

Parkin调控凋亡、坏死性凋亡和焦亡的研究进展

李权¹ 权美玉² 张金三^{2,3*}

(¹温州大学生命与环境科学学院, 温州 325035; ²温州医科大学附属第一医院, 浙江省介入肺脏病学重点实验室, 温州 325000; ³浙江省生物医药协同创新中心, 温州 325035)

摘要 细胞的死亡有多种形式, 包括凋亡、坏死性凋亡、焦亡等, 各具有独特的分子特征, 发挥着不同的功能。近年来, 对各种死亡形式的功能和机制研究不断深入, 围绕着细胞死亡途径的特征分子及其调控取得重要进展。Parkin作为E3泛素连接酶, 通过其对底物的泛素化修饰, 而发挥多种生物学功能。除了其被熟知的介导线粒体自噬途径之外, 近年的研究还发现Parkin通过直接泛素化修饰多种“死亡”特征分子调控细胞死亡进程和肿瘤的发生。该文综述了Parkin参与调控细胞死亡进程的作用和方式, 对其以线粒体自噬依赖和非依赖的方式调控细胞死亡的机制深度解析, 以揭示细胞死亡相关的分子生物学奥秘。

关键词 Parkin; 线粒体自噬; 细胞死亡; E3泛素连接酶

Research Progress on Parkin in Regulating Apoptosis, Necroptosis and Pyroptosis

LI Quan¹, QUAN Meiyu², ZHANG Jinsan^{2,3*}

(¹College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China; ²Key Laboratory of Interventional Pulmonology of Zhejiang Province, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; ³Biomedical Collaborative Innovation Center of Zhejiang Province, Wenzhou 325035, China)

Abstract There exist multiple cell death pathways, including apoptosis, necroptosis and pyroptosis, which are defined by different signaling and execution pathways, and play disparate roles in a wide range of cellular processes. The functions and mechanisms of cell death have been intensively studied in recent years, and a great progress has been made toward understanding the molecular machinery of cell death pathways. Parkin, an E3 ubiquitin ligase, exhibits a plethora of biological activities in various cellular processes by ubiquitination of its specific substrates. In addition to its well-characterized activities in mediating mitophagy, recent studies also highlight its roles in regulating cell death pathways and pathogenesis of cancer via direct ubiquitination of several characteristic “death” substrates. This review summarizes the recent advance in the role and the action mechanism of Parkin in cell death pathways with a focus on apoptosis, necroptosis and pyroptosis, which provides in-depth comprehension of mitophagy-dependent, as well as independent, revealing the biological mystery associated with cell death.

Keywords Parkin; mitophagy; cell death; E3 ubiquitin ligase

长期以来, 细胞死亡被认为是一种不可避免的生命现象。然而, 过去十多年来, 大量的实验表明, 细胞死亡是“主动”而非“被动”的过程, 所以细胞死

亡常常被称为程序性细胞死亡, 包括凋亡、坏死性凋亡和焦亡等。不同的细胞死亡方式具有不同的分子特征和功能机制。细胞凋亡以Caspases级联反

收稿日期: 2021-09-20

接受日期: 2021-10-15

温州大学引进人才科研启动经费(批准号: QD2021250)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18357829380, E-mail: zhang_jinsan@wmu.edu.cn

Received: September 20, 2021

Accepted: October 15, 2021

This work was supported by Startup Research Fund for Talent Recruitment of Wenzhou University (Grant No. QD2021250)

*Corresponding author. Tel: +86-18357829380, E-mail: zhang_jinsan@wmu.edu.cn

应为特征,包括死亡受体起始的外源途径和由线粒体起始的内源途径^[1];坏死性凋亡以RIPK1-RIPK3-MLKL通路激活为特征,形成坏死小体,寡聚化的MLKL(mixed lineage kinase domain-like)转位至细胞膜,改变细胞通透性并释放细胞内容物,引起炎症反应^[2];焦亡类似于坏死性凋亡,可以形成NLRP3(nod-like receptor family, pyrin domain-containing 3)炎症小体,寡聚化的GSDMD(gasdermin-D)也能转位至细胞膜进行穿孔^[3]。此外,在焦亡途径中,Caspase1被激活并切割各种底物分子,释放特征性的炎症因子IL-1 β 和IL-18^[3-4]。事实证明,细胞有条不紊地“死亡”是维持机体稳态的关键。

细胞死亡失调是多种疾病发生的原因。例如,帕金森病是一种神经退行性疾病,最主要的病理改变是中脑黑质多巴胺能神经元的变性死亡,它是仅次于阿尔茨海默病的第二大神经系统的疾病^[5]。KITADA等^[6-7]发现,*PARK2*基因突变可导致常染色体隐性遗传的青少年帕金森病。*Parkin*是一种由*PARK2*基因编码、由465个氨基酸组成、相对分子量约为52 kDa的蛋白质。*Parkin*与细胞凋亡特征分子Bcl-2家族蛋白、坏死性凋亡关键分子RIPK3(the receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3)相互作用,在不同的应激作用下广泛参与调控细胞命运决定。

在功能上,*Parkin*是一种E3泛素连接酶,参与泛素化级联反应中的最后一环。蛋白质的泛素化需要通过3种酶[包括E1泛素活化酶、E2泛素结合酶(又称泛素载体蛋白)和E3泛素连接酶]先后催化来完成^[8]。当泛素化的靶蛋白其泛素自身的赖氨酸残基也被泛素化时,便形成具有寡聚泛素链的泛素化蛋白。然而,与靶蛋白相连的泛素分子上不同位点赖氨酸残基的泛素化修饰往往会产生不同的生理效应。例如,Lys48残基的泛素化修饰(K-48式)可导致靶蛋白被蛋白酶体识别并降解;而Lys63位点的泛素化(K-63式)则可能导致蛋白质活性的改变,促进信号转导^[9]。*Parkin*参与各种细胞死亡途径可以通过不同的泛素化修饰改变其底物蛋白的稳定性或活性。

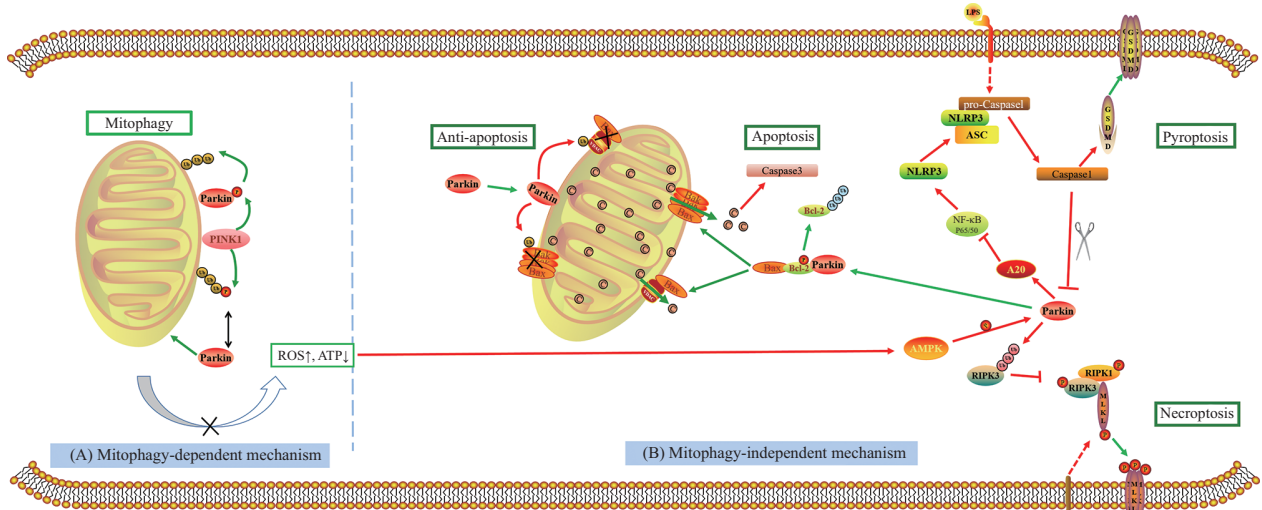
在结构上,*Parkin*含有N-端泛素样区(ubiquitin-like, Ubl)、独特的RING0结构域、典型的与E2结合的RING1结构域,以及两个线性锌指折叠(也称in-between RING, IBR)和起催化作用的RING2结构域^[10]。在稳态条件下,E3泛素连接酶*Parkin*以自身抑制状态定位

于细胞质中。当*Parkin*处于非活性状态时,其Ubl结构域在空间上遮挡了RING1上的E2泛素结合酶结合位点,而RING2上的催化位点Cys431也被RING0所遮蔽^[11]。研究表明,磷酸化的泛素(phospho-ubiquitin, pUb)与*Parkin*结合后,引起*Parkin*的局部结构重排^[12]。然而,这种构象变化并不能完全激活*Parkin*,其催化位点和E2结合位点仍然受阻。pUb与RING1的结合释放了Ubl结构域,从而允许*Parkin*被PINK1(PTEN-induced putative kinase 1)磷酸化^[13-15]。Ubl结构域的磷酸化导致大的结构域重排,由此暴露了RING1结构域上的E2结合位点,RING2结构域也可以自由移动,并能够与E2相互作用,转移泛素(ubiquitin, Ub),从而完全激活*Parkin*,实现靶蛋白的泛素化^[10]。

1 *Parkin*通过介导线粒体自噬调控细胞死亡

*Parkin*泛素线粒体外膜蛋白启动线粒体自噬。“线粒体自噬”一词于2005年首创,是进行细胞器特异性自噬通路的一种,有利于细胞维持正常的结构和功能^[16]。受损的线粒体由双层膜包裹成泡状结构,被称为自噬体。自噬体与溶酶体融合后形成自噬溶酶体,继而包裹其中的线粒体被溶酶体中的水解酶消化。一旦线粒体自噬功能失调,受损的线粒体则不能被及时有效地清除,细胞ROS(reactive oxide species)水平升高,最终导致细胞死亡。线粒体自噬通路广泛参与细胞凋亡、坏死性凋亡和焦亡等,是决定细胞命运的关键因素。

近年来,对于PINK1-*Parkin*通路启动线粒体自噬的机制已经比较明确。细胞生物学研究表明,在正常稳态条件下,PINK1通过线粒体外膜的TOM(translocator of the outer mitochondrial membrane)复合体输入,并进入线粒体内膜的TIM(translocator of the inner mitochondrial membrane)复合体中^[17]。与通常输入线粒体的蛋白相同,PINK1最初被线粒体加工肽酶(mitochondrial processing peptidase, MPP)切割^[18-19],随后PINK1的跨膜疏水结构域被早老素相关菱形样蛋白(presenilin-associated rhomboid-like protein, PARL)裂解^[19],故PINK1在正常的线粒体膜上是不稳定的。氧化应激、蛋白质错误折叠、线粒体DNA突变、线粒体膜电位下降等均可导致线粒体功能异常。线粒体功能异常会导致其膜上运输蛋白和具有切割功能的蛋白功能受损,从而使得PINK1



A: 线粒体自噬依赖性机制。线粒体功能障碍时,稳定的PINK1能够磷酸化泛素和Parkin, Parkin被募集后泛素化线粒体外膜蛋白。形成的泛素链又成为PINK1磷酸化的底物,从而形成“泛素化-磷酸化-泛素化”正反馈回路,以确保有效清除受损的线粒体。线粒体自噬通路受阻会使受损的线粒体堆积, ROS生成量增加,并降低ATP的水平,最终导致细胞死亡。B: 线粒体自噬非依赖性机制。a: Parkin通过调节Bcl-2家族蛋白发挥促凋亡和细胞保护的功能。就其促凋亡功能而言, Parkin的表达水平在抗微管药物治疗后被上调,促进了磷酸化Bcl-2的降解,激活了凋亡的内源途径。而另一些情况是, Parkin被招募到线粒体后会泛素化Bak和VDAC,泛素分子掩盖了它们与Bax的相互作用而抑制凋亡。b: Parkin参与调节坏死性凋亡和焦亡。在坏死性凋亡因子刺激下, AMPK使Parkin磷酸化,激活的Parkin直接多泛素化RIPK3并抑制坏死小体的形成。受到NLRP3激活剂诱导时, Parkin稳定A20并通过NF- κ B途径抑制NLRP3表达。NLRP3炎症小体的形成激活Caspase1,活化的Caspase1切割Parkin,这反过来加强了焦亡信号。蓝色的Ub: K-48式泛素化;橙色的Ub: K-33式泛素化; C: 细胞色素C; P: 磷酸化。

A: mitophagy-dependent mechanism. Mitochondrial dysfunction stabilizes PINK1, enabling it to phosphorylate both ubiquitin and Parkin leading to recruitment of Parkin and subsequent ubiquitination of mitochondrial outer membrane proteins. The ubiquitin chains formed, in turn become substrates for phosphorylation by PINK1, thus forming an ubiquitination-phosphorylation-ubiquitination positive feedback loop to ensure efficient clearance of damaged mitochondria. Mitophagy blockade leads to the accumulation of damaged, ROS-generating mitochondria, and decreases the level of ATP, which eventually results in cell death. B: mitophagy-independent mechanism. a: Parkin exhibits pro-apoptotic and cytoprotective functions by regulating the Bcl-2 family of proteins. For its pro-apoptotic activity, Parkin expression is upregulated upon treatment with anti-microtubular drugs, promoting the degradation of phosphorylated Bcl-2 and activating the intrinsic pathway of apoptosis pathway. In contrast, recruitment of Parkin to mitochondria ubiquitinates Bak and VDAC, which suppresses apoptosis by obscuring their interaction with Bax; b: Parkin is involved in regulating necroptosis and pyroptosis. Upon stimulation by necroptotic factors, AMPK phosphorylates Parkin, and then activated Parkin directly polyubiquitinates RIPK3 and inhibits necrosome formation. When NLRP3 activator is induced, Parkin stabilizes A20 and inhibits NLRP3 expression via the NF- κ B pathway. NLRP3 inflammasome formation results in Caspase1 activation, followed by cleaving Parkin, which, in turn, reinforces pyroptosis signaling. Blue Ub: K48-linked ubiquitination; Orange Ub: K33-linked ubiquitination; C: cytochrome C; P: phosphorylation.

图1 Parkin通过线粒体自噬依赖和非依赖的方式调控凋亡、坏死性凋亡和焦亡(根据参考文献[28]修改)

Fig.1 Parkin regulates apoptosis, necroptosis and pyroptosis via mitophagy-dependent and-independent mechanisms (modified from reference [28])

稳定在线粒体外膜上。生物化学研究表明, PINK1磷酸化线粒体外膜蛋白并招募Parkin。PINK1能使Ub和Parkin的第65位Ser磷酸化^[14]。pUb可以进一步激活Parkin的泛素连接酶活性^[20-22]。泛素磷酸酯是Parkin泛素连接酶活性的变构效应物^[23]。酶底物与酶上的变构位点结合激活酶活性,被称为协同效应。但在这种情况下,与Parkin上的变构位点结合的是pUb,而不是未修饰的Ub。ORDUREAU等^[24]进一步研究表明, pUb与磷酸化Parkin结合的亲和力是未磷酸化Parkin的21倍。Parkin被激活后可以泛素化多种线粒体外膜底物蛋白,包括线粒体融合蛋白(mitofusin 2, Mfn2)、线粒体GTP酶Miro1以及Bcl-2家族

蛋白Bak等^[21,25]。Parkin泛素化线粒体外膜蛋白形成的泛素链被PINK1磷酸化, pUb又进一步激活Parkin,形成正反馈。这样的正反馈扩增机制启动并驱动着线粒体自噬的完成(图1)。一旦线粒体自噬功能异常,细胞非正常死亡发生的概率将大大增加。

2 Parkin介导细胞凋亡

1972年, KERR等^[26]确定了细胞凋亡的概念。对于多细胞生物而言,细胞凋亡在正常发育、自稳态的维持、免疫耐受的形成、肿瘤监控等过程中均发挥重要作用。细胞凋亡作为一种生理性保护机制,能够清除体内多余、受损或危险的细胞而不对周

围的细胞或组织产生损害。临床研究发现,相当多的恶性肿瘤的凋亡机制受到抑制,使机体不能清除病变的细胞。对凋亡诱导因子敏感性的降低是多种肿瘤细胞的基本特征。例如哺乳动物细胞中的凋亡相关基因*Bcl-2*是从滤泡淋巴瘤细胞中克隆出来的。由于染色体重排,这个凋亡抑制基因的编码区与免疫球蛋白的增强子相连,导致*Bcl-2*蛋白的过量表达,使瘤细胞能够抵抗凋亡,持续增殖。

2.1 Parkin泛素化Bcl-2, 促进凋亡

在细胞凋亡的内源途径中,线粒体处于中心地位。线粒体外膜通透性的改变可导致细胞色素C(cytochrome C, Cyt C)释放到细胞质基质并介导细胞凋亡^[27]。线粒体外膜的通透性主要受到*Bcl-2*蛋白家族的调控。*Bcl-2*家族成员大多定位在线粒体外膜上,或受到信号刺激后转移到线粒体外膜上。YIN团队^[28]研究发现,*PARK2*高表达细胞对抗微管药物治疗的反应性更佳。抗微管药物紫杉醇和长春花生物碱等可诱导细胞凋亡,但也有可能触发应激反应,抑制细胞凋亡,导致肿瘤细胞获得耐药表型^[28]。抗凋亡蛋白*Bcl-2*在这些应激反应中起着关键作用。*Bcl-2*蛋白通过与*Bax*蛋白结合并抑制其活性来抑制细胞凋亡^[29]。抗微管药物可诱导*Bcl-2*蛋白第70位Ser磷酸化^[30],磷酸化*Bcl-2*大大增强了*Bcl-2*的抗凋亡能力。然而,*Parkin*可以与磷酸化*Bcl-2*相互作用,并通过E3泛素连接酶作用促进*Bcl-2*的泛素化和降解^[28]。此外,由于信号转导激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)介导了*PARK2*的转录抑制,抗微管药物治疗后,STAT3表达下调导致*Parkin*表达上调,促进了*Bcl-2*的降解^[28]。抗凋亡蛋白*Bcl-2*降解后,促凋亡蛋白*Bax*的抑制效应被解除,随后*Bax*转位到线粒体上并激活细胞凋亡途径(图1)。因此,*Parkin*的激活可以显著增强抗微管药物

化疗的效果。此外,研究发现*Bcl-2*与自噬相关蛋白*Beclin-1*相互作用并抑制其活性,*Parkin*过表达可以增强两者的相互作用^[31]。*Parkin*通过其C末端直接与*Bcl-2*结合并单泛素化*Bcl-2*蛋白,从而增强其稳态水平,由此调节自噬^[31]。自噬作为一种抗凋亡的机制,*Parkin*从细胞质基质中转移到线粒体膜上,基质中*Parkin*蛋白水平下降,使得单泛素化*Bcl-2*蛋白水平下降,减轻了对*Beclin-1*的抑制效应,从而使得细胞自噬水平增加。

2.2 Parkin泛素化Mcl-1, 促进凋亡

抗凋亡家族蛋白包括*Bcl-2*、*Bcl-X_L*和*Mcl-1*等。LIU团队^[32]研究表明,*PINK1-Parkin*具有细胞保护和促凋亡双重功能。出现轻度、可逆的线粒体损伤时,*PINK1-Parkin*可通过促进自噬,阻止细胞凋亡,起到细胞保护的作用。而出现严重、不可修复的线粒体损伤时,如缬氨霉素刺激细胞可发生*PINK1-Parkin*依赖性凋亡。缬氨霉素引起的促凋亡反应与*Mcl-1*的降解有关^[32]。*PINK1*直接磷酸化*Parkin*蛋白Ubl结构域的第65位Ser,激活的*Parkin*通过自催化机制放大其E3泛素连接酶活性,使得*Mcl-1*被泛素化并降解,促进凋亡(表1)。

2.3 Parkin与Bax、Bak和VDAC2相互作用, 抑制凋亡

*Parkin*除了在特定条件下具有促进凋亡的功能外,通常也可发挥抑制凋亡的作用。除了泛素化抗凋亡蛋白*Bcl-2*外,*Parkin*还能与促凋亡蛋白如*Bax*、*Bak*相互作用^[33]。前文说到,在抗微管药作用下,*Parkin*与磷酸化的*Bcl-2*结合并发挥其E3泛素连接酶作用,进而使得*Bcl-2*降解,随后*Bax*从细胞质基质转位到线粒体上,并与电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)相互作用,使通道开放且足以使线粒体内的凋亡因子如Cyt C等释放到

表1 不同应激条件下*Parkin*在细胞死亡中的作用

Table 1 The role of *Parkin* in cell death under various stress conditions

应激条件	机制	结果	参考文献
Stresses	Mechanisms	Results	References
CS (cigarette smoke)	<i>PINK1-Parkin</i> mediates excessive mitophagy and elevates the expression of RIP3	Necroptosis	[37]
Valinomycin	<i>PINK1</i> triggers autocatalytic activation of <i>Parkin</i> that amplifies its E3 ligase activity toward <i>Mcl-1</i>	Apoptosis	[32]
Apoptotic stimuli	<i>Parkin</i> ubiquitinates <i>Bax</i> , <i>Bak</i> and <i>VDAC2</i>	Anti-apoptosis	[33]
Necroptotic stimuli	AMPK- <i>Parkin</i> -RIPK3 axis	Anti-necroptosis	[2]

细胞质基质中, 引发细胞凋亡^[33]。VDAC2是Parkin最重要的底物之一^[34], 这表明其泛素化可能导致Bax无法介导Cyt C释放。值得注意的是, Bax促凋亡作用的抑制可能并不是由于VDAC2的降解, 而是泛素化的VDAC2与Bax存在空间位阻而不能相互作用导致的。Parkin除了以这种间接的方式影响Bax的功能外, 它还能在基础水平或凋亡应激条件下抑制Bax向线粒体转移^[35]。Bax的泛素化可能依赖于Parkin对其构象变化的识别, 这对于维持Bax的正常水平和细胞应对诱导凋亡的刺激是相当重要的^[33-35]。DEWSON团队^[33]发现, Parkin介导的线粒体自噬和抑制凋亡的作用, 是通过促凋亡因子Bak的非降解机制来实现的。事实上, 控制细胞凋亡, 重要的是协调好受损线粒体的清除。反之, 有效地清除受损的线粒体需要适当的细胞凋亡反应。Parkin的促存活机制便可以通过抑制Bak的促凋亡作用来实现^[35]。K-11式泛素化Bak并没有促进其降解, 而是通过泛素化掩盖了Bak蛋白疏水表面沟槽, 直接抑制了其促凋亡活性^[36]。Bak的疏水性沟槽对于其与单BH3结构域蛋白(Bcl-2亚家族的一种, 被称为凋亡信号“感受器”)的相互作用以及Bak的同源二聚化作用是至关重要的, 这对于穿膜孔的形成和线粒体外膜通透性的改变是必要的。因此, Parkin可以通过直接泛素化Bak, 抑制异常凋亡, 同时保证有效清除受损的线粒体。

3 Parkin调控坏死性凋亡

当受到严重损伤, 如极端的物理、化学因素或严重的病理性刺激时, 细胞将发生坏死。此时细胞内ATP浓度已下降到无法维持细胞存活水平, 能量的下降使钠钾泵难以运作, 细胞通透性增强, 质膜破损, 细胞内含物包括膨大和破碎的细胞器以及染色质片段被释放到胞外, 引起周围组织的炎症反应。长期以来, 细胞坏死被认为是一种被动的死亡方式。近些年的研究表明, 细胞也可以“主动”发生坏死, 被称为坏死性凋亡。例如分裂旺盛细胞的DNA持续损伤, 就能引发细胞坏死性凋亡。细胞程序性坏死(坏死性凋亡)是一种由RIPK3激活引发的细胞死亡形式。

在早期的凋亡机制探索中, 普遍认为凋亡过程依赖于DNA受损或线粒体ROS。CHOI团队^[37]研究表明, 线粒体自噬依赖的坏死性凋亡促进了COPD(chronic obstructive pulmonary disease)的发生。

且COPD肺组织中PINK1、RIPK3和Drp1(dynamin-related protein 1)表达增加。PINK1基因缺陷或给予线粒体分裂/线粒体自噬抑制剂Mdivi-1, 可以保护线粒体功能, 并降低磷酸化MLKL的水平, 抑制细胞坏死(表1)。然而, TAIT等^[38]首先利用线粒体自噬的方法获得线粒体缺陷细胞, 随后用TNF- α 刺激线粒体缺陷的细胞, 发现细胞仍然会死亡, 介导坏死性凋亡的寡聚化RIPK3仍能形成。至此, 线粒体自噬和坏死性凋亡的关系尚不十分明确。

我们之前的研究表明, AMPK(5' adenosine monophosphate-activated protein kinase)和Parkin协同调节坏死性凋亡(图1)^[2]。如前所述, 坏死性凋亡与细胞内能量消耗密切相关。AMPK在细胞坏死条件下就能被激活, 而不需要饥饿或葡萄糖缺乏等细胞应激条件。活化的AMPK磷酸化Parkin的第9位Ser并将其激活, 活化的Parkin多泛素化(K-33式)RIPK3的第197位、第302位、第364位Lys, 阻碍RIPK1-RIPK3复合物(也称坏死小体)的形成, 抑制坏死性凋亡^[2]。在线粒体自噬过程中, PINK1能磷酸化Ub和Parkin的Ubl结构域的Ser65, 并激活Parkin的E3泛素连接酶活性。然而, 在坏死性凋亡中, 无论是pUb还是PINK1都没有参与Parkin的激活, 且自噬蛋白LC3-II表达水平也没有明显变化。AMPK磷酸化Parkin的Ubl结构域的Ser9, 可能类似于Ubl结构域内PINK1依赖的Parkin磷酸化(Ser65), 通过诱导构象变化激活Parkin的E3泛素连接酶活性。显然, Parkin参与调控坏死性凋亡可以是非线粒体自噬依赖性的。

4 Parkin参与细胞焦亡

细胞的死亡形式是复杂的, 细胞焦亡是近年来发现的又一种细胞程序性死亡方式。许多研究表明, 细胞焦亡与自噬关系密切^[39-41]。在细胞感染或应激条件下, AIM2(absent in melanoma 2)、NLRP3等炎症小体被激活^[42]。炎症小体的激活导致Caspase1依赖性促炎细胞因子如IL-1 β 和IL-18的分泌, 最终导致细胞焦亡^[43-44]。自2015年以来, SHAO等^[3]发现, Caspase1和Caspase11/4/5是通过剪切蛋白质GSDMD而诱发细胞焦亡的。GSDMD在被Caspase1或Caspase11/4/5剪切后, 释放其N-端结构域, 寡聚化并转位至细胞膜形成跨膜孔道, 由此释放细胞内容物。HORNG团队^[45]研究发现, Caspase1介导线粒体ROS生成、线粒体通透性改变、线粒体网碎片化和线粒

体自噬抑制,可能有助于DAMPs(damage-associated molecular patterns)的释放,最终导致细胞焦亡。机制上,Caspase1通过切割线粒体自噬关键调节因子Parkin的第126位Asp,使得Parkin失活^[45]。在Parkin失去活性的情况下,线粒体自噬受到抑制而不能有效清除受损的线粒体,线粒体损伤加重。线粒体损伤的增加会加剧细胞焦亡。早先,ZHOU等^[46]研究表明,NLRP3炎症小体的活性受自噬负调控,受细胞ROS水平的正调控。静息状态下,NLRP3定位于内质网,而在炎症小体被活化时,NLRP3、ASC(apoptosis-associated speck-like protein containing carboxyl-terminal CARD)等蛋白都重新分布到核周区域。细胞受到各种刺激后,精细地调节着自噬小泡与炎症小体之间的平衡。

Parkin除了通过线粒体自噬途径参与调节NLRP3炎症小体活性外,还可以稳定抗凋亡信号蛋白20(antiapoptotic signaling protein, A20)的表达水平,调节NLRP3炎症小体活性^[47]。泛素修饰酶A20,由类风湿关节炎易感基因*TNFAIP3*(tumor necrosis factor alpha-induced protein 3)编码。机制上,A20抑制NF- κ B通路,导致NF- κ B通路依赖的基因*NLRP3*、*IL-1 β* 等表达下调^[47]。NLRP3激活剂诱导下,虽然NLRP3活性增强,但是由于A20蛋白水平增加,*NLRP3*的表达在转录及翻译水平都受到抑制。Parkin可能通过影响转录因子USF1(upstream stimulatory factor 1)和DREAM(downstream regulatory element antagonist modulator)表达丰度^[48-49],间接调控A20的表达。在没有Parkin的情况下,A20在转录和蛋白水平上都显著减弱,由此NLRP3表达上调,且这种调节不涉及线粒体自噬过程^[47]。此外,我们之前的研究已经发现,Parkin能够泛素化RIPK3,抑制坏死小体的形成,进而负调控坏死性凋亡^[2]。最近,许多研究发现RIPK3参与激活NLRP3炎症小体且不依赖于MLKL,即RIPK3可能参与除坏死性凋亡途径之外的其他细胞死亡途径^[50-53]。因此,在焦亡刺激因素诱导下,研究Parkin与RIPK3的相互作用或有助于进一步阐明细胞焦亡的机制。

5 结论与展望

在特定应激条件下,Parkin通过相对明确的途径参与细胞生命活动。然而,实际情况是细胞受到内外环境的刺激是复杂多变的,相应的细胞内各种

信号通路也会错综复杂。各种细胞死亡方式、自噬等生命过程相伴或相继发生。例如,自噬作为细胞自我保护的机制,当它发生时抑制PINK-Parkin的促凋亡作用;坏死性凋亡通路活化可以不依赖于线粒体自噬,但是线粒体自噬也能在某些条件下影响坏死性凋亡。综上所述,Parkin作为各种死亡形式的重要节点,通过泛素化级联反应,催化形成不同的泛素化连接方式,或使靶蛋白降解、或使目标蛋白生物活性受到抑制,精准细致地调控着线粒体自噬、凋亡、坏死性凋亡和焦亡等细胞生物学过程,以响应多样的细胞内外应激。Parkin在线粒体质量控制机制和细胞死亡调节方面的新认识,将为寻找与线粒体功能障碍相关的神经退行性疾病,如帕金森病、阿尔茨海默病和肌萎缩性侧索硬化症等的靶向药物提供理论基础。

参考文献 (References)

- [1] SUKUMARAN P, NASCIMENTO DA CONCEICAO V, SUN Y, et al. Calcium signaling regulates autophagy and apoptosis [J]. *Cells*, 2021, 10(8): 2125.
- [2] LEE S B, KIM J J, HAN S A, et al. The AMPK-Parkin axis negatively regulates necroptosis and tumorigenesis by inhibiting the necrosome [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(8): 940-51.
- [3] DING J, WANG K, LIU W, et al. Erratum: pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family [J]. *Nature*, 2016, 540(7631): 150.
- [4] ZHOU R, YAZDI A, MENU P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2011, 469(7329): 221-5.
- [5] DANEALU J, VERGARA-DIAZ G, PARISI F, et al. Accelerometer data collected with a minimum set of wearable sensors from subjects with Parkinson's disease [J]. *Sci Data*, 2021, 8(1): 48.
- [6] KITADA T, ASAKAWA S, HATTORI N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism [J]. *Nature*, 1998, 392(6676): 605-8.
- [7] VALENTE E, ABOU-SLEIMAN P, CAPUTO V, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1 [J]. *Science*, 2004, 304(5674): 1158-60.
- [8] HENNEBERG L, SCHULMAN B. Decoding the messaging of the ubiquitin system using chemical and protein probes [J]. *Cell Chem Biol*, 2021, 28(7): 889-902.
- [9] MADSEN D, SCHMIDT S, BLAABJERG M, et al. Interaction between Parkin and α -Synuclein in *PARK2*-mediated Parkinson's disease [J]. *Cells*, 2021, 10(2): 283.
- [10] LE GUERROU F, YOULE R. Active state of Parkin [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25(8): 644-6.
- [11] TREMPER J, SAUVÉ V, GRENIER K, et al. Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation [J]. *Science*, 2013, 340(6139): 1451-5.
- [12] SAUVÉ V, SUNG G, SOYA N, et al. Mechanism of parkin acti-

- vation by phosphorylation [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25(7): 623-30.
- [13] KAZLAUSKAITE A, KELLY V, JOHNSON C, et al. Phosphorylation of Parkin at Serine65 is essential for activation: elaboration of a Miro1 substrate-based assay of Parkin E3 ligase activity [J]. *Open Biol*, 2014, 4(3): 130213.
- [14] GLADKOVA C, MASLEN S, SKEHEL J, et al. Mechanism of parkin activation by PINK1 [J]. *Nature*, 2018, 559(7714): 410-4.
- [15] HUNG C, LOMBARDO P, MALIK N, et al. AMPK/ULK1-mediated phosphorylation of Parkin ACT domain mediates an early step in mitophagy [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(15): eabg4544
- [16] LEMASTERS J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging [J]. *Rejuvenation Res*, 2005, 8(1): 3-5.
- [17] ECKL E, ZIEGEMANN O, KRUMWIEDE L, et al. Sensing, signaling and surviving mitochondrial stress [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(16): 5925-51.
- [18] GREENE A, GRENIER K, AGUILETA M, et al. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment [J]. *EMBO Rep*, 2012, 13(4): 378-85.
- [19] YAN C, GONG L, CHEN L, et al. PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis [J]. *Autophagy*, 2020, 16(3): 419-34.
- [20] KOYANO F, OKATSU K, KOSAKO H, et al. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin [J]. *Nature*, 2014, 510(7503): 162-6.
- [21] CEN X, ZHANG M, ZHOU M, et al. Mitophagy regulates neurodegenerative diseases [J]. *Cells*, 2021, 10(8): 1876
- [22] GUAN Y, WANG Y, LI B, et al. Mitophagy in carcinogenesis, drug resistance and anticancer therapeutics [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 350.
- [23] WAUER T, SIMICEK M, SCHUBERT A, et al. Mechanism of phospho-ubiquitin-induced Parkin activation [J]. *Nature*, 2015, 524(7565): 370-4.
- [24] ORDUREAU A, SARRAF S, DUDA D, et al. Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial Parkin translocation and ubiquitin chain synthesis [J]. *Mol Cell*, 2014, 56(3): 360-75.
- [25] KIM I, SILWAL P, JO E. Mitofusin 2, a key coordinator between mitochondrial dynamics and innate immunity [J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 2273-84.
- [26] KERR J, WYLLIE A, CURRIE A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26(4): 239-57.
- [27] WANG X. The expanding role of mitochondria in apoptosis [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(22): 2922-33.
- [28] CHEN H, LI Y, LI Y, et al. PARK2 promotes mitochondrial pathway of apoptosis and antimicrotubule drugs chemosensitivity via degradation of phospho-BCL-2 [J]. *Theranostics*, 2020, 10(22): 9984-10000.
- [29] RADHA G, RAGHAVAN S. BCL2: a promising cancer therapeutic target [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2017, 1868(1): 309-14.
- [30] BHALLA K. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis [J]. *Oncogene*, 2003, 22(56): 9075-86.
- [31] CHEN D, GAO F, LI B, et al. Parkin mono-ubiquitinates Bcl-2 and regulates autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(49): 38214-23.
- [32] ZHANG C, LEE S, PENG Y, et al. PINK1 triggers autocatalytic activation of Parkin to specify cell fate decisions [J]. *Curr Biol*, 2014, 24(16): 1854-65.
- [33] BERNARDINI J P, BROUWER J M, TAN I K, et al. Parkin inhibits BAK and BAX apoptotic function by distinct mechanisms during mitophagy [J]. *EMBO J*, 2019, 38(2): e99916.
- [34] ORDUREAU A, PAULO J, ZHANG W, et al. Dynamics of Parkin-dependent mitochondrial ubiquitylation in induced neurons and model systems revealed by digital snapshot proteomics [J]. *Mol Cell*, 2018, 70(2): 211-27, e8.
- [35] JOHNSON B N, BERGER A K, CORTESE G P, et al. The ubiquitin E3 ligase parkin regulates the proapoptotic function of Bax [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(16): 6283-8.
- [36] CUNNINGHAM C, BAUGHMAN J, PHU L, et al. USP30 and Parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(2): 160-9.
- [37] MIZUMURA K, CLOONAN S M, NAKAHIRA K, et al. Mitophagy-dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(9): 3987-4003.
- [38] TAIT S W, OBERST A, QUARATO G, et al. Widespread mitochondrial depletion via mitophagy does not compromise necroptosis [J]. *Cell Rep*, 2013, 5(4): 878-85.
- [39] LÜ S, LIU H, WANG H. The interplay between autophagy and NLRP3 inflammasome in ischemia/reperfusion injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8773.
- [40] YAN Y, FANG Y, ZHENG R, et al. NLRP3 inflammasomes in Parkinson's disease and their regulation by Parkin [J]. *Neuroscience*, 2020, 446: 323-34.
- [41] GUO R, WANG H, CUI N. Autophagy regulation on pyroptosis: mechanism and medical implication in sepsis [J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021: 9925059.
- [42] KUMARI P, RUSSO A, SHIVCHARAN S, et al. AIM2 in health and disease: inflammasome and beyond [J]. *Immunol Rev*, 2020, 297(1): 83-95.
- [43] SUN L, MA W, GAO W, et al. Propofol directly induces caspase-1-dependent macrophage pyroptosis through the NLRP3-ASC inflammasome [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 542.
- [44] FU Q, WU J, ZHOU X, et al. NLRP3/Caspase-1 pathway-induced pyroptosis mediated cognitive deficits in a mouse model of sepsis-associated encephalopathy [J]. *Inflammation*, 2019, 42(1): 306-18.
- [45] YU J, NAGASU H, MURAKAMI T, et al. Inflammasome activation leads to Caspase-1-dependent mitochondrial damage and block of mitophagy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(43): 15514-9.
- [46] ZHOU R, YAZDI A S, MENU P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2011, 469(7329): 221-5.
- [47] MOUTON-LIGER F, ROSAZZA T, SEPULVEDA-DIAZ J, et al. Parkin deficiency modulates NLRP3 inflammasome activation by attenuating an A20-dependent negative feedback loop [J]. *Glia*, 2018, 66(8): 1736-51.
- [48] AMIR-ZILBERSTEIN L, DIKSTEIN R. Interplay between E-box and NF-kappaB in regulation of A20 gene by DRB sensitivity-inducing factor (DSIF)[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(3): 1317-23.
- [49] TIRUPPATHI C, SONI D, WANG D, et al. The transcription

- factor DREAM represses the deubiquitinase A20 and mediates inflammation [J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(3): 239-47.
- [50] CHEN J, WANG S, FU R, et al. RIP3 dependent NLRP3 inflammasome activation is implicated in acute lung injury in mice [J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 233.
- [51] LAWLOR K, KHAN N, MILDENHALL A, et al. RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6282.
- [52] OLTEAN T, VAN SAN E, DIVERT T, et al. Viral dosing of influenza A infection reveals involvement of RIPK3 and FADD, but not MLKL [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(5): 471.
- [53] HUANG Y, XU W, ZHOU R. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114-27.