

人源COX7A2L基因型的鉴定及其对线粒体 功能与超级复合体组装的影响

葛玲虹¹ 李文娜¹ 黄佳涛¹ 吕建新^{1,2*}

(¹温州医科大学检验医学院生命科学学院, 温州 325035; ²杭州医学院, 杭州 310053)

摘要 COX7A2L是一个线粒体呼吸链复合体IVCOX7A2亚基的类似蛋白。已知COX7A2L蛋白能够影响小鼠线粒体的功能, 然而, 关于该蛋白在哺乳动物细胞中功能亚型的分布及其如何影响线粒体的功能仍不清楚。为了明确COX7A2L蛋白在人源细胞中的表达类型及功能, 该文初步分析了COX7A2L在人体细胞中亚型的表达情况及其对线粒体功能和超级复合体组装的影响。该文利用细胞生物学及分子生物学技术, 发现COX7A2L在人体细胞中以单一亚型的形式表达并定位于线粒体内膜。研究者对96个中国人COX7A2L基因的测序分析后发现, COX7A2L基因的外显子上不存在任何多态性位点, 提示COX7A2L基因序列以及功能在人群中高度保守。通过线粒体功能实验分析我们发现, COX7A2L基因敲除导致细胞线粒体呼吸功能减弱, ATP含量减少。随后的研究发现, 人源COX7A2L同小鼠长亚型COX7A2L基因一样能够抑制超级复合体III+IV的组装, 但是与小鼠COX7A2L长亚型不同的是, 人源COX7A2L的基因敲除能够降低但不能完全去除超级复合体I+III+IV的含量, 并且超级复合体III+IV的组装受到的影响远大于超级复合体I+III+IV。这提示, 超级复合体I+III+IV的组装不完全依赖于COX7A2L蛋白的表达。综上所述, 人源COX7A2L基因虽然对线粒体功能的影响类似于小鼠的长亚型COX7A2L, 但是人源COX7A2L基因更保守, 并且其对呼吸链超级复合体的影响不同于对应的鼠源基因。

关键词 基因型; 超级复合体组装; 线粒体功能

Identification of Human COX7A2L Genotypes and Their Effects on Mitochondrial Function and Assembly of Supercomplex

Ge Linghong¹, Li Wenna¹, Huang Jiatao¹, Lü Jianxin^{1,2*}

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

²Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China)

Abstract COX7A2L is a similar protein of the mitochondrial respiratory enzyme COX subunit 7a. Two mouse strain specific COX7A2L isoforms differentially affect mitochondrial function, however, the regulatory role of COX7A2L in human mitochondrial function is not known. Here, we find that COX7A2L is expressed as a single isoform in human cells and located in the mitochondrial inner membrane. The sequence of COX7A2L is highly conserved, since no polymorphic sites are detected in 96 human subjects. Furthermore, we find both mitochondrial respiratory function and ATP content are decreased in COX7A2L knockout 293T cells compared with wide type 293T cells. Although our results indicate that loss of human COX7A2L inhibits the assembly of supercomplex

收稿日期: 2018-04-09 接受日期: 2018-05-25

国家自然科学基金(批准号: 31670784)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com

Received: April 9, 2018 Accepted: May 25, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31670784)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com

网络出版时间: 2018-07-27 10:39:24

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180727.1038.002.html>

III+IV, supercomplex I_n+III_n+IV_n assembly is differently affected, suggesting that supercomplex I_n+III_n+IV_n assembly is not completely dependent on the expression of COX7A2L. In summary, our data indicate that human COX7A2L is more conserved and plays a role like mouse long isoform of COX7A2L.

Keywords genotype; supercomplex assembly; mitochondrial function

线粒体是真核生物能量代谢的中心, 真核生物细胞中90%的ATP通过线粒体内的氧化磷酸化系统(OXPHOS)生成^[1]。OXPHOS由位于线粒体内膜上的呼吸链复合体I、II、III、IV以及ATP酶复合体V构成。在电子传递链的作用下, 复合体I和复合体II分别接受来自NADH与FADH₂的电子, 通过复合体III传递给复合体IV与氧气结合生成水(电子传递链)。在电子传递过程中, 线粒体内的质子泵出到线粒体膜间隙形成质子梯度势能, 质子通过复合体V回流到线粒体基质, 并产生ATP^[2]。电子传递链最早被认为是一个由复合体I、II、III、IV组成的大复合体(固态模型)^[3], 随后的研究又认为, 电子传递链中的几个复合体是独立且随机的分布在线粒体内膜上的(液体模型)^[4]。直到10年前, 随着非变性凝胶技术的发展, 有研究提出电子传递链兼具了固态模型与液态模型两种形态(动态模型)^[5]。在这种模型中, 我们通常认为: 除了散在的复合体I、II、III、IV外, 复合体I、III、IV可以组合形成更大的复合体, 我们称之为超级复合体。当然, 随着冷冻电镜技术的快速发展, 有研究进一步发现, 复合体II与V也参与了超级复合体的组成, 并且超级复合体中单一复合体的构成比例更加多样^[6], 但是由于超级复合体的组装机制尚不清楚, 相关研究仍然存在争议^[2]。

目前, 尽管OXPHOS复合体的动态模型得到了公认, 但是线粒体超级复合体存在的生物学意义却仍处于争论之中。虽然有研究认为, 由于线粒体具有极高的蛋白/膜脂比例, 超级复合体的形成可能仅仅是为了缓解线粒体膜上过度拥挤的蛋白, 给复合体单体功能的行使提供足够的空间环境^[7], 但多数研究者普遍认为超级复合体具有功能属性。超级复合体可以提高电子的传递效率, 降低线粒体内ROS的生成^[8]。目前对超级复合体形成的机制研究极少, 2012年的一项研究最早认为, Rcf1能够参与超级复合体的组装, 但Rcf1发现自酵母, 其只参与了超级复合体III+IV的组装, 而似乎不影响超级复合体I+III+IV的形成^[9-10]。由于超级复合体I+III+IV被认为是哺乳动物细胞中唯一具有功能属性的超级复

合体, 对于哺乳动物细胞而言, Rcf1可能并不是严格意义上的超级复合体。最近研究发现, COX7A2L能够参与复合体I、III、IV的组装, 这也是目前为止唯一一个真正意义上的哺乳动物超级复合体组装因子^[11-13]。研究进一步发现, COX7A2L可能通过影响超级复合体的组装来改变细胞的代谢特征, 但是, COX7A2L蛋白在小鼠中作为超级复合体组装因子的属性一直处于争论当中, 并且不同亚型的COX7A2L在小鼠中参与超级复合体组装的机制也存在一定的冲突^[12,14]。

鉴于此, 本研究以人体细胞为研究对象, 通过遗传学分析COX7A2L在人群中的保守性、利用生物化学方法分析COX7A2L在人类细胞中的亚型表达情况、结合非变性凝胶技术与线粒体功能分析技术, 希望能够全面地了解COX7A2L在人类细胞线粒体中所扮演的角色。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM培养基和新生牛血清(newborn calfserum, NCS)购自Sigma公司。DAPI、青霉素-链霉素液购自上海碧云天生物技术有限公司。胰蛋白酶消化液、MitoTracker Red、ATP检测试剂盒、Lipofectamine 3000试剂盒均购自Thermo Fisher Scientific公司。逆转录试剂盒购自TaKaRa公司。文中测序工作均由杭州擎科生物技术公司完成。

1.2 细胞培养

293T细胞用含10%NCS、抗生素(青霉素100 U/mL和链霉素100 μg/mL)的DMEM培养基于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养。

1.3 COX7A2L蛋白敲除稳转细胞株构建

设计gRNA连接于PX330-GFP载体中, gRNA序列如下: 5'-CAC CGA TCA TAC ACT GTG GAA TCG G-3'(forward), 5'-AAA CCC GAT TCC ACA GTG TAT GA TC-3'(reverse)。将重组质粒按照Lipofectamine 3000转染操作步骤进行细胞转染, 在293T细胞中构建COX7A2L蛋白敲除稳定细胞株。

1.4 COX7A2L蛋白过表达稳转细胞株构建

从北京六合华大基因科技有限公司合成COX7A2L 4个亚型基因并连接于pCDH-puro慢病毒高表质粒上, 将重组高表质粒按照Lipofectamine 3000转染操作步骤转染于293T细胞中, 收集病毒液, 感染于293T KO细胞中, 并用嘌呤霉素进行筛选。

1.5 免疫荧光染色

细胞培养于细胞爬片上, 待贴壁24 h后, 用100 nmol/L MitoTracker对线粒体进行染色, 孵育一抗, 所用一抗为抗-Myc抗体(1:500, Cell Signaling公司), 次日孵育二抗, 为Alexa Fluor® 488-IgG(1:250, Cell Signaling公司), 再用DAPI对细胞核进行染色, 封片后于激光共聚焦显微镜进行观察拍照。

1.6 蛋白亚定位检测

收集细胞, 研磨破碎细胞, 经4 °C、1 200 ×g离心5 min后取上清, 再经4 °C、15 000 ×g离心2 min后得到的沉淀即为线粒体。将线粒体平均分为5份, 进行蛋白亚定位检测, 1份线粒体用0.1 mol/L碳酸钠重悬, 冰浴30 min以沉淀膜蛋白, 30 min后进行高速离心, 4 °C、75 000 ×g离心40 min, 上清和沉淀分别进行免疫印迹, 观察蛋白在线粒体膜与基质中的定位情况。另外3份线粒体分别用2%的Triton X-100和100 μg/mL蛋白酶K处理30 min, 进行免疫印迹实验, 观察蛋白在线粒体内外膜中的定位情况。

1.7 线粒体复合体含量检测

收集细胞, 提取线粒体复合体蛋白质, 通过非变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(Blue Native-PAGE)对线粒体复合体蛋白质进行检测, 免疫印迹所用抗体为抗-SDHA抗体(1:1 000, Abcam公司)、抗-UQCRC2抗体(1:1 000, Abcam公司)、抗-COX1抗体(1:1 000, Abcam公司)和抗-ATP5A抗体(1:2 000, Abcam公司)。

1.8 蛋白质免疫印迹试验

收集细胞沉淀, 用RIPA裂解液(Cell Signaling公司)裂解细胞提取蛋白, 通过SDS-PAGE对蛋白进行检测, 所用抗体为抗-COX7A2L抗体(1:500, Abcam公司)、抗-Myc抗体(1:1 000, Cell Signaling公司)、抗-β-Actin抗体(1:1 000, Santa Cruz公司)、抗-GRP75抗体(1:1 000, Santa Cruz公司)、抗-COXIV抗体(1:1 000, Abcam公司)、抗-VDAC抗体(1:1 000, Cell Signaling公司)、抗-TOMM20抗体(1:1 000, Abcam公司)、抗-Cyt c抗体(1:1 000, Abcam公司)。

1.9 细胞氧耗量检测

将细胞接种于60 mm培养皿中, 待细胞长至70%~80%, 胰蛋白酶消化细胞后重悬细胞并计数约1×10⁶细胞, 使用O2K线粒体功能检测仪(Oroboros公司)对细胞氧耗量进行检测。

1.10 三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)生成检测

细胞接种于60 mm培养皿中, 待细胞长至70%~80%, 收集细胞, 用100 μL ATP提取液提取细胞ATP。按100 μL每孔体积, 将ATP测定液加至专用的白色96孔板中, 加入10 μL待测样本后, 采用多功能酶标仪检测化学发光强度。

1.11 线粒体ATP生成检测

细胞接种于6孔板中, 待细胞长至70%~80%, 用含5 mmol/L 2-DG(2-Deoxy-D-glucose)和5 mmol/L丙酮酸钠的ATP Recording Buffer[156 mmol/L氯化钠、3 mmol/L硫酸镁、3 mmol/L氯化钾、2 mmol/L磷酸二氢钾、2 mmol/L氯化钙、20 mmol/L HEPES(pH7.35)]于37 °C培养2 h。2 h后, 收集细胞, 提取细胞ATP, 操作同ATP生成检测。

1.12 聚合酶链式反应(PCR)

用Trizol(Invitrogen公司)裂解细胞提取总RNA, 利用逆转录试剂盒(TaKaRa公司)将RNA逆转录成cDNA后进行PCR。PCR所用引物如下: COX7A2L a亚型: 5'-ATG TAC TAC AAG TTT AGT GGC-3'(forward), 5'-TCA TTT GTT TTT GGG CTG CG-3'(reverse); COX7A2L b亚型: 5'-ATG GAC GGA AAC TGC TGG GG-3'(forward), 5'-TCA TTT GTT TTT GGG CTG CG-3'(reverse); COX7A2L c亚型: 5'-ATG TAC TAC AAG TTT AGT GGC-3'(forward), 5'-TTA TAT GCA CTG GAA AAA C-3'(reverse); COX7A2L d亚型: 5'-ATG TAC TAC AAG TTT AGT GGC-3'(forward), 5'-TCA GGT AGA CGG GCA CAC-3'(reverse)。

1.13 血液基因组DNA提取

全血样本中加入红细胞裂解液进行裂解, 经蛋白酶K消化4 h后, 加入预冷的醋酸钾溶液沉淀蛋白/SDS复合物, 再用异丙醇沉淀DNA, 干燥溶解后得到血液基因组DNA。所得PCR产物送杭州擎科梓熙生物技术有限公司进行测序, 对COX7A2L a亚型第二、三、四个外显子进行测序, 测序引物为外显子2-F: 5'-TTA AGT TAG GCG ATC TTC GGG C-3', 外显子

2-R: 5'-GGA GAA CAG AGA CGA ACT CGA C-3';
 外显子3-F: 5'-GCC TCC TCA GAC ATA CTT T-3', 外
 显子3-R: 5'-GAG CTA TTC ATG CCA TTT-3'; 外显
 子4-F: 5'-TGC TTT TCC CAC TGT CAT GTG TT-3',
 外显子4-R: 5'-AGG AAC TTC AAA GGG TTT ATG
 CC-3'.

1.14 统计学分析

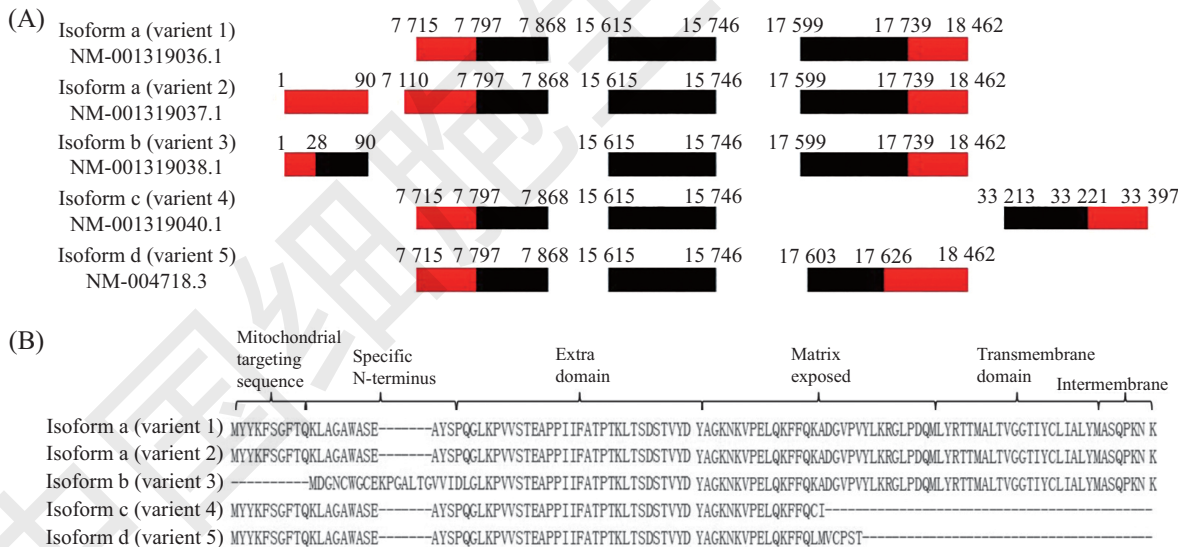
采用SPSS 20.0软件进行统计学分析。数据用
 mean±S.D.表示, 两样本间均数的比较采用t检验,
 P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 人源COX7A2L的表达类型

以往的研究表明, 小鼠COX7A2L蛋白存在2
 种亚型, 分别为111个氨基酸(短亚型)与113个氨基
 酸(长亚型), 其中长亚型中第72至74位的3个氨基
 酸(VPI)在短亚型中为F^[12], 而人源COX7A2L蛋白
 的表达类型目前尚不清楚。在本研究中, 我们检索
 了NCBI之后发现, 人源COX7A2L(Gene ID: 9167)

基因存在5个转录本, 分别为NM_001319036.1、
 NM_001319037.1、NM_001319038.1、
 NM_001319040.1、NM_004718.3(图1A)。上述5个
 转录本能够编码产生4种不同大小的COX7A2L蛋
 白, 其中第一与第二个转录本编码产生亚型a蛋白,
 第三、四、五个亚型编码产生亚型b、c、d蛋白。
 通过生物信息预测后我们发现, a、c、d 3种亚型的
 蛋白均具有线粒体定位序列, 其中a亚型蛋白经预测
 显示为线粒体膜蛋白, 而c、d亚型蛋白可能为线粒体
 基质蛋白(图1B)。另外, b亚型蛋白由于不具有线粒
 体定位蛋白, 其极有可能为细胞质基质蛋白(图1B)。
 由于鼠源长亚型第72~74位VPI的3个氨基酸及其附
 近区域被认为与线粒体超级复合体III+IV的组装密
 切相关。通过ClustalX2分析后我们发现, 小鼠长亚
 型中的VPIH氨基酸在人源a亚型蛋白中为VPVY(图
 2)。此外, 同样定位与线粒体的c与d亚型蛋白则不
 包含相应的关键氨基酸区域, 而b亚型虽然具有对
 应的区域, 但该蛋白不定位在线粒体内(图1B)。因
 此我们推测, 人源COX7A2L的a亚型蛋白可能是与超



A: 人源COX7A2L(Gene ID: 9167)转录本基因简图。黑色部分为CDs区, 黑色和红色部分为mRNA; B: 人源COX7A2L氨基酸序列及其结构域。

A: the schematic view of COX7A2L (Gene ID: 9167) transcripts in human, the black portions represent CDs, black and red portions represent mRNA; B: the amino acid sequences and structural domains of COX7A2L in human.

图1 人源COX7A2L不同转录本基因简图及氨基酸序列

Fig.1 COX7A2L transcripts and amino acid sequences in human

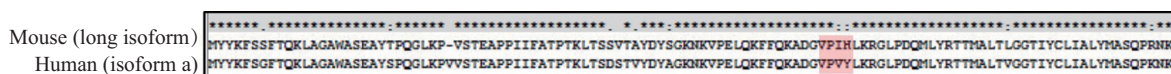
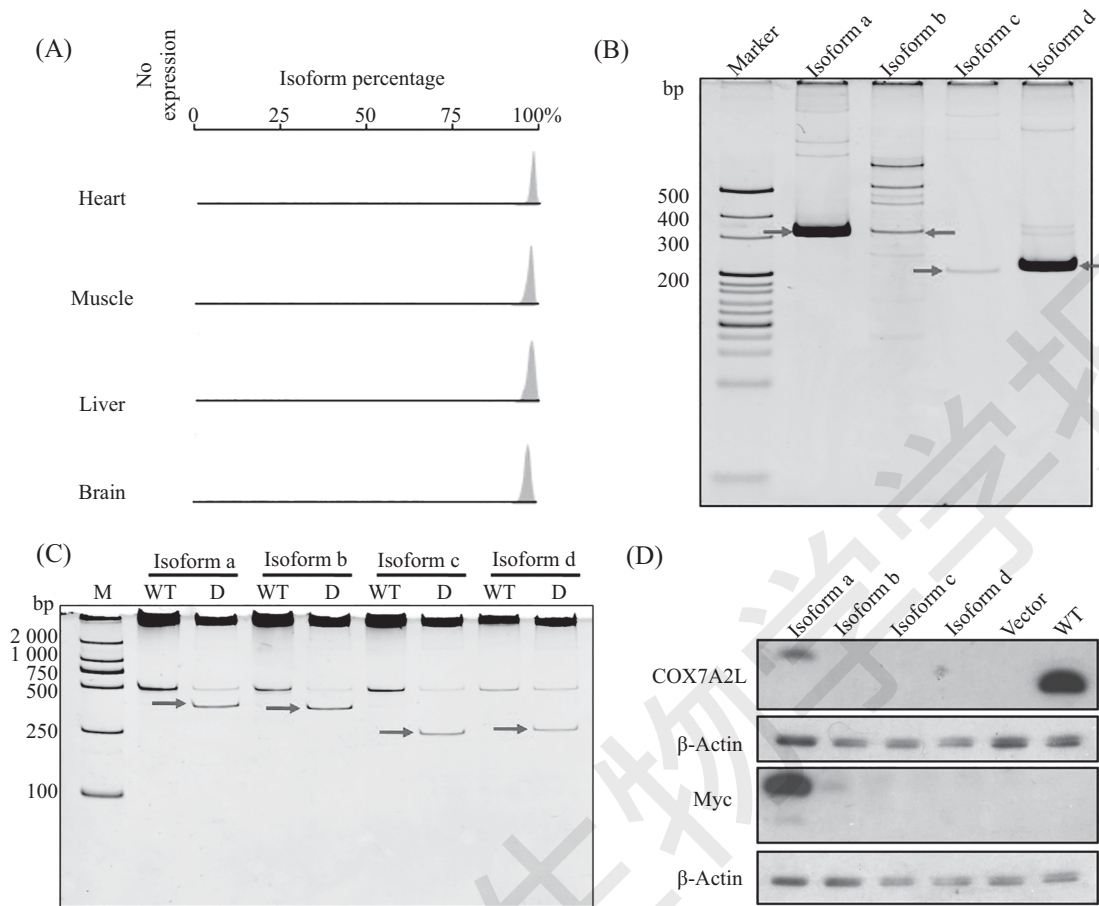


图2 ClustalX2比对鼠长亚型和人源a亚型氨基酸序列

Fig.2 The blast of mouse long form and human isoform a using ClustalX2



A: 我们在UCSC数据库中分析了COX7A2L a亚型在人体心脏、肌肉、肝脏和脑中的表达水平。数据库可通过此链接找到: <https://xenabrowser.net/transcripts/>; B: 在293T细胞中人源COX7A2L不同亚型mRNA水平分析, 箭头所指即为目的条带; C: 用15%聚丙烯酰胺凝胶电泳分析经BamH I和EcoR I酶切后的产物, 箭头所指即为目的条带; WT: 野生型, D: 酶切产物; D: 免疫印迹分析在COX7A2L不同亚型的过表达模型中COX7A2L和Myc的水平, β -Actin作为内参蛋白, Vector为pCDH-puro空载质粒转染293T COX7A2L基因敲除细胞所得的细胞模型。

A: we analyzed the expression levels of COX7A2L isoform a in heart, muscle, liver and brain from the UCSC. The database can be found at <https://xenabrowser.net/transcripts/>; B: analysis of mRNA levels of different isoforms of human COX7A2L in 293T cell, the arrows pointing to the target segments; C: the polyacrylamide gel electrophoresis (15%) of enzyme-digested products of BamH I and EcoR I, the arrows pointing to the target segments; WT: wide type, D: digested product; D: the levels of COX7A2L and Myc in 293T COX7A2L isoforms overexpression cells and 293T wild type cells were determined by Western blot. β -Actin was used as a total loading control. Vector is pCDH-puro empty plasmid transfected into 293TCOX7A2L knock out cells.

图3 人源COX7A2L不同亚型表达模式分析

Fig.3 The protein expression patterns of COX7A2L isoforms in human

级复合体组装相关的主要功能蛋白。

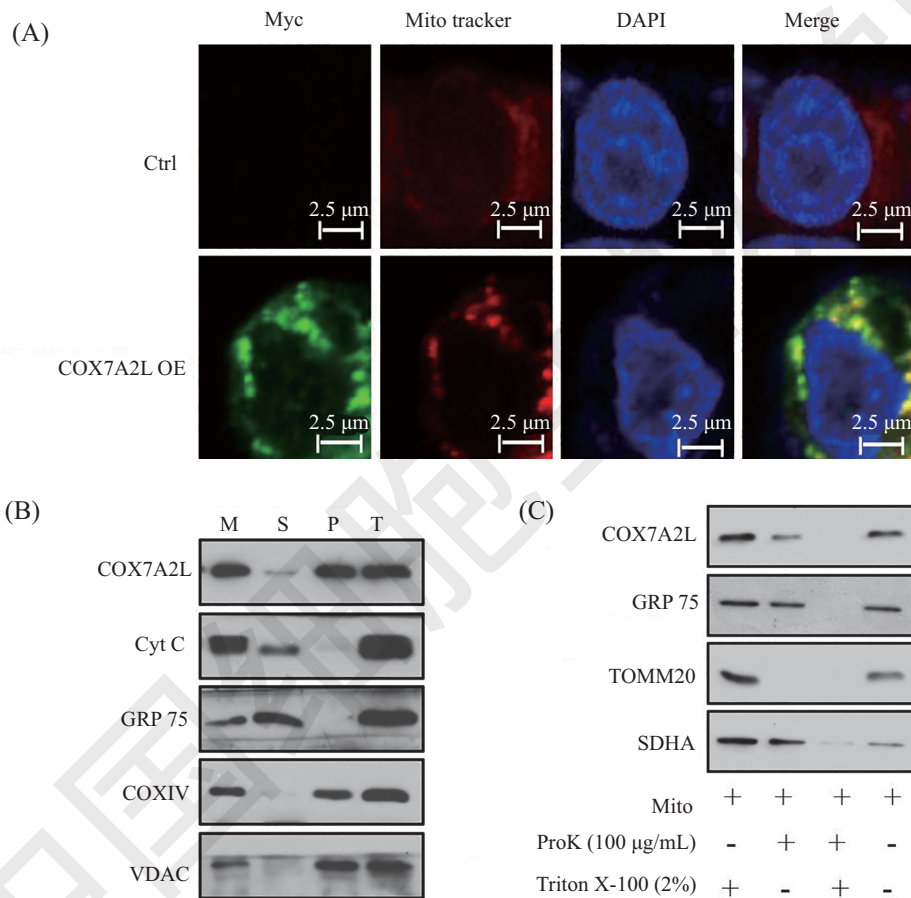
随后我们对COX7A2L的4种亚型蛋白质的表达模式进行了分析。我们对人体中高耗能的、心脏、肌肉、肝脏、脑四个组织进行了生物信息分析后发现, COX7A2L蛋白基本上由NM_001319036.1与NM_001319037.1两个转录本翻译而来, 也就是说人体内以a亚型的COX7A2L蛋白为主(图3A)。进一步对人源COX7A2L蛋白亚型的表达模式进行分析后, 我们发现, 人体内除了a亚型蛋白对应的mRNA外, d亚型对应的mRNA也存在大量的转录(图3B)。此外, b、c亚型对应的mRNA也有微弱的转录(图

3B)。上述结果提示, 这4类蛋白可能在人体细胞中均有表达。为了进一步研究这4种mRNA所对应蛋白的表达情况, 我们体外构建了4个不同版本cDNA的Myc标签慢病毒表达载体(图3C), 并对293T COX7A2L基因敲除细胞进行感染。我们首先发现, 在野生型293T细胞中, 只存在分子量约为12 kDa的COX7A2L蛋白(图3D)。由于a与b亚型约为12 kDa, c与d亚型分子量为7~8 kDa, 提示人源COX7A2L蛋白可能为a或b亚型(图3D)。进一步的外源蛋白过表达分析提示, a亚型为人源COX7A2L的主要表达亚型, b亚型虽有部分表达但极微弱。综上, 我们认

为: 人源COX7A2L蛋白以a亚型为主, 其中, 基因b与c亚型mRNA转录水平较低, 且在转录后蛋白不稳定; d亚型虽然具有较高的mRNA水平, 但是转录后蛋白表达不稳定; a亚型蛋白具有稳定的mRNA转录以及稳定的蛋白表达。最后, 我们对96个中国人COX7A2L基因的所有外显子进行了测序分析, 以筛查人群间COX7A2L的基因多态性。我们发现, 所有人群间蛋白编码区不存在多态性位点。上述结果表明, COX7A2L基因的保守性极高, 说明该蛋白可能具有非常重要的生物学功能(COX7A2L基因外显子测序结果可通过邮件向通讯作者获取)。

2.2 人源COX7A2L的定位分析

鼠源COX7A2L蛋白被报道定位在线粒体, 并且生物信息学分析其可能定位在线粒体膜上^[11]。前面的结果发现, COX7A2L的主要亚型为a, 因此, 我们在本研究中对人源COX7A2L蛋白的a亚型定位做了深入的实验分析。通过过表达Myc标签的外源性a亚型COX7A2L蛋白我们发现, COX7A2L蛋白与MitoTracker存在共定位, 证实COX7A2L蛋白的线粒体定位(图4A)。随后, 利用碳酸钠沉淀实验我们发现, COX7A2L主要定位在线粒体膜上(图4B)。精细的亚定位分析进一步提示, COX7A2L定位在线粒体

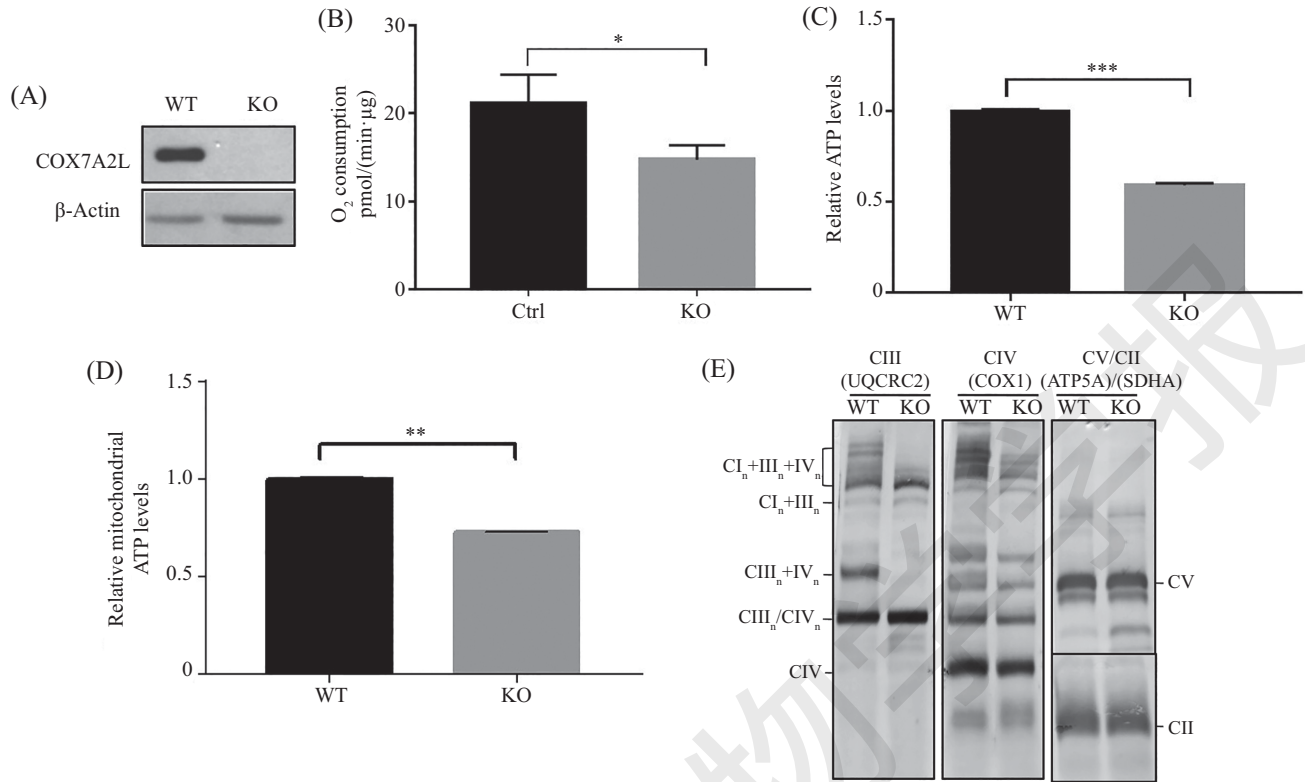


A: COX7A2L与细胞质和线粒体的共定位, 对照和COX7A2L过表达细胞对Myc(绿色)和线粒体(MitoTracker, 红色)进行染色, 所有细胞再经DAPI(蓝色)染色。在激光共聚焦显微镜下观察拍照, 并截取单个细胞作图; B: COX7A2L为线粒体膜蛋白。线粒体经碳酸钠处理后进行高速离心, 分别取上清和沉淀进行免疫印迹分析(M为线粒体, S为上清, P为沉淀, T为全细胞); C: 线粒体按照图中标明分别经蛋白酶K和Triton X-100处理后进行免疫印迹分析。

A: co-localization of COX7A2L to cytosol and mitochondria. Ctrl and COX7A2L OE 293T cells were probed with Myc (green) and mitochondria (MitoTracker Red). All cells were background stained with DAPI (blue). The images were taken with a confocal laser microscope and single cell is taken. B: COX7A2L is a membrane protein. Mitochondria were resuspended in sodium carbonate and followed by centrifugation. Samples (M, mitochondria; S: supernatant; P: pellet; T: total) were analyzed by Western blot using the indicated antibodies. C: mitochondria were incubated in the absence or presence of proteinase K (ProK) and Triton X-100 according to the figure. Samples were analyzed by Western blot using the indicated antibodies.

图4 COX7A2L定位于线粒体内膜

Fig.4 Mitochondrial inner membrane localization of COX7A2L



A: gRNA转染后用免疫印迹分析COX7A2L的表达水平; B: 分析对照细胞和293T COX7A2L敲除细胞基础氧耗量; C: 细胞ATP水平检测; D: 线粒体ATP生成水平检测; E: 呼吸链超级复合体检测。细胞基础氧耗量和ATP水平经蛋白浓度进行校正。免疫印迹分析所用抗体为抗-UQCRC2抗体、抗-SDHA抗体、抗-COX1抗体和抗ATP5A抗体。CI为复合体I, CII为复合体II, CIII为复合体III, CIV为复合体IV, CV为复合体V。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: Western blot analysis of COX7A2L expression after gRNA transfection; B: analysis of the oxygen consumption rate (OCR) of control cells and 293T COX7A2L knockout cells. C: measurements of cellular ATP levels; D: measurements of mitochondrial ATP levels; E: respiratory chain supercomplexes in control cells and 293T COX7A2L knockout cells. The values of OCR and ATP generation were normalized to protein concentration. Blots were probed with anti-UQCRC2, anti-SDHA, anti-COX1 and anti-ATP5A. CI: complex I; CII: complex II; CIII: complex III; CIV: complex IV; CV: complex V. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图5 在293T细胞中COX7A2L维持线粒体功能和呼吸链超级复合体组装

Fig.5 COX7A2L maintains mitochondrial function and respiratory chain supercomplex levels in 293T cells

内膜(图4C)。

2.3 COX7A2L的功能分析

为了进一步分析COX7A2L蛋白的功能, 我们利用CRISPR/Cas9技术在293T细胞中对COX7A2L蛋白进行了敲除(图5A)。通过对细胞的内源性氧呼吸进行测定后我们发现, COX7A2L^{-/-}的线粒体呼吸功能显著低于COX7A2L^{+/+}细胞(图5B)。同样, 我们也发现COX7A2L^{-/-}细胞的ATP含量和线粒体ATP生成水平显著低于COX7A2L^{+/+}细胞(图5C和图5D)。由于COX7A2L蛋白被报道与呼吸链超级复合体的组装密切相关^[11-13], 我们随后对COX7A2L^{-/-}与COX7A2L^{+/+}细胞的超级复合体组装进行了分析。通过非变性凝胶技术我们发现, COX7A2L敲除能够影响超级复合体I+III+IV的组装, 但并不会完全解除

超级复合体I+III+IV的组装。但值得注意的是, 超级复合体III+IV的组装受到的影响远大于超级复合体I+III+IV, 表明超级复合体I+III+IV的组装不完全依赖于COX7A2L蛋白的表达(图5E)。

3 讨论

COX7A2L蛋白最早在研究雌激素受体(ER)功能的时候被发现^[15], 目前关于ER对于COX7A2L表达的正负调控机制还存在争论^[16-17]。除此之外, 关于该蛋白在细胞中的功能研究迄今为止极其有限。直到2013年, 有研究发现, COX7A2L蛋白敲除的C57BL/6J小鼠肌肉存在能量代谢异常, 并且该蛋白可稳定线粒体超级复合体的组装。同年的另一项研究进一步认为, 这一蛋白可作为超级复合体的组装

因子通过促进超级复合体I+III+IV的组装来改善线粒体的功能^[14]。然而, 该项研究并不认为小鼠肌肉组织中的COX7A2L蛋白对线粒体超级复合体具有明显的功能改善作用。另外, 由于相关研究均基于鼠源COX7A2L蛋白, 对于COX7A2L在人体中的具体功能仍不明确。在本研究中我们发现, COX7A2L基因敲除的293T细胞的线粒体内源性呼吸功能以及线粒体ATP的生成能力都明显下降。因此, 我们推测, COX7A2L蛋白对于维持线粒体OXPHOS的功能至关重要。

当然, 我们也注意到之前的2项研究分别利用了COX7A2L基因敲除小鼠模型以及不同亚型的COX7A2L细胞模型, 鉴于COX7A2L基因敲除能够带来线粒体功能的差异, 而COX7A2L不同亚型虽然在小鼠骨骼肌细胞中不影响线粒体超级复合体的组装^[12], 但却在其他组织器官中影响了线粒体内类似的功能。我们推测, 不同亚型的COX7A2L可能均影响线粒体的功能, 而不同亚型在协助超级复合体的组装能力的差异可能因为肌肉组织中其他更为强大的超级复合体组装机制掩盖了不同亚型间的促超级复合体组装能力差异。

最近, 关于COX7A2L真实功能的研究存在极大的争论。在2013年的研究中, 鼠源的COX7A2L被认为是超级复合体组装的必需因子, 没有COX7A2L的细胞将不会有超级复合体I+III+IV的组装^[14]。随后, 有研究提出相反的观点, 认为COX7A2L并不参与超级复合体I+III+IV的组装^[18], 并且他们在后续研究中认为, COX7A2L可能仅仅是超级复合体III+IV组装的必需因子^[11]。我们在最近发表的文章中也发现, COX7A2L与超级复合体III+IV的组装密切相关, 但是鼠源COX7A2L确实参与了超级复合体I+III+IV的稳定组装, 但可能并不是超级复合体组装的必需因子^[9]。并且在本文中, 我们进一步确认了COX7A2L蛋白作为超级复合体III+IV组装的必需因子以及其作为超级复合体I+III+IV组装的必需性和非唯一性。

由于鼠源COX7A2L蛋白存在不同亚型, 并且不同亚型间的功能差异一直是COX7A2L功能存在争论的重要原因之一。因此, 我们在本研究中进一步对人源的COX7A2L亚型进行分析后发现, 人源COX7A2L只表达一种长亚型。在对近100个人的基因型分析后我们发现, COX7A2L长亚型的外显子区

以及邻近的剪切区不存在任何多态性位点。因此, 我们认为, 人源COX7A2L虽然在功能上同鼠源蛋白类型, 但人源COX7A2L似乎具有唯一性, 提示该蛋白在功能上的重要性和保守性。

综上, 我们发现, 人源COX7A2L同鼠源蛋白类似, 是超级复合体III+IV组装的必需因子, 并且同时也参与调控了部分超级复合体I+III+IV的组装。此外, 我们认为, 同鼠源蛋白相比, 人源COX7A2L具有更为单一的基因表达类型以及更高的基因保守性。我们推测, 该蛋白在人体细胞中可能发挥着更为重要的作用。

参考文献 (References)

- 1 Shen L, Fang H, Chen T, He J, Zhang M, Wei X, *et al.* Evaluating mitochondrial DNA in cancer occurrence and development. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1201: 26-33.
- 2 Letts JA, Sazanov LA. Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat Struct Mol Biol* 2017; 24(10): 800-8.
- 3 Chance B, Williams GR. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature* 1955; 175(4469): 1120-1.
- 4 Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* 1986; 18(5): 331-68.
- 5 Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 2008; 32(4): 529-39.
- 6 Guo R, Zong S, Wu M, Gu J, Yang M. Architecture of human mitochondrial respiratory megacomplex I2III2IV2. *Cell* 2017; 170(6): 1247.
- 7 Blaza JN, Serreli R, Jones AJ, Mohammed K, Hirst J. Kinetic evidence against partitioning of the ubiquinone pool and the catalytic relevance of respiratory-chain supercomplexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(44): 15735-40.
- 8 Maranzana E, Barbero G, Falasca AI, Lenaz G, Genova ML. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19(13): 1469-80.
- 9 Vukotic M, Oeljeklaus S, Wiese S, Vögtle FN, Meisinger C, Meyer HE, *et al.* Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metab* 2012; 15(3): 336-47.
- 10 Acin-Perez R, Enriquez JA. The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1837(4): 444-50.
- 11 Pérez-Pérez R, Lobo-Jarne T, Milenkovic D, Mourier A, Bratic A, García-Bartolomé A, *et al.* COX7A2L is a mitochondrial complex III binding protein that stabilizes the III2+IV supercomplex without affecting respirasome formation. *Cell Rep* 2016; 16(9): 2387-98.

- 12 Cogliati S, Calvo E, Loureiro M, Guaras AM, Nieto-Arellano R, Garcia-Poyatos C, *et al.* Mechanism of super-assembly of respiratory complexes III and IV. *Nature* 2016; 539(7630): 579-82.
- 13 Lapuente-Brun E, Enríquez JA. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 2013; 340(6140): 1567-70.
- 14 Ikeda K, Shiba S, Horieinoue K, Shimokata K, Inoue S. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat Commun* 2013; 4: 2147.
- 15 Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, Muramatsu M. Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol Cell Biol* 1998; 18(1): 442-9.
- 16 Arao Y, Hamilton KJ, Ray MK, Scott G, Mishina Y, Korach KS. Estrogen receptor α AF-2 mutation results in antagonist reversal and reveals tissue selective function of estrogen receptor modulators. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(36): 14986-91.
- 17 Bourdeau V, Deschênes J, Métivier R, Nagai Y, Nguyen D, Bretschneider N, *et al.* Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol* 2004; 18(6): 1411-27.
- 18 Mourier A, Matic S, Ruzzenente B, Larsson NG, Milenkovic D. The respiratory chain supercomplex organization is independent of COX7a2l isoforms. *Cell Metab* 2014; 20(6): 1069-75.
- 19 Sun D, Li B, Qiu R, Fang H, Jianxin L. Cell type-specific modulation of respiratory chain supercomplex organization. *Int J Mol Sci* 2016; 17(6): 926.