

Frataxin、线粒体铁代谢与 Friedreich 遗传性共济失调

姜宏 钱忠明

铁对于细胞的生存是必需的,它不仅参与细胞的呼吸过程、蛋白质合成、神经髓鞘形成,而且参与遗传物质 DNA 的合成。机体铁缺乏将严重影响这些重要的生理活动。另一方面,组织铁过量可诱发自由基生成,进而造成生物大分子,如脂质、蛋白质、碳水化合物及核酸等的损伤,最终导致细胞死亡^[1]。已有大量的证据显示,许多神经变性疾病,包括帕金森病和老年痴呆症,患者脑内神经元的死亡可能与脑铁异常增高有关^[2]。新的研究发现,铁异常增高可能也是弗里德赖希共济失调(Friedreich ataxia, FRDA)的一个重要病因。FRDA 是德国医学教授弗里德赖希在 1863 年首先报道的,其主要特征为进行性运动失调、感觉丧失和肌无力。最近研究发现,FRDA 基因及其 GAA 三联体的重复扩增突变^[3],由于 FRDA 基因突变造成其编码的蛋白质 frataxin 缺乏或功能异常,因此导致线粒体铁代谢紊乱及相应的细胞死亡,这可能是 FRDA 的发病学本质所在。换言之,frataxin 在线粒体内铁动态平衡调节方面起关键作用。我们就 FRDA 基因编码的蛋白质 frataxin,及其在铁代谢中的作用和 FRDA 关系的最新研究进展综述如下。

一、FRDA 基因及其表达

编码人类 frataxin 的 FRDA 基因,位于第 9 号染色体长臂的远端,是由 7 个外显子组成的 95 kb 的基因。它的转录是从着丝点向端粒方向。具有主要功能的 mRNA 由前 5 个外显子(1~5a)编码,其长度为 1.3 kb^[3]。极少数变异的转录是由 5b 代替 5a 编码,后面还跟着 1 个未编码的第 6 个外显子,这种转录的意义至今仍不清楚。FRDA 基因在许多细胞中都有表达,但在不同组织和不同发育阶段它的表达水平不同。在小鼠胚胎中,在胚胎期 10.5 d 开始在神经上皮表达,在胚胎期 14.5 d 达到高峰。在小鼠发育过程中,frataxin mRNA 在脊髓中最高,特别是在胸腰段和背根神经节。Frataxin mRNA 在发育的大脑中表达甚多,尤其是在脑室周围、皮层和神经节突起处的增生的神经细胞上数目众多。在心脏、躯干、一些上皮(皮肤、牙齿)和间质组织(褐色脂肪)中表达也很多。在成年小鼠脑内,frataxin mRNA 的水平降低,而且局限在室管周围,但在脊髓和背根神经节含量仍很高。FRDA 基因的表达部分与 FRDA 的病理改变部位有关。成

人体内 frataxin mRNA 在心脏和脊髓表达最多,其次是肝脏、骨骼肌和胰腺。在中枢神经系统中,它在背根神经节表达最强。这一部分是感觉神经元细胞体聚集处,在 FRDA 中它最先受累。在脊髓和小脑的颗粒层中 FRDA 表达相对较少。FRDA 基因也在非神经组织中表达,如心脏和胰腺,因此,在 FRDA 患者中观察到肥厚性心肌病和糖尿病。在其他组织,如肝脏、肌肉、胸腺和褐色脂肪,虽然在 FRDA 中未受影响,但也有 frataxin 的表达。所有表达 FRDA 基因的组织都富含线粒体,而在 FRDA 受损的常常是那些不可再生而又富含线粒体的组织,如神经元、心肌和胰腺的 β 细胞。神经元和心肌细胞都是绝对依赖有氧呼吸的,它们对线粒体的缺陷尤其敏感。因此,在 FRDA 中受损较严重。

二、Frataxin 蛋白结构

1. Frataxin 分子结构: Frataxin 的蛋白结构是目前的研究焦点。Frataxin 的晶体结构^[4],用核磁共振法得到这种可溶性蛋白的 M 结构^[5]以及 frataxin 细菌同源体 CyaY 的晶体结构^[6]的研究,均证实成熟的 frataxin 是 1 个紧密的球形蛋白质。它包含 1 个 N-末端的 α 螺旋,中间的 β 折叠,紧跟着又是 1 个 α 螺旋和 C 末端的卷曲。中间的 β 折叠由 7 个 β 链组成。 α 螺旋在 β 折叠上交迭,C 末端的卷曲正好位于 2 个 α 螺旋形成的凹槽中。其分子结构的中心是一些疏水性氨基酸,它们在 α 螺旋和 β 折叠侧聚集。这些氨基酸中的大部分对于维持 frataxin 蛋白结构的稳定性非常重要,且不能被替代,这一点可从不同种属中它们的一致性中看出,而且一旦突变会影响整个分子的稳定性。Frataxin 分子表面一些带负电荷残基形成的峭和疏水残基的集落具有显著的保守性,这些表面保守区域的大小和本质表明,它可以和 1 个大的配体相互作用,很可能是 1 个蛋白质。但是,至今有关证实 frataxin 配体的实验都不成功。Frataxin 结构中没有任何特点像已知的铁结合位点。但是,带负电荷形成的峭与细菌的铁蛋白有相似性,后者铁结合区域是由两个相邻的亚基形成的。晶体结构研究表明,铁只是非特异性地与 frataxin 单体结合,核磁共振研究并未证实铁可造成 frataxin 的任何结构变化。

2. Frataxin 在线粒体内的加工: Frataxin 结构的 N-末端有 1 个由 55 个氨基酸组成的线粒体靶序列,当 frataxin 蛋白被转运入线粒体后,线粒体靶序列将会被线粒体加工蛋白酶(mitochondrial processing protein, MPP)水解去除。在这段

线粒体靶序列的第41~42和55~56氨基酸残基之间存在两个MPP酶切位点,因此,需经MPP两步水解,frataxin才加工成成熟蛋白。在这一水解或加工过程中,第二步水解是生成成熟frataxin蛋白的限速步骤^[7]。Yfh1p(yeast frataxin homolog protein, Yfh1p)是frataxin在酵母中的同源蛋白,它的N-末端的线粒体靶序列是由51个氨基酸组成的。在第20~21和51~52氨基酸残基之间也有两个MPP酶切位点。然而,除二步水解外,其成熟过程还需要特异性的线粒体热敏蛋白(ssq1p)的参与。ssq1p属于hsp70家族,缺乏ssq1p的酵母变异体跟YFH1基因敲除的酵母一样,加工Yfh1p的速度很慢,并且伴有线粒体内铁积聚。

三、Frataxin 的功能

1. Frataxin 在线粒体铁代谢中的作用:无论是用绿色荧光法,还是免疫细胞化学荧光法及细胞碎片的Western印记法和免疫电泳法都证实frataxin位于线粒体的矩阵内^[8,9]。最近的研究发现,frataxin与线粒体铁代谢有关。但是,frataxin与其他参与铁或血红素代谢的酶类在序列上无同源性。对frataxin在线粒体铁代谢具有重要作用的认识最初来自于它在酵母中的同源体Yfh1p的研究。编码Yfh1p的基因YFH1与编码人类frataxin的基因非常相似。而且,Yfh1p也是一种线粒体蛋白质,参与铁稳态的维持和细胞呼吸。当YFH1基因缺失会导致铁从线粒体内转出障碍,胞质中铁缺乏,最终导致线粒体内铁积聚,进而损伤线粒体DNA和呼吸链^[10]。这显示YFH1基因缺失所致的线粒体铁积聚及自由基生成,可造成脂质、蛋白质和基因的损伤。当YFH1基因重新注入酵母体内,线粒体内的铁重新作为游离的非血红素铁而转运到细胞质中^[8]。Frataxin的同源体Yfh1p可以调节铁从线粒体中运出的功能说明在酵母细胞中存在线粒体的铁循环。但是,对Yfh1p序列分析结果表明它没有作为1个转运体所需的跨膜序列,可能它并不是真正的铁转运体。究竟它是通过什么途径参与铁的转运,目前还不清楚。

2. Frataxin 的其他功能:Frataxin除在线粒体铁代谢中起关键作用外,它与发育的关系也非常密切。Koenig等制作的frataxin敲除小鼠模型,揭示基因敲除的纯合子小鼠在胚胎期第7天就死亡了^[11]。尽管完全缺乏frataxin的小鼠会出现与FRDA相似的frataxin蛋白水平的降低,但是它只影响那些在发育的关键步骤需要依赖正常frataxin水平的细胞,如背根神经节的感觉神经元^[12]。关于frataxin与细胞呼吸关系的研究尚无定论。已有报道frataxin可以调节细胞呼吸^[13]。然而,最近的研究显示,在Yfh1p过度表达的酵母中并不存在细胞呼吸活动的增加^[14]。而且,由于Yfh1p的缺陷而导致的线粒体铁代谢的改变似乎与细胞的呼吸活动无关。只要呼吸功能缺陷的细胞含有功能性的Yfh1p,就不会表现出线粒体内铁积聚。如果缺乏Yfh1p,这些细胞就会出现线粒体内铁积聚。重新导入Yfh1p,线粒体内积聚的铁又可以释出。这些结果显示,线粒体内的铁代谢可能受Yfh1p影响,而与细胞呼吸活动没有关系。研究还显示铁从线粒体

进出所需要的能量不依赖细胞呼吸活动。

四、FRDA 基因突变与FRDA

1. FRDA: FRDA是一种常染色体隐性遗传性疾病。其神经病理改变主要是背根神经节的感觉神经元丧失,周围神经系统中大的感觉神经纤维萎缩,脊髓中锥体束萎缩和小脑中齿状核萎缩。患者主要表现为进行性步态和肢体共济失调,构音困难,下肢反射消失,震动觉消失,下肢肌肉无力,脚底伸肌反射阳性。许多患者同时伴有肥厚性心肌病,大约有1/3的患者还有糖尿病^[15]。

2. FRDA 基因变异:最常见的FRDA基因突变是它的第1个内含子的GAA三联体大量扩增。其扩增数大多在70~1000多个三联体之间,最常见的是600~900个。发病的个体在第9号染色体上两条同源染色体上都有三联体的扩增,而杂合子是正常的。像其他三联体重复扩增的疾病一样,它在父母-孩子的传递过程中具有不稳定性。父亲的传递会伴有重复序列的减少。而母亲的传递会导致更大的重复序列的扩增或相同几率的扩增。重复扩增的GAA抑制FRDA基因的表达,因此,FRDA患者组织和培养的细胞中frataxin mRNA和蛋白质水平都较正常为低。降低的程度与扩增的重复GAA成正比。GAA三联体重复序列是1个很长的DNA片段,在1条链上只包含嘌呤(P),而互补链上只包含嘧啶(Y)。R·Y序列在生理条件下可以形成三螺旋结构,它可以和1个独特的生物分子复合物相连(黏附RNA)。奇怪的是,只有和FRDA有关的GAA三联体的重复才能形成这种结构,而与FRDA无关的在FRDA基因上偶然发现的R·Y序列的变异体却不能形成这种结构。三联体可阻遏转录,这可能是FRDA中基因表达受抑制的原因。已证实GAA重复达到270个三联体时就可抑制基因转录^[12]。另一方面,研究也已经证实小的扩增可使剩余的基因表达增加。此外,GAA重复的量与疾病出现的年龄,严重性和发展速度有关。其他因素,包括扩增片段的体细胞镶嵌型,FRDA基因本身的变异,基因修饰和环境因素等也可影响表型。大约2%FRDA的染色体GAA重复序列长度是正常的,但含有1个错误的、无意义的或分裂点的突变,这最终同样会影响frataxin的编码序列。至今,证实这些具有点突变的个体都是杂合子,在第9对染色体的另1条同源染色体上有扩增的GAA重复序列。由于点突变非常少,所以在纯合子上可能也有点突变,但至今尚未能证实。

五、小结

FRDA基因变异导致的frataxin的缺乏可破坏线粒体内铁稳态,造成铁在线粒体内过量积聚,后者促进大量自由基生成,最终引致相关的细胞死亡,这可能是FRDA的重要病因之一。然而,目前尚未完全明了frataxin的功能及它的减少引起的铁聚集和Fe-S蛋白功能缺失的机制。这些重要问题尚需进一步研究。对这些问题的认识将会帮助人们更全面的理解线粒体铁代谢的生理,FRDA的病因和发病机制及发展新的有效治疗手段。

参 考 文 献

- 1 Qian ZM, Shen X. Brain iron transport and neurodegeneration. Trends Mol Med, 2001, 7: 103-108.
- 2 Qian ZM, Wang Q. Expression of iron transport proteins and excessive iron accumulation in the brain in neurodegenerative disorders. Brain Res Brain Res Rev, 1998, 27: 257-267.
- 3 Campuzano V, Montemini L, Molto MD, et al. Friedreich's ataxia; autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. Science, 1996, 271: 1423-1427.
- 4 Dhe-Paganon S, Shigeta R, Chi YL, et al. Crystal structure of human frataxin. J Bio Chem, 2000, 275: 30753-30756.
- 5 Musco G, Stier G, Kolmerer B, et al. Towards a structural understanding of Friedreich's ataxia; the solution structure of frataxin. Structure Fold Des, 2000, 8: 695-707.
- 6 Cho SJ, Lee MG, Yang JK, et al. Crystal structure of Escherichia coli CyaY protein reveals a previously unidentified fold for the evolutionarily conserved frataxin family. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 8932-8937.
- 7 Patel PI, Isaya G. Friedreich ataxia; from GAA triplet-repeat expansion to frataxin deficiency. Am J Hum Genet, 2001, 69: 15-24.
- 8 Babcock M, de Silva D, Oaks R, et al. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. Science, 1997, 276: 1709-1712.
- 9 Branda SS, Cavadini P, Adamec J, et al. Yeast and human frataxin are processed to mature form in two sequential steps by the mitochondrial processing peptidase. J Biol Chem, 1999, 274: 22763-22769.
- 10 Becker E, Richardson DR. Frataxin; its role in iron metabolism and the pathogenesis of Friedreich's ataxia. Int J Biochem Cell Biol, 2001, 33: 1-10.
- 11 Coscé M, Puccio H, Gansmuller A, et al. Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. Hum Mol Genet, 2000, 9: 1219-1226.
- 12 Pandolfo M. Molecular Basis of Friedreich's ataxia. Mov Disord, 2001, 16: 815-821.
- 13 Ristow M, Pfister MF, Yee AJ, et al. Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 12239-12243.
- 14 Chen OS, Kaplan J. YFH1-mediated iron homeostasis is independent of mitochondrial respiration. FEBS Lett, 2001, 509: 131-134.
- 15 Miranda CJ, Santos MM, Ohshima K, et al. Frataxin knockin mouse. FEBS Lett, 2002, 512: 291-297.

(收稿日期: 2002-08-28)

(本文编辑: 陈秀华)

· 论 著 摘 要 ·

帕金森病患者脑脊液对体外培养的多巴胺能神经元的神经毒性作用

孔屏 张本恕

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是发生于中老年人的慢性神经系统退行性疾病,其病因和发病机制目前尚未明了。其中一种假说是推测某种我们尚不知道的内源性和(或)外源性的神经毒性物质通过产生过量的自由基,使得氧化反应增强,最终导致了黑质致密部多巴胺(DA)能神经元的变性和死亡。如果存在这种或这些神经毒性物质,就应有可能在PD患者脑组织或脑脊液中被发现。

资料和方法: 12例原发性PD患者均来自天津医科大学总医院锥体外系门诊,其中9例接受左旋多巴制剂治疗,3例未用过抗PD药物治疗。健康人15名为对照组,两组年龄相当。应用孕14d的Wistar大鼠中脑嘴侧被盖部组织进行DA能神经元的原代细胞培养。在细胞培养第7天,分别加入PD患者或对照组的脑脊液,通过形态学观察、培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)活性测定以及酪氨酸羟化酶(TH)免疫组化染色等来观察DA能神经元的生长情况。

结果: (1)形态学改变: 对照组细胞生长良好,胞体周围光晕明显,神经突起密集连接成网状;而PD患者组细胞生

长状况不良,存活细胞明显减少,相互之间连接消失,可见大量细胞碎屑。(2)LDH流出量的变化: 加入脑脊液96h后,PD患者组LDH活性明显上升,约为对照组的6倍($P < 0.05$),说明细胞死亡明显增多。(3)TH免疫组化染色阳性细胞率的变化: 对照组TH阳性细胞满布视野,阳性率在90%左右;PD患者组阳性细胞明显减少,而阴性细胞即非DA能神经元无明显变化,故TH阳性细胞率明显减少,与对照组相比减少约50%($P < 0.05$)。

讨论: 加入PD患者CSF后,TH阳性细胞死亡明显增多,而TH阴性细胞即非DA能神经元无明显变化,意味着PD患者脑脊液中存在一种或一些因素,抑制DA能神经元的生长。存在于PD患者脑脊液中的毒性物质的性质目前还不清楚,经研究推测脑脊液相对分子量小于10000蛋白质中,可能存在缺乏叔基结构的小肽类物质起到抑制细胞生长的作用。另外,PD患者脑脊液中含有的左旋多巴制剂是否会产生毒性作用目前还有争论。我们的结果显示,未用左旋多巴治疗的患者脑脊液也同样产生细胞毒性,说明PD患者在未用药物治疗之前就已具有神经毒性。

作者单位: 300052 天津医科大学总医院干部病房神经内科(孔屏), 神经内科(张本恕)

(收稿日期: 2002-08-14)

(本文编辑: 陈秀华)