

Pink1/Parkin介导的线粒体自噬分子机制

汤友静¹ 牛玉娜^{1,2} 王 辉^{1,2*}¹新乡医学院免疫学研究中心, 新乡 453003; ²河南省分子诊断与医学检验技术协同创新中心, 新乡 453003)

摘要 线粒体自噬作为一种选择性清除受损线粒体的特异性自噬类型, 是细胞内线粒体的质量控制体系, 其活性受多种途径调控。近年来, 关于线粒体自噬的调控及其对生理、病理方面的影响受到众多研究者的关注, 并获得了显著的研究成果。研究表明, 人PTEN诱导激酶1(PTEN induced putative kinase 1, Pink1)/Parkin通路调控线粒体动力学过程, 并介导受损线粒体的自噬性清除。*PINK1/PARK2*基因缺失或突变是神经退行性疾病的重要发病机制之一, 其功能异常也与多种肿瘤的发生有关。该综述主要介绍了Pink1/Parkin蛋白质的生化特性、介导线粒体自噬发生的分子机制及其对细胞生物学进程的影响。

关键词 Pink1; Parkin; 线粒体自噬; 分子机制

Advance on the Molecular Mechanism of Pink1/Parkin-Mediated Mitophagy

Tang Youjing¹, Niu Yuna^{1,2}, Wang Hui^{1,2*}¹Research Center for Immunology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China;²Department of Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract Mitophagy, the selective degradation of damaged mitochondria via autophagy dependent manner, is an important mitochondrial quality control system and regulated by a variety of pathways. In recent years, the regulation of mitophagy and its effects on physiology and pathology have been attracted increasing attention and obtained remarkable progress. The present evidence indicates that Pink1/Parkin pathway regulates mitochondrial dynamics and mediates the removal of damaged mitochondria via autophagy. Defects in *PINK1/PARK2* are the main cause of Parkinson's disease. In addition, the dysfunction of Pink1/Parkin may have a role in the development of cancer. This review describes the biochemical characteristics of Pink1/Parkin, highlights the molecular mechanism of mitophagy and its impact on the cellular processes.

Keywords Pink1; Parkin; mitophagy; molecular mechanism

1 线粒体自噬

线粒体自噬是一种特异性自噬现象, 通过自噬溶酶体(*autophagolysosomes*)选择性清除受损或多余线粒体, 被降解的线粒体成分如蛋白质、脂质等可被细胞循环利用。近年来研究表明, 线粒体自噬参与细胞内稳态、增殖、运动、衰老和死亡等多种细胞进程, 而且在神经退行性疾病、心脏病、糖尿

病、固有免疫相关疾病和肿瘤等重大疾病的发生、发展过程中发挥重要作用^[1]。酵母是最早用于研究自噬的生物模型, 也是目前线粒体自噬研究最为深入的模式细胞。在酵母细胞中存在三种清除线粒体的自噬性降解类型: 小自噬(*microautophagy*)、胞质液泡运输系统(*cytosol-to-vacuole transport, CVT*)和大自噬(*macroautophagy*)^[2]。哺乳动物细胞内也存在

收稿日期: 2016-12-18 接受日期: 2017-04-11

国家自然科学基金(批准号: 81471559)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0373-3831203, E-mail: wanghui@xxmu.edu.cn

Received: December 18, 2016 Accepted: April 11, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81471559)

*Corresponding author. Tel: +86-373-3831203, E-mail: wanghui@xxmu.edu.cn

网络出版时间: 2017-06-05 12:12:38

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170605.1212.002.html>

多种类型线粒体自噬, 如与帕金森病发生密切相关的人PTEN诱导激酶1(PTEN induced putative kinase 1, Pink1)/Parkin途径和与网织红细胞发育成熟相关的B细胞淋巴瘤2家族的BH3-only成员(a BH3-only member of the Bcl-2 family, Nix)/腺病毒E1B 19 kDa相互作用蛋白3样蛋白(adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3-like, BNIP3L)途径, 这两种途径均需要自噬体作为载体, 将底物运输至溶酶体降解, 它们属于大自噬。在特定情况下, 线粒体经液泡直接吞噬降解, 提示细胞内部还存在线粒体的小自噬降解途径。与酵母内存在多种线粒体自噬类型不同的是, 哺乳动物细胞降解受损或多余线粒体的主要方式是大自噬。目前尚未发现线粒体清除的CVT的情况。本文主要介绍Pink1/Parkin介导的线粒体自噬。

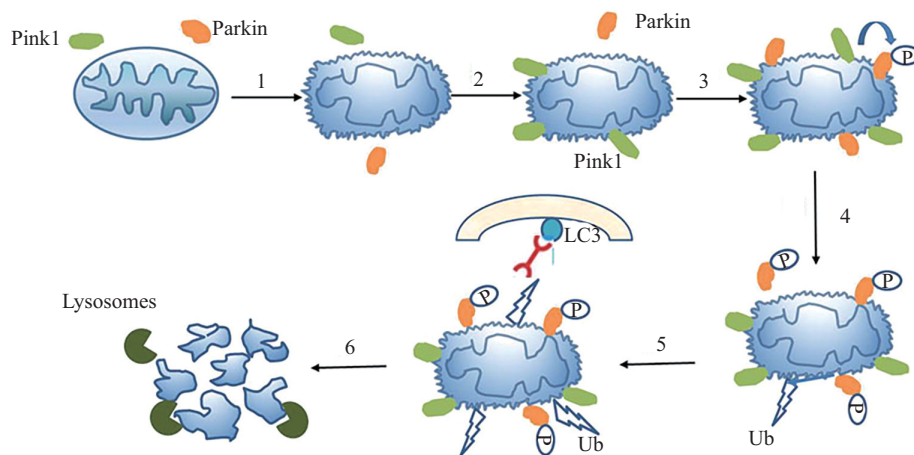
1.1 Pink1/Parkin途径

Pink1和Parkin在帕金森病致病过程中发挥重要作用, 因而受到广泛关注。*PINK1*和*PARK2*基因发生突变是家族性神经退行性疾病的重要致病因素^[3]。激酶Pink1功能失调导致线粒体功能紊乱, 影响多巴胺神经元细胞的生存^[4-6], Pink1可与胞质中E3泛素连接酶Parkin直接结合协同发挥作用^[7], 并且*PARK2*基因本身的突变与帕金森病的发生发展、密切相关^[8]。目前研究认为, 这两个蛋白紧密协作启动线

粒体自噬, 特异性清除受损伤的线粒体, 线粒体自噬活性不足或缺失引起的线粒体聚集则是帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)的致病因素^[9]。

蛋白激酶Pink1由胞核基因编码, 在胞质中合成后通过线粒体膜分子通道进入线粒体内部, 最终被线粒体内蛋白水解酶降解。线粒体受损会导致内膜电位消散, Pink1跨越外膜向内膜转移受阻, 避免了其被蛋白水解酶降解, 最终稳定并积累在线粒体外膜上^[10]。Parkin是一种E3泛素连接酶, 被Pink1从细胞质中招募并发生磷酸化。活化的Parkin给“需要降解的线粒体贴上泛素标签”, 使之能被接头蛋白(或选择性自噬受体)识别, 后者再与吞噬膜上酵母自噬蛋白8(mitophagy protein 8, ATG8)家族同源蛋白如微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein lightchain 3, LC3)、16 kDa蛋白大小的高尔基体相关ATP酶增强子(Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa, GATE-16)等连接, 形成线粒体自噬体(mitophagosomes), 最后, 线粒体自噬体与溶酶体融合形成成熟的线粒体自噬溶酶体(mitolysoosomes), 启动线粒体的降解程序^[11](图1)。

Parkin能聚集在受损线粒体表面并激活线粒体自噬需要Parkin和Pink1蛋白相互作用, 然而二者之间的作用机制仍存在争议。内膜电位一旦消失, Pink1在ser228和ser402位点首先进行自我磷酸化^[12],



1: 在正常状态下, Pink1蛋白质水平较低, 当线粒体受损时线粒体膜电位下降甚至消失; 2: 当膜电位消失后, Pink1聚集在线粒体外膜(mitochondrial outer membrane, MOM); 3: Pink1招募并磷酸化激活E3泛素连接酶Parkin; 4: Parkin催化线粒体成分蛋白质发生泛素化; 5: 接头蛋白通过桥连泛素和LC3, 将线粒体和自噬体连在一起形成线粒体自噬体; 6: 线粒体自噬体与溶酶体融合, 降解线粒体。

1: under normal growth conditions, cellular Pink1 levels are too low to be detectable; 2: in the disappearance of mitochondrial membrane potential, Pink1 is accumulated in the MOM; 3: Pink1 recruits and phosphorylates E3 ubiquitin ligase Parkin; 4: once activated, Parkin ubiquitinates mitochondrial protein substrates on the MOM; 5: meanwhile receptors bridge ubiquitin and LC3 to form mitophagosome; 6: subsequently, mitophagosome fused with lysosome for degradation of damaged mitochondria.

图1 Pink1/Parkin介导线粒体自噬示意图

Fig.1 Pink1/Parkin pathway mediated mitophagy

其次, Pink1直接磷酸化Parkin上位于泛素样结构域(ubiquitin-like domain, Ubl)中的ser65位点^[13]。而有趣的是,携带ser65突变的Parkin在该位点不能发生磷酸化,甚至缺失Ubl结构域的Parkin仍然能够以依赖Pink1激酶的方式移位至线粒体上。研究者对此现象的解释为: Pink1催化泛素自身的ser65位点(相当于Parkin Ubl结构域的ser65)发生磷酸化,而磷酸化的泛素反过来激活Parkin的E3连接酶活性。Kane等^[13]报道指出,泛素的磷酸化足以激活Parkin。但另一个报道指出, Parkin和泛素的ser65位点都发生磷酸化才能完全活化E3连接酶活性^[14]。这些研究结果的不一致可能是由于研究者所用实验材料的不同而造成的。

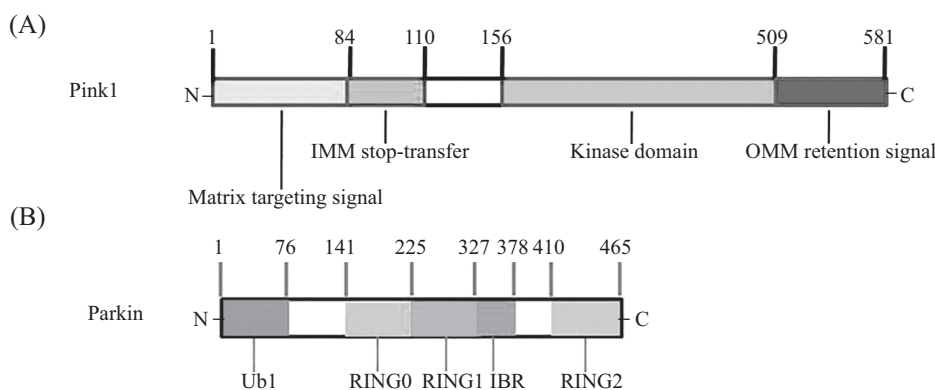
1.2 Pink1

Pink1是由1号染色体短臂上PINK1基因编码,是一个拥有581氨基酸的丝/苏氨酸蛋白激酶,广泛表达于哺乳动物各组织细胞,尤其在心脏、生殖系统、大脑和骨骼肌中表达较高。根据功能将Pink1氨基酸序列分为四个区域: N-端的信号肽(matrix targeting signal)(1~84)、线粒体内膜转移终止信号肽(IMM stop-transfer signal)(85~110)、激酶结构域(kinase domain)(156~509)和线粒体外膜滞留信号肽(OMM retention signal)(510~581)(图2A)^[15]。

线粒体从外到内分为四个区域: 外膜、内膜、

膜间隙和基质,蛋白质进入不同区域需要相应分子的调控。Pink1前体在内质网上合成,由其N-端信号肽引导进入线粒体基质。Pink1进入线粒体的具体细节还存在争议,但一般认为,胞质中刚合成的Pink1前体被位于线粒体外膜上的外膜转运酶(translocase of the outer membrane, TOM)复合体识别并将其转入膜间隙,然后通过内膜转运酶23(translocase of the inner membrane 23, TIM23)进入基质。经由TIM23通道进入内膜的蛋白质转运需要内膜电位的存在。当Pink1前体穿越内膜时,其N-端信号肽被降解变为成熟Pink1,释放进入基质,随后被基质中的蛋白酶水解。在去极化的线粒体上,内膜电位消散, TOM复合体把全长型Pink1安插在线粒体外膜上,并通过Pink1上内膜转移终止信号将Pink1固定其上^[16]。

Pink1聚集在膜电位丧失的线粒体外膜上是线粒体损伤的主要分子标记。电子呼吸链解偶联剂羰基氰化物间氯苯腙(carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone, CCCP)处理细胞3 h后,内源性Pink1达到可被检测的水平,12~16 h后其水平达到顶峰。但线粒体损伤后Pink1上调的原因还是未知的,就目前研究结果而言,线粒体发生损伤后聚集在外膜上的Pink1有三个来源。(1)降解被抑制。线粒体内膜电位消散后, Pink1不能转运至基质,从而避免了被基质中蛋白酶降解。(2)转录增加。在CCCP处理的



A: Pink1结构示意图。N-端1~84氨基酸为靶向线粒体的信号肽序列,其后85~110氨基酸是线粒体内膜转移终止信号肽序列,156~509氨基酸为Pink1丝/苏氨酸激酶活性序列,C-端的510~581氨基酸是线粒体外膜滞留信号肽序列。B: Parkin结构示意图。N-端1~76氨基酸是泛素样结构域,随后141~225氨基酸是RING0结构域,225~327氨基酸是RING1结构域,328~378氨基酸是IBR结构域,C-端410~465氨基酸是RING2结构域。

A: domain structure of Pink1. The N-terminal residues 1-84 constitute the mitochondrial targeting signal, followed by an inner mitochondrial membrane (IMM) stop-transfer signal which comprises residues 85-110. Residues 156-509 constitute the Ser/Thr-kinase domain, and residues 510-581 in the C-terminal domain is outer mitochondrial membrane (OMM) retention signal. B: domain structure of Parkin. The N-terminal residues 1-76 constitute a ubiquitin-like (Ubl) domain, followed by a linker region RING0 (141-225 aa), and three zinc-finger domains, namely RING1 domain (225-327 aa), IBR domain (328-378 aa) and RING2 domain (410-465 aa).

图2 Pink1和Parkin结构示意图

Fig.2 Schematic representation of Pink1 and Parkin domains structures

细胞上能观察到*PINK1* mRNA水平上调。(3)翻译增强。使用环己亚胺(cycloheximide, CHX)抑制蛋白质合成几乎全部阻止CCCP诱导的Pink1和Parkin在线粒体上的积累,表明增加部分为新合成的蛋白质。

除了引导定位的N-端和C-端, Pink1分子其他部分属于激酶结构域。与帕金森病相关的突变对功能的影响以激酶失活或活性下降最常见,表明了Pink1催化磷酸化的活性在帕金森病中发挥重要作用。在线粒体膜电位下降的情况下, Pink1激酶结构域的ser228和ser402发生自我磷酸化,从而正向调控Pink1的催化活性^[17]。除了Parkin外,还有其他线粒体蛋白质,如线粒体热击蛋白90(heat shock proteins 90, Hsp90)分子伴侣肿瘤坏死因子相关蛋白1(tumor necrosis factor-associated protein 1, Trap1)、线粒体融合蛋白2(mitofusin 2, Mfn2)、Rho家族GTP酶(Rho Family GTPase, Rho-GTP)中的线粒体Rho-GTP酶1(mitochondrial Rho-GTPase 1, Miro1)和定位内膜的线粒体丝氨酸蛋白酶Omi/HtrA2,都可作为Pink1的底物,发生磷酸化修饰。然而,多数磷酸化修饰的功能还不清楚。直接催化E3泛素连接酶Parkin发生磷酸化是众所周知的Pink1介导的Parkin活化的主要方式。除此之外, Pink1还能通过促泛素发生磷酸化而激活Parkin的方式^[13]。

1.3 Parkin

人Parkin蛋白质由位于第6号染色体长臂末端的*PARK2*基因编码,是一个拥有465氨基酸的E3泛素连接酶。催化靶蛋白发生泛素化需要三个酶:泛素活化酶(E1)、泛素交联酶(E2)和泛素连接酶(E3)。在蛋白质泛素化过程中, E3协同E1和E2在底物蛋白质上连接含有76个氨基酸的泛素。在催化级联反应中,泛素首先被E1激活,随后被转移至E2,最后被E3将其转移底物赖氨酸侧链的氨基基团上,完成底物的泛素化。泛素化标记的底物蛋白质主要被蛋白酶体系统和自噬溶酶体系统降解。

Parkin的氨基酸序列分为五个功能区域:位于N-端的泛素样结构域(1~76氨基酸)、RING0结构域(141~225氨基酸)、RING1结构域(226~327氨基酸)、RING1结构域和RING2结构域之间的结构域(in-between RING domain, IBR)(328~378氨基酸)和RING2结构域(410~465氨基酸)(图2B)。当Parkin活化后,其上的RING1结构域与泛素-E2结合, E6-AP羧

基末端同源序列(homologous to the E6-AP carboxyl terminus, HECT)结构域的E3活性直接催化泛素(ubiquitin, Ub)从RING1结构域转移至RING2结构域中的半胱氨酸(Cys431)上,形成硫酯键中间体^[18]。根据Parkin的高分辨率晶体结构,发现在静息状态下, Parkin的E3活性受到自我抑制,推测自我抑制的机制可能有以下几种情况。(1)RING0结构域遮盖了位于RING2结构域上的Cys431; (2)在IBR结构域和RING2结构域之间存在所谓的抑制性序列,该序列抑制了RING1结构域上与E2的结合。在线粒体损伤的情况下, Parkin发生空间结构的变化, RING0结构域失去了遮盖作用,暴露Cys431位点, Parkin获得催化磷酸化活性。获得催化磷酸化活性的Parkin蛋白可以催化胞浆中和位于线粒体外膜上的蛋白质发生泛素化修饰,其修饰的类型主要为Lys48和Lys63连接的多聚泛素链^[13,19]。

1.4 线粒体自噬受体

协助选择性自噬对底物进行分选、运输,继而介导其降解的蛋白质则称为自噬受体。目前所发现的选择性自噬受体均含有一个进化上非常保守的LIR结构域,即LC3相互作用区域(LC3 interacting region, LIR),通过LIR与隔离膜上LC3家族蛋白质相连,形成底物(如损伤的线粒体)-自噬受体-LC3-隔离膜复合体,隔离膜进一步延伸最终形成双层膜包裹的线粒体自噬体。就线粒体自噬而言,线粒体自噬受体起分拣(sorting)作用,对损伤的线粒体进行标记,将损伤线粒体与健康线粒体进行区分,而在“标记”发生前需要被标记物被泛素化修饰,只有泛素修饰后的底物才能与自噬受体结合,继而启动线粒体自噬体的形成。目前已知的选择性自噬受体有10余种,这里仅介绍线粒体自噬相关的受体蛋白质。

1.4.1 酵母自噬蛋白32 酵母自噬蛋白32(autophagy protein 32, ATG32)位于线粒体外膜上,其N-端暴露于胞质, C-端位于线粒体膜间隙。在营养供应正常情况下,对数生长期之后酵母生长速度放缓,细胞启动线粒体自噬来减少线粒体数目,而*ATG32*基因缺失的突变体酵母则观察不到线粒体自噬现象。*ATG32*的缺失只是影响了线粒体自噬,而对饥饿诱导的一般自噬没有显著影响^[20]。*ATG32*与*ATG8/ATG11*上的LIR结构域结合,使得靶线粒体逐渐被自噬小泡包裹形成线粒体自噬体,最终通过与溶酶体的融合而被降解。*ATG32*在哺乳动物里没有同源蛋

白。

1.4.2 哺乳动物细胞线粒体自噬性受体 线粒体自噬需要一系列蛋白质协助来吞噬和降解泛素标记的线粒体,包括电压依赖性阴离子通道1(voltage-dependent anion channel 1, VDAC1)/p62(SQSTM1)轴在内的多个受体以及与异体吞噬有关的其他受体被先后报道。Parkin被Pink1激酶磷酸化激活后招募到线粒体外膜上,它通过VDAC1泛素化参与线粒体自噬,在这个过程中p62也被募集到线粒体上,二者协同参与线粒体自噬^[21]。关于VDAC1/p62在线粒体自噬中的调控作用尚存在争议,有学者指出,p62虽然可以被Parkin招募至线粒体上,但与线粒体自噬的发生却并无关系,同样,VDAC1也与线粒体自噬无关^[22]。其他几个公认的线粒体自噬受体为核点蛋白52(calcium binding and coiled-coil domain 2, NDP52)^[23]、视神经蛋白(optineurin, OPTN)和携带FUN14结构域蛋白1(FUN14 domain containing 1, FUNDC1)^[24]。这些受体蛋白含有两个关键的结构域:泛素结合结构域和LC3结合结构域,通过这两个结构域,受体蛋白连接线粒体和LC3家族蛋白,介导隔离膜对线粒体的包裹。

受体蛋白在受Parkin招募至线粒体之前也要接受一定修饰,如磷酸化修饰。研究发现,TANK结合蛋白1(TANK-binding protein 1, TBK1)通过磷酸化OPTN来增强其与泛素化底物的结合,继而加速自噬体的产生^[25]。活化的线粒体自噬受体积累之后,紧接着与LC3家族蛋白或GABA(A)受体相关蛋白[GABA(A) receptor-associated protein, GABARAP]家族成员结合以促进自噬体的形成。与此同时,负责自噬的效应分子[如Unc-51样激酶1(Unc-51-like Kinase 1, ULK1)复合体和ATG12-ATG5-ATG16L复合体等]开始活化并发挥自噬起始作用。在线粒体被吞噬后,自噬体与溶酶体融合,以依赖低pH值的蛋白酶水解方式清除受损的线粒体。

2 线粒体自噬对细胞进程的影响

线粒体信号转导是一个复杂的多途径交叉过程,这种复杂的信号交叉主要是由调控线粒体生命周期、凋亡、代谢以及线粒体自噬等这些生命进程的具多功能性的许多效应分子决定的。因此,不能过于简单地把线粒体自噬看做孤立的过程,细胞回应线粒体损伤的反应是一个协同反应。这部分内容

我们将讨论当发生损伤后,线粒体自噬如何与其他胞内进程协同调控细胞的生存。

2.1 线粒体自噬与生物氧化

众所周知,功能异常的线粒体会产生过多的活性氧类(reactive oxygen species, ROS),同时伴随线粒体自噬被激活。在电子呼吸链抑制剂CCCP或羰基氰化物4-(三氟甲氧基)苯腙[carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, FCCP]处理的氧化磷酸化解偶联细胞中,能观察到线粒体自噬和水平上调的ROS^[26]。然而,关于ROS与线粒体自噬之间关系众说纷纭。有研究认为,脉冲式的内源性ROS(即短时间内ROS水平迅速增加)引起线粒体去极化,诱导线粒体自噬^[27],虽然清除受损线粒体的途径有多个,如泛素蛋白酶体系统、液泡降解系统等,但线粒体自噬是唯一能降解整个细胞器和清除功能丧失线粒体的主要途径。那么线粒体自噬能通过清除损伤线粒体而减少ROS的量吗?令人意外的是,当线粒体自噬完全被阻止后,却没有观察到ROS水平增加。例如,在酵母细胞上敲除自噬受体ATG32,细胞内ROS水平没有显著增加^[28];金属镉暴露可增加小鼠大脑产生的ROS水平,同时诱导线粒体自噬,然而使用线粒体自噬特异性抑制剂却不能阻止镉暴露诱导的ROS量的增加^[29-30]。有趣的是,使用抗氧化剂处理却能抑制线粒体自噬。这些结果提示,从发生顺序上来说,ROS产生位于线粒体自噬发生的上游,即线粒体自噬是ROS诱导的结果。

Twig等^[31]在线粒体分裂蛋白1(mitochondrial fission 1 protein, *Fis1*)RNAi或动力相关蛋白1(dynammin-related protein 1, *Drp1*)突变所致线粒体自噬活性被破坏的非洲绿猴肾细胞(an abbreviation for CV-1in origin SV40 genes, COS7)里,观察到发生氧化的蛋白质量增加。同样,Journo等^[32]在古代泛素蛋白-1(ancient ubiquitous protein-1, *Aup-1*)敲除的酵母细胞里观察到线粒体自噬下降,相比野生型细胞,突变型细胞里有更多的氧化型蛋白。Deffieu等^[33]发现,抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-cysteine, NAC)能抑制酵母中的线粒体自噬,但对饥饿诱导的大自噬没有明显作用,同时谷胱甘肽合成酶突变后,线粒体自噬水平显著上调,因为NAC的抗氧化作用依赖于谷胱甘肽合成酶,而NAC处理不能抑制谷胱甘肽合成酶突变的细胞自噬水平。由此可见,在电子呼吸链正常情况下对线粒体自噬的影响来自于增高的谷胱甘肽

水平,而非内源性ROS水平的变化。这些结果表明,ROS诱导线粒体自噬依赖于呼吸链解偶联,而在呼吸链正常的细胞内,线粒体自噬则是由氧化分子(如蛋白质)的积累而触发激活的。

2.2 线粒体自噬与凋亡

已发现B细胞淋巴瘤/白血病2(B-cell lymphoma/leukemia 2, Bcl2)家族与存活有关的成员参与调控自噬^[34-35]。Bcl2家族是直接还是间接来调控自噬尚不完全清楚,但是最新证据显示,Bcl2家族调节线粒体自噬。Parkin介导的线粒体自噬可被过表达的促细胞存活的Bcl2家族成员所抑制^[36],这些成员往往位于泛素修饰和线粒体受体招募的上游。敲除促生存基因或过表达促凋亡基因Bcl2同源结构域3(Bcl2-homologous 3, BH3)-only成员会加速Parkin的招募。Bcl2家族成员主要结合于线粒体外膜,而对于Bcl2家族成员如何抑制胞质中Parkin转位尚不清楚。Parkin与凋亡二者之间的关系存在争议。有研究认为,Parkin具有正向调控细胞凋亡的作用。例如,Parkin通过调节细胞凋亡来应答由CCCP或FCCP等试剂触发的线粒体应激;Pink1介导的Parkin招募至线粒体足以使细胞感知凋亡信号^[26]。而另一些研究认为,Parkin具有促生存作用,例如Parkin缺失在帕金森病中加速多巴胺能神经细胞病变,而Parkin存在则对神经细胞具有保护作用^[37-38]。促凋亡效应蛋白Bcl2相关蛋白X(Bcl2 associated X, Bax)被Parkin泛素化,在促凋亡因素作用下泛素化的Bax不能转位线粒体,因此抑制了Bax诱导的凋亡,从而保护细胞免于死亡^[39]。Parkin保护细胞免于凋亡还表现在使Bcl2单泛素化使其在细胞内更为稳定,从而抵抗凋亡^[40]。总之,Parkin是促生存还是促凋亡尚存在争论,在调控帕金森病细胞存活中它是否有受基因剂量效应或细胞类型选择效应的影响也尚未清楚。

2.3 线粒体自噬与细胞周期和增殖

虽然PINK1/PARK2突变的帕金森病患者发生肿瘤的概率低于整体人群,但在一系列肿瘤中发现Pink1/Parkin功能下降或缺失,提示Pink1/Parkin可能与肿瘤细胞存活和生长有关^[41]。细胞周期紊乱与肿瘤细胞生长密切相关,调控细胞周期的关键因素分为两类:(1)细胞周期蛋白激酶催化细胞周期相关蛋白质发生磷酸化修饰;(2)E3泛素连接酶降解发生磷酸化的细胞周期相关蛋白。G₁/S转换是控制细胞周期的关键点,G₁期向S期转换的调控蛋白质为细胞周

期蛋白D1(cyclin D1)以及细胞周期蛋白E(cyclin E)。Cyclin D和Cyclin E是Parkin的底物,Parkin通过降解它们从而抑制细胞周期^[42]。

Parkin缺乏有时也能造成细胞周期抑制。p53与Parkin存在相互调控作用^[43],Parkin的编码基因PARK2是p53的靶基因,而Parkin又能通过其RING1结构域来下调p53的转录。在PARK2缺陷的常染色体隐性遗传性少年帕金森病患者大脑中p53呈上调表达,而p53介导了细胞周期G₁期停滞^[44]。因此,Parkin对细胞周期的调节也可能通过p53途径。

2.4 线粒体自噬与代谢、生物产能和活性氧类

在平衡细胞代谢上,Pink1/Parkin发挥核心作用。Pink1/Parkin的缺失使代谢模式切换为有氧糖酵解,即所谓的Warburg效应,这是许多实体瘤的代谢特征,损伤的线粒体产生过多ROS^[45-46]。Pink1蛋白减少能增强低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)转录因子的稳定性,上调丙酮酸脱氢酶激酶-1(pyruvate dehydrogenase kinase-1, PDK-1) mRNA,抑制丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)活性,促进糖酵解过程^[46]。Parkin参与糖酵解调控是通过p53介导的泛素蛋白酶体对负责糖酵解代谢关键酶的降解作用来实现的。事实上,有许多酶是Parkin的底物,但它们怎么影响Parkin依赖的代谢调控却不十分清楚。例如,受Parkin正调控的丙酮酸脱氢酶 α 1(pyruvate dehydrogenase alpha 1, PDHA1)是氧化磷酸化的抑制因子,这与Parkin负调控糖酵解这一事实是相悖的^[47]。Parkin能靶向负调控丙酮酸激酶M2(pyruvate kinase M2, PKM2),它在肿瘤细胞里是一个很重要的协助糖酵解的酶^[48]。正常情况下,在氧化磷酸化过程中因部分电子在电子传递链中无效传递而产生少量ROS,谷胱甘肽作为缓冲剂中和这些ROS,当电子传递链被阻断时,ROS就会拮抗抗氧化剂的保护作用,造成线粒体和基因组DNA的双重损伤,如果此时缺失线粒体自噬,损伤的线粒体会产生细胞毒性ROS^[49]。但低水平的ROS具有促有丝分裂作用而加速细胞增殖,可能就把线粒体自噬缺失的细胞和增高的肿瘤发生率联系起来^[49]。Parkin缺失是无症状帕金森病和编码Parkin蛋白的基因PARK2敲除小鼠(PARK2-KO)大脑中ROS积累原因。在PARK2-KO小鼠大脑里,因为解偶联使线粒体产生过多的ROS,中和了对细胞具有保护作用的抗氧化性的谷胱甘肽,因此,在小鼠大脑中是没有

谷胱甘肽的^[47], 这种现象合理解释了由于*PARK2*点突变引起E3连接酶失活导致的青少年帕金森综合征患者大脑的症状。由此可见, 细胞转换为糖酵解代谢模式是Parkin失活所导致损伤线粒体清除障碍和氧化磷酸化障碍的必然结果。Parkin还参与其他营养物质的代谢, 如Parkin通过稳定脂肪酸转位酶(fatty acid translocase, FAT)而参与脂代谢^[50]。

3 展望

Pink1/Parkin介导的线粒体的分子机制已较为清楚, 但仍存在不少问题。目前尚不清楚Parkin是如何标记(泛素化)功能缺陷的线粒体并将其送至溶酶体以清除。相较其他底物, 为什么某些底物如线粒体融合蛋白1(mitofusin1)和线粒体融合蛋白2(mitofusin2)被Parkin泛素化和降解得如此迅速? Parkin如何被激活来催化非线粒体靶蛋白的泛素化, 这类靶蛋白包括细胞周期蛋白以及一些Pink1之外活化Parkin的激酶。线粒体自噬和其他细胞通路之间交互作用的复杂性仍需进一步的研究确认。在不同的细胞状况下, 线粒体自噬对线粒体动力学、细胞凋亡、代谢和细胞生长的影响程度需要进一步的研究, 以确认它们之间详细的协同调控作用。这些研究结果可能为以线粒体自噬清除缺陷为特征的疾病治疗提供新途径。

参考文献 (References)

- McWilliams TG, Muqit MM. PINK1 and Parkin: Emerging themes in mitochondrial homeostasis. *Curr Opin Cell Biol* 2017; 45: 83-91.
- Dengjel J, Abeliovich H. Roles of mitophagy in cellular physiology and development. *Cell Tissue Res* 2017; 367(1): 95-109.
- Lill CM. Genetics of Parkinson's disease. *Mol Cell Probes* 2016; 30(6): 386-96.
- Gispert S, Ricciardi F, Kurz A, Azizov M, Hoepken HH, Becker D, *et al.* Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *PLoS One* 2009; 4(6): e5777.
- Matsui H, Gavinio R, Asano T, Uemura N, Ito H, Taniguchi Y, *et al.* PINK1 and Parkin complementarily protect dopaminergic neurons in vertebrates. *Hum Mol Genet* 2013; 22(12): 2423-34.
- Triplett JC, Zhang Z, Sultana R, Cai J, Klein JB, Bueler H, *et al.* Quantitative expression proteomics and phosphoproteomics profile of brain from PINK1 knockout mice: Insights into mechanisms of familial Parkinson's disease. *J Neurochem* 2015; 133(5): 750-65.
- Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, *et al.* *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 2006; 441(7097): 1162-6.
- Morgante F, Fasano A, Ginevrino M, Petrucci S, Ricciardi L, Bove F, *et al.* Impulsive-compulsive behaviors in parkin-associated Parkinson disease. *Neurology* 2016; 87(14): 1436-41.
- Bernardini JP, Lazarou M, Dewson G. Parkin and mitophagy in cancer. *Oncogene* 2017; 36(10): 1315-27.
- Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, *et al.* PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 2010; 189(2): 211-21.
- Callegari S, Oeljeklaus S, Warscheid B, Dennerlein S, Thumm M, Rehling P, *et al.* Phospho-ubiquitin-PARK2 complex as a marker for mitophagy defects. *Autophagy* 2017; 13(1): 201-11.
- Okatsu K, Oka T, Iguchi M, Imamura K, Kosako H, Tani N, *et al.* PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat Commun* 2012; 3: 1016.
- Kane LA, Lazarou M, Fogel AI, Li Y, Yamano K, Sarraf SA, *et al.* PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *J Cell Biol* 2014; 205(2): 143-53.
- Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, *et al.* Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 2014; 510(7503): 162-6.
- Wauer T, Simicek M, Schubert A, Komander D. Mechanism of phospho-ubiquitin-induced PARKIN activation. *Nature* 2015; 524(7565): 370-4.
- Schulz C, Schendzielorz A, Rehling P. Unlocking the presequence import pathway. *Trends Cell Biol* 2015; 25(5): 265-75.
- Aerts L, Craessaerts K, De Strooper B, Morais VA. PINK1 kinase catalytic activity is regulated by phosphorylation on serines 228 and 402. *J Biol Chem* 2015; 290(5): 2798-811.
- Wauer T, Komander D. Structure of the human Parkin ligase domain in an autoinhibited state. *EMBO J* 2013; 32(15): 2099-112.
- Riley BE, Loughheed JC, Callaway K, Velasquez M, Brecht E, Nguyen L, *et al.* Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. *Nat Commun* 2013; 4: 1982.
- Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell* 2009; 17(1): 87-97.
- Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 2010; 12(2): 119-31.
- Narendra D, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM, Youle RJ. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* 2010; 6(8): 1090-106.
- Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, *et al.* The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 2015; 524(7565): 309-14.
- Chen M, Chen Z, Wang Y, Tan Z, Zhu C, Li Y, *et al.* Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy* 2016; 12(4): 689-702.
- Heo JM, Ordureau A, Paulo JA, Rinehart J, Harper JW. The

- PINK1-PARKIN mitochondrial ubiquitylation pathway drives a program of OPTN/NDP52 recruitment and TBK1 activation to promote mitophagy. *Mol Cell* 2015; 60(1): 7-20.
- 26 Park JS, Kang DH, Bae SH. p62 prevents carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP)-induced apoptotic cell death by activating Nrf2. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 464(4): 1139-44.
- 27 Wang Y, Nartiss Y, Steipe B, McQuibban GA, Kim PK. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy* 2012; 8(10): 1462-76.
- 28 Kanki T, Wang K, Cao Y, Baba M, Klionsky DJ. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev Cell* 2009; 17(1): 98-109.
- 29 Wei X, Qi Y, Zhang X, Gu X, Cai H, Yang J, *et al.* ROS act as an upstream signal to mediate cadmium-induced mitophagy in mouse brain. *Neurotoxicology* 2015; 46: 19-24.
- 30 Wei X, Qi Y, Zhang X, Qiu Q, Gu X, Tao C, *et al.* Cadmium induces mitophagy through ROS-mediated PINK1/Parkin pathway. *Toxicol Mech Methods* 2014; 24(7): 504-11.
- 31 Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, *et al.* Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 2008; 27(2): 433-46.
- 32 Journo D, Mor A, Abeliovich H. Aup1-mediated regulation of Rtg3 during mitophagy. *J Biol Chem* 2009; 284(51): 35885-95.
- 33 Deffieux M, Bhatia-Kissova I, Salin B, Galinier A, Manon S, Camougrand N. Glutathione participates in the regulation of mitophagy in yeast. *J Biol Chem* 2009; 284(22): 14828-37.
- 34 Han R, Ji X, Rong R, Li Y, Yao W, Yuan J, *et al.* MiR-449a regulates autophagy to inhibit silica-induced pulmonary fibrosis through targeting Bcl2. *J Mol Med (Berl)* 2016; 94(11): 1267-79.
- 35 Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, *et al.* Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 2007; 26(10): 2527-39.
- 36 Hollville E, Carroll RG, Cullen SP, Martin SJ. Bcl-2 family proteins participate in mitochondrial quality control by regulating Parkin/PINK1-dependent mitophagy. *Mol Cell* 2014; 55(3): 451-66.
- 37 Qu D, Hage A, Don-Carolis K, Huang E, Joselin A, Safarpour F, *et al.* BAG2 gene-mediated regulation of PINK1 protein is critical for mitochondrial translocation of PARKIN and neuronal survival. *J Biol Chem* 2015; 290(51): 30441-52.
- 38 Dai H, Deng Y, Zhang J, Han H, Zhao M, Li Y, *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy alleviates chlorpyrifos-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Toxicology* 2015; 334: 72-80.
- 39 Johnson BN, Berger AK, Cortese GP, Lavoie MJ. The ubiquitin E3 ligase parkin regulates the proapoptotic function of Bax. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(16): 6283-8.
- 40 Chen D, Gao F, Li B, Wang H, Xu Y, Zhu C, *et al.* Parkin mono-ubiquitinates Bcl-2 and regulates autophagy. *J Biol Chem* 2010; 285(49): 38214-23.
- 41 Garber K. Parkinson's disease and cancer: the unexplored connection. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(6): 371-4.
- 42 Bartek J, Hodny Z. PARK2 orchestrates cyclins to avoid cancer. *Nat Genet* 2014; 46(6): 527-8.
- 43 Checler F, Alves da Costa C. Interplay between parkin and p53 governs a physiological homeostasis that is disrupted in Parkinson's disease and cerebral cancer. *Neurodegener Dis* 2014; 13(2/3): 118-21.
- 44 Tudzarova S, Mulholland P, Dey A, Stoeber K, Okorokov AL, Williams GH. p53 controls CDC7 levels to reinforce G₁ cell cycle arrest upon genotoxic stress. *Cell Cycle* 2016; 15(21): 2958-72.
- 45 Zhang C, Lin M, Wu R, Wang X, Yang B, Levine AJ, *et al.* Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(39): 16259-64.
- 46 Requejo-Aguilar R, Lopez-Fabuel I, Fernandez E, Martins LM, Almeida A, Bolanos JP. PINK1 deficiency sustains cell proliferation by reprogramming glucose metabolism through HIF1. *Nat Commun* 2014; 5: 4514.
- 47 Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M, *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 2004; 279(18): 18614-22.
- 48 Liu K, Li F, Han H, Chen Y, Mao Z, Luo J, *et al.* Parkin regulates the activity of pyruvate kinase M2. *J Biol Chem* 2016; 291(19): 10307-17.
- 49 Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: Initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer* 2014; 14(11): 709-21.
- 50 Abumrad NA, Moore DJ. Parkin reinvents itself to regulate fatty acid metabolism by tagging CD36. *J Clin Invest* 2011; 121(9): 3389-92.