

携带线粒体CO1/tRNA^{Ser(UCN)} 7444G>A突变和 12S rRNA 1555A>G突变的非综合征性 耳聋家系的线粒体功能研究

时雯雯^{1,2} 陈亚茹^{1,2} 任晓燕^{1,2} 薛凌^{1,2} 郑斌娇^{1,2} 唐霄雯^{1,2} 管敏鑫^{1,2*}

¹温州医科大学检验医学院、生命科学学院,温州 325035;

²温州医科大学Attardi线粒体生物医学研究院,温州 325035)

摘要 该研究通过构建携带突变的血小板融合细胞系,探讨12S rRNA 1555A>G和CO1/tRNA^{Ser(UCN)} 7444G>A突变对线粒体功能的影响。首先,采集携带12S rRNA 1555A>G和CO1/tRNA^{Ser(UCN)} 7444G>A双突变、单突变及正常对照组患者外周血,构建血小板融合细胞系。其次,对构建成功的血小板融合细胞系进行一系列功能研究,包括细胞内活性氧类(ROS)生成量、线粒体膜电位水平、蛋白质水平和tRNA稳态水平的分析。通过对各组血小板融合细胞系的线粒体功能的研究,结果与对照组相比发现,细胞内ROS生成量显示,仅携带m.1555A>G单突变组细胞ROS上升66.54%,仅携带m.7444G>A单突变组细胞ROS上升83.09%,而同时携带m.1555A>G和m.7444G>A双突变组细胞ROS上升131.08%;线粒体膜电位水平显示,m.1555A>G单突变组的 $\Delta\Psi_m$ 水平下降32.86%,m.7444G>A单突变组的 $\Delta\Psi_m$ 水平下降0.66%,m.1555A>G和m.7444G>A双突变组的 $\Delta\Psi_m$ 水平下降29.86%;Western blot结果显示,各突变样本的CO1、CO2均有不同程度的下降,仅携带m.1555A>G单突变组中ND4、ND5和ND6差异不明显,而仅携带m.7444G>A单突变组和m.1555A>G和m.7444G>A双突变组中ND4、ND5和ND6均有不同程度的下降;Northern blot结果显示,m.7444G>A对tRNA^{Ser(UCN)}稳态水平的改变并不是很明显。提示CO1/tRNA^{Ser(UCN)} 7444G>A突变可能只是12S rRNA 1555A>G突变的病理效应的修饰因子,但在耳聋的发生过程中,还是12S rRNA 1555A>G突变起主导作用。

关键词 非综合征性耳聋;线粒体tRNA^{Ser(UCN)}基因;突变;功能障碍

The Study of Mitochondrial Function in A Nonsyndromic Hearing Loss Family Carrying Mitochondria CO1/tRNA^{Ser(UCN)} 7444G>A and 12S rRNA 1555A>G Mutations¹

Shi Wenwen^{1,2}, Chen Yaru^{1,2}, Ren Xiaoyan^{1,2}, Xue Ling^{1,2}, Zheng Binjiao^{1,2}, Tang Xiaowen^{1,2}, Guan Minxin^{1,2*}

¹School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

²Attardi Institute of Mitochondrial Biomedicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

收稿日期: 2017-12-13 接受日期: 2018-02-06

国家自然科学基金青年基金(批准号: 31401070)、国家自然科学基金面上项目(批准号: 81670944)、浙江省自然科学基金(批准号: LY17C060004)、浙江省卫生计生医药卫生科学研究基金(批准号: 2015KYB235)、温州市科技计划项目(批准号: Y20160005)、温州医科大学科研发展基金(批准号: QTJ13017)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88206916, E-mail: gminxin88@gmail.com

Received: December 13, 2017 Accepted: February 6, 2018

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (Grant No.31401070, 81670944), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LY17C060004), Zhejiang Health Department Medical Scientific Research Foundation (Grant No.2015KYB235), Science and Technology Plan Project of Wenzhou City (Grant No.Y20160005) and Wenzhou Medical University Scientific Research Foundation (Grant No.QTJ13017)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88206916, E-mail: gminxin88@gmail.com

网络出版时间: 2018-05-15 18:15:45 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180515.1815.028.html>

Abstract In this study, we investigated the effects of 12S rRNA 1555A>G and COI/tRNA^{Ser(UCN)} 7444G>A mutations on mitochondria function through establishing platelet fusion cell lines with mitochondrial mutations. First, we collected the peripheral blood of control group, patients with 12S rRNA 1555A>G mutation, patients with COI/tRNA^{Ser(UCN)} 7444G>A mutation and patients with both above mutations to establish platelet fusion cell lines. Second, we selected the satisfactory platelet fusion cell lines and studied their function including the amount of reactive oxygen species (ROS) in cells, the level of mitochondrial membrane potential, the level of protein and the steady-state level of tRNA. We investigated the mitochondria function of platelet fusion cell lines in each group, compared with control group, cells with 12S rRNA 1555A>G mutation generated 66.54% more ROS with a 32.86% drop in $\Delta\Psi_m$ level, cells with COI/tRNA^{Ser(UCN)} 7444G>A mutation generated 83.09% more ROS with a 0.66% drop in $\Delta\Psi_m$ level, and cells with both above mutations generated 131.08% more ROS with a 29.86% drop in $\Delta\Psi_m$ level. According to the results of Western blot, the levels of CO1, CO2, ND4, ND5 and ND6 in experimental groups decreased in different degrees compared with control group except for ND4, ND5 and ND6 in cells with 12S rRNA 1555A>G mutation which showed no significant difference. According to the results of Northern blot, 7444G>A mutation didn't alter the steady-state level of tRNA^{Ser(UCN)} obviously. Thus, COI/tRNA^{Ser(UCN)} 7444G>A mutation might just be a modifying factor with regard to the pathological effects of gene with 12S rRNA 1555A>G mutation, but in the process of hearing loss, 12S rRNA 1555A>G mutation played a dominant role.

Keywords NSHL; mitochondrial tRNA^{Ser(UCN)} gene; mutant; dysfunction

耳聋影响着人类身心健康和生活质量, 已覆盖全球3.6亿人口^[1], 是当今社会主要公共卫生问题之一。根据是否伴有其他症状, 耳聋可分为非综合征性耳聋(nonsyndromic hearing impairment, NSHI)和综合征性耳聋(syndromic hearing impairment, SHI)。线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)突变是造成听力损失的重要原因之一^[2], 尤其线粒体12S rRNA和tRNA^{Ser(UCN)}基因是导致非综合征性耳聋的两个突变热点区域^[3-4], 突变包括1555A>G、1494C>T^[3]、7445A>G、7472insC、7510T>C和7511T>C^[5]。COI/tRNA^{Ser(UCN)} 7444G>A突变造成线粒体重链上COI基因终止密码子AGA改变为AAA, 使由COI基因翻译出的多肽在C-端增加了3个氨基酸残基(赖氨酸-谷氨酰胺-赖氨酸)^[5], 同时, 线粒体COI/tRNA^{Ser(UCN)} 7444G>A位点临近轻链上tRNA^{Ser(UCN)}前体3'端外切核酸酶的作用位点, 而且线粒体tRNA初级转录产物3'端多余核苷酸需在外切核酸酶的作用下从末端逐个切除。有研究表明, tRNA^{Ser(UCN)}前体上7445A>G突变可导致tRNA^{Ser(UCN)}前体加工缺陷, 引起tRNA^{Ser(UCN)}稳定性和ND6 mRNA量的明显下降^[6]。这样, 与m.7445A>G突变相近的m.7444G>A突变可能也会以相同机制造成线粒体功能下降。因此, m.7444G>A突变是有可能加重由m.1555A>G突变造成的线粒体功能障碍。本研究建立了一个同时携带线粒体

COI/tRNA^{Ser(UCN)} 7444G>A和12S rRNA 1555A>G的非综合征性耳聋家系的血小板融合细胞系, 通过对该家系血小板融合细胞系的细胞内活性氧类(reactive oxygen species, ROS)生成量、线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)水平、蛋白质水平、tRNA稳态水平的研究, 从线粒体功能水平对该位点的致病性进行了评估, 为耳聋的早期诊断、预防和遗传咨询提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究通过血小板融合技术构建了对照以及携带线粒体12S rRNA 1555A>G和COI/tRNA^{Ser(UCN)} 7444G>A突变的血小板融合细胞系。外周血来源于参加此项研究的试验者, 所有试验者按照温州医科大学伦理委员会管理规定的管理方法, 签署知情同意书。随后, 对研究对象进行了详细的听力和临床体格检查, 排除综合征性耳聋, 同时深入细致地询问了患者及其家系成员的耳聋病史, 是否有氨基糖苷类抗生素(aminoglycoside antibiotics, AmAn)使用史以及是否存在其他致聋因素等。听力学检查包括纯音测听(pure-tone hearing threshold, PTA)、听觉脑干反应(auditory brainstem responses, ABR)、声导抗以及畸变产物耳声反射(distortion product oto-acoustic

emission, DPOAE)。耳聋以听力水平的分贝(dBHL)数为单位进行测量,并以语言频率(500、1 000、2 000、4 000和8 000 Hz)的听阈平均值计算,将听力损失的严重程度分成5级,正常<26 dBHL、轻度聋26~40 dBHL、中度聋41~70 dBHL、重度聋71~90 dBHL及极重度聋>90 dBHL。

1.2 线粒体基因组全序列分析

从外周血或血小板融合细胞中按照Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.4.0(TaKaRa公司)的使用说明提取基因组DNA, -20 °C保存备用。以提取的外周血全基因组DNA为模板,通过PCR扩增先证者及对照组成员线粒体DNA,使用24对引物进行线粒体全基因组扩增,PCR产物纯化后,送基因测序公司进行双向测序,测序结果与校正的剑桥标准序列^[7]进行比对,以确定是否含有耳聋相关热点基因突变。

1.3 细胞培养

血小板融合细胞系是从全血中分离血小板,与ρ⁰206细胞融合,此法操作简单,时间短,核背景稳定,并含有特定突变的线粒体DNA,可以排除核基因影响,对研究线粒体对细胞功能的影响带来了极其有意义的作用,使得在体外研究细胞功能和分子遗传机制变为可能。本研究建立的血小板融合细胞系包括1个携带1555A>G和7444G>A突变的个体(MTD127), 1个携带1555A>G突变的个体(MTD005), 1个携带7444G>A突变的个体(WZ21), 1个不携带

1555A>G和7444G>A突变的个体(CO70)。所有的细胞系采用以不含丙酮酸的DMEM为培养基,同时添加10% FBS进行培养,置于37 °C、5% CO₂及饱和湿度的恒温培养箱中培养。

1.4 细胞系鉴定

1.4.1 线粒体突变位点鉴定 酚氯仿法提取单克隆细胞团的全基因组DNA,针对线粒体1 555和7 444位点进行引物扩增,引物序列详见表1,并用直接测序法进行鉴定分析,排除假阳性克隆。

1.4.2 线粒体拷贝数测定 对已鉴定线粒体位点的克隆团细胞(正常对照和突变样本)进行荧光定量PCR测定拷贝数。本实验以18S rRNA为核基因内参,以MT-ND1区段序列代表线粒体DNA,引物序列详见表2,通过ABI Step One Pluss Real-time PCR仪测定相对的mtDNA和18S rRNA比值。

1.5 细胞内活性氧类检测

采用上海碧云天生物技术有限公司ROS检测试剂盒(reactive oxygen species assay kit S0033),应用流式细胞术检测细胞内ROS水平^[1,8-9]。每个细胞系取1×10⁶个细胞,重悬于含有100 μmol/L的2',7'-二氯二乙酸酯(2',7'-dichloroethyl acetate, DCFH-DA)的PBS中,然后再于37 °C孵育20 min; H₂O₂刺激组用PBS洗涤2次后重悬于新鲜制备的含有2 mmol/L H₂O₂的PBS中,室温孵育5 min。最后,将细胞用PBS洗涤1次,重悬于300 μL的PBS。正常和H₂O₂刺激的样品通过BD-Accuri-C6流式细胞仪进行分析,分别在488 nm

表1 引物信息

Table 1 Primers information

引物名称 Name	位置 Site	引物序列(5'→3') Sequence of primers (5'→3')
F1(1555)	1 245-2 007	CGA TCA ACC TCA CCA CCT CT
R1(1555)		TGG ACA ACC AGC TAT CAC CA
F2(7444)	7 129-8 114	ACG CCA AAA TCC ATT TCA CT
R2(7444)		CGG GAA TTG CAT CTG TTT TT

表2 实时荧光定量PCR所用引物

Table 2 Primers for Real-time PCR

引物名称 Name	引物序列(5'→3') Sequence of primers (5'→3')
RT-mtDNA-F	CAC CCA AGA ACA GGG TTT GT
RT-mtDNA-R	TGG CCA TGG GTA TGT TGT TAA
RT-18S-F	TAG AGG GAC AAG TGG CGT TC
RT-18S-R	CGC TGA GCC AGT CAG TGT

和525 nm时激发和发射。

1.6 线粒体膜电位检测

使用Abcam公司的JC-10荧光染料,应用流式细胞术检测线粒体膜电位水平^[10]。在6孔板中接种约 1×10^6 个细胞,在37 °C、5% CO₂条件下加入JC-10(Abcam)染液孵育20 min。阳性对照在JC-10染料染色前用10 μmol/L解偶联剂羰氰化3-氯苯(CCCP)在37 °C、5% CO₂条件下预处理30 min。使用BD-Accuri-C6流式细胞仪测定Ex/Em=585 nm/590 nm和Ex/Em=514 nm/529 nm为JC-10聚合物和JC-10单体的荧光强度。

1.7 蛋白质水平检测

将30 μg从裂解细胞中获得的蛋白质进行变性,并在十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶中电泳。随后,将蛋白质转移到PVDF膜。膜在含有5%(W/V)牛奶的TBST(150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH值为7.5和0.1% Tween 20)中封闭2~4 h,然后加入相应的一抗和二抗。在这个实验中使用的一抗是兔抗-ND4、ND5和ND6,鼠抗-CO1、CO2和β-actin(Abcam公司);二抗是辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(碧云天生物科技有限公司)。应用ECL系统(CWBIO)检测蛋白质信号。

1.8 tRNA稳态水平检测

使用TOTALLY RNA™ Kit试剂盒(Ambion)从血小板融合细胞系中提取线粒体RNA。2 μg线粒体总RNA(样品在65 °C中加热10 min)在7 mol/L尿素/10%聚丙烯酰胺凝胶中电泳,缓冲液为1×TBE,然后由凝

胶转到尼龙膜(Roche)上与寡核苷酸探针杂交分析。利用DIG oligonucleotide Tailing kit试剂盒(Roche),生成了被标记的寡脱氧核苷酸,有tRNA^{Ser(UCN)}、tRNA^{Gln}、tRNA^{Lys}、tRNA^{Leu(UUR)}、tRNA^{Glu}和5S。在杂交炉中进行杂交。

1.9 统计学方法

采用SPSS 24.0统计学软件或Microsoft-Excel程序(版本2010)中的t检验进行数据统计分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

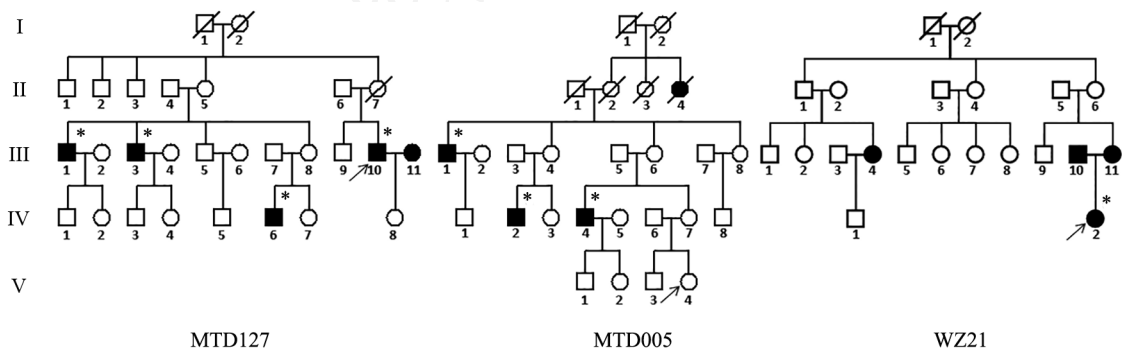
2 结果

2.1 听力学及临床检查结果分析

在MTD127家系中,先证者III-10,男,35岁。发病年龄3岁,诱因为发热,静脉注射氨基糖苷类抗生素药物史。ABR结果表明,其听力损失为极重度感音神经性耳聋。对该家系其他成员进行临床和遗传学的评估,发现该家系主要成员生活在浙江省温州市永嘉县,共3代18人(图1),家系中所有耳聋患者均为母系成员后代,符合母系遗传方式;该家系共有4位听力下降的母系成员(III-1、III-3、III-10及IV-6),均为男性,听力损失程度从重度到极重度;先证者听力图结构主要为斜坡型(III-10)(图2和表3)。检查发现,该家系成员以双侧对称的听力障碍为唯一的临床症状,未发现其他临床症状,如糖尿病、肌病、心血管疾病等。

2.2 线粒体基因组突变分析

该家系呈现母系遗传特征,提示线粒体DNA突变可能是致病的分子基础。我们首先对先证者线粒体12S rRNA基因进行测序分析,发现了存在

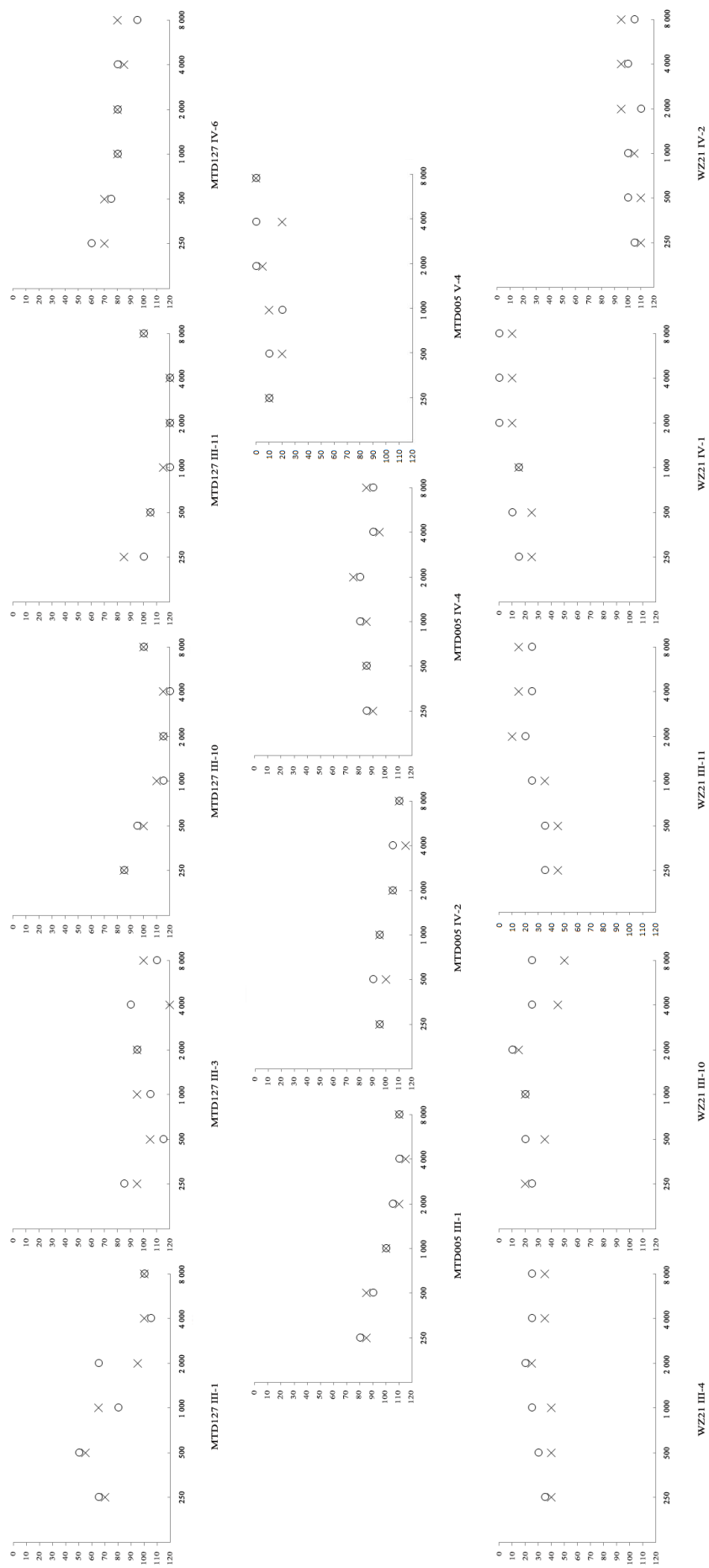


MTD127为同时携带m.1555A>G和m.7444G>A突变的家系,MTD005为携带m.1555A>G突变的家系,WZ21为携带m.7444G>A突变的家系。黑色符号表示听力下降者;箭头所指为先证者;*表示有AmAn用药史。

MTD127 is Chinese family with m.1555A>G and m.7444G>A. MTD005 is Chinese family with m.1555A>G. WZ21 is Chinese family with m.7444G>A. Hearing impaired individuals are indicated by filled symbols; arrow denotes proband, * denotes the individuals who had a history of exposure to aminoglycosides.

图1 耳聋家系的家系图

Fig.1 Chinese families with hearing loss



x: 左耳; o: 右耳。
 x: left ear; o: right ear.

图2 家系中部分患者的听力图
 Fig.2 Air conduction audiogram of some patients in the Chinese families

m.1555A>G突变(图3)。为了确定线粒体多态性在m.1555A>G突变的临床表型中的作用,我们对先证者线粒体全基因组进行了扩增和测序,测序结果和修正后的剑桥序列做比较,这个家系除了存在同质性的1555A>G突变外,还存在7444G>A突变及多个多态性位点(表4)。其中,2个是新发现的变异位点,包括D-loop 316insC和16S rRNA 2656 T>C。

2.3 细胞系鉴定分析

2.3.1 线粒体突变位点鉴定 为了证明融合细胞中是否存在突变位点,且与患者携带的突变一致,本文对构建的细胞模型使用直接测序法进行线粒体位

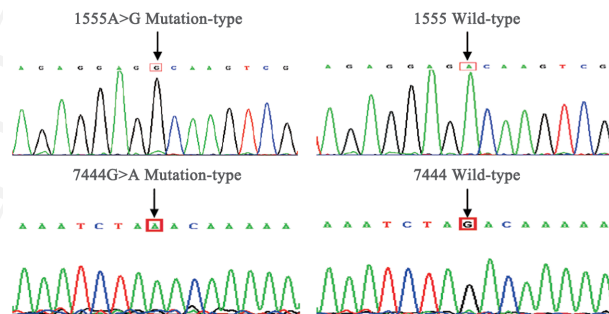
点鉴定。正常对照的血小板融合细胞系中在1 555位点的是纯合A碱基,在7 444位点的是纯合G碱基。MTD005样本的血小板融合细胞系中1 555位点突变为纯和的G碱基。WZ21样本的血小板融合细胞系中7 444位点突变为纯和的A碱基。MTD127样本的血小板融合细胞系中1 555位点突变为纯和的G碱基,7 444位点突变为纯和的A碱基。此结果表明,这四组细胞系携带的突变位点与患者体内细胞一致,建系成功,细胞可用于存储或后续的细胞功能分析。

2.3.2 线粒体拷贝数分析 血小板是巨核细胞的衍生物,成熟的血小板内无细胞核,每个血小板平均

表3 家系中部分成员的临床资料表

Table 3 Summary of the clinical data of some members in the Chinese families

编号 Code	性别 Sex	年龄(年) Age (years)		氨基糖苷类药物史 Use of aminoglycosides	纯音测听(dBHL) PTA (dBHL)		听力损失程度 Level of hearing impairment	听力曲线类型 Audiometric configuration
		发病年龄 At onset	检测年龄 At testing		右耳 Right ear	左耳 Left ear		
MTD127 III-1	M	38	2	Yes	80	83	Severe	Sloping
MTD127 III-3	M	37	1	Yes	103	103	Profound	Flat
MTD127 III-10	M	35	3	Yes	109	108	Profound	Sloping
MTD127 III-11	F	37	1	NO	113	112	Profound	Sloping
MTD127 IV-6	M	13	<1	Yes	82	79	Severe	Sloping
MTD005 III-1	M	58	5	Yes	103	104	Profound	Sloping
MTD005 IV-2	M	45	2	Yes	101	105	Profound	Sloping
MTD005 IV-4	M	38	3	Yes	85	85	Severe	Flat
MTO005 V-4	F	15	/	NO	6	11	Normal	Flat
WZ21 III-4	F	38	38	NO	25	35	Mild	Flat
WZ21 III-10	M	38	38	NO	20	33	Mild	Flat
WZ21 III-11	F	36	36	NO	26	24	Mild	Rising
WZ21 IV-1	M	13	/	NO	5	14	Normal	Flat
WZ21 IV-2	F	11	3	Yes	103	100	Profound	Flat



mtDNA 1 555位点和7 444位点的测序峰图。箭头指示mtDNA 1 555位点和7 444位点碱基变化。

Partial sequence chromatograms of mtDNA 1 555 and 7 444. Arrows indicate the location of the base changes.

图3 家系中患者与正常人m.1555A>G位点和m.7444G>A位点的测序峰图结果

Fig.3 Partial sequence chromatograms of the fragments carrying the m.1555A>G or m.7444G>A mutation from affected individuals and controls from the family

表4 四个样本的线粒体DNA全序列分析
Table 4 mtDNA variants in four samples

基因 Gene	位点 Position	碱基替换 Replacement	保守性 (H/B/M/X) ^a Conservatism (H/B/M/X) ^a	是否已报道 ^b Previously reported ^b	CO70	MTD005	WZ21	MTD127
D-loop	73	A to G		Y	G	G	G	G
	146	T to C		Y				C
	152	T to C		Y			C	
	217	T to C		Y			C	
	249	A to del		Y		del		
	263	A to G		Y	G	G	G	G
	307	C to T		Y				T
	309	C to T		Y	T			
	310	T to C/A		Y	C			A
	314	C to del		Y				del
	315	C to del		Y				del
	316	G to A		Y	A			
	316	G to insC		N		insC	insC	
	374	A to G		Y		G		
	456	C to T		Y		T		
	489	T to C		Y			C	
	523	A to del		Y			del	del
	524	C to del		Y			del	del
	16 093	T to C		Y			C	
	16 129	G to A		Y			A	A
	16 150	C to T		Y			T	
	16 162	A to G		Y			G	
	16 172	T to C		Y			C	
	16 176	C to T		Y		T		
	16 182	A to C		Y				C
	16 183	A to C		Y		C		C
	16 189	T to C		Y				C
	16 223	C to T		Y			T	
	16 304	T to C		Y			C	C
	16 362	T to C		Y			C	
16 519	T to C		Y			C		
12S rRNA	709	G to A	G/A/A/-	Y				A
	750	A to G	A/A/A/-	Y	G	G	G	G
	827	A to G	A/A/A/A	Y	G			
	1 313	A to G	A/A/T/T	Y		G		
	1 438	A to G	A/A/A/G	Y	G	G	G	
16S rRNA	1 555	A to G	A/A/A/A	Y		G		G
	1 811	A to G	A/A/A/A	Y			G	
	2 656	T to C	T/T/T/T	N				C
	2 706	A to G	A/G/A/A	Y	G	G	G	G
	3 010	G to A	G/G/A/A	Y			A	
	3 107	N to del	N/T/T/T	Y	del	del	del	del
	3 206	C to T	C/A/C/A	Y			T	
ND1	3 970	C to T	L/L/L/L	Y		T		
	4 086	C to T	V/M/T/M	Y		T		
ND2	4 769	A to G	M/M/M/I	Y	G	G	G	G

续表4

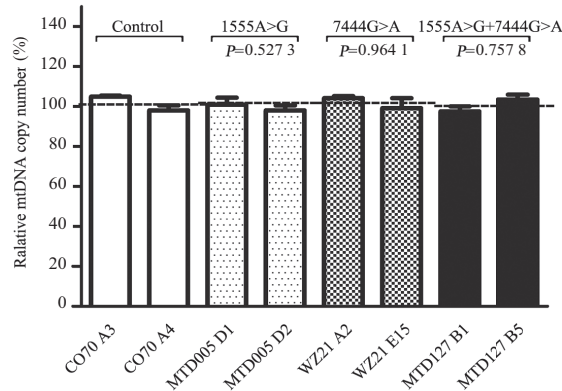
基因 Gene	位点 Position	碱基替换 Replacement	保守性 (H/B/M/X) ^a Conservatism (H/B/M/X) ^a	是否已报道 ^b Previously reported ^b	CO70	MTD005	WZ21	MTD127	
CO1	4 883	C to T	P/P/P/P	Y			T		
	5 178	C to A	L/T/T/T	Y			A		
	5 442	T to C	F/F/M/L	Y			C		
	5 465	T to C	L/L/M/L	Y				C	
	6 392	T to C	N/N/N/N	Y		C			
	6 962	G to A	L/L/L/L	Y		A			
	7 028	C to T	A/A/A/A	Y	T	T	T	T	
CO2	7 444	G to A		Y			A	A	
	7 705	T to C	Y/Y/Y/Y	Y				C	
Non-coding	7 864	C to T	P/P/P/P	Y	T				
	8 281-8 289	del CCCCCTCTA		Y	del			del	
ATP8	8 414	C to T	L/F/M/W	Y			T		
ATP6	8 473	T to C	P/N/A/E	Y			C		
	8 701	A to G	T/S/L/Q	Y			G		
	8 860	A to G	T/A/A/T	Y	G	G	G	G	
CO3	9 053	G to A	S/G/G/T	Y		A			
	9 123	G to A	L/L/L/L	Y				A	
	9 540	T to C	L/L/L/L	Y			C		
	9 548	G to A	G/G/G/E	Y		A			
	10 238	T to C	I/I/I/I	Y				C	
ND3	10 310	G to A	I/L/T/P	Y		A			
	10 398	A to G	T/T/T/A	Y			G		
	10 400	C to T	T/T/T/A	Y			T		
	10 609	T to C	M/T/T/T	Y		C			
ND4	10 873	T to C	P/S/S/S	Y			C		
	11 719	G to A	G/G/G/G	Y	A	A	A	A	
ND5	11 914	G to A	L/L/L/L	Y	A				
	12 406	G to A	V/F/S/F	Y		A			
	12 705	C to T	I/L/L/T	Y			T		
	12 732	T to C	V/V/T/V	Y	C				
	12 849	A to G	A/A/A/A	Y				G	
	12 882	C to T	F/F/F/L	Y		T			
	13 443	T to C	T/T/T/T	Y				C	
	13 759	G to A	A/T/T/I	Y		A			
	13 821	C to T	F/I/V/V	Y		T			
	13 928	G to C	S/T/S/T	Y		C			
ND6	13 942	A to G	T/L/I/M	Y	G				
	14 668	C to T		Y			T		
	CytB	14 766	C to T	T/S/T/S	Y	T	T	T	
		14 783	T to C	L/I/I/I	Y			C	
		14 979	T to C	I/I/L/L	Y			C	
	15 038	A to G	V/V/I/I	Y	G				
	15 043	G to A	G/G/G/G	Y			A		
15 301	G to A	L/L/L/L	Y			A			
15 326	A to G	T/M/I/I	Y	G	G	G	G		

续表4

基因 Gene	位点 Position	碱基替换 Replacement	保守性 (H/B/M/X) ^a Conservatism (H/B/M/X) ^a	是否已报道 ^b Previously reported ^b	CO70	MTD005	WZ21	MTD127
	15 535	C to T	N/N/N/I	Y	T			
tRNA-Thr	15 930	G to A		Y	A			

^a氨基酸或核苷酸在人(H)、牛(B)、鼠(M)和非洲爪蟾(X)中的保守性。^b见线粒体基因组数据库网站<http://www.mitomap.org>。

^aConservation of amino acid for polypeptides or nucleotide for rRNAs in human (H), bovine (B), mouse (M), and *Xenopus laevis* (X). ^bSee the online mitochondrial genome database <http://www.mitomap.org>.



通过实时荧光定量PCR(Real-time PCR)测定相对的mtDNA 和18S rRNA比值进行分析。实验重复3次, 数据以mean±S.D.形式表示。

The relative levels of mtDNA and 18S rRNA were analyzed by Real-time PCR. Each point represents the mean±S.D. of three independent experiments.

图4 线粒体拷贝数水平比较

Fig.4 Relative levels of mtDNA copy number

含有4个线粒体, 每个线粒体内平均有1个mtDNA分子。用mtDNA拷贝数来替代细胞线粒体含量。鉴于线粒体拷贝数(或线粒体含量)对线粒体功能的影响, 本文在筛选与鉴定血小板融合细胞系时不仅进行了突变位点的鉴定, 还检测了线粒体拷贝数。对已鉴定线粒体位点的克隆株细胞(正常对照、1 555突变、7 444突变和双突变)进行线粒体拷贝数检测。各样本选取线粒体拷贝数没有显著差异的细胞株, 即正常对照组CO70 A3和A4克隆株细胞、MTD005 D1和D2克隆株细胞, WZ21 A2和E15克隆株细胞及MTD127 B1和B5克隆株细胞, 用于后续实验(图4)。

2.4 活性氧类检测结果

在正常情况下和H₂O₂刺激条件下使用流式细胞术检测对照组、单突变组和双突变组细胞系的细胞内ROS水平, 记录检测到的每个样本的ROS几何平均荧光强度。每个样本的刺激组与非刺激组的几何平均荧光强度之比表示氧胁迫下ROS的增加水平^[9]。如图5所示, 与对照组相比, 仅携带m.1555A>G单突变组细胞ROS上升66.54%(P=0.009 1), 仅携带m.7444G>A单突变组细胞ROS上升83.09%(P=0.000 7), 而同时携

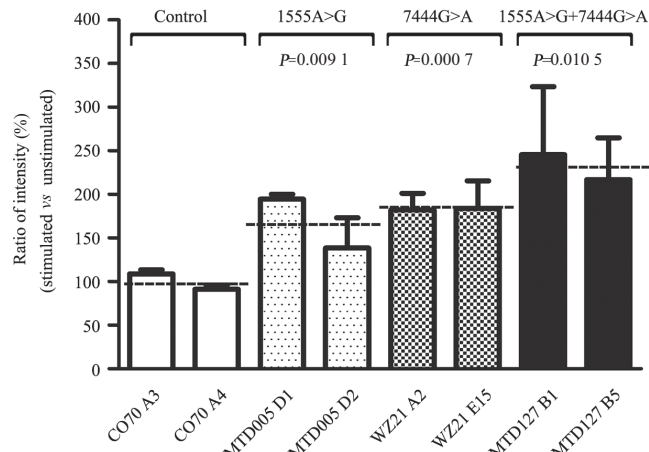
带m.1555A>G和m.7444G>A双突变组细胞ROS上升131.08%(P=0.010 5)。

2.5 膜电位检测结果

线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)在控制呼吸速率, ATP合成和ROS的产生中起着重要作用^[1,10]。我们使用JC-10荧光染料检测正常对照组、单突变组和双突变组细胞系的 $\Delta\Psi_m$ 水平。Ex/Em=490 nm/590 nm和Ex/Em=490 nm/529 nm的荧光强度比(FL590/FL529)反映每个样本的 $\Delta\Psi_m$ 水平。如图6所示, 与对照组相比, m.1555A>G单突变组的 $\Delta\Psi_m$ 水平下降32.86%(P=0.000 2), m.7444G>A单突变组的 $\Delta\Psi_m$ 水平下降0.66%(P=0.947 5), m.1555A>G和m.7444G>A双突变组的 $\Delta\Psi_m$ 水平下降29.86%(P=0.002 4)。

2.6 蛋白质水平检测结果

为了了解CO1/tRNA^{Ser(U^{CN})} 7444G>A突变是否会加重12S rRNA 1555A>G突变对细胞蛋白质翻译水平的影响, 本论文对正常对照和突变组的小血小板融合细胞系通过Western blot对线粒体基因编码的5个多肽的表达水平进行了检测。其中, ND4、ND5和ND6属于复合体I上的亚基; CO1和CO2参与组成复合体IV上的

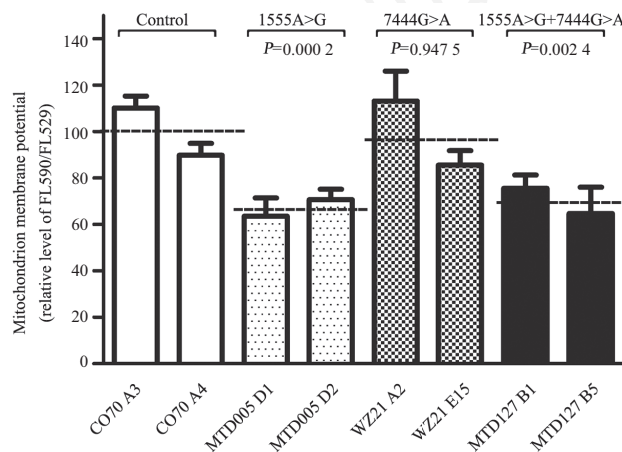


通过BD-Accuri-C6流式细胞仪对有或没有H₂O₂刺激的突变组 and 对照组样品进行ROS分析。计算相对强度(刺激组/非刺激组)。实验独立重复3次, 数据以mean±S.D.形式表示。

The rates of production in ROS from mutant cell lines and control cell lines were analyzed by BD-Accuri-C 6 flow cytometer system with or without H₂O₂ stimulation. The relative ratio of intensity (stimulated versus unstimulated with H₂O₂) was calculated. Each point represents the mean±S.D. of three independent experiments.

图5 细胞内ROS水平比较

Fig.5 Relative levels of ROS production



使用JC-10荧光染料对突变组和对照组样品进行染色后,应用BD-Accuri-C6流式细胞仪分析线粒体膜电位, Ex/Em=490 nm/590 nm和Ex/Em=490 nm/529 nm的荧光强度比(FL590/FL529)表示每个样本的ΔΨm水平。突变组与对照组的FL590/FL529相对比率反映了膜电位的相对水平。实验独立重复4次, 数据以mean±S.D.形式表示。

The mitochondrial membrane potential (ΔΨm) in mutant and control cell lines were analyzed by BD-Accuri-C6 flow cytometer using a fluorescence probe JC-10 assay. The ratio of fluorescence intensities Ex/Em=490 nm/590 nm and Ex/Em=490 nm/529 nm(FL590/FL529) were recorded to delineate the ΔΨm level of each sample. Relative ratio of JC-10 fluorescence intensities at Ex/Em=490 nm/529 nm and Ex/Em=490 nm/590 nm. Each point represents the mean±S.D. of 4 independent experiments.

图6 线粒体膜电位水平分析

Fig.6 Mitochondrial membrane potential analysis

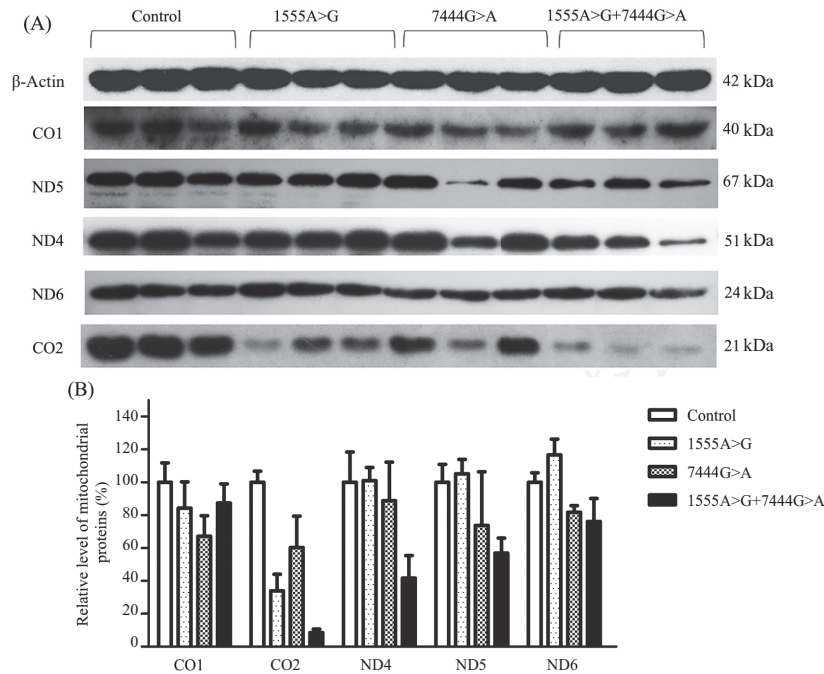
亚基^[11], 本实验以β-Actin为内参^[12](图7A)。

对Western blot的结果处理分析, 数据显示与对照相比, 各突变样本的CO1、CO2均有不同程度的下降, 仅携带m.1555A>G单突变样本中ND4、ND5和ND6差异不明显(图7B), 而携带有m.7444G>A突变样本中ND4、ND5和ND6均有不同程度的下降(表5)。

2.7 tRNA稳态水平检测结果

为了进一步确认7444G>A突变这一变化是否

对线粒体tRNA^{Ser(UCN)}的代谢造成影响, 本文分别提取各样本的线粒体RNA, 并从tRNA所在的重链和轻链以及氨基酸的酸碱性的角度, 分别选取了与地高辛标记的线粒体tRNA^{Ser(UCN)}、tRNA^{Glu}、tRNA^{Gln}、tRNA^{Leu(UUR)}、tRNA^{Lys}和细胞的核基因编码的5S rRNA探针进行了Northern blot杂交实验^[13], tRNA稳态水平检测的探针序列见表6, 结果分析如图8所示, 各突变样本的线粒体tRNA^{Ser(UCN)}、tRNA^{Glu}、



A: 蛋白质经SDS-PAGE电泳显影后各个条带图; B: 5种线粒体蛋白质半定量分析图。
A: the protein is shown after the SDS-PAGE electrophoresis; B: semi-quantitative analysis of 5 kinds of mitochondrial proteins.

图7 Western blot分析线粒体蛋白质水平

Fig.7 Mitochondrial protein level analysed by Western blot

表5 各突变组线粒体蛋白质水平占对照组的百分比

Table 5 Mitochondrial protein level of each mutation group accounted for the percentage of control group

多肽 Polypeptide	MTD005 1555A>G	WZ21 7444G>A	MTD127 1555A>G+7444G>A
CO1	84.33% ($P=0.474$)	67.24% ($P=0.129$)	87.39% ($P=0.489$)
CO2	33.97% ($P=0.006$)	60.31% ($P=0.122$)	8.54% ($P<0.000$)
ND4	101.03% ($P=0.961$)	88.77% ($P=0.726$)	41.68% ($P=0.064$)
ND5	105.18% ($P=0.731$)	73.80% ($P=0.490$)	56.96% ($P=0.039$)
ND6	116.70% ($P=0.212$)	81.79% ($P=0.062$)	76.14% ($P=0.192$)

tRNA^{Gln}、tRNA^{Leu(UUR)}稳态水平均有不同程度的下降, 而线粒体tRNA^{Lys}的稳态水平差异不明显, 详见表7。

3 讨论

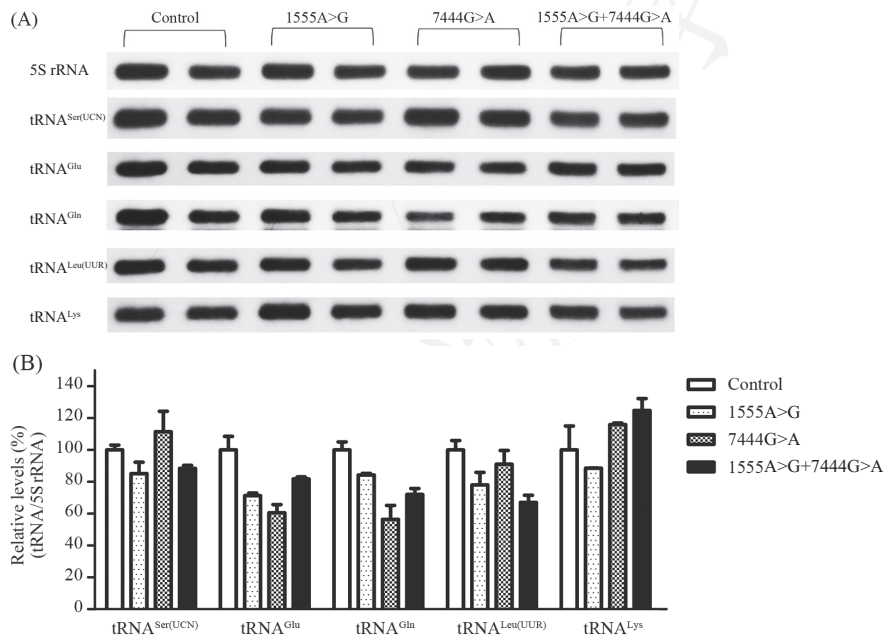
根据家系调查, 排除了综合征性耳聋和其他临床症状后, 发现MTD127家系中4位母系成员(III-1、III-3、III-10及IV-6)均出现不同程度的听力下降, 并且除听力下降外无其他临床症状。同时, 对先证者进行了与耳聋相关的常见核基因GJB2、GJB3、GJB6、SLC26A4等的检测, 但未检测到GJB2基因235位点, GJB3基因547位点, GJB6基因228位点, SLC26A4基因22 819位点等常见位点发生突变。家系中其他成员听力表现正常, 提示该家系的耳聋表型为母系遗传。目前, 与氨基糖苷类药物性耳聋和非综合征性

耳聋密切相关的mtDNA突变主要集中在线粒体12S rRNA和tRNA^{Ser(UCN)}基因上^[3-4]。而对先证者的线粒体DNA全序进行分析, 发现该患者除了携带同质性12S rRNA 1555A>G外, 还有CO1/tRNA^{Ser(UCN)} 7444G>A位点变异。我们以前的研究表明, 线粒体tRNA变异位点, 如tRNA^{Glu} 14693A>G、tRNA^{Thr} 15908T>C、tRNA^{Thr} 15927G>A、tRNA^{Arg} 10454T>C和tRNA^{Cys} 5821G>A可能是这5个携带 m.1555A>G突变的中国家系耳聋外显率较高的原因^[14-17]。m.7444G>A突变造成线粒体重链上COI基因终止密码子AGA改变为AAA, 使由COI基因翻译出的多肽在C-端增加了3个氨基酸残基(赖氨酸-谷氨酰胺-赖氨酸), 同时, 也临近轻链上tRNA^{Ser(UCN)}前体上3'端外切核酸酶的作用位点^[5]。tRNA初级转录产物5'端多余核苷酸的切除是在内切

表6 探针序列

Table 6 The probe sequence

探针名称 Name	核苷酸序列(5'→3') Sequence of probes (5'→3')
tRNA ^{Leu(UUR)}	TGT TAA GAA GAG GAA TTG AAC CTC TGA CTG TAA
tRNA ^{Gln}	CTA GGA CTA TGA GAA TCG AAC CCA TCC CTG AGA
tRNA ^{Ser(UCN)}	CAA GCC AAC CCC ATG GCC TC
tRNA ^{Glu}	TAT TCT CGC ACG GAC TAC AA
tRNA ^{Lys}	TCA CTG TAA AGA GGT GTT GGT TCT CTT AAT CTT
5s rRNA	GGG TGG TAT GGC GGT AGA C



A: Northern blot 线粒体 tRNA 实验图像; B: 线粒体 tRNA 相对含量。

A: mitochondrial tRNA experimental images of Northern blot; B: mitochondrial tRNA relative content.

图8 Northern blot 结果图

Fig.8 Results of Northern blot

表7 各突变组线粒体 tRNA 表达占对照组的百分比

Table 7 Mitochondrial tRNA expression of each mutation group accounted for the percentage of control group

tRNA	MTD005 1555A>G	WZ21 7444G>A	MTD127 1555A>G+7444G>A
tRNA ^{Ser(UCN)}	85.22% ($P=0.197$)	111.39% ($P=0.537$)	88.43% ($P=0.086$)
tRNA ^{Glu}	71.35% ($P=0.174$)	60.51% ($P=0.079$)	81.85% ($P=0.273$)
tRNA ^{Gln}	84.33% ($P=0.094$)	56.43% ($P=0.049$)	72.12% ($P=0.048$)
tRNA ^{Leu(UUR)}	78.03% ($P=0.156$)	91.10% ($P=0.493$)	67.05% ($P=0.047$)
tRNA ^{Lys}	88.58% ($P=0.587$)	115.95% ($P=0.481$)	124.84% ($P=0.318$)

核酸酶RNaseP的催化下完成的, 3'端多余核苷酸是在核酸外切酶RNaseD的作用下从末端逐个切除^[18]。有研究表明, tRNA^{Ser(UCN)}前体上m.7445A>G突变可导致tRNA^{Ser(UCN)}前体加工缺陷, 引起tRNA^{Ser(UCN)}稳定性和ND6 mRNA量的明显下降^[6], 这样与m.7445A>G突变相近的m.7444G>A突变可能也会以相同机制造成线粒体功能下降。以上提示, m.7444G>A可能

也参与了m.1555A>G表型的修饰作用, 进而加重由m.1555A>G突变引起的线粒体功能障碍。本文构建了同时携带m.1555A>G与m.7444G>A双突变的MTD127家系、只携带m.1555A>G突变的MTD005家系、只携带m.7444G>A突变的WZ21家系和正常对照组的血小板融合细胞系(均属于B4单体型), 利用构建成功的细胞系进行了细胞内ROS水平、线粒

体膜电位水平、蛋白质表达量水平和tRNA稳态水平等功能研究。氧化磷酸化的损伤可导致更多的电子从电子传递链漏出,并使突变细胞内ROS的产生增加^[19]。与对照组相比,氧胁迫下双突变组细胞系的ROS水平高于单突变组,提示m.7444G>A可能加重了m.1555A>G对细胞造成细胞的损伤。ROS的主要来源是线粒体氧化过程,正常情况下,会有0.2%的O₂被转变为ROS^[20]。线粒体DNA突变会导致电子传递链中电子流受到损伤,生成过量的ROS^[21-22]。细胞内过量积累的ROS会造成线粒体的氧化应激恶性循环,对线粒体蛋白质、核酸和脂质(lipid)等生物大分子造成损伤,进而造成一系列的线粒体功能障碍^[23-25]。ROS积累是耳蜗毛细胞受到损伤的重要机制,也是各种类型听力损失的重要病理过程,而毛细胞损伤是听力损失的重要病理基础^[21,26]。正常的 $\Delta\Psi_m$ 是维持线粒体功能和进行氧化磷酸化、产生ATP的先决条件, $\Delta\Psi_m$ 水平的下降将会导致线粒体氧化呼吸链异常^[1,27]。与对照组相比,m.1555A>G单突变组的 $\Delta\Psi_m$ 水平下降32.86%,m.7444G>A单突变组的 $\Delta\Psi_m$ 水平下降0.66%,m.1555A>G和m.7444G>A双突变组的 $\Delta\Psi_m$ 水平下降29.86%,说明m.1555A>G突变对线粒体膜电位有影响,而m.7444G>A突变对线粒体膜电位的影响并不明显。

一般而言,ROS水平越高,对线粒体细胞膜的损伤越严重,而本研究中双突变组的ROS水平高于m.1555A>G单突变组,但双突变组线粒体膜电位下降水平并不显著低于m.1555A>G单突变组,提示m.7444G>A可能只是m.1555A>G突变的病理效应的修饰因子,主要还是m.1555A>G突变起主导作用。tRNA代谢功能的正常是蛋白质合成的必要条件,而丝氨酸(UCN)在线粒体编码的大部分多肽中占较大比例(表8),推测m.7444G>A突变对线粒体内蛋白质

合成具有较大影响。Western blot结果显示,突变样本的线粒体编码的CO1、CO2、ND4、ND5和ND6等多肽的表达量均有不同程度的下降,双突变样本下降更明显。Northern blot结果显示,m.7444G>A突变对线粒体tRNA^{Ser(UCN)}稳态水平的改变并不是很明显。然而有趣的是,m.7444G>A单突变组却明显改变了线粒体tRNA^{Gln}的稳态水平。我们在选择轻链上的tRNA探针进行杂交时,选择了tRNA^{Ser(UCN)}远端tRNA^{Glu}和其下游tRNA^{Gln}。Northern blot结果中这两个tRNA的稳态水平均出现了不同程度的下降,而轻链上只存在一个转录起始位点,在转录过程中,mtDNA轻链是整条转录,我们猜测,m.7444G>A类似于7445A>G突变^[28]可能影响轻链前体3'端的剪辑,从而间接影响轻链前体的剪切效率,而由于tRNA^{Gln}在tRNA^{Ser(UCN)}下游,因此,m.7444G>A突变对其稳态水平影响稍大。tRNA^{Phe}、12S rRNA、tRNA^{Val}、16S rRNA、tRNA^{Leu(UUR)}构成重链上一个短转录本^[28-30],m.1555A>G突变影响12S rRNA进而可能会影响tRNA^{Leu(UUR)}的转录,因此,m.1555A>G突变影响12S rRNA进而可能会影响tRNA^{Leu(UUR)}的转录,从而携带m.7444G>A与m.1555A>G双突变组tRNA^{Leu(UUR)}稳态水平出现了明显下降。

综上所述,先证者存在同质性m.1555A>G与m.7444G>A突变,家系呈母系遗传特征。使用正常对照组、m.1555A>G单突变组、m.7444G>A单突变组和m.1555A>G与m.7444G>A双突变组的血小板融合细胞系进行线粒体功能研究,结果表明,m.1555A>G与m.7444G>A突变,导致线粒体ROS生成量升高,蛋白质水平下降等线粒体功能缺陷,且双突变组的ROS生成高于m.1555A>G单突变组,蛋白质水平低于m.1555A>G单突变组;对于 $\Delta\Psi_m$ 水平,m.1555A>G突变对膜电位有影响,而m.7444G>A突变产生的影

表8 线粒体编码多肽中各氨基酸的含量

Table 8 The content of amino acids in mitochondrial encoding polypeptide

多肽 Name	氨基酸残基 总量 Total amino acid residues	丝氨酸(所占比例(%)) The percent of Ser (UCN) (%)	谷氨酸所占比例(%)) The percent of Glu (%)	谷氨酰胺所占比例(%)) The percent of Gln (%)	亮氨酸所占比例(%)) The percent of Leu (UUR) (%)	赖氨酸所占比例(%)) The percent of Lys (%)
CO1	513	5.5	1.9	1.2	1.4	1.9
CO2	227	4.0	4.8	3.1	2.2	1.8
ND4	459	7.2	2.0	2.2	2.0	2.4
ND5	603	5.9	1.5	3.3	1.5	3.5
ND6	174	2.9	5.7	0	8.0	1.1

响不足以显示; 同样tRNA水平的改变也不是很明显, 提示m.7444G>A突变可能只是对m.1555A>G突变的病理效应起到了修饰作用, 但在耳聋发生的过程中, 主要还是m.1555A>G突变起主导作用。

参考文献 (References)

- 1 Gong S, Peng Y, Jiang P, Wang M, Fan M, Wang X, *et al.* A deafness-associated tRNA^{His} mutation alters the mitochondrial function, ROS production and membrane potential. *Nucleic Acids Res* 2014; 42(12): 8039-48.
- 2 Fan W, Zhu Y, Tang X, Xue L. Noninvasive test for mitochondrial DNA A1555G mutation associated with deafness. *Clin Lab* 2017; 63(1): 127-31.
- 3 Meng F, Cang X, Peng Y, Li R, Zhang Z, Li F, *et al.* Biochemical evidence for a nuclear modifier allele (A10S) in TRMU (methylaminomethyl-2-thiouridylylate-methyltransferase) related to mitochondrial tRNA modification in the phenotypic manifestation of deafness-associated 12S rRNA mutation. *J Biol Chem* 2017; 292(7): 2881-92.
- 4 Wang M, Peng Y, Zheng J, Zheng B, Jin X, Liu H, *et al.* A deafness-associated tRNA^{Asp} mutation alters the m1G37 modification, aminoacylation and stability of tRNA^{Asp} and mitochondrial function. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(22): 10974-85.
- 5 Liu Q, Liu P, Ding Y, Dong XJ, Wang ZX, Qian YE, *et al.* Mitochondrial COI/tRNA^{Ser}(UCN) G7444A mutation may be associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing impairment. *Mol Med Rep* 2015; 12(6): 8176-8.
- 6 Ding Y, Leng J, Fan F, Xia B, Xu P. The role of mitochondrial DNA mutations in hearing loss. *Biochem Genet* 2013; 51(7-8): 588-602.
- 7 Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999; 23(2): 147.
- 8 McBee ME, Chionh YH, Sharaf ML, Ho P, Cai MW, Dedon PC. Production of superoxide in bacteria is stress- and cell state-dependent: agating-optimized flow cytometry method that minimizes ROS measurement artifacts with fluorescent dyes. *Front Microbiol* 2017; 8: 459.
- 9 Yu J, Zheng J, Zhao X, Liu J, Mao Z, Ling Y, *et al.* Aminoglycoside stress together with the 12S rRNA 1494C>T mutation leads to mitophagy. *PLoS One* 2014; 9(12): e114650.
- 10 Kanno C, Kang SS, Kitade Y, Yanagawa Y, Takahashi Y, Nagano M. Simultaneous evaluation of plasma membrane integrity, acrosomal integrity, and mitochondrial membrane potential in bovine spermatozoa by flow cytometry. *Zygote* 2016; 24(4): 529-36.
- 11 Sun J, Zhong H, Chen SY, Yao YG, Liu YP. Association between MT-CO3 haplotypes and high-altitude adaptation in Tibetan chicken. *Gene* 2013; 529(1): 131-7.
- 12 Fujimoto M, Sonoyama YK, Fukushima K, Imamoto A, Miyahara F, Miyahara N, *et al.* Increased IRS2 mRNA expression in SGA neonates: PCR analysis of insulin/IGF signaling in cord blood. *J Endocr Soc* 2017; 1(12): 1408-16.
- 13 Accari J, Barth C. Transcription and processing of mitochondrial RNA in the human pathogen *Acanthamoeba castellanii*. *Mitochondrion* 2015; 23: 25-31.
- 14 Yang AF, Zhu Y, Lu JX, Yang L, Zhao JY, Sun DM. [Mitochondrial DNA G7444A mutation may influence the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation]. *Yi Chuan* 2008; 30(6): 728-34.
- 15 Tang XW, Li ZY, Lu JX, Zhu Y, Li RH, Wang JD, *et al.* [Mitochondrial tRNA^{Thr} G15927A mutation may influence the phenotypic manifestation of deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation.]. *Yi Chuan* 2008; 30(10): 1287-94.
- 16 Young WY, Zhao L, Qian Y, Li R, Chen J, Yuan H, *et al.* Variants in mitochondrial tRNA^{Glu}, tRNA^{Arg}, and tRNA^{Thr} may influence the phenotypic manifestation of deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation in three Han Chinese families with hearing loss. *Am J Med Genet A* 2006; 140(20): 2188-97.
- 17 Zhao L, Wang Q, Qian Y, Li R, Cao J, Hart LC, *et al.* Clinical evaluation and mitochondrial DNA sequence analysis in two Chinese families with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336(3): 967-73.
- 18 Betat H, Long Y, Jackman JE, Morl M. From end to end: tRNA editing at 5'- and 3'-terminal positions. *Int J Mol Sci* 2014; 15(12): 23975-98.
- 19 Lv J, Bhatia M, Wang X. Roles of mitochondrial DNA in energy metabolism. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1038: 71-83.
- 20 Wong HS, Dighe PA, Mezera V, Monternier PA, Brand MD. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. *J Biol Chem* 2017; 292(41): 16804-9.
- 21 Addabbo F, Montagnani M, Goligorsky MS. Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension* 2009; 53(6): 885-92.
- 22 Scheffler IE. Mitochondrial disease associated with complex I (NADH-CoQ oxidoreductase) deficiency. *J Inher Metab Dis* 2015; 38(3): 405-15.
- 23 Raimundo N, Song L, Shutt TE, McKay SE, Cotney J, Guan MX, *et al.* Mitochondrial stress engages E2F1 apoptotic signaling to cause deafness. *Cell* 2012; 148(4): 716-26.
- 24 Eirin A, Lerman A, Lerman LO. Mitochondria: a pathogenic paradigm in hypertensive renal disease. *Hypertension* 2015; 65(2): 264-70.
- 25 Hayashi G, Cortopassi G. Oxidative stress in inherited mitochondrial diseases. *Free Radic Biol Med* 2015; 88(Pt A): 10-7.
- 26 Leis JA, Rutka JA, Gold WL. Aminoglycoside-induced ototoxicity. *CMAJ* 2015; 187(1): E52.
- 27 de Andrade PB, Rubi B, Frigerio F, van den Ouweland JM, Maassen JA, Maechler P. Diabetes-associated mitochondrial DNA mutation A3243G impairs cellular metabolic pathways necessary for beta cell function. *Diabetologia* 2006; 49(8): 1816-26.
- 28 Guan MX, Enriquez JA, Fischel-Ghodsian N, Puranam RS, Lin CP, Maw MA, *et al.* The deafness-associated mitochondrial DNA mutation at position 7445, which affects tRNA^{Ser}(UCN) precursor processing, has long-range effects on NADH dehydrogenase subunit ND6 gene expression. *Mol Cell Biol* 1998; 18(10): 5868-79.
- 29 Montoya J, Christianson T, Levens D, Rabinowitz M, Attardi G. Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79(23): 7195-9.
- 30 Montoya J, Gaines GL, Attardi G. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* 1983; 34(1): 151-9.