

线粒体相关内质网膜(MAM)钙转运及调节 蛋白介导线粒体钙稳态

高鹏[#] 杨明[#] 孙林^{*}

(中南大学湘雅二医院肾内科, 中南大学肾脏病研究所, 长沙 410011)

摘要 内质网和线粒体作为细胞内重要的钙池, 维持细胞内钙离子稳态。近年来发现, 线粒体与内质网之间存在物理偶联, 称为线粒体相关内质网膜(mitochondria associated endoplasmic reticulum membrane, MAM)。最近发现, MAM中存在许多钙转运与调节蛋白, 它们对内质网与线粒体之间的钙离子交流进行精密调节, 维持细胞功能与生存。该文综述了国内外近年来MAM介导的钙离子信号转导的研究进展, 重点阐述MAM中钙离子相关蛋白质在维持线粒体钙稳态中的作用与机制。

关键词 线粒体相关内质网膜; Ca^{2+} 转运调节蛋白; 线粒体钙稳态; 功能

The Role of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes (MAM) Calcium-Related Proteins in Maintaining Mitochondria Calcium Homeostasis

Gao Peng[#], Yang Ming[#], Sun Lin^{*}

(Department of Nephrology, Second Xiangya Hospital, Institute of Nephrology, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract The endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria are the main storage compartment for cell calcium, which play an important role in calcium homeostasis. The specific sites of physical association between ER and mitochondria are known as mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM). It has recently become clear that MAMs are crucial for highly efficient transmission of Ca^{2+} from the ER to mitochondria, thus controlling fundamental processes involved in energy production, determining cell fate and also mitochondria calcium homeostasis. In this review, we summarize the recent progress of the calcium signaling around MAM, emphasizing the mechanism and functions of Ca^{2+} related proteins of MAM in maintaining mitochondria calcium homeostasis.

Keywords MAM; Ca^{2+} transport and regulatory proteins; mitochondria calcium homeostasis; function

线粒体相关内质网膜(mitochondria associated endoplasmic reticulum, MAM)最初由John Ruby于1969年在电子显微镜下发现, 直到1990年Jean Vance利用

生化方法才将这一结构分离出来, 把这一偶联部位正式命名为线粒体相关内质网膜^[1], 并发现线粒体外膜的5%~20%和内质网相互关联^[2]。内质网和线

收稿日期: 2017-10-07

接受日期: 2017-12-25

国家自然科学基金(批准号: 81730018、81470960)资助的课题

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 0731-85292064, E-mail: sunlin@csu.edu.cn

Received: October 7, 2017

Accepted: December 25, 2017

[#]These authors contributed equally to this work

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81730018, 81470960)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-731-85292064, E-mail: sunlin@csu.edu.cn

网络出版时间: 2018-04-17 10:54:48

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180417.1054.004.html>

粒体上钙离子相关蛋白质丰度最高,是细胞内重要的钙离子储存器。近年来研究发现, MAM是一个动态的结构域,可以招募不同的分子维持细胞各种生理功能^[3],其中包括Ca²⁺转运等相关蛋白质,从而参与细胞增殖分化、突触传递、基因表达、细胞代谢以及细胞死亡等各种生理病理过程^[4]。下面就细胞MAM中钙离子传递蛋白质组成、调节机制及其相关功能进行阐述。

1 MAM的概述

MAM在细胞内环境稳态中扮演重要的角色,广泛参与脂质合成与转运、线粒体动力学调控、炎症小体形成、内质网应激、自噬以及细胞凋亡^[4-6]。研究表明, MAM是细胞内抗去垢剂的膜性结构,其上含有丰富的脂筏样结构域(lipid raft-like domain)^[7]。此外,线粒体外膜和内质网之间的距离并不是恒定的,其变化范围在10~100 nm,如线粒体和滑面内质网之间的距离约为10~15 nm,而粗面内质网上存有核糖体,此部位的MAM距离较大,约为20~30 nm^[4]。因此,我们将电镜下观察到线粒体和内质网之间距离小于100 nm的区域定义为MAM(图1A),以便对MAM进行定量检测。MAM的形态结构具有异质性,根据电子显微镜观察的形态, MAM可分为三种类型: (I)内质网小管和线粒体相切,相互接触面积占线粒体的10%左右; (II)内质网小管完全包绕线粒体; (III)内质网小管包绕部分(大约占线粒体周径的50%)线粒体。绝大多数细胞内存在的为I型MAM,三种形态的MAM可存在于同一个细胞内^[5]。但不同亚型的MAM是否具有不同的功能,目前没有相关研究报道。

目前对组织和细胞MAM的提取技术已相当成熟。利用Percoll梯度离心法提取MAM,分为两个步骤。第一步,分离粗线粒体(此时的线粒体周围黏连膜性细胞器,包括内质网);第二步,利用高速离心机和Percoll梯度溶液对粗线粒体进行分离,离心后的MAM位于最上层,而纯化的线粒体则位于试管的底部,随后将提取到的MAM利用Western blot进行纯度检测,详细的提取步骤可参考文献[8-9]。目前尚未找到MAM部位的特异性标志物,现在常用的标志物有FACL4(long-chain fatty-acid CoA synthases)、PEMT(phosphatidylethanolamine N-methyltransferase)、VDAC1(voltage-dependent anion channel 1)以及

Ps1(presenilin 1)^[7]。可以利用上述标志物对提取的MAM进行纯度鉴定。除了利用上述方法对MAM进行半定量检测,还可以利用激光共聚焦显微镜直接观察MAM的数量变化。利用两种不同的荧光蛋白分别对线粒体和内质网进行标记(图1B),通过激光共聚焦显微镜成像,生成的Mander系数(Mander's coefficient)可以反映MAM的变化^[10]。

2 MAM与钙离子转运

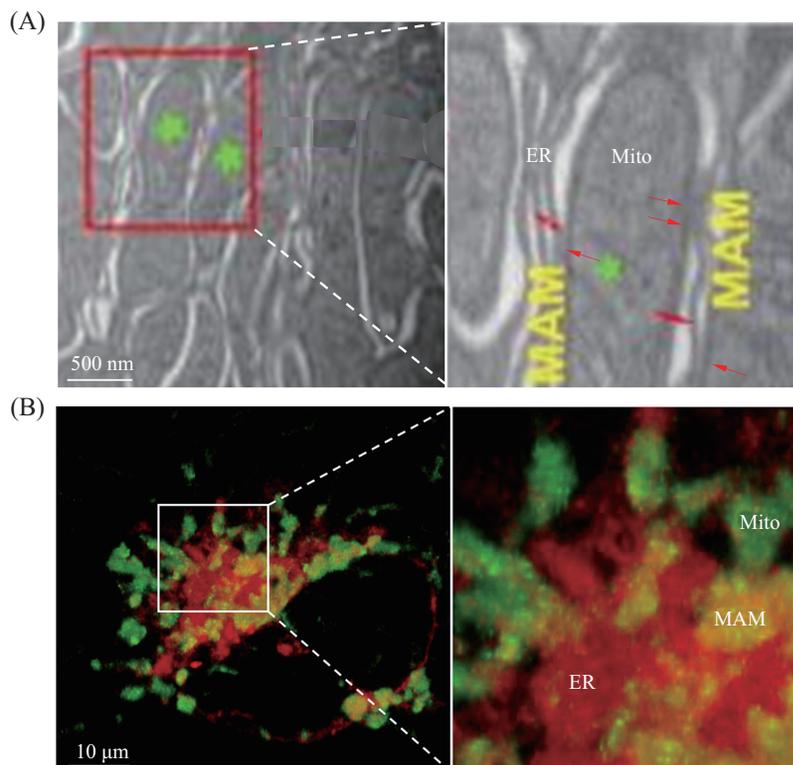
MAM中参与Ca²⁺转运的蛋白质包括内质网钙离子释放蛋白质、线粒体外膜相关蛋白质以及线粒体内膜相关蛋白质。线粒体经由MAM摄取内质网释放的钙离子可以分为三步。第一步,内质网释放钙离子,由IP₃Rs(inositol 1,4,5-trisphosphate receptors)或者RyRs(ryanodine receptors)介导;第二步,钙离子穿越线粒体外膜(outer mitochondria membranes, OMM),由VDAC(voltage-dependent anion-selective channel)介导;第三步,钙离子穿越线粒体内膜(inner mitochondria membranes, IMM)进入线粒体基质,主要由线粒体钙离子单向转运体(mitochondria calcium uniporter, MCU)介导^[11]。

2.1 内质网/肌浆网与Ca²⁺转运

内质网/肌浆网上钙离子释放蛋白质为IP₃Rs和RyRs。IP₃Rs表达在绝大多数细胞内质网,也可表达在肌细胞的肌浆网。RyRs主要表达在肌细胞的肌浆网上,部分表达于非肌细胞的内质网上^[12]。

2.1.1 IP₃Rs 该通道为六跨膜受体,有三种亚型,即IP₃R1、IP₃R2、IP₃R3,其N-末端结构域为IP₃的结合位点(三种亚型对IP₃的亲合力不同,IP₃R2>IP₃R1>IP₃R3)和酶(蛋白激酶、磷酸酶、过氧化物酶)的调节位点^[13-14]。研究表明,中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中, MAM部位介导内质网释放钙离子的蛋白质主要是IP₃R3,而IP₃R1主要介导内质网释放钙离子至细胞质中^[15]。有研究表明,小鼠肝细胞中,IP₃R1和IP₃R2也存在于MAM部位,介导钙离子的传导^[16]。因此,在不同的组织中三种亚型均参与MAM内质网钙离子释放蛋白质的组成,且MAM的不同功能或由不同的亚型执行。

2.1.2 RyRs 有三种亚型,即RyR1、RyR2、RyR3,主要表达在肌细胞肌浆网,部分表达在非肌细胞的内质网,因此它们的分布无组织特异性^[12]。RyR1主要分布于骨骼肌, RyR2在心肌细胞, RyR3表达在脑



A: 电镜下人肾脏近曲小管细胞(HK-2细胞)MAM成像(红色箭头所指部位); B: 激光聚焦显微镜对转染了线粒体靶向绿色荧光蛋白和内质网靶向红色荧光蛋白的HK-2细胞MAM区域成像(黄色部位)。

A: electronic microscope (EM) image of human kidney proximal cells (HK-2 cells) showing mitochondria (Mito) in close apposition to endoplasmic reticulum (ER) membranes (red arrows); B: confocal microscopy image of HK-2 cells expressing a mitochondrial matrix GFP and an ER targeted RFP, in which several appositions between the two organelles are visible (yellow spots).

图1 线粒体相关内质网膜结构

Fig.1 ER-mitochondria structural apposition

组织和膈肌^[17]。Minck等^[18]在小鼠心肌细胞(HL-1细胞)中发现, RyR2与VDAC2相互作用介导钙离子在内质网和线粒体之间的转运。

2.2 线粒体外膜与Ca²⁺转运

线粒体外膜上的钙转运蛋白为VDAC, 为OMM上表达最丰富的蛋白质, 有三种亚型即VDAC1/2/3, 它们结构相似, 并具有高度的序列同源性(65%~75%)^[19]。该通道特点为: 低电势(<20~30 mV)时, 通道开放, 电导率升高, 离子选择性降低; 高电势(>40 mV)时, 通道关闭, 电导率降低, 离子选择性升高^[20]。目前, 该通道的特性和效应仍然存在一些争议^[21], 主要有两种观点。(1)VDAC关闭, 促进细胞凋亡, VDAC开放促进线粒体能量代谢; (2)细胞在生理状态下, VDAC持续开放, 当关闭时促进细胞能量代谢。研究表明, 介导MAM部位钙离子转运的亚型为VDAC1和VDAC2^[18,22], 其通过Grp75(glucose related protein 75)偶联IP₃Rs, 形成大分子转运体介导线粒体外膜对钙离子的转运。

2.3 线粒体内膜与Ca²⁺转运

线粒体内膜上的钙转运蛋白为RyRs和MCU复合体。其中, 关于RyRs的研究主要集中在心肌和神经细胞, 其他细胞中相关报道较少。因此, 下文着重介绍MCU复合体的最新研究进展。

2.3.1 RyRs 前文提及, RyRs主要表达在肌细胞肌浆网, 因此, 其主要参与内质网钙离子的释放。但是新近的研究表明, 也有部分RyRs定位在线粒体内膜上, Jakob等^[23]和Ryu等^[24]先后在心肌细胞(RyR1)和神经元细胞(RyR2)中发现, 位于线粒体内膜上的RyRs与MCU协同调节线粒体摄取钙离子。

2.3.2 MCU复合体 线粒体内膜上MCU复合体可介导钙离子穿越IMM进入线粒体基质, 因此, 该复合体是钙离子进入线粒体的最后屏障。MCU复合体包括核心通道MCU以及MCU调节蛋白MICU1/2/3(mitochondrial calcium uptake protein 1/2/3)、EMRE(essential MCU regulator)、MCUR1(mitochondrial calcium uptake regulator 1)和MCUb。

(1)核心通道MCU。该通道对钙离子的亲和力很低,高浓度的钙离子才可以激活其开放,已有研究证实,在MAM部位可以形成“高钙微区”,从而激活MCU的开放,使钙离子快速大量进入线粒体^[25]。

(2)MICU。该蛋白质有三种亚型MICU1/2/3,在脊椎动物中广泛存在,互为同源基因旁系产物,具有保守的结构域序列和线粒体特异性序列。MICU1广泛分布于小鼠各组织, MICU2分布于内脏器官, MICU3分布于骨骼肌和中枢神经系统^[26]。MICU1定位于线粒体膜间腔(intermembrane space, IMS),感知线粒体外钙离子浓度的变化,调节MCU的开放和关闭。当钙离子浓度低时, MCU关闭;当钙离子浓度升高时, MCU开放,线粒体摄取钙离子增多。因此, MICU1具有守门(gatekeeping)的功能^[27]。MICU2也被发现定位于IMS^[28],与MICU1互相稳定彼此的表达。研究发现, MICU2可与MCU/MICU1形成大分子复合物,但是其具体功能仍不明确,可能与MICU1存在功能重叠,也可能具有其他作用,需要进一步研究证实^[26]。上述提到, MICU3虽然也具有线粒体特异性序列,但是基于线粒体蛋白质数据库(MitoCarta)来源的证据,发现其在线粒体的丰度并不高^[26]。因此,关于MICU3是否参与MCU的调节需要进一步的研究证实。

(3)EMRE。该蛋白质是后生动物特异性蛋白质,分子量约为10 kDa,含有单跨膜结构域和线粒体特异性序列,广泛分布于哺乳动物组织中^[29]。研究表明, EMRE起到桥接作用,将位于IMS的钙离子感受蛋白质MICU1/MICU2和位于IMM上的MCU连接在一起,进而将感知钙离子信号和钙离子转运活动偶联在一起^[28]。

(4)MCUb。该蛋白质与MCU序列有50%的相似性,但是具有不同的表达模式,利用平面脂质双层系统,发现其并不参与钙离子孔道的形成。此外,在HeLa细胞中研究发现,MCUb对MCU具有直接抑制作用,可以减少外界刺激引起的线粒体摄取钙离子^[30]。

2.4 线粒体钙离子排出通道

线粒体基质内钙离子浓度升高激活钙离子依赖的信号通路后,发挥完效应的钙离子便被转运出线粒体基质,该过程主要通过钙离子排出相关蛋白质实现,最终维持线粒体钙离子稳态。线粒体内膜上的mNCX(mitochondria $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger)和mHCX(mitochondria $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger)将钙离子转

运出线粒体,使基质内钙离子恢复至静息水平^[31]。此外,线粒体内膜上的通透性转换孔(mitochondria permeability transition pore, mPTP)也可介导线粒体钙离子外流。关于mPTP的分子组成仍然存有争议,最新的研究表明, mPTP由位于IMM上的F-ATP合酶(F-ATP synthase)二聚体形成^[32], mPTP瞬时开放时可以允许钙离子和<1.5 kDa大小的分子进出线粒体,长时间开放便会引起细胞凋亡。

综上所述, $\text{IP}_3\text{Rs-Grp75-VDAC-MCU}$ 复合体/ RyRs 或 RyRs-VDAC-MCU 复合体/ RyRs 共同组成MAM部位钙离子转运蛋白质群,介导内质网钙离子的释放和线粒体摄取钙离子,而位于线粒体上的mNCX、mHCX以及mPTP则将发挥完效应的钙离子移出线粒体基质。一进一出通道相互协调共同维持线粒体基质钙离子稳态。

3 MAM对钙离子转运的调节

MAM是双层膜性结构,其上含有线粒体膜蛋白质、内质网膜蛋白质以及部分胞质蛋白质,它们均可参与钙离子转运的调节。此外, MAM还是一个动态的结构域,其功能与MAM距离(distance)、偶联长度(expansion)和偶联数量(number)有关,上述参数的改变也可以影响线粒体摄取钙离子,具体机制见图2。

3.1 线粒体相关蛋白对钙离子转运的调节

3.1.1 Cyto C 正常情况下, Cyto C定位于IMS,在促凋亡因子作用下可以被释放至细胞质,与 IP_3Rs 相互作用解除钙离子对 IP_3Rs 的抑制作用,促进钙离子释放^[12],线粒体经MAM摄取量也相应增加。

3.1.2 Grp75 该蛋白属热休克蛋白家族,主要定位于线粒体,但其在内质网和细胞膜等部位也有部分表达。György等^[22]证实,线粒体外膜相关的Grp75作为 IP_3Rs 和VDAC1之间的桥梁参与MAM部位钙离子的转运, Grp75具有维持 IP_3Rs 构象稳定的作用。

3.1.3 Bcl-2蛋白质家族 该家族因其通过线粒体发挥凋亡调控的功能而为人们所熟知。Lewis等^[21]和Eckenrode等^[33]发现,该家族中的部分成员如Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1可以与内质网上的 IP_3Rs 结合,调节 IP_3Rs 介导的钙离子释放。过表达Bcl-2不仅可以显著抑制 IP_3Rs 的开放,还可降低 IP_3Rs 和其配体 IP_3 的结合能力。Bcl-XL可以增强 IP_3Rs 对 IP_3 的亲和力,增加 IP_3Rs 通道的开放效率,但却降低 IP_3Rs 的表达。Li

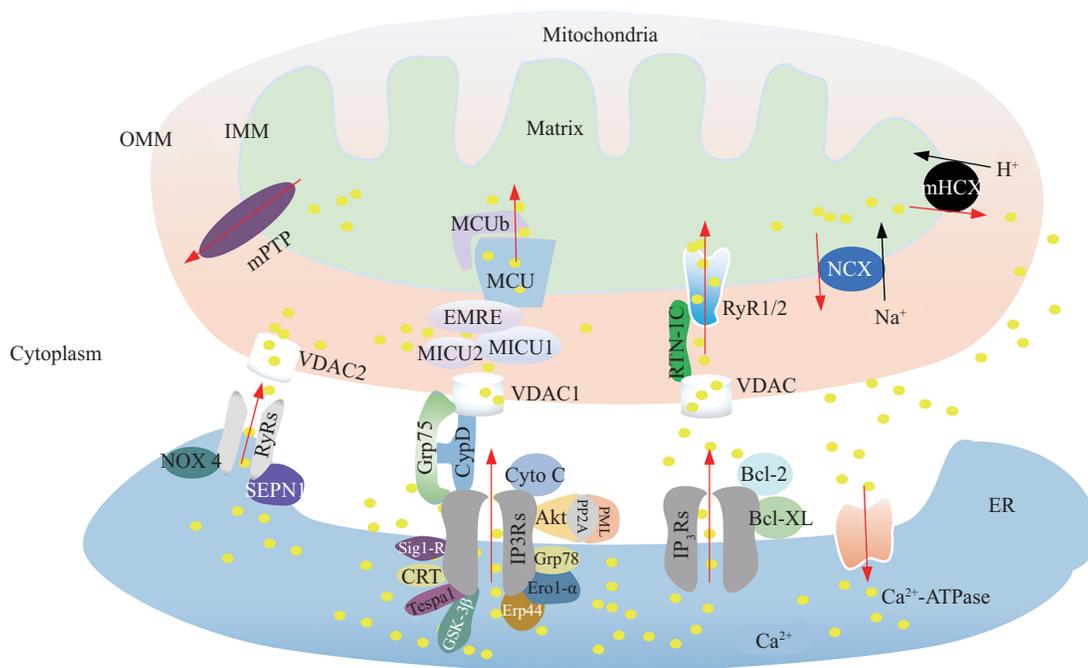


图2 MAM部位钙离子传递及调节示意图

Fig.2 Major Ca^{2+} transporters/channels and regulatory molecules at the mitochondrion and ER

等^[21]证实, Bcl-XL对内质网释放钙离子总的效应是下调。

3.1.4 CypD CypD(Cyclophilin D)为线粒体膜蛋白质, 参与调节mPTP的开放^[34]。Paillard等^[35]和Tubbs等^[36]在心肌和肝细胞中发现, CypD也存在于MAM部位, 敲除CypD可以导致MAM形成减少。进一步研究发现, 该蛋白质可与IP₃Rs/Grp75/VDAC复合物相互作用, 参与MAM部位钙离子转运的调节^[35-36]。研究表明, CypD既可通过改变MAM的空间结构(见下文)影响钙离子的传递, 又可与IP₃Rs/Grp75/VDAC复合物相互作用参与调节钙离子的传递^[35]。

3.2 内质网相关蛋白质对钙离子转运的调节

3.2.1 内质网分子伴侣 Sig1-R、Grp78(glucose regulated protein 78)、Calreticulin和Erp44为存在于内质网上的分子伴侣, 它们可以通过不同的机制调节MAM部位IP₃Rs的活性。IP₃Rs一旦与其配体IP₃结合后很快被泛素化, 然后被内质网相关的蛋白酶体降解, 因此, IP₃Rs的构象在被激活后保持稳定对于维持钙离子在线粒体和细胞质中的传递至关重要^[37]。研究表明, Sig1-R、Grp78可稳定IP₃Rs的构象^[22,37-38], 其中, Grp78不仅可以直接与IP₃Rs作用稳定其构象, 还可以通过与Sig1-R解离间接调控IP₃Rs的稳定性, 从而保证钙离子在内质网和线粒体之间的正常传

递。此外, 一些分子伴侣还可以调节IP₃Rs的活性, Calreticulin(CRT)可以通过其独特的高亲和力-低结合力结构域(high-affinity-low-capacity domain)抑制IP₃Rs介导的钙离子信号传导^[39], Erp44可以特异性地抑制IP₃R1的活性(不影响IP₃R2和IP₃R3的活性), 进而影响内质网和线粒体之间的钙离子传递^[40]。

3.2.2 内质网氧化还原相关蛋白质 Ero1-α(ER oxidoreductin 1-α)、NOX4(NADPH oxidase 4)、SEPN1(selenoprotein N1)为存在于内质网上的氧化还原蛋白质, 研究表明, 它们也参与了MAM部位钙离子传递的调节。Ero1-α是细胞内主要的蛋白质二硫键氧化酶, Gilady等^[41]在MAM的内质网膜上也发现了它的存在, Ero1-α既可以过氧化IP₃Rs引起巨噬细胞内质网释放钙离子增多, 也可以通过解除Erp44对IP₃R1的抑制作用促进内质网释放钙离子^[42]。NOX4可以过氧化骨骼肌肌浆网上的RyR1, 引起内质网中的钙离子渗漏^[43], 但是否引起线粒体摄取钙离子增多作者并未提及, 需进一步研究证实。此外, SEPN1也可与RyRs相互作用, 激活其开放^[44]。上述的三种蛋白质为内质网氧化还原状态的重要调节蛋白质(Ero1-α、NOX4、SEPN1)。因此, 有学者提出, 内质网的氧化状态也可调节MAM部位钙离子传递^[45]。

3.2.3 PML 上述已提及IP₃Rs的N-端结构域存在

多种酶的作用位点, 磷酸化或过氧化可以调节IP₃Rs的活性。PML(promyelocytic leukemia)是多效应的凋亡调节蛋白质, Giorgi等^[46]发现, 它定位于MAM部位的内质网膜上, 与Akt-PP2A(protein phosphatase 2A)-IP₃Rs在MAM部位形成大分子复合物, 调节内质网释放钙离子和线粒体摄取钙离子。其具体机制为: PML在MAM部位招募PP2A, 使Akt去磷酸化而失活, Akt对IP₃Rs的磷酸化减少, 引起IP₃Rs通道的激活, 随之内质网释放钙离子增多, 线粒体通过MAM摄取钙离子也相应增多^[46]。

3.2.4 Reticulon protein-1C Reticulons(RTNs)蛋白质家族主要分布于内质网^[47]。Reali等^[48]发现, 它们也存在于MAM部位, 且与FACL4和VDAC存在相互作用, 参与调节线粒体和内质网之间的偶联。上调Reticulon protein-1C的表达, 可以引起MAM偶联长度增加, 细胞质钙离子水平升高, 线粒体内钙离子水平降低。进一步研究内质网上钙通道相关蛋白质(RyR2、SERCA2b、IP3R1、Mfn2)的表达发现, 仅RyR2表达上调^[48]。因此, Reticulon protein-1C可能通过对IMM上RyR2的调节, 调节线粒体经由MAM摄取钙离子, 也可能通过与OMM上的VDAC相互作用调节线粒体摄取钙离子。

3.2.5 GSK-3β GSK-3β(glycogen synthase kinase-3β)是一个多功能的蛋白激酶, 参与糖原合成, 研究发现, 其对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用^[49]。Gomez等^[49]在心肌细胞中证实, GSK-3β存在于内质网和MAM部位, 可与IP₃R1-Grp75-VDAC-CypD复合物相互作用。进一步的研究表明, GSK-3β可调节IP₃R1磷酸化和活性, 影响线粒体经由MAM摄取钙离子的效率^[49]。

3.2.6 Tespa1 *Tespa1*(thymocyte-expressed, positive selection-associated gene 1)是调控胸腺中T-细胞成熟的关键基因^[50]。Matsuzaki等^[51]发现, 它在T和B淋巴细胞中高表达, 并与IP₃Rs的N-端存在相互作用的结构域。进一步的研究发现, *Tespa1*在jurkat细胞中定位于MAM, 且与MAM部位的Grp75也存在相互作用, 下调*Tespa1*的表达可以显著抑制线粒体摄取钙离子, 表明*Tespa1*可能通过与IP₃Rs/Grp75复合物的相互作用调控MAM部位钙离子的传递^[51]。

3.3 MAM空间结构改变对钙离子转运的调节

研究表明, MAM之间距离、偶联长度及偶联数量的改变可以引起MAM功能的变化, 影响钙离子在

内质网和线粒体之间的传递效率。

3.3.1 MAM距离影响钙离子转运速率 Csordás等^[16]通过设计不同长度的人工偶联(即一段特殊的氨基酸序列, 其N-端为mAKAP1序列, 特异性锚定于线粒体外膜; C-端为γUBC6序列, 特异性锚定于内质网膜)来控制线粒体和内质网之间距离发现: 当MAM之间的距离变小时, 钙离子传输效率便会增加, 易引起线粒体钙超载; 当距离变大时, 钙离子传输效率便会下降。但是, 当MAM距离<7 nm时, 反而会降低钙离子的传输效率, 其可能原因是IP₃Rs受体在MAM部位需要一定的空间才可以发挥作用^[16,25]。

3.3.2 Mfn2依赖的MAM介导的钙离子转运调节 上述提及的是通过人工偶联改变MAM的形成从而调节钙离子传递, 此外, 还可以通过调节MAM形成关键蛋白质改变MAM的形成来影响钙离子的转运, 如Mfn2(mitofusin 2)^[52]、E3泛素连接酶MITOL^[53]、家族性阿尔茨海默病相关蛋白质Ps-2(presenilin-2)^[54]等。研究表明, MITOL和Ps-2通过Mfn2间接调节MAM的形成^[53-55], 因此, Mfn2是调节MAM(包括MAM的距离、长度、数量)的重要蛋白质。但由于Mfn2参与线粒体的融合, 与线粒体的形态变化有关, 而线粒体形态学改变可影响共聚焦显微镜对MAM的定量。因此, 关于Mfn2对MAM形成调节是负性调节还是正向调节仍需进一步研究^[4]。可以肯定的是, Mfn2的表达改变可引起MAM空间结构的变化, 进而导致线粒体摄取钙离子出现异常^[4]。综上所述, MAM的距离、长度以及偶联数量都会影响钙离子在MAM部位的传递, 机体可以通过调节MAM这些空间参数来调节钙离子的传输效率使得细胞更好地面对外界的应激。

4 MAM介导的钙离子传递与细胞功能

4.1 线粒体能量代谢

线粒体通过MAM摄取钙离子调控能量代谢和细胞死亡, 线粒体基质内钙离子浓度高低决定上述两个功能之间的转化。当基质内钙离子浓度短暂升高(即在生理浓度范围内时), 可以增加NADH和ATP的生成。因为糖代谢中的三个限速酶活性与线粒体基质内钙离子浓度相关, 钙离子通过不同的方式调节三种限速酶的活性^[4]。一是丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH), 该酶将丙酮酸转化为乙酰辅酶A, 后者进入三羧酸循环。钙离子通过活化PDH

磷酸酶,使PDH去磷酸化而被激活。二是异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, ICDH)和 α -酮戊二酸脱氢酶(oxoglutarate dehydrogenase, OGDH),钙离子通过与两种酶的钙离子结合位点结合从而变构激活上述酶的活性,增加酶和相应底物的亲和力。此外,钙离子还可以直接激活电子传递链(ETC)和ATP合酶(F_0F_1 ATP synthase)的活性,直接促进ATP的生成^[4]。研究表明,通过阻断内质网通过IP₃Rs释放钙离子或者下调MCU/MCU1抑制线粒体摄取钙离子,可使线粒体的耗氧量和ATP的生成量显著下降^[56]。综上所述,线粒体通过MAM摄取钙离子调控线粒体的能量代谢。

4.2 细胞死亡

细胞死亡可以分为三种类型:一是细胞凋亡(apoptosis),二是自噬(autophagy),三是细胞坏死(necrosis)^[57]。研究表明,上述三种细胞死亡类型均与线粒体通过MAM摄取钙离子有关^[58]。当线粒体基质内的钙离子浓度超过一定阈值时便会引起线粒体膜通透性转变(mitochondrial permeability transition, MPT),由位于IMM上的钙离子敏感的mPTP所介导,MPT可引起线粒体内膜的通透性增高,线粒体膜电位消失,丧失产生ATP的能力,线粒体则因渗透压变化引起外膜(OMM)破裂^[55]。ATP生成不足影响细胞质内各离子稳态和细胞的完整性,最终引起细胞坏死。然而,一些研究发现,MPT也参与细胞凋亡的发生,OMM破裂时会释放线粒体相关的促凋亡因子如Cyto C、凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)、SMAC/DIABLO和内切核酸酶G(endonuclease G),它们可激活凋亡的不同通路^[58]。自噬通常在细胞能量供应不足时被激活,细胞通过自噬可以实现能量的重复利用,从而增强细胞的生存能力,换一个角度也可以说自噬与细胞死亡相关。研究表明,线粒体经由MAM摄取钙离子参与了自噬的发生^[59],IP₃Rs介导的线粒体摄取钙离子减少,可抑制PDH的活性,减少ATP的生成,细胞因能量不足而激活自噬。同时,线粒体摄取钙离子减少也可激活AMPK(细胞内的能量感受器),抑制mTOR(自噬的负调节因子)的活性,从而激活自噬^[58]。综上所述,钙离子作为MAM部位的重要信使以不同的方式影响细胞的生存。

4.3 胰岛素抵抗

线粒体摄取钙离子影响细胞的能量代谢。近

年来发现,改变线粒体摄取钙离子异常可以引起胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)^[60],而线粒体摄取钙离子是通过MAM实现的,并且MAM完整性(MAM integrity)与胰岛素抵抗发生相关^[35]。因此,MAM部位钙离子传导异常引起的胰岛素抵抗可能在2型糖尿病的发生、发展过程中起着重要作用。

5 总结

本文主要围绕MAM介导的钙离子转运展开叙述,总结了MAM部位介导钙离子转运、调节的相关蛋白及其行使的功能,充分表明了MAM在维持线粒体钙离子稳态中的重要作用。MAM介导的钙离子传导不仅可以影响细胞生存、能量代谢,还参与胰岛素等相关信号转导,且有研究表明,MAM功能异常与多种疾病发生相关,如肿瘤、糖尿病和神经系统退行性疾病有关。因此,调节MAM介导的钙离子信号转导可能成为治疗上述疾病的重要靶点。

参考文献 (References)

- 1 Vance JE. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem* 1990; 265(13): 7248-56.
- 2 Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, *et al.* Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science* 1998; 280(5370): 1763-6.
- 3 van Vliet A R, Verfaillie T, Agostinis P. New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843(10): 2253-62.
- 4 Filadi R, Theurey P, Pizzo P. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. *Cell Calcium* 2017; 62: 1-15.
- 5 Fujimoto M, Hayashi T. New insights into the role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane. *Int Rev Cell Mol Biol* 2011; 292: 73-117.
- 6 Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 2009; 19(2): 81-8.
- 7 Area-Gomez E, Del Carmen Lara Castillo M, Tambini MD, Guardia-Laguarta C, de Groof AJ, Madra M, *et al.* Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J* 2012; 31(21): 4106-23.
- 8 Arruda AP, Pers BM, Parlakgöl G, Güney E, Inouye K, Hotamisligil GS. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med* 2014; 20(12): 1427-35.
- 9 Wieckowski MR, Giorgi C, Lebedzinska M, Duszynski J, Pinton P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc* 2009; 4(11): 1582-90.
- 10 de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 2008; 456(7222): 605-10.

- 11 Marchi S, Patergnani S, Pinton P. The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1837(4): 461-9.
- 12 Spat A, Szanda G, Csordas G, Hajnóczky G. High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling. *Cell Calcium* 2008; 44(1): 51-63.
- 13 Patergnani S, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, *et al.* Calcium signaling around mitochondria associated membranes (MAMs). *Cell Commun Signal* 2011; 9: 19.
- 14 Newton CL, Mignery GA, Sudhof TC. Co-expression in vertebrate tissues and cell lines of multiple inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptors with distinct affinities for InsP3. *J Biol Chem* 1994; 269(46): 28613-9.
- 15 Mendes CC, Gomes DA, Thompson M, Souto NC, Goes TS, Goes AM, *et al.* The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca²⁺ signals into mitochondria. *J Biol Chem* 2005; 280(49): 40892-900.
- 16 Csordas G, Renken C, Varnai P, Souto NC, Goes TS, Goes AM, *et al.* Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol* 2006; 174(7): 915-21.
- 17 Baker MR, Fan G, Serysheva II. Single-particle cryo-EM of the ryanodine receptor channel in an aqueous environment. *Eur J Transl Myol* 2015; 25(1): 35-48.
- 18 Min C K, Yeom DR, Lee KE, Kwon HK, Kang M, Kim YS, *et al.* Coupling of ryanodine receptor 2 and voltage-dependent anion channel 2 is essential for Ca²⁺ transfer from the sarcoplasmic reticulum to the mitochondria in the heart. *Biochem J* 2012; 447(3): 371-9.
- 19 Shoshan-Barmatz V, Gincel D. The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys* 2003; 39(3): 279-92.
- 20 Colombini M. VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem* 2004; 256-257(1/2): 107-15.
- 21 Lewis A, Hayashi T, Su TP, Betenbaugh MJ. Bcl-2 family in inter-organelle modulation of calcium signaling; roles in bioenergetics and cell survival. *J Bioenerg Biomembr* 2014; 46(1): 1-15.
- 22 Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, *et al.* Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol* 2006; 175(6): 901-11.
- 23 Jakob R, Beutner G, Sharma VK, Duan Y, Gross RA, Hurst S, *et al.* Molecular and functional identification of a mitochondrial ryanodine receptor in neurons. *Neurosci Lett* 2014; 575: 7-12.
- 24 Ryu SY, Beutner G, Dirksen RT, Kinnally KW, Sheu SS. Mitochondrial ryanodine receptors and other mitochondrial Ca²⁺ permeable channels. *FEBS Lett* 2010; 584(10): 1948-55.
- 25 Csordas G, Varnai P, Golenar T, Roy S, Purkins G, Schneider TG, *et al.* Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol Cell* 2010; 39(1): 121-32.
- 26 Plovanich M, Bogorad RL, Sancak Y, Kamer KJ, Strittmatter L, Li AA, *et al.* MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling. *PLoS One* 2013; 8(2): e55785.
- 27 Csordas G, Golenar T, Seifert EL, Kamer KJ, Sancak Y, Perocchi F, *et al.* MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Cell Metab* 2013; 17(6): 976-87.
- 28 Sancak Y, Markhard AL, Kitami T, Kovács-Bogdán E, Kamer KJ, Udeshi ND, *et al.* EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science* 2013; 342(6164): 1379-82.
- 29 Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Kovács-Bogdán E, Kamer KJ, Udeshi ND, *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 2001; 305(3): 567-80.
- 30 Raffaello A, De Stefani D, Sabbadin D, Teardo E, Merli G, Picard A, *et al.* The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit. *EMBO J* 2013; 32(17): 2362-76.
- 31 Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999; 79(4): 1127-55.
- 32 Giorgio V, Guo L, Bassot C, Petronilli V, Bernardi P. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium* 2018; 70: 56-63.
- 33 Eckenrode EF, Yang J, Velmurugan GV, Foskett JK, White C. Apoptosis protection by Mcl-1 and Bcl-2 modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem* 2010; 285(18): 13678-84.
- 34 Woodfield K, Ruck A, Brdiczka D, Halestrap AP. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J* 1998; 336(Pt2): 287-90.
- 35 Tubbs E, Theurey P, Vial G, Bendridi N, Bravard A, Chauvin MA, *et al.* Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes* 2014; 63(10): 3279-94.
- 36 Paillard M, Tubbs E, Thiebaut PA, Gomez L, Fauconnier J, Da Silva CC, *et al.* Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation* 2013; 128(14): 1555-65.
- 37 Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. *Cell* 2007; 131(3): 596-610.
- 38 Higo T, Hamada K, Hisatsune C, Nukina N, Hashikawa T, Hattori M, *et al.* Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP(3) receptor. *Neuron* 2010; 68(5): 865-78.
- 39 Camacho P, Lechleiter JD. Calreticulin inhibits repetitive intracellular Ca²⁺ waves. *Cell* 1995; 82(5): 765-71.
- 40 Higo T, Hattori M, Nakamura T, Natsume T, Michikawa T, Mikoshiba K. Subtype-specific and ER luminal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. *Cell* 2005; 120(1): 85-98.
- 41 Gilady SY, Bui M, Lynes EM, Benson MD, Watts R, Vance JE, *et al.* Ero1alpha requires oxidizing and normoxic conditions to localize to the mitochondria-associated membrane (MAM). *Cell Stress Chaperones* 2010; 15(5): 619-29.
- 42 Li G, Mongillo M, Chin KT, Harding H, Ron D, Marks AR, *et al.* Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-

- triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 2009; 186(6): 783-92.
- 43 Waning DL, Mohammad KS, Reiken S, Xie W, Andersson DC, John S, *et al.* Excess TGF-beta mediates muscle weakness associated with bone metastases in mice. *Nat Med* 2015; 21(11): 1262-71.
- 44 Juryneć MJ, Xia R, Mackrill JJ, Gunther D, Crawford T, Flanigan KM, *et al.* Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(34): 12485-90.
- 45 Chernorudskiy AL, Zito E. Regulation of calcium homeostasis by ER redox: a close-up of the ER/mitochondria connection. *J Mol Biol* 2017; 429(5): 620-32.
- 46 Giorgi C, Ito K, Lin HK, Wieckowski MR, Lebedzinska M, Bononi A, *et al.* PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release. *Science* 2010; 330(6008): 1247-51.
- 47 Teng FY, Tang BL. Cell autonomous function of Nogo and reticulons: the emerging story at the endoplasmic reticulum. *J Cell Physiol* 2008; 216(2): 303-8.
- 48 Reali V, Mehdawy B, Nardacci R, Filomeni G, Risuglia A, Rossin F, *et al.* Reticulon protein-1C is a key component of MAMs. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1853(3): 733-45.
- 49 Gomez L, Thiebaut PA, Paillard M, Ducreux S, Abrial M, Crola Da Silva C, *et al.* The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3beta during reperfusion injury. *Cell Death Differ* 2016; 23(2): 313-22.
- 50 Wang D, Zheng M, Lei L, Ji J, Yao Y, Qiu Y, *et al.* Tespa1 is involved in late thymocyte development through the regulation of TCR-mediated signaling. *Nat Immunol* 2012; 13(6): 560-8.
- 51 Matsuzaki H, Fujimoto T, Ota T, Ogawa M, Tsunoda T, Doi K, *et al.* Tespa1 is a novel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding protein in T and B lymphocytes. *FEBS Open Bio* 2012; 2: 255-9.
- 52 Filadi R, Greotti E, Turacchio G, Luini A, Pozzan T, Pizzo P. Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(17): E2174-81.
- 53 Sugiura A, Nagashima S, Tokuyama T, Amo T, Matsuki Y, Ishido S, *et al.* MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2. *Mol Cell* 2013; 51(1): 20-34.
- 54 Area-Gomez E, de Groof AJ, Boldogh I, Bird TD, Gibson GE, Koehler CM, *et al.* Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria. *Am J Pathol* 2009; 175(5): 1810-6.
- 55 Filadi R, Theurey P, Pizzo P. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. *Cell Calcium* 2017; 62: 1-15.
- 56 Mallilankaraman K, Cardenas C, Doonan PJ, Chandramoorthy HC, Irrinki KM, Golenár T, *et al.* MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism. *Nat Cell Biol* 2012; 14(12): 1336-43.
- 57 Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; 16(1): 3-11.
- 58 Danese A, Patergnani S, Bonora M, Wieckowski MR, Previati M, Giorgi C, *et al.* Calcium regulates cell death in cancer: Roles of the mitochondria and mitochondria-associated membranes (MAMs). *Biochim Biophys Acta* 2017; 1858(8): 615-27.
- 59 Gomez-Suaga P, Paillusson S, Stoica R, Noble W, Hanger DP, Miller CCJ. The ER-mitochondria tethering complex VAPB-PTPIP51 regulates autophagy. *Curr Biol* 2017; 27(3): 371-85.
- 60 Gutierrez T, Parra V, Troncoso R, Pennanen C, Contreras-Ferrat A, Vasquez-Trincado C, *et al.* Alteration in mitochondrial Ca²⁺ uptake disrupts insulin signaling in hypertrophic cardiomyocytes. *Cell Commun Signal* 2014; 12: 68.