要开关来行使功能.

参考目前的 PANX1 冷冻电镜结构以及一些其他的电生理实验, 可以总结出一个该离子通道的离子传导模型 (图 2). 常规情况下, C 端会堵住大的主要孔道, 这时在胞内区和跨膜区之间的缝隙成为较小的离子通过的通道, PANX1 的小电导电流主要是通过这条通路形成的; 而 PANX1 的大电导电流一般是通过主要的孔道形成的, 造成主要孔道开放的原因可能是 C 端发生构象变化, 或者是在细胞凋亡过程中通过 caspase 将 C 端整个切掉, 使相对较宽的主孔道暴露出来.

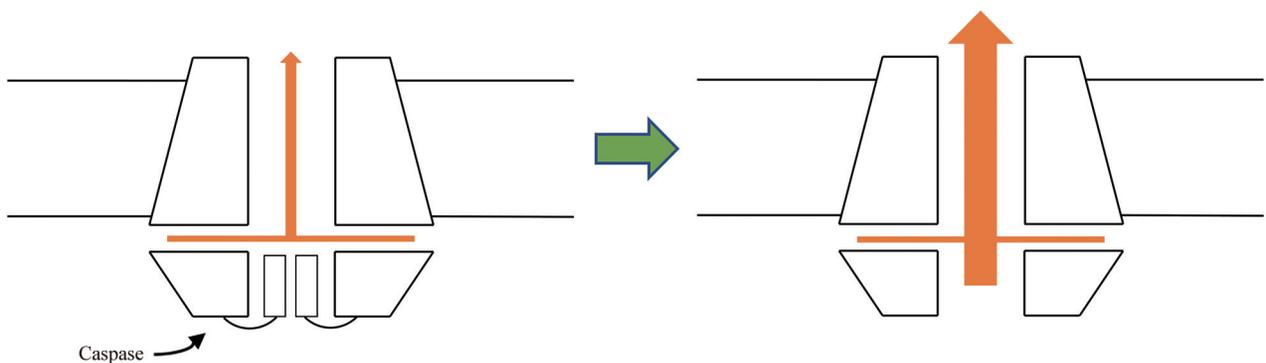


Fig. 2 An ion-conducting pathway model

图2 一个离子传导通路模型

一般生理状态下 C 端堵住主要孔道, 体积较小的阴离子从胞内区和跨膜区之间的缝隙通过, 形成电导较小的电流 (左图); 当发生细胞凋亡时, caspase 切掉 C 端, 使主要孔道打开, 诸如 ATP 等较大的小分子化合物可以从主要孔道通过, 形成电导较大的电流 (右图).

6 讨论与展望

随着 2020 年来 PANX1 的多个冷冻电镜结构的发表, 对于该离子通道的研究发展到了一个新的阶段. 长久以来, 由于 connexons 的半通道

(hemichannel) 是六聚体, 该离子通道的聚合状态也被认为是六聚体, 并且还有相关的实验证据^[30]. 然而当该离子通道的冷冻电镜结构被解析出来后, 却发现该离子通道为七聚体. 在早期研究该离子通道的时候, 由于其与 innexins 的同源性,

从结构以及功能上都会与 connexins 和 innexins 进行对比. 而后两者有一个非常重要的特征, 那就是两层细胞质膜上的半通道 (hemichannel) 可以通过“头碰头”的方式形成一个完整的通道, 在功能上是充当相邻细胞间信息的直接交流的桥梁. 而 PANX1 离子通道自发现以来, 并未观察到其有“头碰头”的特性. 曾经关于 PANX1 离子通道是半通道 (hemichannel) 还是通道 (channel) 有过争议, 但是随着相关研究的深入, 研究者们逐渐达成共识: PANX1 可以形成一个独立行使功能的通道. 近来的冷冻电镜结构也证实了这一点. 这里需要特别说明, 有关于 PANX1 不形成“头碰头”结构的原因, Ruan 等^[32]的工作中提出了一个可能: 在 PANX1 的胞外结构域上, 有一个糖基化位点 N255, 当把这个位点突变为 A 的时候, 两个 PANX1 可以“头碰头”地形成一个类似缝隙连接的结构. 这个结果暗示 PANX1 不形成缝隙连接的“头碰头”结构, 是 N255 的糖基化带来的结果, 而通过结构的比对, 也发现了突变前后整个胞外区域有部分构象的变化^[32]. 当然, 这里要注意的是, 通过突变得到的 N255A 尽管能够形成“头碰头”结构, 但是并无生理意义.

随着冷冻电镜技术的发展, 针对 PANX1 的研究已经向前迈了一大步, 但依然有一些问题没有得到解决. 目前所有使用冷冻电镜解析出来 PANX1 的电子密度在胞内区域都极度缺乏, 主要原因在于其 C 端柔性太高, 在不断的图像处理过程中, 电子密度被平均了. 之前的实验结果表明, PANX1 的 C 端在平时处于其内部主要的孔道内, 使其处于一种自抑制状态. 但是目前的结果并不能显示 C 端在其孔道内究竟是如何一种状态, 由于并没有观察到很强烈的电子密度, 只能猜测其并非稳定结合于孔道内壁. 从当前的冷冻电镜技术原理来看, 要解析这种灵活度较高的结构域并没有较好的解决方案, 这也是目前 PANX1 在结构生物学上所遭遇的瓶颈. 这种 C 端的自抑制机制相对特殊, 如果能够将其处于孔道中的状态完全解析清楚会更有助于理解该离子通道的特性.

还需要特别注意, 根据目前所报道的几个结构来看, 野生型和 C 端截短的离子通道结构之间并未发现明显的区别, 这里需要思考两种情况: 第一种情况是在生理条件下, 该通道的主要孔道开放与关闭只和 C 端构象变化有关; 二是目前得到的结构只是单一的状态, 且可能与其真正的生理状态并不完

全一致.

总体而言, 冷冻电镜技术的发展解决了很多之前所遇到的问题, 也证实了一些之前就提出过的假设, 同时还带来了一些新的挑战, 这些结果会在之后的研究中为研究者们指明道路. 除了 C 端自抑制机制之外, CBX 的抑制机制也将会是之后一段时间研究的重点. 完全掌握 CBX 的抑制机制, 对于将来针对 PANX1 设计靶向药物时, 会带来更好的理论支持.

参 考 文 献

- [1] Bruzzone R, Hormuzdi S G, Barbe M T, *et al.* Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(23): 13644-13649
- [2] Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, *et al.* A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol*, 2000, **10**(13): R473-R474
- [3] Swayne LA, Sorbara C D, Bennett S A L. Pannexin 2 is expressed by postnatal hippocampal neural progenitors and modulates neuronal commitment. *J Biol Chem*, 2010, **285**(32): 24977-24986
- [4] Ray A, Zoidl G, Weickert S, *et al.* Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system. *Eur J Neurosci*, 2005, **21**(12): 3277-3290
- [5] Vogt A, Hormuzdi S G, Monyer H. Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. *Mol Brain Res*, 2005, **141**(1): 113-120
- [6] Celetti S J, Cowan K N, Penuela S, *et al.* Implications of pannexin 1 and pannexin 3 for keratinocyte differentiation. *J Cell Sci*, 2010, **123**(Pt8): 1363-1372
- [7] Ma Z, Tanis J E, Taruno A, *et al.* Calcium homeostasis modulator (CALHM) ion channels. *Pflugers Arch*, 2016, **468**(3): 395-403
- [8] Abascal F, Zardoya R. LRRRC8 proteins share a common ancestor with pannexins, and may form hexameric channels involved in cell-cell communication. *Bioessays*, 2012, **34**(7): 551-560
- [9] Sosinsky G E, Boassa D, Dermietzel R, *et al.* Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels(Austin)*, 2011, **5**(3): 193-197
- [10] Boassa D, Qiu F, Dahl G, *et al.* Trafficking dynamics of glycosylated pannexin 1 proteins. *Cell Commun Adhes*, 2008, **15**(1): 119-132
- [11] Penuela S, Bhalla R, Nag K, *et al.* Glycosylation regulates pannexin intermixing and cellular localization. *Mol Biol Cell*, 2009, **20**(20): 4313-4323
- [12] Dvorianchikova G, Ivanov D, Panchin Y, *et al.* Expression of pannexin family of proteins in the retina. *FEBS Lett*, 2006, **580**(9): 2178-2182
- [13] Kienitz M, Bender K, Dermietzel R, *et al.* Pannexin 1 constitutes the large conductance cation channel of cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 2011, **286**(1): 290-298
- [14] Bao L, Locovei S, Dahl G. Pannexin membrane channels are

- mechanosensitive conduits for ATP. FEBS Lett, 2004, **572**(1-3): 65-68
- [15] Thompson R J, Zhou N, Macvicar B A. Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science*, 2006, **312**(5775): 924-927
- [16] Romanov R A, Bystrova M F, Rogachevskaya O A, *et al.* The ATP permeability of pannexin 1 channels in a heterologous system and in mammalian taste cells is dispensable. *J Cell Sci*, 2012, **125**(Pt22): 5514-5523
- [17] Ma W, Compan V, Zheng W, *et al.* Pannexin 1 forms an anion-selective channel. *Pflugers Arch*, 2012, **463**(4): 585-592
- [18] Chiu Y, Ravichandran K S, Bayliss D A. Intrinsic properties and regulation of Pannexin 1 channel. *Channels(Austin)*, 2014, **8**(2): 103-109
- [19] Chekeni F B, Elliott M R, Sandilos J K, *et al.* Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*, 2010, **467**(7317): 863-867
- [20] Lohman A W, Leskov I L, Butcher J T, *et al.* Pannexin 1 channels regulate leukocyte emigration through the venous endothelium during acute inflammation. *Nat Commun*, 2015, **6**: 7965
- [21] Chen K W, Demarco B, Heilig R, *et al.* Extrinsic and intrinsic apoptosis activate pannexin-1 to drive NLRP3 inflammasome assembly. *EMBO J*, 2019, **38**(10): e101638
- [22] Bargiotas P, Krenz A, Hormuzdi S G, *et al.* Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(51): 20772-20777
- [23] Weilinger N L, Lohman A W, Rakai B D, *et al.* Metabotropic NMDA receptor signaling couples Src family kinases to pannexin-1 during excitotoxicity. *Nat Neurosci*, 2016, **19**(3): 432-442
- [24] Weaver J L, Arandjelovic S, Brown G, *et al.* Hematopoietic pannexin 1 function is critical for neuropathic pain. *Sci Rep*, 2017, **7**: 42550
- [25] Burma N E, Bonin R P, Leduc-Pessah H, *et al.* Blocking microglial pannexin-1 channels alleviates morphine withdrawal in rodents. *Nat Med*, 2017, **23**(3): 355-360
- [26] Sáez P J, Vargas P, Shoji K F, *et al.* ATP promotes the fast migration of dendritic cells through the activity of pannexin 1 channels and P2X receptors. *Sci Signal*, 2017, **10**(506): eaah7107
- [27] Adamson S E, Meher A K, Chiu Y H, *et al.* Pannexin 1 is required for full activation of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Mol Metab*, 2015, **4**(9): 610-618
- [28] Billaud M, Chiu Y H, Lohman A W, *et al.* A molecular signature in the pannexin1 intracellular loop confers channel activation by the α 1 adrenoceptor in smooth muscle cells. *Sci Signal*, 2015, **8**(364): ra17
- [29] Mousseau M, Burma N E, Lee K Y, *et al.* Microglial pannexin-1 channel activation is a spinal determinant of joint pain. *Sci Adv*, 2018, **4**(8): eaas9846
- [30] Chiu Y H, Jin X, Medina C B, *et al.* A quantized mechanism for activation of pannexin channels. *Nat Commun*, 2017, **8**: 14324
- [31] Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, *et al.* Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. *J Biol Chem*, 2007, **282**(43): 31733-31743
- [32] Ruan Z, Orozco I J, Du J, *et al.* Structures of human pannexin 1 reveal ion pathways and mechanism of gating. *Nature*, 2020, **584**(7822): 646-651
- [33] Qu R, Dong L, Zhang J, *et al.* Cryo-EM structure of human heptameric Pannexin 1 channel. *Cell Res*, 2020, **30**(5): 446-448
- [34] Mou L, Ke M, Song M, *et al.* Structural basis for gating mechanism of Pannexin 1 channel. *Cell Res*, 2020, **30**(5): 452-454.
- [35] Jin Q, Zhang B, Zheng X, *et al.* Cryo-EM structures of human pannexin 1 channel. *Cell Res*, 2020, **30**(5): 449-451
- [36] Deng Z, He Z, Maksaev G, *et al.* Cryo-EM structures of the ATP release channel pannexin 1. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, **27**(4): 373-381
- [37] Michalski K, Syrjanen J L, Henze E, *et al.* The Cryo-EM structure of pannexin 1 reveals unique motifs for ion selection and inhibition. *Elife*, 2020, **9**: e54670
- [38] Silverman W R, De Rivero Vaccari J P, Locovei S, *et al.* The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *J Biol Chem*, 2009, **284**(27): 18143-18151
- [39] Santiago M F, Veliskova J, Patel N K, *et al.* Targeting pannexin1 improves seizure outcome. *Plos One*, 2011, **6**(9): e25178
- [40] Wang J, Ambrosi C, Qiu F, *et al.* The membrane protein Pannexin1 forms two open-channel conformations depending on the mode of activation. *Sci Signal*, 2014, **7**(335): ra69
- [41] Dahl G. ATP release through pannexon channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2015, **370**(1672): 20140191
- [42] Nielsen B S, Toft-Bertelsen T L, Lolansén S D, *et al.* Pannexin 1 activation and inhibition is permeant-selective. *J Physiol*, 2020, **598**(2): 361-379
- [43] Sandilos J K, Chiu Y H, Chekeni F B, *et al.* Pannexin 1, an ATP release channel, is activated by caspase cleavage of its pore-associated C-terminal autoinhibitory region. *J Biol Chem*, 2012, **287**(14): 11303-11311
- [44] Yang D, He Y, Muñoz-Planillo R, *et al.* Caspase-11 requires the Pannexin-1 channel and the Purinergic P2X7 pore to mediate pyroptosis and endotoxic shock. *Immunity*, 2015, **43**(5): 923-932
- [45] Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett*, 2006, **580**(1): 239-244
- [46] Seminario-Vidal L, Kreda S, Jones L, *et al.* Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of rho- and Ca²⁺-dependent signaling pathways. *J Biol Chem*, 2009, **284**(31): 20638-20648
- [47] Gödecke S, Roderigo C, Rose C R, *et al.* Thrombin-induced ATP release from human umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol, Cell Physiol*, 2012, **302**(6): C915-C923
- [48] Thompson R J, Jackson M F, Olah M E, *et al.* Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus. *Science*, 2008, **322**(5907): 1555-1559
- [49] Weilinger N L, Tang P L, Thompson R J. Anoxia-induced NMDA receptor activation opens pannexin channels *via* Src family kinases. *J Neurosci*, 2012, **32**(36): 12579-12588
- [50] Iglesias R, Locovei S, Roque A, *et al.* P2X7 receptor-Pannexin1

- complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, **295**(3): C752-C760
- [51] Xiao F, Waldrop S L, Khimji A K, *et al.* Pannexin1 contributes to pathophysiological ATP release in lipoapoptosis induced by saturated free fatty acids in liver cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, **303**(10): C1034-C1044
- [52] Poornima V, Vallabhaneni S, Mukhopadhyay M, *et al.* Nitric oxide inhibits the pannexin 1 channel through a cGMP-PKG dependent pathway. *Nitric Oxide*, 2015, **47**: 77-84
- [53] Kurtenbach S, Prochnow N, Kurtenbach S, *et al.* Pannexin1 channel proteins in the zebrafish retina have shared and unique properties. *PLoS One*, 2013, **8**(10): e77722
- [54] Sridharan M, Adderley S P, Bowles E A, *et al.* Pannexin 1 is the conduit for low oxygen tension-induced ATP release from human erythrocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, **299**(4): H1146-H1152
- [55] Velasquez S, Malik S, Lutz S E, *et al.* Pannexin1 channels are required for chemokine-mediated migration of CD⁴⁺ T lymphocytes: role in inflammation and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 2016, **196**(10): 4338-4347
- [56] Bruzzone R, Barbe M T, Jakob N J, *et al.* Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem*, 2005, **92**(5): 1033-1043
- [57] Ma W, Hui H, Pelegri P, *et al.* Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, **328**(2): 409-418
- [58] Michalski K, Kawate T. Carbenoxolone inhibits Pannexin1 channels through interactions in the first extracellular loop. *J Gen Physiol*, 2016, **147**(2): 165-174
- [59] Poon I K H, Chiu Y H, Armstrong A J, *et al.* Unexpected link between an antibiotic, pannexin channels and apoptosis. *Nature*, 2014, **507**(7492): 329-334

Recent Advances in Structure and Functions of Pannexin1*

ZHENG Xiang¹⁾, YE Sheng²⁾, ZHAO Wei^{1,3)}, CHEN Yuan^{1)**}

¹⁾College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China;

²⁾School of Life Science, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

³⁾Zhejiang Provincial Key Laboratory of Conservation and Innovation of Traditional Chinese Medicine Resources, Hangzhou 311300, China)

Abstract Pannexin1(PANX1) is a channel protein which can be penetrated by many ions and molecules including ATP. It plays important roles in many physiological phenomena such as apoptosis and inflammation, and is considered as a potential therapeutic target. It can be activated by many different stimuli such as extracellular potassium, phosphorylation, protease cleavage, and intracellular calcium. Also its electrophysiological characteristic is complicated. Its characteristics as an ion channel need to be investigated in details. With the development of cryoelectron microscopy in recent years, the study of ion channels has reached a new stage, and the structure of PANX1 protein has been elucidated, including the activation mechanism, ion pathway and blocking mechanism of small molecule inhibitors. It is a heptamer rather than a hexamer as previously suspected. In addition to the main pore responsible for molecules like ATP, there are also side tunnels responsible for ion conducting. But still there are many problems remain unsolved. Cryo-EM structures didn't show how C-tail exist in main pore of channel. This paper will introduce some basic characteristics of PANX1, and analyze the problems encountered in current studies, in order to put forward the key research objectives for future work.

Key words Pannexin1, Cryo-EM, structural biology

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0444

* This work was supported by grants from Scientific Research Foundation of Zhejiang A & F University(2013FR032) and Zhejiang Province Public Welfare Technology Application Research Project (LGF18H280002).

** Corresponding author.

Tel: 86-571-63732700, E-mail: ychen@zafu.edu.cn

Received: December 20, 2020 Accepted: April 15, 2021