

Parkin 与 α -酮戊二酸载体蛋白(OGCP)的相互作用研究*

王春喻^{1, 2)**} 曹立^{2, 3)**} 唐北沙²⁾ 张海南^{1, 2)} 郭纪锋²⁾ 何丹²⁾
廖书胜²⁾ 汤建光¹⁾ 严新翔²⁾ 谭利明^{1)***}

⁽¹⁾中南大学湘雅二医院神经内科, 长沙 410011; ⁽²⁾中南大学湘雅医院神经内科, 长沙 410008;

⁽³⁾上海交通大学附属瑞金医院神经内科, 上海 200025)

摘要 *Parkin* 基因是帕金森病的致病基因之一, *Parkin* 蛋白作为泛素-蛋白酶体通路(ubiquitin-proteasome pathway, UPP)的一种 E3 酶, 介导了多种底物的泛素化过程, 而后者与帕金森病的发病机制有着密切的联系. α -酮戊二酸载体蛋白(2-oxoglutarate carrier protein, OGCP)是一种线粒体内膜蛋白. 采用激光共聚焦技术和免疫共沉淀技术证实, 在 HEK293 细胞中 *Parkin* 蛋白与 OGCP 共定位, 且二者之间存在相互作用关系; 通过体内、外泛素化实验发现 *Parkin* 蛋白能介导 OGCP 的泛素化. 提示 OGCP 可能是 *Parkin* 蛋白的泛素化底物蛋白, 且 *Parkin* 蛋白能促进 OGCP 的泛素化.

关键词 帕金森病, *Parkin* 蛋白, α -酮戊二酸载体蛋白(OGCP)

学科分类号 R394.3, R740.02

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00349

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种常见的神经系统退行性疾病^[1], 主要表现为静止性震颤、肌强直、运动减少和平衡障碍, 主要的病理特点为黑质多巴胺能神经元丧失和 *lewy* 小体形成. 但 PD 发病机制尚不完全清楚, 近年研究发现, 老年化因素、环境因素、遗传因素与 PD 发病相关, 分子遗传学研究发现: 至少已定位了 15 个遗传性 PD 的致病基因位点^[2-4], 其中 10 个致病基因已被克隆^[2-5]. *Parkin* 基因于 1998 年由 Kitada 等^[6]克隆, 该基因突变可以导致常染色体隐性遗传青少年型帕金森综合征 (autosomal recessive juvenile Parkinsonism, AR-JP), 随后发现 *Parkin* 基因与早发性帕金森病 (early onset Parkinson disease, EOPD) 也相关, 提示 *Parkin* 基因在 PD 发病机制中起着重要作用. 研究证实 *Parkin* 蛋白是一种泛素-蛋白连接酶 (E3 酶), 它和 E1、E2 酶一起促使多种蛋白质 (包括其自身) 的泛素化^[7]. 目前研究已发现 *Parkin* 有多种相互作用蛋白 (互作蛋白), 其中有些互作蛋白是 *Parkin* 的底物蛋白, 而 *Parkin* 与其互作蛋白或底物蛋白之间的相互作用参与了 PD 的发病机制. 因此, 寻找 *Parkin* 的互作蛋白或底物蛋白, 探讨其相互作用后的功能变化具有一定的意义. α -酮戊二酸载体蛋

白(2-oxoglutarate carrier protein, OGCP)是一种线粒体膜蛋白^[8], 主要参与细胞内的能量代谢和三羧酸循环的过程. 根据生物信息学推测 OGCP 可能与 *Parkin* 存在相互作用, 本研究采用免疫荧光、免疫共沉淀、泛素化实验验证 *Parkin* 与 OGCP 的相互作用, 探讨 *Parkin* 对 OGCP 的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

ECL 试剂盒购自 GE 公司; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自 GIBICO 公司; Anti-myc 单克隆抗体、Anti- β -actin 单克隆抗体、Anti-Flag 单克隆抗体、Anti-Flag 多克隆抗体、Anti-ubiquitin 抗体、Ubch7、Ubiquitin 购自

* 国家自然科学基金(30370515, 30570638), 国家高技术研究发展计划(863)(2004AA227040), 国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB500700)和国家十五科技攻关计划(2004BA720A03)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0731-85295856, E-mail: wcy19@tom.com

收稿日期: 2009-06-04, 接受日期: 2009-11-26

Sigma 公司; Cy2-labeled anti-mouse IgG、Cy3-labeled anti-rabbit IgG、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 购自 KPL 公司; Clasto-lactacystin β -lactone、E1 购自 Calbiochem 公司; HEK293 细胞株由中南大学医学遗传学国家重点实验室冻存。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建. 使用人胎脑 cDNA 文库设计引物扩增 *Parkin* 的 CDS(GenBank: AB009973)和 *OGCP* 基因 CDS(GenBank: BC006508), 利用 *EcoR* I 和 *Hind* III 分别连接到 pCMV-Tag4, pcDNA3.1-myc-his(-)B 中, 构建 pCMV-*Parkin*, pcDNA3.1-myc-*OGCP*, 所有克隆经酶切和测序证实后, 抽提大量质粒后进行转染。

1.2.2 细胞培养与转染. HEK293 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 置于 37°C 5% CO₂ 培养箱中培养, 3 天换一次培养液。将 HEK293 细胞用胰酶消化后按 1:3 的比例接种至培养板培养, 待细胞长至约 70% 融合时进行转染。转染具体操作参考脂质体 Lipofectamine 2000 说明书进行。

1.2.3 免疫荧光. 将 HEK293 细胞接种于有盖玻片的 24 孔板中, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中。转染质粒 DNA, 转染 36 h 后, 弃去培养基, 3.7% 的多聚甲醛 / PBS 室温下固定 15 min。PBS 洗 4 次, 每次 5 min。5% BSA 封闭液, 室温封闭 30 min。适当比例的一抗室温孵育 1 h。1×PBS 洗 5 次, 每次 5 min。5% BSA 封闭液, 室温封闭 30 min。相应二抗 30 μ l, 避光室温下孵育 40 min。1×PBS 洗 5 次, 每次 5 min。DAPI 染细胞核, 室温, 避光反应 2 min。1×PBS 洗 5 次, 每次 5 min。去离子水洗一次, 封片, 在荧光显微镜上观察染色情况, 用激光共聚焦显微镜扫描和照相。

1.2.4 免疫印迹. 取细胞, 按蛋白质提取试剂盒提取手册提取并收集蛋白质, 蛋白质定量试剂盒测蛋白质浓度。再将样品加入 5×变性缓冲液混匀, 100°C 下变性 5 min。均取 20 μ g 蛋白质样品经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并电转移至 PVDF 膜上。以 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 加入相应一抗, 4°C 过夜, TBST 洗膜后, 加入对应的辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 60 min, TBST 洗膜后, ECL 发光、曝光。内参照为鼠抗 β -actin 单克隆抗体。

1.2.5 免疫共沉淀. 每 1 ml 经过预吸附的细胞裂解液上清液中加入相应的单克隆抗体 4 μ g, 对照

组则加入 4 μ g 正常小鼠 IgG 作为对照。4°C 转转 30 min; 加入 50 μ l 已预处理的 Protein G Agarose, 4°C 转转 2 h; 4°C 8 000 *g* 离心 5 min, 去上清液, 加入 1 ml RIPA(不含 cocktail)重悬沉淀物; 重复上一步操作 2 次; 4°C 12 000 *g* 离心 10 min, 去上清液, 加入 20 μ l 2×SDS 样品缓冲液, 100°C 煮沸 10 min; 4°C 12 000 *g* 离心 1 min, 取上清液进行 Western blot。

1.2.6 体外泛素化实验. 将 pCMV-*Parkin*、pcDNA3.1-myc-*OGCP* 两种质粒分别转入 HEK293 细胞, 培养 36 h 后裂解, 分别用抗 Flag 单抗和抗 myc 单抗进行免疫沉淀, 纯化 *Parkin*-Flag 蛋白和 *OGCP*-myc 融合蛋白。蛋白质提纯后进行体外泛素化实验, 分组见表 1, 反应体系见表 2, 反应体系充分混匀后在 PCR 仪上, 30°C 下反应 2 h。将反应产物分成两份, 分别用抗泛素化单抗 (1:500) 和抗 myc 单抗 (1:1 000) 做 Western blot; 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(1:5 000)。

Table 1 The groups of *in vitro* ubiquitination assays

	1	2	3	4	5	6
Parkin-Flag	+	+	-	+	+	-
OGCP-myc	+	-	+	+	-	+
E2	+	+	+	-	-	-
E1/Ub	+	+	+	-	-	-

Table 2 The reaction system of *in vitro* ubiquitination assays

Agent	Dose
E1	100 ng
Ubiquitin	10 μ g
E2(UbcH7)	200 ng
Buffer	50 μ l
OGCP-myc	7 μ l
Parkin-Flag	7 μ l

1.2.7 体内泛素化实验. 将已构建好的 *OGCP*-myc/HEK293 稳定表达细胞株分 *a*, *b*, *c*, *d* 四组培养至 70% 融合后, 向 *a* 组和 *c* 组转染 pcDNA3.1-ubiquitin, 向 *b* 组和 *d* 组共转染 pCMV-*Parkin* 和 pcDNA3.1-ubiquitin 质粒, 转染 32 h 后, 将 *a* 组和 *b* 组细胞用 5 μ mol/L Clasto-lactacystin β -lactone 处理 1 h, *c* 组和 *d* 组细胞用 5 μ mol/L Clasto-lactacystin β -lactone 处理 4 h, 用 anti-ubiquitin 单克

隆抗体进行免疫沉淀试验, 再用一抗为抗 myc 单抗(1:1 000); 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(1:5 000)作免疫印迹检测。

2 结 果

2.1 Parkin 和 OGCP 在细胞中的定位

应用免疫荧光观察 Parkin-Flag, OGCP-myc 融合蛋白在 HEK293 细胞中的定位情况. 发现 Parkin 蛋白广泛存在于胞浆和胞核中(图 1, A1、A2、A3), OGCP-myc 融合蛋白位于细胞的线粒体上, 且能与 MitoTracker 染色的线粒体进行共定位(图 1, B1、B2、B3).

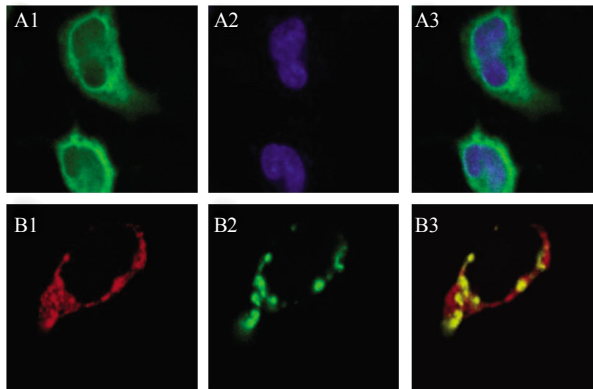


Fig. 1 The location of parkin and OGCP in HEK293 cells

HEK293 cells grown on coverslips were transfected with expression plasmids encoding the Parkin (A1, A2, A3) and OGCP (B1, B2, B3) proteins. 48 h after transfection cells were fixed with paraformaldehyde and stained with anti-Flag/C2-anti-mouse IgG (to detect Parkin, in green, A1, A3), anti-myc/C2-anti-mouse IgG (to detect OGCP, in green, B2), DAPI (to detect DNA in blue, A2, A3) and MitoTracker (to detect mitochondrial in red, B1, B3) as described in **Materials and methods**. Images were obtained by using an inverted system microscope (Zeiss). The merged image overlaps (A3, B3) were obtained using the Metamorph software.

2.2 Parkin 与 OGCP 的相互作用

2.2.1 荧光共定位. 用激光共聚焦显微镜观察 Parkin-Flag 和 OGCP-myc 融合蛋白在 HEK293 细胞中的共定位情况. 发现在 HEK293 细胞中 Parkin 蛋白(红色荧光)广泛分布在胞浆和胞核中, 而 OGCP(绿色荧光)呈聚积性分布. OGCP 和 Parkin 蛋白存在部分共定位(黄色荧光)(图 2).

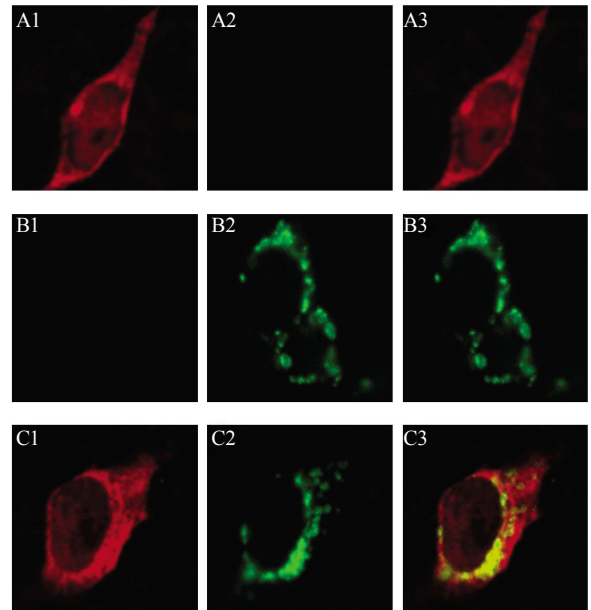


Fig. 2 The Co-localization of Parkin and OGCP in HEK293 cells ($\times 1 000$)

HEK293 cells grown on coverslips were cotransfection with pCMV-parkin and pcDNA3.1-myc-his-(B-)(A1, A2, A3), pcDNA3.1-myc-OGCP and pCMV-Tag4(B2, B2, b3), pCMV-parkin and pcDNA3.1-myc-OGCP (C1, C2, C3). 48 h after transfection cells were fixed with paraformaldehyde and stained with anti-Flag/C3-anti-mouse IgG (to detect Parkin, in red, A1, B1, C1), anti-myc/C2-anti-rabbit IgG (to detect OGCP, in green, A2, B2, C2) as described in **Materials and methods**. Images were obtained by using an inverted system laser confocal microscope (Zeiss). The merged image overlaps (A3, B3, C3) were obtained using the Metamorph software. The result showed the Co-localization of Parkin and OGCP in HEK293 cells (C3, yellow fluorescence).

2.2.2 免疫共沉淀. 我们将实验分为 3 组, 分别为 A 组(Parkin 组), B 组(OGCP 组)和 C 组(Parkin 和 OGCP 共转组). 免疫共沉淀结果显示: 用 anti-myc 单抗对 A、B 和 C 这 3 组的全细胞裂解液检测, 在 B 和 C 组中都可见一条大约 38 ku 大小的特异性条带, 说明 OGCP-myc 融合蛋白在 B 组和 C 组中有表达, 而在 A 组中则无表达; 用 anti-Flag 单抗沉淀后用 anti-myc 单抗检测 OGCP-myc 融合蛋白, 仅发现 C 组有 38 ku 大小的特异性条带, 说明沉淀 Parkin 蛋白同时能将 OGCP-myc 融合蛋白沉淀, 表明两者之间存在相互作用, 对 C 组(C*)用正常小鼠的 IgG 作为对照, 未检测到 OGCP-myc 融合蛋白, 说明 Parkin-Flag 和 OGCP-myc 融合蛋白的相互作用不是因为 IgG 的非特异性作用所致(图 3a). 使用

anti-myc 沉淀后, 用 anti-Flag 检测也能得到同样的结果(图 3b).

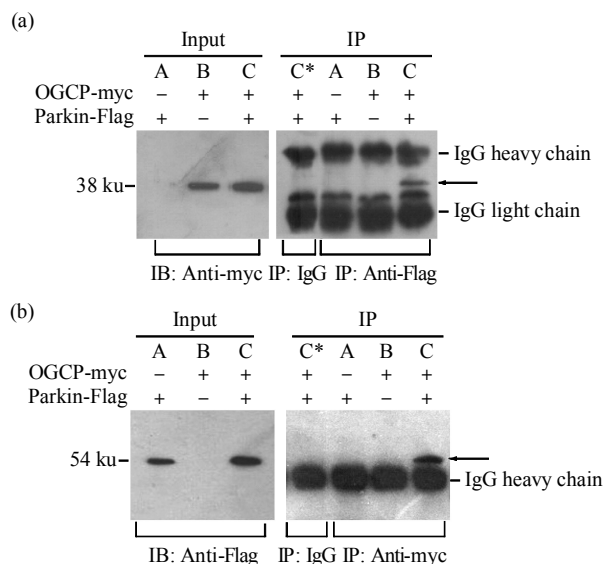


Fig. 3 Co-immunoprecipitation experiments of Parkin-Flag proteins and OGCP-myc in HEK293

(a) The cell lysates from HEK293 cells over-expressing flag tagged Parkin or/and myc tagged OGCP were immunoprecipitated (IP) with anti-Flag antibody. Five percent of whole cell lysates of three groups were immunoblotted with anti-myc monoclonal antibody and the rest were subjected to immunoprecipitation with monoclonal anti-Flag antibody, the normal mouse IgG were used as the control antibody(C*). Immunoblotting with anti-myc monoclonal antibody detected OGCP (38 ku, black arrow directed) in groups which over-expressed OGCP or both parkin and OGCP, but not in the control groups. (b) The cell lysates were immunoprecipitated with anti-myc antibody. Five percent of whole cell lysates of three groups were immunoblotted with anti-Flag monoclonal antibody and the rest were subjected to immunoprecipitation with monoclonal anti-myc antibody, the normal mouse IgG were used as the control antibody (C*). Immunoblotting with anti-Flag monoclonal antibody detected Parkin (54 ku, black arrow directed) in groups which over-expressed parkin or both parkin and OGCP, but not in the control groups. The results confirmed the interaction between parkin and OGCP.

2.3 Parkin 介导 OGCP 的体内外泛素化实验结果

2.3.1 体外泛素化实验. 将反应后的 6 组产物(表 1) 分别用 anti-ubiquitin 单克隆抗体和 anti-myc 单克隆抗体做 Western blot 检测. 用 anti-ubiquitin 单克隆抗体检测泛素化产物, 从图 4a 可见 1, 2, 3 组都有浓度较高的高分子质量条带出现, 以 1 组的条带最浓, 其次是 2 和 3 组, 在 4、5、6 组仅有很微弱的高分子的条带, 这些检测出的高分子条带为高分子质量的泛素化蛋白. 用 anti-myc 单克隆抗体检测体外泛素化产物中的 OGCP-myc 融合蛋白, 从

图 4b 可见 1 组有高分子质量条带出现, 而其他组没有高分子质量条带出现.

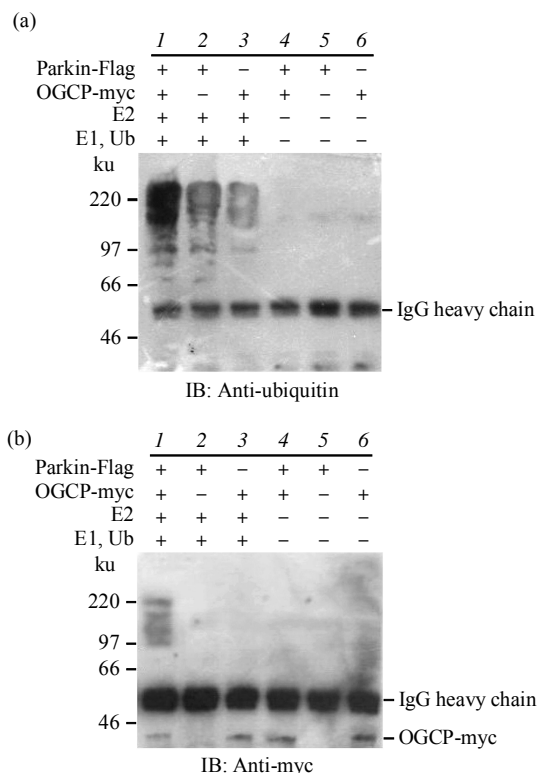


Fig. 4 Ubiquitination of OGCP in vitro

The *in vitro* assay was performed as described in **Materials and methods** with individual components added as indicated in **Table 1**. The purified fusion protein Parkin-Flag and/or OGCP-myc were incubated with the ubiquitin enzymes (E1, E2) and ubiquitin, production without ubiquitin enzymes (E1, E2) and ubiquitin were used as control. (a) Immunoblotting with anti-ubiquitin monoclonal antibody detected the high molecular mass straps in the production of *in vitro* ubiquitination with Parkin and/or OGCP and E1, E2, ubiquitin(1, 2, 3), but not in the control groups(4, 5, 6). And the fortissimus straps were detected in the production of Parkin-Flag, OGCP-myc, E1, E2 and ubiquitin (1). (b) Immunoblotting with anti-myc monoclonal antibody detected the high molecular mass straps only in the production of *in vitro* ubiquitination with Parkin-Flag, OGCP-myc, E1, E2 and ubiquitin(1).

2.3.2 体内泛素化实验. 用 5 $\mu\text{mol/L}$ Clasto-lactacystin β -lactone 处理 1 h, 泛素化高分子质量蛋白条带(泛素化的 OGCP-myc)出现在 b 组, 而 a 组则无, 说明 Parkin 蛋白可以促使 OGCP-myc 融合蛋白的泛素化. 蛋白酶体抑制剂 Clasto-lactacystin β -lactone 干预 4 h 后的 c 和 d 组, 同 1 h 的 a 和 b 组相比, 泛素化高分子质量蛋白条带浓度增加, 说明 Clasto-lactacystin β -lactone 能抑制 OGCP-myc 融合蛋白降解(图 5).

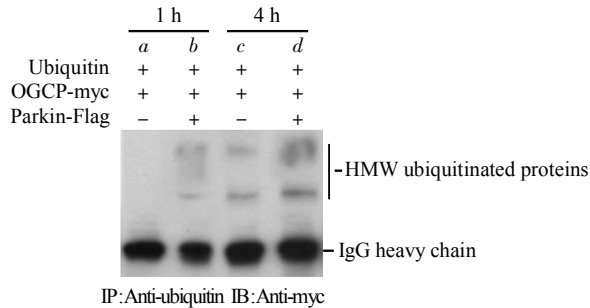


Fig. 5 Ubiquitination of OGCP *in vivo*

HEK293 cells stably expressing OGCP-myc were transfected with pcDNA3.1-ubiquitin (a, d) or cotransfected with pCMV-Parkin (b, d). 48 h after transfection cells were treated with Clasto-lactacystin β -lactone (5 μ mol/L) for 1 h (a, b) and 4 h (c, d) respectively. The whole cell lysates were immunoprecipitated with anti-ubiquitin antibody. Immunoblotting with anti-myc monoclonal antibody detected the high molecular mass ubiquitinated proteins besides in lane a, which showed that Parkin significantly increases OGCP ubiquitination. Whereas the protein band of HMW ubiquitinated proteins were heavier in lane c and d than that in lane b, indicated Clasto-lactacystin β -lactone could inhibit OGCP-myc degradation in cells.

3 讨 论

遗传因素在帕金森病中发挥着重要作用,从分子机制上来看,UPP 功能障碍与帕金森病的发病机制有着密切的联系. Parkin 蛋白是 UPP 的一种 E3 酶,其功能的发挥主要是依赖于其与底物蛋白之间的相互作用^[9-10]. Parkin 蛋白功能障碍可以导致未能泛素化的某些底物蛋白聚集,通过增强其对非毒性应激的敏感性,直接或间接激活细胞死亡通路,引起多巴胺能神经元死亡,还可以导致某些易受环境应激因素损伤的、折叠错误的蛋白质不能被泛素化而清除,在神经元内聚集,最终造成神经元死亡^[11].

Parkin 蛋白全长 465 个氨基酸,分子质量约为 52 ku,主要由一个泛素样结构域、R1-IBR-R2 和 PDZ 域组成.我们研究表明, Parkin 蛋白在细胞内广泛表达,主要分布在细胞浆和细胞核中,在线粒体中也有分布,与文献报道^[12]的 Parkin 亚细胞定位情况一致. OGCP 全长 315 个氨基酸,分子质量约 35 ku.我们研究发现 OGCP 定位于线粒体上,与以往研究^[13]一致.因为 Parkin 蛋白和 OGCP 在线粒体中均有分布,而且以往的研究^[14]表明, OGCP 作为 α -酮戊二酸脱氢酶的一个亚单位,参与细胞

内的能量代谢和三羧酸循环的过程,能从细胞质内运输还原型谷胱甘肽进入线粒体内,清除线粒体内源性的氧自由基、增强细胞抗氧化能力^[15-18],因此我们推测 OGCP 可能是 Parkin 蛋白的互作蛋白,在帕金森病的发病机制中发挥一定的作用.本研究中我们使用免疫荧光和激光共聚焦显微镜结合免疫共沉淀试验,发现 Parkin 蛋白和 OGCP 在 HEK293 细胞中存在共定位,且在用抗 Flag 抗体沉淀 Parkin-Flag 融合蛋白的同时能沉淀 OGCP-myc 融合蛋白,用抗 myc 抗体沉淀 OGCP-myc 融合蛋白的同时能沉淀 Parkin-Flag 蛋白,说明二者之间存在相互作用,证实了我们的推测.但是 OGCP 是否是 Parkin 的一个新的底物蛋白呢?

Parkin 是泛素-蛋白酶体通路中一种 E3 酶,以往研究表明 Parkin 能够介导自身泛素化^[19].本研究体外泛素化实验中, E1/ubiquitin、UbcH7 和纯化的 Parkin-myc 融合蛋白在一定的反应条件下可以形成高分子质量的泛素化蛋白,其形成的原因主要是 Parkin 介导了自身的泛素化,此外,在免疫沉淀纯化 Parkin 蛋白时,可能有很少的 Parkin 的底物蛋白一起沉淀,从而一起参与体外泛素化反应,形成高分子质量的泛素化蛋白.在泛素化过程中,底物蛋白只有在泛素、E1、E2、E3 都存在的情况下才能完成泛素化反应,但我们在研究中发现, ubiquitin, E1, UbcH7 和纯化的 OGCP-myc 融合蛋白在一定的反应条件下也能形成高分子质量的泛素化蛋白,其形成的原因可能是当纯化 OGCP-myc 融合蛋白的时候,有部分的内源性 Parkin 一起沉淀下来,一起参与体外泛素化反应,形成高分子质量的泛素化蛋白.另外,从图 4 的第 3 组实验结果来看,我们用 anti-myc 单克隆抗体并没有检测出高分子质量的蛋白质,说明即使是内源性的 Parkin 介导了 OGCP-myc 融合蛋白的泛素化,其程度也是很低,以致无法检测出.结合图 4 中 1 组的结果,可以推断 Parkin 蛋白能在体外介导 OGCP-myc 融合蛋白的泛素化.在体内泛素化实验中,为了抑制蛋白质通过蛋白酶体途径代谢,增加表达量,我们使用了蛋白酶体抑制剂 Clasto-lactacystin β -lactone 进行干预.图 5 的结果表明: Parkin 蛋白的过度表达显著地促使 OGCP-myc 融合蛋白的泛素化(a 组和 b 组比较, c 组和 d 组比较); Clasto-lactacystin β -lactone 能抑制 OGCP-myc 融合蛋白通过蛋白酶体途径代谢(a 组和 c 组比较, b 组和 d 组比较).本研究体外和体内泛素化实验证实

了 Parkin 蛋白能介导 OGCP-myc 融合蛋白的泛素化, OGCP-myc 融合蛋白是 Parkin 蛋白的底物蛋白, 表明 OGCP 是 Parkin 的一个底物蛋白。

总之, 我们已明确 OGCP 是 Parkin 蛋白的一个新的泛素化底物蛋白, 而且证实 Parkin 蛋白能够促进 OGCP 的泛素化, 进一步研究 Parkin 蛋白与 OGCP 相互作用的生物学意义对于明确 Parkin 在 PD 发病机制中的作用具有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] Pakkenberg B, Moller A, Gundersen H J, *et al.* The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1991, **54**(1): 30-33
- [2] Thomas B, Beal M F. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 2007, **16**(2): R183-194
- [3] Ma Z, Wang X, Nowatzke W, *et al.* Human pancreatic islets express mRNA species encoding two distinct catalytically active isoforms of group VI phospholipase A2 (iPLA2) that arise from an exon-skipping mechanism of alternative splicing of the transcript from the iPLA2 gene on chromosome 22q13.1. *J Biol Chem*, 1999, **274**(14): 9607-9616
- [4] Ilyin G P, Rialland M, Pigeon C, *et al.* cDNA cloning and expression analysis of new members of the mammalian F-box protein family. *Genomics*, 2000, **67**(1): 40-47
- [5] Di Fonzo A, Dekker M C J, Montagna P, *et al.* FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology*, 2009, **72**(3): 240-245
- [6] Kitada T, Asakawa S, Hattori N, *et al.* Mutations in the Parkin gene cause autosomal recessive juvenileparkinsonism. *Nature*, 1998, **392**(6676): 605-608
- [7] Shimura H, Hattori N, Kubo S, *et al.* Familial Parkinson disease gene product, Parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*, 2000, **25**(3): 302-305
- [8] Yu X X, Lewin D A, Zhong A, *et al.* Overexpression of the human 2-oxoglutarate carrier lowers mitochondrial membrane potential in HEK-293 cells: contrast with the unique cold-induced mitochondrial carrier CGI-69. *Biochem J*, 2001, **353**(2): 369-375
- [9] 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. *Nat Med*, 2001, **7**(10): 1144-1150
- [10] Shimura H, Schlossmacher M G, Hattori N, *et al.* Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by Parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science*, 2001, **293**(5528): 263-269
- [11] Choi P, Golts N, Snyder H, *et al.* Co-association of Parkin and alpha-synuclein. *Neuroreport*, 2001, **12**(13): 2839-2843
- [12] Darios F, Corti O, Lucking C B, *et al.* Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet*, 2003, **12**(5): 517-526
- [13] Palmisano A, Zara V, Honlinger A, *et al.* Targeting and assembly of the oxoglutarate carrier: general principles for biogenesis of carrier proteins of the mitochondrial inner membrane. *Biochem J*, 1998, **333**(Pt 1): 151-158
- [14] Coll O, Colell A, Garcia-Ruiz C, *et al.* Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology*, 2003, **38**(3): 692-702
- [15] Iacobazzi V, Palmieri F, Runswick M J, *et al.* Sequences of the human and bovine genes for the mitochondrial 2-oxoglutarate carrier. *DNA Seq*, 1992, **3**(2): 79-88
- [16] Lash L H, Putt D A, Matherly L H. Protection of NRK-52E cells, a rat renal proximal tubular cell line, from chemical-induced apoptosis by overexpression of a mitochondrial glutathione transporter. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, **303**(2): 476-486
- [17] Coll O, Colell A, Garcia-Ruiz C, *et al.* Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology*, 2003, **38**(3): 692-702
- [18] Chen Z, Putt D A, Lash L H. Enrichment and functional reconstitution of glutathione transport activity from rabbit kidney mitochondria: further evidence for the role of the dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers in mitochondrial glutathione transport. *Arch Biochem Biophys*, 2000, **373**(1): 193-202
- [19] Kumlesh K D, Herman V P, Bernd S, *et al.* Part I: Parkin-associated proteins and Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 2003, **45**(1): 1-13

The Study of The Interaction Between Parkin and OGCP*

WANG Chun-Yu^{1,2)**}, CAO Li^{2,3)**}, TANG Bei-Sha²⁾, ZHANG Hai-Nan^{1,2)}, GUO Ji-Feng²⁾, HE Dan²⁾,
LIAO Shu-Sheng²⁾, TANG Jian-Guang¹⁾, YAN Xin-Xiang²⁾, TAN Li-Ming^{1)***}

¹⁾ Department of Neurology, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China;

²⁾ Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

³⁾ Department of Neurology, Ruijin Hospital Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

Abstract Parkin gene is one of the virulence gene in Parkinson's disease. Being an E3 enzyme of ubiquitin-proteasome pathway(UPP), Parkin protein mediates many substrate proteins' ubiquitination which has been closely linked to the pathogenesis of Parkinson's disease. 2-oxoglutarate carrier protein (OGCP) is a mitochondrial membrane protein. Immunofluorescence and laser confocal microscope confirmed that in HEK293 cells, there are co-orientation and interaction between Parkin protein and OGCP. And Parkin protein can mediate the ubiquitination of OGCP though *in vitro* and *in vivo* ubiquitination essays. These findings suggest that OGCP may be one of the ubiquitination substrate proteins of Parkin protein and Parkin protein mediates can promote the OGCP's ubiquitination.

Key words Parkinson's disease, Parkin protein, 2-oxoglutarate carrier protein(OGCP)

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00349

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30370515, 30570638), Hi-Tech Research Development Program of China (2004AA227040), National Basic Research Program of China (2006CB500700) and The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2004BA720A03).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-731-5295856, E-mail: wcy19@tom.com

Received: June 4, 2009 Accepted: November 26, 2009