

帕金森病相关蛋白 Parkin 与 PINK1 的相互作用研究 *

王雪晶 郭纪锋 江 泓 沈 璐 唐北沙 **

(中南大学湘雅医院神经内科, 长沙 410008)

摘要 帕金森病(Parkinson's disease, PD)是常见的神经系统变性疾病. 分子遗传学研究发现, 突变的 Parkin 蛋白及 PINK1 蛋白均参与了帕金森病的致病过程, 但二者之间是否存在相互作用以及是否能够相互调节仍不清楚. 为明确生理状态下 Parkin 蛋白与 PINK1 蛋白之间的相互作用, 首先运用蛋白体外结合实验(GST pull-down)技术及免疫共沉淀技术证实了 Parkin 与 PINK1 在体外及体内均可相互结合. 进一步构建 PINK1 的不同截短型, 运用 GST pull-down 技术验证了 PINK1 与 Parkin 相互结合的区域为 PINK1 的蛋白激酶结构域. 免疫细胞化学实验也证实 Parkin 与 PINK1 蛋白在细胞中存在共定位. 进一步运用免疫共沉淀技术证实 Parkin 可减少 PINK1 通过泛素蛋白酶体系统(ubiquitin proteasome system, UPS)的降解, 从而稳定 PINK1. PINK1 可增加 Parkin 通过 UPS 的降解, 从而减少 Parkin 的水平, 降低其稳定性. 这些结果提示, 帕金森病相关蛋白 Parkin 与 PINK1 能够直接结合, 二者通过泛素蛋白酶体降解系统相互调节, 可能协同作用参与了帕金森病的致病过程.

关键词 PINK1, Parkin, 泛素蛋白酶体系统, 免疫共沉淀

学科分类号 R742.5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00612

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经退行性疾病, 迄今为止, 已确定的 PD 相关易感基因有 α -synuclein、Parkin、UCH-L1、DJ-1、PINK1、LRRK2、ATP13A2 及 HTRA2 等 8 种. UPS 可选择性地降解细胞内的蛋白质, 是一条重要的非溶酶体降解途径. 研究发现, 特发性和某些家族性 PD 均存在泛素蛋白酶体通路(ubiquitin proteasome pathway, UPP)功能障碍, 由泛素介导的蛋白质降解途径的功能受损被认为是 PD 的发病机制之一^[1-2].

Parkin 基因的表达产物 Parkin 蛋白是一种 E3 泛素蛋白连接酶, 在泛素蛋白酶体系统(UPS)中发挥重要作用. Parkin 基因突变导致 Parkin 蛋白功能障碍, 其底物蛋白质不能通过泛素化途径降解, 最终导致神经元死亡^[3]. PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1)蛋白突变后的致病机制目前尚未完全明确, 多数研究认为突变的 PINK1 蛋白可能导致线粒体功能异常并介导了细胞凋亡. Parkin 蛋白可进行自身泛素化的修饰, PINK1 蛋白则是通过 UPP 途径降解的, 二者均为 PD 相关易感基因编码

蛋白, 那么生理状态下二者之间是否能够相互作用以及通过何种机制相互调节目前尚无报道.

本研究初步证实生理状态下帕金森病相关蛋白 Parkin 与 PINK1 直接相互结合, 二者可以通过 UPS 相互调节, 提示在病理状态下二者可能协同参与了帕金森病的致病过程.

1 材料与方法

1.1 材料

293A 人胚肾细胞、pEGFP-N1-Parkin^{WT} 质粒及 PKH3-HA-PINK1^{WT} 质粒由中国科学技术大学生命科学院提供, pGEX-5X-1-PINK1^{WT} 由本课题组构建. 质粒 pGEX-5X-1-PINK1 (156~509) 是 PINK1 蛋白激酶结构域的截短形式, 它是利用引物

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB500700), 国家高科技研究发展计划(863)(2006AA02A408)和国家自然科学基金(30570638, 30770735, 30971035, 30900469)资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 0731-84327398, Fax: 0731-84327332

E-mail: bstang7398@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-03-26, 接受日期: 2010-06-28

5' CGGAATTCATGTATCTGATAGGGCAGTCC 3'/
5' CCCTCGAGTAGATGAAGCACATTTGC 3' 以
pGEX-5X-1-PINK1^{WT} 为模板 PCR, 分别通过
EcoR I /*Xho* I 酶切位点亚克隆至载体 pGEX-5X-1
中; 质粒 pGEX-5X-1-PINK1 (Δ 156~509) 是缺失
PINK1 蛋白激酶结构域的突变形式, 它是利用引物
5' AGCCTCTGGGGTGAACATATTCTA 3'/5' CTC-
CTCCAGCCGAAAGCCCTGCAA 3' 以 pGEX-5X-1-
PINK1^{WT} 为模板 PCR 连接而成。DMEM/F12 培养
基、胎牛血清(FBS)和胰蛋白酶(Gibco 公司);
protein G Agarose beads、Glutathione-Sepharose 4B
(Sigma 公司); anti-HA 抗体、anti-Ubiquitin 抗体
(Abcam 公司); anti-GST 抗体、anti-GFP(Santa cruz
公司); CY3 偶联的山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥公
司); 蛋白酶体抑制剂 MG132(Sigma 公司)ECL 化
学发光试剂盒(Pharmacia 公司)。

1.2 GST pull-down

将 GST 和构建的 GST-PINK1^{WT}、GST-PINK1
(156~509)及 GST-PINK1(Δ 156~509)融合蛋白表
达质粒转化到大肠杆菌 JM109 中, 取单克隆菌株
接种到 10 ml LB 培养液中, 37℃, 250 r/min 振荡
过夜, 再按 0.3%接种量转接, 37℃ 培养至菌液
A 值达到 0.20~0.25 后, 加入 IPTG 至终浓度为
300 μ mol/L, 继续振荡培养 2.5 h。离心收集菌体,
用 1×PBS 重悬, 超声后离心收集上清液。加入适量
Glutathione-Sepharose 4B, 4℃ 旋转孵育 1 h, 收集
Glutathione-Sepharose 4B, 充分漂洗后, 即得到结
合 GST 和 GST 融合蛋白的 Glutathione-Sepharose 4B。
用细胞裂解液收集过表达 EGFP-Parkin^{WT} 293A 细
胞, 收取上清, 留取少量作免疫印迹对照, 分别加
入等量结合于 Glutathione-Sepharose 4B 的 GST、
GST-PINK1^{WT}、GST-PINK1(156~509)及 GST-PINK1
(Δ 156~509)融合蛋白, 于 4℃ 旋转孵育 4 h, 离
心收集 Glutathione-Sepharose 4B, 1×PBS 充分漂洗,
沉降复合物中加入适量的蛋白质电泳上样缓冲液,
进行 Western blotting 分析。

1.3 细胞培养及转染

293A 细胞采用含 10%胎牛血清、100 U/ml 青
霉素和 100 U/ml 链霉素的培养基, 置于 37℃ 的
CO₂ 培养箱中培养。质粒转染按照 Lipofectamine
2000 操作说明书进行。

1.4 免疫共沉淀

于转染后 24 h 加入 MG132, 终浓度为 10 μ mol。
转染 34 h 后收集细胞, 用 RIPA 裂解液(150 mmol/L

NaCl, 1% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.6,
5 mmol/L EDTA, 0.1% SDS, 0.5% 脱氧胆酸钠,
20 mmol/L NP-40 裂解液, 加入 1:100 的 cocktail)
于冰上裂解 30 min。裂解液 4℃ 12 000 r/min 离心
30 min 后收集上清, 留出 40 μ l 上清, 加入同体积
2×SDS 样品缓冲液混匀, 100℃ 煮沸 10 min, 4℃
保存。其余上清用于之后的免疫共沉淀实验。
每 60 μ l 的 Protein G Agarose 分别加入 18 μ l 5%
BSA、750 μ l 1×PBS 以及 6 μ l 相应的抗体(沉淀
PINK1 用 anti-HA 单抗, 沉淀 Parkin 用 anti-GFP 抗
体), 4℃ 孵育 6 h, 洗涤沉淀 3 次。加入全细胞裂
解液 4℃ 孵育 10 h, 洗涤沉淀 6 次, 去上清加入
50 μ l 2×SDS 样品缓冲液, 100℃ 煮沸 10 min。离
心取上清进行蛋白质印迹实验。蛋白质印迹具体操
作步骤: 取 10 μ l 上清行 12% SDS-PAGE, 并将蛋白
质转至 PVDF 膜, 封闭 1 h 后, 加入相应的一抗
(anti-HA 单抗检测 PINK1, anti-GFP 抗体检测
Parkin, anti-Ubiquitin 抗体检测 Ubiquitin), 4℃ 孵
育过夜, 洗膜后加入相应的二抗, 室温孵育 1 h,
洗膜后用 ECL 试剂浸泡 2 min 显影。

1.5 免疫细胞化学染色

将 293A 细胞传代于 24 孔细胞培养板上, 培
养 24 h 后进行免疫细胞化学染色, 小心弃掉培养
基, 预冷 1×PBS 4℃ 冲洗 2 次, 加入 4%多聚甲醛,
室温固定 10 min, 预冷 1×PBS 冲洗 3 次, 5% BSA
室温孵育 1 h 封闭非特异性结合位点, 弃掉封闭用
羊血清, 加入 anti-HA 一抗(1:800), 4℃ 过夜, 次
日用预冷 PBS 洗 3 次, 加入相应的二抗(1:200),
37℃ 避光孵育 1 h, PBS 冲洗 5 次, 加入 DAPI 于
37℃ 避光孵育 10 min 复染细胞核, PBS 冲洗 5 次,
甘油封片后用荧光显微镜观察。

2 结 果

2.1 PINK1 与 Parkin 体外直接结合实验以及结合 结构域的确定

将过表达 EGFP-Parkin 的 293A 细胞裂解液上
清分别加入 GST、GST-PINK1^{WT}、GST-PINK1(156
~509) 及 GST-PINK1 (Δ 156~509) 融合蛋白的
Glutathione-Sepharose 4B 中进行 GST 融合蛋白沉
降实验后, 在 GST-PINK1^{WT} 及 GST-PINK1(156~509)
的沉降复合物中能够检测到 Parkin 蛋白的存在
(图 1), 在单独 GST 蛋白及 GST-PINK1(Δ 156~509)
融合蛋白的沉降复合物中检测不到 Parkin 蛋白
(图 1)。说明 Parkin 与 PINK1 可在体外直接结合,

并且其结合结构域位于 PINK1 的蛋白激酶区。

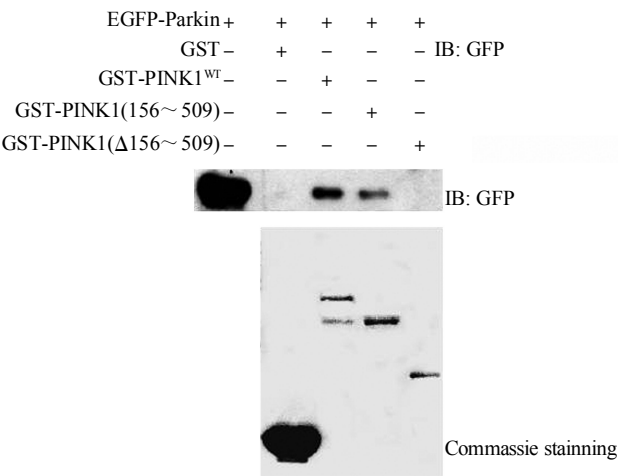


Fig. 1 Parkin interacts with PINK1 *in vitro*
GST, GST-PINK1^{WT}, GST-PINK1 (156 ~ 509) or GST-PINK1 (Δ156 ~ 509) coupled to glutathione-agarose beads was incubated with EGFP-Parkin expressed from 293A cells. The bound proteins were detected using anti-GFP antibody.

2.2 Parkin 与 PINK1 的细胞内相互作用

2.2.1 PINK1 可通过促进 Parkin 的泛素化降解而降低 Parkin 的稳定性. 将 293A 细胞分为三组：第一组共转染 EGFP-N1、HA-PINK1 及 FLAG-Ub，第二组共转染 HA、EGFP-Parkin 及 FLAG-Ub，第三组共转染 EGFP-Parkin、HA-PINK1 及 FLAG-Ub. 当 EGFP-Parkin 与 HA-PINK1 共转染时，Parkin 的泛素化水平明显增加，而在细胞内的水平减少，当 EGFP-Parkin 与 HA 共转染时无此现象. 这说明过表达 PINK1 可以促进 Parkin 通过 UPP 途径的降解，从而降低 Parkin 在细胞内的水平(图 2).

2.2.2 Parkin 可通过减少 PINK1 的泛素化降解而增加 PINK1 的稳定性. 将 293A 细胞分为三组：第一组共转染 HA、EGFP-Parkin 及 FLAG-Ub，第二组共转染 EGFP-N1、HA-PINK1 及 FLAG-Ub，第三组共转染 EGFP-Parkin、HA-PINK1 及 FLAG-Ub. 当 HA-PINK1 与 EGFP-Parkin 共转染时，PINK1 的泛素化明显减少，而在细胞内的水平增加，当 HA-PINK1 与 EGFP-N1 共转染时无此现象. 这说明过表达 Parkin 可以减少 PINK1 通过 UPP 途径的降解，从而稳定 PINK1 在细胞内的水平(图 3).

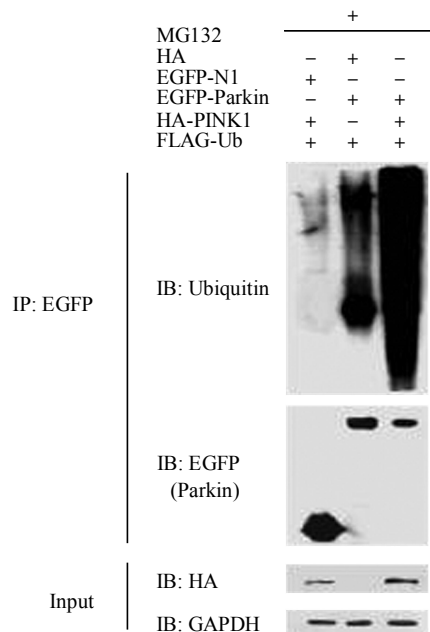


Fig. 2 PINK1 promote degradation of Parkin by increasing its ubiquitination
293A cells were transfected with EGFP-N1 or EGFP-Parkin, HA-PINK1 or HA and FLAG-Ub with treatment of MG132. The cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-GFP antibody followed by Western blotting.

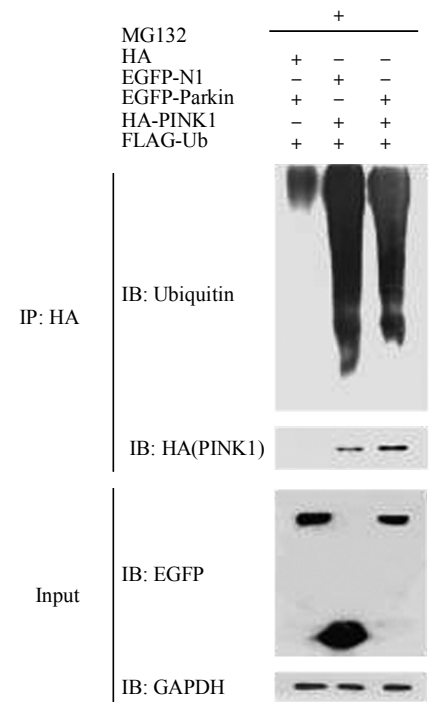


Fig. 3 Parkin stabilizes PINK1 by inhibiting its ubiquitination
293A cells were transfected with EGFP-N1 or EGFP-Parkin, HA-PINK1 or HA and FLAG-Ub with treatment of MG132. The cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibody followed by Western blotting.

2.3 Parkin 与 PINK1 的亚细胞共定位

将 EGFP-Parkin 与 HA-PINK1 共转染 293A 细胞, 蓝色为 DAPI 复染细胞核(图 4a), 绿色为 EGFP-Parkin 的特异染色(图 4b), 红色为 HA-PINK1 特异染色(图 4c), 黄色为两种蛋白质的共定位

(图 4d). 可见 EGFP-Parkin 呈全细胞分布(图 4b), HA-PINK1 呈典型的线粒体分布, 表现为胞浆中的点状聚集分布(图 4c). PINK1 和 Parkin 在 293A 细胞中部分共定位.

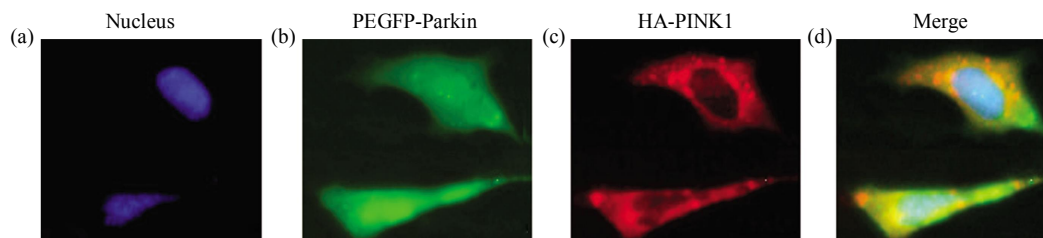


Fig. 4 Co-localization of Parkin and PINK1

293A cells were transfected with EGFP-Parkin and HA-PINK1. The cells were incubated with monoclonal anti-HA antibody, and then were incubated with cy3-labeled anti-rabbit IgG (red). The blue fluorescence was the nuclear DNA staining by DAPI(a); EGFP-Parkin showed diffuse cytoplasmic and nuclear distribution(b); HA-PINK1 show punctuated cytoplasmic staining patterns(c); the merge picture showed co-localization of EGFP-Parkin and HA-PINK1 in the cytoplasm of transfected cells(d).

3 讨 论

帕金森病的发病机制可能涉及到遗传缺陷、线粒体功能障碍、兴奋性氨基酸毒性作用、环境毒性作用等多种因素, 其中遗传因素导致的 PD 越来越受到重视. 流行病学研究显示, 10%~15% 的帕金森病患者有家族史^[4-5]. 目前已被克隆的 8 个致病基因中 Parkin、DJ-1、PINK1 与常染色体隐性遗传性 PD 相关. UPS 是体内蛋白质降解的主要途径, 参与体内 80% 以上蛋白质的降解, 在错误折叠蛋白或其他突变蛋白的降解过程中也发挥重要作用. UPS 和神经退行性疾病之间存在着密切的关系^[6-8]. 研究发现, 已经被定位的各种与家族性 PD 相关的蛋白质都直接或间接地参与了 UPS 对蛋白质的降解过程, 家族性 PD 相关基因突变后导致蛋白质功能障碍进而干扰了 UPS 对异常蛋白的降解而致病, 但这些 PD 相关蛋白间的直接作用或功能上的相互关系仍不十分清楚. 研究发现, Parkin 突变后其 E3 连接酶功能缺陷导致底物蛋白毒性积聚, 最终导致多巴胺(dopamine, DA)能神经元死亡. PINK1 蛋白功能障碍导致 PD 的致病机制目前尚未明确, 线粒体功能障碍、氧化应激和泛素蛋白酶体系统(UPS)功能障碍可能是散发性 PD 和家族性 PD 共同的发病机制. 多个研究显示 Parkin 及 PINK1 蛋白均通过 UPS 降解, 且二者在遗传性及散发性 PD 中均具有重要作用, 因而明确二者的关系对于阐明

PD 发病机制、发现新的治疗靶点具有重要意义.

以往研究认为 Parkin 与 PINK1 是通过同一途径起作用, 但二者具体的相互作用机制并不十分清楚. 本研究首先通过 GST-pull down 实验证实 Parkin 与 PINK1 直接相互结合, 且二者的结合区段位于 PINK1 的蛋白激酶结构域内. 鉴于蛋白质与蛋白质相互作用的复杂性, 为了进一步验证 Parkin 与 PINK1 的相互作用, 我们利用免疫共沉淀的方法研究内源性二者的相互作用. 实验证实不仅在体外可看到 Parkin 与 PINK1 存在直接相互作用, 细胞内也具有相同的结果. 随之, 我们进一步利用免疫细胞化学染色检测二者细胞内共定位, 结果显示 Parkin 与 PINK1 可出现细胞内共定位关系. 由于 Parkin 与 PINK1 均可通过 UPS 降解, 因此我们进一步研究了二者泛素化降解过程的相互作用. 结果表明, Parkin 可以减少 PINK1 通过 UPP 途径的降解, 从而稳定细胞内的 PINK1, PINK1 可以促进 Parkin 通过 UPP 途径的降解, 从而降低 Parkin 在细胞内的水平.

总之, 已有越来越多的证据提示神经系统变性疾病可能具有共同的致病机制, 我们的实验结果证实 Parkin 与 PINK1 为相互作用蛋白, 二者可以直接相互结合, 且可以通过 UPS 相互调节. 但突变的 Parkin 与 PINK1 是否在 PD 的发病中起到了协同的作用, 以及具体的相互作用机制尚需进一步研究.

参 考 文 献

- [1] McNaught K S, Olanow C W, Halliwell B, *et al.* Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2001, **2**(8): 589-594
- [2] McNaught P, Belizaire R, Isaacs O, *et al.* Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 2003, **179**(1): 38-46
- [3] Chung K K, Zhang Y, Lim K L, *et al.* Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nature Med*, 2001, **7**(10): 1144-1150
- [4] Sherer T B, Betarbet R, Greenamyre J T. Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *Neuroscientist*, 2002, **8**(3):192-197
- [5] Payami H, Larsen K, Bernard S, *et al.* Increased risk of Parkinson's disease in parents and siblings of patients. *Ann Neurol*, 1994, **36**(4): 659-661
- [6] Giorgi F S, Bandettini di Poggio A, Battaglia G, *et al.* A short overview on the role of alpha-synuclein and proteasome in experimental models of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 2006 (70):105-109
- [7] Ardley H C, Robinson P A. The role of ubiquitin-protein ligases in neurodegenerative disease. *Neurodegener Dis*, 2004, **1**(2-3): 71-87
- [8] Healy D G, Abou-Sleiman P M, Wood N W. Genetic causes of Parkinson's disease: UCHL-1. *Cell Tissue Res*, 2004, **318** (1): 189-194

Direct Interaction Between Two Parkinson-related Protein Parkin and PINK1*

WANG Xue-Jing, GUO Ji-Feng, JIANG Hong, SHEN Lu, TANG Bei-Sha**

(Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008)

Abstract Parkinson disease (PD) is the common movement disorder. Along with the development of molecular genetics, genes related to the familial forms of Parkinson's disease such as Parkin (PARK2) and phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN)-induced putative kinase 1——PINK1 (PARK6) have been identified. GST pull-down assays were performed to identify which domain of PINK1 interacted with Parkin, and the result showed that Parkin directly interacted with PINK1, and the PINK1 kinase domain interacted with Parkin. Based on these results, then the co-immunoprecipitation technique was used to investigate the possible interaction between Parkin and PINK1 in 293A cells. The results indicated that Parkin stabilized PINK1 by interfering with its degradation *via* the ubiquitin-mediated proteasomal pathway, and PINK1 decreased level of Parkin by promoting its degradation *via* the ubiquitin-mediated proteasomal pathway. The results confirmed that Parkin directly interacted with PINK1, and they regulated each other *via* the ubiquitin-mediated proteasomal pathway.

Key words PINK1, Parkin, ubiquitin proteasome system, co-immunoprecipitation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00612

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China(2006CB500700), Hi-Tech Research and Development Program of China(2006AA02A408) and The National Natural Science Foundation of China (30570638, 30770735, 30971035, 30900469).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-84327398, Fax: 86-731-84327332, E-mail: bstang7398@yahoo.com.cn

Received: March 26, 2010 Accepted: June 28, 2010