

DOI: 10.13376/j.cbls/2020018

文章编号: 1004-0374(2020)02-0139-04

*Twinkle*突变导致Perrault综合征的研究进展

田国帅¹, 董文吉², 汪伟^{3*}, 张业^{1*}

(1 北京协和医学院/中国医学科学院基础医学研究所生物化学与分子生物学系, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100730; 2 中吉智药(北京)生物技术有限公司, 北京 100176; 3 中日友好医院神经内科, 北京 100029)

摘要: *Twinkle* 基因编码蛋白 TWINKLE 可进入线粒体内参与复制体的组成, 维持线粒体 DNA 数目的稳定。Perrault 综合征作为一种罕见的常染色体隐性遗传病, 可由 *Twinkle* 突变导致, 目前该疾病暂无全面的诊断方法和有效的治疗手段。现简要概述了 *Twinkle* 突变导致 Perrault 综合征的研究进展。

关键词: *Twinkle*; Perrault 综合征; 线粒体 DNA

中图分类号: Q31; R596 **文献标志码:** A

Research progress on Perrault syndrome caused by *Twinkle* mutations

TIAN Guo-Shuai¹, DONG Wen-Ji², WANG Wei^{3*}, ZHANG Ye^{1*}

(1 State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China; 2 Genmedicin Biopharma Incorporation, Beijing 100176, China; 3 Department of Neurology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract: *Twinkle* gene coding protein TWINKLE could enter the mitochondria to participate in the composition of the replicators, which plays a role in the mitochondrial DNA (mtDNA) maintenance. Perrault syndrome (PRLTS), a rare autosomal recessive genetic disease, could be caused by *Twinkle* mutations and there is no comprehensive diagnosis and effective treatment for this disease currently. This article provides a brief overview of the progress of the research on the PRLTS caused by *Twinkle* mutations.

Key words: *Twinkle*; PRLTS; mtDNA

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 长度一般为几万至数十万碱基对, 因物种类型而存在差别。人类 mtDNA 为双链环状 DNA 结构, 长度为 16 569 bp, 由 37 个基因组成, 可编码 2 种 rRNA (12S rRNA 和 16S rRNA)、22 种 tRNA 以及 13 种多肽 (呼吸链复合物 I、III、IV、V 的亚基)^[1], 主要参与三羧酸循环、氧化磷酸化等生物化学反应, 进而产生能量和影响细胞状态的物质, 如有氧条件下生成的副产物活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS), 它能促使细胞衰老并导致生物大分子的破坏。线粒体同时能储存钙离子, 并参与细胞周期的调控, 促使细胞程序性凋亡, 因而 mtDNA 数目稳定及稳定转录表达极为重要。复制体 (replisome) 在

维持 mtDNA 数目稳定的过程中发挥重要作用, 其组成蛋白主要包括 DNA 聚合酶 γ 、单链 DNA 结合蛋白、线粒体拓扑异构酶 I、线粒体 RNA 聚合酶、RNase H1、线粒体基因组维持核酸外切酶 1 和解旋酶 TWINKLE^[1-2]。双链 DNA 改变拓扑结构后与 TWINKLE 蛋白结合, 从 5' 端开始解旋, 进而进行复制和转录等重要生化活动。

收稿日期: 2019-11-09; 修回日期: 2019-12-30

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81701131); 北京协和医学院研究生创新基金项目 (2019-0710-21)

*通信作者: E-mail: stevanwei@163.com (汪伟), yezhang@pumc.edu.cn (张业)

1 TWINKLE蛋白的结构

Twinkle 基因位于细胞核基因组第 10 号染色体第 2 个读码框, 因而又称之为 C10orf2。Twinkle 表达产生两类单体: 由 684 个氨基酸组成的 TWINKLE 蛋白和由 582 个氨基酸组成的 TWINKY 蛋白。两种蛋白质均主要定位于线粒体拟核部位, 但由于 TWINKY 缺少 C 端 (C-terminal domain, CTD) 相应的解旋酶结构域, 因而不能行使解旋酶功能, TWINKY 在细胞内发挥的作用仍不清楚^[3]。TWINKLE 单体主要分为三个区域 (图 1): N 端 (N-terminal domain, NTD), 包含线粒体靶向序列 (mitochondrion target sequence, MTS) 和原核 DnaG 类型的引发酶结构域, 引发酶结构域由锌离子结合结构域 (zinc binding domain, ZBD) 和 RNA 聚合酶结构域 (RNA polymerase domain, RPD) 组成, 可依靠引发位点与单链 DNA 结合并识别三核苷酸模式, 从而引发 DNA 的自我复制和转录^[4-5]; CTD, 与 T7 噬菌体 gp4 蛋白相似程度较高, 具有解旋酶结构域; 中间有一个连接区域, 便于 TWINKLE 单体聚合为寡聚体^[6]。

TWINKLE 解旋酶以聚合体形式存在于线粒体内。2015 年, 科学家通过采用电子显微镜和 X 射线散射技术首次解析了 TWINKLE 六聚体和七聚体的三维结构, 其中一个亚基的 ZBD 和 RPD 能够分别与相邻亚基的 RPD 和 CTD 相互作用^[4]。对野生型 TWINKLE 结构的研究发现, 无论结合三磷酸核苷酸 (nucleoside triphosphates, NTP) 与否, TWINKLE 均可以形成六聚体和七聚体寡聚物: 在没有结合 NTP 的情况下, TWINKLE 呈现灵活的星形构象, 其中的引发酶结构域通过连接区域从中央孔中伸出; 结合 NTP 后, 引发酶结构域重新定位在相邻的单体解旋酶结构域上方, 从而形成更紧凑的结构^[7]。

2 TWINKLE蛋白的功能

TWINKLE 解旋酶活性呈现 NTP 依赖性, 结合并水解 ATP 或 UTP 后解旋酶活性最高^[8]。TWINKLE 不仅具有解旋酶活性, 还可依靠 NTD 区的引发酶结构域结合单链 DNA 参与两条单链的退火和同源序列替换等生化活动, 进而参与 mtDNA 双链断裂修复过程^[8-9]。降低 *Twinkle* 表达可导致 mtDNA 拷贝数降低, 并减缓线性 mtDNA 降解速度, 表明 TWINKLE 可参与因为双链 mtDNA 断裂产生的线性 mtDNA 降解过程, 维持 mtDNA 稳定性^[10-11]。TWINKLE 蛋白不仅在线粒体基因组水平上发挥重

要作用, 还参与多种生物化学反应。TWINKLE 蛋白可促进线粒体 RNA 的合成和加工^[12]。过表达 *Twinkle* 基因可以促使心肌保护, 同时降低线粒体内 ROS 水平, 表明 TWINKLE 参与氧化磷酸化反应^[13]。胞质内的 TWINKLE 蛋白可参与动粒复合体的形成进而参与细胞有丝分裂过程, 调控细胞周期^[14]。

3 *Twinkle*突变导致疾病的分子机制

Twinkle 基因的突变可导致进行性眼外肌麻痹 (progressive external ophthalmoplegia, PEO)、婴儿期脊髓小脑性共济失调 (infantile onset spinocerebellar ataxia, IOSCA)、早发性脑病等疾病^[1, 15], 也可导致伴有神经系统部位损伤的 Perrault 综合征 (Perrault syndrome, PRLTS)^[6]。对 TWINKLE 致病突变体的 ATP 水解酶活性及解旋酶活性研究发现, 大部分突变体的酶活性减弱, 但有趣的是, 个别 TWINKLE 突变体 (如 P335L) 会形成更多寡聚体形式进而导致解旋能力增强^[7, 16]。通过引入外源 TWINKY 编码序列和 TWINKLE 353~365 氨基酸重复编码序列构建小鼠疾病模型发现, 小鼠多种组织中 mtDNA 拷贝数减少, 部分肌纤维内部出现空泡化并伴随自噬体的产生, 肌膜下线粒体聚集, 小脑内细胞色素 C 氧化酶活性丧失, Parkin 表达水平下降引发多巴胺能神经元细胞自噬^[10, 17-18]。

4 PRLTS临床症状及其相关TWINKLE突变位点

PRLTS 是一种罕见的常染色体隐性遗传病, 目前全世界报道的病例不超过 100 例^[19]。患者通常在青少年时期出现进行性呼吸障碍、双耳进行性感音神经性耳聋等症状, 在神经系统方面出现智力障碍、小脑脊髓共济失调、平衡和协调运动困难、四肢感觉丧失和周围神经病变导致无力等临床症状, 但并非所有患者都出现神经系统症状^[20]。女性患者还伴有卵巢发育不良症状^[6, 21]。在临床上, PRLTS 可分为两种类型: 没有神经系统表现的为 I 型, 有神经系统表现的为 II 型。依据不同的基因突变可将 PRLTS 划分为六个类型: PRLTS1~6 分别由 HSD17B4、HARS2、CLPP、LARS2、TWINKLE、ERAL1 等 6 个基因突变引发^[19, 21-27]。

Twinkle 突变会导致 II 型 PRLTS^[21]。图 1 展示了目前已知的导致 PRLTS 的 TWINKLE 突变位点。2014 年, 通过对患者家族外显子测序首次报道了 TWINKLE 第 391、585 位氨基酸编码序列及第 441、

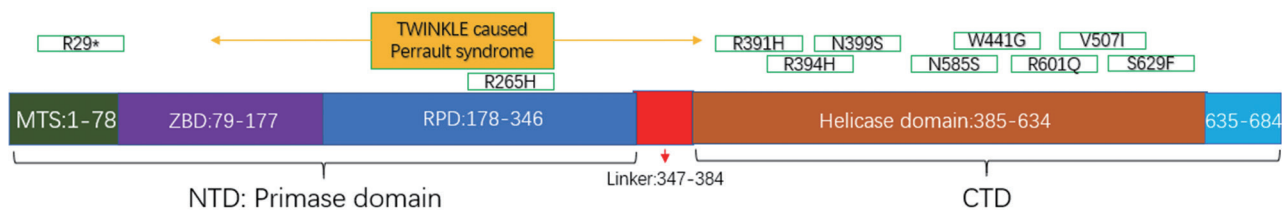


图1 TWINKLE蛋白结构及其导致PRLTS的突变位点

507 位氨基酸编码序列复合杂合突变导致 PRLTS 的病例, 患者有氧运动后肌肉内乳酸水平过度升高^[6]。2017 年报道了 TWINKLE 第 399 和第 601 位氨基酸编码序列的突变导致 PRLTS 的病例, 患者同时出现了前庭耳蜗神经萎缩、小脑灰质减少伴白质体积增加的新型症状^[28]。2019 年报道了第 629 位氨基酸编码序列突变并伴随编码区第 85 个碱基突变造成翻译提前终止的 PRLTS 病例^[21]。TWINKLE 编码区第 85 个碱基突变造成翻译提前终止还会造成早期的肝脏衰竭, 但肝脏衰竭不属于既往已知的 PRLTS 症状^[29]。因而, TWINKLE 同一突变可能引发多种疾病。本实验室近期报道了 TWINKLE 第 265 和第 394 位氨基酸编码序列的突变引发 PRLTS 的首例中国病例^[30], 目前正在进行两个杂合突变的致病分子机制研究。

5 展望

本文在此将从 PRLTS 的诊断和遗传分析及治疗等三方面进行展望。PRLTS 可能未得到充分诊断。由于男性 PRLTS 患者可不出现性腺功能减退的临床症状, 部分女性 PRLTS 患者患有原发性卵巢功能衰竭, 因而以听力功能障碍为主要症状的男性患者和患有原发性卵巢功能衰竭的青少年女性患者易出现错诊, 因此, 应该由耳科医生、内分泌科医生和神经科医生共同进行神经功能评估、家族史和发生情况的诊断, 以确定真实患病率和发现 PRLTS 其他临床表征。

目前 60% 的 PRLTS 病例中遗传病因仍未确定, 因而急需寻找更多导致 PRLTS 的致病基因并进一步研究致病分子机制。目前针对 6 个 PRLTS 致病基因, 尚无法建立基因型与表型的相关性, 因此急需进行此项工作以便对新病例进行鉴定分类及进一步完善确定 PRLTS 分子表征。

PRLTS 治疗方法仍非常有限: 针对女性卵巢发育不良症状, 主要采用激素替代疗法进行个性化治疗; 针对听力障碍者, 主要是特殊教育资源的使

用和助听器、触觉感应设备等电子仪器的配备; 对于重度及严重听力损失的 12 个月以上的儿童进行人工耳蜗植入。随着基因治疗技术的不断发展和完善, 可针对 PRLTS 常染色体隐性遗传病采用正常基因替换或补偿突变基因进行缓解和治疗, 但更多的治疗方法和细节仍需要不断深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] El-Hattab AW, Craigen WJ, Scaglia F. Mitochondrial DNA maintenance defects. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863: 1539-55
- [2] Korhonen JA, Pham XH, Pellegrini M, et al. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome *in vitro*. *EMBO J*, 2004, 23: 2423-9
- [3] Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, et al. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet*, 2001, 28: 223-31
- [4] Fernandez-Millan P, Lazaro M, Cansiz-Arda S, et al. The hexameric structure of the human mitochondrial replicative helicase Twinkle. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43: 4284-95
- [5] Shutt TE, Gray MW. Twinkle, the mitochondrial replicative DNA helicase, is widespread in the eukaryotic radiation and may also be the mitochondrial DNA primase in most eukaryotes. *J Mol Evol*, 2006, 62: 588-99
- [6] Morino H, Pierce SB, Matsuda Y, et al. Mutations in Twinkle primase-helicase cause Perrault syndrome with neurologic features. *Neurology*, 2014, 83: 2054-61
- [7] Peter B, Farge G, Pardo-Hernandez C, et al. Structural basis for adPEO-causing mutations in the mitochondrial TWINKLE helicase. *Hum Mol Genet*, 2019, 28: 1090-9
- [8] Sen D, Nandakumar D, Tang GQ, et al. Human mitochondrial DNA helicase TWINKLE is both an unwinding and annealing helicase. *J Biol Chem*, 2012, 287: 14545-56
- [9] Sen D, Patel G, Patel SS. Homologous DNA strand exchange activity of the human mitochondrial DNA helicase TWINKLE. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 4200-10
- [10] Tyynismaa H, Sembongi H, Bokori-Brown M, et al. Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Human Mol Genet*, 2004, 13: 3219-27

- [11] Peeva V, Blei D, Trombly G, et al. Linear mitochondrial DNA is rapidly degraded by components of the replication machinery. *Nat Commun*, 2018, 9: 1727
- [12] Hensen F, Potter A, van Esveld SL, et al. Mitochondrial RNA granules are critically dependent on mtDNA replication factors Twinkle and mtSSB. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: 3680-98
- [13] Ikeda M, Ide T, Fujino T, et al. Overexpression of TFAM or Twinkle increases mtDNA copy number and facilitates cardioprotection associated with limited mitochondrial oxidative stress. *PLoS One*, 2015, 10: e0119687
- [14] Uittenbogaard M, Chiaramello A. Novel subcellular localization of the DNA helicase Twinkle at the kinetochore complex during mitosis in neuronal-like progenitor cells. *Histochem Cell Biol*, 2016, 145: 275-86
- [15] Bouchereau J, Barrot SV, Dupre T, et al. Abnormal glycosylation profile and high α -fetoprotein in a patient with Twinkle variants. *JIMD Rep*, 2016, 29: 109-13
- [16] Longley MJ, Humble MM, Sharief FS, et al. Disease variants of the human mitochondrial DNA helicase encoded by C10orf2 differentially alter protein stability, nucleotide hydrolysis, and helicase activity. *J Biol Chem*, 2010, 285: 29690-702
- [17] Tyynismaa H, Mjosund KP, Wanrooij S, et al. Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 17687-92
- [18] Song L, Shan Y, Lloyd KC, et al. Mutant Twinkle increases dopaminergic neurodegeneration, mtDNA deletions and modulates Parkin expression. *Hum Mol Genet*, 2012, 21: 5147-58
- [19] Kim MJ, Kim SJ, Kim J, et al. Genotype and phenotype heterogeneity in Perrault syndrome. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 2013, 26: e25-7
- [20] Zerkaoui M, Demain LAM, Jaouad IC, et al. Marfanoid habitus is a nonspecific feature of Perrault syndrome. *Clinl Dysmorphol*, 2017, 26: 200-4
- [21] Dominguez-Ruiz M, Garcia-Martinez A, Corral-Juan M, et al. Perrault syndrome with neurological features in a compound heterozygote for two TWNK mutations: overlap of TWNK-related recessive disorders. *J Transl Med*, 2019, 17: 290
- [22] Brodie EJ, Zhan H, Saiyed T, et al. Perrault syndrome type 3 caused by diverse molecular defects in CLPP. *Sci Rep*, 2018, 8: 12862
- [23] Pierce SB, Walsh T, Chisholm KM, et al. Mutations in the DBP-deficiency protein HSD17B4 cause ovarian dysgenesis, hearing loss, and ataxia of Perrault syndrome. *Am J Hum Genet*, 2010, 87: 282-8
- [24] Karstensen HG, Rendtorff ND, Hindbaek LS, et al. Novel HARS2 missense variants identified in individuals with sensorineural hearing impairment and Perrault syndrome. *Eur J Med Genet*, 2019, [Epub ahead of print]
- [25] Al-Jaroudi D, Enabi S, Sameer AlThagafi M. Perrault syndrome with amenorrhea, infertility, Tarlov cyst, and degenerative disc. *Gynecol Endocrinol*, 2019, 35: 1037-9
- [26] Chatzispirou IA, Alders M, Guerrero-Castillo S, et al. A homozygous missense mutation in ERAL1, encoding a mitochondrial rRNA chaperone, causes Perrault syndrome. *Hum Mol Genet*, 2017, 26: 2541-50
- [27] Pierce SB, Gersak K, Michaelson-Cohen R, et al. Mutations in LARS2, encoding mitochondrial leucyl-tRNA synthetase, lead to premature ovarian failure and hearing loss in Perrault syndrome. *Am J Hum Genet*, 2013, 92: 614-20
- [28] Oldak M, Ozieblo D, Pollak A, et al. Novel neuro-audiological findings and further evidence for TWNK involvement in Perrault syndrome. *J Transl Med* 2017, 15: 25
- [29] Goh V, Helbling D, Biank V, et al. Next-generation sequencing facilitates the diagnosis in a child with twinkle mutations causing cholestatic liver failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012, 54: 291-4
- [30] Duan X, Wang W, Dong M, et al. Clinical and genetic analysis of a patient with Perrault syndrome and additional neurological features. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2019, 36: 577-80