

人线粒体DNA复制与转录调控

陈博文^{1,2,3,4}, 王猛^{1,2,3,4*}, 管敏鑫^{1,2,3*}

(¹浙江大学医学院附属儿童医院国家儿童健康与疾病临床医学研究中心, 杭州 310057;

²浙江大学医学院遗传学研究所, 杭州 310058; ³浙江省遗传缺陷与发育障碍研究重点实验室, 杭州 310058;

⁴浙江大学爱丁堡大学联合学院, 海宁 314400)

摘要: 线粒体是真核细胞能量代谢、物质代谢和信号调控的核心细胞器。线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)的复制与转录调控对维持正常的线粒体功能至关重要。研究表明, 线粒体转录延伸因子(mitochondrial transcription elongation factor, TEFM)和线粒体DNA单链结合蛋白(mitochondrial DNA single-strand binding protein, mtSSB)作为调控mtDNA复制与转录之间转换的分子开关, 实现特异性调控mtDNA的维持和表达。本文就TEFM和mtSSB对mtDNA复制与转录的调控作简要总结, 以期为相关疾病的致病机制和干预研究提供思路。

关键词: 线粒体DNA; 复制; 转录; 线粒体转录延伸因子; 线粒体DNA单链结合蛋白

Replication-transcription regulation of human mitochondrial DNA

CHEN Bowen^{1,2,3,4}, WANG Meng^{1,2,3,4*}, GUAN Minxin^{1,2,3*}

(¹Division of Medical Genetics and Genomics, the Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine and National Clinical Research Center for Child Health, Hangzhou 310057, China; ²Institute of Genetics, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China; ³Provincial Key Lab of Genetic and Developmental Disorder, Hangzhou 310058, China; ⁴Zhejiang University-University of Edinburgh Institute, Haining 314400, China)

Abstract: Mitochondria are the key organelles in energy production, cell metabolism and signaling. The precise regulation of mitochondrial DNA (mtDNA) replication and transcription plays a critical role in the maintenance of mitochondrial functions. It has been shown that mitochondrial transcription elongation factor (TEFM) and mitochondrial DNA single-strand binding protein (mtSSB) act as molecular switches between mtDNA replication and transcription, allowing specific regulation of mtDNA maintenance and expression. In this review, we briefly summarize the recent advances in replication-transcription regulation of human mitochondrial DNA by TEFM and mtSSB in order to provide insights into the molecular mechanism and intervention strategy of diseases caused by the deficiency of TEFM and mtSSB.

Key Words: mitochondrial DNA; replication; transcription; mitochondrial transcription elongation factor; mitochondrial single-stranded DNA-binding protein

收稿日期: 2022-03-21

基金项目: 国家重点研发计划重点专项(2021YFC2700902, 2021YFC2701900); 国家自然科学基金项目(82030028); 浙江省高层次人才特殊支持计划青年拔尖人才项目

第一作者: E-mail: Bowen.19@intl.zju.edu.cn

*通信作者: 管敏鑫, E-mail: gminxin88@zju.edu.cn; 王猛, E-mail: mengwang@zju.edu.cn

1 人线粒体DNA

线粒体是真核细胞的“能量工厂”，通过氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)提供细胞各种生理活动所需约90%的ATP^[1]。人线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)全长16 569 bp, 为环状双链分子, 根据两条链在氯化铯梯度中浮动密度的显著差异分为重链(heavy strand, H)和轻链(light strand, L), 其中重链的鸟嘌呤(guanine, G)含量较高^[2]。mtDNA占人体细胞

内DNA总量的1%~2%, 编码37个基因, 包括13个OXPHOS蛋白亚基(复合物I的7个亚基、复合物Ⅲ的1个亚基、复合物Ⅳ的3个亚基以及复合物V的2个亚基)、22个转运RNA(transfer RNA, tRNA)和2个核糖体RNA(ribosomal RNA, rRNA)^[3]。各基因之间排列极为紧凑, 无基因特异的启动子和内含子, 部分基因甚至出现重叠或缺少完整的终止密码子(图1)^[4]。多种蛋白质与mtDNA形成具有多层结构、直径约为100 nm的拟

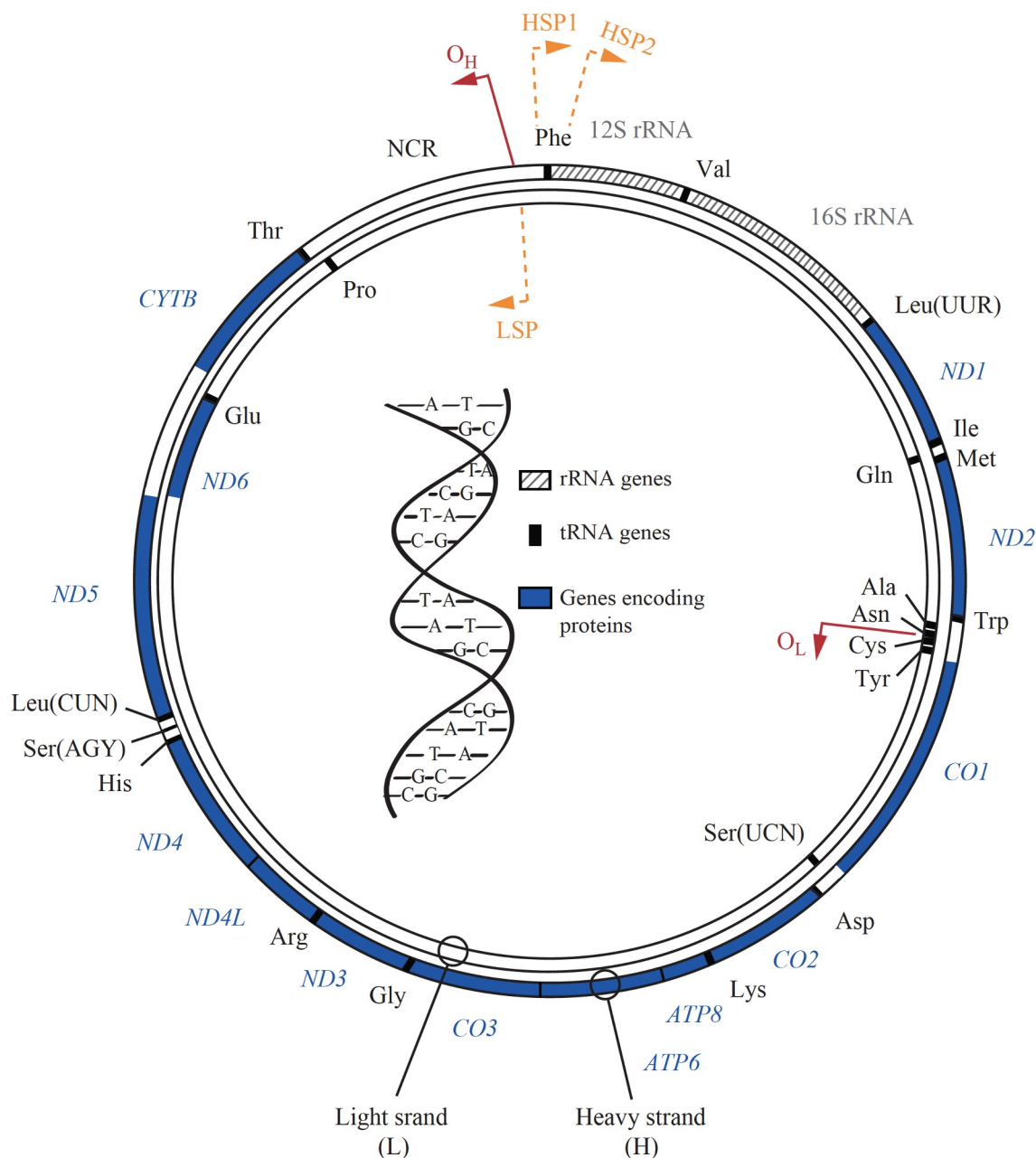


图1 人线粒体基因组

核(nucleoid), 与mtDNA的复制、转录等过程相关[5]。

不同于只有两个拷贝的核基因组, 每个细胞内的mtDNA可达上千拷贝。若细胞或组织中的所有mtDNA都相同, 称之为同质性; 若同一细胞同时存在野生型和突变型mtDNA分子时则称之为异质性[6]。mtDNA复制具有随机选择和独立于细胞周期的特点, 因此细胞中mtDNA分子的异质性水平具有动态性[7]。当突变型mtDNA分子的占比高于一定水平(又称为阈值)时, 线粒体功能出现异常, 导致出现线粒体疾病的临床表型[8]。线粒体功能障碍通常累及多个器官系统, 如神经系统、肌肉、心脏等, 发病率1/5 000, 临床表现多样, 分子机制复杂[9,10]。

2 人线粒体DNA复制

人mtDNA具有重链起始位点(O_H)和轻链起始位点(O_L)两个复制起始位点[11]。 O_H 位于非编码区, 而 O_L 位于编码五个tRNA的基因簇中的短非编码片段, 分别对应两条单链的单向复制(图1)[12]。人线粒体DNA复制的具体机制尚未明确, 目前存在三种模型, 即链置换模型、滞后链核糖核酸渗入(RNA incorporated throughout the lagging strand, RITOLS)模型和链耦合模型, 其中链置换模型认可度最高[13-15]。在链置换模型中, mtDNA的复制从 O_H 开始, mtDNA被TWINKLE线粒体DNA解旋酶解旋, 重链与线粒体DNA单链结合蛋白(mitochondrial single-stranded DNA-binding protein, mtSSB)结合, 线粒体RNA聚合酶(mitochondrial RNA polymerase, POLRMT)结合在轻链的轻链启动子(light strand promoter, LSP)上进行转录, 生成具有一条单链的几十个核苷酸大小的引物RNA, 帮助引导线粒体DNA聚合酶 γ (mitochondrial DNA polymerase subunit gamma, POLG)生成新的重链。新生成的重链和原轻链通过氢键结合, 借此将原重链置换, 形成D环复制中间物。当新生重链合成约2/3时, D环不断膨胀, 导致原重链上的 O_L 暴露出来。POLG经过原轻链的 O_L 之后, 原重链会折叠成茎环结构, 避免与mtSSB结合的同时与POLRMT结合, 以原重链为模板合成约25个核苷酸大小的引物RNA, 在POLG作用下合

成新的轻链。此后, 新生的重链与轻链持续合成, 直到POLG再次通过 O_H 或 O_L , 整个mtDNA分子完成复制, 其中重链合成率先遇到复制终点结束复制[12,15]。在链置换模型中, mtDNA复制是单向的、不对称的和异步的。由于启动轻链合成需要重链合成, 因此两条链的复制是关联的。

3 人线粒体DNA转录

线粒体基因组的转录起始于轻链启动子(light strand promoter, LSP)和重链启动子(heavy strand promoter, HSP)所在的非编码区(noncoding region, NCR)[16]。轻链启动子控制8个tRNA和ND6基因的转录。此外, 重链转录的双启动子模型被提出, 其中HSP1转录产生1个包含tRNA^{Phe}、tRNA^{Val}和2个rRNA(12S 和 16S rRNA)的转录本, 而HSP2引导的转录会生成一个几乎跨越整个基因组的转录本(图1)[17]。线粒体DNA的转录是以POLRMT为中心, 多种辅助因子共同调节的过程。在转录起始阶段, 线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)特异性结合LSP上游的DNA, 并诱导DNA发生180°弯曲, 同时招募POLRMT至转录起始位点[17]。线粒体转录因子B2(mitochondrial transcription factor B2, TFB2M)则协助POLRMT打开启动子区域并稳定解螺旋的DNA[18,19]。三者形成的转录起始复合物增强了POLRMT识别启动子的能力, 激活了线粒体DNA的转录[20]。之后TFB2M和POLRMT解离, 线粒体转录延长因子(mitochondrial transcription elongation factor, TEFM)与POLRMT特异性结合, POLRMT会通过保守序列块II(conserved sequence block II, CSB II)继续转录, 直到在线粒体终止因子(mitochondrial termination factor, MTERF)与mtDNA的特异性结合下终止[21,22]。

4 人线粒体DNA复制与转录转换的潜在调控机制

研究表明, TEFM和mtSSB作为调控mtDNA复制与转录之间转换的分子开关, 选择性地发生mtDNA复制或转录, 避免复制与转录同时进行发生冲突, 并实现了特异性调控mtDNA的维持和表达[23,24]。本文着重介绍TEFM和mtSSB在人线粒体

DNA复制和转录调控中的作用机制。

TEFM由4个外显子编码的360个氨基酸组成,包括N端的线粒体靶向序列、螺旋-发夹-螺旋结构域、中间连接结构域和C端的细菌RuvC类核糖核酸酶H折叠域四个部分^[25]。TEFM通过C端折叠域间的相互作用形成同源二聚体,后与POLRMT的C端催化域结合,通过参与mtDNA的转录延伸过程,调控mtDNA的复制与转录^[25]。当TEFM未与POLRMT结合时,线粒体基因组的转录会在LSP之后约120个碱基对的区域提前终止,合成用于mtDNA复制起始的短序列引物RNA,这是因为该区域存在一条富含G的基序序列并携带一个8 bp的间隔区和一个9 bp的AU富集区,即CSB II区域^[26]。当POLRMT通过CSB II时,转录延伸复合体中新合成的RNA和上游的DNA会与CSB II的大量鸟嘌呤形成G-四链体发夹结构,破坏转录延伸复合体的稳定性,导致转录的提前终止^[27]。而当TEFM存在时,TEFM会在POLRMT的RNA出口通道附近结合,并引导新合成的RNA与DNA分离直

到RNA长度达到约18~20个核苷酸;TEFM会与POLRMT的内嵌发夹结构和特殊环结构结合,封闭转录延伸复合体与CSB II的鸟嘌呤结合区域,进而阻止G-四链体的形成,延长并稳定线粒体基因组的转录(图2)^[28]。研究表明,C端折叠域和中间连接结构域确保了TEFM的抗转录终止能力,促进长片段的转录产物生成^[25]。

mtSSB由四个相对分子质量为16 000的亚基构成,具有两种不同的结合方式:对于长度大于60个核苷酸的单链DNA(single strand DNA, ssDNA),mtSSB的四个亚基会直接接触并完全包裹住ssDNA;而对于长度约为30个核苷酸的ssDNA,mtSSB四聚体中的两个亚基与之结合^[29]。通过与ssDNA的结合,mtSSB提高了TWINKLE的解旋能力和POLG的持续合成能力^[30]。敲除 $mtSSB$ 基因后,LSP远端基因($ND6$, LSP衍生的tRNA)表达水平增加,即mtDNA的转录向长片段转录倾斜^[24]。因此,引物RNA的表达水平降低,直接影响mtDNA的复制水平,导致mtDNA拷贝数降低。

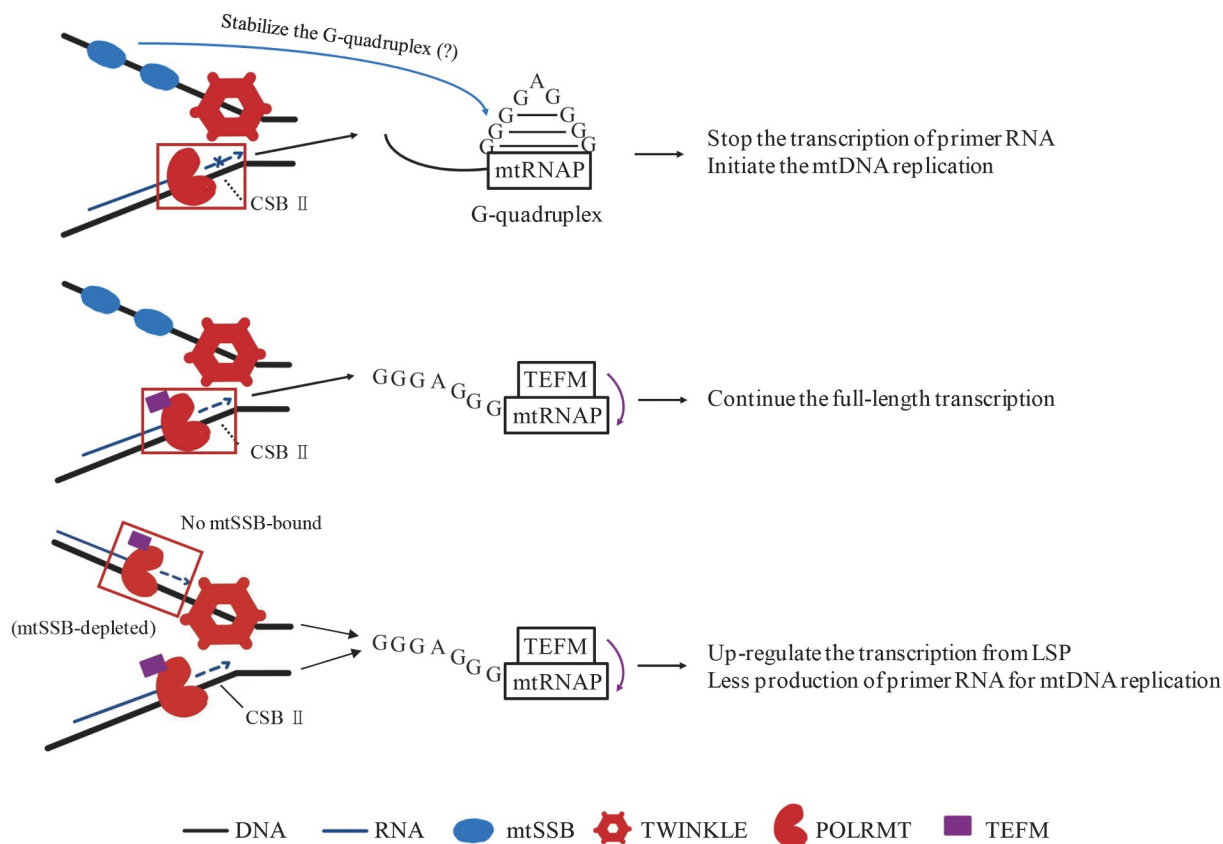


图2 人线粒体DNA复制与转录转换的潜在调控机制

笔者推测, mtSSB会稳定短序列转录产生的G-四链体的发夹结构, 从而实现O_H引物RNA的正常合成来推动mtDNA的复制, 然而该假说需要更多实验证明(图2)。TEFM和mtSSB均通过全长转录本和引物RNA的转录方式切换来调控人线粒体DNA在O_H的复制起始, 而关于O_L的mtDNA复制起始调控将是未来研究的方向之一。

5 人线粒体DNA复制与转录调控及疾病

人线粒体DNA复制与转录调控对mtDNA的维持、表达和线粒体的能量转换效率至关重要。人线粒体DNA复制与转录受mtDNA修饰和相关蛋白质因子等多种因素影响。研究表明, mtDNA启动子区域的5-甲基胞嘧啶修饰(5mC)可以增强TFAM与mtDNA的结合, 提高转录起始效率^[31]。mtDNA的N⁶-甲基腺嘌呤修饰(6mA)则抑制了TFAM与mtDNA的结合以及TFAM介导的DNA弯曲^[32]。缺氧条件下, mtDNA的6mA修饰水平增加, 表明mtDNA的复制和转录与环境压力息息相关^[32]。线粒体转录产生的双链RNA则可以激活MAVS信号通路, 促进干扰素 I 的合成, 从而引起固有免疫反应^[33]。除此之外, mtDNA复制和转录过程中的核心蛋白质因子如POLG、POLRMT等的功能障碍也与神经退行性疾病、心血管疾病的发生发展密切相关^[34,35]。

以下将以TEFM和mtSSB为例, 介绍线粒体DNA复制和转录调控与疾病的关系。TEFM在线粒体转录延伸过程中增强了线粒体转录延伸复合体的稳定性和持续合成能力, 同时通过抑制发夹结构G-四链体的形成来避免转录的中途终止。TEFM全身性基因敲除的小鼠会形成严重的发育缺陷, 并在胚胎发育的第8.5天致死^[36]。而条件性敲除心脏和骨骼肌的TEFM基因小鼠可以度过胚胎发育时期, 但其寿命显著缩短, 最大寿命为9周, 同时出现体重下降和心脏增大的特征, 导致心脏重量与体重的比值显著增加, 表现为线粒体心肌病^[36]。TEFM基因的缺失会诱导mtDNA的过量复制, 且线粒体质量与正常细胞的线粒体相比增大1.5倍。因为转录能力的下降, OXPHOS复合物 I、III和IV的表达量和活性大幅度降低, 线粒体氧化磷酸化水平下降^[36]。与TEFM类似, mtSSB全身性基因敲

除的小鼠也会形成严重的发育缺陷, 并在胚胎发育的第8.5天致死^[24]。在心脏和骨骼肌条件性敲除mtSSB基因, 小鼠的最大寿命则缩短为18周^[24]。在此期间, 小鼠的心脏重量占比逐渐提高, 伴随着在17周出现心肌病症状, 同时线粒体氧化磷酸化能力也出现了明显下降^[24]。因为不同组织器官对能量的需求量不同, 潜在调控因子的缺失通过降低线粒体氧化磷酸化水平主要影响对能量需求大的组织器官, 其中线粒体心肌病则最为常见。

选择性提高野生型mtDNA的比例和降低突变型mtDNA的比例以改变mtDNA的突变负荷水平, 可以有效提高受累组织、器官和细胞的线粒体活力^[37]。由于线粒体缺乏有效的DNA双链断裂修复机制, 线粒体靶向的锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)系统和转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)系统, 可以通过识别并剪切突变mtDNA, 引起突变mtDNA的降解, 从而降低突变mtDNA的比例^[38-40]。此外, 研究表明, 在不改变mtDNA突变负荷水平的情况下, 提高mtDNA拷贝数也可以缓解线粒体疾病的症状^[41,42]。基于线粒体DNA复制与转录调控, 可以通过调控TEFM和mtSSB的表达水平实现对mtDNA拷贝数和细胞突变负荷的特异性调控, 实现对线粒体疾病的有效干预。

6 小结

线粒体DNA复制与转录调控对线粒体功能的维持至关重要。本文对线粒体DNA复制与转录调控核心蛋白质TEFM和mtSSB的作用机制及其导致线粒体心肌病的分子机理进行了讨论和总结。线粒体疾病危害严重、致病机制复杂, 有效治疗手段匮乏, 线粒体DNA复制与转录调控机制的研究将有助于理解相关疾病的发生机制并为后期的治疗提供理论基础。

参考文献

- [1] Koc EC, Koc H. Regulation of mammalian mitochondrial translation by post-translational modifications. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(9-10): 1055-1066
- [2] Nass MMK, Nass S. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J Cell Biol*, 1963, 19(3): 593-611

- [3] Naini A, Gilkerson R, Shanske S, et al. Detection of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations. *Methods Cell Biol*, 2020, 155: 383-400
- [4] Ojala D, Montoya J, Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 1981, 290(5806): 470-474
- [5] Lee SR, Han J. Mitochondrial nucleoid: shield and switch of the mitochondrial genome. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 1-15
- [6] Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol*, 2015, 77(5): 753-759
- [7] Bogenhagen D, Clayton DA. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell*, 1977, 11(4): 719-727
- [8] Rossignol R, Faustin B, Rocher C, et al. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*, 2003, 370(3): 751-762
- [9] Abu-Amero KK, Bosley TM. Mitochondrial abnormalities in patients with LHON-like optic neuropathies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(10): 4211-4220
- [10] Bloemberg D, Quadriatero J. Autophagy, apoptosis, and mitochondria: molecular integration and physiological relevance in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 317(1): C111-C130
- [11] Lott MT, Leipzig JN, Derbeneva O, et al. mtDNA variation and analysis using mitomap and mitomaster. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2013, 44(1): 1
- [12] Zinovkina LA. DNA replication in human mitochondria. *Biochemistry (Mosc)*, 2019, 84(8): 884-895
- [13] Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell*, 2000, 100(5): 515-524
- [14] Yasukawa T, Reyes A, Cluett TJ, et al. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *EMBO J*, 2006, 25(22): 5358-5371
- [15] Robberson DL, Clayton DA. Replication of mitochondrial DNA in mouse L cells and their thymidine kinase derivatives: displacement replication on a covalently-closed circular template. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69(12): 3810-3814
- [16] Montoya J, Christianson T, Levens D, et al. Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(23): 7195-7199
- [17] Lodeiro MF, Uchida A, Bestwick M, et al. Transcription from the second heavy-strand promoter of human mtDNA is repressed by transcription factor A *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(17): 6513-6518
- [18] Hillen HS, Morozov YI, Sarfallah A, et al. Structural basis of mitochondrial transcription initiation. *Cell*, 2017, 171(5): 1072-1081.e10
- [19] Litonin D, Sologub M, Shi Y, et al. Human mitochondrial transcription revisited. *J Biol Chem*, 2010, 285(24): 18129-18133
- [20] Ringel R, Sologub M, Morozov YI, et al. Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature*, 2011, 478(7368): 269-273
- [21] Yakubovskaya E, Mejia E, Byrnes J, et al. Helix unwinding and base flipping enable human MTERF1 to terminate mitochondrial transcription. *Cell*, 2010, 141(6): 982-993
- [22] Posse V, Shahzad S, Falkenberg M, et al. TEFM is a potent stimulator of mitochondrial transcription elongation *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(5): 2615-2624
- [23] Agaronyan K, Morozov YI, Anikin M, et al. Replication-transcription switch in human mitochondria. *Science*, 2015, 347(6221): 548-551
- [24] Jiang M, Xie X, Zhu X, et al. The mitochondrial single-stranded DNA binding protein is essential for initiation of mtDNA replication. *Sci Adv*, 2021, 7(27): eabf8631
- [25] Hillen HS, Parshin AV, Agaronyan K, et al. Mechanism of transcription anti-termination in human mitochondria. *Cell*, 2017, 171(5): 1082-1093.e13
- [26] Yu H, Xue C, Long M, et al. TEFM enhances transcription elongation by modifying mtRNAP pausing dynamics. *Biophys J*, 2018, 115(12): 2295-2300
- [27] Wanrooij PH, Uhler JP, Simonsson T, et al. G-quadruplex structures in RNA stimulate mitochondrial transcription termination and primer formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(37): 16072-16077
- [28] Minczuk M, He J, Duch AM, et al. TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(10): 4284-4299
- [29] Qian Y, Johnson KA. The human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein displays distinct kinetics and thermodynamics of DNA binding and exchange. *J Biol Chem*, 2017, 292(31): 13068-13084
- [30] Farr CL, Matsushima Y, Lagina Iii AT, et al. Physiological and biochemical defects in functional interactions of mitochondrial DNA polymerase and DNA-binding mutants of single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem*, 2004, 279(17): 17047-17053
- [31] Dostal V, Churchill MEA. Cytosine methylation of mitochondrial DNA at CpG sequences impacts transcription factor A DNA binding and transcription. *Biochim Biophys Acta Gene Regulatory Mech*, 2019, 1862(5): 598-607
- [32] Hao Z, Wu T, Cui X, et al. N⁶-deoxyadenosine methylation in mammalian mitochondrial DNA. *Mol Cell*, 2020,

- 78(3): 382-395.e8
- [33] Dhir A, Dhir S, Borowski LS, et al. Mitochondrial double-stranded RNA triggers antiviral signalling in humans. *Nature*, 2018, 560(7717): 238-242
- [34] Wong LJC, Naviaux RK, Brunetti-Pierri N, et al. Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to POLG mutations. *Hum Mutat*, 2008, 29(9): E150-E172
- [35] Oláhová M, Peter B, Szilagyi Z, et al. POLRMT mutations impair mitochondrial transcription causing neurological disease. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1135
- [36] Jiang S, Koolmeister C, Misic J, et al. TEFM regulates both transcription elongation and RNA processing in mitochondria. *EMBO Rep*, 2019, 20(6): e48101
- [37] Emperador S, López-Gallardo E, Hernández-Ainsa C, et al. Ketogenic treatment reduces the percentage of a LHON heteroplasmic mutation and increases mtDNA amount of a LHON homoplasmic mutation. *Orphanet J Rare Dis*, 2019, 14(1): 150
- [38] Saravanan S, Lewis CJ, Dixit B, et al. The mitochondrial genome in aging and disease and the future of mitochondrial therapeutics. *Biomedicines*, 2022, 10(2): 490
- [39] Bayona-Bafaluy MP, Blits B, Battersby BJ, et al. Rapid directional shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in animal tissues by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(40): 14392-14397
- [40] Yang X, Jiang J, Li Z, et al. Strategies for mitochondrial gene editing. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 3319-3329
- [41] Filograna R, Koolmeister C, Upadhyay M, et al. Modulation of mtDNA copy number ameliorates the pathological consequences of a heteroplasmic mtDNA mutation in the mouse. *Sci Adv*, 2019, 5(4): eaav9824
- [42] Jiang M, Kauppila TES, Motori E, et al. Increased total mtDNA copy number cures male infertility despite unaltered mtDNA mutation load. *Cell Metab*, 2017, 26(2): 429-436.e4