



线粒体蛋白 CHCHD10 与神经退行性疾病*

王 晴 朱 笠**

(中国科学院生物物理研究所, 脑与认知科学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 CHCHD10 是核基因编码的线粒体蛋白, 主要位于线粒体膜间隙, 在维持线粒体结构的完整性和线粒体功能方面起关键作用。CHCHD10 基因突变或功能缺失与额颞叶痴呆、肌萎缩侧索硬化症、帕金森病、阿尔茨海默病等多种神经退行性疾病的发生、发展密切相关。线粒体损伤是多种神经退行性疾病的一个共同特点, CHCHD10 基因突变或功能缺失同样会导致线粒体结构和功能的异常。本文从 CHCHD10 结构及其线粒体功能角度总结近年来所发表的研究进展, 讨论 CHCHD10 基因突变或功能缺失引起线粒体损伤的机制。研究 CHCHD10 在维持线粒体结构和功能中的作用机制, 将有助于理解神经退行性疾病的致病机理, 并为探究这些疾病的干预策略奠定基础。

关键词 神经退行性疾病, CHCHD10, CHCHD2, 线粒体 MICOS 复合物, OMA1, TDP-43

中图分类号 Q71, R74

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0107

线粒体是细胞的能量工厂和信号中转站, 其主要功能除了生产 ATP 外, 还参与氨基酸和脂类等代谢物的生物合成、细胞信号转导、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成、蛋白质稳态维持、代谢调节、免疫反应和调控细胞程序性死亡等^[1]。线粒体含有自身的基因组 (mtDNA), 该基因组含有 16 596 个碱基对组成的 37 个基因, 编码 22 个 tRNA、2 个 rRNA 和 13 条多肽链, 这 13 条多肽链分别是不同呼吸链复合物的组分, 参与线粒体氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS)^[2-3]。然而, 人类细胞的线粒体含有 1 200 多种蛋白质, 约 98% 的线粒体蛋白是由核基因组 (nDNA) 编码的^[4]。与大多数线粒体蛋白相似, CHCHD10 (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10) 由核基因编码, 在细胞质中合成, 经线粒体蛋白转运系统进入线粒体, 定位在线粒体膜间隙 (intermembrane space of mitochondria, IMS) 和线粒体嵴上^[5]。

诸多研究表明, 线粒体稳态失衡与额颞叶变性病 (frontal temporal lobar degeneration, FTLD; 也叫额颞叶痴呆 (frontotemporal dementia, FTD))、肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、阿

尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 等多种神经退行性疾病密切相关^[6]。在一个线粒体里, mtDNA 通常以多个拷贝存在, 而且一个细胞中含有成百上千个线粒体。由于细胞线粒体处于分裂和融合的动态变化中, 其数目也是变化的。此外, mtDNA 组更易发生突变, 其突变率比 nDNA 高 100~1 000 倍。因此, 线粒体稳态失衡主要包括: a. mtDNA 拷贝数明显减少或 mtDNA 缺失产生的 mtDNA 不稳定性增强, 可能导致 mtDNA 损耗综合征^[7-8]; b. 线粒体分裂融合动态失衡导致线粒体结构形态改变^[9]; c. ROS 水平增加^[7-8]; d. OXPHOS 水平改变^[7-8]。

运用生物信息学方法预测 CHCHD10 与线粒体 OXPHOS 有关, 并通过实验证明其参与线粒体呼吸链复合物 COX 活化^[10]。研究发现, CHCHD10 的点突变 S59L 会导致常染色体显性遗传病, 表现出运动神经元损伤、认知功能下降等症状^[5]。随后, CHCHD10 的功能研究备受关注, 而且更多与神经退行性疾病相关的 CHCHD10 基因突变被发

* 国家自然科学基金 (31971075, 32271200) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64888303, E-mail: zhuli@ibp.ac.cn

收稿日期: 2023-03-29, 接受日期: 2023-04-21

现。本文总结了近年来已发表的关于CHCHD10结构及其线粒体功能的文章, 为研究与CHCHD10相关的神经退行性疾病提供新思路。

1 CHCHD10蛋白的一级结构

CHCHD10基因位于人类第22号染色体, 其编

码的蛋白质由142个氨基酸组成。CHCHD10蛋白N端的前16个氨基酸是线粒体定位序列(mitochondrial targeting sequence, MTS), C端99~140位氨基酸组成其CHCH结构域(coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain), 其中C102和C132, C112和C122分别形成两对二硫键(图1)。

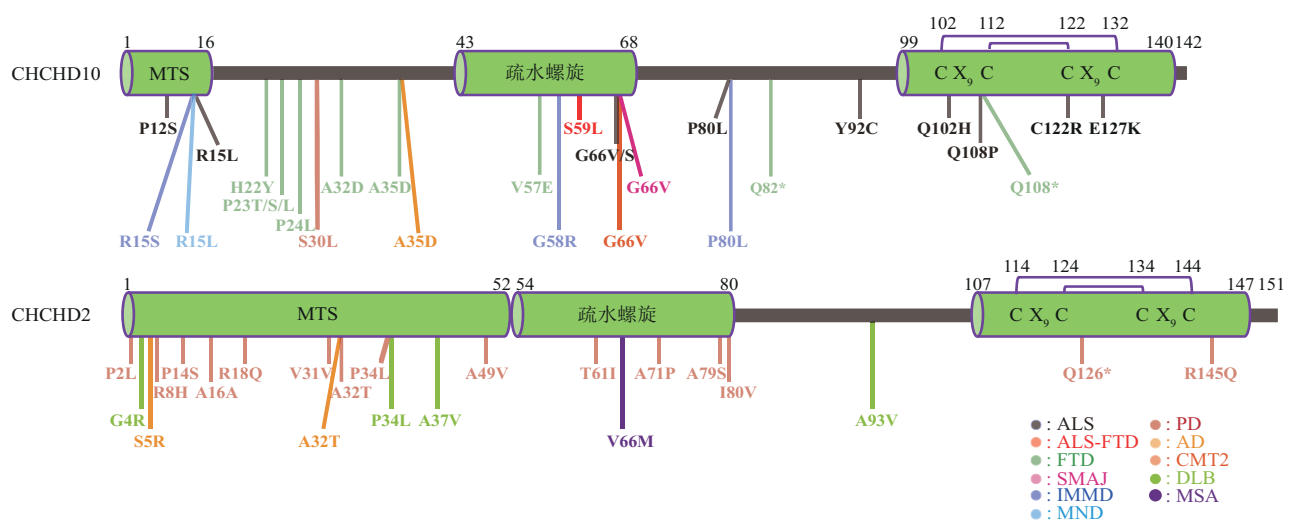


Fig. 1 Primary structures of CHCHD10 and CHCHD2 proteins as well as the amino acid positions of various neurodegenerative diseases associated mutations

图1 CHCHD10和CHCHD2蛋白的一级结构及其基因在FTD、ALS和AD等神经退行性疾病中突变位点对应的氨基酸位置 MTS代表线粒体定位序列; CX₉C代表CX₉C基序。在CHCHD10蛋白序列中, C102和C132形成一对二硫键, C112和C122形成另一对二硫键; 在CHCHD2蛋白序列中, C114和C144形成一对二硫键, C124和C134形成另一对二硫键。ALS: 肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis); FTD: 额颞叶痴呆 (frontotemporal dementia); SMAJ: 迟发性脊肌萎缩症 (late-onset spinal muscular atrophy); IMMD: 常染色体显性线粒体肌病 (autosomal dominant mitochondrial myopathy); MND: 常染色体显性运动神经元疾病 (autosomal dominant motor neuron disease); PD: 帕金森病 (Parkinson's disease); AD: 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease); CMT2: 2型腓骨肌萎缩症 (Charcot-Marie-Tooth 2); DLB: 路易小体痴呆 (Lewy body dementia); MSA: 多系统萎缩 (multiple system atrophy)。此示意图根据已发表的多篇文献绘制。

由于二硫键的存在, CHCHD10通过 Mia40/Erp1通路进入线粒体, 最终定位在线粒体膜间隙^[5] (图2)。在HeLa细胞中, 与对照相比, 敲减Mia40后, 进入线粒体的CHCHD10明显减少。过表达Mia40, ALS相关突变体Q108P-CHCHD10更多地进入线粒体^[11]。CHCH结构域在CHCHD10进入线粒体时发挥作用。删除CHCH结构域或表达CHCH结构域的疾病相关突变体(如Q108P、C122R),

进入线粒体的CHCHD10显著减少。然而, 删除CHCHD10的N端1~16这一段氨基酸组成的线粒体定位序列对其进入线粒体无明显影响^[11]。但是, 不同实验室的研究结果存在差异, Burstein等^[12]发现, 单独删除N端1~16氨基酸序列或者单独删除CHCH结构域, 均会影响CHCHD10进入线粒体。

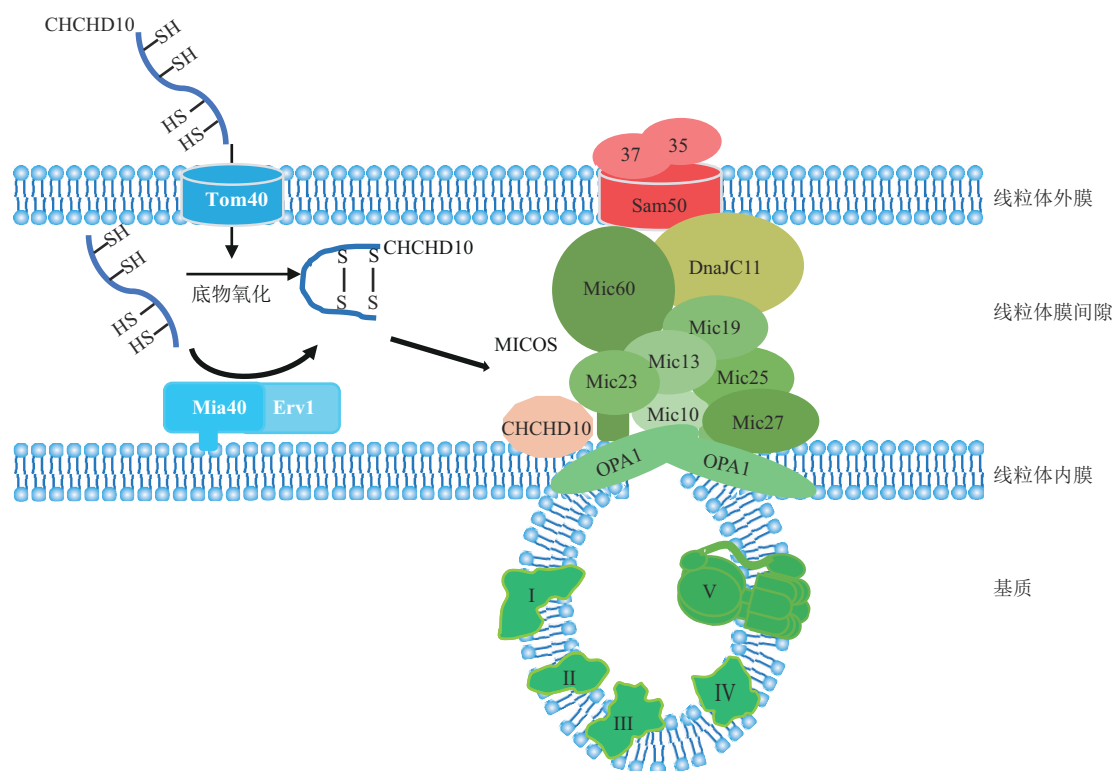


Fig. 2 CHCHD10 is imported into mitochondria through Mia40/Erv pathway and involved in the maintenance of the mitochondrial integrity

图2 CHCHD10通过Mia40/Erv途径进入线粒体并参与维持线粒体结构的完整性

MICOS: mitochondrial contact site and cristae organizing system; I~V分别代表线粒体呼吸链复合物I~V。根据文献绘制^[13-14]。

2 CHCHD10疾病相关突变体

2014年,科研人员首次在ALS-FTD患者的病理组织中筛选到CHCHD10的突变体S59L^[5]。随后更多与神经退行性疾病相关的CHCHD10突变体被报道,包括与ALS或ALS-FTD相关的p.P12S^[15]、p.R15L^[16-18]、p.S59L^[5, 19]、p.G66V^[16]、p.G66S^[11]、p.P80L^[18, 20]、p.Y92C^[21]、p.Q102H^[21]、p.Q108P^[11]、p.C122R^[11]、p.E127K^[11],与FTD相关的p.H22Y^[22]、p.P23S^[22]、p.P23L^[23]、p.P23T^[18]、p.A32D^[22]、p.A35D^[18]、p.V57E^[22]、p.Q82*^[15]、p.Q108*^[24];与常染色体显性运动神经元疾病(autosomal dominant motor neuron disease, MND)相关的p.R15L^[25],与常染色体显性线粒体肌病(autosomal dominant mitochondrial myopathy, IMMD)相关的p.R15S^[26]、p.G58R^[26]、p.P80L^[20],与迟发性脊肌萎缩症(late-onset spinal muscular atrophy, SMAJ)相关的p.G66V^[27],与2型腓骨

肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth 2, CMT2)相关的p.G66V^[28],与散发性PD相关的p.S30L^[29],与AD相关的p.A35D^[30],等等(图1)。

3 CHCHD10与同源基因CHCHD2

CHCHD2与CHCHD10同属于CX₂C蛋白家族,二者的蛋白质序列同源性高达58%^[31]。CHCHD10与CHCHD2存在相互作用,并且与线粒体相关蛋白形成分子质量约为220 ku的复合物^[12, 32]。通过受激发射损耗荧光显微术(stimulated emission depletion, STED)观察到CHCHD10与CHCHD2沿着线粒体形成轨道样结构^[33]。在线粒体中,CHCHD10作为支架蛋白,辅助ARG激酶(ABL proto-oncogene 2, nonreceptor tyrosine kinase, ABL2)调节CHCHD2的磷酸化,进而活化COX复合物^[31]。CHCHD2在细胞内可单独形成二聚体或与CHCHD10形成异二聚体,但是CHCHD10需与CHCHD2结合才能形成聚合物^[34]。

4 CHCHD10的功能

4.1 CHCHD10与线粒体结构完整性

MICOS (mitochondrial contact site and cristae organizing system) 复合物位于线粒体内膜上, 对线粒体嵴结构的形成和维持至关重要^[14], MICOS复合物组装发生障碍会影响线粒体嵴结构的完整性。CHCHD10主要定位在线粒体膜间隙中。免疫电镜显示CHCHD10在线粒体富集^[5, 34], 免疫共沉淀检测到CHCHD10与MICOS复合物的Mic60/mitofilin存在相互作用, 因此Genin等^[35]认为CHCHD10是MICOS复合物的组成部分。然而, 后续其他研究均未能重复出上述结果, 即未检测到CHCHD10与MICOS复合物中Mic60/mitofilin之间的相互作用。CHCHD10蛋白单体分子质量为14 ku。一维的天然胶(或非变性胶)聚丙烯酰胺凝胶电泳(blue native polyacrylamide gel electrophoresis, BN-PAGE)显示, CHCHD10在170 ku和220 ku与其他蛋白质形成复合物, 但在约600~720 ku处没有检测到CHCHD10存在^[32]。免疫共沉淀或二维SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-SDS-PAGE)共迁移实验, 均未检测到CHCHD10或CHCHD2与MICOS复合物的Mic60或Mic19存在相互作用。用Mic60或Mic19抗体进行免疫共沉淀, 然后进行质谱分析, 均未检测到CHCHD10或CHCHD2^[32]。在HEK293细胞中转染带FLAG标签的CHCHD10, 用FLAG抗体进行免疫共沉淀, 可检测到mitofilin, 但Mic60/mitofilin与IgG也存在相互作用。相反, 用Mic60/mitofilin抗体结合的免疫共沉淀实验, 未检测到CHCHD10。因此, Mic60/mitofilin与CHCHD10之间可能是非特异性的相互作用^[12, 33]。因此, CHCHD10是否是MICOS复合物的必要组成部分, 目前仍存在争议。

另外, CHCHD10对MICOS复合物的表达影响甚微。在ALS相关突变体G66V-CHCHD10患者的成纤维细胞中, MICOS复合物中mitofilin表达无明显改变^[36]。HeLa细胞中, 敲除CHCHD10或CHCHD2, MICOS复合物的组成部分Mic60/mitofilin、Mic19/CHCHD3和Mic25/CHCHD6均无明显改变。CHCHD2-CHCHD10双基因敲除后, MICOS复合物组成部分Mic60、Mic19/CHCHD3、Mic25/CHCHD6略微减少^[34]。

虽然CHCHD10是否属于MICOS复合物的组成部分存在争议, 但毫无疑问, CHCHD10对线粒

体形态结构的完整性维持尤为重要。CHCHD10缺失或者突变, 均会影响线粒体嵴结构的完整性。单独敲减CHCHD10或CHCHD10-CHCHD2双基因敲除后, 线粒体嵴结构出现异常^[33-34, 37]。在ALS相关突变体S59L-CHCHD10患者的成纤维细胞中, 出现线粒体嵴缺失、线粒体呼吸链缺乏、mtDNA损伤修复障碍等异常^[5, 35]。在HeLa细胞系中过表达ALS相关突变体S59L-CHCHD10, 或在S59L-CHCHD10的转基因小鼠模型中, 线粒体嵴均是受损的^[5, 38-40]。不过, 与上述结果不一致的是, 携带另外一种ALS相关突变G66V-CHCHD10的患者, 其成纤维细胞中的线粒体嵴结构无明显变化^[36]。目前的研究结果显示, CHCHD10参与维持细胞线粒体的形态结构, 但具体以何种方式参与其中尚不明确。

4.2 CHCHD10与线粒体分裂融合

线粒体通过不断的分裂(fission)和融合(fusion)以维持其正常结构和生理功能, 一旦分裂和融合失去平衡将直接导致线粒体形态改变和功能受损。ALS相关突变S59L-CHCHD10患者的成纤维细胞中, 转染线粒体mitoPAGFP质粒, 在405 nm激发光条件下连续观察60 min, 线粒体荧光强度减弱的速率与对照相比无明显差异, 提示S59L突变对线粒体融合无显著影响^[5, 35]。使用不同的方法进行实验, 得到的结果略有差异。在NIH-3T3细胞中, 同时转染野生型或突变体CHCHD10(如R15L、S59L)和mito-dendra2质粒, 48 h后在405 nm激发光条件下连续观察线粒体的荧光强度, 发现转染突变体的细胞中其荧光强度的改变速率显著慢于对照组, 提示线粒体融合受损^[41]。虽然CHCHD10突变对线粒体融合的影响因实验方法不同而存在差异, 但已报道的ALS相关突变(包括S59L、R15S、G58R、G66V)在患者样本、小鼠模型或细胞模型中, 均观察到线粒体发生片段化^[5, 26, 36-40]。线粒体动力蛋白样GTP酶(mitochondrial dynamin-like GTPase)OPA1(optic atrophy 1)是调节线粒体分裂和融合的重要蛋白质。在YME1样ATP酶(YME1 like 1 ATPase, YME1L1)和锌金属肽酶OMA1(OMA1 zinc metalloproteinase, OMA1)这两种蛋白水解酶的作用下, OPA1会形成长、短两种形式, L-OPA1参与线粒体融合过程, S-OPA1与线粒体分裂相关, L-OPA1与S-OPA1比例失衡将影响线粒体分裂和融合, 最终导致线粒体结构异常^[37, 40-41]。CHCHD10

突变体使线粒体片段化或许与OPA1水解相关,但是这一推测需要实验进一步证实。

4.3 CHCHD10与线粒体OXPHOS

OXPHOS主要发生在线粒体内膜上,由一系列蛋白质复合物完成。糖、脂、蛋白质这三大类营养物质进入有机体后,首先被消化为小分子物质,它们被吸收进入细胞后,通过各种酶促反应形成乙酰辅酶A等中间产物,然后进入线粒体三羧酸循环,最终生成CO₂和H₂O。在这一氧化过程中释放的能量,通过线粒体呼吸链复合物供给ADP与无机磷酸盐,合成能量分子ATP,体内95%的ATP都是通过线粒体的OXPHOS合成的^[42]。运用生物信息学方法预测,CHCHD10是核基因编码的线粒体蛋白,同COX19一样含有CHCH结构域,而COX19参与呼吸链复合物IV (complex IV)的形成,提示CHCHD10可能与complex IV有关^[10]。在HeLa细胞中,通过免疫荧光观察到CHCHD10与线粒体存在明显共定位,且CHCHD10主要定位在线粒体中,这一实验证实了预测的结果^[10]。而且,在HeLa细胞中敲减CHCHD10,经线粒体OXPHOS解偶联剂(carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, FCCP)或寡霉素处理,或用含半乳糖的培养基培养细胞,细胞ATP合成减少,Complex IV活性降低^[10]。随后更多的实验结果表明,CHCHD10与线粒体OXPHOS水平密切相关。CHCHD10基因缺失的细胞系或携带CHCHD10突变(如S59L、R15S、G58R)患者的成纤维细胞中,线粒体耗氧量减少,呼吸链复合物活性降低^[5, 11, 26, 32, 34-35, 43]。ALS相关突变R15L-CHCHD10患者的成纤维细胞中,线粒体OXPHOS水平与正常对照组相比显著降低。在突变患者的成纤维细胞中转染野生型CHCHD10,线粒体OXPHOS水平明显升高,可恢复到正常对照组的水平^[32]。而且,CHCHD10的ALS相关疾病突变患者细胞中的线粒体受损情况,与在细胞中敲除CHCHD10基因导致的结果一致^[32]。然而,CHCHD10不同疾病突变体对线粒体OXPHOS的影响略有不同,如在G66V突变体患者的肌肉组织活检样本中,COX-negative的纤维不超过总纤维数的1%^[27-28]。同样,G66V突变患者的成纤维细胞中,呼吸链复合物活性及ATP合成均无显著改变^[36]。上述报道中均未提及CHCHD10具体以何种方式参与调节线粒体OXPHOS。

在8%低氧情况下,CHCHD10可进入细胞核,

结合并活化转录抑制因子CXXC5 (CXXC finger protein 5),进而下调在启动子处含有ORE元件的基因表达,使COX4I2蛋白表达下降^[31]。在线粒体中,CHCHD10可直接与COX6B相互作用,也可作为支架蛋白,辅助ARG激酶调节CHCHD2磷酸化,进而活化COX^[31]。而CHCHD10的疾病相关突变体(如G66V、P80L)却失去支架作用,与CHCHD2的相互作用减弱,同时细胞耗氧量减少,ROS水平增加^[31]。此外,在细胞核中未能检测到CHCHD10突变体(G66V、P80L)与CXXC5相互作用,CHCHD10对ORE元件的抑制减弱,也会导致细胞耗氧量减少,ROS水平增加^[31]。

5 CHCHD10引起神经退行性疾病的致病机理

5.1 CHCHD10单倍剂量不足

CHCHD10既可作为线粒体结构的组成部分参与线粒体嵴结构完整性的维持,也可作为调节因子调控线粒体呼吸链复合物蛋白质的表达水平。CHCHD10本身的表达降低会影响线粒体的结构和功能。在体外细胞实验中,敲减CHCHD10导致线粒体嵴结构发生异常^[34, 37],线粒体呼吸作用减弱,呼吸链复合物活性降低,ATP合成减少^[10-11, 34]。向CHCHD10敲除的细胞中回补野生型CHCHD10,线粒体OXPHOS恢复至正常水平^[32]。在TDP-43转基因小鼠模型中,随着TDP-43诱导神经退行性疾病的病程加重,皮层中CHCHD10蛋白的表达量随之降低^[44]。在ALS患者的组织样本中,也发现CHCHD10的mRNA水平和蛋白质表达量与对照组相比显著降低^[44-45]。因此,CHCHD10单倍剂量不足或许与神经退行性疾病相关。

5.2 CHCHD10与CHCHD2均会发生突变

CHCHD10和CHCHD2均会发生突变,且与多种神经退行性疾病密切相关(图1),这些突变均会干扰二者之间的相互作用。CHCHD10的突变(如G66V、P80L)在线粒体中不再作为支架蛋白,辅助ARG激酶调节CHCHD2的磷酸化,线粒体耗氧量减少,ROS水平增加^[31]。在细胞系中表达CHCHD2的PD相关突变体(如T61I、R145Q、Q126*),免疫共沉淀检测到CHCHD2突变体与CHCHD10的相互作用明显降低^[33]。但在不同细胞系中得到的实验结果存在差异,如在HEK293T转染CHCHD2突变体T61I,免疫共沉淀检测到突变体与CHCHD10相互作用是增加的^[46]。CHCHD10

疾病突变体(如G58R、S59L、G66V)和CHCHD2疾病突变体T61I都能促进CHCHD2与CHCHD10形成异二聚体,导致蛋白聚集而损伤线粒体。因此,CHCHD2-CHCHD10异二聚体的形成可能是PD和/或ALS的新致病因素^[34]。

5.3 MICOS复合物完整性缺失

MICOS复合物的核心组成部分Mic60/mitofilin与线粒体内膜蛋白OPA1相互作用,共同调节线粒体嵴结构的完整性。虽然CHCHD10是否参与MICOS复合物的组成还有待进一步确认,但CHCHD10的缺失或突变确实会影响MICOS复合物的完整性。在HEK293T细胞中,干扰CHCHD10表达后,MICOS复合物的三个重要亚基mitofilin、Mic23和Mic19的蛋白质表达量与对照组相比显著降低。在细胞中敲减CHCHD10,使用非变性胶电泳(blue-native gel)检测线粒体mitofilin-OPA1二者形成复合物的多少,发现在720 ku分子质量处mitofilin-OPA1蛋白复合物减少了50%,另外在480 ku分子质量处mitofilin蛋白量同样减少了50%。在CHCHD10敲减细胞中,免疫共沉淀实验检测到mitofilin与OPA1之间的相互作用减弱,原位邻近连接技术(*in situ* proximity ligation assay, PLA)检测到二者之间的相互作用减少了70%。在细胞系中转染野生型CHCHD10,与未转染的细胞相比,mitofilin和OPA1之间的结合增加接近2倍^[41]。然而,CHCHD10疾病突变体(如R15L、S59L)会破坏mitofilin与OPA1结合,mitofilin-OPA1复合物下降了65%^[41]。在CHCHD10转基因小鼠的海马中得到了同样的结果,CHCHD10疾病突变体(如R15L、S59L)干扰mitofilin与OPA1之间的结合^[41]。因此,CHCHD10缺失或突变破坏mitofilin-OPA1复合物形成,影响MICOS复合物的组装,最终破坏线粒体嵴结构的完整性。

5.4 OMA1过度激活

锌金属肽酶OMA1是ATP酶依赖的锌代谢酶,具有多个跨膜结构域,其锌指结构域位于线粒体内膜上^[47]。OMA1活化与线粒体膜电位的改变或线粒体应激有关^[37]。OMA1主要通过两种方式参与调节线粒体的形态结构。一种方式是OPA1水解。在线粒体应激或者参与线粒体质量控制的蛋白酶(如YME1L、AFG3L2、SPG7)功能缺失的情况下,OMA1被激活^[37],将L-OPA1水解成S-OPA1,L-OPA1/S-OPA1比例失衡使线粒体分裂-融合发生

改变,导致线粒体嵴的改变,表现为线粒体片段化^[37]。在CHCHD2-CHCHD10双基因敲除小鼠的原纤维细胞中,线粒体嵴呈异常的环形结构,而且,与对照小鼠相比,线粒体嵴的数目和面积均显著降低^[37]。这种异常的线粒体结构与在MEF细胞中将OPA1敲除后的线粒体结构相似。在正常生理状态下,OPA1被蛋白酶YME1和OMA1水解形成3条(c/d/e)S-OPA1蛋白条带。蛋白质免疫印迹实验证明,CHCHD2-CHCHD10双基因敲除小鼠的原纤维细胞中OMA1蛋白酶被激活,OMA1水解OPA1形成S-OPA1(c/e)的比例增加^[37]。在HEK293细胞中,将CHCHD2、CHCHD10、OMA1三者同时敲除,线粒体嵴密度恢复至正常水平^[37]。CHCHD10突变导致的线粒体片段化依赖于OMA1水解OPA1形成S-OPA1的过程。比如,使用CHCHD10突变体G58R转染细胞,OMA1即被激活,线粒体发生片段化。在转染G58R-CHCHD10的细胞中同时敲除OMA1,线粒体片段化程度降低^[37]。因此,CHCHD2和CHCHD10缺失或突变导致线粒体嵴结构异常与OMA1激活、OPA1水解增加有关。OMA1参与调节线粒体形态结构的另一种方式是线粒体整体应激反应(mitochondrial integrated stress response, mtISR)激活。在G58R-CHCHD10蛋白异常聚集或CHCHD10基因单倍剂量不足时,线粒体应激使OMA1激活而切割DELE1(DAP3-binding cell death enhancer 1),切割后的DELE1释放到细胞质中与转录起始因子激酶HRI(eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 1)相互作用,使真核细胞转录起始因子2(eukaryotic initiation factor 2 alpha, eIF2 α)磷酸化并进入细胞核,导致mtISR相关基因(包括ATF4、ATF5、CHOP)的mRNA上调,从而激活mtISR通路^[48]。

5.5 线粒体能量代谢紊乱

CHCHD10突变导致线粒体能量代谢发生障碍。在ALS疾病相关突变S59L-CHCHD10的转基因小鼠模型中,mtISR调节的mTORC1被激活^[39],mtISR涉及到的一碳(1C)代谢和色氨酸代谢升高,线粒体OXPHOS发生障碍^[39, 49]。mtISR激活与S59L-CHCHD10同CHCHD2形成异二聚体有关,CHCHD10突变体与CHCHD2形成的异二聚体激活OMA1,而OMA1的活化使mtISR激活。长期mtISR激活诱导的代谢重排导致氨基乙磺酸耗竭,核苷酸代谢失衡,出现mtDNA耗竭,最终引起心

衰^[49]。半乳糖处理 R15L-CHCHD10 突变患者的成纤维细胞, 1C 代谢发生异常, 然而 mTORC1 下调^[50]。CHCHD2-CHCHD10 双基因敲除也能激活 mtISR, 并导致心肌病^[37]。CHCHD2-CHCHD10 双基因敲除小鼠表现出的能量代谢功能缺失和 CHCHD10 的 G58R 或 S59L 转基因小鼠的毒性获得 (gain of toxicity) 表型, 均与 mtISR 密切相关^[37, 39, 48-49]。

5.6 PINK1-Parkin 过度激活

PINK1 通过招募 Parkin 到损伤的线粒体从而诱导线粒体自噬。正常情况下, PINK1 进入线粒体膜间隙内会被线粒体 PARL 蛋白 (presenilin-associated rhomboid-like) 切割, 然后释放到细胞质中, 最终被泛素蛋白酶体降解。当线粒体受损时, PINK1 在线粒体外膜上积累并被磷酸化, 激活的 PINK1 招募 Parkin^[51]。随后 Parkin 使线粒体外膜上的电压依赖的阴离子通道 (voltage dependent anion channel 1, VDAC1) 和线粒体融合蛋白 1/2 (mitofusin 1/2, Mfn1/2) 发生泛素化, 诱导线粒体自噬^[52]。HeLa 细胞中转染突变体 S59L-CHCHD10, 线粒体的 PINK1-Parkin 表达量与对照组相比显著升高, 线粒体发生片段化。使用 PINK1 抑制剂处理细胞, 抑制 PINK1 活性, 可挽回 S59L-CHCHD10 诱导的线粒体损伤。在 S59L-CHCHD10 突变患者成纤维细胞中抑制 PINK1, 可挽回 S59L-CHCHD10 突变导致的线粒体片段化^[38]。在 S59L-CHCHD10 转基因果蝇模型中, 线粒体长度减小, ATP 合成降低。在此模型中抑制 PINK1 的表达后, 线粒体的 OXPHOS 增加, ATP 合成增加, 提示 S59L-CHCHD10 突变体可能是通过 PINK1-Parkin 自噬途径诱导细胞毒性; 而抑制 PINK1 活性可部分挽救 S59L-CHCHD10 造成的线粒体损伤^[38]。因此, 在 CHCHD10 突变体中, PINK1-Parkin 过度激活也会导致线粒体损伤及细胞毒性。

5.7 TDP-43 在胞质和线粒体中异常积累

TDP-43 是 RNA 结合蛋白 (RNA binding protein, RBP)。在正常情况下, TDP-43 蛋白定位于细胞核, 参与多种 RNA 代谢与加工过程, 包括 RNA 转录调控、RNA 前体剪接、RNA 稳定性维持, 以及 miRNA 等非编码 RNA 的形成等^[53]。在 FTL D、ALS 和部分 AD 患者的病理组织中, TDP-43 在胞质中异常积累并形成包涵体, 这是 TDP-43 蛋白病的主要病理学特征^[54-55]。在病理情况下, TDP-43 可从细胞核转移到细胞质, 形成聚集体,

并在某些因子的帮助下进入线粒体, 导致线粒体嵴减少、膜电位降低、ROS 水平升高、ATP 产生下降, 最终引起神经元死亡^[56]。研究发现, CHCHD10 与 TDP-43 发生相互作用。在 TDP-43 转基因小鼠和 ALS 患者的病理样本中, CHCHD10 表达量下降^[41, 44]。在细胞系中过表达 TDP-43 后, CHCHD10 进入细胞核^[57]。在 HeLa 细胞中, 将 CHCHD10 敲除或者转染 CHCHD10 的突变体, TDP-43 会在细胞质中聚集, 并进入线粒体^[57]。与对照组相比, TDP-43 与 S59L-CHCHD10 突变体相互作用增强, CHCHD10 突变体导致 TDP-43 蛋白形成不溶性的蛋白质聚集体, 使其更多地进入线粒体, 造成线粒体损伤^[38]。根据曼德斯重叠系数 (Mander's overlap coefficient, MOC) 计算 FTL D 和 AD 患者脑组织样本中磷酸化的 TDP-43 (p-TDP-43) 与 CHCHD10 的共定位系数, 分别是 0.75 和 0.84, 在 FTL D 与 AD 之间没有显著差异。相反, CHCHD10 与磷酸化的 TDP-43 共定位系数为 0.18, 表明 18% 的 CHCHD10 与 p-TDP-43 存在共定位^[58]。FTL D-TDP 患者脑组织样本经过 RIPA 缓冲液裂解后, 检测可溶解和不可溶解的 TDP-43、p-TDP-43 和 CHCHD10 的含量, 结果显示 FTL D-TDP 样本中不溶性的 TDP-43、p-TDP-43 和 CHCHD10 分别是非患病对照组的 2.1 倍、2.4 倍和 1.7 倍, 皮尔森相关性系数 (Pearson's correlation coefficient, PCC) 分析显示, 不溶性 TDP-43 与不溶性的 CHCHD10 具有明显相关性 ($R=0.6407$)^[58]。在 TDP-43 转基因小鼠背景下, 野生型 CHCHD10 使 TDP-43 磷酸化水平降低并抑制 TDP-43 聚集, 减轻 TDP-43 造成的病理学特征; 而突变型 CHCHD10 可促进 TDP-43 磷酸化, 导致其聚集增加^[38, 58]。在 ALS 相关突变 R15L-CHCHD10 患者的脊髓解剖样本中, CHCHD10 大量聚集, 但未发现 CHCHD10 聚集体与 TDP-43 有明显共定位^[59]。因此, TDP-43 错误定位并进入线粒体造成线粒体损伤可能也是 CHCHD10 相关疾病的致病因素。

6 展 望

CHCHD10 的功能研究均从疾病角度出发, 分析其突变体对线粒体结构和功能造成的影响, 而对其正常生理功能以及 CHCHD10 蛋白本身性质的研究甚少。目前 CHCHD10 的生理功能主要表现在两方面。a. CHCHD10 是 MICOS 复合物的组成部分, 但是此观点仍然存在争议。首先, MICOS 复合物

的具体组成部分至今仍未被完全鉴定。其次, 所有结果均以蛋白质之间的相互作用作为实验手段, 还没有其他方法证明CHCHD10是否属于MICOS复合物的组成部分。目前亟待发展新的实验方法进行解析, 或者筛选出MICOS复合物新的组成蛋白, 进一步证明CHCHD10是否与MICOS复合物有关。

b. 在缺氧条件下, CHCHD10进入细胞核中, 通过CXXC5与ORE结构域结合抑制COX4I2的基因表达。使用不同细胞系进行实验, 得到的实验结果也存在差异, 说明选择合适的模型对于CHCHD10的功能研究尤为重要。CHCHD10是线粒体蛋白, 虽然疾病相关突变对其进入线粒体影响不大, 但是表达CHCHD10突变体的细胞, 其线粒体嵴却表现出非常明显的异常。因此, 研究CHCHD10蛋白的结构和功能, 以及疾病相关突变体对其结构和功能的影响, 不仅有助于揭示CHCHD10在维持线粒体嵴结构和稳定性中的重要作用, 还将为理解CHCHD10突变在相关神经退行性疾病中的致病机理提供重要线索。

参 考 文 献

- [1] Rahman J, Rahman S. Mitochondrial medicine in the omics era. *Lancet*, 2018, **391**(10139): 2560-2574
- [2] Morgenstern M, Peikert C D, Lubbert P, *et al.* Quantitative high-confidence human mitochondrial proteome and its dynamics in cellular context. *Cell Metab*, 2021, **33**(12): 2464-2483.e18
- [3] Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, **11**(9): 655-667
- [4] Ryan M T, Hoogenraad N J. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem*, 2007, **76**: 701-722
- [5] Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chaussonot A, *et al.* A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain*, 2014, **137**(8): 2329-2345
- [6] Johri A, Beal M F. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, **342**(3): 619-630
- [7] Smith R A, Hartley R C, Cocheme H M, *et al.* Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 2012, **33**(6): 341-352
- [8] Logan A, Murphy M P. Using chemical biology to assess and modulate mitochondria: progress and challenges. *Interface Focus*, 2017, **7**(2): 20160151
- [9] Wai T, Langer T. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, **27**(2): 105-117
- [10] Martherus R S, Sluiter W, Timmer E D, *et al.* Functional annotation of heart enriched mitochondrial genes GBAS and CHCHD10 through guilt by association. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **402**(2): 203-208
- [11] Lehmer C, Schludi M H, Ransom L, *et al.* A novel CHCHD10 mutation implicates a Mia40-dependent mitochondrial import deficit in ALS. *EMBO Mol Med*, 2018, **10**(6): e8558
- [12] Burstein S R, Valsecchi F, Kawamata H, *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies of the ALS-FTLD protein CHCHD10 reveal novel mitochondrial topology and protein interactions. *Hum Mol Genet*, 2018, **27**(1): 160-177
- [13] Modjtahedi N, Tokatlidis K, Dessen P, *et al.* Mitochondrial proteins containing coiled-coil-helix-coiled-coil-helix (CHCH) domains in health and disease. *Trends Biochem Sci*, 2016, **41**(3): 245-260
- [14] Kozjak-Pavlovic V. The MICOS complex of human mitochondria. *Cell Tissue Res*, 2017, **367**(1): 83-93
- [15] Dols-Icardo O, Nebot I, Gorostidi A, *et al.* Analysis of the CHCHD10 gene in patients with frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis from Spain. *Brain*, 2015, **138**(12): e400
- [16] Muller K, Andersen P M, Hubers A, *et al.* Two novel mutations in conserved codons indicate that CHCHD10 is a gene associated with motor neuron disease. *Brain*, 2014, **137**(12): e309
- [17] Johnson J O, Glynn S M, Gibbs J R, *et al.* Mutations in the CHCHD10 gene are a common cause of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 2014, **137**(12): e311
- [18] Zhang M, Xi Z, Zinman L, *et al.* Mutation analysis of CHCHD10 in different neurodegenerative diseases. *Brain*, 2015, **138**(9): e380
- [19] Chaussonot A, Le Ber I, Ait-El-Mkadem S, *et al.* Screening of CHCHD10 in a French cohort confirms the involvement of this gene in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol Aging*, 2014, **35**(12): 2884. e1-2884.e4
- [20] Ronchi D, Riboldi G, Del Bo R, *et al.* CHCHD10 mutations in Italian patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 2015, **138**(8): e372
- [21] Zhou Q, Chen Y, Wei Q, *et al.* Mutation screening of the CHCHD10 gene in Chinese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol*, 2017, **54**(5): 3189-3194
- [22] Jiao B, Xiao T, Hou L, *et al.* High prevalence of CHCHD10 mutation in patients with frontotemporal dementia from China. *Brain*, 2016, **139**(4): e21
- [23] Shen S, He J, Tang L, *et al.* CHCHD10 mutations in patients with amyotrophic lateral sclerosis in mainland China. *Neurobiol Aging*, 2017, **54**: 214.e7-214.e10
- [24] Perrone F, Nguyen H P, Van Mossevelde S, *et al.* Investigating the role of ALS genes CHCHD10 and TUBA4A in Belgian FTD-ALS spectrum patients. *Neurobiol Aging*, 2017, **51**: 177.e9-177.e16
- [25] Kurzwelly D, Kruger S, Biskup S, *et al.* A distinct clinical phenotype in a German kindred with motor neuron disease carrying a CHCHD10 mutation. *Brain*, 2015, **138**(9): e376
- [26] Ajroud-Driss S, Fecto F, Ajroud K, *et al.* Mutation in the novel nuclear-encoded mitochondrial protein CHCHD10 in a family with autosomal dominant mitochondrial myopathy. *Neurogenetics*, 2015, **16**(1): 1-9
- [27] Penttilä S, Jokela M, Bouquin H, *et al.* Late onset spinal motor neuropathy is caused by mutation in CHCHD10. *Ann Neurol*, 2015, **77**(1): 163-172
- [28] Auranen M, Ylikallio E, Shcherbii M, *et al.* CHCHD10 variant p.(Gly66Val) causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurol*

- Genet, 2015, **1**(1): e1
- [29] Zhou X, Liu Z, Guo J, *et al.* Identification of CHCHD10 variants in Chinese patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 2018, **47**: 96-97
- [30] Xiao T, Jiao B, Zhang W, *et al.* Identification of CHCHD10 Mutation in Chinese patients with Alzheimer disease. *Mol Neurobiol*, 2017, **54**(7): 5243-5247
- [31] Purandare N, Somayajulu M, Huttemann M, *et al.* The cellular stress proteins CHCHD10 and MNRR1 (CHCHD2): partners in mitochondrial and nuclear function and dysfunction. *J Biol Chem*, 2018, **293**(17): 6517-6529
- [32] Straub I R, Janer A, Weraarpachai W, *et al.* Loss of CHCHD10-CHCHD2 complexes required for respiration underlies the pathogenicity of a CHCHD10 mutation in ALS. *Hum Mol Genet*, 2018, **27**(1): 178-189
- [33] Zhou W, Ma D, Sun A X, *et al.* PD-linked CHCHD2 mutations impair CHCHD10 and MICOS complex leading to mitochondrial dysfunction. *Hum Mol Genet*, 2019, **28**(7): 1100-1116
- [34] Huang X, Wu B P, Nguyen D, *et al.* CHCHD2 accumulates in distressed mitochondria and facilitates oligomerization of CHCHD10. *Hum Mol Genet*, 2018, **27**(22): 3881-3900
- [35] Genin E C, Plutino M, Bannwarth S, *et al.* CHCHD10 mutations promote loss of mitochondrial cristae junctions with impaired mitochondrial genome maintenance and inhibition of apoptosis. *EMBO Mol Med*, 2016, **8**(1): 58-72
- [36] Genin E C, Bannwarth S, Lespinasse F, *et al.* Loss of MICOS complex integrity and mitochondrial damage, but not TDP-43 mitochondrial localisation, are likely associated with severity of CHCHD10-related diseases. *Neurobiol Dis*, 2018, **119**: 159-171
- [37] Liu Y T, Huang X, Nguyen D, *et al.* Loss of CHCHD2 and CHCHD10 activates OMA1 peptidase to disrupt mitochondrial cristae phenocopying patient mutations. *Hum Mol Genet*, 2020, **29**(9): 1547-1567
- [38] Baek M, Choe Y J, Bannwarth S, *et al.* TDP-43 and PINK1 mediate CHCHD10(S59L) mutation-induced defects in drosophila and *in vitro*. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 1924
- [39] Anderson C J, Bredvik K, Burstein S R, *et al.* ALS/FTD mutant CHCHD10 mice reveal a tissue-specific toxic gain-of-function and mitochondrial stress response. *Acta Neuropathol*, 2019, **138**(1): 103-121
- [40] Genin E C, Bannwarth S, Ropert B, *et al.* CHCHD10 and SLP2 control the stability of the PHB complex: a key factor for motor neuron viability. *Brain*, 2022, **145**(10): 3415-3430
- [41] Liu T, Woo J A, Bukhari M Z, *et al.* CHCHD10-regulated OPA1-mitofilin complex mediates TDP-43-induced mitochondrial phenotypes associated with frontotemporal dementia. *FASEB J*, 2020, **34**(6): 8493-8509
- [42] Wilson D F, Harrison D K, Vinogradov S A. Oxygen, pH, and mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Appl Physiol*, 2012, **113**(12): 1838-1845
- [43] Meng H, Yamashita C, Shiba-Fukushima K, *et al.* Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c. *Nat Commun*, 2017, **8**: 15500
- [44] Mccann E P, Fifita J A, Grima N, *et al.* Genetic and immunopathological analysis of CHCHD10 in Australian amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia and transgenic TDP-43 mice. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2020, **91**(2): 162-171
- [45] Brockmann S J, Freischmidt A, Oeckl P, *et al.* CHCHD10 mutations p. R15L and p. G66V cause motoneuron disease by haploinsufficiency. *Human Mol Genet*, 2018, **27**(4): 706-715
- [46] Mao C, Wang H, Luo H, *et al.* CHCHD10 is involved in the development of Parkinson's disease caused by CHCHD2 loss-of-function mutation p.T61I. *Neurobiol Aging*, 2019, **75**: 38-41
- [47] Hu Y, Hu X, Li D, *et al.* The APC/C(FZY-1/Cdc20) complex coordinates with OMA-1 to regulate the oocyte-to-embryo transition in *Caenorhabditis elegans*. *Front Cell Dev Biol*, 2021, **9**: 749654
- [48] Shammam M K, Huang X, Wu B P, *et al.* OMA1 mediates local and global stress responses against protein misfolding in CHCHD10 mitochondrial myopathy. *J Clin Invest*, 2022, **132**(14): e157504
- [49] Sayles N M, Southwell N, Mcavoy K, *et al.* Mutant CHCHD10 causes an extensive metabolic rewiring that precedes OXPHOS dysfunction in a murine model of mitochondrial cardiomyopathy. *Cell Rep*, 2022, **38**(10): 110475
- [50] Straub I R, Weraarpachai W, Shoubridge E A. Multi-OMICS study of a CHCHD10 variant causing ALS demonstrates metabolic rewiring and activation of endoplasmic reticulum and mitochondrial unfolded protein responses. *Hum Mol Genet*, 2021, **30**(8): 687-705
- [51] Nguyen T N, Padman B S, Lazarou M. Deciphering the molecular signals of PINK1/Parkin mitophagy. *Trends Cell Biol*, 2016, **26**(10): 733-744
- [52] Song Y, Zhou Y, Zhou X. The role of mitophagy in innate immune responses triggered by mitochondrial stress. *Cell Commun Signal*, 2020, **18**(1): 186
- [53] Candia R F, Cohen L S, Morozova V, *et al.* Importin-mediated pathological Tau nuclear translocation causes disruption of the nuclear lamina, TDP-43 mislocalization and cell death. *Front Mol Neurosci*, 2022, **15**: 888420
- [54] Neumann M, Sampathu D M, Kwong L K, *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 2006, **314**(5796): 130-133
- [55] Amador-Ortiz C, Lin W L, Ahmed Z, *et al.* TDP-43 immunoreactivity in hippocampal sclerosis and Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 2007, **61**(5): 435-445
- [56] Wang P, Deng J, Dong J, *et al.* TDP-43 induces mitochondrial damage and activates the mitochondrial unfolded protein response. *PLoS Genet*, 2019, **15**(5): e1007947
- [57] Woo J A, Liu T, Trotter C, *et al.* Loss of function CHCHD10 mutations in cytoplasmic TDP-43 accumulation and synaptic integrity. *Nat Commun*, 2017, **8**: 15558
- [58] Liu T, Woo J A, Bukhari M Z, *et al.* Modulation of synaptic plasticity, motor unit physiology, and TDP-43 pathology by CHCHD10. *Acta Neuropathol Commun*, 2022, **10**(1): 95
- [59] Keith J L, Swinkin E, Gao A, *et al.* Neuropathologic description of CHCHD10 mutated amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Genet*, 2020, **6**(1): e394

Mitochondrial CHCHD10 and Neurodegenerative Diseases*

WANG Jing, ZHU Li**

(State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract With the aging population increasing worldwide, neurodegenerative diseases are becoming a major public health crisis. Neurodegenerative diseases are a group of neurologic disorders caused by the loss of the structure and function of neurons, mainly manifested by degenerative changes or death of neurons in specific regions. Neurodegenerative diseases are often classified into two categories: one affecting motor function, such as Parkinson's disease (PD), Huntington's disease (HD), and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and the other affecting cognitive function, such as Alzheimer's disease (AD) and frontotemporal dementia (FTD). Mitochondrial impairment manifesting in the affected neurons is a common feature in these neurodegenerative diseases. The coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10 (CHCHD10) is a mitochondrial protein encoded by the nuclear genome, mainly located in the mitochondrial intermembrane space. CHCHD10 plays a critical role in the maintenance of structural integrity and function of mitochondria. Various CHCHD10 gene mutations have been identified in different neurodegenerative diseases, including FTD, ALS, PD, AD, *etc.* Mutations of the CHCHD10 gene or loss of its function can lead to the loss of mitochondrial cristae structure and abnormal mitochondrial function. However, the specific function of the CHCHD10 protein and the mechanism underlying mitochondrial damage caused by its gene mutations remain unclear. Here we review the recent advances in the structure and mitochondrial function of CHCHD10 and discuss the mechanism of mitochondrial dysfunction induced by gene mutations or functional loss of CHCHD10. Investigating the role of CHCHD10 in maintaining mitochondrial function will help us to understand the pathological mechanism of neurodegenerative diseases and explore potential therapeutic interventions for these devastating diseases.

Key words neurodegenerative diseases, CHCHD10, CHCHD2, MICOS complex, OMA1, TDP-43

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0107

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31971075, 32271200).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-64888303, E-mail: zhuli@ibp.ac.cn

Received: March 29, 2023 Accepted: April 21, 2023