



# 肌肉细胞内质网-质膜互作与CRAC信号通路

孙傲敏<sup>1</sup>, 陈一兰<sup>1</sup>, 荆吉<sup>2</sup>, 王友军<sup>1,3\*</sup>

1. 北京师范大学生命科学院遗传与发育生物所, 抗性基因资源与分子发育北京市重点实验室, 北京 100875;

2. 中国科学院肿瘤与基础医学研究所, 杭州 310000;

3. 北京师范大学生命科学院细胞所, 细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875

\* 联系人: E-mail: [wyoujun@bnu.edu.cn](mailto:wyoujun@bnu.edu.cn)

收稿日期: 2021-05-17; 接受日期: 2021-07-23; 网络版发表日期: 2021-10-26

**摘要** 细胞通过内质网(endoplasmic reticulum, ER)-质膜(plasma membrane, PM)之间的膜接触点(简称为ER-PM连接区)进行脂类传递和钙信号转导。该连接区占据神经元胞体处质膜表面积的12%, 且是肌肉细胞兴奋-收缩偶联所必须的。当前对神经元中该区的动态特征及生物学功能还所知甚少, 对兴奋性细胞中该区中的蛋白质图谱也了解得比较有限。而作为连接区内介导ER-PM互作的蛋白质机器, 钙池释放钙通道钙释放激活钙(calcium release-activated calcium, CRAC)通道在兴奋性细胞中的调控、生理和病理作用也有待进一步阐明。近年来, 超分辨成像, 光遗传学技术及蛋白邻近标记技术的出现, 为回答这些问题提供了有力的工具。本文因而总结了ER-PM连接区的动态观测与蛋白质组学鉴定, 及肌肉细胞的CRAC通路等研究方向上的最新进展, 并对后续相关研究进行了初步的展望。

**关键词** 内质网, 质膜, 膜接触点, 钙释放激活钙通道, 邻近标记, 光遗传学

真核细胞的一个重要特征是具有多种膜性细胞器<sup>[1]</sup>, 如内质网(endoplasmic reticulum, ER)<sup>[2]</sup>、高尔基体、线粒体、溶酶体。为应对胞内外刺激以维持生命活动的正常进行, 细胞需要通过细胞器互作来进行物质和信息的交流, 进而协调各个细胞器所介导的各种生物学过程。细胞器及质膜之间的互作是通过它们之间存在的10~30 nm的间隙实现的。而这些介导细胞器互作的间隙部位被称为膜接触点(membrane contact site, MCS)<sup>[1]</sup>。虽然最早有关细胞器互作的报道可以追溯到20世纪50年代<sup>[3]</sup>, 但由于技术手段的限制, 人们对其结构、蛋白组成和功能的认知都比较有限, 甚至曾

普遍认为两个细胞器之间的交流是通过胞浆蛋白实现的。借助新近发展出来的基因编辑、光遗传、超分辨, 及邻近标记等新型技术手段, 人们对各种膜接触点和它们所涉及的生理功能开始有了更深入的了解, 细胞器互作及其功能也逐渐成为热点研究领域。

细胞器互作最常涉及的一个细胞器是ER。ER负责细胞内蛋白质和脂质的合成以及蛋白质的折叠, 同时又是动物细胞内最主要的钙库。ER是动物细胞中最大的膜系统, 从核包膜延伸至细胞边缘, 并与多种细胞器和细胞质膜发生互作, 当前了解最多的是ER与质膜(plasma membrane, PM), 核膜和线粒体之间膜接触

引用格式: 孙傲敏, 陈一兰, 荆吉, 等. 肌肉细胞内质网-质膜互作与CRAC信号通路. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 17–27

Sun A M, Chen Y L, Jing J, et al. ER-PM contacts and CRAC signaling in muscle cells (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 17–27, doi: [10.1360/SSV-2021-0143](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0143)

点<sup>[4]</sup>. 其中内质网-质膜连接区是细胞响应胞内外刺激关键部位, 目前已知的发生在该膜接触点处的生物学过程主要是脂类转运和钙信号转导等<sup>[5]</sup>.

CRAC通道是一种典型的介导ER和PM互作的蛋白质机器. 经典的CRAC通道由ER膜上的开关元件STIM1(stromal interaction molecule 1)和PM上的钙通道亚基Orai1组装而成. STIM1钙感受器是内质网上的单次跨膜蛋白, 其N端位于内质网一侧的部分含有能感知钙离子(calcium ion,  $\text{Ca}^{2+}$ )水平变化的结构域, 而其位于胞浆的C端区域则含有能与Orai1结合的结构域. 而Orai1是位于细胞质膜上的一种四次跨膜蛋白, 以六聚体的形式发挥作用<sup>[6]</sup>. 当细胞膜上的G蛋白偶联受体或络氨酸激酶受体被激活后, 会通过诱导产生三磷酸肌醇(inositol 1,4,5-triphosphate,  $\text{IP}_3$ ), 后者结合并激活内质网上的 $\text{IP}_3$ 受体, 引发内质网中的 $\text{Ca}^{2+}$ 的释放, 造成内质网 $\text{Ca}^{2+}$ 水平的降低,  $\text{Ca}^{2+}$ 从STIM1的钙结合域上解离. STIM1因而发生构象的变化、寡聚化, 迁移至内质网膜与质膜连接区, 结合并激活质膜上的Orai1通道亚基, 引发胞外的 $\text{Ca}^{2+}$ 内流, 该过程即SOCE(store-operated calcium entry). 经由SOCE进入细胞的 $\text{Ca}^{2+}$ 最终会使内质网钙库重新充满, 细胞恢复静息状态并维持其正常的钙稳态<sup>[6]</sup>. SOCE是几乎所有非兴奋细胞中引发钙内流的主要机制, 是细胞内钙信号的重要来源, 调节诸多生理功能, 如免疫反应、分泌、细胞迁移和组织发育等<sup>[6]</sup>. 越来越多的证据表明, SOCE在包括神经元、骨骼肌细胞和心肌细胞在内的兴奋细胞中也普遍存在并发挥重要的功能<sup>[7-10]</sup>. CRAC信号与神经元的功能请参看另一篇综述<sup>[11]</sup>, 本文将着重讨论肌肉细胞中的内质网-质膜连接区及其中CRAC通路.

## 1 肌肉细胞内质网-质膜连接区中的CRAC信号及功能

### 1.1 肌肉细胞内质网-质膜连接区的发现

膜接触点结构是在肌肉细胞中被首次发现的. 1957年, 人们首次通过电子显微镜(电镜, electron microscope, EM)观察到肌肉细胞的内质网与质膜间存在紧密接触的区域, 并将这些区域命名为心肌细胞的二联管区(dyads)或骨骼肌的三联管区(triads)<sup>[12]</sup>. 这些特化的结构实际上就是内质网-质膜之间的膜接触点. 随后几年在其他动物细胞, 如神经元细胞<sup>[13,14]</sup>、

小鼠成纤维细胞<sup>[15]</sup>、非洲爪蟾卵母细胞<sup>[16]</sup>等中, 也陆续发现了类似结构的存在. 在不同细胞中对ER-PM之间接触点的命名有所不同, 如在神经元细胞中被称为SSC's(subsurface cisterns), 在酵母细胞中被称为cortical ER<sup>[17]</sup>, 在果蝇光感受细胞中被称为SRC(subrhabdomeric cisternae)<sup>[18]</sup>, 而在植物细胞中则被称为EPCS(ER-PM contact sites)<sup>[19,20]</sup>等. 为了叙述方便, 在本文中称之为内质网-质膜连接区(ER-PM junctions).

### 1.2 肌肉细胞的钙信号通路

心肌细胞的二联管区或骨骼肌细胞的三联管区为肌肉细胞内特化的ER-PM连接区, 由肌肉细胞的质膜深度内陷形成T管(transverse tubules), 与交界处的肌质网(junctional sarcoplasmic reticulum, jSR)所组成. 该连接区是介导肌肉细胞中特有的兴奋-收缩偶联(excitation-contraction coupling, ECC)的关键部位. 肌肉细胞肌膜表面发生去极化后, 位T管上的电压门控L型钙离子通道( $\text{Ca}_v$ )发生构象变化, 直接或间接的激活位于jSR上的兰尼碱受体(ryanodine receptors, RYRs). 后者介导由肌质网向胞浆的钙释放, 最终引起肌节的收缩<sup>[21]</sup>.

上述兴奋收缩偶联所引发的钙释放会导致肌质网钙水平下降, 理论上细胞也需要某种机制, 如SOCE, 引发钙内流, 进入胞浆的 $\text{Ca}^{2+}$ 通过肌质网上的钙泵( $\text{SR Ca}^{2+}$  ATPase, SERCA)泵入肌质网, 来反馈性地恢复肌质网钙水平. 的确, 几个研究团队分别在分离的小鼠完整趾长伸肌<sup>[9]</sup>、啮齿动物胚胎心肌细胞<sup>[22]</sup>、新生鼠心肌细胞<sup>[8]</sup>及成年大鼠心肌细胞<sup>[23]</sup>中检测到了SOCE. 后续的研究工作则在肌肉细胞中证实了介导SOCE的STIM1和Orai1这两个CRAC通道元件的存在<sup>[24,25]</sup>. 进一步的工作则表明肌肉细胞中SOCE的大小与STIM1及Orai1的表达量或功能直接相关. 例如, Stiber等人<sup>[26]</sup>发现在STIM1功能丧失小鼠的肌纤维中, SOCE显著减小. Dirksen团队将小鼠肌管中的STIM1敲低后, 检测到SOCE几乎消失, 而回补hSTIM1后, SOCE完全恢复. 同时, 他们还验证了Orai1的功能丧失性突变——E106Q也使肌管中的SOCE消失<sup>[27]</sup>. 这些工作表明, 肌肉细胞中的SOCE也是由STIM1和Orai1介导的.

兴奋性细胞的各种反应, 如动作电位的产生以及肌肉的收缩等的速度较快(毫秒~秒级别), 而CRAC通

道介导的钙信号则是一种激活速度相对较慢的生理过程(分钟级别)<sup>[28]</sup>。针对这一问题, 几个团队发现兴奋性细胞中会表达一种STIM1剪接异构体STIM1L<sup>[29,30]</sup>。与STIM1相比, STIM1L在C端多出了一段由106个氨基酸组成的具有actin结合能力的肽段。在细胞骨架的帮助下, STIM1L在静息时即与Orai1共定位, 结合但不激活Orai1。在肌肉细胞中, STIM1L因此可以略过STIM1的大部分的激活、聚集及重定位到ER-PM连接区结合Orai1等较耗时的步骤, 实现对Orai1的快速激活<sup>[30]</sup>。但后续的一个报道则发现, 超表达在STIM1-STIM2双敲除的成纤维细胞的STIM1L介导SOCE的速度反而更慢<sup>[31]</sup>。因而还需要更多的工作来验证肌肉细胞中CRAC通道激活速度更快的假说正确与否。尽管如此, 上述工作仍提示肌肉细胞里可能存在一些特有的调控因子来增加CRAC通道的激活速度。

### 1.3 CRAC信号在肌肉细胞中的生理功能及调控

当前对CRAC通道在肌肉细胞中的生理功能了解的还比较有限。Rosenberg团队<sup>[32]</sup>的工作表明, CRAC通道与心脏的节律性有关。他们发现STIM1和Orai1大量存在于窦房结细胞, 而敲除STIM1的窦房结细胞中的静息钙水平和肌质网钙库钙水平平均会降低。而且STIM1敲除的小鼠表现出心脏起搏的改变和心率的显著性降低, 但是具体的调控机制仍需要进一步的研究。而在骨骼肌细胞上的工作则表明, SOCE信号与肌质网钙稳态的维持有关, 以敲减SOCE相关蛋白或超表达无功能Orai1突变蛋白等方式降低肌肉细胞的SOCE功能后, 会降低细胞维持内质网钙水平的能力, 使得连续去极化引发的钙释放不断降低。这会造成连续刺激引发的肌肉收缩能力下降, 进而导致SOCE缺陷的转基因小鼠的耐力下降<sup>[26,33,34]</sup>。而通过超表达Orai1增加SOCE后, 则可以减轻小鼠在重复高频刺激下的肌肉疲劳<sup>[35]</sup>。

还有一些研究则表明, CRAC通道介导的SOCE信号与肌肉的发育密切相关。SOCE缺陷的小鼠骨骼肌分化受损<sup>[36~38]</sup>, Orai1骨骼肌特异性敲除小鼠在发育过程中缺少了抗疲性I型纤维<sup>[34]</sup>。Orai1功能缺失患者的腓肠肌则几乎完全缺失II型肌纤维<sup>[39]</sup>。在小鼠骨骼肌中敲除STIM1后, 小鼠表现出严重的发育迟缓和围产期致死<sup>[37]</sup>。这些结果表明SOCE在肌肉生长和分化中起着核心作用, 精准的SOCE对骨骼肌的正常发

育和功能都至关重要。小鼠骨骼肌发育过程中STIM1表达含量升高, 钙库中的钙水平和SOCE也随之升高<sup>[40]</sup>。而在心肌中则相反, Hill和Rosenberg团队<sup>[29,41]</sup>的工作表明STIM1和Orai1的表达量随着心脏的发育而下调。在发育过程中, 对为什么CRAC通道蛋白在不同肌肉细胞中的表达模式不同这个问题, 当前还不清楚具体原因。Rosenberg团队的推测是, 在新生心肌细胞中, T管尚未形成,  $Ca_v$ 表达量也较低, 由位于T管的 $Ca_v$ 与位于jSR的RyRs构成的二联体还在发育阶段, 因此需要大量STIM1和SOCE的存在来形成足够的钙信号来进行心肌的分化和增殖。而在成年心肌细胞中, 二联体发育完全、速度更快、经典的ECC钙信号通路替代SOCE来行使功能, STIM1的表达量和SOCE的功能因此而减弱<sup>[41]</sup>。

尽管当前对肌肉细胞中CRAC通道的表达及功能的调节机制的了解不多, 但肌肉细胞中无疑应该存在一些特有的SOCE调控因子。有研究发现, 小鼠运动后的骨骼肌会发生SR和T管的重构, 在新产生的ER-PM连接区中STIM1和Orai1的共定位显著增加。而SOCE的抑制剂则可以降低这种现象的发生频率。该研究提示骨骼肌中可能存在特有的调控STIM1和Orai1互作的机制<sup>[42]</sup>。而有研究则发现或提示骨骼肌特有的一些蛋白对CRAC通路有调控作用。例如, 在胚胎期小鼠的骨骼肌中, 对SOCE有限制作用的蛋白SLN(sarcolipin)含量较高, STIM1的含量较低。出生后小鼠的骨骼肌中SLN的表达下降, STIM1表达上调, SOCE增加<sup>[40]</sup>。此外, 骨骼肌SR中大量表达的钙结合蛋白CSQ1(calsequestrin-1)是骨骼肌中SOCE的负调节蛋白。在敲低CSQ1的小鼠骨骼肌中, SOCE显著升高<sup>[43]</sup>。CSQ1的作用机制是通过降低激活态STIM1的聚集程度来减弱STIM1和Orai1的偶联程度, 进而降低SOCE。推测CASQ1调控SOCE功能的生理意义在于防止生理条件下肌质网 $Ca^{2+}$ 过载<sup>[44~46]</sup>。最后, 骨骼肌中其他的一些重要功能蛋白, 如RyRs和MG29(mitsugumin 29), 也被证实可以调控骨骼肌中的SOCE<sup>[47,48]</sup>。除了上述零星的报道外, 目前还未见在肌肉细胞中CRAC通道调控因子的系统研究。

### 1.4 SOCE在肌肉细胞中的病理功能及调节机制

众多肌肉类疾病都与SOCE的异常相关。对骨骼肌而言, SOCE的异常增加或减少会导致不同临床表型的

肌病。管状聚集性肌病(tubular aggregate myopathy, TAM)是研究中最为人熟知的SOCE异常相关的肌病, 表现为肌肉无力、肌肉疼痛和痉挛等症状。众多研究表明TAM与STIM1和Orai1的功能获得性突变有紧密的联系<sup>[49,50]</sup>。另外, 也有研究提出, SOCE的活性增强可能与杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)及恶性高热(malignant hyperthermia, MH)的发病机制相关<sup>[51]</sup>。

在心肌相关疾病中, 除前述STIM1可能与心率失常有关的报道外<sup>[52]</sup>。近十年来, 陆续有工作表明STIM1-Orai1介导的SOCE与心肌肥大(cardiac hypertrophy)密切相关。早期的研究表明SOCE通过NFAT通路激活心肌肥大信号通路<sup>[8]</sup>。Voelkers, Ohba和Hulot等团队的工作也证实了心肌肥大细胞的SOCE增强, 并进一步表明敲减STIM1或Orai1可以减弱内皮素1(endothelin-1, ET-1)或苯肾上腺素(phenylephrine, PE)等诱导的SOCE的激活和心肌细胞肥大<sup>[24,53,54]</sup>。Luo等人<sup>[29]</sup>的研究则显示, 在经主动脉狭窄(transaortic constriction, TAC)诱导的肥大成年心脏中, STIM1和STIM1L的表达量显著增加; 在持续表达激活状态的STIM1的心肌细胞中, 发生了心肌肥大。对Orai1在心肌肥大形成中的作用, 除Voelkers等人<sup>[24]</sup>的研究外, Bartoli等人<sup>[55]</sup>发现, 在成年心脏中转基因表达失活的Orai1会抑制压力过载造成的心肌肥大, 以及Orai1抑制剂JPIII具有使心脏免于压力过载造成的心衰的保护作用。以上诸多证据显示, STIM1和Orai1介导的SOCE参与了心肌肥大的形成, 然而具体的相关机制和调控方式依然有待进一步探究。

综上, 造成当前对CRAC通道在兴奋性细胞中的调控机制、生理功能和病理作用等的了解比较有限的一个主要因素, 是对ER-PM连接区内蛋白质组学解析还不够深入。

## 2 内质网-质膜连接区的观测技术

ER-PM连接区的ER膜与PM平行排列, 长度大概为100~400 nm, 两个膜的距离为10~30 nm<sup>[56]</sup>。ER-PM间隙的尺寸超出了一般超分辨显微镜的分辨极限, 因而对其的检测非常有挑战性。当前对ER-PM连接区的观测手段主要有以下几种:

(1) 电镜技术。早期人们依靠电镜技术认识到了

ER-PM连接区的广泛存在。近年来, 随着电镜的发展, 冷冻电子断层扫描<sup>[57]</sup>和高分辨率聚焦离子束扫描电子显微镜断层扫描技术<sup>[58]</sup>实现了以纳米(nm)级甚至埃(Å)量级对亚细胞区进行3D成像。运用该技术, De Camilli团队<sup>[59]</sup>系统地描绘了神经元中内质网与其他细胞器及质膜间的膜接触点。除了前述对ER-PM连接区的形态学鉴定外, 科学家们还运用这类技术探究了一些蛋白如STIM1和Orai1在该区的存在模式<sup>[57,60]</sup>。然而, 该类技术需要花费大量时间将样本固定, 且整个固定过程可能会损伤细胞结构, 导致实验假象的产生。在一些ER-PM连接丰度相对较低的细胞中, 用EM检测ER-PM连接区的难度更大。这些问题均使得ER-PM连接区的研究受到限制。

(2) 化学诱导标记法。2007年, Balla团队<sup>[61]</sup>将一种基于化学诱导的标记法应用于活细胞中, 实现了活细胞ER-PM连接区的动态可视化。他们在细胞中共表达了位于PM的融合蛋白组件FKBP12-Mrpf(FK506-binding protein 12-Mrpf)和位于ER的融合蛋白组件CFP-FRB(CFP-fragment of mTOR that binds FKBP12)。雷帕霉素(rapamycin, Rapa)作为一种化学诱导剂使这两个融合蛋白在细胞的ER-PM连接区发生异二聚化, 从而在活细胞中指示出ER-PM连接区的位置。虽然该工具获得了一定的应用<sup>[62-64]</sup>, 但该方法需要在细胞中超表达两种蛋白工具并使用化学试剂处理细胞。这些操作很可能使细胞的生理状态发生改变, 如较长时间的Rapa处理会激活细胞mTOR通路等。这些缺点限制了化学诱导标记法在检测ER-PM连接区的动态特性和功能中的应用。

(3) 荧光标记-MAPPER。2013年, Liou团队<sup>[65]</sup>制备了一种基于STIM1的, ER-PM连接区的单元件荧光标记工具MAPPER(membrane-attached peripheral ER)。MAPPER保留了STIM1的信号肽和跨膜(transmembrane, TM)区, 使之能定位在内质网膜上, 还保留了STIM1的C末端能与质膜结合的富含碱性(polybasic, PB)氨基酸的区域。然后将STIM1的内质网内的部分替换为荧光蛋白, 将STIM1的TM和PB之间的部分换成FRB和长度适中的连接片段(linker)。最终得到的定位于内质网的MAPPER同时带有与质膜结合的PB区, 因而可以特异性地驻留在ER-PM连接区中, 其所带的荧光可以指示该区的位置及形态。这一单元件的荧光工具无需化学试剂的处理即可示踪连接区, 对细胞本身

的干扰稍小一些, 因而也有一些应用<sup>[66~70]</sup>. 但MAPPER的问题是它们在表达后会持续的定位于连接区, 因而当MAPPER表达量过高时, 会增加细胞中的ER-PM连接区的数量和尺寸, 还有可能干扰连接区内的蛋白质机器, 因此使用时要使用低表达的载体.

(4) 光遗传学标记-LiMETER. 2015年, Zhou与Wang团队<sup>[66]</sup>合作, 对MAPPER进行了进一步的改造, 将其胞浆部分替换为感光元件LOV2(light oxygen voltage-sensing domain, residues 404–546)结构域, 获得了一种ER-PM的光遗传学标记工具LiMETER(light-inducible membrane-tethered peripheral ER). 在黑暗中, LiMETER的LOV2将其PB质膜结合区锚定在内质网附近, 因而LiMETER呈均匀的内质网样分布. 在蓝光照射后, LOV2将PB区释放出来与质膜结合, LiMETER经由扩散-驻留(diffuse-trap)的模式转而定位ER-PM连接区并指示后者的定位及形态特征. 该工具用光开关的方式同时避免了化学药物的使用, 以及因标记工具在连接区的长时间驻留而对后者的形态及蛋白质组成所造成的影响, 是当前对连接区干扰最小的活细胞标记方式. Zhou团队<sup>[71]</sup>还对LiMETER做了更换质膜结合区等改造, 使之可以被运用其他膜接触点. 这类工具有助于对各种细胞的ER-PM连接区进行研究, 特别是有助于描绘兴奋性细胞在执行生物学功能时ER-PM连接区的动态变化图谱.

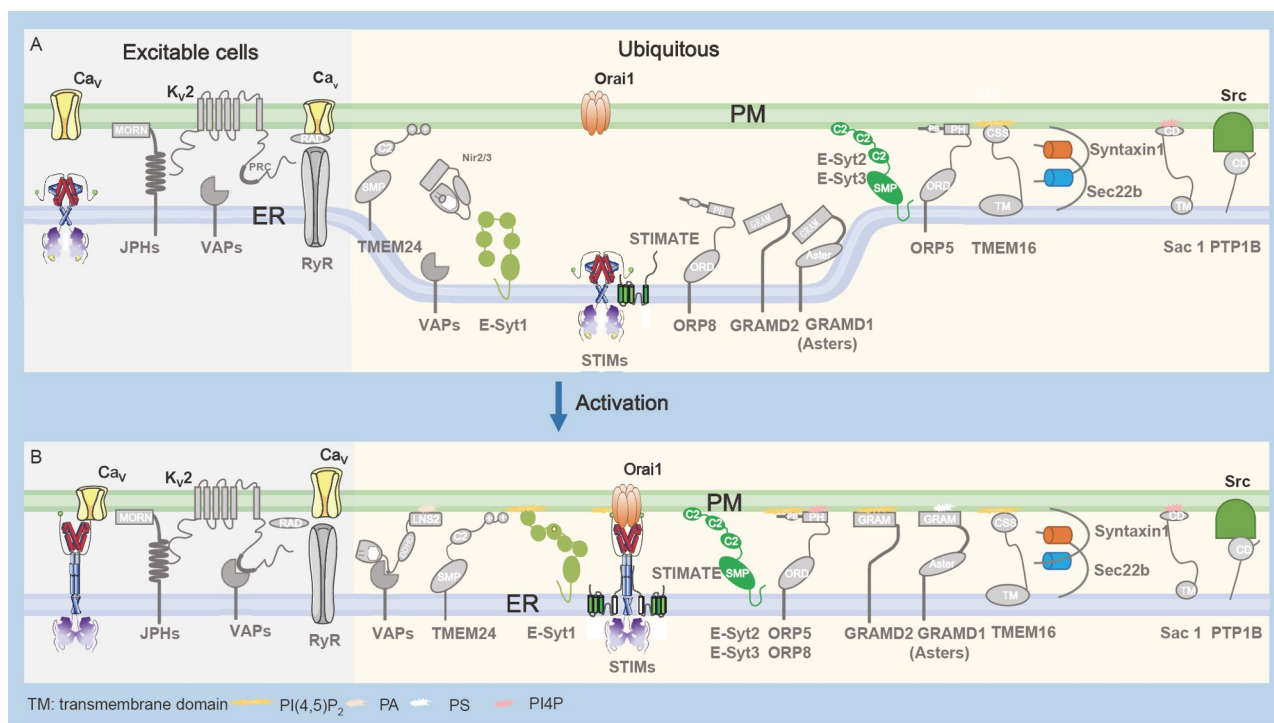
### 3 ER-PM连接区蛋白质组鉴定与CRAC通路调控机制研究

跟其他膜接触点一样, 整个ER-PM连接区没有完整的被膜, 因而很难用传统的方法系统分离鉴定其中的蛋白质组. 尽管如此, 众多散发的研究工作陆续发现了很多定位于ER-PM连接区的蛋白, 并进一步揭示了它们的生物学功能及作用机制(图1). 目前已知的, 在该区内驻留或在某种情况下进入该区的蛋白的功能主要是参与脂类运输与钙信号转导. 其中与脂类运输有关的蛋白主要有: 介导磷脂酰肌醇四磷酸(phosphatidylinositol-4-phosphate, PI4P)/磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)逆向运输的ORP5和ORP8<sup>[72]</sup>; 参与甾醇转运的含有GRAMD(glucosyltransferases, Rab-like GTPase activators and myotubularins domain)结构域的蛋白家族<sup>[73,74]</sup>; 介导磷脂酰肌醇循环的胞浆脂质

转运蛋白Nir2和Nir3<sup>[75~77]</sup>; E-Syt家族蛋白(extended synaptotagmin, E-syt)<sup>[78]</sup>, 参与脂质代谢的Sec22b-Syntaxin1复合物<sup>[79]</sup>, PI4P磷酸酶Sac1<sup>[80]</sup>等. 而该区中与钙信号转导有关的蛋白则主要是介导SOCE信号的CRAC通道蛋白, 如STIM1, STIM2, Orai1-Orai3<sup>[6]</sup>; 兴奋细胞中介导兴奋收缩耦联的Ca<sub>v</sub>和RYRs<sup>[81]</sup>及相关调控蛋白JPHs<sup>[82]</sup>等. 该区内的蛋白还有ER上的钙激活的氯离子通道TMEM16<sup>[83,84]</sup>, 以及可以结合并激活PM上的酪氨酸蛋白激酶Src的ER膜蛋白PTP1B<sup>[85]</sup>等. 另外, 近期有研究表明, 电压门控的K<sub>v</sub>2钾离子通道能通过ER膜蛋白VAPs互作而定位于ER-PM连接区<sup>[86]</sup>, 但相关的生理功能仍需要被进一步揭示.

ER-PM连接区等膜接触点内的蛋白质组学解析的难题在蛋白邻近标记技术出现后得到了部分解决. 蛋白邻近标记技术的核心在于利用融合在诱饵蛋白上的工程酶催化外源底物, 产生半衰期短(<1 ms), 活性范围小(<20 nm), 带生物素标签和自由基的活性小分子, 后者会与特定氨基酸(如Tyr, Trp, Cys和His)形成共价连接, 从而将生物素标记到离诱饵蛋白20 nm以内的蛋白质上, 再通过亲和纯化、免疫印迹和质谱等技术即可鉴定出相应的蛋白质组<sup>[87]</sup>. 用该类技术可以在活细胞内进行原位蛋白质组学鉴定, 特异性较高. 而且邻近标记技术的标记范围正好与ER-PM连接区的间隙尺寸相当, 正好适用于该区内的蛋白质组学鉴定. Ting团队<sup>[88]</sup>开发的工程化抗坏血酸过氧化物酶2(engineered ascorbate peroxidase 2, APEX2)介导的邻近标记技术(图1)就被Jing等人<sup>[66]</sup>首次运用到非兴奋性细胞ER-PM连接区的蛋白质组解析中, 并鉴定出了STIM1激活增强蛋白STIMATE. 而依赖生物素酶的邻近标记技术(如BioID)<sup>[89]</sup>和依赖过氧化物酶的邻近标记技术(如APEX)<sup>[88]</sup>则被应用于鉴定位于心肌二联体的蛋白质组. Marx团队<sup>[90]</sup>将APEX2融合进Ca<sub>v</sub>, 鉴定出在Ca<sub>v</sub>微环境附近的RAD在静息状态下与Ca<sub>v</sub>结合并抑制Ca<sub>v</sub>, 而β肾上腺素受体激活后, 随之激活的PKA会磷酸化RAD而使其脱离Ca<sub>v</sub>, 从而停止对Ca<sub>v</sub>的抑制作用. 与依赖于APEX的邻近标记相比, 依赖于生物素酶的BioID邻近标记技术的优势在于可以在动物体内进行生物素邻近标记. Chen团队<sup>[91]</sup>就在小鼠中将BioID2敲入到位于二联体的内源JPH2蛋白, 鉴定出了已知和一些未知的位于二联体的蛋白.

值得注意的是, ER-PM连接区的蛋白质组学研究



**图 1** 内质网-质膜连接区(ER-PM junctions)部分已知蛋白质机器及其动态变化示意图。A: 静息状态下的ER-PM junctions; B: 内质网钙库清空后的ER-PM junctions。其中, 与脂类运输相关的有ORP5/8, 含有GRAMD结构域的蛋白家族, Nir2/3, E-Syt蛋白家族, Sec22b-Syntaxin1复合物, PI4P磷酸酶Sac1等。与钙信号转导相关的蛋白则主要是介导SOCE信号的CRAC通道蛋白, 如STIM1, STIM2, Orai1, 以及STIM1的增强子STIMATE; 兴奋细胞中介导兴奋-收缩耦联的电压门控L型钙离子通道( $\text{Ca}_v$ )和兰尼碱受体(ryanodine receptors, RYRs)及相关调控蛋白JPHs。此外, 还有TMEM16, TMEM24, Src-PTP1B, KV-VAPs等

**Figure 1** Schematic diagram of several known protein machineries at ER-PM junctions and the dynamic changes. A: resting ER-PM junctions; B: ER-PM junctions after ER  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion. Among these proteins, ORP5/8, GRAMD, Nir2/3, E-Syt, Sec22b-Syntaxin1 complex and Sac1 are lipid transfer-related. The proteins which are related to calcium signaling at ER-PM junctions are mainly CRAC channel-associated proteins, such as STIM1, STIM2, Orai1 and STIM1 enhancer STIMATE. Additionally,  $\text{Ca}_v$  and ryanodine receptors (RYRs) which mediate excitation-contraction coupling in excitable cells as well as the regulator protein JPHs are also involved in calcium signaling. What is more, there are some other proteins at ER-PM junctions, such as TMEM16, TMEM24, Src-PTP1B, and KV-VAPs

的准确性依赖于诱饵蛋白在ER-PM连接区的特异性定位, 而包括STIM1在内多数诱饵蛋白并不是100%的特异性定位于ER-PM连接区。因而上述在连接区的蛋白质组学工作含有一定的假阳性结果。针对这一问题, 研究者引入了split策略, 即将邻近标记酶分成两个无功能的片段, 分别连接到目的蛋白复合物的两个元件上。只有当这两个元件靠得足够近或形成复合物时, 这两个片段才能组装成有功能的邻近标记酶, 特异性地标记复合物附近的蛋白, 从而可以有效避免假阳性结果<sup>[92~96]</sup>。其中Ting团队<sup>[95]</sup>开发的Split-TurboID表现得较为出色, 他们利用该工具得到了ER-线粒体膜接触点的蛋白质组。Takano等人<sup>[97]</sup>也利用Split-TurboID鉴定出了位于星形细胞-神经元间隙的蛋白质组。这类采用split技术的邻近标记工具能很好地解决特异性问

题, 但仍不能解决在ER-PM连接区超表达这些工具给该区蛋白质机器带来的干扰和破坏的问题。而本团队<sup>[66]</sup>的LiMETER工具结合新型的邻近标记技术, 则有望解决这一问题, 为更好地描绘ER-PM连接区的蛋白质图谱提供帮助。

在兴奋性细胞的ER-PM连接区内, 除了应用上述邻近标记的工作外, 还未见一些限制更少, 标记更简单快捷的邻近标记工具, 如TurboID<sup>[98]</sup>和BASU<sup>[99]</sup>等的应用。而该区内与CRAC通道互作的蛋白质组学研究也还未见报道。进一步将生物素邻近标记技术引入到相关横纹肌生理和病理的研究中, 将帮助人们鉴定出与CRAC通道动态互作的蛋白质组的变化, 为进一步阐明CRAC通道在兴奋性细胞中的调控及功能提供新方向。

## 4 总结与展望

尽管ER-PM连接区在兴奋性细胞中的丰度较高,并且是最早被发现的膜接触点,但由于技术手段的限制,目前对该区在兴奋性细胞中的动态变化、蛋白质组成、生物学功能等方面的了解还比较有限。本团队合作制备的LiMETER光遗传学标记工具有望帮助揭示连接区的动态变化。各种新型邻近标记工具的应用则有望帮助研究者解析其中的蛋白质组,进而深入揭示连接区的生物学功能。

最后,为深入阐明ER-PM连接区的生物学功能,相关研究应该适度扩展到该连接区以外,即质膜外和ER内。进一步研究相关细胞因子从胞外和内质网内两个方向来调控ER-PM连接区的生物学功能。例如,近年在基因编码的钙指示剂方面的研究突破,使得细胞器钙信号转导成为了一个新兴的研究方向<sup>[100]</sup>。在此基础上,探究内质网钙信号及钙稳态与CRAC通路的关系,以及它们对ER-PM连接区生物学功能的调控等,将有望加深对ER-PM连接区的生理和病理作用的理解。

## 参考文献

- Elbaz Y, Schuldiner M. Staying in touch: the molecular era of organelle contact sites. *Trends Biochem Sci*, 2011, 36: 616–623
- Chen S, Novick P, Ferro-Novick S. ER structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25: 428–433
- Bernhard W, Rouiller C. Close topographical relationship between mitochondria and ergastoplasm of liver cells in a definite phase of cellular activity. *J Biophys Biochem Cytol*, 1956, 2: 73–78
- Phillips M J, Voeltz G K. Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17: 69–82
- Chang C L, Chen Y J, Liou J. ER-plasma membrane junctions: why and how do we study them? *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1864: 1494–1506
- Prakriya M, Lewis R S. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*, 2015, 95: 1383–1436
- Arakawa N, Sakaue M, Yokoyama I, et al. KB-R7943 inhibits store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in cultured neurons and astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279: 354–357
- Hunton D L, Lucchesi P A, Pang Y, et al. Capacitative calcium entry contributes to nuclear factor of activated T-cells nuclear translocation and hypertrophy in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 2002, 277: 14266–14273
- Kurebayashi N, Ogawa Y. Depletion of  $\text{Ca}^{2+}$  in the sarcoplasmic reticulum stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  entry into mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol*, 2001, 533: 185–199
- Pang Y, Hunton D L, Bounelis P, et al. Hyperglycemia inhibits capacitative calcium entry and hypertrophy in neonatal cardiomyocytes. *Diabetes*, 2002, 51: 3461–3467
- Wang L Q, Dou F, Wang Y J. Neuronal calcium signaling system and “calcium hypothesis” of Alzheimer’s Disease (in Chinese). *Chin J Biochem Mol Biol*, 2021, doi: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2021.05.1055 [王刘清, 窦非, 王友军. 神经元钙信号系统异常与阿尔茨海默病的“钙假说”. *中国生物化学与分子生物学*, 2021, doi: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2021.05.1055]
- Porter K R, Palade G E. Studies on the endoplasmic reticulum. *J Biophys Biochem Cytol*, 1957, 3: 269–300
- Rosenbluth J. Subsurface cisterns and their relationship to the neuronal plasma membrane. *J Cell Biol*, 1962, 13: 405–421
- Henkart M, Landis D M, Reese T S. Similarity of junctions between plasma membranes and endoplasmic reticulum in muscle and neurons. *J Cell Biol*, 1976, 70: 338–347
- Henkart M P, Nelson P G. Evidence for an intracellular calcium store releasable by surface stimuli ifibroblasts (L cells). *J Gen Physiol*, 1979, 73: 655–673
- Gardiner D M, Grey R D. Membrane junctions in *Xenopus* eggs: their distribution suggests a role in calcium regulation. *J Cell Biol*, 1983, 96: 1159–1163
- Loewen C J R, Young B P, Tavassoli S, et al. Inheritance of cortical ER in yeast is required for normal septin organization. *J Cell Biol*, 2007, 179: 467–483
- Vihetlic T S, Goebel M, Milligan S, et al. Localization of *Drosophila* retinal degeneration B, a membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein. *J Cell Biol*, 1993, 122: 1013–1022
- Staehelin L A. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J*, 1997, 11: 1151–1165

- 20 McFarlane H E, Lee E K, van Bezouwen L S, et al. Multiscale structural analysis of plant ER-PM contact sites. *Plant Cell Physiol*, 2017, 58: 478–484
- 21 Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V. Shape, size, and distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys J*, 1999, 77: 1528–1539
- 22 Uehara A, Yasukochi M, Imanaga I, et al. Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry uncoupled with ryanodine receptor and junctional membrane complex in heart muscle cells. *Cell Calcium*, 2002, 31: 89–96
- 23 Hunton D L, Zou L Y, Pang Y, et al. Adult rat cardiomyocytes exhibit capacitative calcium entry. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286: H1124–H1132
- 24 Voelkers M, Salz M, Herzog N, et al. Orai1 and Stim1 regulate normal and hypertrophic growth in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48: 1329–1334
- 25 Zhu-Mauldin X, Marsh S A, Zou L, et al. Modification of STIM1 by O-linked *N*-acetylglucosamine (O-GlcNAc) attenuates store-operated calcium entry in neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 2012, 287: 39094–39106
- 26 Stiber J, Hawkins A, Zhang Z S, et al. STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol*, 2008, 10: 688–697
- 27 Lyfenko A D, Dirksen R T. Differential dependence of store-operated and excitation-coupled  $\text{Ca}^{2+}$  entry in skeletal muscle on STIM1 and Orai1. *J Physiol*, 2008, 586: 4815–4824
- 28 Soboloff J, Rothberg B S, Madesh M, et al. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 549–565
- 29 Luo X, Hojaye B, Jiang N, et al. STIM1-dependent store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry is required for pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52: 136–147
- 30 Darbellay B, Arnaudeau S, Bader C R, et al. STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive  $\text{Ca}^{2+}$  release. *J Cell Biol*, 2011, 194: 335–346
- 31 Saüc S, Bulla M, Nunes P, et al. STIM1L traps and gates Orai1 channels without remodeling the cortical ER. *J Cell Sci*, 2015, 128: 1568–1579
- 32 Zhang H, Sun A Y, Kim J J, et al. STIM1- $\text{Ca}^{2+}$  signaling modulates automaticity of the mouse sinoatrial node. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E5618–E5627
- 33 Sztretye M, Singlár Z, Balogh N, et al. The role of Orai1 in regulating sarcoplasmic calcium release, mitochondrial morphology and function in myostatin deficient skeletal muscle. *Front Physiol*, 2020, 11: 601090
- 34 Carrell E M, Coppola A R, McBride H J, et al. Orai1 enhances muscle endurance by promoting fatigue-resistant type I fiber content but not through acute store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *FASEB J*, 2016, 30: 4109–4119
- 35 Wei-Lapierre L, Carrell E M, Boncompagni S, et al. Orai1-dependent calcium entry promotes skeletal muscle growth and limits fatigue. *Nat Commun*, 2013, 4: 2805
- 36 Darbellay B, Arnaudeau S, König S, et al. STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium entry regulates human myoblast differentiation. *J Biol Chem*, 2009, 284: 5370–5380
- 37 Li T, Finch E A, Graham V, et al. STIM1- $\text{Ca}^{2+}$  signaling is required for the hypertrophic growth of skeletal muscle in mice. *Mol Cell Biol*, 2012, 32: 3009–3017
- 38 Trebak M, Zhang W, Ruhle B, et al. What role for store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in muscle? *Microcirculation*, 2013, 20: 330–336
- 39 Lian J, Cuk M, Kahlfuss S, et al. ORAI1 mutations abolishing store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry cause anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142: 1297–1310.e11
- 40 Seth M, Li T, Graham V, et al. Dynamic regulation of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  stores by stromal interaction molecule 1 and sarcolipin during muscle differentiation. *Dev Dyn*, 2012, 241: 639–647
- 41 Rosenberg P, Zhang H, Bryson V G, et al. SOCE in the cardiomyocyte: the secret is in the chambers. *Pflügers Arch Eur J Physiol*, 2021, 473: 417–434
- 42 Boncompagni S, Michelucci A, Pietrangelo L, et al. Exercise-dependent formation of new junctions that promote STIM1-Orai1 assembly in skeletal muscle. *Sci Rep*, 2017, 7: 14286
- 43 Zhao X, Min C K, Ko J K, et al. Increased store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in skeletal muscle with reduced calsequestrin-1 expression. *Biophys J*, 2010, 99: 1556–1564
- 44 Wang L, Zhang L, Li S, et al. Retrograde regulation of STIM1-Orai1 interaction and store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry by calsequestrin. *Sci Rep*, 2015,

5: 11349

- 45 Zhang L, Wang L, Li S, et al. Calsequestrin-1 regulates store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry by inhibiting STIM1 aggregation. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38: 2183–2193
- 46 Michelucci A, Boncompagni S, Pietrangelo L, et al. Pre-assembled  $\text{Ca}^{2+}$  entry units and constitutively active  $\text{Ca}^{2+}$  entry in skeletal muscle of calsequestrin-1 knockout mice. *J Gen Physiol*, 2020, 152: e202012617
- 47 Pan Z, Yang D, Nagaraj R Y, et al. Dysfunction of store-operated calcium channel in muscle cells lacking *mg29*. *Nat Cell Biol*, 2002, 4: 379–383
- 48 Zhao X, Weisleder N, Han X, et al. Azumolene inhibits a component of store-operated calcium entry coupled to the skeletal muscle ryanodine receptor. *J Biol Chem*, 2006, 281: 33477–33486
- 49 Böhm J, Chevessier F, Maues De Paula A, et al. Constitutive activation of the calcium sensor STIM1 causes tubular-aggregate myopathy. *Am J Hum Genet*, 2013, 92: 271–278
- 50 Endo Y, Noguchi S, Hara Y, et al. Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Hum Mol Genet*, 2015, 24: 637–648
- 51 Michelucci A, García-Castañeda M, Boncompagni S, et al. Role of STIM1/ORAI1-mediated store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in skeletal muscle physiology and disease. *Cell Calcium*, 2018, 76: 101–115
- 52 Zhang H, Bryson V, Luo N, et al. STIM1- $\text{Ca}^{2+}$  signaling in coronary sinus cardiomyocytes contributes to interatrial conduction. *Cell Calcium*, 2020, 87: 102163
- 53 Ohba T, Watanabe H, Murakami M, et al. Essential role of STIM1 in the development of cardiomyocyte hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 389: 172–176
- 54 Hulot J S, Fauconnier J, Ramanujam D, et al. Critical role for stromal interaction molecule 1 in cardiac hypertrophy. *Circulation*, 2011, 124: 796–805
- 55 Bartoli F, Bailey M A, Rode B, et al. Orai1 channel inhibition preserves left ventricular systolic function and normal  $\text{Ca}^{2+}$  handling after pressure overload. *Circulation*, 2020, 141: 199–216
- 56 Chen Y J, Quintanilla C G, Liou J. Recent insights into mammalian ER-PM junctions. *Curr Opin Cell Biol*, 2019, 57: 99–105
- 57 Fernández-Busnadiego R, Saheki Y, De Camilli P. Three-dimensional architecture of extended synaptotagmin-mediated endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E2004–E2013
- 58 Ohta K, Okayama S, Togo A, et al. Three-dimensional organization of the endoplasmic reticulum membrane around the mitochondrial constriction site in mammalian cells revealed by using focused-ion beam tomography. *Microscopy*, 2014, 63: i34.1–i34
- 59 Wu Y, Whiteus C, Xu C S, et al. Contacts between the endoplasmic reticulum and other membranes in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E4859–E4867
- 60 Perni S, Dynes J L, Yeromin A V, et al. Nanoscale patterning of STIM1 and Orai1 during store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E5533–E5542
- 61 Varnai P, Thyagarajan B, Rohacs T, et al. Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells. *J Cell Biol*, 2006, 175: 377–382
- 62 Luik R M, Wang B, Prakriya M, et al. Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature*, 2008, 454: 538–542
- 63 Korzeniowski M K, Popovic M A, Szentpetery Z, et al. Dependence of STIM1/Orai1-mediated calcium entry on plasma membrane phosphoinositides. *J Biol Chem*, 2009, 284: 21027–21035
- 64 Walsh C M, Chvanov M, Haynes L P, et al. Role of phosphoinositides in STIM1 dynamics and store-operated calcium entry. *Biochem J*, 2009, 425: 159–168
- 65 Chang C L, Hsieh T S, Yang T T, et al. Feedback regulation of receptor-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signaling mediated by E-Syt1 and Nir2 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Cell Rep*, 2013, 5: 813–825
- 66 Jing J, He L, Sun A, et al. Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Nat Cell Biol*, 2015, 17: 1339–1347
- 67 Lee E, Vanneste S, Pérez-Sancho J, et al. Ionic stress enhances ER-PM connectivity via phosphoinositide-associated SYT1 contact site expansion in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 1420–1429
- 68 Woo J S, Sun Z, Srikanth S, et al. The short isoform of extended synaptotagmin-2 controls  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in T cells via interaction with STIM1.

- [Sci Rep](#), 2020, 10: 14433
- 69 Srivastava N, Tauseef M, Amin R, et al. Noncanonical function of long myosin light chain kinase in increasing ER-PM junctions and augmentation of SOCE. [FASEB J](#), 2020, 34: 12805–12819
- 70 Katz Z B, Zhang C, Quintana A, et al. Septins organize endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions for STIM1-ORAI1 calcium signalling. [Sci Rep](#), 2019, 9: 10839
- 71 He L, Jing J, Zhu L, et al. Optical control of membrane tethering and interorganellar communication at nanoscales. [Chem Sci](#), 2017, 8: 5275–5281
- 72 Chung J, Torta F, Masai K, et al. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. [Science](#), 2015, 349: 428–432
- 73 Besprozvannaya M, Dickson E, Li H, et al. GRAM domain proteins specialize functionally distinct ER-PM contact sites in human cells. [eLife](#), 2018, 7: e31019
- 74 Sandhu J, Li S, Fairall L, et al. Aster proteins facilitate nonvesicular plasma membrane to ER cholesterol transport in mammalian cells. [Cell](#), 2018, 175: 514–529.e20
- 75 Kim S H, Kedan A, Marom M, et al. The phosphatidylinositol-transfer protein Nir2 binds phosphatidic acid and positively regulates phosphoinositide signalling. [EMBO Rep](#), 2013, 14: 891–899
- 76 Chang C L, Liou J. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate homeostasis regulated by Nir2 and Nir3 proteins at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. [J Biol Chem](#), 2015, 290: 14289–14301
- 77 Kim Y J, Guzman-Hernandez M L, Wisniewski E, et al. Phosphatidylinositol-phosphatidic acid exchange by Nir2 at ER-PM contact sites maintains phosphoinositide signaling competence. [Dev Cell](#), 2015, 33: 549–561
- 78 Giordano F, Saheki Y, Idevall-Hagren O, et al. PI(4,5)P<sub>2</sub>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. [Cell](#), 2013, 153: 1494–1509
- 79 Petkovic M, Jemaie A, Daste F, et al. The SNARE Sec22b has a non-fusogenic function in plasma membrane expansion. [Nat Cell Biol](#), 2014, 16: 434–444
- 80 Dickson E J, Jensen J B, Vivas O, et al. Dynamic formation of ER-PM junctions presents a lipid phosphatase to regulate phosphoinositides. [J Cell Biol](#), 2016, 213: 33–48
- 81 Eisner D A, Caldwell J L, Kistamás K, et al. Calcium and excitation-contraction coupling in the heart. [Circ Res](#), 2017, 121: 181–195
- 82 Takeshima H, Hoshijima M, Song L S. Ca<sup>2+</sup> microdomains organized by junctophilins. [Cell Calcium](#), 2015, 58: 349–356
- 83 Hartzell H C, Yu K, Xiao Q, et al. Anoctamin/TMEM16 family members are Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>−</sup> channels. [J Physiol](#), 2009, 587: 2127–2139
- 84 Kunzelmann K, Cabrita I, Wanitchakool P, et al. Modulating Ca<sup>2+</sup> signals: a common theme for TMEM16, Ist2, and TMC. [Pflugers Arch Eur J Physiol](#), 2016, 468: 475–490
- 85 Monteleone M C, González Wusener A E, Burdisso J E, et al. ER-bound protein tyrosine phosphatase PTP1B interacts with Src at the plasma membrane/substrate interface. [PLoS ONE](#), 2012, 7: e38948
- 86 Kirmiz M, Vierra N C, Palacio S, et al. Identification of VAPA and VAPB as K<sub>v</sub>2 channel-interacting proteins defining endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions in mammalian brain neurons. [J Neurosci](#), 2018, 38: 7562–7584
- 87 Du Y C, Tang J L, Wang Y J, et al. Several new techniques for the study of living intracellular subcellular structural proteomics: application and comparison of proximity labeling strategy (in Chinese). [Prog Biochem Biophys](#), 2019, 46: 641–653 [杜阳春, 唐菁兰, 王友军, 等. 活细胞内亚细胞结构蛋白质组学研究新技术——几种邻近标记策略的应用及比较. [生物化学与生物物理进展](#), 2019, 46: 641–653]
- 88 Lam S S, Martell J D, Kamer K J, et al. Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. [Nat Methods](#), 2015, 12: 51–54
- 89 Choi-Rhee E, Schulman H, Cronan J E. Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. [Protein Sci](#), 2004, 13: 3043–3050
- 90 Liu G, Papa A, Katchman A N, et al. Mechanism of adrenergic Ca<sub>v</sub>1.2 stimulation revealed by proximity proteomics. [Nature](#), 2020, 577: 695–700
- 91 Feng W, Liu C, Spinozzi S, et al. Identifying the cardiac dyad proteome *in vivo* by a BioID2 knock-in strategy. [Circulation](#), 2020, 141: 940–942
- 92 De Munter S, Görnemann J, Derua R, et al. Split-BioID: a proximity biotinylation assay for dimerization-dependent protein interactions. [FEBS Lett](#), 2017, 591: 415–424

- 93 Schopp I M, Amaya Ramirez C C, Debeljak J, et al. Split-BioID a conditional proteomics approach to monitor the composition of spatiotemporally defined protein complexes. *Nat Commun*, 2017, 8: 15690
- 94 Kwak C, Shin S, Park J S, et al. Contact-ID, a tool for profiling organelle contact sites, reveals regulatory proteins of mitochondrial-associated membrane formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 12109–12120
- 95 Cho K F, Branon T C, Rajeev S, et al. Split-TurboID enables contact-dependent proximity labeling in cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 12143–12154
- 96 Han Y, Branon T C, Martell J D, et al. Directed evolution of Split APEX2 peroxidase. *ACS Chem Biol*, 2019, 14: 619–635
- 97 Takano T, Wallace J T, Baldwin K T, et al. Chemico-genetic discovery of astrocytic control of inhibition *in vivo*. *Nature*, 2020, 588: 296–302
- 98 Branon T C, Bosch J A, Sanchez A D, et al. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 880–887
- 99 Ramanathan M, Majzoub K, Rao D S, et al. RNA-protein interaction detection in living cells. *Nat Methods*, 2018, 15: 207–212
- 100 Li J, Wang Y J, Zhang X Y. Research progress on calcium indicators (in Chinese). *Prog Biochem Biophys*, 2021. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2161.Q.20210111.1522.002.html> [李佳, 王友军, 张晓嫣. 钙指示剂的发展及其研究现状. 生物化学与生物物理进展, 2021. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2161.Q.20210111.1522.002.html>]

## ER-PM contacts and CRAC signaling in muscle cells

SUN AoMin<sup>1</sup>, CHEN YiLan<sup>1</sup>, JING Ji<sup>2</sup> & WANG YouJun<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Beijing Key Laboratory of Gene Resource and Molecular Development, Institute of Genetics and Developmental Biology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

<sup>2</sup> Institute of Cancer and Basic Medicine, Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310000, China;

<sup>3</sup> Ministry of Education Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology, Institute of Cell Biology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Membrane contact sites (MCS) between endoplasmic reticulum (ER) and plasma membrane (PM), named ER-PM junctions, are crucial for lipid transfer and calcium signaling. ER-PM junction occupies 12% of PM in neurons and is essential for excitation-contraction coupling (ECC) in muscle cells. Currently, the dynamics and biological function of ER-PM junctions in neurons still remain elusive, and known information of proteomics within this region is also limited. The regulation and physiological/pathological function of calcium release-activated calcium (CRAC) channels, well established tethers that mediate ER-PM contacts, are waiting to be further unraveled. Recent advances in super-resolution imaging, optogenetic technology and proximity labeling provide possible solutions to address the aforementioned scientific questions. This review summarized recent advances in understanding the dynamics and proteomics of ER-PM junctions as well as CRAC signaling in muscle cells, and further directions of related research was briefly discussed.

**endoplasmic reticulum (ER), plasma membrane (PM), membrane contact sites (MCS), calcium release-activated calcium (CRAC), promixity labeling, optogenetics**

doi: 10.1360/SSV-2021-0143