

线粒体拟核结构及相关疾病研究进展

何向宇¹ 金利平² 刘忠³ 严庆丰^{1*}

¹ 浙江大学生命科学学院, 浙江大学遗传学研究所, 杭州 310058;

² 浙江省杭州市良渚镇安溪卫生院, 杭州 311113;

³ 浙江大学医学院附属第一医院, 杭州 310003)

摘要 线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)与一系列蛋白质相互作用形成核蛋白复合体, 并包装折叠成类似原核生物拟核的结构, 称为线粒体拟核(mitochondrial nucleoid)。参与线粒体拟核组成的相关蛋白包括线粒体转录因子、线粒体单链DNA结合蛋白以及多种参与线粒体中代谢途径的多功能蛋白。线粒体拟核结构的阐明对于进一步研究线粒体形态与功能以及mtDNA的遗传模式、基因表达调控具有重要意义。本文综述了线粒体拟核结构的最新研究进展, 着重介绍组成拟核结构的重要蛋白, 以及这些蛋白如何将mtDNA与柠檬酸循环等线粒体重要代谢途径相联系。同时, 拟核相关蛋白(nucleoid-associated protein)的异常涉及多种人类疾病, 这为研究线粒体相关疾病提供了新的思路。

关键词 线粒体拟核; 拟核相关蛋白; 疾病; 表观遗传学

线粒体是真核生物的能量代谢中心, 氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)产生的ATP是细胞能量的主要来源。在多种信号转导途径和维持Ca²⁺稳态水平等生理过程中, 线粒体也起到关键作用^[1]。始于上世纪80年代末的线粒体相关疾病研究、90年代发现的线粒体与细胞凋亡的关系, 以及线粒体生物起源等传统问题的深入探索^[2], 使线粒体研究领域受到广泛关注。

线粒体的结构与功能受核基因组与线粒体基因组两套遗传信息的调控。真核生物约有10%~15%的核基因用于编码线粒体蛋白, 在胞质中翻译后转运至线粒体, 这类蛋白占线粒体总蛋白的98%以上^[3]。mtDNA仅有37个基因, 编码2种rRNA、22种tRNA以及13种氧化磷酸化复合物的亚单位^[1,3]。在细胞核与线粒体的相互作用中, 核基因占据了非常重要的地位。不仅仅体现在编码蛋白的数量上, 更重要的是这些蛋白几乎涉及到线粒体功能的每个方面, 包括mtDNA复制、转录、损伤修复、重组、线粒体分裂与融合、以及TCA等代谢途径^[1-3]。本文介绍的线粒体拟核就是由一系列核基因编码的蛋白和mtDNA相互作用构成的。

线粒体拟核是mtDNA与一系列蛋白质形成的核蛋白复合物, 呈颗粒状分布在线粒体内特定区域, 并经一些蛋白质锚定于线粒体内膜^[4]。根据线粒体的

原核起源, 将其命名为线粒体拟核。线粒体拟核的发现已有30多年^[5,6], 但是长期未受重视。近年来Butow等^[7,8]学者比较系统地阐述了线粒体拟核的组织结构及遗传模式, 并鉴定了拟核中大部分蛋白, 证明拟核对线粒体的结构与功能有重要作用。目前许多研究小组都致力于研究线粒体拟核的结构和拟核相关蛋白, 其中一些拟核相关蛋白与人类疾病密切相关, 研究这类蛋白对于阐明这些疾病的发病机制具有积极的指导意义, 也为开发治疗方法提供了新思路。

1 线粒体拟核研究概述

1963年Nass等^[9]率先发现mtDNA并且进一步提出mtDNA及线粒体RNA可能存在甲基化修饰的观点^[10], 表明对mtDNA化学结构已有较为深入的认识, 并着重研究其生物学意义。与此相比mtDNA是否形成类似染色质结构等涉及mtDNA高级结构的研究则进展缓慢, 而且长期缺乏关注。

1974年, Kuroiwa^[5]利用银染色法在多头绒泡菌(*Physarum polycephalum*)中观察到完整的线粒体拟

收稿日期: 2010-08-19 接受日期: 2010-11-09

国家自然科学基金(No.30971599/C060503), 教育部新世纪优秀人才支持计划(No.NCET-06-0526), 浙江省科技计划项目(No.2008C23028)和浙江省新世纪151人才工程(No.06-2-008)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0571-88206646, E-mail: qfyan@zju.edu.cn

核结构,提出拟核中含有蛋白的观点,而且该蛋白应该具有与组蛋白相似的性质。随后,Kuroiwa等^[6]从多头绒泡菌中分离线粒体拟核,并且通过SDS-PAGE分析证实了线粒体拟核中含有蛋白质。1984年,Miyakawa^[11]率先在酿酒酵母中观察到线粒体拟核,发现拟核形态随着细胞生理状态、细胞周期以及不同的药物处理而发生变化,单个细胞中拟核的数目以及mtDNA含量也随着培养条件的不同而改变,表明线粒体拟核是一个高度动态的结构,而且,酵母线粒体拟核还含有类似于组蛋白的蛋白质。目前已在多种真菌、植物、哺乳动物中发现了线粒体拟核,并认为该结构是真核生物mtDNA的普遍存在形式^[7,12,13]。酿酒酵母由于其结构简单且易于实验操作,已成为研究线粒体拟核的经典模式生物,现有的对线粒体拟核结构的认识主要来源于对酿酒酵母的研究。此外,非洲爪蟾、多头绒泡菌以及各种离体培养的哺乳动物细胞也是常用的线粒体拟核研究模型。

利用细胞染色的方法很容易对线粒体拟核进行定位、观察,DAPI、乙啶、PicoGreen等DNA染料、DNA特异性抗体以及针对拟核中特定蛋白设计的特异性抗体,均可用于观察线粒体拟核形态^[6]。酿酒酵母经DAPI染色后观察到线粒体拟核直径为400 nm,根据培养条件和生理状态的不同,单个酵母细胞可含有10~40个拟核,平均每个拟核内有1~2个mtDNA分子^[4,11]。80 Kb的酿酒酵母mtDNA在松散状态下长度约为25 μm ,远大于直径400 nm的拟核^[4],说明mtDNA必须进行压缩折叠才能装配成紧凑的拟核结构。酿酒酵母中执行这一功能的是线粒体DNA结合蛋白Abf2 (ARS-binding factor 2)^[14],该蛋白能将mtDNA进行压缩而不影响mtDNA基因表达。哺乳动物线粒体拟核的形态和分布与酿酒酵母中的情况十分相似,在人ECV304细胞中,mtDNA组成约475个拟核,不连续地分布于线粒体中,每个拟核含6~10个mtDNA^[15]。拟核定位于线粒体内膜,直接或间接地与驱动蛋白相互作用,并在线粒体分裂中作为mtDNA分离的基本单位^[4,8,15]。

线粒体将mtDNA装配成拟核结构,这种机制具有明显的优势。线粒体具有很高的活性氧水平,mtDNA与蛋白质相互结合的结构,能够更有效地防止mtDNA损伤和突变。当发生损伤时,多个mtDNA分子集中在某一区域,彼此可以作为损伤修复的模板进行修复^[4]。在线粒体分裂时,拟核还可能直接参与

遗传物质的分离,从而使子代线粒体mtDNA含量保持一致。此外,在拟核中鉴定出一系列参与其他代谢途径的蛋白质,这些蛋白将mtDNA与线粒体中的代谢途径直接联系起来,使线粒体能迅速根据代谢情况来调整mtDNA的表达水平^[7]。

1.1 线粒体拟核的蛋白质组成

线粒体拟核是一个高度动态的结构,其结构与功能的完整性依赖于拟核相关蛋白之间以及蛋白与mtDNA间的相互作用^[4,8,11]。在不含mtDNA的细胞(ρ^0)中,仅依靠拟核相关蛋白无法形成拟核结构;同样,多种拟核相关蛋白的缺失也会使拟核结构不稳定,并最终导致mtDNA缺失^[14]。现已鉴定的酿酒酵母拟核相关蛋白有23种,哺乳动物以及人线粒体拟核中的蛋白组分也已基本鉴定(表1)^[8]。

1.1.1 线粒体转录因子 线粒体具有相对独立、完整的转录系统,包括依赖于DNA的RNA聚合酶、转录因子、转录终止因子等^[2]。这些蛋白均由核基因编码,在胞质中合成后转运至线粒体执行功能^[3]。除了参与转录,这些蛋白在mtDNA折叠和线粒体拟核结构组织中也发挥重要作用。

人mtDNA转录系统包括RNA聚合酶、3种不同的转录因子以及转录终止因子mTERF。最早被鉴定的线粒体转录因子是TFAM (mitochondrial transcription factor A, mtTFA/TFAM),其编码基因位于染色体10q21,包括6个内含子和7个外显子^[16]。TFAM相对分子量为25 kDa,氨基酸序列中含有两个串联的HMG(high mobility group) box结构,中间由27个氨基酸残基隔开。TFAM主要功能是起始mtDNA转录,利用HMG box的DNA结合能力,TFAM结合于启动子LSP和HSP上游序列后激活mtDNA双向转录^[3,16]。突变分析的结果显示,TFAM的末端结构域对于识别mtDNA并起始转录至关重要^[17]。此外,TFAM也被认为与mtDNA的复制、损伤修复及重组过程有关。

在线粒体拟核结构中,TFAM是拟核装配的核心元件。利用RNAi降低Hela细胞内源性TFAM的表达水平后,mtDNA含量减少,线粒体拟核的形成也受到影响^[17]。酿酒酵母Abf2是TFAM的同源蛋白,研究表明Abf2能使mtDNA主链弯曲成一定角度,从而使mtDNA压缩凝聚^[18],因此也被称为“线粒体组蛋白”。ABF2基因敲除的酵母仍能存活,但是线粒体基因组不稳定,拟核呈现弥散状,而且mtDNA对

表1 线粒体拟核相关蛋白和疾病的概况^[13,28,30,36-40]Table 1 An overview of mitochondrial nucleoid-associated proteins and diseases^[13,28,30,36-40]

拟核相关蛋白 Nucleoid-associated protein	基因座 Loci	蛋白质功能 Protein function	临床表型 Clinical features
ACADVL	17p13	Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase	VLCAD deficiency
CPS1	2q35	Carbamoyl phosphate synthetase I	Carbamoyl phosphate synthetase I deficiency, pulmonary hypertension
DBT	1p31	Dihydrolipoamide branched-chain transacylase	Maple syrup urine disease
HADHA	2p23	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-Ketoacyl-CoA thiolase/Enoyl-CoA hydratase, alpha subunit	LCHAD deficiency, trifunctional protein deficiency
HADHB	2p23	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-Ketoacyl-CoA thiolase/Enoyl-CoA hydratase, beta subunit	Trifunctional protein deficiency
LRPPRC	2p21-p16	Leucine-rich PPR motif-containing protein, may have regulatory role in cytoskeleton integrity	Leigh syndrome, French-Canadian type
TWINKLE	10q24	Mitochondrial DNA helicase	Progressive external ophthalmoplegia with mitochondrial DNA deletions, autosomal dominant; sensory ataxic neuropathy, dysarthria, and ophthalmoparesis; mitochondrial DNA depletion syndrome, hepatocerebral form; spinocerebellar ataxia, infantile-onset
POLG	15q25	mtDNA polymerase gamma	Progressive external ophthalmoplegia with mitochondrial DNA deletions; sensory ataxic neuropathy, dysarthria, and ophthalmoparesis; alpers syndrome; mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy syndrome without leukoencephalopathy; spinocerebellar ataxia with epilepsy
TUFM	16p11.2	Mitochondrial translation elongation factor Tu	Combined oxidative phosphorylation deficiency 4
Hsp60	2q33.1	Heat-shock 60 kDa protein, responsible for protein folding	Spastic paraplegia, Leukodystrophy
PHB1	17q21	Prohibitin, promotes longevity	Breast cancer
ANT1	4q35	Adenine nucleotide translocator 1	Progressive external ophthalmoplegia with mitochondrial DNA deletions, autosomal dominant
NDUFS3	11p11.11	NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 3	Leigh syndrome due to mitochondrial complex I deficiency
CPT1A	11q13	Carnitine palmitoyltransferase I A	Carnitine palmitoyl transferase I A deficiency

DNase I 的敏感性提高了 4 至 5 倍, 表明失去 Abf2 的作用后 mtDNA 更容易受到核酶作用^[18], 因此证实 Abf2 具有保护 mtDNA 的作用, 能有效地避免 mtDNA 受损^[4]。TFAM 在进化上是高度保守的, 酿酒酵母 Abf2 缺失引起的功能缺陷可通过表达外源性的 Abf2 同源蛋白得到恢复, 如细菌 HU 蛋白、人 TFAM 及非组蛋白 NHP6A^[14]。

TFAM 在线粒体中含量很高, 平均 15~30 bp mtDNA 就有一个 TFAM 分子与之结合。虽然不同研究小组得出的 TFAM/mtDNA 比值有所不同, 但都认为 TFAM 的高丰度使其足以覆盖整个 mtDNA, 而不仅仅是启动子序列区域^[4]。

TFAM 与组蛋白的诸多相似点, 使其具有调控

mtDNA 基因表达的可能性。组蛋白 H3、H4 的氨基酸残基往往受到一系列翻译后修饰, 如甲基化、磷酸化、泛素化等, 这些修饰能改变染色质的构象, 并对基因表达产生影响, 这是表观遗传调控的重要方式。目前尚无关于线粒体表观遗传调控的研究, 但是已有报道指出, 在酿酒酵母中蛋白激酶 A 介导的磷酸化修饰能调节 Abf2 活性^[19], Abf2 的 DNA 结合活性发生变化可能会导致 Abf2 与 mtDNA 比例发生变化, 甚至引起拟核形态重塑, 这有可能会影响 mtDNA 基因表达^[4]。

1.1.2 线粒体单链 DNA 结合蛋白 线粒体单链 DNA 结合蛋白 (mitochondrial single-stranded DNA binding protein, mtSSB) 是另一种大量存在的拟核相关

蛋白^[4]。单链结合蛋白 SSB 相对分子量约为 13~16 kDa, 进化上高度保守, 酵母、果蝇甚至大肠杆菌 SSB 蛋白在结构和功能上都非常类似。所有 SSB 都具有极强的单链 DNA 亲和力, 体内通常以四聚体形式存在, 每个四聚体能结合 50~70 个核苷酸^[20]。在 mtDNA 复制、损伤修复及重组过程中, mtSSB 四聚体能使解链的 mtDNA 维持单链形式, 并防止被核酶水解^[20,21]。而且, 参与 mtDNA 复制的解旋酶 TWINKLE 的活性也必须由 mtSSB 特异性激活。在酵母中, 编码 mtSSB 的基因 *RIM1* 缺失导致 mtDNA 丢失, 说明 mtSSB 对于 mtDNA 正常复制是不可或缺的^[8]。在哺乳动物中, 线粒体发生相关的信号通路能调控 mtSSB 表达水平, 而且在不同组织中 mtSSB 表达水平与 mtDNA 含量呈正相关, 说明 mtSSB 可能是调节 mtDNA 含量的关键蛋白因子。

除了保证 mtDNA 正常复制, mtSSB 还与线粒体形态有关。在小鼠 C2C12 肌原细胞中, *mtSSB* 基因的表达使线粒体形态呈现碎片化; 而通过 RNAi 使 *mtSSB* 表达沉默时, 线粒体形态同时发生变化, 比野生型线粒体有所延长, 说明 mtSSB 可能在线粒体分裂和融合中起作用。此外, mtSSB 表达沉默后, 细胞对鬼臼乙叉甙(etoposide)等药物的敏感性提高, 引起细胞凋亡, 说明 mtSSB 可能参与其他代谢途径^[21]。

最近的研究显示, mtSSB 能与肿瘤抑制因子 p53 相互作用^[22]。肿瘤抑制因子 p53 能对多种细胞胁迫做出反应, 并调节一系列靶基因表达, 包括细胞周期阻滞、凋亡、DNA 损伤修复的相关基因。p53 也可转移至线粒体中, 与 mtDNA 及 DNA 聚合酶 γ 相互作用, 并对 mtDNA 损伤作出反应。这一相互作用对 mtDNA 维持正常功能具有重要作用, 在 mtDNA 突变积累等异常状态下, p53 可能激活凋亡途径, 从而避免 mtDNA 异常导致的线粒体疾病的发生。mtSSB 能结合于 p53 N 末端结构域, 这进一步增强了 p53 的 3'-5' 外切酶活性, 尤其是识别 mtDNA 氧化损伤标志物 8-氧-7,8-二氢-20-脱氧鸟苷(8-oxo-7,8-dihydro-20-deoxyguanosine)的能力, 说明 mtSSB 可能与 mtDNA 氧化损伤的修复有关。

1.1.3 拟核中的多功能蛋白 线粒体是许多重要代谢反应的场所, 线粒体基质中含有大量催化 TCA 循环、氨基酸合成等生化反应的酶。大多数酶是单一功能的, 但也有些是具有多重功能的, 如顺乌头酸酶(aconitase, Aco1)、乙酰羟酸还原异构酶(aceto-hydroxyacid reductoisomerase, Ilv5)、 α -酮戊二酸脱氢酶(α -KetoGlutarate dehydrogenase, KGD)、ATP 合成酶(ATP synthase, ATP1)等, 研究发现这些蛋白除了参与各种生化代谢途径外, 还与 mtDNA 以及拟核

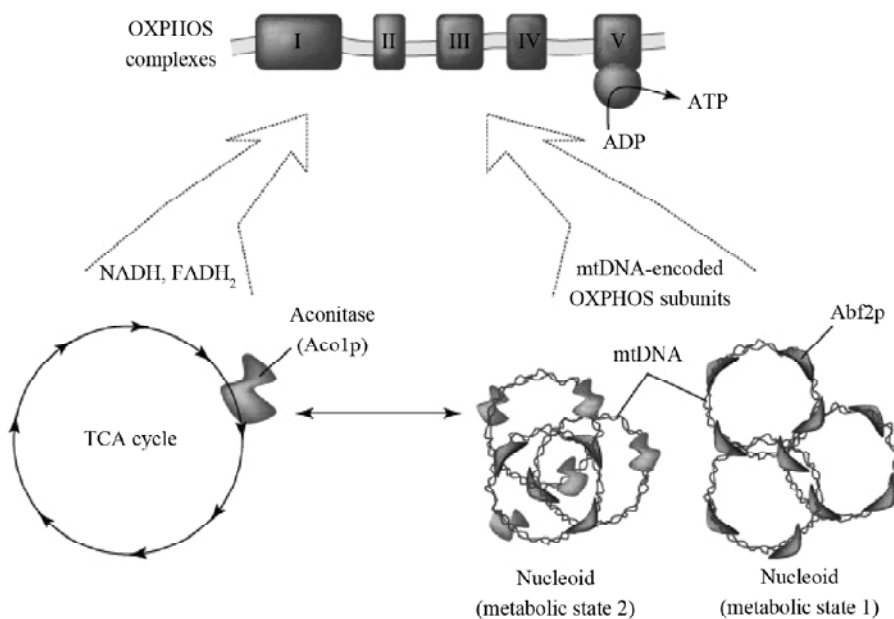


图1 Aco1 是酵母线粒体拟核中的一种双功能蛋白质^[23]

Fig.1 Aco1 is a bifunctional protein in yeast mitochondrial nucleoids^[23]

结构密切相关^[4,7]。

Aco1 是多功能蛋白中最具代表性的,其基本功能是在 TCA 循环中催化柠檬酸形成异柠檬酸, TCA 循环以 NADH 和 FADH₂ 的形式为线粒体氧化磷酸化提供高能电子,进一步生成 ATP。同时 Aco1 是一种线粒体拟核相关蛋白,具有单链及双链 DNA 结合活性,能结合至 mtDNA 并起到稳定拟核结构的作用^[7]。Aco1 同时具备催化能力和 DNA 结合能力,可以使 TCA 代谢水平迅速影响 mtDNA 的构象和基因表达。如图 1 所示^[23],处于代谢状态 1 时,线粒体拟核主要在 Abf2 的作用下维持稳定结构;而处于代谢状态 2 时, Aco1 与线粒体拟核相互作用,在功能上取代了 Abf2 并借此改变拟核的构象, Aco1 在催化 TCA 循环与稳定拟核结构这两者间相互协调,使得 mtDNA 表达根据代谢水平而变化,这可能是线粒体中各种代谢途径与 mtDNA 基因表达相偶联的一种方式^[7,23]。

细菌的许多细胞生理过程是直接和细菌遗传物质相关的,而且这种相互作用是细菌遗传物质组织的驱动力,即遗传物质结构具有很强的可塑性,其构象受代谢过程影响,在不同的代谢状态下可形成不同的稳定构象,以调整某些基因的表达^[24]。这是细菌适应环境的一种方式,而线粒体很可能保留了细菌的这一机制,以适应细胞的代谢水平和能量需求。因为除了 Aco1,线粒体拟核中还有许多类似的蛋白,如与氨基酸代谢相关的 Ilv5、Arg5, 6, 以及 TCA 循环中的 Idh1 等^[23]。线粒体拟核中的这些多功能蛋白,将拟核结构、mtDNA 基因表达与线粒体代谢途径相偶联,可以使 mtDNA 在不同的代谢水平采取不同的组织方式,并通过拟核形态重塑来改变 mtDNA 的构象和基因表达水平^[7,23]。

1.2 拟核与线粒体的动态变化(dynamics)

1.2.1 线粒体的融合与分裂

线粒体是高度动态的结构,可以沿着微管或者肌动蛋白运动,并且不断进行融合与分裂^[3]。线粒体融合与分裂协同进行,并保持动态平衡,这对维持线粒体正常的形态、分布和功能十分重要。融合异常导致线粒体形态延长,而分裂异常导致线粒体破碎,两者都破坏线粒体的功能^[1]。这些异常的线粒体通常膜电位会降低,并最终经线粒体自噬作用被清除。

线粒体融合与分裂是一个高度保守的过程,由多种含 GTPase 活性的蛋白参与作用。在哺乳动物中, Mfn1、Mfn2 及 OPA1 参与线粒体融合,其中 Mfn1/

Mfn2 是融合中起关键作用的蛋白^[1,3]。Mfn1 位于线粒体外膜胞质侧,融合过程中, Mfn1 的 HR2 结构域相互作用形成二聚体,使两个线粒体的外膜相互集聚,随后利用 Mfn1 的 GTPase 活性介导外膜融合。外膜融合后, OPA1 通过相互形成低聚物的方式介导内膜融合,最后两个线粒体的基质、拟核等内容物融合至一个线粒体中^[25,26]。

Drp1、Dnm1、Fis1 则是介导线粒体分裂的重要蛋白,其中起到关键作用的是 Drp1。Drp1 位于细胞质中,在线粒体内部也有少量存在。在分裂的初始阶段,线粒体特定位点会出现缢裂,随后借助 Fis1 的作用, Drp1 被募集到缢裂的位点,并缠绕于线粒体周围形成环状结构,通过 Drp1 的收缩完成分裂形成两个子代线粒体^[25]。

1.2.2 线粒体拟核的动态变化

线粒体拟核的动态变化不仅是因代谢水平变化而引发的形态重塑,还包括拟核在线粒体融合、分裂过程中所发生的变化。一方面, ρ^+ 细胞与 ρ^0 细胞融合的实验结果显示: mtDNA 和拟核能从 ρ^+ 线粒体扩散至 ρ^0 线粒体,说明在融合过程中,拟核可在线粒体间进行交换。另一方面,分裂产生的每个线粒体至少含有一个拟核,说明在线粒体分裂过程中伴随着拟核的分离和重新分布,这一点与细胞的有丝分裂有些相似^[25]。以 POLG、mtSSB、TWINKLE 为核心元件的 DNA 复制系统使 mtDNA 能进行独立复制。mtDNA 复制过程与转录过程密切相关,复制所需的引物在转录过程中形成,而且一些蛋白质可同时参与复制、转录两个过程。D 环(D-loop)复制是被广泛接受的 mtDNA 复制模型,即复制从 H 链起点开始先合成一段 7S DNA,并形成 D 环结构,当 H 链复制完成 2/3 后开始 L 链复制。mtDNA 复制时 TWINKLE 利用其解旋酶活性解开 mtDNA 双链,并由 mtSSB 维持模板链的单链构象,随后 POLG 从 RNA 引物的 3' 末端开始,沿模板合成 mtDNA 新生链^[20]。不仅 mtDNA 复制过程严格依赖于拟核相关蛋白,而且 mtDNA 的分离也以拟核为单位进行,拟核中重要的蛋白如 TFAM 表达水平降低都会导致 mtDNA 分离异常,产生无 mtDNA 的线粒体^[7]。

目前尚不清楚拟核及 mtDNA 在子代线粒体中重新分布的具体机制,但已有的研究成果表明一些线粒体膜蛋白可能在这一过程中起到作用。如图 2 所示,线粒体膜蛋白复合体 Mdm10p-Mdm12p-Mmm1p 具有跨膜结构,在细胞质一侧能与肌动蛋白 actin 相互

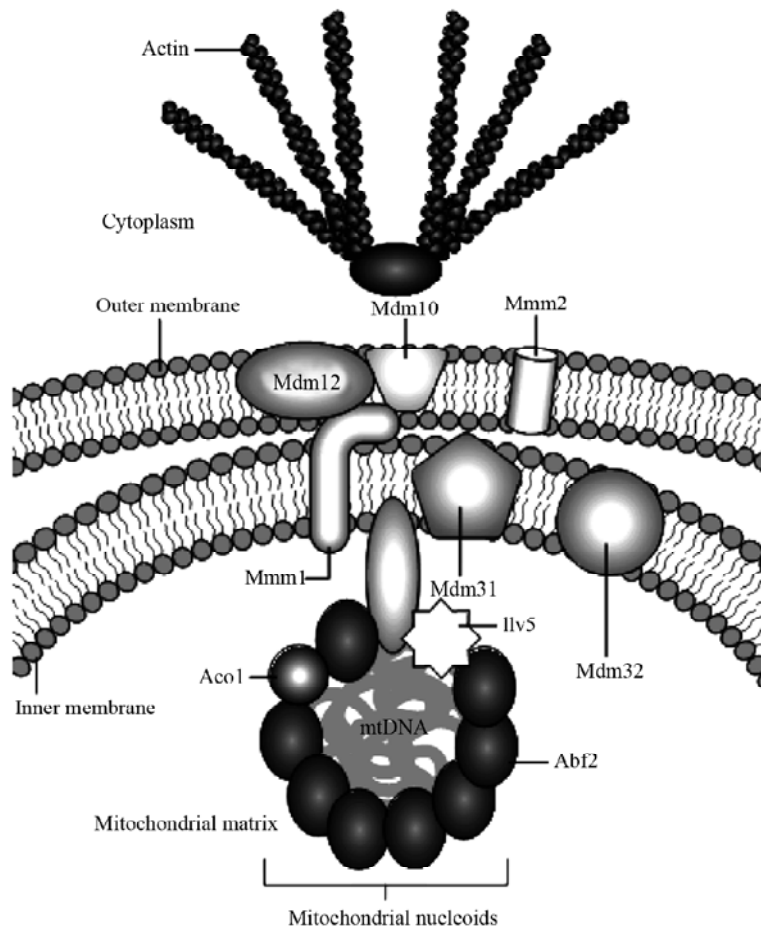


图2 酵母中线粒体拟核分离的分子基础模型^[8]

Fig.2 A potential model describing the molecular basis of nucleoid segregation in yeast^[8]

作用,使线粒体沿着细胞骨架运动,在线粒体基质一侧通过 Mdm31 和 Mdm32 与拟核相互作用^[8,27]。该复合体中任何一种蛋白缺失都会导致 mtDNA 丢失或者拟核结构无法维持;反之 mtDNA 的缺失(丧失拟核结构)也会影响线粒体沿细胞骨架的迁移率^[27]。这种紧密的相互作用将线粒体拟核通过 Mdm10p-Mdm12p-Mmm1 复合体锚定至细胞骨架,从而可利用分裂过程中线粒体膜的分离,将拟核与 mtDNA 随着线粒体膜分配到子代线粒体中^[27]。这也印证了线粒体膜缢裂的位点与拟核所处的位置有关^[26]。

拟核分裂与线粒体分裂不一定是同步的,具有物种差异性^[8]。在人细胞中,线粒体拟核的分裂与线粒体分裂不是同步的,即拟核可以在线粒体不分裂的情况下进行分裂;同样地,在细胞边缘也观察到线粒体分裂而拟核不分裂的情况。而在多头绒泡菌中,两者是同步进行的^[5]。

有报道指出人线粒体融合基因 *Mfn2* 突变引起

的融合异常,导致神经退行性疾病(Charcot-Marie-Tooth type 2A, CMT2A)发生^[26]。该研究发现在 *Mfn2* 基因敲除的成纤维细胞中,线粒体无法融合但是分裂过程依然可以继续,因此线粒体多呈断裂状。线粒体亚细胞结构的破坏导致膜电位异常,并丧失 mtDNA 和拟核结构,这说明拟核的正常形态功能需要线粒体融合进行维持。而拟核的缺失使这些线粒体无法利用 mtDNA 编码电子传递链的多种亚基,进而造成细胞功能受损。这是 CMT2A 的发病机制,类似的过程可能也发生于显性遗传视神经萎缩(autosomal dominant optic atrophy, DOA)发病过程中。

2 线粒体拟核相关蛋白与疾病

mtDNA 突变或者 mtDNA 突变与核基因相互作用导致的疾病,是当前线粒体生物医学研究的热点。线粒体拟核是 mtDNA 的高级结构,拟核相关蛋白的异常也会导致疾病发生,其中一个典型的病例是常染

染色体显性的进行性外眼肌麻痹(*autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia, adPEO*)。

adPEO是一种由mtDNA大范围缺失引发的罕见疾病, 典型症状为眼肌麻痹以及运动不耐性^[28,29]。adPEO呈现孟德尔遗传模式, 因为这种mtDNA缺失是由常染色体基因突变所致。至少有4个染色体位点的突变可导致adPEO发生, 分别是位于10q24的*PEO1*、4q35的*ANT1*、15q25的*PLOG*和17q23~q24的*POLG2*^[28]。*PLOG*与*POLG2*编码DNA聚合酶 γ 的两个亚基, *PEO1*编码的TWINKLE是mtDNA复制过程中的解螺旋酶, 这三种蛋白都定位于线粒体拟核中, 是mtDNA复制所必需的。其中任何一个发生突变, 都能导致mtDNA复制过程出现障碍, 并引起mtDNA大范围缺失。*ANT1*编码腺嘌呤核苷酸转移酶(*adenine nucleotide translocator*), 是一种线粒体内膜蛋白, 以同型二聚体形式存在, 其功能是将ADP转运进线粒体基质, 同时将ATP运出线粒体基质。在人当中存在3种同工型(*isoform*)的ANT: ANT1主要在骨骼肌、心脏和脑组织表达, ANT2主要在增殖的组织中表达, ANT3则在各种组织中普遍存在^[28]。从Hela细胞线粒体拟核中分离出的蛋白中含有ANT2, 说明ANT2是一种拟核相关蛋白^[30]。*ANT1*突变导致mtDNA缺失, 暗示该基因可能具有维持mtDNA或线粒体拟核结构稳定的功能。

鉴于TFAM的重要作用, Poulton等^[31]在实验构建的mtDNA缺失细胞系以及临床病例中分析了TFAM表达水平, 试图弄清这些表型是否与TFAM的缺失有关。研究发现在3例病例中, 骨骼肌细胞mtDNA与nDNA的比值偏低, 而且在mtDNA缺失的细胞中, TFAM表达水平也较低。TFAM可作为mtDNA缺失疾病的标志。Larsson等^[32]构建了*TFAM*基因敲除的小鼠模型, 杂合敲除的小鼠表现出心脏mtDNA数目减少和呼吸链缺陷, 纯合敲除的小鼠胚胎不仅表现出严重的mtDNA缺失和氧化磷酸化缺陷, 且在胚胎期死亡, 这说明TFAM对于哺乳动物线粒体发生和胚胎发育至关重要。

耳聋相关的线粒体12S rRNA A1555G同质突变的表型具有很大差异, 携带该突变的人群可表现出严重的先天性听力丧失, 也可表现为听力完全正常^[33,34]。临床表型的多样性是因为该突变位点的表型表达受到氨基糖苷类抗生素的作用, 并与核修饰基因有关, 包括核修饰基因*TRMU*以及线粒体转录因子*TFB1M*^[34]。

*TFB1M*同时也是一种拟核相关蛋白^[30], 与RNA腺嘌呤甲基转移酶具有高度的序列同源性, 具有体外结合腺苷甲硫氨酸的能力, 并且可催化线粒体12S rRNA额外环的腺嘌呤进行甲基化修饰, 该修饰造成了A1555G突变的表型差异。

线粒体拟核相关蛋白有可能成为线粒体疾病研究和治疗中的一个新方向。首先, 一些病理状态下的细胞与正常细胞相比, mtDNA拷贝数减少^[31], 因而造成OXPHOS缺陷并进一步导致细胞病变。其次, mtDNA突变往往呈现异质性, 仅在突变积累到或超过某一阈值(*threshold*)后才表现出相应的临床症状^[35]。mtDNA复杂的拷贝数和异质性已成为开发新的基因治疗方法的瓶颈。而线粒体拟核相关蛋白均为核基因编码, 因此相对于mtDNA而言这些基因在细胞中含量恒定、突变率低, 并且易于实验操作。一旦了解这些蛋白在调控mtDNA拷贝数、mtDNA损伤修复等方面的分子机制, 就有可能通过在蛋白质水平和DNA水平对拟核相关蛋白进行调控或修饰, 使mtDNA拷贝数恢复到正常水平, 或者使mtDNA突变降低至阈值以下, 从而实现线粒体疾病的基因治疗。

3 小结与展望

线粒体拟核结构的阐明是线粒体研究的一个重大突破, 使我们对线粒体遗传物质的结构、作用及遗传方式有了更清晰的认识。尤其是在拟核中鉴定的一系列蛋白, 是线粒体研究领域的一个重大收获, 目前针对拟核的研究主要集中在这一类蛋白上。之前我们认为这些蛋白的生理生化功能已经被阐明, 但是目前来看这些功能注释不足以解释其在线粒体拟核中的作用, 因此有必要弄清这些蛋白的新功能及其在线粒体拟核中的作用, 这也是将来线粒体拟核研究需要解决的问题。

线粒体拟核结构说明mtDNA也具有与染色体类似的高级结构, 暗示着可能有更多更复杂的调控方式参与调控mtDNA基因表达以及线粒体与细胞核的相互作用。mtDNA所蕴涵信息的解码和调控机制, 以及mtDNA与核基因表观遗传调控之间的关系, 这些都是我们所关注并且希望阐明的问题。

参考文献(References)

- 1 Diaz F, Moraes CT. Mitochondrial biogenesis and turnover.

- Cell Calcium 2008; 44(1): 24-35.
- 2 Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 2005; 39: 359-407.
 - 3 Ryan MT, Hoogenraad NJ. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 701-22.
 - 4 Kucej M, Butow RA. Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids. *Trends Cell Biol* 2007; 17(12): 586-92.
 - 5 Kuroiwa T, Hizume M. Mitochondrial nucleoid staining with ammoniacal silver. *Exp Cell Res* 1974; 87(2): 406-9.
 - 6 Kuroiwa T, Kawano S, Hizume M. A method of isolation of mitochondrial nucleoid of *Physarum polycephalum* and evidence for the presence of a basic protein. *Exp Cell Res* 1976; 97(2): 435-40.
 - 7 Chen XJ, Wang X, Kaufman BA, Butow RA. Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* 2005; 307(5710): 714-7.
 - 8 Chen XJ, Butow RA. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet* 2005; 6(11): 815-25.
 - 9 Nass MM, Nass S. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol* 1963; 19: 593-611.
 - 10 Nass MM. Mitochondrial DNA: advances, problems, and goals. *Science* 1968; 165(888): 25-35.
 - 11 Miyakawa I, Aoi H, Sando N, Kuroiwa T. Fluorescence microscopic studies of mitochondrial nucleoids during meiosis and sporulation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 1984; 66: 21-38.
 - 12 Garrido N, Griparic L, Jokitalo E, Wartiovaara J, van der Blik AM, Spelbrink JN. Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell* 2003; 14(4): 1583-96.
 - 13 Wang Y, Bogenhagen DF. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 2006; 281(35): 25791-802.
 - 14 Diffley JF, Stillman B. A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(17): 7864-8.
 - 15 Iborra FJ, Kimura H, Cook PR. The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol* 2004; 2: 9.
 - 16 Reyes A, Mezzina M, Gadaleta G. Human mitochondrial transcription factor A (mtTFA): gene structure and characterization of related pseudogenes. *Gene* 2002; 291(1-2): 223-32.
 - 17 Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoh A, Sasaki N, *et al.* Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol* 2004; 24(22): 9823-34.
 - 18 Newman SM, Zelenaya-Troitskaya O, Perlman PS, Butow RA. Analysis of mitochondrial DNA nucleoids in wild-type and a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that lacks the mitochondrial HMG box protein Abf2p. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(2): 386-93.
 - 19 Cho JH, Lee YK, Chae CB. The modulation of the biological activities of mitochondrial histone Abf2p by yeast PKA and its possible role in the regulation of mitochondrial DNA content during glucose repression. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1522(3): 175-86.
 - 20 Schultz RA, Swoap SJ, McDaniel LD, Zhang B, Koon EC, Garry DJ, *et al.* Differential expression of mitochondrial DNA replication factors in mammalian tissues. *J Biol Chem* 1998; 273(6): 3447-51.
 - 21 Arakaki N, Nishihama T, Kohda A, Owaki H, Kuramoto Y, Abe R, *et al.* Regulation of mitochondrial morphology and cell survival by Mitogenin I and mitochondrial single-stranded DNA binding protein. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760(9): 1364-72.
 - 22 Wong TS, Rajagopalan S, Townsley FM, Freund SM, Petrovich M, Loakes D, *et al.* Physical and functional interactions between human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein and tumour suppressor p53. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(2): 568-81.
 - 23 Shadel GS. Mitochondrial DNA, aconitase 'wraps' it up. *Trends Biochem Sci* 2005; 30(6): 294-6.
 - 24 Rocha EP. The organization of the bacterial genome. *Annu Rev Genet* 2008; 42: 211-33.
 - 25 Chan DC. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22: 79-99.
 - 26 Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 2007; 130(3): 548-62.
 - 27 Boldogh IR, Nowakowski DW, Yang HC, Chung H, Karmon S, Royes P, *et al.* A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell* 2003; 14(11): 4618-27.
 - 28 Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V, Kyttala A, Zeviani M, Comi GP, *et al.* Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 2000; 289(5480): 782-5.
 - 29 Suomalainen A, Majander A, Haltia M, Somer H, Lonnqvist J, Savontaus ML, *et al.* Multiple deletions of mitochondrial-DNA in several tissues of a patient with severe retarded depression and familial progressive external ophthalmoplegia. *J Clin Invest* 1992; 90(1): 61-6.
 - 30 Bogenhagen DF, Rousseau D, Burke S. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J Biol Chem* 2008; 283(6): 3665-75.
 - 31 Poulton J, Morten K, Freeman-Emmerson C, Potter C, Sewry C, Dubowitz V, *et al.* Deficiency of the human mitochondrial transcription factor h-mtTFA in infantile mitochondrial myopathy is associated with mtDNA depletion. *Hum Mol Genet* 1994; 3(10): 1763-9.
 - 32 Wang J, Silva JP, Gustafsson CM, Rustin P, Larsson NG. In-

- creased *in vivo* apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(7): 4038-43.
- 33 Guan MX, Yan Q, Li X, Bykhovskaya Y, Gallo-Teran J, Hajek P, *et al.* Mutation in TRMU related to transfer RNA modification modulates the phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S ribosomal RNA mutations. *Am J Hum Genet* 2006; 79(2): 291-302.
- 34 Bykhovskaya Y, Mengesha E, Wang D, Yang HY, Estivill X, Shohat M, *et al.* Human mitochondrial transcription factor B1 as a modifier gene for hearing loss associated with the mitochondrial A1555G mutation. *Mol Genet Metab* 2004; 82(1): 27-32.
- 35 Pandya A, Xia XJ, Erdenetungalag R, Amendola M, Landa B, Radnaabazar J, *et al.* Heterogenous point mutations in the mitochondrial tRNA Ser(UCN) precursor coexisting with the A1555G mutation in deaf students from Mongolia. *Am J Hum Genet* 1999; 65(6): 1803-6.
- 36 Zhu X, Peng X, Guan MX, Yan Q. Pathogenic mutations of nuclear genes associated with mitochondrial disorders. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009; 41 (3): 179-87.
- 37 Hoshida R, Matsuura T, Haraguchi Y, Endo F, Yoshinaga M, Matsuda I. Carbamyl phosphate synthetase I deficiency. One base substitution in an exon of the CPS I gene causes a 9-basepair deletion due to aberrant splicing. *J Clin Invest* 1993; 91(5): 1884-7.
- 38 Herring WJ, Litwer S, Weber JL, Danner DJ. Molecular genetic basis of maple syrup urine disease in a family with two defective alleles for branched chain acyltransferase and localization of the gene to human chromosome 1. *Am J Hum Genet* 1991; 48(2): 342-50.
- 39 Ushikubo S, Aoyama T, Kamiyo T, Wanders RJ, Rinaldo P, Vockley J, *et al.* Molecular characterization of mitochondrial trifunctional protein deficiency: formation of the enzyme complex is important for stabilization of both alpha- and beta-subunits. *Am J Hum Genet* 1996; 58(5): 979-88.
- 40 Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenborg J, Reich M, Hjerrild M, *et al.* Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(2): 605-10.

Advances in Mitochondrial Nucleoid Structure and Related Diseases

Xiang-Yu He¹, Li-Ping Jin², Zhong Liu³, Qing-Feng Yan^{1*}

(¹*Institute of Genetics, College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;*

²*Anxi Health Center, Liangzhu, Hangzhou 311113, China;* ³*The First Affiliated Hospital of College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)*

Abstract Mitochondrial DNA (mtDNA) is organized in solid particles with a series of proteins, and these nucleoprotein complexes are named as mitochondrial nucleoids because of the prokaryotic origin of mitochondria. Proteins in mitochondrial nucleoids consist of mitochondrial transcription factors, mitochondrial single stranded-DNA binding proteins and multiple functional proteins which catalyze the metabolic reactions in mitochondria. The elucidation of mitochondrial nucleoid structure is meaningful to interpret the mechanisms of the maintenance and inheritance of mitochondrial genome, and in revealing the potential regulation of mitochondrial gene expression. This review focuses on the current opinions in the components, structure and functions of mitochondrial nucleoid, especially how these proteins coordinate the mtDNA and mitochondrial metabolisms like TCA cycle and amino acid metabolism. Meanwhile, abnormality in nucleoid-associated proteins leads to many human diseases. The research in mitochondrial nucleoids is helpful to develop new therapeutics.

Key words mitochondrial nucleoid; nucleoid-associated protein; disease; epigenetics

Received: August 19, 2010 Accepted: November 9, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30971599/C060503), the Program for New Century Excellent Talents in University (No.NCET-06-0526), the Program of Science and Technology in Zhejiang Province (No.2008C23028) and the Program for New Century 151 Talents in Zhejiang Province (No.06-2-008)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88206646, E-mail: qfyan@zju.edu.cn