

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.07.020

二氢乳清酸脱氢酶突变对米勒综合征患者体内蛋白及功能的研究*

方静娴¹, 陈 蕾², 梁建英¹, 钱 虹¹, 唐 翔^{3△}

(1. 南方医科大学口腔医院/广东省口腔医院儿童口腔科, 广州 510280; 2. 南方医科大学口腔医院/广东省口腔医院口腔综合科, 广州 510280; 3. 广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心妇科, 广州 510260)

[摘要] **目的** 基于已知临床突变类型, 即 G202A、R346W 和 R135C, 观察突变后相应蛋白功能变化。**方法** 建立可稳定表达米勒综合征致病突变型 G202A、R346W 和 R135C 的宫颈癌细胞系。通过免疫组织化学和线粒体分层定位研究相应蛋白的线粒体定植功能、蛋白稳定性和酶活性。**结果** 二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)3 种突变蛋白线粒体定植功能均未受影响, 表达后均存在于线粒体内膜内。突变体 G202A 和 R34W 的蛋白稳定性降低; 突变体 R135C、蛋白稳定, 但基底诱导酶活性受损致相应线粒体内酶活性缺失。**结论** DHODH 功能受损可能与米勒综合征症状相关联。

[关键词] 密码子, 无义; 线粒体; 二氢乳清酸脱氢酶; 米勒综合征; 蛋白稳定性

[中图分类号] R329.2+6; R33

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)07-0933-05

Dihydroorotate dehydrogenase mutations lead to changes of protein and function in Miller syndrome*

FANG Jingxian¹, CHEN Lei², LIANG Jianying¹, QIAN Hong¹, TANG Xiang^{3△}

(1. Department of Pediatric Dentistry, Stomatological Hospital, Southern Medical University/Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou, Guangdong 510280, China; 2. Department of General Dentistry, Stomatological Hospital, Southern Medical University/Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou, Guangdong 510280, China; 3. Department of Gynecology, Guangzhou Municipal Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China)

[Abstract] **Objective** To observe the changes of corresponding proteins and function based on known clinical dihydroorotate dehydrogenase(DHODH) mutation types, i. e., G202A, R346W and R135C in the patients with Miller syndrome. **Methods** HeLa cell lines stably expressing Miller syndrome pathogenic mutation types G202A, R346W and R135C were established. Then the mitochondrial localization function, protein stability and enzyme activity of corresponding proteins were studied by the immunohistochemistry and mitochondrial layered positioning. **Results** The mitochondrial localization function of 3 kinds of DHODH mutation were not affected, which existed in the mitochondrial inner membrane after expression. The mutant G202A and R346W protein stability was reduced; the mutant R135C protein was stable, but base induced enzyme activity injury caused the deficiency of corresponding enzymatic activity. **Conclusion** The DHODH function injury may be related with the symptoms in Miller syndrome.

[Key words] codon, nonsense; mitochondria; dihydroorotate dehydrogenase; Miller syndrome; protein instability

线粒体是双膜封闭器官, 因其能量转化功能被认为是真核细胞的能量加工厂。此外, 线粒体也参与到钙和离子储存以及信号传导、细胞分化、细胞凋亡、细胞周期调控和细胞生长等重要功能之中^[1]。近来有研究表明, 线粒体功能异常可引起一系列疾病, 而线粒体功能状态也与老龄化等问题可能存在关联^[2-3]。考虑到腺苷三磷酸(ATP)的产生主要依赖于氧化呼吸链的作用, 线粒体遗传物质的维护对于个体维持健康状态是相当重要的^[4-5]。

核酸嘧啶的合成通过两条途径: 从头嘧啶合成途径和补救途径。二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)催化从头嘧啶合成途径第四步反应, 将二氢乳清酸(DHO)转化成为乳清酸盐^[6-7]。DHODH是整个核酸嘧啶合成中惟一存在于线粒体内膜的限速酶, 而其他的限速酶均存在于细胞质中。DHODH催化DHO氧化为乳清酸盐, 将电子传递给铝氧化呼吸分子辅酶Q, 通过结合酶还原共同体黄素单核苷酸^[8]。因此, DHODH依赖于辅酶Q, 进而将线粒体氧化呼吸链和核酸嘧啶生物合成从功

能上联系起来。

DHODH有两个结合位点。其底物DHO结合于第一位点, 并通过共同底物电子受体而被氧化。形成乳清酸盐后, 辅酶结合于其第二位点, 并从共同底物处接收一个电子。经DHODH合成的乳清酸盐在尿苷-磷酸合酶(UMPS)复合体的作用下接着转化为尿苷酸(UMP), 此即UMP合成^[9-10]。

米勒综合征是轴后面骨发育不全, 通常也以Wildervanck-Smith综合征为人所知。其临床症状包括严重小下颌、唇裂和(或)腭裂, 轴背部位如四肢发育不全或发育缺陷, 眼睑缺损以及多生乳头^[11-12]。近来发现米勒综合征的致病基因是DHODH, 其定位于染色体16q22^[13]。从外显子2到外显子9, 共发现13个突变体^[13-14]。然而这些突变体是如何导致米勒综合征的发生却尚待研究。

小鼠体内, 通过运用DHODH抑制剂来氟米特(Leflunomide/LFN)作用于怀孕小鼠, 可引起一系列四肢及颌面发育缺陷, 最主要的共同表现包括露脑畸形、腭裂和眼睑无法闭

* 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(2015A030310105); 广东省医学科学技术研究基金资助项目(A2017508); 广东省中医药局面上科研项目(20171025); 广州市卫生局医药卫生科技项目(20161A011070)。 作者简介: 方静娴(1983—), 主治医师, 博士, 主要从事儿童口腔医学及口腔遗传病学基础与临床研究。 △ 通信作者, E-mail: 21558034@qq.com。

合^[15]。因此, DHODH 突变引起米勒综合征的发现揭示了 DHODH 在颌面和四肢发育过程中尚待发现的新作用。本研究中, 观察 3 种与米勒综合征相关 DHODH 突变体在线粒体中的蛋白稳定性、定位和 DHO-依赖酶活性, 以期了解 DHODH 在米勒综合征中发挥的作用。

1 材料与方 法

1.1 抗体和试剂 抗-DHODH、抗 HA 和抗 TFAM(线粒体转录因子 A)抗体由九州大学临床检查部分子检查室提供。抗 BAP37 购于美国 SantaCruz 生物科技公司。抗- β -actin 抗体购于美国 Sigma 公司。MitoTrackerRed 购于美国 Invitrogen 公司。L-DHO 购于美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌 HeLa 细胞培养于 DMEM 培养液(美国 Sigma-Aldrich)以及 10% 牛胚胎失活血清(FBS)。细胞系维持培养于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中。

1.2.2 表达载体 DHODH cDNA 表达构建采用标准方法。野生和突变型 DHODH cDNA 通过 BamH I / Xho I 酶切位点加入载体 pcDNA(Invitrogen)。DHODH cDNA 包括推测的第一个甲硫氨酸位点通过人宫颈癌 HeLa 细胞的 cDNA 文库得以扩增, 通过配对引物, 即: 5'-CAG AGT CTT CTG CCT CCC TG-3' 和 5'-AGG CAG AAG ACT CTG-3'。然后 BamH I 和 Xho I 位点分别通过二次 PCR 加入到 5' 和 3' 端, 通过引物 5'-GCG TGG AGA CAC CTG AAA AAG C-3' 和 5'-CGA GTC ACC TCC GAT GAT CTG CTC C-3'。PCR 产物经 BamH I 和 Xho I 酶切。pcDNA5/FRT 载体(美国 Invitrogen)经 BamH I 和 Xho I 酶切后的片段同编码 HA 标记的 DNA 片段结合在一起, 形成编码 DHODH 的 DNA 片段, 该载体命名为 pDHODH-HA。

1.2.3 构建突变 DHODH 蛋白质粒 DHODH 突变体 G202、R346W 和 R135C 由 pDHODH-HA 产生, 突变由 PCR 位点导向诱变产生^[16]。所有 PCR 产生片段经插入至 pGEMT 载体(美国 Promega)后测序确认, 表达载体与 pcDNA5/FRT 共同构建。

为构建可稳定表达细胞系, 按照生产商说明书 HeLa Flp-In™ T-Rex™ cells(美国 Invitrogen)经 Lipofectamine™ 2000(Invitrogen)共转染于包含 DHODH 和 pOG44 的 pcDNA5/FRT/TO。转染后, 细胞培养于含有潮霉素 B(200 μ g/mL)和灭瘟素 S(10 μ g/mL, 美国 Invitrogen)的 DMEM 培养液。选择培养基培养 3~4 周后, 挑选独立菌株, 转移培养于独立培养皿, 并用抗 HA 抗体检测表达。当加入 DOX(doxycycline; 1 μ g/mL)于培养液时, 可在指定时期诱导相应蛋白的表达。

1.2.4 蛋白免疫印记检测 HeLa 细胞裂解于 TNE 裂解液(50 mmol/L Tris/HCl, pH 7.5, 1 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl 和 0.5% Nonidet P40)。将 20 μ g 提取蛋白上样于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳分离, 并用下文所提及的具体抗体进行免疫印迹检测。检测信号通过辣根过氧化物酶(HRP)-标记抗免疫球蛋白 G(IgG)和增强化学发光(ECL)试剂(GE Healthcare)显影。化学发光结果通过预冷电荷耦合设置(CCD)相机(LAS1000plus; Fuji Photo Film)进行记录和定量分析。

1.2.5 亚线粒体定位 细胞收集器将 HeLa 细胞(1×10^8 个)收集后悬浮于 PBS 溶液, 经离心后沉淀, 并用同质化缓存液清洗。上清液以 10 000 \times g 离心 6 min 后, 将沉淀物作为原始线粒体部分。取 20 μ g 线粒体处理于低渗液(10 mmol/L Hepes/

KOH, pH 7.4 和 1 mmol/L EDTA)于 4 °C 裂解线粒体外膜。经过低渗处理后, 10 000 \times g 离心 6 min 以获得纯化线粒体。将该线粒体组分悬浮于低渗缓冲液并用 200 μ g/mL 蛋白酶 K(含或不含 1% Triton X-100)于冰上消化 20 min。加入 15% 三氯乙酸沉淀蛋白。沉淀溶于样品缓冲液(6% SDS, 150 mmol/L 氨基甲烷, 10 mmol/L EDTA 和 25% 甘油)后经 SDS/SPS-PAGE 电泳和印迹分析检测。

1.2.6 HeLa 细胞免疫荧光成像 HeLa 细胞经含 500 nmol/L MitoTracker® Red(Invitrogen)处理 20 min(按生产厂商说明书)。细胞固定渗透处理后, 处理于 1:200 稀释含抗 HA 和抗 DHODH 血清的 1% BSA/PBS 溶液 1 h。处理后的样本置于 Superfrost(Matsunami)。荧光图像经荧光显微镜(Biorevo, KEYENCE)获取分析。

1.2.7 氧化呼吸链活性生化检测 分光光度法(U-3210, 日立)检测 DHODH 依赖氧化呼吸酶活性。稳定表达 DHODH 的 HeLa 细胞冰浴 15 min 裂解于低渗缓冲液(2.5 mmol/L Tris/HCl, pH 7.5 和 2.5 mmol/L MgCl₂), 然后超声裂解 15 s, 样板用于检测氧化呼吸链复合物活性。

标准反应缓冲液包含 50 mmol/L 磷酸钾, 5 mg/mL BSA 和 2.5 mmol/L MgCl₂。检测不同复合体用不同的反应底物(电子供体及电子受体), 每组反应都由受检测的特殊氧化呼吸链复合体的对应抑制剂来终止。每组参与反应的蛋白浓度通过二喹啉甲酸(BCA)蛋白检测法(Thermo Scientific)确定。每组复合体的活力通过每分钟每毫克底物氧化或还原率的改变来计算。检测每组复合体活力时加入其余氧化还原复合体的抑制剂, 以确保所检测活力仅反映所检测酶复合体活力。每组数据检测于同一日, 在相同条件下, 重复 3 次。

1.2.7.1 DHO-泛醌氧化还原酶活性 DHODH 活力在 37 °C 时通过分光光度法检测 600 nm 还原 2,6-二氯酚(2,6-dichlorophenol-indophenol, DCPIP; 用作虚拟电子受体)吸光度的降低程度。总的说来, 反应由 1 mL 标准反应缓存液中的 20 mmol/L DHO 和 50 μ mol/L DCPIP 启动, 并包含 2 μ g 的 rotenone(复合体 I 抑制剂), 2 μ g 的抗霉素 A(复合体 III 抑制剂), 5 mmol/L 的 NaN₃(复合体 IV 抑制剂)及 0.1 mg 全细胞溶液。检测结果显示为 nmol/ μ g 蛋白。反应体系通过加入 2 μ g 的来氟米特(leflunomide, LFN)终止。

1.2.7.2 琥珀酸脱氢酶(氧化体呼吸链复合体 II)活力 琥珀酸脱氢酶(复合体 II)活力通过分光光度法检测于 37 °C。反应由含 50 μ mol/L DCPIP 和 20 mmol/L 琥珀酸, 2 μ g 的 rotenone, 2 μ g 的抗霉素 A, 5 mmol/L NaN₃ 和 0.1 mg 全细胞液的 1 mL 标准反应缓存液发起。检测结果显示为 nmol/ μ g 蛋白。

1.2.7.3 细胞色素 C 还原酶(复合体 III)活性 细胞色素 C 还原酶(复合体 III)活力通过分光光度法于 37 °C 检测。通过检测细胞色素 C 于 550 nm 吸光度的降低程度来检测。反应由含 5 mmol/L 癸基泛醌和 2 μ g 的鱼藤酮, 5 mmol/L 的 NaN₃, 60 μ mol/L 细胞色素 C 和 0.1 mg 全细胞液的 1 mL 标准反应缓存液发起。反应通过加入 2 μ g 的抗霉素 A 终止, 检测结果显示为 nmol/ μ g 蛋白。

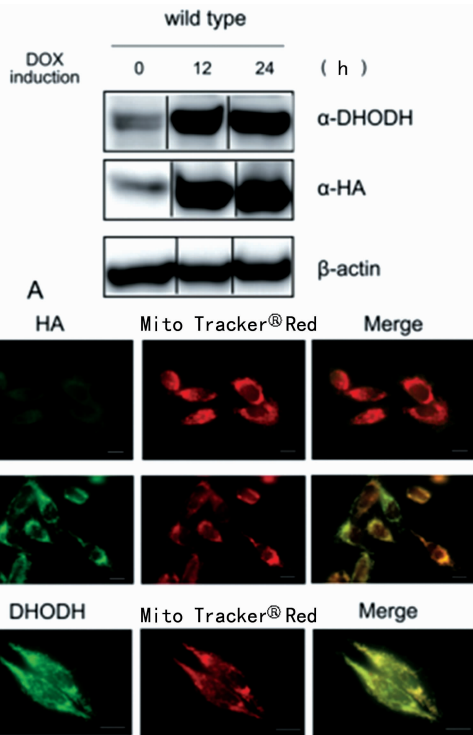
1.2.7.4 细胞色素酶 C 氧化还原酶活性 DHO: 细胞色素酶 C 氧化还原酶活性评估方法与 1.2.7.3 细胞色素酶 C 还原酶活性评估方法相似。检测环境与条件也与复合体 III 相近, 但将 20 mmol/L DHO 作为供体底物, 并通过加入 2 μ g 的抗霉素 A 终止反应。

1.2.8 蛋白稳定性分析 野生型和突变型 DHODH-HA 经 DOX 诱导 24 h 产生后,分别在次日 0、2、4、8 h 后加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 放线菌酮(CHX),并收集细胞。提取总蛋白以进行蛋白免疫印迹检测,使用多克隆抗 DHODH 和抗 HA 抗体。检测分析条带信号。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并制成柱状图,组间统计学比较通过 Student *t* 检测进行分析或在合适情况下采用成对 Student *t* 检测。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 建立稳定表达 DHODH 蛋白的 HeLa 细胞系 构建载体转入细胞后,建立了在 DOX 诱导下可稳定表达包含 DHODH-HA 组合蛋白的细胞系(DHODH 蛋白 C 末端包含 HA 标记)。经 DOX 诱导 24 h 后,同非诱导细胞系相比,组合 DHODH-HA 的表达量翻了 5 倍(图 1A)。DHODH-HA 蛋白经 HA 抗体染色后诱导效果(图 1B)及诱导前未经 HA 抗体染色的蛋白表达情况显示内、外源性 DHODH 均准确定位于线粒体。



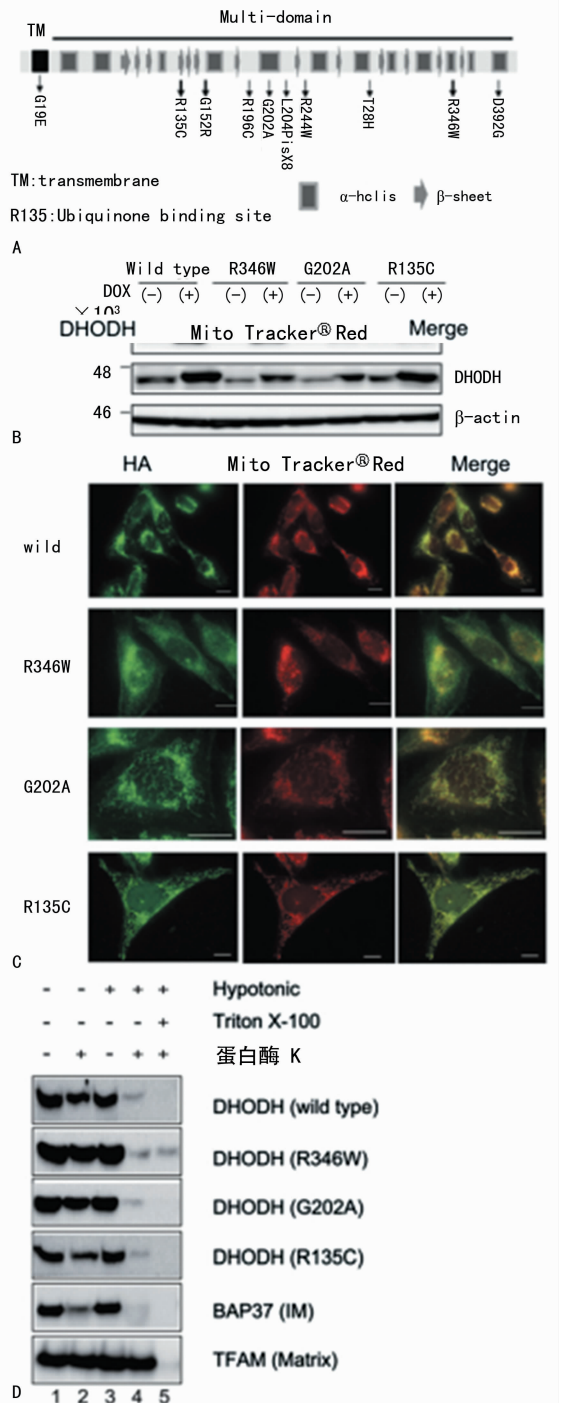
A: HA 标记野生型 DHODH 蛋白印迹结果;B:融合 DHODH 蛋白细胞免疫荧光染色结果

图 1 野生型 DHODH 蛋白表达和定位

2.2 米勒综合征相关联 DHODH-HA 的表达和定位 为观察米勒综合征中发现的突变蛋白的处理、定位和功能,将 G152R、R346W 和 R135C 突变引入 DHODH cDNA(图 2A)。经 DOX 诱导 24 h 后,同非诱导细胞系相比,组合 DHODH-HA 的表达量翻了 5 倍(图 2B)。经免疫荧光染色检测,R135C-突变型 DHODH 显示了正常的细胞内定位。抗 HA 抗体显示其存在于 HeLa 细胞中的线粒体内(图 2C)。而 G202A 和 R346W 突变型则显示弱染色,虽然同样定位于线粒体内。R346W 型构建体显示在线粒体外有弱溶解(图 2C)。

2.3 突变 DHODH 蛋白在线粒体内的定位 经低渗处理后,野生型和所有的 DHODH 突变蛋白均可被蛋白酶 k 剪切消化(图 2D,第 4 列)。当线粒体内膜经非离子洗涤剂 TritonX-100 处理后,TFAM 和 DHODH 都被蛋白酶 k 消化(图 2D,第 5

列)。实验中构建的 3 种突变 DHODH 蛋白均准确存在于线粒体内膜空间内或内膜内(图 2D,第 2、3、4 行)。

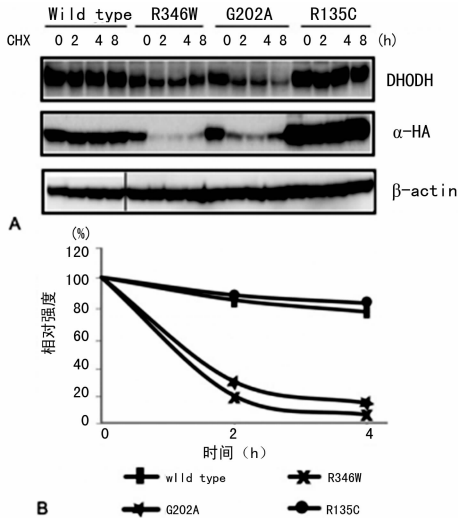


A:DHODH 及米勒综合征相关突变结构图示;B:HA 标记野生型 DHODH 蛋白诱导后的表达情况;C:融合突变型 DHODH 免疫荧光染色结果;D:外源性野生型和突变型 DHODH 蛋白在线粒体内的亚定位;1:完整线粒体;2:线粒体外膜经蛋白酶处理后;3、4:线粒体外膜经低渗法裂解后;5:线粒体经裂解及蛋白酶处理后

图 2 米勒综合征相关突变蛋白的表达和定位

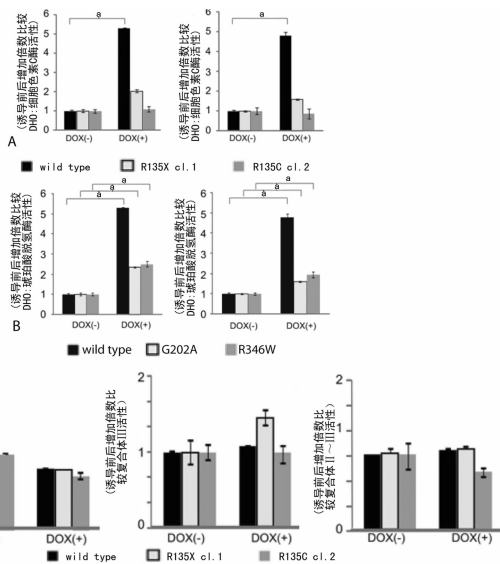
2.4 R346W 和 G202A 突变 DHODH 的蛋白稳定性减低 经 DOX 诱导后用 CHX 抑制新蛋白的表达。DHODH 蛋白总量经 CHX 处理 0、2、4、8 h 后收集后检测。野生型和 R135C 型 DHODH 蛋白水平 8 h 处理后相对一致(图 3),突变蛋白自身降解加快。而在实验中,并未观察到 β -actin 的不稳定性(图 3A)。

2.5 突变 DHODH 蛋白的 DHO 依赖泛醌和细胞色素 C 氧化还原酶活性 通过检测野生型和两株可稳定表达突变型 R135C DHODH 的细胞检测氧化呼吸复合体的酶活性,发现在 HeLa 细胞转染体中,诱导后的野生型 DHODH 蛋白的 DHO 依赖酶活性较突变型增加了 5 倍;而在突变型 R135C 中,诱导后相应蛋白表达量增加了 5 倍,但其 DHO 依赖酶活性却没有明显的变化(图 1A 和图 4A)。经 DOX 诱导后, G202A 和 R346W 型 DHODH 的 DHO 依赖酶活性增加了 2 倍,与其蛋白表达量的增加幅度相对应,即 G202A 和 R346W 型 DHODH 蛋白的功能酶活性存在,而其蛋白稳定性减低(图 4B)。而 R135C 和野生型 DHODH 两组中复合体 II、复合体 III 和复合体 II~III 联合体的多项都没有差别(图 4C)。



A: 经 CHX 处理 0、2、4、8 h 后野生型和突变型 DHODH 蛋白表达情况; B: 图 A 相关图像资料量化结果

图 3 突变型 DHODH 蛋白稳定性检测结果



A: R135C 型 DHODH 转染细胞中降低的 DHO 依赖酶活性; B: 表达 G202C 和 R346W 型 DHODH 蛋白细胞中 DHO 依赖还原酶活性检测; C: 表达 R135C 和野生型 DHODH 的细胞中线粒体复合体 II 和 III 活性检测结果。* $P < 0.05$, 与对照组比较

图 4 米勒综合征相关 DHODH 突变蛋白酶活性检测

3 讨论

米勒综合征以常染色体隐性异常或复合杂合子模式遗传^[13]。米勒综合征阻断了第一和第二鳃弓的发育。DHODH

基因突变时如何导致鳃弓的异常发育目前尚不清楚。但需要指出的是 DHODH 是从头嘧啶合成 6 个限速酶中的第 4 个^[8], 该途径中的其余 5 个酶分别组成两个不同的酶复合体, 并均存在于细胞质中。前 3 个酶形成了多重酶复合体 CAD (氨基甲酰磷酸合成酶、天冬氨酸转氨基甲酰酶和二氢乳酸酶), 而第 5 和第 6 个酶形成了 UMPS。

UMPS 基因编码具有乳清酸磷酸核糖转移酶和乳清苷酸脱羧酶双重功能的酶^[17]。UMPS 基因复合杂合子突变引起乳清酸尿症, 一种较少见的常染色体隐性遗传。其临床表现包括了巨幼红细胞性贫血和乳清酸结晶尿, 并常伴有智力和身体发育上的迟缓^[18]。然而, 作为 UMPS 突变并不会引起与米勒综合征相似的发育异常。这提示, 米勒综合征中的嘧啶或嘌呤缺乏并不是导致颌面发育异常的原因。

WHITE 等^[19]曾报道 LFN (一种 DHODH 抑制剂), 可引起斑马鱼神经嵴发育的完全停止以及哺乳动物神经嵴干细胞自我更新的减缓。LFN 发挥这些作用是通过抑制神经嵴发育所需基因的转录延长来实现的^[17]。神经嵴细胞的特殊发育途径对黑色素瘤的形成有直接关系, 提示了 DHODH 也参与了神经嵴细胞的增殖和发育。

甲氨蝶呤是一种从头嘌呤生物合成的抑制剂, 而其抗增殖作用通常被认为是由其抑制二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的作用而产生的。婴幼儿中甲氨蝶呤最常导致的发育异常胚胎疾病包括: 发育缺陷、颅缝早闭、小颌以及骨骼异常, 而这些症状与米勒综合征个体所表现的个体症状相类似^[20]。然而, DHFR 自身突变并不会导致颌面异常。考虑到米勒综合征部分程度上是由于线粒体功能异常, 甲氨蝶呤有可能不仅仅作用于 DHFR, 也作用于神经嵴细胞的线粒体。

许多出生缺陷, 例如米勒综合征和甲氨蝶呤所致胚胎病, 都与颌面发育异常相关。这些数据说明神经嵴细胞的发育涉及颌面发育^[23]。而米勒综合征患者所表现临床症状有可能是由于 DHODH 功能缺失所引起的神经嵴细胞发育缺陷所致。

人体内 DHODH 蛋白主要由两部分组成: 较大的 C 末端 (蛋氨酸 78-精氨酸 396) 和较小的 N 末端 (蛋氨酸 30-亮氨酸 68), 其间通过一个扩展环连接。较大 C 末端域被描述为 α/β 筒折叠, 其中央筒有 8 个平行 β 链, 外围环绕着 8 个 α 螺旋。此结构中存在一些近端还原位点, 并以部分带点或复极化链收尾 (Gln47、Tyr356、Thr360 和 Arg135)。从人类到恶性疟原虫精氨酸 135 均存在于泛醌结合位点, 其均表现出了保守性。本研究观察了 DHODH 突变型 R135C, 该型在米勒综合征患者中也被检测出。该突变型具有准确的线粒体定位功能, 但却缺乏 DHO 依赖酶活性。由于 DHODH 的 α 和 β 筒域形成了酶活性反应的作用位点, 与 α 和 β 筒域相互作用的化合物可阻断 DHODH 活性。G202A 和 R346W 存在于 DHODH 的 α 筒域内; G202A 和 R346W 突变体可能是由于蛋白质构象上的改变而导致蛋白质稳定性降低。

本研究涉及实验中, MitoTracker[®] Red 染色的细胞与 HA 染色的细胞部分重叠, 提示细胞中表达的野生型 DHODH-HA 蛋白准确表达于线粒体中。相同的染色结果可观察于经抗 DHODH 抗体处理的染色结果中 (图 1B), 提示内、外源性 DHODH 均准确定位于线粒体。实验中用同样方法成功构建了可稳定表达突变型 DHODH 的细胞株 (图 2), 对突变型蛋白的定位研究结果提示突变型蛋白都主要存在于线粒体内, 尽管一小部分 R346W 存在于细胞质内。为检测野生型和突变型 DHODH-HA 蛋白在线粒体内的定位, 通过低渗法裂解线粒体

外膜后(图 2D, 每组中第 3、4 列), 可观察到 BAP37(一种线粒体内膜蛋白), 可被蛋白酶 k 消化; 而 TFAM(存在于线粒体基质内的蛋白), 则因受到内膜保护而不被蛋白酶 k 消化(图 2D, 第 4 列较低行), 从而说明低渗法可保持线粒体内膜的完整性。通过低渗法完整提出线粒体对判断突变型 DHODH 的定位提供了保证。

为检测突变 DHODH 蛋白减少是否是由于蛋白稳定性降低所致, 本研究培养了可稳定表达野生型或突变型 DHODH 蛋白的 HeLa 细胞, 并在经 DOX 诱导后用 CHX 抑制新蛋白的表达。DHODH 蛋白总量经 CHX 处理 0、2、4、8 h 后收集后检测。野生型和 R135C 型 DHODH 蛋白水平 8 h 处理后相对一致(图 3), 突变蛋白自身降解加快。在实验中, 并未观察到 β -actin 的不稳定性(图 3A)。由于这些突变都存在于 DHODH 蛋白的 α 螺旋中, 也有可能是突变导致了蛋白结果稳定性的降低从而加速了蛋白的降解。R346W 和 G202A 突变导致的 DHODH 蛋白稳定性降低, 从某种程度上对米勒综合征的发生发挥了作用。

由于 R135C 型 DHODH 突变蛋白并未显示明显的稳定性或内膜空间定位功能异常, 实验接着检测了该突变是否影响酶活性。结果显示突变型 R135C DHODH 缺失其供电子功能。有研究显示, Arg135 残基存在于 DHODH 蛋白的泛醌结合位点上, 提示了 R135C 突变型有可能无法结合于泛醌发挥作用。

考虑 R135C 突变是否会影响其他氧化呼吸复合体的功能, 研究中同时也比较了 DOX 诱导后的酶活性, 结果显示无差别。提示 R135C DHODH 并没有直接影响其他的氧化呼吸复合体。

本研究观察到, G202A 和 R346W 突变型引起了蛋白稳定性的缺失和 R135C 突变型底物诱导酶活性的受损, 这些提示 DHODH 蛋白活性受损与米勒综合征表现型相关。

参考文献

- [1] MCBRIDE H M, NEUSPIEL M, WASIAK S. Mitochondria; more than just a powerhouse[J]. *Curr Biol*, 2006, 16(14): R551-560.
- [2] DIMAURO S, SCHON E A. Mitochondrial disorders in the nervous system[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2008, 31: 91-123.
- [3] FRENZEL M, ROMMELSPACHER H, SUGAWA M D, et al. Ageing alters the supramolecular architecture of Ox-Phos complexes in rat brain cortex[J]. *Exp Gerontol*, 2010, 45(7-8): 563-572.
- [4] WALLACE DC. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2010, 51(5): 440-450.
- [5] TUPPEN H A, BLAKELY E L, TURNBULL D M, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1797(2): 113-128.
- [6] LOFFLER M, GREIN K, KNECHT W, et al. Dihydroorotate dehydrogenase Profile of a novel target for antiproliferative and immunosuppressive drugs[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1998, 431: 507-513.
- [7] EVANS DR, GUY HI. Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(32): 33035-33038.
- [8] RAWLS J, KNECHT W, DIEKERT K, et al. Requirements for the mitochondrial import and localization of dihydroorotate dehydrogenase[J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(7): 2079-2087.
- [9] LOFFLER M, JOCKEL J, SCHUSTER G, et al. Dihydroorotate-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides[J]. *Mol Cell Biochem*, 1997, 174(1-2): 125-129.
- [10] WALSE B, DUFE VT, SVENSSON B, et al. The structures of human dihydroorotate dehydrogenase with and without inhibitor reveal conformational flexibility in the inhibitor and substrate binding sites. [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(34): 8929-8936.
- [11] MILLER MF, FINEMAN R, SMITH DW. Postaxial acrofacial dysostosis syndrome[J]. *J Pediatr*, 1979, 95(6): 970-975.
- [12] DONNAI D, HUGHES HE, WINTER RM. Postaxial acrofacial dysostosis (Miller) syndrome[J]. *J Med Genet*, 1987, 24: 422-425.
- [13] NG SB, BIGHAM AW, BUCKINGHAM KJ, et al. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(9): 790-793.
- [14] KINOSHITA F, KONDOH T, KOMORI K, et al. Miller syndrome with novel dihydroorotate dehydrogenase gene mutations[J]. *Pediatr Int*, 2011, 53(4): 587-591.
- [15] FUKUSHIMA R, KANAMORI S, HIRASHIBA M, et al. Teratogenicity study of the dihydroorotate-dehydrogenase inhibitor and protein tyrosine kinase inhibitor Leflunomide in mice[J]. *Reprod Toxicol*, 2007, 24(3-4): 310-316.
- [16] UCHIUMI T, OHGAKI K, YAGI M, et al. ERAL1 is associated with mitochondrial ribosome and elimination of ERAL1 leads to mitochondrial dysfunction and growth retardation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010(38): 5554-5568.
- [17] MCCLARD RW, BLACK MJ, LIVINGSTONE LR, et al. Isolation and initial characterization of the single polypeptide that synthesizes uridine 5-monophosphate from orotate in Ehrlich ascites carcinoma. Purification by tandem affinity chromatography of uridine-5-monophosphate synthase[J]. *Biochemistry*, 1980, 19(20): 4699-4706.
- [18] SUCHI M, MIZUNO H, KAWAI Y, et al. Molecular cloning of the human UMP synthase gene and characterization of point mutations in two hereditary orotic aciduria families[J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 60(3): 525-539.
- [19] WHITE RM, CECH J, RATANASIRINTRAWOOT S, et al. DHODH modulates transcriptional elongation in the neural crest and melanoma[J]. *Nature*, 2011, 471(7399): 518-522.
- [20] RUCKEMANN K, FAIRBANKS LD, CARREY EA, et al. Leflunomide inhibits pyrimidine de novo synthesis in mitogen-stimulated T-lymphocytes from healthy humans[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(34): 21682-21691.
- [21] MILUNSKY A, GRAEF JW, GAYNOR MF JR. Methotrexate-induced congenital malformations[J]. *J Pediatr*, 1968, 72(6): 790-795.