

PINK1 蛋白在线粒体外膜上的定位机制研究

太颢然^{1,2}, 姜长安^{1,2△}

1. 四川大学华西第二医院 发育与干细胞研究所(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 生物治疗国家重点实验室(成都 610041)

【摘要】目的 研究帕金森氏病相关蛋白 PINK1 在线粒体外膜上定位的具体机制。**方法** 以体外培养的 HEK293T 细胞转染表达不同蛋白的真核表达质粒, 然后加入 DMSO 作为对照或者加入线粒体解偶联剂 CCCP, 以 Western 印迹和免疫共沉淀技术来检测蛋白的表达和相互作用的变化。**结果** 全长的 PINK1 在 CCCP 作用下和线粒体上的 Tom40 的相互作用能力是 DMSO 对照的 20 倍以上, 而去掉线粒体定位序列(MTS)和跨膜序列(TM)的 PINK1 以及其它线粒体外膜蛋白在 CCCP 作用下没有这样的相互作用。当 CCCP 去掉后, PINK1 全长和 Tom40 的相互作用迅速减弱。去掉或突变掉 TM 序列的 PINK1 和 Tom40 不论在 CCCP 是否存在的情况下, 均有相互作用。**结论** 在受损线粒体外膜积累的 PINK1 只是卡在外膜蛋白转运通道上, 并没有真正转运到外膜上。而当线粒体的跨膜电位恢复时, 它会继续向内转运。

【关键词】 帕金森病 PINK1 TOM 复合体 双重定位

The Mechanism of PINK1 Localization on the Outer Membrane of Mitochondria TAI Hao-ran^{1,2}, JIANG Chang-an^{1,2△}. 1. *Developmental & Stem Cell Institute, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;* 2. *State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China*

△ Corresponding author, E-mail: cjcareer@qq.com

【Abstract】 Objective To study the specific mechanism of PTEM-induced putative kinase 1 (PINK1) located to the outer membrane of damaged mitochondria. **Methods** Cultured HEK293T cells were transfected with plasmids expressing different proteins, following with DMSO or CCCP treatment. Western blot and coimmunoprecipitation were used to detect the expression and interaction of proteins. **Results** Full length PINK1, but not its mitochondria targeting sequence (MTS) & trans-membrane (TM) deleted forms or other outer mitochondria outer membrane proteins, could interact with Tom40 upon CCCP treatment and the interaction ability was more than 20 times stronger than that of DMSO control. When the added CCCP is washed out, the interaction between full length PINK1 and Tom40 declined rapidly. PINK1 with removed or mutated TM can interact with Tom40 even in the absence of CCCP. **Conclusion** The accumulated PINK1 on the outer membrane of damaged mitochondria is just stuck on the TOM complex instead of integrated into the lipid bilayer.

【Key words】 Parkinson's disease PINK1 TOM complex Dual localization

帕金森氏病是第二大神经退行性疾病, 多数是散发的, 但也有 10% 的遗传性病例。其中, PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) 被发现是一个帕金森氏病的相关基因, 它的突变能够导致早发的青少年帕金森氏病。PINK1 编码的蛋白是一个 581 个氨基酸的蛋白激酶, 主要分布在线粒体上。PINK1 的 N 端具有线粒体定位序列 (mitochondria targeting sequence, MTS) 和跨膜 (trans-membrane, TM) 序列, 其蛋白激酶结构域位于 C 端。在真核细胞中全长的 PINK1 能被进一步加工成去掉 MTS 和 TM 的成熟形式。研究发现^[1-3] 位于线粒体内膜上的一个蛋白酶 PARL 能够切

PINK1, 形成 55×10^3 大小的去掉了 MTS 和 TM 的 PINK1, 但是对于 PINK1 全长和 55×10^3 形式的亚细胞定位还存在很多的争议。有研究认为 PINK1 位于线粒体膜间隙 (IMS) 或者内膜上^[4], 而且还发现了线粒体内膜上的一个蛋白 TRAP1 是 PINK1 的磷酸化底物^[5]。后来的研究又表明了在线粒体失活的情况下, PINK1 能在线粒体的外膜上积累, 而 PINK1 被切掉 N 端的定位序列后会进入细胞质中并通过胞质中的蛋白酶体降解^[6,7]。这就提示 PINK1 在线粒体上有可能是双重定位的——既存在于线粒体 IMS, 同时也存在于线粒体外膜上, 然而定位的具体机制目前还不是很清楚。

TOM 复合体是将胞质中合成的蛋白向线粒体转运的重要复合体, 其中 Tom20 是线粒体外膜上的

受体,而 Tom40 在线粒体外膜上形成一个蛋白转运的通道。我们希望通过研究 PINK1 和 TOM 复合体蛋白的相互作用来研究 PINK1 在线粒体外膜上的定位,并通过和另外两个线粒体外膜蛋白 March5、MFF 以及膜间隙蛋白 HtrA2 的比较,来突出 PINK1 蛋白在线粒体上定位的特殊性。

1 材料与方法

1.1 材料

琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒均购自 OMEGA BIO-TEK;pcDNA3.1(+)-质粒购自 Invitrogen;各种限制性内切酶购自 New England Biolabs;DMEM 培养基购自 Hyclone;胎牛血清购自 Biowest;蛋白酶抑制剂 Cocktail、Dylight 680 和 Dylight 800 标记的 Western 二抗购自 Thermo Scientific;Flag 单克隆抗体购自 Prospect 公司;Protein G Agarose 珠子购自 Millipore;HEK293T 细胞购自 ATCC;其他生化试剂均为国产分析纯。CCCP 购自 BD Biosciences。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 用自己设计的 5'端带有 *EcoR* I 酶切位点,3'端带有 *Xba* I 或 *Xho* I 酶切位点的引物(GATCGAATTCGCCACCATGTTTCGGGCTAGGGCTGGGCC, GATCTCTAGACAGGGCTGCCTCCATGAGC, GATCCTCGAGCAGGGCTGCCTCCATGAGC),以 *PINK1* 的 cDNA 作为模板用 PCR 扩增出 *PINK1* 片段,将得到的片段用上述相应的酶切,并连到用同样酶切的 pcDNA3.1(+)-4Flag 载体上,再转化,涂板,挑菌,摇菌,小抽提,酶切检测,得到 pcDNA3.1(+)-*PINK1*-4Flag 和 pcDNA3.1(+)-*PINK1*(111-581)-4Flag 质粒,最后通过测序验证。pcDNA3.1(+)-4Flag 载体是将 4 个 Flag 标签通过 PCR 扩增出来,用 *Xba* I 和 *Apa* I 酶切并连接到 pcDNA3.1(+)-4Flag 载体上。pcDNA3.1(+)-*PINK1* Δ TM-4Flag 是用上述引物分别将 *PINK1*(1-92)和 *PINK1*(111-581) PCR 扩增出来,再用连接酶将两个片段连起来并按上述方法放到 pcDNA3.1(+)-4Flag 载体上。其他质粒,pcDNA3.1(+)-*EGFP*、pcDNA3.1(+)-N2Flag-March5、pcDNA3.1(+)-N2Flag-MFF、pcDNA3.1(+)-*HtrA2*-2Flag 和 pcDNA3.1(+)-*PINK1*R98F-4Flag 均来自本实验室成员的馈赠。

1.2.2 细胞培养与转染 HEK293T 细胞用含有 10%胎牛血清和 1%PS 的 DMEM 培养基在 37℃、

5%CO₂ 的培养箱中培养,2~3 d 传代一次。转染用的传代的 HEK293T 细胞株是一个永生化的细胞株,只要培养的细胞健康,传代数影响不大,因此实验中不考虑细胞代数。转染用 MegaTran 转染试剂,细胞密度、质粒与转染试剂的用量依照转染试剂说明书中推荐的量,在 DMEM 培养基中转染 4 h,然后换成完全培养基。

1.2.3 细胞分组干预 对于培养的 HEK293T 细胞,我们通过加入 10 μ mol/L 的线粒体解偶联剂 carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP)来使线粒体失去膜电势,从而模拟线粒体受损的状态。而对照组中则加入 DMSO,该组细胞中的线粒体功能正常。

1.2.3.1 Tom40、Tom20 与 PINK1 蛋白的相互作用 将培养的 HEK293T 细胞转染 pcDNA3.1(+)-*PINK1*-4Flag 质粒,并分成两组,以加入 DMSO 为对照,另一组加入 CCCP。转染后 24 h 加入 DMSO 或 CCCP,加药时间为 1 h,然后收样,以 flag 抗体做免疫共沉淀,用 Tom20 和 Tom40 的抗体做 Western blot 观察内源性 Tom20 和 Tom40 被 *PINK1* 共沉淀下来的量。

1.2.3.2 去掉 MTS 后观察线粒体外膜上 PINK1 与 TOM 复合物的相互作用 将培养的 HEK293T 细胞转染 pcDNA3.1(+)-*EGFP* 质粒(对照)或 pcDNA3.1(+)-*PINK1*(111-581)-4Flag,并分别加入 DMSO 或 CCCP,然后按和 1.2.3.1 相同的方法处理。

1.2.3.3 Tom40 及 Tom20 与线粒体外膜蛋白 March5、MFF 的相互作用 将培养的 HEK293T 细胞分别转染 pcDNA3.1(+)-N2Flag-March5 和 pcDNA3.1(+)-N2Flag-MFF 质粒,然后按和 1.2.3.1 相同的方法处理。

1.2.3.4 加入和去掉 CCCP 后 PINK1 和 Tom40 相互作用的变化 HEK293T 细胞转染 pcDNA3.1(+)-*PINK1*-4Flag 质粒,转染后 24 h 对照组加入 DMSO 处理 2 h,实验组加入 CCCP,分别处理 2 h、2.5 h、3 h、4 h,另外 3 组在 CCCP 处理 2 h 后将含有 CCCP 的培养基换成含有 DMSO 的培养基,再分别培养 0.5 h、1 h、2 h。其余处理方法同上。

1.2.3.5 Tom40 与膜间隙蛋白 HtrA2 的相互作用 HEK293T 细胞转入 pcDNA3.1(+)-*HtrA2*-2Flag 质粒,两组分别加入 DMSO 和 CCCP,其余处理方法同上。

1.2.3.6 Tom40 和去掉 TM 的 PINK1 的相互作

用 HEK293T 细胞分别转染 pcDNA3.1(+)-*PINK1*-4Flag 和 pcDNA3.1(+)-*PINK1* Δ TM-4Flag 质粒,再分别加入 DMSO 和 CCCP,其余处理方法同上。

1.2.3.7 Tom40 和 TM 序列突变的 PINK1 的相互作用 HEK293T 细胞分别转染 pcDNA3.1(+)-*PINK1*-4Flag 和 pcDNA3.1(+)-*PINK1*R98F-4Flag 质粒,再分别加入 DMSO 和 CCCP,其余处理方法同上。

1.2.4 免疫共沉淀 免疫共沉淀(CoIP)可检测蛋白之间的相互作用。6 孔板每孔的细胞分别转染不同的质粒,在转染后培养 24 h,去掉培养液,用 PBS 洗一次,再每孔加入 200 μ L 含有蛋白酶抑制剂的 NP-40 裂解液(1% NP-40,150 mmol/L NaCl,50 mmol/L Tris-HCl,pH7.5,1 mmol/L EDTA,蛋白酶抑制剂现用现加),裂解 0.5 h 以上,裂解后将裂解液转移到 EP 管中,以 14 000 r/min 离心,取上清,每孔加入 1 μ g Flag 抗体,4 $^{\circ}$ C 结合 2 h,再加入 15 μ L Protein-G 的珠子,在 4 $^{\circ}$ C 结合 1 h,然后用上述的 NP-40 裂解液洗 3 次珠子,最后将裂解液吸干,向珠子中加入 SDS 缓冲液(2% SDS,2 mmol/L DTT,4% 甘油,40 mmol/L Tris-HCl,pH6.8,0.01% 溴酚蓝),100 $^{\circ}$ C 煮 5 min。然后将所得样品用 Western blot 检测,检测到的荧光相对强度越强,说明蛋白之间的相互作用越强。

1.2.5 Western blot 检测 将全细胞裂解液(WCL,Whole Cell Lysate)或者 CoIP 处理后的样品用 10% 分离胶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离

后,用半干转器材将蛋白转至 PVDF 膜上(50V 恒压,2 h)。将转好的 PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭 1 h,以 Tom40、Tom20 或者 PINK1 的抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBST 洗膜 3 次,再用相应的荧光二抗在室温下孵育 1 h,PBST 洗膜 3 次,最后用 Li-Cor Odyssey 红外激光成像系统成像,用该成像系统自带的软件以 DMSO 组为对照组,将 DMSO 组的数据标准化为 1,分析各组蛋白条带灰度值的相对强度,即表示蛋白的相对量。

1.2.6 统计学方法 实验重复 3 次。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据之间采用 *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 线粒体外膜上积累的 PINK1 与 TOM 复合体的相互作用

CoIP 结果显示,在加入 DMSO 的情况下,PINK1 和 Tom20 以及 Tom40 没有明显的相互作用,而在加入线粒体解偶联剂 CCCP 的情况下,PINK1 和 Tom40 有较明显的相互作用(图 1A)。我们将加入 DMSO 的对照组的表示相互作用的条带标准化为 1,则加入 CCCP 的实验组的条带为 23.69 ± 4.39 ($P < 0.05$)。而我们发现去掉 PINK1 的线粒体定位序列后(*PINK1*(111-581)-4Flag),不论是否加入 CCCP,PINK1 都与 TOM 复合物没有相互作用(图 1B)。而另外两个线粒体外膜蛋白 MFF 和 March5 与 TOM 复合物均没有明显的相互作用(图 1C)。

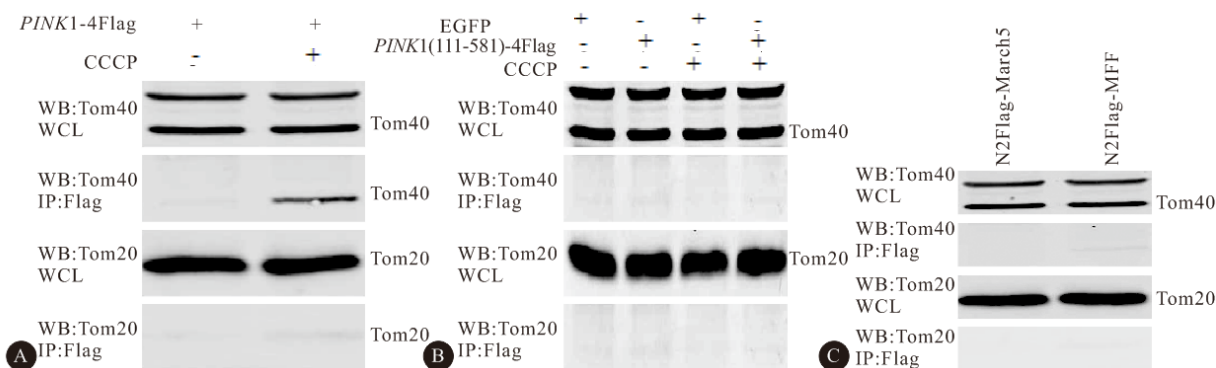


图 1 线粒体外膜上的 PINK1 和 Tom40 有相互作用

Fig 1 The outer membrane PINK1 interacts with Tom40

A: PINK1/Tom40 could interact with each other upon CCCP treatment (\pm CCCP, $P < 0.05$); B: PINK1 without MTS & TM could not interact with Tom40; C: March5 & MFF could not interact with Tom40 (WCL: Whole Cell Lysate, IP: Immunoprecipitation)

2.2 CCCP 处理下 PINK1 和 Tom40 的相互作用

实验结果显示,当加入 CCCP 的时候,随着时间推移,PINK1 和 Tom40 的相互作用只有少量的

减少。然而当将 CCCP 换为 DMSO 后,仅仅 0.5 h 后,PINK1 和 Tom40 的相互作用就迅速减弱,1 h 以后已经和加 DMSO 的对照没有太大区别(图 2)。

将 DMSO 对照组的条带标准化为 1, 则加入 CCCP 2 h、2.5 h、3 h、4 h 的条带灰度值分别为 20.80 ± 3.42 、 19.02 ± 3.11 、 17.28 ± 2.98 、 17.93 ± 3.14 , 而洗掉 CCCP 0.5 h、1 h、2 h 的条带灰度值分别为 4.42 ± 0.73 、 1.64 ± 0.28 、 1.08 ± 0.22 。

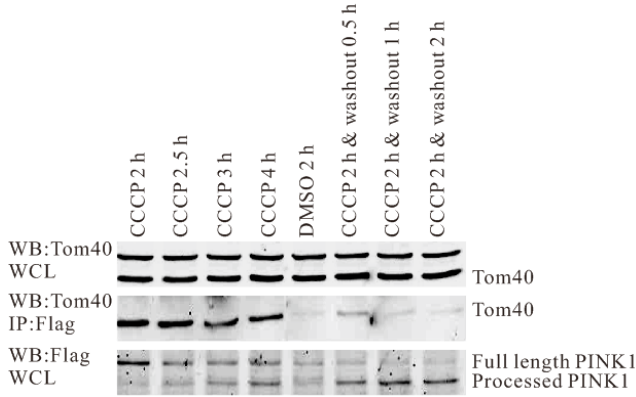


图 2 CCCP 诱导的 PINK1 和 Tom40 的相互作用

Fig 2 The CCCP induced interaction of PINK1/Tom40 decrease rapidly after the washout of CCCP. All of them were transfected with PINK1-4Flag plasmid

2.3 TM 序列对 PINK1 和 Tom40 相互作用的影响

不论是否加 CCCP, 都未观察到 HtrA2 和

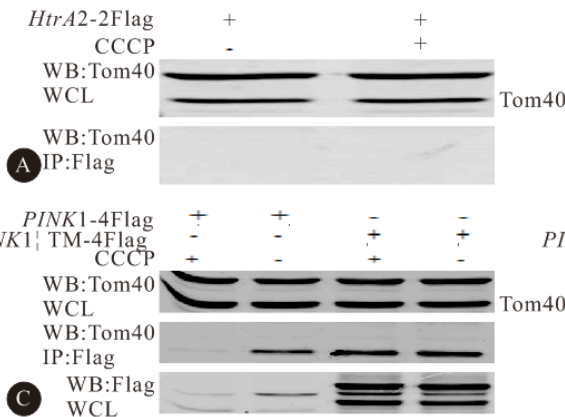


图 3 PINK1 和 Tom40 的相互作用特殊且不依赖于 TM 序列

Fig 3 PINK1/Tom40 interaction was unique and TM independent

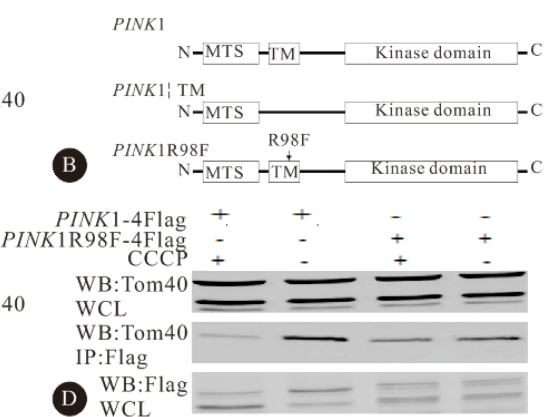
A: HtrA2/Tom40 had no interaction with or without CCCP treatment; B: Illustration of the mutated constructs of PINK1; PINK1/Tom40 interaction was not disrupted when the TM was removed (C) or mutated (D)

3 讨论

已有的数据表明 PINK1 蛋白有着它的特殊性, 也就是它在线粒体上的双重定位, 特别是它去掉了线粒体定位序列的形式在胞质和线粒体中均有发现, 而切它的蛋白酶 PARL 位于线粒体的内膜。通常认为, 对于健康的线粒体, 位于 IMS 的蛋白是无法随意的通过线粒体外膜的。

因此, 为了研究 PINK1 在线粒体上定位的具体机制, 我们首先观察了 PINK1 在外膜上的定位是否

TOM 复合体有明显的相互作用(图 3A)。进一步观察 PINK1 的 TM 序列对它与 Tom40 的相互作用是否有影响。通过 Western 检测发现, 去掉 TM 的 PINK1(图 3B)稳定性和野生型相比大大提高(图 3C)。CoIP 结果发现, 对于去掉 TM 的 PINK1, 即使不加入 CCCP, 也和 Tom40 有明显的相互作用。在加入 CCCP 之后, 同样有明显的相互作用(图 3C)。将表达野生型的 PINK1 蛋白并用 DMSO 处理的样本作为对照组标准化为 1, 则过表达野生型蛋白并用 CCCP 处理的样本条带灰度值为 17.38 ± 2.87 , 过表达突变型蛋白并分别用 DMSO 和 CCCP 处理的样本条带灰度值分别为 20.58 ± 3.74 、 21.99 ± 3.45 。表达突变型蛋白的两组样品与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$), 而突变组中不论是否加入 CCCP 变化较不明显。用 TM 突变的 PINK1R98F-4Flag 得到和上面相类似的结果(图 3D)。对照组为 1 时, 野生型 CCCP 组为 19.79 ± 3.25 , 突变型 DMSO 组为 7.33 ± 1.49 , 突变型 CCCP 组为 9.84 ± 1.83 。野生型 CCCP 组与突变型的两组数据差异有统计学意义($P < 0.05$)。



和普通的外膜蛋白一样。我们的实验显示在线粒体失去膜电势的情况下, PINK1 与 Tom40 有较强的相互作用, 而这个现象与普通的外膜蛋白是不一样的。像 March5 或 MFF 这样的外膜蛋白是直接位于脂质双分子层上的, 即使与 TOM 复合体有相互作用那也是一个瞬时过程。考虑到 Tom40 是一个外膜通道, 因此 CCCP 处理情况下 PINK1 的外膜定位很有可能是位于 Tom40 的通道内, 而并没有转移到外膜的脂质双分子层上。

接下来我们又观察了在线粒体膜电势恢复后,

PINK1 和 Tom40 相互作用的变化。实验结果表明一旦线粒体的内膜电势恢复, PINK1 和 Tom40 的相互作用也迅速消失, 说明在外膜上积累的 PINK1 能够恢复向线粒体内部转运直到被 PARL 所切。同时, 也有研究表明, 当 CCCP 去掉后, PINK1 在外膜上的积累亦会很快消失^[7], 提示 PINK1 在外膜上的积累可能是由于它转运和加工过程的一种停滞。而 HtrA2 和 Tom40 相互作用的实验说明了 PINK1 在线粒体膜电势消失的时候表现出来的与 Tom40 通道的强相互作用的情况对于其他线粒体蛋白并非适用, 而是一种特有的模式。

众所周知, TM 序列是一段有较高疏水性的序列, 在蛋白的线粒体转运过程中可以嵌入到线粒体内膜或外膜的脂质双分子层中。而且对于 PINK1 来说, PARL 对 PINK1 的切割位点位于 TM 上^[2], 之前还有模型认为 PINK1 的外膜定位是依赖于它的 TM 的。我们用去掉或者突变掉 TM 的 PINK1 做的和 Tom40 相互作用的实验说明, PINK1 和 Tom40 的相互作用并不依赖于它的 TM 序列, 可能只与前面的 MTS 和后面的激酶结构域有关。

综上所述, 我们的实验结果显示了对于 PINK1 在线粒体上具有双重定位的这样一种模型。也就是在转运过程中, 当 PINK1 的 TM 到达线粒体内膜的时候, 它的激酶结构域或者已经进入 IMS, 或者仍然位于线粒体外, 结合在 Tom40 的通道中。这样当 PARL 切掉它的定位序列之后, 少部分位于线粒体 IMS 中, 而大部分则直接退回到细胞质中, 并被蛋白酶体很快的降解掉。当线粒体失活后 (CCCP 加入), PARL 不能切 PINK1, 大部分的 PINK1 卡在 Tom40 的通道内, 但并没有通过 TM 转移到脂质双分子层中, 因此一旦线粒体的活性恢复 (洗掉 CCCP) 后, 又能继续转运并被 PARL 所切。

这样一种 PINK1 的定位方式虽然特殊, 但也并非个例。早在 2005 年, Dagda 等^[8]便发现另一个线粒体蛋白 Phosphatase 2A 能以类似的方式定位在线粒体的外膜上。实际上, 在我们之前已经有数据提示了 PINK1 可能具有这样的一种定位形式。Lin 等^[9]发现 HSP90 是 PINK1 的一个相互作用蛋白, 它一方面能够稳定 55×10^3 大小的 PINK1, 另一方面, HSP90 通过和 PINK1 激酶结构域的相互作用阻止了 PINK1 完全进入到线粒体内部^[10]。而

Meissner 等^[3]进一步详细阐述了这样一种模型。然而, 这个模型是从一系列 PINK1 定位的数据间接得出的, 仍然缺少直接的证据。我们的结果首次提供了直接的证据证明 PINK1 的外膜定位是位于线粒体外膜上的 Tom40 的通道内, 该结论有助于进一步阐明 PINK1 在清除受损线粒体中是怎样发挥作用的。

参 考 文 献

- 1 Jin SM, Lazarou M, Wang C, *et al.* Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol*, 2010; 191(5): 933-942.
- 2 Deas E, Plun-Favreau H, Gandhi S, *et al.* PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Hum Mol Genet*, 2011; 20(5): 867-879.
- 3 Meissner C, Lorenz H, Weihofen A, *et al.* The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human PINK1 to regulate PINK1 trafficking. *J Neurochem*, 2011; 117(5): 856-867.
- 4 Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, *et al.* Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet*, 2005; 14 (22): 3477-3492.
- 5 Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS, *et al.* PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biol*, 2007; 5(7): e172.
- 6 Zhou C, Huang Y, Shao Y, *et al.* The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105(33): 12022-12027.
- 7 Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, *et al.* PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol*, 2010; 8(1): e1000298.
- 8 Dagda RK, Barwacz CA, Cribbs JT, *et al.* Unfolding-resistant translocase targeting: a novel mechanism for outer mitochondrial membrane localization exemplified by the B β 2 regulatory subunit of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, 2005; 280(29): 27375-27382.
- 9 Lin W, Kang UJ. Characterization of PINK1 processing, stability, and subcellular localization. *J Neurochem*, 2008; 106(1): 464-474.
- 10 Lin W, Kang UJ. Structural determinants of PINK1 topology and dual subcellular distribution. *BMC Cell Biol*, 2010; 11(1): 90.

(2012-08-22 收稿, 2012-12-11 修回)

编辑 吕 熙