

α -突触核蛋白在突触囊泡循环中的作用研究进展

刘聪聪 孟兰霞 张振涛

【中图分类号】 R742 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2022)06-0582-03

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2022.06.020

突触是神经元之间、神经元与效应器细胞之间相互接触并实现功能联系的部位,由突触前膜、突触间隙和突触后膜构成^[1]。突触前膜内含有大量神经递质,以囊泡的形式储存和释放,发挥着信息传递等重要作用。突触功能障碍是帕金森病、阿尔茨海默病等神经退行性疾病早期、共同的病理改变,但导致突触功能障碍的机制尚未阐明^[2-4]。越来越多的证据表明, α -突触核蛋白(α -synuclein)在神经递质释放的过程中扮演着重要的角色^[5],而 α -synuclein异常折叠与帕金森病、路易体痴呆、多系统萎缩等疾病的发生发展密切相关。因此,了解 α -synuclein在突触囊泡循环中的作用,对于阐明神经退行性疾病的发病机制具有重要意义。本研究综述了生理情况下 α -synuclein在囊泡循环中的作用,并探讨了病理性 α -synuclein对囊泡循环的影响,以期更好地理解帕金森病等神经退行性疾病的发病过程,为这些疾病的治疗提供新的靶点。

1 α -Synuclein 的结构和功能

α -Synuclein是一种大量存在于中枢和周围神经系统突触前膜的小分子蛋白质,由140个氨基酸构成,分为3个结构域:N端为高度保守的两亲螺旋结构域,中央为疏水的非 β -淀粉样成分结构域,C端为带负电残基的酸性末端结构域^[6]。其中,N端结构域的错义突变与遗传性帕金森病的发生有关,中央结构域与蛋白质的聚集有关,而C端结构域与蛋白磷酸化等蛋白翻译后修饰有关^[7]。一般认为, α -synuclein在生理情况下以可溶性单体或 α -螺旋四聚体形式存在,参与调节突触囊泡转运^[8-9]。然而,在某些病理情况下 α -synuclein会发生聚集,形成 β 片层样结构的不可溶性纤维,并沉积于神经元胞体及轴突内,称为路易小体或路易神经突,导致神经毒性、突触功能障碍、认知和运动功能障碍,参与帕金森病、路易体痴呆、多系统萎缩等多种神经退行性疾病的发生发展^[10-11]。在囊泡循环的过程中突触前膜的囊泡通过胞吐作用将神经递质释放到突触间隙,然后通过内吞作用将囊泡回收至突触前膜内^[12-14]。其中,囊泡与质膜的融合、分离都伴随着膜曲率的改变。有研究发现,生理情况下的 α -synuclein单体具有识别并产生膜曲率的功能,因而可能在囊泡的胞吐与内吞过程中发挥着重要作用^[15]。 α -Synuclein可以与酸性脂膜发生紧密结合^[16],且优先与较小的囊泡结合,说明 α -synuclein不仅能识别膜曲率,而且对膜曲率

高的囊泡更具亲和力^[17]。 α -Synuclein的N端及中央疏水区可以形成2个反向平行的 α -螺旋结构,并平行于质膜排列,其疏水面可以插入双层质膜的外层,造成双层质膜内、外层的曲率不对称,因而能够产生膜曲率^[18-19]。 α -Synuclein单体蛋白通过感知并产生膜曲率在囊泡循环过程中发挥重要作用,然而 α -synuclein聚集体以及突变体均不具备该功能^[20]。因此, α -synuclein聚集体或者突变体可能因丧失了调节囊泡与质膜曲率的作用,从而影响囊泡的释放与内吞。

2 α -Synuclein 参与囊泡循环

突触囊泡的循环主要包括囊泡的释放、内吞和再循环等步骤。首先,突触前膜的囊泡锚定于前膜的活性区,通过对接、启动和融合等连续步骤,完成囊泡的释放过程^[21];其次,通过网格蛋白介导的内吞(Clatrin-mediated endocytosis, CME)蛋白介导的快速内吞(Fast endophilin-mediated endocytosis, FEME)和瞬时融合后分离(Kiss-and-run)等多种方式回收囊泡^[22-23];最后,囊泡通过转运蛋白获取神经递质,再次参与释放。 α -Synuclein几乎参与了囊泡循环过程中的所有阶段。

2.1 α -Synuclein 参与囊泡的释放

囊泡的释放主要包括对接、启动和融合等3个步骤。突触前膜的囊泡主要分布于3个功能池:1个是与突触前膜紧密接触、在生理刺激下立即发生释放的易释放池;1个是用于补充易释放池的回收池;还有1个是在回收池耗尽后被招募的储备池^[24]。首先,回收池或储备池的囊泡通过突触融合蛋白结合蛋白1(Syntaxin binding protein 1, STXBP1)、Rab3A蛋白等多种蛋白介导,锚定于突触前膜的活性区,构成易释放池^[25];随后对接的囊泡经历一系列激活过程,为释放做好准备;最后通过钙离子介导囊泡与质膜的融合,将囊泡内的神经递质释放至突触间隙,完成囊泡的释放过程^[26]。

2.1.1 α -Synuclein 抑制囊泡的对接和启动 生理情况下位于突触前膜的 α -synuclein可以同时结合2个不同的囊泡,从而促进储备池中囊泡的聚集,进而减少对接囊泡的数量^[27]。有研究通过在七鳃鳗网状脊髓的突触中注射 α -synuclein抗体,发现 α -synuclein的缺失导致大型囊泡集群分散成了较小的囊泡集群,甚至是单个囊泡,证明 α -synuclein能够调节脊椎动物突触囊泡聚集和对接的作用^[28]。同样,在海马神经元中适度过表达 α -synuclein能够减少对接的囊泡数量,增加远端储备池中的囊泡数量^[29],说明 α -synuclein可以通过促进储备池中囊泡的聚集、抑制囊泡的对接而发挥调控囊泡释放的作用^[30-31]。还有研究在嗜铬细胞系中过表达野生

基金项目:国家重点研发计划(No. 2019YFE0115900)

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内科[刘聪聪 孟兰霞 张振涛(通信作者)]

型或突变型 α -synuclein, 结果发现儿茶酚胺的释放受到抑制, 但钙阈值和释放的协同性没有改变, 说明 α -synuclein 可以抑制囊泡融合前的启动过程^[32]。

囊泡的对接局限于突触前膜活性区, 已有研究证明病理性 α -synuclein 可在活性区发生沉积^[33]。因此, 病理性沉积的 α -synuclein 一方面可能阻碍了活性区其他蛋白的运输、影响突触蛋白行使正常功能及发挥代偿作用; 另一方面也可能激活了活性区蛋白酶系统, 导致活性区蛋白被降解, 直接影响囊泡的对接和启动^[34]。

2.1.2 α -Synuclein 参与囊泡融合 膜融合是囊泡释放的关键步骤, 主要由可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着受体蛋白家族 (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, SNAREs) 介导, 主要包括囊泡相关膜蛋白 (Vesicle-associated membrane protein, VAMP-2)、25 千道尔顿突触体相关蛋白 (The 25 kDa synaptosomal-associated protein, SNAP-25) 和突触融合蛋白-1 (Sntaxin-1, STX-1)。VAMP-2 蛋白定位于囊泡, 称为囊泡相关 SNAREs 蛋白 (Vesicle-associated SNAREs, v-SNAREs); SNAP-25 和 STX-1 蛋白定位于质膜, 称为靶膜相关 SNAREs 蛋白 (Target-membrane-associated SNAREs, t-SNAREs)^[35-36]。v-SNAREs 与 t-SNAREs 在钙离子激活下形成四螺旋束复合体, 以分子拉链的形式将囊泡和质膜逐渐拉近, 并促使融合孔的形成, 使囊泡和质膜相互融合^[37-38]。

生理情况下 α -synuclein 可以作为分子伴侣, 通过直接结合 VAMP-2 和囊泡上的磷脂, 促进 SNARE 复合体的组装与维持, 而不促进囊泡的释放^[39-40]。也有研究表明, 内源性过表达野生型 α -synuclein 均可促进融合孔扩张、抑制融合孔闭合, 而过表达导致帕金森病相关的 A30P, A53T 突变型 α -synuclein 则没有该作用, 且过表达野生型及突变型 α -synuclein 均对囊泡的释放具有抑制作用, 说明 α -synuclein 在生理条件下可以促进融合孔扩张, 而在病理条件下抑制囊泡的释放^[41]。

病理情况下 α -synuclein 寡聚体优先与囊泡上的 VAMP-2 结合, 从而阻碍了囊泡与质膜的对接, 干扰 SNAREs 复合体的形成, 抑制神经递质释放^[42-43]。此外, Rab3A 蛋白是小鸟嘌呤核苷酸结合蛋白, 可通过与三磷酸鸟苷酸 (Guanosine triphosphate, GTP) 结合或水解来改变对囊泡的亲合力、调节囊泡运输而病理性 α -synuclein 增强了自身与 Rab3A 的相互作用, 减少了 Rab3A 与其下游效应因子 Rab 亲和蛋白 (Rabphilin) 的结合, 因此可能使 Rab3A 在囊泡转运过程中的调节受阻, 导致神经递质释放受到影响^[44]。

2.2 α -Synuclein 参与囊泡的内吞

为了防止囊泡循环池的耗竭以及突触前膜的无限扩大, 囊泡的内吞与胞吐紧密耦合, 并主要通过网格蛋白介导囊泡的回收^[45]。网格蛋白以配体-受体结合的形式覆盖于质膜内小叶表面, 介导膜内陷形成有被小窝, 进而形成网格蛋白包裹的囊泡, 即有被小泡; 随后网格蛋白脱膜释放囊泡, 以便于囊泡在细胞内转运^[46-47]。 α -Synuclein 在这一过程中发挥的作用较为复杂, 它可以在内吞过程中介导细胞膜的弯曲; 同时 α -synuclein 还与囊泡上的 VAMP-2 相互作用, 促进囊

泡的聚集, 限制囊泡的动员与回收^[48-49]。

还有研究表明, α -synuclein 单体及其低聚物会损害网格蛋白介导内吞作用的不同阶段, 导致突触囊泡丢失^[50]。将 α -synuclein 单体注射到七鳃鳗网状脊髓突触中, 有被小泡增加, 表明 α -synuclein 单体损害了网格蛋白脱膜的机制。注射 α -synuclein 二聚体增加了沿着质膜的有被小窝, 表明 α -synuclein 低聚物损害了囊泡与质膜的分离, 而注射人 α -synuclein 多聚体似乎并未改变网格蛋白介导的内吞作用^[50]。

3 结束语

综上所述, α -synuclein 可以作为膜曲率感受器来参与囊泡释放和内吞过程, 并作为 SNAREs 复合体的蛋白伴侣调控囊泡的释放, 而病理性 α -synuclein 因序列、构象或浓度的改变, 丧失了生理功能, 导致突触囊泡聚集受损或功能失调、SNAREs 复合体减少, 从而抑制了神经递质的释放, 影响神经元长期的功能及寿命, 这或许是病理性 α -synuclein 导致神经退行性疾病突触功能障碍的原因之一。

值得注意的是, α -synuclein 不仅具有调控囊泡运输的功能, 还具有调控基因表达的作用。近期有研究发现 α -synuclein 是处理小体 (Processing body, P-body) 和 mRNA 稳定性的调节因子, 其中 P-body 是细胞中 mRNA 代谢的主要区域^[51], 而 α -synuclein 与囊泡相互作用的部分也会与 P-body 相结合, 两种相互作用之间是否存在联系仍然未知, 但非常值得深入探索。

总之, 还需要更多深入的研究以明确 α -synuclein 在囊泡循环中的正常生理功能以及病理性 α -synuclein 在这一过程中的毒性作用, 以期预防或延缓突触功能障碍, 为早期治疗神经退行性疾病提供新的希望。

参 考 文 献

- [1] Südhof TC. Towards an understanding of synapse formation [J]. *Neuron*, 2018, 100(2): 276-293.
- [2] Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure [J]. *Science*, 2002, 298(5594): 789-791.
- [3] Schirini T, Madeo G, Martella G, et al. Early synaptic dysfunction in Parkinson's disease: Insights from animal models [J]. *Mov Disord*, 2016, 31(6): 802-813.
- [4] Nachman E, Verstreken P. Synaptic proteostasis in Parkinson's disease [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2022, 72: 72-79.
- [5] Longhena F, Faustini G, Spillantini MG, et al. Living in promiscuity: the multiple partners of Alpha-Synuclein at the synapse in physiology and pathology [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(1): 141.
- [6] Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2004, 363(9423): 1783-1793.
- [7] Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, et al. Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain [J]. *Brain*, 2013, 136(Pt 4): 1128-1138.
- [8] Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation [J]. *Nature*, 2011, 477(7362): 107-110.
- [9] Yc W, Krainc D. α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2017, 23

- (2); 1-13.
- [10] Yang W, Yu S. Synucleinopathies; common features and hippocampal manifestations[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(8): 1485-1501.
 - [11] Koga S, Sekiya H, Kondru N, et al. Neuropathology and molecular diagnosis of Synucleinopathies[J]. *Mol Neurodegener*, 2021, 16(1): 83.
 - [12] Zefirov AL. Vesicle cycle in the presynaptic nerve terminal[J]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 2007, 93(5): 544-562.
 - [13] Schweizer FE, Ryan TA. The synaptic vesicle: cycle of exocytosis and endocytosis[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2006, 16(3): 298-304.
 - [14] Rizzoli SO. Synaptic vesicle recycling: steps and principles[J]. *EMBO J*, 2014, 33(8): 788-822.
 - [15] Pranke IM, Morello V, Bigay J, et al. α -Synuclein and Alps motifs are membrane curvature sensors whose contrasting chemistry mediates selective vesicle binding[J]. *J Cell Biol*, 2011, 194(1): 89-103.
 - [16] Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, et al. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(16): 9443-9449.
 - [17] Middleton ER, Rhoades E. Effects of curvature and composition on α -synuclein binding to lipid vesicles[J]. *Biophys J*, 2010, 99(7): 2279-2288.
 - [18] Shen H, Pirruccello M, De Camilli P. SnapShot: membrane curvature sensors and generators[J]. *Cell*, 2012, 150(6): 1300, 1300.e1-2.
 - [19] Braun AR, Sevcik E, Chin P, et al. α -Synuclein induces both positive mean curvature and negative Gaussian curvature in membranes. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(5): 2613-2620.
 - [20] Westphal CH, Chandra SS. Monomeric synucleins generate membrane curvature[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(3): 1829-1840.
 - [21] Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2004, 27: 509-547.
 - [22] Chanaday NL, Cousin MA, Milosevic I, et al. The synaptic vesicle cycle revisited: new insights into the modes and mechanisms[J]. *J Neurosci*, 2019, 39(42): 8209-8216.
 - [23] Alabi AA, Tsien RW. Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission[J]. *Annu Rev Physiol*, 2013, 75: 393-422.
 - [24] Denker A, Rizzoli SO. Synaptic vesicle pools: an update[J]. *Front Synaptic Neurosci*, 2010, 2: 135.
 - [25] Becherer U, Rettig JP. docking. Priming, and release[J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 326(2): 393-407.
 - [26] Rizo J, Xu J. The synaptic vesicle release machinery[J]. *Annu Rev Biophys*, 2015, 44: 339-367.
 - [27] Fusco G, Pape T, Stephens AD, et al. Structural basis of synaptic vesicle assembly promoted by α -synuclein[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12563.
 - [28] Fouke KE, Wegman ME, Weber SA, et al. Synuclein regulates synaptic vesicle clustering and docking at a vertebrate synapse[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 774650.
 - [29] Nemani VM, Lu W, Berge V, et al. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis[J]. *Neuron*, 2010, 65(1): 66-79.
 - [30] Scott D, Roy S. α -Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility and maintains recycling-pool homeostasis[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(30): 10129-10135.
 - [31] Huang M, Wang B, Li X, et al. α -Synuclein: A multifunctional player in exocytosis, endocytosis, and vesicle recycling[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 28.
 - [32] Larsen K, Schmitz Y, Troyer MD, et al. Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(46): 11915-11922.
 - [33] Martin IJ, Pan Y, Price AC, et al. Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(1): 41-50.
 - [34] Bridi JC, Hirth F. Mechanisms of α -Synuclein induced synaptopathy in parkinson's disease[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 80.
 - [35] Jena BP. Assembly and disassembly of SNAREs in membrane fusion[J]. *Methods Cell Biol*, 2008, 90: 157-182.
 - [36] Yoon TY, Munson M. SNARE complex assembly and disassembly[J]. *Curr Biol*, 2018, 28(8): R397-R401.
 - [37] Baker RW, Hughson FM. Chaperoning SNARE assembly and disassembly[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(8): 465-479.
 - [38] Bombardier JP, Munson M. Three steps forward, two steps back: mechanistic insights into the assembly and disassembly of the SNARE complex[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2015, 29: 66-71.
 - [39] Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, et al. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro[J]. *Science*, 2010, 329(5999): 1663-1667.
 - [40] Gao V, Briano JA, Komer LE, et al. Functional and pathological effects of α -Synuclein on synaptic SNARE complexes[J]. *J Mol Biol*, 2022, 167714.
 - [41] Logan T, Bendor J, Toupin C, et al. α -Synuclein promotes dilation of the exocytotic fusion pore[J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(5): 681-689.
 - [42] Diao J, Burré J, Vivona S, et al. Native α -synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2[J]. *Elife*, 2013, 2: e00592.
 - [43] Choi BK, Choi MG, Jy K, et al. Large α -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(10): 4087-4092.
 - [44] Dalfó E, Barrachina M, Rosa JL, et al. Abnormal alpha-synuclein interactions with rab3a and rabphilin in diffuse Lewy body disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 16(1): 92-97.
 - [45] Calo L, Węgrzynowicz M, Santiviáñez-Pérez J, et al. Synaptic failure and α -synuclein[J]. *Mov Disord*, 2016, 31(2): 169-177.
 - [46] Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(5): 313-326.
 - [47] Mettlen M, Chen PH, Srinivasan S, et al. Regulation of Clathrin-Mediated endocytosis[J]. *Annu Rev Biochem*, 2018, 87: 871-896.
 - [48] Wang L, Das U, Scott DA, et al. α -synuclein multimers cluster synaptic vesicles and attenuate recycling[J]. *Curr Biol*, 2014, 24(19): 2319-2326.
 - [49] Sun J, Wang L, Bao H, et al. Functional cooperation of α -synuclein and VAMP2 in synaptic vesicle recycling[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(23): 11113-11115.
 - [50] Medeiros AT, Soll LG, Tessari I, et al. α -Synuclein dimers impair vesicle fission during Clathrin-Mediated synaptic vesicle recycling[J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 388.
 - [51] Hallacı E, Kayatekin C, Nazeen S, et al. The Parkinson's disease protein alpha-synuclein is a modulator of processing bodies and mRNA stability[J]. *Cell*, 2022, 185(12): 2035-2056, e33.