



## 线粒体AAA+蛋白酶的结构与功能 及其在神经系统疾病中的作用\*

李茹茹<sup>1,2)</sup> 张叶<sup>3,4)</sup> 卫涛涛<sup>1,3,4)\*\*</sup> 朱笠<sup>1,2,4)\*\*</sup>

(<sup>1</sup>) 西南医科大学基础医学院, 泸州 646000; (<sup>2</sup>) 中国科学院生物物理研究所, 认知科学与心理健康全国重点实验室, 北京 100101;  
 (<sup>3</sup>) 中国科学院生物物理研究所, 生物大分子全国重点实验室, 北京 100101; (<sup>4</sup>) 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049)

**摘要** 线粒体是真核细胞中最重要的能量产生细胞器, 在物质代谢、细胞信号转导、氧化应激, 以及多种形式的细胞死亡途径中发挥关键的调控作用。线粒体拥有独立于细胞核基因组的DNA——线粒体DNA (mtDNA), 但是只编码13条多肽链、22个转运RNA (tRNA) 和2个核糖体RNA (rRNA)。线粒体内的其他蛋白质都是由核基因 (nDNA) 编码的, 这两个基因组协同工作, 维持细胞的正常功能和稳态。已鉴定的人类细胞线粒体蛋白质组含有超过1158种蛋白质, 它们分别定位于线粒体外膜、膜间隙、内膜和基质中, 参与氧化磷酸化、三羧酸循环、分裂-融合动力学, 以及维持线粒体稳态等重要功能。线粒体稳态和线粒体功能的正常发挥与线粒体蛋白酶密切相关, 这些线粒体蛋白酶通过调节线粒体蛋白的活性, 去除受损的或不必要的蛋白质, 从而维持线粒体稳态并确保细胞存活。其中一组功能依赖于ATP结合和水解的线粒体AAA+蛋白酶 (ATPases associated with diverse cellular activities, AAA+ proteases), 不仅执行降解错误折叠蛋白质的功能, 还在线粒体融合蛋白的加工成熟、呼吸链复合物组装、mtDNA复制/转录等过程中发挥关键作用。研究发现, 这些线粒体AAA+蛋白酶的基因突变或者表达异常导致其酶活性改变, 严重损害线粒体结构和功能的完整性, 并导致多种神经系统疾病的发生。本文主要以Lon蛋白酶1 (Lon peptidase 1, LONP1)、酵母线粒体逃逸基因1样蛋白1 (yeast mitochondrial escape 1 like 1, YME1L1) 和ATP酶家族基因3样蛋白2 (ATPase family gene 3-like 2, AFG3L2) 等3种线粒体AAA+蛋白酶为例, 详细阐述了它们的序列相似性和结构特点, 以及在线粒体中的不同定位与功能。通过总结这3种蛋白酶基因突变与神经系统疾病的关系, 发现已报道的疾病相关突变主要位于ATPase结构域和水解酶或肽酶结构域。因此, 解析这些蛋白酶关键结构域的结构和突变导致的功能变化及其对线粒体乃至细胞稳态的影响, 将为理解疾病机制和研发靶向干预策略提供参考。

**关键词** 线粒体AAA+蛋白酶, 神经系统疾病, LONP1, YME1L1, AFG3L2

中图分类号 Q71, R74

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0363

CSTR: 32369.14.pibb.20250363

线粒体是真核细胞中普遍存在且高度动态的细胞器, 参与多种细胞功能, 在物质与能量代谢、细胞信号转导、细胞命运决定等过程中具有重要的调控功能。从超微结构上来说, 线粒体由双层膜包裹, 具有外膜 (outer mitochondrial membrane, OMM)、内膜 (inner mitochondrial membrane, IMM)、膜间隙 (intermembrane space, IMS) 和基质 (matrix); 内膜常常形成向腔内折叠的嵴 (cristae), 而参与电子转移和ATP合成的呼吸链复合物密集排布于嵴上<sup>[1]</sup>。线粒体含有自身的基因组, 即线粒体DNA (mtDNA), 人类细胞的环状mtDNA长度为16 569 bp, 编码13条蛋白质多肽

链、22个线粒体转运RNA (tRNA) 和2个线粒体核糖体RNA (rRNA); 这13个mtDNA编码的蛋白质是呼吸链各复合物的亚基, 它们在线粒体核糖体上合成<sup>[2]</sup>。然而, 线粒体含有的蛋白质超过1 000种<sup>[3]</sup>, 绝大多数是由核基因编码的, 在细胞质中的核糖体上合成, 随后通过复杂的输入途径和易位机制系统导入线粒体<sup>[4]</sup>。

\* 国家自然科学基金 (32271200) 资助项目。

\*\* 通讯联系人。

卫涛涛 Tel:010-64888566, E-mail: weitt@ibp.ac.cn

朱笠 Tel:010-64888303, E-mail: zhuli@ibp.ac.cn

收稿日期: 2025-08-03, 接受日期: 2025-09-15

线粒体质量控制 (mitochondrial quality control, MQC) 是一种细胞内源性保护程序, 分别通过线粒体生物发生 (mitochondrial biogenesis)、线粒体分裂-融合动态 (mitochondrial dynamics)、线粒体自噬 (mitophagy) 以及线粒体去折叠蛋白反应 (mitochondrial unfolded protein response, UPR<sup>mt</sup>) 等4种机制维持其稳态<sup>[5]</sup>。线粒体蛋白酶作为MQC的重要组分, 其功能多样性不仅体现在降解线粒体内错误折叠和损伤的蛋白质, 还参与线粒体内蛋白质剪切加工至成熟型的过程、调控短寿命调节蛋白的表达丰度<sup>[6]</sup>, 并在线粒体生物发生过程中的线粒体蛋白质输入过程、线粒体分裂-融合蛋白的加工以及线粒体去折叠蛋白反应中发挥关键作用<sup>[7-8]</sup>。

AAA+蛋白酶 (ATPases associated with diverse cellular activities, AAA+ proteases) 是一大类具有ATP酶活性的多功能蛋白质超家族, 它们是由多个亚基组成的复合物, 每个亚基都含有一个保守的ATP结合结构域, 形成同源或者异源寡聚体组成的环状结构, 其内部具有依赖于ATP的空腔用于底物构象调节和蛋白质水解, 从而执行包括蛋白质、膜或DNA的重组和循环过程等多种细胞功能<sup>[9-10]</sup>。从分子机制角度, AAA+蛋白酶通过以下步骤实现其功能: 首先特异性识别底物蛋白质的特征性序列; 随后利用ATP结合并水解所释放的能量驱动底物发生构象变化; 进而促使底物蛋白质在其中央通道内展开并转运至降解腔室; 最终将展开的多肽链水解为短肽片段, 从而完成降解过程<sup>[11]</sup>。在线粒体中执行降解错误折叠蛋白质功能的ATP依赖性蛋白酶有4种主要类型, 分别是膜间AAA蛋白酶 (intermembrane AAA, i-AAA)、基质AAA蛋白酶 (matrix AAA, m-AAA)、Lon蛋白酶同源物 (Lon peptidase, LONP) 以及ATP依赖的Clp蛋白酶 (Clp protease, CLPP)<sup>[12]</sup>。值得关注的是, 这些线粒体AAA+蛋白酶的基因突变或者表达异常使其酶活性改变, 影响线粒体正常功能, 从而导致包括心血管疾病、癌症和多种神经系统疾病的发生发展<sup>[13]</sup>。本文重点围绕Lon蛋白酶1 (Lon peptidase 1, LONP1)、i-AAA蛋白酶酵母线粒体逃逸基因1样蛋白1 (yeast mitochondrial escape 1 like 1, YME1L1) 和m-AAA蛋白酶ATP酶家族基因3样蛋白2 (ATPase family gene 3-like 2, AFG3L2) 等3种具有代表性的线粒体AAA+蛋白酶, 旨在通过对比分析它们的结构与功能特点, 阐述其在神经系统

疾病中的核心作用, 并探讨靶向这些蛋白酶研发治疗策略的临床意义。

## 1 线粒体AAA+蛋白酶的序列相似性及结构特点

AAA+蛋白酶家族的标志性特征是包含一个由200~250个氨基酸组成的ATP结合结构域 (简称AAA+结构域, AAA+domain), 该结构域包含Walker A和Walker B基序以及其他几个将其与经典P环 (phosphate-binding loop, P-loop) 核苷三磷酸 (nucleoside triphosphate, NTP) 酶区分开的特征性基序 (图1)。Walker A和Walker B基序是AAA+蛋白酶ATP结合与水解位点的核心组成部分<sup>[14-15]</sup>。Walker A基序的P环 (位于β1和α1之间) 直接与ATP的磷酸基团相互作用, P环中一个特定的赖氨酸残基 (位于共有序列GXXXXGK [T/S] 内) 至关重要, 其突变通常会消除ATP结合而使酶失活<sup>[15]</sup>。Walker B基序 (从β3延伸到α3起始处) 也与ATP分子发生接触, 其hhhDE序列 (h代表疏水性氨基酸) 中的酸性氨基酸残基对于ATP酶活性不可或缺<sup>[14]</sup>。多种AAA+蛋白酶已被广泛研究, 其中线粒体AAA+蛋白酶包括: 参与蛋白质质量控制并定位于线粒体内膜的含有AAA+结构域ATP酶家族蛋白1 (ATPase family AAA domain-containing 1, ATAD1)<sup>[16-18]</sup>、应激激活的锌离子金属肽酶OMA1 (OMA1 zinc metallopeptidase, OMA1)<sup>[19-20]</sup>、酪蛋白水解蛋白酶P (caseinolytic protease, ClpP)<sup>[21-22]</sup>、Lon蛋白酶LONP1<sup>[23-25]</sup>、i-AAA蛋白酶YME1L1<sup>[26-28]</sup>和m-AAA蛋白酶AFG3L2<sup>[29-31]</sup>。

线粒体蛋白酶LONP1、YME1L1和AFG3L2, 均含有负责ATP结合与水解的AAA+结构域和负责底物降解的水解酶/肽酶结构域 (图1), 且它们均可形成六聚体结构。氨基酸序列比对结果显示, LONP1、YME1L1和AFG3L2发挥关键功能的Walker A和Walker B基序是高度保守的 (图1, S1), 但作为维持线粒体稳态的核心执行者, 它们的底物特异性和降解机制却各有差异。

### 1.1 LONP1结构特点

LONP1是一种高度保守的AAA+蛋白水解酶, 几乎在所有生物中都有同源物。它最初发现于大肠杆菌, 并被命名为Lon或La<sup>[32]</sup>。在人类细胞中, LONP1的编码基因位于第19号染色体, 其编码的蛋白质由959个氨基酸组成<sup>[25]</sup>。LONP1蛋白N端的前67个氨基酸为线粒体靶向序列

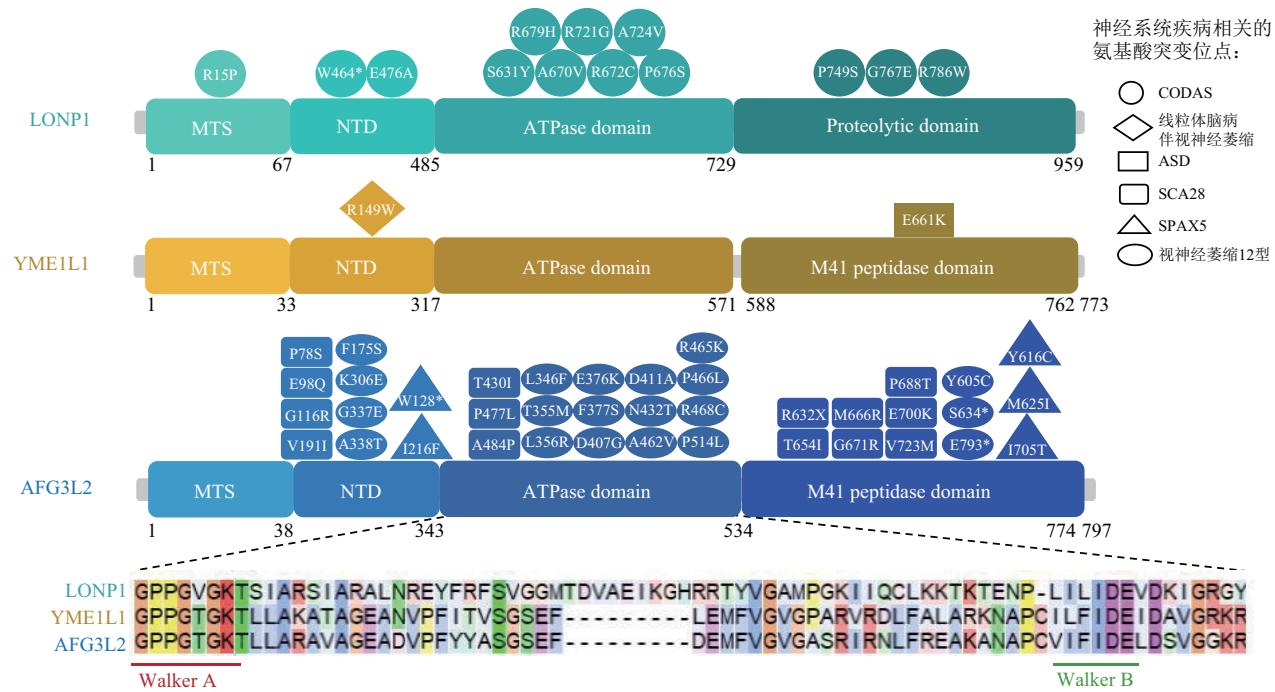


Fig. 1 Domain structure of mitochondrial AAA+ proteases and amino acid mutations associated with neurological disorders

图1 3种线粒体AAA+蛋白酶的结构域以及部分神经系统疾病中的氨基酸突变位点

MTS: 线粒体靶向序列 (mitochondrial targeting sequence); NTD: N端结构域 (N-terminal domain); ATPase domain: ATP酶结构域 (adenosine triphosphatase domain); proteolytic domain: 肽酶结构域; M41 peptidase domain: M41肽酶家族的锌金属蛋白酶结构域 (M41 peptidase family zinc-binding metalloprotease domain); 使用Jalview软件, 对人源LONP1 (UniProt ID: P36776)、YME1L1 (UniProt ID: Q96TA2) 和AFG3L2 (UniProt ID: Q9Y4W6) 蛋白的ATPase domain进行序列比对, 以相似性指数和全局评分为0.5的百分比等价性进行展示。相同背景框表示高度保守的区域。红色横线和绿色横线分别表示保守的Walker A和Walker B基序。图中还显示LONP1、YME1L1和AFG3L2基因突变导致神经系统疾病相关的氨基酸突变。以不同形状的几何图形表示不同神经系统疾病的氨基酸突变位点: 圆形表示脑-眼-牙-耳-骨骼异常 (cerebral, ocular, dental, auricular, skeletal anomalies, CODAS) 综合征; 菱形表示线粒体脑病伴视神经萎缩; 矩形表示孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD); 圆角矩形表示脊髓小脑共济失调28型 (spinocerebellar atrophy 28, SCA28); 三角形表示痉挛性共济失调-神经病综合征5型 (spastic ataxia-neuropathy syndrome 5, SPAX5); 椭圆形表示视神经萎缩。\*尚待确定。其中氨基酸突变位点均来自表1的参考文献。

(mitochondrial targeting sequence, MTS), 负责将在细胞质中合成的LONP1蛋白运输至线粒体内, 而后被切除, 形成成熟的LONP1蛋白。N端67~485位氨基酸组成N端结构域 (N-terminal domain, NTD), 参与不同底物蛋白质的识别; 中部486~729位氨基酸是一个与多种细胞活性相关的AAA+结构域, 具有ATP酶活性, 可与ATP结合并参与ATP水解; 而C端730~959位氨基酸组成参与底物蛋白质水解的P结构域, 含有1个保守的Ser-Lys二联体构成的水解酶活性区<sup>[33]</sup> (图1)。通过构建K529A、E591A和S855A突变体进行实验, 已确认K529、E591和S855分别是ATP结合、ATP水解和肽酶水解的关键位点<sup>[34]</sup> (图1, 2)。

在哺乳动物细胞中, LONP1是一种重要的

MQC蛋白酶, 通过多种机制调节线粒体的蛋白质稳态及各种生物学功能<sup>[35]</sup>。研究发现: 在缺乏底物时, LONP1采用开放的左手螺旋构象, 其AAA+结构域结合ADP, 并使其蛋白酶活性位点组织成一个非活性构象; 而在底物存在的情况下, LONP1组装成同源六聚体, 所有蛋白酶结构域组装成一个碗状降解腔室, AAA+结构域以盖的形式出现, 底物进入其降解腔室而被降解, 水解产物从碗状腔的另一侧离开<sup>[36]</sup>。最新发展的信号噪声比迭代重构法 (signal-to-noise ratio iterative reconstruction method, SIRM) 使冷冻电镜解析的LONP1构象变化的分辨率由3.6 Å提升至2.9 Å, 并首次清晰解析了Walker A环 (Lys529) 与ATP γ磷酸之间的氢键网络<sup>[37]</sup>。该工作不仅使LONP1六

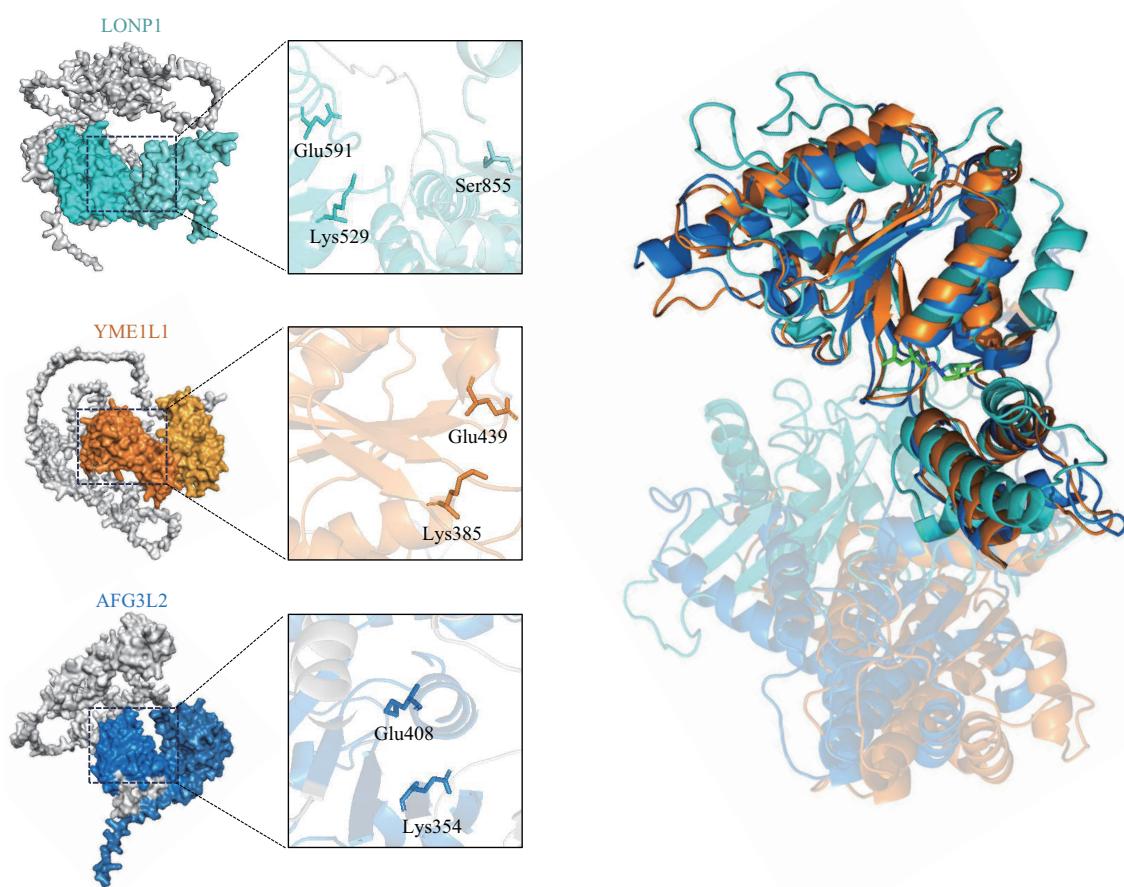


Fig. 2 Key sites for ATP binding and hydrolysis in mitochondrial AAA+ proteases

图2 线粒体AAA+蛋白酶结构中的关键ATP结合和水解位点

左图从上到下依次表示来自PDB数据库的LONP1 (PDB ID: 7KSL)<sup>[34]</sup>、YME1L1 (PDB ID: 6AZ0)<sup>[28]</sup> 和AFG3L2 (PDB ID: 6NYY)<sup>[38]</sup> 的单体结构以及ATP酶结构域中Walker A和Walker B的局部放大。灰色表示跨膜区和N端结构域 (N-terminal domain, NTD); 亮蓝绿色和蓝绿色分别表示人源LONP1的AAA+结构域 (AAA+domain) 和肽酶结构域 (proteolytic domain); 橙色和黄色分别表示酵母Yme1的AAA+结构域和M41肽酶家族的锌金属蛋白酶结构域 (M41 peptidase domain); 亮蓝色和深蓝色分别表示人源AFG3L2的AAA+结构域和M41肽酶家族的锌金属蛋白酶结构域。右图表示三个全长蛋白质的重叠, 绿色棒状结构显示ADP分子结合在LONP1的AAA+结构域中, 实图部分表示高度相似的AAA+结构域, 虚图部分表示差异性较大的其他区域。

聚体在开放与关闭两种构象间切换的密度图更加完整, 也为AAA+蛋白酶利用ATP水解驱动的“螺旋-旋转-门控”机制提供了高精度的结构证据。

## 1.2 YME1L1结构特点

i-AAA蛋白酶是一类催化结构域面向线粒体膜间隙的AAA+蛋白酶, 其进化起源可追溯至细菌同源物FtsH<sup>[39]</sup>。在酵母中, i-AAA蛋白酶由Yme1的6个同源亚基组成, 而在人类细胞中, 其同源蛋白为Yme1样蛋白酶1 (YME1 like 1 ATPase, YME1L1), 每个亚基含有773个氨基酸, 组装成六聚体形式<sup>[40]</sup>。YME1L1的氨基酸序列中, 1~316位氨基酸组成1个短的NTD和1个跨膜区 (transmembrane segments, TMs), 而317~773位氨

基酸包含1个AAA+结构域和1个属于M41肽酶家族的锌金属蛋白酶结构域 (图1)。YME1L1的跨膜区将其锚定在线粒体内膜上, 而亲水性的ATP酶和肽酶结构域则延伸至膜间隙, 使其能够与膜间隙中的可溶性蛋白质以及内膜蛋白的非膜暴露区域相互作用。YME1L1的ATP酶活性依赖于其保守的P环, 该环包含Walker A和Walker B基序, 其中K385和E439分别为参与ATP结合和ATP水解的关键位点<sup>[26]</sup> (图1, 2)。为克服全长YME1L1在体外研究中的困难, 研究者将其跨膜区替换为一个可溶的六聚体卷曲螺旋 (cc-hex), 并通过连接肽 (GSGSYFQSNA) 将其与催化核心 (YME1L-AP, 317~773) 融合, 成功构建出具有酶活性的可溶性

hexYME1L1六聚体<sup>[41]</sup>。这种工程化的hexYME1L1能够在体外模拟其在细胞内的功能, 为研究其底物识别和降解机制提供了有力工具。冷冻电镜结构分析表明: ATP水解驱动AAA+结构域的螺旋桨状旋转, 促使中央孔道内的保守Tyr443残基捕获底物并推动其去折叠, 从而完成对底物的降解<sup>[28]</sup>。

研究表明, 人源i-AAA蛋白酶YME1L1对底物的识别严格依赖于其羧基或氨基端是否存在可接近的、非结构化的降解信号(degron), 并且蛋白质发生去折叠本身并不足以触发降解过程, 必须存在特定的degron序列才能启动蛋白酶解反应。例如, 在去折叠形式的I27蛋白C端融合 $\beta$ 20 degron(序列为QLRSLNNGEWRFAWFPapeav)后, 才可被YME1L1高效降解, 而缺乏该degron的相同去折叠蛋白则不被识别。进一步的研究揭示, 该降解信号中一个包含疏水氨基酸的五肽基序“FAWFP”在YME1L1的识别中起到关键作用。当该基序位于degron的C端时(例如在截短的 $\beta$ 10 degron中, 序列为FAWFPAPEAV), 仍可介导有效的底物降解, 而仅包含末端五肽“APEAV”的重组构建体( $\beta$ 5)则几乎丧失被识别的能力, 说明“FAWFP”是YME1L1特异性识别的核心元件<sup>[41]</sup>。综上, 该研究提示: YME1L1最有效的降解信号是一类位于蛋白质末端、长度不少于10个氨基酸的非结构化序列, 其C端需包含一个疏水核心基序(如“FAWFP”)。这种识别机制表明, YME1L1可能通过特异性degron介导底物选择, 并非广泛且非特异地清除所有未折叠蛋白底物, 这为其在线粒体蛋白质质量控制中的精确调控功能提供了分子基础。

### 1.3 AFG3L2结构特点

与YME1L1相似, AFG3L2是一种依赖于ATP的锌金属蛋白酶, 它也定位于线粒体内膜, 但是其功能结构域朝向线粒体基质。AFG3L2的结构包括1个高度可变的NTD、2个TMs、1个AAA+结构域以及1个属于M41肽酶家族的锌金属蛋白酶结构域<sup>[42]</sup>(图1)。关键功能位点分析表明, K354和E408残基分别负责AFG3L2的ATP结合与ATP水解活性<sup>[30]</sup>(图1, 2)。与LONP1和YME1L1不同, AFG3L2可形成同源六聚体, 或与Paraplegin(由SPG7基因编码)组装成异源六聚体蛋白酶复合体, 拓展了其底物降解的范围与调控维度<sup>[43]</sup>。AFG3L2蛋白酶在降解错误折叠蛋白底物的过程主要包括以

下步骤: 首先, 底物通过其ATP酶结构域的N端和C端进行募集; 其次, 在ATP水解供能的驱动下, 底物被孔道环1(pore loop 1)捕获并嵌入, 进入易位预备状态; 接着, 去折叠的底物肽链经由孔道环2(pore loop 2)和中心突起室(central pore)进行定向转移; 最终, 在锌相关蛋白酶的活性位点完成底物的切割<sup>[38]</sup>。

### 1.4 线粒体AAA+蛋白酶的结构共性与特性

LONP1、YME1L1和AFG3L2代表了线粒体中3类重要的AAA+蛋白酶, 它们在维持线粒体MQC中扮演关键角色。三者在结构和功能上既存在显著共性, 又各具特性, 共同构成了一个多层次、作用位点特异的调控网络。它们在结构上的共性是均具有保守的AAA+结构域和水解酶/肽酶结构域, 并均以六聚体形式发挥功能。冷冻电镜解析的LONP1、YME1L1及AFG3L2六聚体结构(分辨率达3.0 Å)共同揭示, 线粒体AAA+蛋白酶利用“螺旋梯”式(helical staircase)的协同ATP水解机制, 驱动中央孔道内的Tyr环(Tyr-loop)抓取底物并实现单向易位, 从而完成它们对蛋白质底物的解折叠和降解<sup>[44]</sup>。

它们各自的特性则体现在3个方面。首先, 由于三者的亚细胞定位不同, 它们在结构上存在有无跨膜螺旋的差别, LONP1是基质可溶性蛋白酶, 不含跨膜区, 主要降解基质内的错误折叠蛋白, YME1L1和AFG3L2均含有跨膜区使其锚定于线粒体内膜, 但它们的催化结构域朝向相反, 这进一步决定了其降解底物的偏好性。其次, 它们形成的寡聚体不同, LONP1和YME1L1均以同源六聚体形式出现, 而AFG3L2可形成同源六聚体或与Paraplegin组装为异源六聚体。最后, 三者最显著的区别体现在底物识别机制上, LONP1蛋白酶识别并倾向于降解蛋白质N端带有碱性氨基酸(如精氨酸、赖氨酸、组氨酸)或大型疏水氨基酸(如苯丙氨酸、色氨酸、亮氨酸)的底物<sup>[45]</sup>, YME1L1严格依赖底物C端存在包括疏水核心基序“FAWFP”的特异性degron, 而AFG3L2偏好降解在P1'位置(即切割位点的C端)含有苯丙氨酸的序列<sup>[38]</sup>。综上, 这些蛋白酶通过保守的催化核心机制与差异化的定位、组装及识别策略, 在功能上实现了分工与互补, 协同维护线粒体的蛋白质稳态。

## 2 线粒体AAA+蛋白酶的亚细胞定位与功能

真核细胞的线粒体拥有一套高度特化的MQC系统,其核心功能是维系线粒体蛋白质组的稳态并通过分区发挥特异性功能。依据亚线粒体定位,线粒体蛋白质组被精确划分为外膜、膜间隙、内膜及基质四个功能区室<sup>[46-49]</sup>,广泛参与线粒体分裂-融合动力学(mitochondrial fission and fusion dynamics)、细胞凋亡(apoptosis)、脂质生物合成(lipid biosynthesis)、钙稳态(calium homeostasis)、氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)及前体蛋白转运后的加工与降解等关键生命过程<sup>[12, 50]</sup>。上述任一环节失衡均可诱发线粒体功能障碍并威胁细胞存活<sup>[51-52]</sup>。作为MQC核心执行者的AAA+蛋白酶家族成员,定位于线粒体基质的LONP1通过降解受损蛋白质并调控mtDNA拷贝数与转录从而维持线粒体基因组的稳定性,锚定于内膜且催化结构域面向膜间隙的i-AAA蛋白酶YME1L1专责剪切异常膜蛋白并参与呼吸链复合体组装,镶嵌于内膜且催化结构域朝向基质的m-AAA蛋白酶AFG3L2则与Paraplegin协同完成基质侧内膜蛋白的加工成熟与线粒体核糖体稳态维持(图3)。这3种蛋白酶的功能活性、亚线粒体定位与底物特异性的精准协同,共同构成MQC网络的核心枢纽,确保线粒体蛋白质组的稳态与功能完整性。

### 2.1 LONP1亚细胞定位与功能

LONP1是线粒体基质中一种至关重要的AAA+蛋白酶(图3),其功能多样,广泛参与维持线粒体稳态。首先,作为MQC系统的重要组成部分,它通过降解错误折叠或受损的蛋白质,维持线粒体蛋白组的完整性。例如,LONP1可特异性识别并降解三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TAC)中的关键酶:顺乌头酸酶2(aconitase hydratase 2, ACO2),从而防止其异常积累对代谢循环造成的损害<sup>[23]</sup>。近期研究还表明,LONP1通过调控琥珀酸脱氢酶复合体B亚基(succinate dehydrogenase complex subunit B, SDHB)的稳定性,影响细胞内琥珀酸水平,进而参与白色脂肪细胞向米色脂肪细胞的分化过程,体现了其在能量代谢中的关键作用<sup>[53]</sup>。其次,LONP1具有分子伴侣功能。它能与热休克蛋白60(heat shock protein 60, HSP60)相互作用,稳定HSP60与线粒体热休克蛋白70(mtHSP70)形成的复合物,从而促进新输入

蛋白质的正确折叠,维持线粒体蛋白质稳态<sup>[54]</sup>。此外,LONP1还参与调控线粒体动力学。研究发现,LONP1缺失会导致分裂相关蛋白1(dynamin-related protein 1, Drp1)的表达增加2.3倍,促进线粒体碎片化<sup>[55]</sup>。在人类软骨和衰老大鼠软骨细胞中,LONP1敲低可引起氧化应激和线粒体自噬,继而激活下游促丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路,加速骨关节炎进展<sup>[24]</sup>。特别值得关注的是,LONP1直接参与mtDNA拷贝数的维持。电泳迁移率变动分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)和圆二色谱(circular dichroism spectrum, CD spectrum)的结果一致表明,LONP1能够特异性识别G-四联体(G-quartet)结构域,与mtDNA结合<sup>[56]</sup>。更重要的是,LONP1通过调控线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)的稳定性来影响mtDNA的复制和转录活性。当TFAM在Ser55/Ser56位点发生磷酸化修饰后,其与mtDNA的结合能力下降,转而与LONP1相互作用并被降解<sup>[35, 57]</sup>。

在低氧等应激条件下,LONP1同样发挥关键作用。低氧环境下,细胞通过激活低氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)启动适应性应答,HIF-1通过直接结合LONP1基因的启动子区域,显著上调LONP1的转录与表达;随后,被诱导的LONP1特异性地降解细胞色素c氧化酶(cytochrome c oxidase, COX)的亚基COX4-1。这一过程与HIF-1同时诱导的COX4-2亚基表达上调协同作用,优化电子传递链的运行效率,并减少有害活性氧类(reactive oxygen species, ROS)的生成<sup>[58]</sup>。进一步的研究揭示,在低氧和缺血条件下,COX的核编码亚基(如IVi1和Vb)会被线粒体基质内的蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)在其特定位点(如IVi1-T52和Vb-S40)磷酸化,从而使磷酸化位点暴露于溶剂可及区域,并成为LONP1的优势底物。而且脉冲-追踪实验(pulse-chase)证实,磷酸化位点突变的COX亚基能够抵抗低氧诱导的降解,保护COX的酶活性<sup>[59]</sup>。在低氧应激中,LONP1作为HIF-1信号通路的关键执行者,通过识别PKA介导的磷酸化信号并特异性降解COX亚基,精密地重构线粒体功能,是维持细胞能量稳态和存活的重要机制。除了TFAM和COX亚基,LONP1是否更易识别其他底物的磷酸化修饰形式是值得关注的问题。此外,尽管多项研

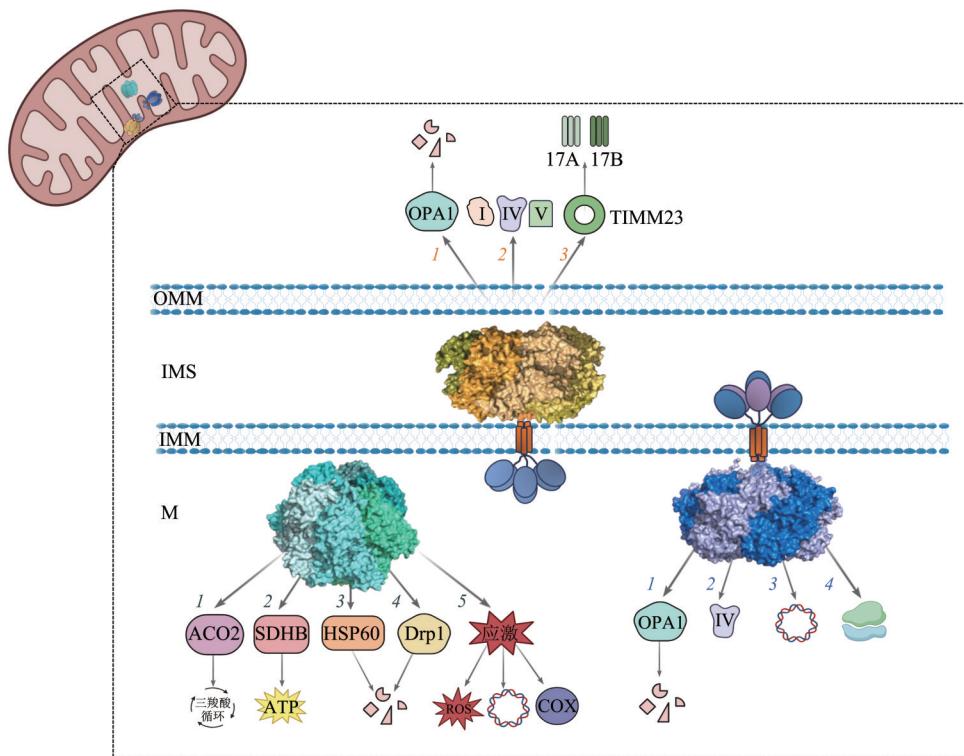


Fig. 3 Subcellular localization and function of mitochondrial AAA+ proteases

图3 线粒体AAA+蛋白酶的亚细胞定位及功能

图中显示LONP1、YME1和AFG3L2 (PDB ID同图2) 催化核心的结构信息及其在线粒体中的重要功能。OMM: 线粒体外膜 (outer mitochondrial membrane); IMS: 膜间隙 (intermembrane space); IMM: 线粒体内膜 (inner mitochondrial membrane); M: 基质 (matrix)。亮绿色数字1~5表示本综述中所述LONP1的功能, 分别为: LONP1可识别并降解顺乌头酸酶2 (aconitase hydratase 2, ACO2), 并进一步调控三羧酸循环; LONP1能够降解琥珀酸脱氢酶复合体B亚基 (succinate dehydrogenase complex subunit B, SDHB), 参与ATP合成; LONP1也可与热休克蛋白60 (heat shock protein 60, HSP60) 相互作用, 从而促进新输入蛋白质的正确降解; LONP1还会影响分裂相关蛋白1 (dynamin-related protein 1, Drp1) 的表达, 促进线粒体的碎片化; 在应激条件下, LONP1参与维持细胞能量稳态, 如保障mtDNA的稳定性以及特异性地降解细胞色素c氧化酶 (cytochrome c oxidase, COX) 的亚基。橘色数字1~3表示本综述中所述YME1L1的功能, 分别为: YME1L1参与调节OPA1稳定性, 并参与错误蛋白的降解过程; YME1L1维持呼吸链复合物I、IV和V的正确组装; YME1L1能够识别未被前体占据的TIM23复合物, 并降解其核心亚基TIMM17A和TIMM23。深蓝色数字1~4表示本综述中所述AFG3L2的功能, 分别为: AFG3L2通过调控线粒体融合蛋白OPA1的加工, 影响蛋白质的正确降解; AFG3L2也会影响电子传递链复合物IV的组装; AFG3L2参与mtDNA的完整性; AFG3L2缺失还可引起“核糖体衰变”。

究证实LONP1主要在线粒体基质中发挥功能, 但也有研究表明, LONP1也在细胞核、细胞质和内质网中被检测到<sup>[60-61]</sup>。这意味着LONP1是否具有未被发现的非经典功能, 仍是该领域一个值得探索的方向。

## 2.2 YME1L1亚细胞定位与功能

YME1L1定位于线粒体内膜上, 其催化结构域面向IMS (图3)。作为线粒体内膜蛋白质量控制的核心执行者, YME1L1通过降解未组装或错误折叠的蛋白质亚基, 维持呼吸链复合物的正确组装、线粒体结构完整性和线粒体输入系统的功能。共聚焦显微镜观察到, YME1L1缺失细胞中, 多种呼吸

链复合物 (如复合物I、IV和V) 的亚基异常积累<sup>[62]</sup>, 包括细胞色素c氧化酶亚基4 (cytochrome c oxidase subunit 4, Cox4) 和NADH脱氢酶1 $\beta$ 亚复合物6 (ubiquinone oxidoreductase subunit B6, NDUFB6) 等未能正确组装的蛋白质成分, 使得这些游离亚基无法被及时清除, 进一步损害电子传递链功能<sup>[63]</sup>。除参与呼吸链组装外, YME1L1还通过调控视神经萎缩症1型蛋白 (optic atrophy 1, OPA1) 的加工, 影响线粒体形态和分裂-融合动力学。蛋白质印迹 (Western blot, WB) 分析发现, 在YME1L1基因敲除小鼠的心肌细胞中, OPA1的长亚型 (long-form OPA1, L-OPA1) 水平显著升

高，而其短亚型（short-form OPA1，S-OPA1）生成减少。透射电子显微镜（transmission electron microscopy, TEM）观察进一步显示，*YME1L1*缺失虽未明显破坏线粒体嵴的结构，但引起线粒体数量增多和体积减小<sup>[64]</sup>。这些结果揭示了*YME1L1*在调节OPA1稳定性以及维持线粒体形态结构完整性方面发挥着关键作用。

近年来研究发现，*YME1L1*还参与线粒体蛋白质输入过程的监控。线粒体的生物发生依赖于核基因组编码的大量蛋白质，这些蛋白质需通过线粒体外膜转位酶复合物（translocase of the outer membrane, TOM）和线粒体内膜转位酶复合物23（translocase of the inner membrane 23, TIM23）协同作用转运至线粒体基质或定位于线粒体内膜<sup>[6]</sup>。蛋白质输入过程受阻则导致线粒体功能异常甚至细胞死亡。在这种输入受阻的条件下，前体蛋白无法抵达TIM23复合物，致使其处于“空闲”或“未被占据”的状态。免疫共沉淀（Co-immunoprecipitation, Co-IP）和一维天然胶（或非变性胶）聚丙烯酰胺凝胶电泳（blue native polyacrylamide gel electrophoresis, BN-PAGE）实验结果表明，*YME1L1*能够识别未被前体占据的TIM23复合物，并降解其核心亚基TIMM17A和TIMM23，从而防止无效的蛋白质继续输入，避免错误折叠或受损蛋白质的积累<sup>[65]</sup>。值得注意的是，*YME1L1*降解“未被占据”的TIM23复合体这一发现与早期关于线粒体输入通道稳态的认识有所不同。此前普遍认为，线粒体蛋白输入受阻主要通过UPR<sup>mt</sup><sup>[66]</sup>或PINK1-Parkin介导的线粒体自噬途径来应对<sup>[67]</sup>。*YME1L1*参与调控TIM23复合物的通路是独立存在，还是与上述通路存在交叉，仍是未来研究中亟需解决的重要问题。

### 2.3 AFG3L2亚细胞定位与功能

AFG3L2主要定位于线粒体内膜上，并面向线粒体基质一侧，属于m-AAA（图3）。与LONP1和*YME1L1*等其他线粒体AAA+蛋白酶类似，AFG3L2对维持线粒体蛋白稳态至关重要<sup>[68]</sup>。首先，AFG3L2的缺失通过影响电子传递链复合物IV的组装，影响OXPHOS效率，其缺失可导致耗氧量下降30%~40%、ATP合成减少50%，并激活细胞凋亡<sup>[69]</sup>。其次，它参与线粒体动力学平衡的维持：2019年Richter等<sup>[70]</sup>首次观察到，AFG3L2功能障碍可导致线粒体融合蛋白OPA1加工异常，进而通过OMA1依赖性途径引起S-OPA1过度积累

和线粒体碎片化；该研究还首次报道了AFG3L2缺失可引起“核糖体衰变”，即线粒体核糖体数量显著减少。此外，AFG3L2负责对13种mtDNA编码的呼吸链蛋白亚基进行共翻译加工，确保呼吸链复合物的正确组装。在神经元中，尤其是浦肯野细胞等能量需求较高的细胞，AFG3L2缺失的表型尤为严重：一方面导致线粒体碎片化，使树突远端线粒体密度下降60%，另一方面通过影响线粒体钙单向转运体（mitochondrial calcium uniporter, MCU）复合体组装，损害线粒体Ca<sup>2+</sup>缓冲能力，加之ATP合成不足导致谷氨酸清除延迟，最终引发兴奋性毒性和细胞凋亡<sup>[71-73]</sup>。这些结果说明，AFG3L2通过在MQC、呼吸链组装、线粒体动力学和钙稳态等多层面的调控，对维持线粒体功能完整性具有核心作用。

### 2.4 线粒体AAA+蛋白酶功能的调控

线粒体AAA+蛋白酶的功能活性不仅取决于其催化结构域的完整性，更受到转录、翻译及翻译后修饰等多个层次的精密调控，以响应细胞内外的能量状态与应激信号。LONP1的表达调控主要发生在转录和翻译后水平。如前所述，LONP1受HIF-1的直接调控：在低氧条件下，HIF-1 $\alpha$ 结合于LONP1基因的启动子区域，显著增强其转录，进而促进对COX4亚基的选择性降解，优化呼吸链功能并减少ROS的产生<sup>[58]</sup>。此外，核呼吸因子1（nuclear respiratory factor 1, NRF1）及过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 共激活因子1 $\alpha$ （peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, PGC-1 $\alpha$ ）等线粒体生物发生的主调控因子，也能正向调控LONP1的表达，将其整合入线粒体能量代谢的核心调控网络<sup>[74]</sup>。在翻译后层面，LONP1的活性受到酪氨酸磷酸化的负调控：其N端结构域中Tyr186和Tyr394这两个位点被磷酸化可导致其蛋白酶活性受到抑制，而去磷酸化则解除该抑制，增强其功能<sup>[75]</sup>。*YME1L1*的表达受到UPR<sup>mt</sup>的诱导。通过激活转录因子5（activating transcription factor 5, ATF5），UPR<sup>mt</sup>可广泛上调多种线粒体伴侣蛋白和线粒体蛋白酶（包括*YME1L1*）的表达，以缓解蛋白质错误折叠压力<sup>[76]</sup>。此外，*YME1L1*的活性也受到其底物状态的反馈调节。例如，当线粒体蛋白输入受阻导致TIM23复合物处于“空闲”状态时，会作为信号触发*YME1L1*对其核心亚基进行降解，这是一种快速的蛋白质质量控制反馈回路<sup>[65]</sup>。AFG3L2的表

达同样受到线粒体生物发生核心信号的严密调控。已有研究提示, *AFG3L2*基因的启动子区域可能存在参与细胞能量感知的关键因子的结合位点, 如NRF1和GA结合蛋白转录因子α亚基(GA-binding protein transcription factor alpha subunit, GABPA, 也称NRF2), 表明其转录可能与线粒体生物发生过程密切协同<sup>[7]</sup>。此外, *AFG3L2*参与PTEN诱导的激酶1(PTEN-induced kinase 1, PINK1)蛋白的加工成熟过程, 提示其可能通过调控线粒体自噬通路的上游信号, 间接影响线粒体质量控制的全局网络<sup>[30]</sup>。综上所述, LONP1、YME1L1和AFG3L2的表达与功能受到转录、复合物组装、底物反馈及病理蛋白相互作用的多层次调控。这些调控机制确保线粒体能够动态适应生理需求, 而其失调则直接参与多种神经系统疾病的分子病理过程。

### 3 线粒体AAA+蛋白酶与神经系统疾病

神经系统疾病包括两大类, 一类是神经发育疾病(neurodevelopmental disorders), 另一类是神经退行性疾病(neurodegenerative diseases)。前者主要是在胎儿期至儿童期大脑发育过程中出现的慢性、非进展性神经系统障碍, 其核心表现是认知、语言、运动或社交行为受损, 常见类型包括孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)、智力迟缓(mental retardation, MR)、注意缺陷多动障碍(attention-deficit/hyperactivity disorder, ADHD)、脑瘫(cerebral palsy, CP)等, 通常由遗传变异、围产期损伤或环境因素共同导致, 并可持续至成年, 其中遗传突变和/或应激暴露导致的线粒体功能障碍可能通过影响胎儿产前和产后的神经细胞发育和神经网络构建导致<sup>[78]</sup>。后者是一类在成年后期随衰老而出现的进行性神经系统退行性

病变, 核心表现为记忆、执行、运动或自主神经功能丧失, 常见类型包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)等, 通常由遗传突变、氧化应激、病理性蛋白聚集及线粒体功能障碍共同驱动, 并随病程持续恶化直至终生<sup>[79]</sup>。由于大脑中的神经元需要消耗大量能量为轴突中的离子通道和泵供电, 且主要依靠线粒体的OXPHOS提供ATP, 因此神经元极易受到线粒体功能障碍的影响<sup>[80]</sup>。线粒体在神经元胞体内形成, 通过分裂融合和MQC维持其健康的动态平衡, 但是由于轴突很长, 神经元特化出复杂机制, 通过动力蛋白和微管、微丝, 将健康线粒体输送到轴突中最需要能量的部位发挥作用, 并将受损线粒体从远端运回胞体进行循环利用<sup>[81]</sup>。随着人体的衰老, 线粒体的能量代谢功能逐渐降低, ATP产能减少, ROS产生增加, MQC和运输能力均下降, 无法应对外界各种压力, 就会促进神经退行性疾病发生和进展<sup>[82-83]</sup>。

多项研究发现, LONP1、YME1L1和AFG3L2这3种线粒体AAA+蛋白酶的突变均与多种神经系统疾病密切相关, 而且其病理机制均指向线粒体蛋白稳态的崩溃<sup>[12]</sup>。通过整理已报道疾病相关突变位点在其蛋白质氨基酸序列的位置发现, YME1L1目前只发现两个突变与神经系统疾病有关, 且一个突变位于NTD, 另一个位于肽酶结构域, 而LONP1和AFG3L2的疾病突变主要定位于它们的ATPase结构域和水解酶或肽酶结构域(图1, 表1)。这说明这些蛋白酶的关键结构域对其功能至关重要, 一旦发生基因突变, 影响其结构或构象, 就会导致疾病的产生和进展。下文将详细阐述每种疾病背后的分子机制, 并尝试比较其异同。

Table 1 Mutated amino acids of mitochondrial AAA+ proteases in human neurological diseases

表1 人类神经系统疾病中线粒体AAA+蛋白酶的氨基酸突变位点

线粒体蛋白酶	生物学功能	相关神经系统疾病	氨基酸突变位点
LONP1	线粒体质量控制, 分子伴侣, 线粒体分裂-融合动力学, mtDNA复制/维持	CODAS综合征	R15P, R672C <sup>[84]</sup> ; R786W <sup>[85]</sup> ; W464*, E476A, A670V, R679H, P749S, G767E <sup>[86]</sup> ; S631Y, P676S, R721G, A724V <sup>[87]</sup>
YME1L1	线粒体质量控制, 呼吸链复合物组装, 线粒体蛋白质转运, 线粒体分裂-融合动力学	线粒体脑病伴视神经萎缩 ASD	R149W <sup>[88]</sup> E661K <sup>[89]</sup>

续表1

线粒体蛋白酶	生物学功能	相关神经系统疾病	氨基酸突变位点
AFG3L2	线粒体质量控制, 呼吸链复合物组装, 核糖体装配, 氧化磷酸化	SCA28	P78S, E98Q, P477L, A484P <sup>[90]</sup> ; G116R <sup>[91]</sup> ; V191I, T430I <sup>[42]</sup> ; R632X <sup>[92]</sup> ; T654I, M666R <sup>[93]</sup> ; G671R <sup>[94]</sup> ; P688T <sup>[95]</sup> ; E700K <sup>[96]</sup> ; V723M <sup>[97]</sup>
		SPAX5	W128*, I216F, M625I, I705T <sup>[90]</sup> ; Y616C <sup>[42]</sup> F175S <sup>[98]</sup> ; T355M, K306E, A338T, L346F, L356R, E376K, F377S, D407G, N432T, A462V, R465K, P466L, R468C, P514L, Y605C, S634* <sup>[42]</sup> ; G337E <sup>[99]</sup> ; D411A <sup>[91]</sup> ; E793* <sup>[90]</sup>

\*尚待确定。

### 3.1 LONP1与神经系统疾病

#### 3.1.1 LONP1与CODAS综合征

1991年, Shebib等<sup>[100]</sup>首次将脑、眼、牙、耳、骨骼异常(cerebral, ocular, dental, auricular, skeletal anomalies, CODAS)综合征描述为一种罕见的常染色体隐性遗传性多系统发育障碍。CODAS综合征的典型临床表现包括: 颅面发育异常(宽颅、面中部扁平)、感觉器官畸形, 以及进行性骨骼发育障碍(身材矮小、脊柱侧弯、干骺端发育不良等)<sup>[86]</sup>。2015年的研究通过全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)揭示CODAS综合征由LONP1双等位基因突变引起, 其中4个致病突变Arg721Gly、Pro676Ser、Ser631Tyr和Ala724Val均位于LONP1的AAA+结构域(图1), 且空间定位紧邻ATP结合口袋<sup>[87]</sup>, 提示其可能通过干扰ATP水解或六聚体组装而损害LONP1的蛋白酶体功能。体外实验证实, 高频突变Arg721Gly导致LONP1六聚体解离常数(Kd)增加5倍, ATP酶活性下降80%, 说明该突变严重破坏了LONP1的结构稳定性与催化活性。电镜分析显示, 68%的CODAS患者线粒体出现肿胀, 且53%存在电子致密包涵体; 进一步通过免疫电镜可见, 线粒体编码蛋白细胞色素c氧化酶亚基2(cytochrome c oxidase subunit 2, COX2)在线粒体基质中异常聚集, 并伴随复合体IV活性下降约65%, 这些结果明确将LONP1功能障碍与线粒体内蛋白质稳态失衡、呼吸链缺陷及OXPHOS崩溃相联系, 从机制上阐释了能量代谢障碍可能是CODAS多系统表型的重要驱动因素<sup>[86-87]</sup>。目前已发现13种LONP1基因突变与CODAS综合征有关(图1, 表1), 但仍缺乏有效的治愈性医疗手段, 临床管理以缓解症状和提升生活质量为主要目标。

#### 3.1.2 LONP1与AD

AD是最常见的神经退行性疾病, 主要发生于

老年人群, 临床表现为进行性记忆减退和认知功能障碍<sup>[101]</sup>。研究表明,  $\beta$ 淀粉样蛋白42(amyloid- $\beta$  42, A $\beta$ 42)寡聚体是AD的重要病理标志物<sup>[102]</sup>。Co-IP实验证实, 在AD病理中, A $\beta$ 42寡聚体通过其疏水核心, 特异性地识别并结合LONP1六聚体AAA+结构域表面的一个变构调控口袋, 这与ATP结合位点相邻但并不完全重叠, 这种结合并非简单遮盖活性中心, 而是破坏了LONP1水解ATP所必需的各亚基间的协同构象变化。这一变化, 一方面直接抑制了LONP1的ATP酶活性, 切断了降解过程的能量来源, 另一方面, 它破坏了LONP1六聚体的稳定性, 导致其解离成无活性的单体或二聚体。由于LONP1失活, 其关键底物如超氧化物歧化酶2(superoxide dismutase 2, SOD2)无法被正常周转更新。受损的SOD2在线粒体基质中积累, 加剧氧化应激, 同时ATP合成产量下降40%, 最终严重的氧化损伤和能量衰竭导致突触退化和神经元死亡<sup>[103]</sup>。该研究不仅提示AD中线粒体功能障碍是关键分子机制之一, 更为开发以LONP1功能修复为核心的新型AD治疗策略提供了有力且可操作的依据。后续研究需在体内模型中进行实验, 验证此通路在AD发生发展过程中的病理贡献及靶向干预的有效性, 并探索LONP1活性/构象作为AD生物标志物的潜力。

#### 3.1.3 LONP1与PD

PD是发病率仅次于AD的神经退行性疾病, 其核心运动症状表现为运动迟缓、肌强直和静止性震颤三联征。尽管绝大多数PD病例为散发, 但约5%~10%的病例具有家族遗传性<sup>[104-105]</sup>, 其中DJ-1基因(protein DJ-1)突变是导致常染色体隐性遗传早发型PD的重要病因之一<sup>[106]</sup>。已报道的DJ-1致病突变包括: 纯合突变(如L10P、M26I、E64D、P158 $\Delta$ 、E163K、L166P、L172Q等)和杂合错义突变(如A39S、A104T、D149A)<sup>[52, 105, 107]</sup>, 这些突变

多数影响DJ-1蛋白的稳定性、二聚化能力及其抗氧化应激功能, 但其具体降解机制及与线粒体稳态的关联尚未完全明确。研究者利用DJ-1基因敲除小鼠胚胎成纤维细胞作为表达系统, 外源表达人源DJ-1野生型及16种错义突变体, 通过环己酰亚胺(cycloheximide, CHX)追踪实验发现: LONP1蛋白酶能够识别并降解其中7种构象不稳定或错误折叠/氧化的DJ-1突变体。进一步机制研究表明, 这些突变体因折叠缺陷在线粒体基质中发生聚集, 并与LONP1发生直接相互作用, 抑制LONP1活性, 导致突变体DJ-1积累并显著增强细胞毒性。在PD细胞模型中, LONP1功能缺失引起突变DJ-1在线粒体内异常滞留, 进而导致线粒体膜电位受损、ROS水平升高、复合体I活性下降, 最终引发多巴胺能神经元凋亡<sup>[108]</sup>。这项研究揭示了LONP1在MQC中的新角色, 尤其在于清除缺陷型DJ-1蛋白中的作用, 也提示通过增强LONP1活性或表达以促进毒性蛋白质聚集体的清除, 或可成为延缓PD进展的潜在治疗途径。

### 3.1.4 LONP1与TDP-43蛋白病

TDP-43蛋白是由414个氨基酸组成的RNA结合蛋白(RNA-binding protein, RBP), 由位于1号染色体上的TARDBP基因编码<sup>[109]</sup>。2006年的研究发现, 约97%的ALS和约45%的额颞叶痴呆/额颞叶变性(frontotemporal dementia/frontotemporal lobe degeneration, FTD/FTLD)患者脑组织中存在TDP-43阳性蛋白包涵体<sup>[110]</sup>, 提示TDP-43蛋白异常聚集可能是这类神经退行性疾病的共同分子病理基础。值得注意的是, 约57%的AD患者样本中也检测到TDP-43的异常沉积<sup>[111]</sup>。因此, 与TDP-43蛋白沉积相关的神经退行性疾病被统称为TDP-43蛋白病(TDP-43 proteinopathy)<sup>[112]</sup>。研究发现, 细胞质中的错误折叠蛋白可通过位于线粒体外膜的线粒体自噬受体FUN14结构域包含蛋白1(FUN14 domain containing 1, FUNDC1)以及分子伴侣HSC70(heat shock cognate 70, 组成型表达的细胞质HSP70)的共同作用下招募到线粒体上, 再经过线粒体转位酶TOM-TIM复合物进入线粒体, 由位于线粒体基质的LONP1降解<sup>[113]</sup>。本实验室关注TDP-43蛋白在细胞内的稳态, 通过透射电镜和免疫电镜分析发现, 在细胞模型、转基因果蝇模型和FTLD-TDP患者病理组织细胞中, TDP-43蛋白可在FUNDC1-HSC70-DNAJA2的介导下进入线粒体, 引起线粒体损伤, 并且与LONP1共定位, Co-

IP实验发现, TDP-43与LONP1发生相互作用, 且过表达LONP1后, 线粒体中的TDP-43水平降低, 利用纯化的蛋白质进行实验, 证明LONP1参与TDP-43蛋白的降解过程<sup>[114-115]</sup>。这说明LONP1参与缓解TDP-43毒性、修复线粒体损伤, 从而发挥神经保护作用, 提示调控LONP1活性治疗TDP-43蛋白病的可能性。

## 3.2 YME1L1与神经系统疾病

### 3.2.1 YME1L1与线粒体脑病

线粒体脑病(mitochondriopathy)是一类由线粒体功能缺陷导致的多系统障碍性疾病, 临床表现高度异质, 但通常显著累及能量代谢需求较高的神经与肌肉系统, 典型症状包括肌无力、共济失调和视神经萎缩<sup>[27]</sup>。OPA1被鉴定为常染色体显性遗传性视神经萎缩的致病基因, 其编码产物是一种定位在线粒体内膜的GTP酶, 不仅调控线粒体内膜融合过程, 还对嵴形态的构建与稳定具有核心作用<sup>[116]</sup>。后续研究进一步揭示, OPA1的功能受到高度精细的蛋白质水解调控: 位于内膜的ATP依赖蛋白酶YME1L1负责切割OPA1的S2位点, 从而维持长链(L-OPA1)与短链(S-OPA1)亚型的平衡, 这一过程对线粒体分裂-融合动力学和嵴结构的完整性至关重要<sup>[117]</sup>。2016年, 研究者通过WES发现4例携带YME1L1纯合错义突变(c.616C>T, p.Arg149Trp)的神经发育障碍患儿, 该突变位于YME1L1的NTD(图1, 表1), 导致其无法被线粒体加工肽酶(mitochondrial processing peptidase, MPP)正确剪切, 从而使YME1L1前体(~80 ku)加速降解, 无法生成成熟型的蛋白酶(~63 ku)。功能研究表明, 该突变引起OPA1蛋白的S2切割严重受损, 导致线粒体碎片化增加3倍、ATP合成效率下降55%<sup>[27]</sup>。虽然目前只发现一个YME1L1相关的疾病突变, 明确导致线粒体结构和功能缺陷, 且此突变并不位于其关键功能结构域, 提示发生在关键结构域内的突变可能因严重影响酶活性和功能而导致胚胎致死, 不过这一推测尚需通过进一步的实验加以验证。线粒体脑病的患儿主要表现出全面发育迟缓、智力障碍、视神经萎缩、感觉神经性耳聋、共济失调及脑白质病变等多系统异常, 符合“神经-视-听”综合征型的线粒体疾病谱<sup>[27]</sup>。这一发现不仅拓展了线粒体脑病的基因型-表型对应关系, 更突显了YME1L1在维持线粒体动态平衡及支持神经系统发育中的关键作用。

### 3.2.2 YME1L1与ASD

ASD是一种神经发育性疾病，其主要临床特征包括社会交往障碍、限制性重复行为模式以及狭窄的兴趣范围<sup>[118]</sup>。近年来，遗传学研究在揭示ASD的分子机制方面取得了显著进展。在一项针对116个ASD家系的基因组学研究中，研究人员通过整合全基因组/外显子组测序（whole-genome/exome sequencing, WGS/WES）和单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP）芯片技术，系统分析了罕见变异与ASD之间的关联。该研究识别出多个新的潜在风险基因，其中包括YME1L1。在一个多发家系（编号117）的先证者（个体117.3）中，一个YME1L1的新生错义变异c.1981G>A导致YME1L1蛋白第661位的谷氨酸（Glu）被替换为赖氨酸（Lys）。该变异位点位于YME1L1的肽酶结构域（图1，表1），且在进化上高度保守，且根据美国医学遗传学与基因组学学会（American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG）指南，该变异被归类为“可能致病”（likely pathogenic, LP）。该个体表现为早发性孤独症（ADOS-2评分9, CARS2-ST评分35.5），语言发育异常、轻度智力障碍（WPPSI-III：语言智商80，操作智商65，总智商66）以及局灶性癫痫<sup>[89]</sup>。此发现提示，YME1L1功能异常可能与神经发育障碍尤其是ASD的发病机制相关，为进一步研究其在下游信号通路及神经元发育中的功能提供了遗传学依据。

## 3.3 AFG3L2与神经系统疾病

### 3.3.1 AFG3L2与脊髓小脑共济失调

脊髓小脑共济失调（spinocerebellar ataxia, SCA）是一组罕见的常染色体显性遗传的进行性神经系统疾病，其核心病理改变主要集中于小脑浦肯野细胞、脑干及相关的运动传导通路，临床表现为典型的运动协调障碍综合征，包括构音障碍（发音含糊不清）、头部或躯干震颤、肌张力减退、步态异常（步基增宽）及辨距不良，部分患者还可出现头痛与易疲劳等非特异性症状<sup>[31]</sup>。在众多SCA亚型中，SCA28由位于18p11.22的AFG3L2基因杂合功能丧失性突变（loss-of-function mutations）引起，这些突变位点位于AFG3L2蛋白的MTS、N端结构域、AAA+结构域和肽酶结构域（图1，表1）<sup>[119-120]</sup>。近期研究发现，AFG3L2基因第14~16号外显子的杂合缺失可导致移码突变并提前引入终止密码子，致使编码的AFG3L2蛋白缺失关键的

AAA+结构域。此缺失突变通过无义介导的mRNA降解（nonsense-mediated mRNA decay, NMD）机制，导致AFG3L2蛋白表达量下降约50%，提示单倍剂量不足（haploinsufficiency）为其核心致病机制。在患者来源的成纤维细胞中，该突变导致显著的线粒体形态和功能异常，包括碎片化增多、嵴结构紊乱、复合物IV活性降低约40%及ATP合成减少35%。值得注意的是，此特定缺失区域（外显子14~16）使患者出现上睑下垂这一独特的临床表型，为基因型-表型关联提供了新依据<sup>[29, 121]</sup>。

与SCA28的单倍剂量不足机制不同，AFG3L2基因的纯合错义突变可引起一种更为严重且早发型神经退行性疾病，即痉挛性共济失调-神经病综合征5型（spastic ataxia-neuropathy syndrome 5, SPAX5）。该病于2011年在多个近亲家系中被首次报道，共鉴定出4种不同的纯合错义突变，代表性突变之一是位于AAA+结构域的c.1847A>G（p.Y616C）（图1，表1）<sup>[105]</sup>。这类突变导致AFG3L2蛋白功能近乎完全丧失，使其无法有效降解关键线粒体底物，如线粒体核糖体大亚基蛋白32（mitochondrial ribosomal protein large subunit 32, MRPL32），进而严重破坏呼吸链复合物I的组装与功能，引起ATP合成障碍、ROS大量积累及线粒体形态异常<sup>[122]</sup>。这些严重的分子病理改变解释了SPAX5常在婴儿或儿童期起病，并表现为痉挛性截瘫（spastic paraparesis）、小脑性共济失调（cerebellar ataxia）和轴索性感觉运动周围神经病（axonal sensorimotor peripheral neuropathy）等重型综合征。综上所述，AFG3L2突变通过不同遗传机制（单倍剂量不足与纯合突变导致功能丧失）和不同程度的线粒体功能障碍，导致从成人期发病、相对局限的SCA28表型，到婴幼儿期起病、多系统受累的严重SPAX5综合征。这一连续疾病谱突显了AFG3L2在线粒体蛋白质质量控制中的核心地位，并为理解遗传性共济失调的分子基础与临床异质性提供了关键视角。

### 3.3.2 AFG3L2与视神经萎缩

研究发现，与YME1L1相似，AFG3L2的功能缺失突变会特异性干扰线粒体融合蛋白OPA1的加工过程，导致L-OPA1减少，进而引起线粒体网络显著碎片化。然而，这种线粒体片段化在SCA28患者中并未观察到，提示AFG3L2突变导致视神经病变可能涉及不同于SCA28的致病机制。进一步深入分析发现，引起视神经萎缩12型（optic

atrophy 12, OPA12) 的致病突变显著富集于 AFG3L2 的 ATP 酶结构域 (图 1, 表 1)。这些突变通过破坏 ATP 结合、显著削弱 ATP 水解活性, 并最终损害 AFG3L2 与底物蛋白 OPA1 的相互作用能力<sup>[99]</sup>。这种特定结构域的功能损害模式, 可能是导致选择性视神经病理的关键因素, 而 OPA12 即是此类 AFG3L2 突变相关疾病的典型临床代表。该疾病由 *AFG3L2* 基因杂合显性突变引起, 患者主要表现为进行性、缓慢发展的双侧视力损害<sup>[42]</sup>。这些发现极大地拓展了我们对 AFG3L2 基因型-表型相关性的理解, 也为深入解析遗传性视神经退行性疾病发病机制提供了至关重要的线索。

### 3.3.3 AFG3L2与PD

PD 的病理表现主要为中脑黑质致密部多巴胺能 (dopamine, DA) 神经元的进行性丢失, 以及神经元胞质内出现由  $\alpha$  突触核蛋白 ( $\alpha$ -synuclein) 异常聚集形成的路易小体 (Lewy bodies)<sup>[105]</sup>。近年研究进一步揭示,  $\alpha$  突触核蛋白的异常聚集不仅是 PD 的核心病理标志, 更与线粒体功能障碍密切相关, 二者共同推动疾病进展。在这一机制中, PINK1 激酶作为 MQC 的核心分子, 于胞质中合成后转位至线粒体, 启动线粒体自噬过程。尤其值得注意的是, PINK1 能够直接与  $\alpha$ -synuclein 发生相互作用, 提示该相互作用可能在耦联线粒体功能障碍与蛋白质聚集病理之间发挥桥梁作用<sup>[123]</sup>。另一方面, 线粒体 AAA+蛋白酶 AFG3L2 作为维持线粒体稳态的关键因子, 通过酶切生成约 52 ku 的功能片段并定位于线粒体膜间隙, 参与调控 PINK1 的加工与成熟, 进而影响线粒体自噬通路<sup>[124]</sup>。2014 年的报道显示, 一例携带 *AFG3L2* 基因外显子 15 移码突变 (c.1958dupT) 的患者, 表现出轻度帕金森样症状 (bradykinesia), 并伴有认知功能下降、小脑共济失调和多发性神经病<sup>[125]</sup>, 表明 *AFG3L2* 基因突变与神经退行性疾病的临床关联性。综上所述, 尽管 AFG3L2 在 PD 中确切作用机制的细节仍需深入解析, 但现有证据提示: *AFG3L2* 基因突变或功能异常, 通过干扰线粒体蛋白稳态、破坏线粒体结构和功能完整性、并可能影响 PINK1 介导的线粒体自噬通路, 最终参与 PD 及其他相关神经退行性疾病的发生。

### 3.4 疾病突变主要富集于线粒体AAA+蛋白酶的关键功能结构域

通过对目前已报道的疾病相关突变位点进行汇总分析 (图 1, 表 1) 发现: 这些突变并非随机分

布, 而是显著富集于其 AAA+结构域和水解酶或肽酶结构域。有些关键功能结构域的突变直接破坏了 ATP 水解、底物识别或蛋白水解活性, 从而导致 MQC 的核心功能受损。而另一些突变可能导致 AAA+蛋白酶在转录、翻译以及翻译后等多个水平的调控异常, 从而影响其在线粒体中的丰度。我们认为, 这一现象的深层原因远不止于此, 它提示线粒体作为一个复杂网络的脆弱性, 其稳态依赖于多种 AAA+蛋白酶在其各分区中的精密协作。一旦这些关键蛋白酶的功能发生局部失衡, 即可通过 mtDNA 不稳定、呼吸链功能障碍、线粒体动力学紊乱等多重机制, 引发广泛的神经元功能紊乱和/或退行性变。此外, 突变位点的异质性与疾病临床表现的多样性, 进一步反映了线粒体 AAA+蛋白酶功能在不同细胞类型、各个发育阶段及多样遗传背景下的复杂调控。

## 4 总结与展望

本文系统回顾了 3 种关键线粒体 AAA+蛋白酶, LONP1、YME1L1 和 AFG3L2 的多方面作用。现有研究表明, 这 3 种线粒体 AAA+蛋白酶在氨基酸序列和结构上有较大的相似性, 在功能上既存在重叠 (如都参与降解错误折叠蛋白), 又具有鲜明的特异性 (如亚细胞定位、底物选择性和疾病表型等)。

然而, 目前大多数研究仍集中于单个蛋白酶的功能分析或与其特定疾病关联的探讨, 对于它们如何作为协同网络 (collaborative network) 共同维持线粒体稳态, 以及在病理生理状态下其功能如何被精确调控以实现互补与特异, 仍缺乏系统性的理解。基于这些发现, 本文尝试提出一个“冗余-特异”平衡框架来整合现有知识。该框架认为, MQC 网络的稳健性 (robustness) 源于功能冗余与特异性之间的精密平衡。在稳态条件下, 各蛋白酶分工明确; 应激状态下, 功能重叠允许一定的代偿; 而一旦特定功能失活, 则可能导致无法代偿的病理后果。例如 LONP1 突变引起 CODAS 综合征<sup>[86]</sup>, YME1L1 纯合突变导致视神经萎缩-智力障碍综合征<sup>[27]</sup>, AFG3L2 突变则因其异质性可分别引起 SCA28、SPAX5 及 OPA12 等疾病<sup>[38, 94, 125-126]</sup>。

基于这一“冗余-特异”平衡框架, 未来研究可从以下几个方向重点展开: 首先, 进一步理解 AAA+蛋白酶对底物识别的特异性和重叠性, 这本质上是由蛋白酶与底物的相互作用决定的。借助原

位冷冻电镜 (cryo-electron tomography, Cryo-ET) 以及超分辨结构光显微镜等跨尺度成像技术, 在近生理环境下观察这些 AAA+蛋白酶的超分子组装、构象动态及底物处理过程, 将有助于在原子水平上揭示“识别密码”, 为基于结构的药物设计提供理论基础。其次, 开发和运用化学生物学工具为精准治疗策略提供依据。现有的工具包括2-氰基-3,12-二氧代齐墩果酸CDDO (2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oic acid) 等抑制剂<sup>[127]</sup>, 以及青蒿素类药物, 如双氢青蒿素 (dihydroartemisinin, DHA) 和青蒿琥酯 (artesunate, ART)<sup>[128]</sup>, 这些工具为特异性调控LONP1提供了分子探针。我们亟需进一步拓展靶向YME1L1或AFG3L2的高选择性调节剂。通过在细胞和动物模型中精确操纵单一蛋白酶活性, 有望揭示MQC网络的应答机制。特别是有无其他因子共同参与调控其功能? 它们是否发生功能代偿? 代偿的效率与边界如何? 此外, 未来研究需进一步阐明这些AAA+蛋白酶在转录调控、翻译后修饰及蛋白相互作用网络中的精细调控机制。例如, 不同细胞类型、神经系统不同发育阶段以及疾病的不同发展阶段中, 这3种蛋白酶的表达谱和活性变化规律如何? 是否存在特异性调控这些蛋白酶活性的上游信号分子? 鉴定这些上游信号及其传导机制, 不仅能够推动从“静态平衡”的理解迈向“动态调控”的预测, 也将为研发干预疾病的药物提供新的潜在靶点。

附件 见本文网络版 (<http://www.pibb.ac.cn>, <http://www.cnki.net> ) :

PIBB\_20250363\_Figure\_S1.pdf

## 参 考 文 献

- [1] Tábara L C, Segawa M, Prudent J. Molecular mechanisms of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2025, **26**(2): 123-146
- [2] Yang X, Zhang R, Nakahira K, *et al*. Mitochondrial DNA mutation, diseases, and nutrient-regulated mitophagy. *Annu Rev Nutr*, 2019, **39**: 201-226
- [3] Morgenstern M, Peikert C D, Lübbert P, *et al*. Quantitative high-confidence human mitochondrial proteome and its dynamics in cellular context. *Cell Metab*, 2021, **33**(12): 2464-2483.e18
- [4] Endo T, Wiedemann N. Molecular machineries and pathways of mitochondrial protein transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2025. DOI: 10.1038/s41580-025-00865-w
- [5] Cilleros-Holgado P, Gómez-Fernández D, Piñero-Pérez R, *et al*. Mitochondrial quality control via mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) in ageing and neurodegenerative diseases. *Biomolecules*, 2023, **13**(12): 1789
- [6] Quirós P M, Langer T, López-Otín C. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, **16**(6): 345-359
- [7] Eldeeb M A, Thomas R A, Ragheb M A, *et al*. Mitochondrial quality control in health and in Parkinson's disease. *Physiol Rev*, 2022, **102**(4): 1721-1755
- [8] Ruan L, Wang Y, Zhang X, *et al*. Mitochondria-associated proteostasis. *Annu Rev Biophys*, 2020, **49**: 41-67
- [9] Hanson P I, Whiteheart S W. AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**(7): 519-529
- [10] Zhang S, Mao Y. AAA+ ATPases in protein degradation: structures, functions and mechanisms. *Biomolecules*, 2020, **10**(4): 629
- [11] Sauer R T, Baker T A. AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annu Rev Biochem*, 2011, **80**: 587-612
- [12] Deshwal S, Fiedler K U, Langer T. Mitochondrial proteases: multifaceted regulators of mitochondrial plasticity. *Annu Rev Biochem*, 2020, **89**: 501-528
- [13] Zhang J, Qiao W, Luo Y. Mitochondrial quality control proteases and their modulation for cancer therapy. *Med Res Rev*, 2023, **43**(2): 399-436
- [14] Iyer L M, Leipe D D, Koonin E V, *et al*. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol*, 2004, **146**(1/2): 11-31
- [15] Neuwald A F, Aravind L, Spouge J L, *et al*. AAA+: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*, 1999, **9**(1): 27-43
- [16] Bohnert M, Gatsogiannis C, Herrmann J M. The ATP-driven extractor ATAD1/Msp1 proof-reads protein translocation into mitochondria. *Trends Cell Biol*, 2024, **34**(9): 698-699
- [17] Kim J, Goldstein M, Zecchel L, *et al*. ATAD1 prevents clogging of TOM and damage caused by un-imported mitochondrial proteins. *Cell Rep*, 2024, **43**(8): 114473
- [18] Yan H H, He J J, Fu C, *et al*. ATAD1 regulates neuronal development and synapse formation through tuning mitochondrial function. *Int J Mol Sci*, 2024, **26**(1): 44
- [19] Yamada T, Ikeda A, Murata D, *et al*. Dual regulation of mitochondrial fusion by Parkin-PINK1 and OMA1. *Nature*, 2025, **639**(8055): 776-783
- [20] Zhu W D, Rao J, Zhang L H, *et al*. OMA1 competitively binds to HSPA9 to promote mitophagy and activate the cGAS-STING pathway to mediate GBM immune escape. *J Immunother Cancer*, 2024, **12**(4): e008718
- [21] Guo C, Xiao Y, Gu J, *et al*. ClpP/ClpX deficiency impairs mitochondrial functions and mTORC1 signaling during spermatogenesis. *Commun Biol*, 2023, **6**(1): 1012
- [22] Leeten K, Jacques N, Esquembre L A, *et al*. Ticagrelor alters the membrane of *Staphylococcus aureus* and enhances the activity of vancomycin and daptomycin without eliciting cross-resistance.

- mBio, 2024, **15**(10): e0132224
- [23] Bota D A, Davies K J A. Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat Cell Biol*, 2002, **4**(9): 674-680
- [24] He Y, Ding Q, Chen W, et al. LONP1 downregulation with ageing contributes to osteoarthritis via mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med*, 2022, **191**: 176-190
- [25] Lee Y G, Kim H W, Nam Y, et al. LONP1 and ClpP cooperatively regulate mitochondrial proteostasis for cancer cell survival. *Oncogenesis*, 2021, **10**(2): 18
- [26] Coppola M, Pizzigoni A, Banfi S, et al. Identification and characterization of *YME1L1* a novel paraplegin-related gene. *Genomics*, 2000, **66**(1): 48-54
- [27] Hartmann B, Wai T, Hu H, et al. Homozygous *YME1L1* mutation causes mitochondrialopathy with optic atrophy and mitochondrial network fragmentation. *Elife*, 2016, **5**: e16078
- [28] Puchades C, Rampello A J, Shin M, et al. Structure of the mitochondrial inner membrane AAA+ protease YME1 gives insight into substrate processing. *Science*, 2017, **358**(6363): eaao0464
- [29] Cagnoli C, Stevanin G, Brussino A, et al. Missense mutations in the AFG3L2 proteolytic domain account for ~1.5% of European autosomal dominant cerebellar ataxias. *Hum Mutat*, 2010, **31**(10): 1117-1124
- [30] Ghosh Dastidar R, Banerjee S, Lal P B, et al. Multifaceted roles of AFG3L2, a mitochondrial ATPase in relation to neurological disorders. *Mol Neurobiol*, 2024, **61**(7): 3788-3808
- [31] Löbbecke A M, Kang J S, Hilker R, et al. A novel missense mutation in AFG3L2 associated with late onset and slow progression of spinocerebellar ataxia type 28. *J Mol Neurosci*, 2014, **52**(4): 493-496
- [32] Chung C H, Goldberg A L. The product of the lon (capR) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(8): 4931-4935
- [33] Gibellini L, De Gaetano A, Mandrioli M, et al. The biology of Lonp1: more than a mitochondrial protease. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2020, **354**: 1-61
- [34] Shin M, Watson E R, Song A S, et al. Structures of the human LONP1 protease reveal regulatory steps involved in protease activation. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 3239
- [35] Lu B, Lee J, Nie X, et al. Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA+ Lon protease. *Mol Cell*, 2013, **49**(1): 121-132
- [36] Puchades C, Sandate C R, Lander G C. The molecular principles governing the activity and functional diversity of AAA+ proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, **21**(1): 43-58
- [37] Levytskyy R M, Bohovych I, Khalimonchuk O. Metalloproteases of the inner mitochondrial membrane. *Biochemistry*, 2017, **56**(36): 4737-4746
- [38] Puchades C, Ding B, Song A, et al. Unique structural features of the mitochondrial AAA+ protease AFG3L2 reveal the molecular basis for activity in health and disease. *Mol Cell*, 2019, **75**(5): 1073-1085.e6
- [39] Pinti M, Gibellini L, Liu Y, et al. Mitochondrial Lon protease at the crossroads of oxidative stress, ageing and cancer. *Cell Mol Life Sci*, 2015, **72**(24): 4807-4824
- [40] Zhu D, Cao W, Li J, et al. Correction of preferred orientation-induced distortion in cryo-electron microscopy maps. *Sci Adv*, 2024, **10**(30): eadn0092
- [41] Shi H, Rampello A J, Glynn S E. Engineered AAA+ proteases reveal principles of proteolysis at the mitochondrial inner membrane. *Nat Commun*, 2016, **7**: 13301
- [42] Caporali L, Magri S, Legati A, et al. ATPase domain AFG3L2 mutations alter OPA1 processing and cause optic neuropathy. *Ann Neurol*, 2020, **88**(1): 18-32
- [43] Lysyk L, Brassard R, Touret N, et al. PARDL protease: a glimpse at intramembrane proteolysis in the inner mitochondrial membrane. *J Mol Biol*, 2020, **432**(18): 5052-5062
- [44] Khan Y A, White K I, Brunger A T. The AAA+ superfamily: a review of the structural and mechanistic principles of these molecular machines. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2022, **57**(2): 156-187
- [45] Ng M Y W, Wai T, Simonsen A. Quality control of the mitochondrion. *Dev Cell*, 2021, **56**(7): 881-905
- [46] Morgenstern M, Stiller S B, Lübbert P, et al. Definition of a high-confidence mitochondrial proteome at quantitative scale. *Cell Rep*, 2017, **19**(13): 2836-2852
- [47] Pagliarini D J, Calvo S E, Chang B, et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 2008, **134**(1): 112-123
- [48] Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, et al. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(23): 13207-13212
- [49] Vögtle F N, Burkhardt J M, Gonczarowska-Jorge H, et al. Landscape of submitochondrial protein distribution. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 290
- [50] Shpilka T, Haynes C M. The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, **19**(2): 109-120
- [51] Andréasson C, Ott M, Büttner S. Mitochondria orchestrate proteostatic and metabolic stress responses. *EMBO Rep*, 2019, **20**(10): e47865
- [52] Topf U, Wrobel L, Chacinska A. Chatty mitochondria: keeping balance in cellular protein homeostasis. *Trends Cell Biol*, 2016, **26**(8): 577-586
- [53] 冯佳佳, 郭蒙, 欧阳铮, 等. 线粒体质量控制在糖脂代谢和代谢性疾病中的作用. *生物化学与生物物理进展*, 2025, **52**(7): 1673-1686
- Feng J J, Guo M, Ouyang Z, et al. *Prog Biochem Biophys*, 2025, **52**(7): 1673-1686
- [54] Kao T Y, Chiu Y C, Fang W C, et al. Mitochondrial Lon regulates apoptosis through the association with Hsp60-mtHsp70 complex. *Cell Death Dis*, 2015, **6**(2): e1642
- [55] Li Y, Huang D, Jia L, et al. LonP1 links mitochondria-ER

- interaction to regulate heart function. *Research (Wash D C)*, 2023, **6**: 0175
- [56] Chen S H, Suzuki C K, Wu S H. Thermodynamic characterization of specific interactions between the human Lon protease and G-quartet DNA. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(4): 1273-1287
- [57] Matsushima Y, Goto Y I, Kaguni L S. Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(43): 18410-18415
- [58] Fukuda R, Zhang H, Kim J W, *et al*. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*, 2007, **129**(1): 111-122
- [59] Sepuri N B V, Angireddy R, Srinivasan S, *et al*. Mitochondrial LON protease-dependent degradation of cytochrome c oxidase subunits under hypoxia and myocardial ischemia. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2017, **1858**(7): 519-528
- [60] Wright J N, Benavides G A, Johnson M S, *et al*. Acute increases in O-GlcNAc indirectly impair mitochondrial bioenergetics through dysregulation of LonP1-mediated mitochondrial protein complex turnover. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, **316**(6): C862-C875
- [61] Gibellini L, Borella R, De Gaetano A, *et al*. Evidence for mitochondrial Lonp1 expression in the nucleus. *Sci Rep*, 2022, **12**(1): 10877
- [62] Mishra P, Carelli V, Manfredi G, *et al*. Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab*, 2014, **19**(4): 630-641
- [63] Stiburek L, Cesnekova J, Kostkova O, *et al*. YME1L controls the accumulation of respiratory chain subunits and is required for apoptotic resistance, cristae morphogenesis, and cell proliferation. *Mol Biol Cell*, 2012, **23**(6): 1010-1023
- [64] Wai T, García-Prieto J, Baker M J, *et al*. Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. *Science*, 2015, **350**(6265): aad0116
- [65] Elanchelian P, Maruszczak K K, Serwa R A, *et al*. OCIAD1 and prohibitins regulate the stability of the TIM23 protein translocase. *Cell Rep*, 2024, **43**(12): 115038
- [66] Melber A, Haynes C M. UPR(mt) regulation and output: a stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication. *Cell Res*, 2018, **28**(3): 281-295
- [67] Pickles S, Vigié P, Youle R J. Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Curr Biol*, 2018, **28**(4): R170-R185
- [68] Opalińska M, Jańska H. AAA proteases: guardians of mitochondrial function and homeostasis. *Cells*, 2018, **7**(10): 163
- [69] Li Y, Park J S, Deng J H, *et al*. Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *J Bioenerg Biomembr*, 2006, **38**(5/6): 283-291
- [70] Richter U, Ng K Y, Suomi F, *et al*. Mitochondrial stress response triggered by defects in protein synthesis quality control. *Life Sci Alliance*, 2019, **2**(1): e201800219
- [71] Ito M. The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nat Rev Neurosci*, 2002, **3**(11): 896-902
- [72] Maltecca F, De Stefani D, Cassina L, *et al*. Respiratory dysfunction by AFG3L2 deficiency causes decreased mitochondrial calcium uptake *via* organellar network fragmentation. *Hum Mol Genet*, 2012, **21**(17): 3858-3870
- [73] Ng K Y, Richter U, Jackson C B, *et al*. Translation of MT-ATP6 pathogenic variants reveals distinct regulatory consequences from the co-translational quality control of mitochondrial protein synthesis. *Hum Mol Genet*, 2022, **31**(8): 1230-1241
- [74] Scarpulla R C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*, 2011, **1813**(7): 1269-1278
- [75] Kunová N, Ondrovičová G, Bauer J A, *et al*. Polyphosphate and tyrosine phosphorylation in the N-terminal domain of the human mitochondrial Lon protease disrupts its functions. *Sci Rep*, 2024, **14**(1): 9923
- [76] Zhao Q, Wang J, Levichkin I V, *et al*. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J*, 2002, **21**(17): 4411-4419
- [77] Hu S, Feng J, Wang M, *et al*. Nrf1 is an indispensable redox-determining factor for mitochondrial homeostasis by integrating multi-hierarchical regulatory networks. *Redox Biol*, 2022, **57**: 102470
- [78] Zhao T, Alder N N, Starkweather A R, *et al*. Associations of mitochondrial function, stress, and neurodevelopmental outcomes in early life: a systematic review. *Dev Neurosci*, 2022, **44**(6): 438-454
- [79] Wilson D M, Cookson M R, Van Den Bosch L, *et al*. Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell*, 2023, **186**(4): 693-714
- [80] Cyrino L A R, Delwing-de Lima D, Ullmann O M, *et al*. Concepts of neuroinflammation and their relationship with impaired mitochondrial functions in bipolar disorder. *Front Behav Neurosci*, 2021, **15**: 609487
- [81] Cheng X T, Huang N, Sheng Z H. Programming axonal mitochondrial maintenance and bioenergetics in neurodegeneration and regeneration. *Neuron*, 2022, **110**(12): 1899-1923
- [82] Bratic A, Larsson N G. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest*, 2013, **123**(3): 951-957
- [83] Zhang G, Wang X, Li C, *et al*. Integrated stress response couples mitochondrial protein translation with oxidative stress control. *Circulation*, 2021, **144**(18): 1500-1515
- [84] Khan A O, AlBakri A. Clinical features of LONP1-related infantile cataract. *JAAPOS*, 2018, **22**(3): 229-231
- [85] Inui T, Mai A, Takezawa Y, *et al*. A novel mutation in the proteolytic domain of LONP1 causes atypical CODAS syndrome. *J Hum Genet*, 2017, **62**(6): 653-655
- [86] Dikoglu E, Alfaiz A, Gorna M, *et al*. Mutations in LONP1, a mitochondrial matrix protease, cause CODAS syndrome. *Am J Med Genet A*, 2015, **167**(7): 1501-1509
- [87] Strauss K A, Jinks R N, Puffenberger E G, *et al*. CODAS syndrome is associated with mutations of LONP1, encoding mitochondrial

- AAA+Lon protease. *Am J Hum Genet*, 2015, **96**(1): 121-135
- [88] Griparic L, Kanazawa T, van der Bliek A M. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol*, 2007, **178**(5): 757-764
- [89] Viggiano M, Ceroni F, Visconti P, et al. Genomic analysis of 116 autism families strengthens known risk genes and highlights promising candidates. *NPJ Genom Med*, 2024, **9**(1): 21
- [90] Chiang H L, Fuh J L, Tsai Y S, et al. Expanding the phenotype of AFG3L2 mutations: late-onset autosomal recessive spinocerebellar ataxia. *J Neurol Sci*, 2021, **428**: 117600
- [91] Charif M, Roubertie A, Salime S, et al. A novel mutation of AFG3L2 might cause dominant optic atrophy in patients with mild intellectual disability. *Front Genet*, 2015, **6**: 311
- [92] Li H, Ma Q, Xue Y, et al. Compound heterozygous mutation of AFG3L2 causes autosomal recessive spinocerebellar ataxia through mitochondrial impairment and MICU1 mediated Ca(2+) overload. *Sci China Life Sci*, 2025, **68**(2): 484-501
- [93] Cagnoli C, Mariotti C, Taroni F, et al. SCA28, a novel form of autosomal dominant cerebellar ataxia on chromosome 18p11.22-Q11.2. *Brain*, 2006, **129**(Pt 1): 235-242
- [94] Svenstrup K, Nielsen T T, Aidt F, et al. SCA28: novel mutation in the AFG3L2 proteolytic domain causes a mild cerebellar syndrome with selective type-1 muscle fiber atrophy. *Cerebellum*, 2017, **16**(1): 62-67
- [95] Szpisják L, Nemeth V L, Szepfalusi N, et al. Neurocognitive characterization of an SCA28 family caused by a novel AFG3L2 gene mutation. *Cerebellum*, 2017, **16**(5/6): 979-985
- [96] Edener U, Wöllner J, Hehr U, et al. Early onset and slow progression of SCA28, a rare dominant ataxia in a large four-generation family with a novel AFG3L2 mutation. *Eur J Hum Genet*, 2010, **18**(8): 965-968
- [97] Reyes N G D, Sepúlveda Soto M C, Munhoz R P. Spasmodic dysphonia in a patient with spinocerebellar ataxia associated with a rare AFG3L2 variant (ATX-AFG3L2). *Mov Disord Clin Pract*, 2023, **10**(6): 1024-1026
- [98] Yang L, Jin X, Li Y, et al. A novel mutation located in the intermembrane space domain of AFG3L2 causes dominant optic atrophy through decreasing the stability of the encoded protein. *Cell Death Discov*, 2022, **8**(1): 361
- [99] Baderna V, Schultz J, Kearns L S, et al. A novel AFG3L2 mutation close to AAA domain leads to aberrant OMA1 and OPA1 processing in a family with optic atrophy. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, **8**(1): 93
- [100] Shebib S M, Reed M H, Shuckett E P, et al. Newly recognized syndrome of cerebral, ocular, dental, auricular, skeletal anomalies: CODAS syndrome—a case report. *Am J Med Genet*, 1991, **40**(1): 88-93
- [101] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease. *Lancet*, 2021, **397**(10284): 1577-1590
- [102] Economou N J, Giannonna M J, Do T D, et al. Amyloid  $\beta$ -protein assembly and Alzheimer's disease: dodecamers of A $\beta$ 42, but not of A $\beta$ 40, seed fibril formation. *J Am Chem Soc*, 2016, **138**(6): 1772-1775
- [103] Wang W, Ma X, Bhatta S, et al. Intraneuronal  $\beta$ -amyloid impaired mitochondrial proteostasis through the impact on LONP1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, **120**(51): e2316823120
- [104] Hernandez D G, Reed X, Singleton A B. Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. *J Neurochem*, 2016, **139**(Suppl 1): 59-74
- [105] Pierson T M, Adams D, Bonn F, et al. Whole-exome sequencing identifies homozygous AFG3L2 mutations in a spastic ataxia-neuropathy syndrome linked to mitochondrial m-AAA proteases. *PLoS Genet*, 2011, **7**(10): e1002325
- [106] Bonifati V, Rizzu P, van Baren M J, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset Parkinsonism. *Science*, 2003, **299**(5604): 256-259
- [107] Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, et al. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the *SNCA* *PARK2* *PINK1* *PARK7* and *LRRK2* genes: a mutation update. *Hum Mutat*, 2010, **31**(7): 763-780
- [108] Sánchez-Lanzas R, Castaño J G. Mitochondrial LonP1 protease is implicated in the degradation of unstable Parkinson's disease-associated DJ-1/PARK 7 missense mutants. *Sci Rep*, 2021, **11**(1): 7320
- [109] Feldman E L, Goutman S A, Petri S, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 2022, **400**(10360): 1363-1380
- [110] Liachko N F, McMillan P J, Guthrie C R, et al. CDC7 inhibition blocks pathological TDP-43 phosphorylation and neurodegeneration. *Ann Neurol*, 2013, **74**(1): 39-52
- [111] Meneses A, Koga S, O'Leary J, et al. TDP-43 pathology in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, 2021, **16**(1): 84
- [112] Kwong L K, Neumann M, Sampathu D M, et al. TDP-43 proteinopathy: the neuropathology underlying major forms of sporadic and familial frontotemporal lobar degeneration and motor neuron disease. *Acta Neuropathol*, 2007, **114**(1): 63-70
- [113] Li Y, Xue Y, Xu X, et al. A mitochondrial FUNDC1/HSC70 interaction organizes the proteostatic stress response at the risk of cell morbidity. *EMBO J*, 2019, **38**(3): e98786
- [114] Ma J, Liu L, Song L, et al. Integration of FUNDC1-associated mitochondrial protein import and mitochondrial quality control contributes to TDP-43 degradation. *Cell Death Dis*, 2023, **14**(11): 735
- [115] Wang P, Deng J, Dong J, et al. TDP-43 induces mitochondrial damage and activates the mitochondrial unfolded protein response. *PLoS Genet*, 2019, **15**(5): e1007947
- [116] Delettre C, Lenaers G, Griffoin J M, et al. Nuclear gene *OPA1* encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet*, 2000, **26**(2): 207-210
- [117] Rainey R N, Glavin J D, Chen H W, et al. A new function in translocation for the mitochondrial i-AAA protease Yme1: import of polynucleotide phosphorylase into the intermembrane space. *Mol Cell Biol*, 2006, **26**(22): 8488-8497
- [118] Lord C, Brugha T S, Charman T, et al. Autism spectrum disorder. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, **6**: 5

- [119] Banfi S, Bassi M T, Andolfi G, *et al.* Identification and characterization of *AFG3L2* a novel paraplegin-related gene. *Genomics*, 1999, **59**(1): 51-58
- [120] Nasir J, Frima N, Pickard B, *et al.* Unbalanced whole arm translocation resulting in loss of 18p in dystonia. *Mov Disord*, 2006, **21**(6): 859-863
- [121] Smets K, Deconinck T, Baets J, *et al.* Partial deletion of *AFG3L2* causing spinocerebellar ataxia type 28. *Neurology*, 2014, **82**(23): 2092-2100
- [122] Franchino C A, Brughera M, Baderna V, *et al.* Sustained OMA1-mediated integrated stress response is beneficial for spastic ataxia type 5. *Brain*, 2024, **147**(3): 1043-1056
- [123] Rugarli E I, Langer T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO J*, 2012, **31**(6): 1336-1349
- [124] Liu J, Wang X, Lu Y, *et al.* Pink1 interacts with  $\alpha$ -synuclein and abrogates  $\alpha$ -synuclein-induced neurotoxicity by activating autophagy. *Cell Death Dis*, 2017, **8**(9): e3056
- [125] Musova Z, Kaiserova M, Kriegova E, *et al.* A novel frameshift mutation in the *AFG3L2* gene in a patient with spinocerebellar ataxia. *Cerebellum*, 2014, **13**(3): 331-337
- [126] Oeztuerk M, Herebian D, Dipali K, *et al.* Multi-omics-based phenotyping of *AFG3L2*-mutant lymphoblasts determines key factors of a pathophysiological interplay between mitochondrial vulnerability and neurodegeneration in spastic ataxia type 5. *Front Mol Neurosci*, 2025, **18**: 1548255
- [127] Lee J, Pandey A K, Venkatesh S, *et al.* Inhibition of mitochondrial LonP1 protease by allosteric blockade of ATP binding and hydrolysis *via* CDDO and its derivatives. *J Biol Chem*, 2022, **298**(3): 101719
- [128] Liu Y, Jiang J J, Du S Y, *et al.* Artemisinins ameliorate polycystic ovarian syndrome by mediating LONP1-CYP11A1 interaction. *Science*, 2024, **384**(6701): eadk5382

## Structure and Function of Mitochondrial AAA+ Proteases and Their Roles in Neurological Disorders\*

LI Ru-Ru<sup>1,2)</sup>, ZHANG Ye<sup>3,4)</sup>, WEI Tao-Tao<sup>1,3,4)\*\*</sup>, ZHU Li<sup>1,2,4)\*\*</sup>

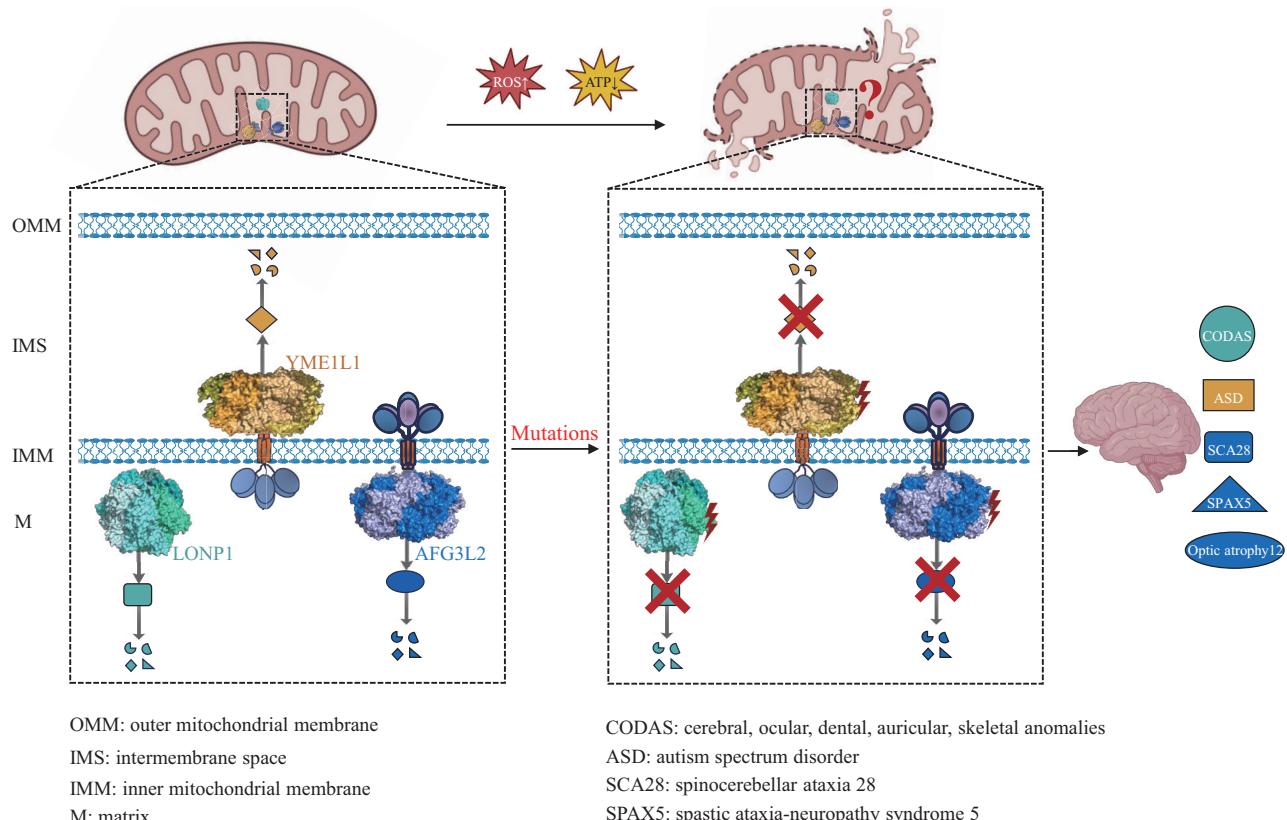
(<sup>1</sup>School of Basic Medical Sciences, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Cognitive Science and Mental Health, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

<sup>3</sup>State Key Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

<sup>4</sup>College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

### Graphical abstract



**Abstract** Mitochondria are the most crucial energy-generating organelles in eukaryotic cells and serve as signaling hubs that orchestrate metabolism, redox balance, cell-fate decision and multiple forms of cell death. Mitochondria possess their own DNA (mtDNA), which is independent of the nuclear genome, yet encodes only

\* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (32271200).

\*\* Corresponding author.

WEI Tao-Tao. Tel: 86-10-64888566, E-mail: weitt@ibp.ac.cn

ZHU Li. Tel: 86-10-64888303, E-mail: zhuli@ibp.ac.cn

Received: August 3, 2025 Accepted: September 15, 2025

13 polypeptides, 22 tRNAs, and 2 rRNAs. The remaining  $>1$  150 mitochondrial proteins are encoded by nuclear genes (nDNA), and the two genomes cooperate to preserve cellular homeostasis and proper function. Mitochondrial proteins are localized to the outer mitochondrial membrane (OMM), intermembrane space (IMS), inner mitochondrial membrane (IMM) or matrix, participating in oxidative phosphorylation (OXPHOS), the tricarboxylic acid (TCA) cycle, fission-fusion dynamics, and other processes indispensable for mitochondrial integrity. Mitochondrial quality control (MQC) is exerted largely by mitochondrial proteases, which selectively modulate protein activity and degrade misfolded or superfluous proteins. Among them, a group of mitochondrial ATPases associated with diverse cellular activities (AAA+ proteases) couple ATP binding and hydrolysis to protein unfolding and proteolysis, thereby regulating fusion protein maturation, respiratory-chain assembly, and mtDNA replication/transcription. Mutations or aberrant expression of these mitochondrial AAA+ proteases cripple mitochondrial architecture and function, precipitating a spectrum of severe neurological disorders. This review summarizes current knowledge on three paradigmatic mitochondrial AAA+ proteases, LONP1, YME1L1, and AFG3L2. We highlight their conserved Walker A/B motifs in the ATPase domain and hexameric architecture, yet emphasize divergent sub-mitochondrial topologies: LONP1 is soluble in the matrix, whereas YME1L1 and AFG3L2 are embedded in the IMM with catalytic domains facing IMS and matrix, respectively. These positional differences translate into distinct substrates and proteolytic strategies, enabling a division of labor and mutual complementation that cooperatively safeguards mitochondrial proteostasis. Pathogenic mutations linked to neurological disorders are mapped predominantly to the ATPase and the hydrolase/peptidase domains. Substitutions of the amino acid within these core domains can directly abolish ATP hydrolysis, substrate engagement or peptide cleavage, thereby crippling local MQC networks. Additional variants may disturb transcriptional, translational or post-translational regulation, altering protease stoichiometry and impairing compartmental balance. The subsequent cascade, mtDNA instability, respiratory-chain dysfunction, and aberrant mitochondrial dynamics, propagates stress signals that culminate in neuronal dysfunction and/or neurodegeneration. The mutational and clinical heterogeneity observed across cell types, developmental stages, and genetic backgrounds underscores the context-dependent fine-tuning of these AAA+ proteases. Deciphering how disease-associated variants rewire domain structure, catalytic cycle, and network-level crosstalk will therefore illuminate pathophysiologic mechanisms and guide precision therapeutic strategies.

**Key words** mitochondrial AAA+ proteases, neurological disorders, LONP1, YME1L1, AFG3L2

**DOI:** 10.3724/j.pibb.2025.0363

**CSTR:** 32369.14.pibb.20250363