

特约综述



陈良怡教授, 北京大学分子医学研究所细胞分泌和代谢研究室主任, 博士生导师。目前的研究兴趣主要集中在为在体研究开发新的高时空分辨率的荧光成像技术。陈良怡教授实验室利用这些新技术, 以斑马鱼和小鼠为模型, 研究血糖的调控及糖尿病的发病机制。作为通讯作者, 陈良怡教授已经在Dev Cell、Cell Res、Proc Natl Acad Sci USA、Biophys J、Biomed Opt Express、Diabetes及Diabetologia等期刊上发表多篇论文。自2012年以来, 陈良怡教授开始以资深教员身份服务于Faculty of 1000 Biology的神经信号传导机制部, 还多次受邀在学术团体如OSA、SPIE和Biophysical Society组织的各种国际学术会议上做特邀报告。

可兴奋细胞胞吐胞吞的耦联机制

刘彦梅* 郑晓璐 袁天一 陈良怡*

(生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京大学分子医学研究所, 北京 100871)

摘要 调节型胞吐存在于神经元、内分泌细胞和外分泌细胞等可兴奋细胞以及免疫细胞等特化细胞中, 是复杂而精确调节的分泌过程。其作用广泛, 与神经信号传递、激素释放、免疫反应等重要的生理活动密切相关。调节型胞吐发生后, 在分秒的时间尺度上, 可兴奋性细胞快速启动与胞吐发生位置密切相关的调控型胞吞, 回收细胞膜脂质和囊泡的膜蛋白, 迅速清除分泌位点上由于胞吐而留下的蛋白以利于下一轮的分泌, 回收并填充可释放囊泡库, 维持细胞膜的平衡。该文先分别介绍可兴奋细胞中胞吐和胞吞的主要模式, 然后探讨了它们之间耦联的机制。

关键词 胞吐; 胞吞; 耦联; 可兴奋细胞; 网格蛋白

The Coupling Mechanism of Exocytosis and Endocytosis in the Excitable Cells

Liu Yanmei*, Zheng Xiaolu, Yuan Tianyi, Chen Liangyi*

(The State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology,
Institute of Molecular Medicine, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Regulative exocytosis, existing in the excitable cells including neurons, endocrine cells and exocrine cells, is precisely regulated and mediates important physiological activities such as neurotransmitters

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2013CB531200)和国家自然科学基金(批准号: 81222020、31221002、31327901、31570839和31301186)资助的课题
*通讯作者。Tel: 010-62765725, E-mail: yanmeiliu@pku.edu.cn; Tel: 010-62764959, E-mail: lychen@pku.edu.cn

This work was supported by the Major State Basic Research Program of China (Grant No.2013CB531200) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81222020, 31221002, 31327901, 31570839, 31301186)

*Corresponding authors. Tel: +86-10-62765725, E-mail: yanmeiliu@pku.edu.cn; Tel: +86-10-62764959, E-mail: lychen@pku.edu.cn

and hormones release. Following exocytosis, coupled endocytosis occurs within seconds to minutes at spatially correlated sites to retrieve vesicular membrane and proteins on the plasma membrane. The rapid clearance of the vesicle membrane and protein from the exocytic sites will facilitate the next round exocytosis of vesicles at the release sites, balance of surface membrane homeostasis and secretory vesicles recycling. Here we review different modes of exocytosis and endocytosis, and explore the mechanisms of spatiotemporal exo-endocytosis coupling based on the current knowledge and our recent experimental data.

Keywords exocytosis; endocytosis; coupling; excitable cells; clathrin

细胞内待分泌的生物分子包裹在脂质双层膜组成的囊泡中, 移动到细胞膜附近, 通过囊泡膜与细胞膜融合而排出细胞外的过程, 叫做胞吐。细胞胞吐有组成型(constitutive)和调节型(regulative)两种^[1]。所有的真核细胞都存在组成型胞吐, 其分泌不受外界刺激的调节, 主要作用是更新细胞质膜脂和蛋白的组成, 调节细胞外基质, 释放营养成分和信号分子等^[1-2]。调节型胞吐存在于神经元、内分泌细胞和外分泌细胞等可兴奋细胞以及免疫细胞等特化细胞中。当细胞受到胞外信号刺激时, 分泌囊泡与细胞膜发生融合并将囊泡内的内容物释放出去^[3-4]。调节型胞吐是复杂而精确调节的分泌过程, 其作用广泛, 与神经信号传递、激素释放、免疫反应等重要的生理活动密切相关。

胞吞是与胞吐相对应的基本生命现象, 是细胞与外界交换物质的重要途径, 介导外界营养摄取和细胞膜脂质和膜蛋白回收, 维持细胞膜平衡和细胞形态、控制生长分化、调节胞内信号转导过程、吞噬致病菌等的重要功能^[5]。细胞需要摄取的大分子、膜成分与蛋白分子通过细胞膜内陷形成小囊, 接着通过脂双层融合、切断形成独立的囊泡进入细胞内部, 完成物质的循环利用。最经典的例子是低密度脂蛋白通过结合细胞膜上的低密度脂蛋白受体[the low-density lipoprotein (LDL) receptor], 经由依赖于网格蛋白(clathrin)的途径进入细胞内累积。非可兴奋细胞上的胞吞过程大多数是组成型的, 速度比较缓慢, 空间上随机发生。与非可兴奋性细胞不同, 可兴奋性细胞上存在着调控型的胞吞。它在胞吐发生后快速启动, 在空间位置上胞吞与胞吐的位置密切相关, 回收细胞膜脂质和囊泡的膜蛋白, 迅速清除分泌位点上由于胞吐而留下的蛋白以利于下一轮的分泌、回收并填充可释放囊泡库, 维持了细胞的活性和持续感受刺激的反应能力并维持细胞膜的平衡^[6]。

胞吞受到抑制时, 由于胞吐也会受到抑制会导致神经突触的短时程抑制^[7]。可兴奋细胞的胞吞如何与胞吐在时间和空间上耦联的机制一直以来并不清楚, 本文先分别介绍可兴奋细胞中胞吐和胞吞的主要模式, 然后探讨它们之间耦联的机制。

1 胞吐的机制和不同模式

1.1 胞吐的机制

可兴奋细胞去极化后, 细胞膜上电压依赖的钙通道打开, 产生瞬时钙离子内流, 胞内钙浓度升高, 启动调控型的囊泡胞吐^[2,8-9]。

囊泡在细胞膜附近锚定、启动、膜融合的过程中, 有多种调节蛋白的参与。其中, 最核心的蛋白包括SNARE[soluble NSF attachment protein (SNAP) receptor]蛋白复合体(细胞膜上的syntaxin、SNAP-25(synaptosomal-associated protein-25)和囊泡膜蛋白VAMP(vesicle associated membrane proteins)组成、SM蛋白[Sec1/mammalian uncoordinated (Munc)-18-1]、Munc13、synaptotagmin和complexin等^[10-11]。这些蛋白在真核细胞中非常保守, 其中, SNARE蛋白是为囊泡膜融合提供能量的核心分子^[12]。

胞吐发生的过程大致可以分为4个步骤^[10]: (1)细胞膜上的syntaxin蛋白分别与SNAP-25或Munc18-1发生1:1的结合, 形成syntaxin/SNAP-25/Munc18-1复合物。(2)囊泡到达细胞膜下发生锚定时, 囊泡上的VAMP2(也称synaptobrevin-2)蛋白插入复合物中。来自于囊泡膜的synaptotagmin 1参与调节复合物的形成, 协助了囊泡的锚定。(3)囊泡膜和细胞膜之间形成松散的SNARE复合体螺旋结构, 将囊泡与细胞膜进一步拉近, 并有complexin协调参与复合体的组装, 称为启动。此时的囊泡距离细胞膜很近, 能够感受钙的升高后发生囊泡与细胞膜的融合, 所以对应于电生理记录中的立即可释放囊泡库。(4)

随着钙离子的流入, Munc18-1脱离, 松散的SNARE复合体继续以拉链形式折叠, 螺旋折叠一直发生到跨膜区将能量传递给囊泡膜和细胞膜, 发生膜融合, 打开融合孔。

Synaptotagmin是钙离子感受器, 胞质区具有C2A、C2B结构域, 可以和 Ca^{2+} 结合发生构象改变^[13]。当synaptotagmin 1与 Ca^{2+} 结合后, 其C2A和C2B结构域能够部分插入细胞膜^[14-15], 一方面拉近了囊泡膜与细胞膜之间的距离, 另一方面改变细胞膜的弯曲度, 减少膜融合所需的能量^[16]。C2B结构域还可以结合细胞膜上的磷酸肌醇4,5-二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP_2), 其亲和性在与钙离子结合的状态下大大提高^[17-18]。因此, synaptotagmin 1也被认为与囊泡锚定在细胞膜的特定位置有关。Synaptotagmin 1可以与syntaxin、SNAP-25分别结合, 或结合syntaxin/SNAP-25二聚体, 在 Ca^{2+} 的作用下它们之间的结合更加紧密^[19]。Synaptotagmin与SNARE复合体的C-端相互作用, 结合位点靠近SNARE蛋白的跨膜区^[20]。因此, 当突变SNAP-25的C-端氨基酸时, 减弱与synaptotagmin的结合能力, 显著抑制调节型分泌^[21]。在synaptotagmin与SNARE蛋白的相互作用中, 另外一个重要蛋白是complexin, 它与synaptotagmin的共同相互作用调控了分泌。Complexin以 α -螺旋的形状与syntaxin和VAMP结合, 将SNARE复合体的组装钳制在中间态^[22]。Synaptotagmin与这个复合体的结合可以解除这种钳制状态^[23-24]。由于complexin和synaptotagmin都能与组装的SNARE蛋白结合, 它们在结合的过程中相互竞争^[22,24], Ca^{2+} 的流入使得synaptotagmin将complexin从复合物中移除, 从而调控了 Ca^{2+} 内流与分泌的同步性, 因此钙离子依赖的synaptotagmin结合也被认为是促进囊泡的快速融合的最后一步。最后, synaptotagmin与SNARE蛋白在C-端的相互作用, 也可能调节囊泡融合孔的形成、打开、扩张等动力学特性, 影响了分泌速度和胞吐的类型^[20,25]。

1.2 不同的胞吐模式

囊泡与细胞膜融合时有三种方式, 分别是Full-Collapse Fusion、Kiss-and-Run和Compound Exocytosis。经典的胞吐模式Full-Collapse Fusion是囊泡膜完全塌陷变平融合进细胞膜, 从而快速释放所有的囊泡内容物。在这种模式下, 囊泡膜脂质和蛋白会在细胞质膜上完全扩散。

Kiss-and-Run是一种非传统的分泌方式, 囊泡胞吐时通过一个短暂存在的、直径很小的一个融合孔释放内容物, 而囊泡的膜与蛋白保持原有的形态, 不与细胞膜融合。在短暂开放几毫秒后, 融合孔关闭, 囊泡与细胞膜分离, 完成回吞。尽管多种观测手段都已经在神经和内分泌细胞上证明了Kiss-and-Run的存在, 但其分子机制和生理功能仍不明晰。

Compound Exocytosis是第三种特殊形式的分泌, 表现为除了与细胞膜融合外, 囊泡之间也发生融合。多数情况下, 复合胞吐先由第一个囊泡与细胞膜的融合。之后, 细胞深处的囊泡再与这个与细胞膜融合, 但结构还未完全消失的囊泡发生次级融合。在某些细胞里, 多个囊泡之间也可以在与细胞膜接触之前相互之间发生融合, 再作为一个整体与细胞膜发生融合。尽管其分子机制仍不清楚, 通常认为, SNARE蛋白复合体及与其相互作用的蛋白也参与了Compound Exocytosis, 而这种类型的胞吐也被认为提高了细胞的分泌效率。

2 胞吞的模式和机制

可兴奋细胞上, 囊泡以不同模式与细胞膜融合。在融合完成后数秒内, 在融合位点附近会发生与之相耦联的胞吞, 包括网格蛋白介导的胞吞、囊泡完全回收的Kiss-and-Run及巨胞吞(bulk endocytosis)三种形式。即使是同一种细胞, 不同的刺激强度会诱发不同类型的胞吞, 胞吞具备可塑能力^[6]。以听觉区耳蜗核的神经末梢为例, 如单个动作电位的弱刺激可以诱发一个或者几个突触囊泡分泌, 伴随着一个时间常数为1~3 s的快速相胞吞。而中等程度刺激如一小串动作电位或者一个20 ms的去极化刺激可以诱发时间常数为10~30 s的慢速胞吞和巨胞吞。最后, 强烈刺激如长时程高频动作电位刺激或10个10 Hz的20 ms去极化刺激可以同时诱发出快速、慢速和巨胞吞^[6]。应用特异的抑制剂或者是基因沉默方法抑制clathrin介导的胞吞途径时, 可以抑制绝大多数的慢速相胞吞。因此, 网格蛋白clathrin介导的胞吞被认为是慢速相胞吞最主要的贡献模式。慢速相胞吞在几乎所有的可兴奋细胞的大多数的刺激下都会发生, 所以传统的网格蛋白clathrin介导的胞吞被认为是最重要的胞吞模式。但是, 在神经和内分泌细胞上, 抑制clathrin介导的胞吞并不阻止快速胞吞的发生, 表明快速胞吞主要是由

Kiss-and-Run和巨胞吞所介导的^[6]。

2.1 网格蛋白clathrin介导的胞吞

Clathrin介导的胞吞(clathrin-mediated endocytosis, CME)是研究得最清楚的经典胞吞形式,在酵母、线虫、果蝇、大鼠、小鼠等物种中保守存在,整个过程涉及到数量庞大的相关蛋白的参与,包括60多个进化上保守的蛋白,是一个精确调控的复杂过程^[26]。Clathrin介导的胞吞的最大特点是形成了具有clathrin衣被的胞吞囊泡。Clathrin由25 kDa的轻链和190 kDa的重链组成,三条轻链和三条重链在彼此相互作用下形成三聚体形式的clathrin,称为clathrin triskelion。这些clathrin三聚体在多种衔接蛋白和辅助蛋白以及自身的相互作用下聚集,形成由六边形或五边形组成的足球状笼型结构。在哺乳动物细胞中一个成熟的、典型的clathrin衣被囊泡大约80 nm,含有至少60个clathrin三聚体^[27]。

在胞吞的过程中,许多不同的跨膜受体蛋白等货物蛋白(cargo protein)通过衔接蛋白(adaptor protein)被包裹到clathrin衣被小泡(clathrin coated vesicles, CCV)中。Clathrin介导的胞吞可以回收多种不同的货物蛋白,进化上也产生了不同的衔接蛋白和辅助蛋白(accessory protein),这些多样性的辅助分子也使得clathrin介导的胞吞可以识别不同的货物蛋白,具有广泛的适应性。有些衔接蛋白可以识别多种不同的膜受体,例如AP2(adaptor complex 2)蛋白,通常被认为是clathrin介导的胞吞过程中最重要的货物识别蛋白;相反,还有一些衔接蛋白特异性地识别膜受体,例如Dab2和ARH蛋白,它们识别LDL受体并专一性地介导它的回收^[28]。Clathrin衣被囊泡依赖衔接蛋白,可以对不同膜蛋白选择性地回收。然而,像AP2这样能够与不同受体蛋白结合的衔接蛋白如何对膜蛋白选择性地回收并不清楚,另外,CCV是否具有类似内涵体的蛋白分选功能也没有定论^[5]。

Clathrin介导的胞吞可分成五个步骤。(1)成核: FCHO蛋白自身二聚化形成香蕉状的弯曲形状,识别细胞膜曲率,并与细胞膜上的PIP₂结合并插入细胞膜,还能协助维持细胞膜的浅曲率弯曲^[29-30]。在成核过程中还有EPS15(epidermal growth factor receptor substrate 15)与intersectin蛋白的参与,它们含有EH结构域和SH3结构域的脚架蛋白(scaffolding protein),能够与很多蛋白发生相互作用,参与了AP2

和clathrin的多聚化^[31-32]。(2)货物选择: AP2被EPS15招募, AP2本身也可与细胞膜上的PIP₂结合^[33], 在与其相互作用下多聚化。AP2通过它的 μ 亚基识别并与膜受体等货物蛋白结合,将受体富集在AP2聚集区,并且AP2本身也在与货物蛋白的结合作用中稳定并进一步聚集。它可以招募clathrin、Dab2及Epsin等货物特异性的衔接蛋白和AP180等辅助蛋白^[34],完成对货物蛋白的识别和选择。Epsin蛋白能够楔状插入细胞膜,加大膜弯曲^[35]。此外,许多衔接蛋白和辅助蛋白既能和AP2结合又能与clathrin结合,进一步招募和稳定clathrin结构。(3)clathrin衣被的组装: 细胞中的clathrin三聚体被AP2和其他辅助蛋白不断招募, clathrin多聚化形成的衣被结构比较刚性,可以维持并介导了膜弯曲的进一步进行。如果没有招募到足够多的clathrin, AP2聚集的起始结构就不能够进一步成熟^[30]。伴随clathrin的招募与膜的逐渐弯曲, amphiphysin、SNX9(sorting nexin-9)、endophilin这些BAR(bin-amphiphysin-rvs)蛋白家族的成员逐渐被招募, 它们的结构呈月牙状,能够感受细胞膜的深度弯曲,并和FCHO蛋白类似地插入弯曲的双层膜并维持膜形状的稳定^[36]。(4)剪切: 成熟后的clathrin衣被囊泡在dynamin的作用下剪切与细胞膜分离。Dynamin是GTP酶,它受到amphiphysin、SNX9、endophilin蛋白的招募,这些BAR蛋白家族的成员含有的SH3结构域可以结合dynamin的多脯氨酸残基区域,而促使它来到clathrin衣被囊泡与细胞膜连接的位置^[37]。在这里, dynamin聚集围绕着衣被小泡的脖子,并利用GTP水解发生构象的变化,实现剪切^[38-39]。Dynamin是实现剪切的重要分子,它的招募也控制了clathrin衣被结构的寿命时间,而且使clathrin衣被囊泡最终发挥了回收膜货物的功能^[40]。(5)脱衣被: 从细胞膜上脱离下来的clathrin衣被小泡要在胞质中脱去衣被,下一步才能与内涵体结合或重新利用。脱衣被的过程是在auxilin、GAK(cyclin G-associated kinase)、HSC70(heat shock 70 kDa protein)等蛋白作用下进行的。完整的clathrin衣被结构十分稳定,需要外界的能量才能将其解聚, HSC70蛋白是ATP酶,利用ATP水解的能量将clathrin衣被解聚下来^[41],而auxilin和GAK蛋白协助了它的招募^[42]。在衣被囊泡脱衣被的过程中需要招募磷脂酶synaptojanin,转化膜上的磷脂酰肌醇,改变了衣被小泡的膜脂成分^[43],帮助AP2、Epsin、AP180等结合PIP₂的辅助蛋白从

膜上的解聚^[33,35]。Clathrin囊泡从起始、形成到最后的剪切、解聚,是一个复杂的过程,其中需要招募许多蛋白,因此整个过程比较缓慢^[27]。应用荧光显微镜成像方法可以实时地看到clathrin衣被结构的形成和组装过程,通过分析它们的荧光强度和寿命(lifetime)可以得到其形成的动力学。Loerke等^[40,44]在哺乳动物细胞中逐个分析clathrin衣被结构,并得到了它们的平均寿命约为60~90 s。所以,clathrin衣被结构的组装是一个慢速的过程。

与clathrin衣被囊泡组装的慢速过程相对,神经和内分泌细胞上与调节型分泌耦联的CME速度大概在3~15 s^[45-46]。例如,应用膜片钳技术测量细胞膜电容变化,去极化刺激在视网膜双极细胞中引起了CME和clathrin不依赖的胞吞,时间常数分别约为9.5 s和1 s^[46]。在海马神经元中,利用实时荧光成像观察到低频刺激会引发时间常数分别约为3 s和10 s的两个胞吞过程,都依赖于clathrin^[47]。当刺激增强时,胞吞过程变成单指数过程,时间常数约为15 s,同样是CME^[48]。而胰岛细胞中,用紫外光分解钙离子螯合物(photolysis of caged-Ca²⁺)或者一串去极化刺激来使细胞内钙离子浓度上升时,同样观察到依赖于clathrin和不依赖clathrin的两种胞吞,时间常数约为5 s和0.5 s^[45]。在非可兴奋性细胞上一个空间随机、缓慢形成的clathrin衣被结构和CME内吞过程以及在可兴奋细胞上如何与调节型分泌在时间和空间上耦联在一起的分子机制至今仍然不清楚,有待进一步阐明。

2.2 巨胞吞

在强烈的刺激下,出现一种巨胞吞,表现为大片细胞膜内凹形成类似内涵体的结构,而后囊泡从这些内涵体中通过出芽过程形成。它首先在蛙类的神经-肌肉接头中被发现,之后在中枢神经系统的各种突触以及胰岛 β 细胞中均被观察到。强去极化刺激引发的大量钙内流触发巨胞吞,其启动不依赖于网格蛋白clathrin。在某些细胞中巨胞吞依赖于dynamin,但是在dynamin基因敲除小鼠的海马神经元中用电镜同样可以观察到大量的巨胞吞结构。因此,巨胞吞的生理意义及分子机制有待进一步阐明。

3 胞吐和胞吞的耦联机制

为了维持细胞持续的分泌能力、对外界刺激的迅速响应、与环境的物质沟通以及细胞的正常形态

等,胞吞胞吐需要密切地耦联在一起^[6]。时间上,在可兴奋细胞受到外界刺激发生胞吐后的几秒到几分钟之内就会伴随发生与之相耦联的胞吞过程^[45,49]。空间上,有些胞吞胞吐发生在同一位置,如Kiss-and-Run。另外,有些胞吞就发生在胞吐位置的周围,如神经突触上的胞吐位置是活性区(active zone),而胞吞位置是周围活性区(peri-active zone)^[3]。

目前的研究发现,在时间和空间上介导胞吞和胞吐发生的分子可能包括突触活性区的支架蛋白(scaffolding proteins)、Ca²⁺及Ca²⁺的感受器synaptotagmin蛋白、膜脂质PIP₂等^[50]。

3.1 活性区蛋白耦联胞吞胞吐

在神经突触中,囊泡融合集中地发生在突触前膜的活性区,它是电子显微镜所观察到的包含电子致密物质的一片细胞膜区域。活性区在脊椎动物的中枢神经系统突触中呈大约200~500 nm直径的盘状区,这里集中了大量的囊泡^[51]。突触前膜活性区包含了大量的支架蛋白,它们具有多个结构域,可以通过蛋白-蛋白相互作用或蛋白-脂质相互作用招募不同蛋白来稳定结构,从而将活性区组织起来。五个进化上保守的支架蛋白构成了活性区的核心蛋白,包括ELKS(也叫作CAST1)、liprin、RIM(Rab3 interacting molecule)、RIM-BP(RIM binding protein)和Munc13。此外,piccolo与bassoon两个具有多功能域的大蛋白也是活性区的重要组成蛋白^[52-53]。

活性区的蛋白与胞吐密切相关。如活性区的RIM蛋白可以和G蛋白Rab3结合,调控了囊泡的运输与锚定^[54]。而Munc13参与改变SNARE/SM蛋白复合体组装的构象,从而调控了囊泡的启动和膜融合过程^[55]。另外,RIM蛋白及RIM-BP通过与电压依赖的钙离子通道相互作用将钙离子通道集中在活性区^[56],使得锚定在细胞膜下的囊泡与钙通道联系在一起,促进了分泌的快速进行。

活性区核心蛋白ELKS也在其他可兴奋细胞如胰岛 β 细胞和PC12细胞中表达,并与致密大囊泡在细胞质膜上连续融合的位点共定位^[57-58]。在PC12肾上腺嗜铬细胞中,ELKS还与RIM和bassoon等活性区蛋白共定位;过表达ELKS促进PC12细胞钙依赖的细胞分泌^[57]。此外,ELKS还在成纤维细胞中被发现较高表达在细胞的生长前端^[59],并与微管的定位有关。另外, α -liprin(LAR protein tyrosine phosphatase-interacting protein- α)、RIM、Munc13、RIM-BP也

在其他非神经的内分泌细胞中有表达^[51], 暗示了它们一起参与调控空间特异性的激素分泌。

另一方面, 活性区支架蛋白还与胞吞相关。ELKS通过与bassoon和piccolo蛋白相互作用, 连接actin及actin聚集的调控蛋白^[50], 包括Cdc42和NWASP(neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein)等, 而后两者又与clathrin衣被囊泡中的重要脚架蛋白intersectin和EPS15有相互作用^[60]。Intersectin既和clathrin衣被结构的成核有关, 又能和clathrin衣被结构中的AP2、stonin2、dynamin等众多蛋白相互作用^[30,33]。这样, 活性区的支架蛋白通过复杂的相互作用关系, 将clathrin衣被结构与胞吐在空间上耦联了起来。此外, 胞吞的剪切蛋白dynamin在胞吐中可能也起作用。动力学研究表明, dynamin可能与囊泡分泌时融合孔的打开与扩张有关^[61]。Dynamin可与clathrin衣被结构中的intersectin支架蛋白结合, 同时, intersectin与胞吐的核心蛋白SNAP-25也有相互作用^[62], 这些分子的联系可能对胞吞胞吐的耦联都有作用。

3.2 Ca^{2+} 、synaptotagmin、 PIP_2 对胞吞胞吐耦联的调控

Ca^{2+} 是最早被认为耦联了胞吞胞吐的重要因子^[3]。囊泡分泌受到钙离子内流的触发和钙离子浓度的调控。其中, synaptotagmin 1是囊泡分泌中 Ca^{2+} 的感受器, 它能够结合 Ca^{2+} , 促进其C2B结构域与细胞膜上的 PIP_2 结合, 部分插入细胞膜中, 拉近囊泡与细胞膜的距离, 并通过参与调控SNARE蛋白在C-端的组装而促进分泌的进行^[51]。胞吞也被发现受到 Ca^{2+} 的调控, Ca^{2+} 浓度的升高能够加速胞吞^[63]。 Ca^{2+} 还与清除胞吐位置的细胞膜的速度密切相关^[64-65]。在胞吞过程中, clathrin衣被的成熟过程与AP2等许多衔接蛋白和辅助蛋白的磷酸化与去磷酸化有关, 这些过程依赖于钙调蛋白calmodulin^[66]。去极化刺激后, 流入细胞内的 Ca^{2+} 与calmodulin结合, 激活钙依赖磷酸酶calcineurin, 去磷酸化dynamin I并使其与syndapin蛋白结合, 从而介导巨胞吞的发生^[67]。另外, 利用calmodulin的抑制剂或者通过敲除calcineurin催化亚基的实验, 学者们证明, calmodulin和calcineurin也参与调节快速和慢速胞吞^[6]。因此, Ca^{2+} 介导的calmodulin和calcineurin通路可能是耦联胞吞胞吐的分子基础。

Synaptotagmin 1除了作为 Ca^{2+} 的感受器调控胞

吐之外, 还作为细胞膜上待回收的典型货物蛋白, 被clathrin介导的胞吞回收。在synaptotagmin 1敲除的小鼠中, 胞吞的速度减慢了一倍^[68]。在果蝇中, 利用瞬时紫外光失活synaptotagmin 1蛋白后也完全阻断了synaptotagmin 1的胞吞回收^[69], 说明synaptotagmin 1也参与了胞吞胞吐耦联。但是, synaptotagmin 1是如何调控胞吞、使它与胞吐相耦联的机制仍不清楚。

细胞膜脂质也和胞吞胞吐的耦联相关。 PIP_2 是细胞膜上重要的脂质分子, 它与突触前膜活性区的许多分子相互作用, 此外, 还与细胞膜上的钙离子通道相互作用, 与活性区的蛋白复合体形成密切相关^[70]。 PIP_2 与分泌囊泡上的synaptotagmin有相互作用^[14], 同时分泌的核心蛋白syntaxin在细胞膜上与synaptotagmin的相互作用依赖于 PIP_2 ^[71], 暗示它与囊泡在膜上的锚定和分泌的位点有关。这些 PIP_2 依赖的蛋白相互作用可能参与调节可立即释放囊泡库(RRP)的大小^[72]。胞吞时 PIP_2 调节了clathrin衣被囊泡的起始、组装、成熟和剪切各个过程, 大量的clathrin衣被结构相关分子与 PIP_2 结合, 如衔接蛋白AP2和AP180、膜弯曲的感受和维持蛋白FCHO、amphiphysin, 辅助蛋白CALM(clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia)、 β -arrestin、Epsin、synaptojanin和剪切蛋白dynamin等^[29,73]; 所以, 细胞膜上的 PIP_2 是另一个空间上耦联胞吞和胞吐的重要分子。

3.3 细胞骨架对胞吞胞吐的耦联作用

包括囊泡的多种细胞器通过细胞骨架实现胞内的运输。细胞骨架主要有三类: 微管(microtubule)、微丝(microfilament)和中间丝, 其中微管和微丝的研究相对较多。微管由微管蛋白(tubulin)组装, 微丝由肌动蛋白(actin)组装, 它们在囊泡转运中起重要的作用。而它们如何影响分泌囊泡的胞吐与胞吞还不十分清楚。

从高尔基体出芽后, 新生成的囊泡沿着微管迅速地到达细胞膜附近, 并沿着微丝运动。人们发现, 肌动蛋白能够在细胞膜附近聚集, 可能与囊泡正确地到达细胞膜的位置、锚定和胞吐有关^[74]。药物干扰抑制actin的聚集或抑制马达蛋白myosin, 导致囊泡的快速和慢速分泌都减少, 而抑制微管聚集只影响了囊泡分泌的慢速相; 而且阻断actin的聚集或马达蛋白myosin, 囊泡在整个胞质的运动都受到了抑制, 而阻断微管聚集只影响了囊泡在核周的运动; 这

个结果表明, 微丝而不是微管对囊泡在膜下的运输十分重要^[75]。微丝在细胞膜下分布丰富, 去极化后, 胞外 Ca^{2+} 流入细胞时, 可解聚膜下的微丝网络, 促进囊泡与细胞膜融合^[76]。另一方面, Kiss-and-Run类型的胞吐又需要肌动蛋白微丝的帮助来维持融合孔不扩张以及维持整个囊泡的形状^[77]。有报道称, 囊泡上携带的Arp2/3(actin-related proteins)能够促进actin在囊泡附近成核和聚集, 促进囊泡分泌^[78]。总体来说, 微丝如何在胞吐中起作用仍然有争议。

肌动蛋白微丝在胞吞中参与了内吞囊泡最后的剪切以及内吞囊泡与细胞膜分离后向胞内的运输^[79-81]。在哺乳动物细胞中, 内吞囊泡的剪切主要由dynamin完成, actin参与协助剪切; 而在酵母中, 剪切过程则完全由actin负责^[82]。Actin围绕着内吞囊泡形成丝状网络, 随着actin的生长, 挤压内吞囊泡与细胞膜的连接处直至分离^[81]。随后, 胞吞后的囊泡在myosin马达蛋白的启动下沿着微丝向胞内运输, 进行循环利用^[79-80]。

Actin及其调节因子, 如Cdc42和NWASP、ABP蛋白(actin binding protein的一种)等分别与突触活性区支架蛋白piccolo直接或间接地相互作用^[50], Cdc42和NWASP也和clathrin衣被囊泡的重要组织蛋白intersectin等相互作用^[60]。这些暗示了微丝是突触活性区与周围活性区之间联通的骨架蛋白, 可能是联系胞吐与胞吞结构的桥梁。

微管如何影响胞吐和胞吞的分子机制并不明确。最近的研究表明, 微管可以通过微管连接蛋白CLASP(cytoplasmic linker associated protein)锚定到细胞膜下^[83]。由于CLASP的一个相互作用蛋白ELKS是分泌活性区的重要蛋白^[59], 我们间接推测微管可将囊泡运输到活性区。突触活性区上发现了膜下微管结构, 而且在SMN基因突变的细胞中, 突触活性区的减少也伴随着微管结构由粗丝或细丝状变成离散点状的现象^[84], 暗示微管与活性区的组织可能有关。与胞吞相关的, 膜下clathrin衣被结构的慢速和快速运输依赖于微管^[85-86]; 在超分辨荧光显微成像技术下, 观察到clathrin衣被结构和微管共定位^[87]; 近期结果表明, clathrin衣被囊泡通过AP2衔接蛋白与 α -tubulin乙酰转移酶(α -tubulin acetyltransferase, α -TAT)相连, α -TAT对微管进行翻译后乙酰化修饰并稳定微管结构, 从而介导胞吞囊泡和微管的相互作用^[88]。尽管有这些前期实验报道, 微管蛋白是否耦

联胞吞胞吐以及如何耦联胞吞与胞吐都不清楚。

3.4 胞吞胞吐耦联的新机制

最近, 我们利用全内反射显微镜观察了胰岛素分泌的INS-1细胞上的胞吞胞吐过程。我们发现了三种与胞吐时空耦联的CME。第一种是网格蛋白包裹的小窝在胞吐的位点预先形成, 在胞吐后瞬间被胞吞回收入细胞; 第二种是预先形成的网格蛋白包裹的小窝位于胞吐位点附近, 胞吐后迅速运动到胞吐位置, 然后被吞入。第三种是在胞吐发生后, 在胞吐位点原位形成网格蛋白包裹的小窝以及胞吞。第一、二种介导了与胞吐耦联的快速胞吞, 而第三种介导了与胞吐耦联的慢速胞吞。进一步研究第二种网格蛋白包裹小窝的位移机制, 我们发现, 其沿着细胞膜下的微管纤维移动到胞吐发生的位置。细胞内钙离子浓度升高触发分泌。另一方面, Ca^{2+} 会激活钙依赖的磷脂酶C(phospholipase C, PLC), 从而将 PIP_2 水解成为带着负曲率的二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)。我们观察到胞吐位点的DAG浓度会暂时升高, 从而减少局部膜张力, 促进网格蛋白包裹的小窝向胞吐位置移动。由于DAG可以激活胞吐的重要蛋白Munc13, 所以我们认为, DAG是一个新的胞吞胞吐的耦联分子^[89]。该机制在其他可兴奋细胞中是否存在需要进一步证明。

综上所述, 神经突触活性区蛋白、clathrin衣被结构的脚架蛋白、dynamin、细胞骨架、 Ca^{2+} 、囊泡膜蛋白synaptotagmin以及细胞膜上的 PIP_2 等诸多分子为胞吐胞吞的耦联提供了分子基础。新技术和新方法的出现将有助于揭示出更多胞吐胞吞的耦联机制。

参考文献 (References)

- 1 Burgess TL, Kelly RB. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol* 1987; 3: 243-93.
- 2 Zucker RS. Exocytosis: A molecular and physiological perspective. *Neuron* 1996; 17(6): 1049-55.
- 3 Murthy VN, de Camilli P. Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu Rev Neurosci* 2003; 26: 701-28.
- 4 Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 2004; 27: 509-47.
- 5 Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 857-902.
- 6 Wu LG, Hamid E, Shin W, Chiang HC. Exocytosis and endocytosis: Modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol* 2014; 76: 301-31.
- 7 Hua Y, Woehler A, Kahms M, Haucke V, Neher E, Klingauf J. Blocking endocytosis enhances short-term synaptic depression

- under conditions of normal availability of vesicles. *Neuron* 2013; 80(2): 343-9.
- 8 Chen H, Slepnev VI, Di Fiore PP, de Camilli P. The interaction of epsin and Eps15 with the clathrin adaptor AP-2 is inhibited by mitotic phosphorylation and enhanced by stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J Biol Chem* 1999; 274(6): 3257-60.
- 9 Jackson MB, Chapman ER. Fusion pores and fusion machines in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2006; 35: 135-60.
- 10 de Wit H, Walter AM, Milosevic I, Gulyás-Kovács A, Riedel D, Sørensen JB, *et al.* Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. *Cell* 2009; 138(5): 935-46.
- 11 Rizo J, Rosenmund C. Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15(7): 665-74.
- 12 Rizo J, Südhof TC. The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices—guilty as charged? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012; 28: 279-308.
- 13 Südhof TC. Synaptotagmins: Why so many? *J Biol Chem* 2002; 277(10): 7629-32.
- 14 Chapman ER. How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu Rev Biochem* 2008; 77: 615-41.
- 15 Chapman ER, Davis AF. Direct interaction of a Ca²⁺-binding loop of synaptotagmin with lipid bilayers. *J Biol Chem* 1998; 273(22): 13995-4001.
- 16 McMahon HT, Kozlov MM, Martens S. Membrane curvature in synaptic vesicle fusion and beyond. *Cell* 2010; 140(5): 601-5.
- 17 Guillen J, Ferrer-Orta C, Buxaderas M, Pérez-Sánchez D, Guerrero-Valero M, Luengo-Gil G, *et al.* Structural insights into the Ca²⁺ and PI(4,5)P₂ binding modes of the C2 domains of rabphilin 3A and synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(51): 20503-8.
- 18 van den Bogaart G, Meyenberg K, Diederichsen U, Jahn R. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate increases Ca²⁺ affinity of synaptotagmin-1 by 40-fold. *J Biol Chem* 2012; 287(20): 16447-53.
- 19 Bai J, Wang CT, Richards DA, Jackson MB, Chapman ER. Fusion pore dynamics are regulated by synaptotagmin**t*-SNARE interactions. *Neuron* 2004; 41(6): 929-42.
- 20 Lai Y, Lou X, Wang C, Xia T, Tong J. Synaptotagmin I and Ca²⁺ drive trans SNARE zippering. *Sci Rep* 2014; 4: 4575.
- 21 Zhang X, Kim-Miller MJ, Fukuda M, Kowalchuk JA, Martin TF. Ca²⁺-dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for Ca²⁺-triggered exocytosis. *Neuron* 2002; 34(4): 599-611.
- 22 Chen X, Tomchick DR, Kovrigin E, Araç D, Machius M, Südhof TC, *et al.* Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron* 2002; 33(3): 397-409.
- 23 Schaub JR, Lu X, Doneske B, Shin YK, McNew JA. Hemifusion arrest by complexin is relieved by Ca²⁺-synaptotagmin I. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13(8): 748-50.
- 24 Tang J, Maximov A, Shin OH, Dai H, Rizo J, Südhof TC. A complexin/synaptotagmin I switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell* 2006; 126(6): 1175-87.
- 25 Zhang Z, Hui E, Chapman ER, Jackson MB. Regulation of exocytosis and fusion pores by synaptotagmin-effector interactions. *Mol Biol Cell* 2010; 21(16): 2821-31.
- 26 Idrissi FZ, Geli MI. Zooming in on the molecular mechanisms of endocytic budding by time-resolved electron microscopy. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(4): 641-57.
- 27 Marsh M, McMahon HT. The structural era of endocytosis. *Science* 1999; 285(5425): 215-20.
- 28 Maurer ME, Cooper JA. The adaptor protein Dab2 sorts LDL receptors into coated pits independently of AP-2 and ARH. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt20): 4235-46.
- 29 Antonescu CN, Aguet F, Danuser G, Schmid SL. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size. *Mol Biol Cell* 2011; 22(14): 2588-600.
- 30 Henne WM, Boucrot E, Meinecke M, Evergren E, Vallis Y, Mittal R, *et al.* FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science* 2010; 328(5983): 1281-4.
- 31 Adams J, Kelso R, Cooley L. The kelch repeat superfamily of proteins: Propellers of cell function. *Trends Cell Biol* 2000; 10(1): 17-24.
- 32 Morgan JR, Prasad K, Jin S, Augustine GJ, Lafer EM. Eps15 homology domain-NPF motif interactions regulate clathrin coat assembly during synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem* 2003; 278(35): 33583-92.
- 33 McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(8): 517-33.
- 34 Schmid EM, Ford MG, Burtay A, Praefcke GJ, Peak-Chew SY, Mills IG, *et al.* Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol* 2006; 4(9): e262.
- 35 Ford MG, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJ, Evans PR, *et al.* Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 2002; 419(6905): 361-6.
- 36 Wang Q, Kaan HY, Hooda RN, Goh SL, Sondermann H. Structure and plasticity of Endophilin and Sorting Nexin 9. *Structure* 2008; 16(10): 1574-87.
- 37 Meinecke M, Boucrot E, Camdere G, Hon WC, Mittal R, McMahon HT. Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission. *J Biol Chem* 2013; 288(9): 6651-61.
- 38 Ferguson SM, de Camilli P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(2): 75-88.
- 39 Marks B, Stowell MH, Vallis Y, Mills IG, Gibson A, Hopkins CR, *et al.* GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* 2001; 410(6825): 231-5.
- 40 Loerke D, Mettlen M, Yasar D, Jaqaman K, Jaqaman H, Danuser G, *et al.* Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation. *PLoS Biol* 2009; 7(3): e57.
- 41 Chappell TG, Konforti BB, Schmid SL, Rothman JE. The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *J Biol Chem* 1987; 262(2): 746-51.
- 42 Barouch W, Prasad K, Greene L, Eisenberg E. Auxilin-induced interaction of the molecular chaperone Hsc70 with clathrin baskets. *Biochemistry* 1997; 36(14): 4303-8.
- 43 Verstreken P, Koh TW, Schulze KL, Zhai RG, Hiesinger PR, Zhou Y, *et al.* Synaptotagmin is recruited by endophilin to

- promote synaptic vesicle uncoating. *Neuron* 2003; 40(4): 733-48.
- 44 Loerke D, Mettlen M, Schmid SL, Danuser G. Measuring the hierarchy of molecular events during clathrin-mediated endocytosis. *Traffic* 2011; 12(7): 815-25.
- 45 He Z, Fan J, Kang L, Lu J, Xue Y, Xu P, *et al.* Ca²⁺ triggers a novel clathrin-independent but actin-dependent fast endocytosis in pancreatic beta cells. *Traffic* 2008; 9(6): 910-23.
- 46 Jockusch WJ, Praefcke GJ, McMahon HT, Lagnado L. Clathrin-dependent and clathrin-independent retrieval of synaptic vesicles in retinal bipolar cells. *Neuron* 2005; 46(6): 869-78.
- 47 Zhu Y, Xu J, Heinemann SF. Two pathways of synaptic vesicle retrieval revealed by single-vesicle imaging. *Neuron* 2009; 61(3): 397-411.
- 48 Granseth B, Odermatt B, Royle SJ, Lagnado L. Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron* 2006; 51(6): 773-86.
- 49 Dittman J, Ryan TA. Molecular circuitry of endocytosis at nerve terminals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009; 25: 133-60.
- 50 Haucke V, Neher E, Sigrist SJ. Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12(3): 127-38.
- 51 Südhof TC. The presynaptic active zone. *Neuron* 2012; 75(1): 11-25.
- 52 Dieck ST, Sanmarti-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S, Soyke A, *et al.* Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol*; 1998; 142(2): 499-509.
- 53 Fenster SD, Chung WJ, Zhai R, Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, *et al.* Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron* 2000; 25(1): 203-14.
- 54 Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC. Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 1997; 388(6642): 593-8.
- 55 Ma C, Li W, Xu Y, Rizo J. Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18(5): 542-9.
- 56 Kaeser PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, *et al.* RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 2011; 144(2): 282-95.
- 57 Inoue E, Deguchi-Tawarada M, Takao-Rikitsu E, Inoue M, Kitajima I, Ohtsuka T, *et al.* ELKS, a protein structurally related to the active zone protein CAST, is involved in Ca²⁺-dependent exocytosis from PC12 cells. *Genes Cells* 2006; 11(6): 659-72.
- 58 Ohara-Imaizumi M, Ohtsuka T, Matsushima S, Akimoto Y, Nishiwaki C, Nakamichi Y, *et al.* ELKS, a protein structurally related to the active zone-associated protein CAST, is expressed in pancreatic beta cells and functions in insulin exocytosis: Interaction of ELKS with exocytotic machinery analyzed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Mol Biol Cell* 2005; 16(7): 3289-300.
- 59 Lansbergen G, Grigoriev I, Mimori-Kiyosue Y, Ohtsuka T, Higa S, Kitajima I, *et al.* CLASPs attach microtubule plus ends to the cell cortex through a complex with LL5beta. *Dev Cell* 2006; 11(1): 21-32.
- 60 Pechstein A, Bacetic J, Vahedi-Faridi A, Gromova K, Sundborger A, Tomlin N, *et al.* Regulation of synaptic vesicle recycling by complex formation between intersectin 1 and the clathrin adaptor complex AP2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(9): 4206-11.
- 61 Anantharam A, Bittner MA, Aikman RL, Stuenkel EL, Schmid SL, Axelrod D, *et al.* A new role for the dynamin GTPase in the regulation of fusion pore expansion. *Mol Biol Cell* 2011; 22(11): 1907-18.
- 62 Okamoto M, Schoch S, Südhof TC. EHS1/intersectin, a protein that contains EH and SH3 domains and binds to dynamin and SNAP-25. A protein connection between exocytosis and endocytosis? *J Biol Chem* 1999; 274(26): 18446-54.
- 63 Lee AK, Tse A. Endocytosis in identified rat corticotrophs. *J Physiol* 2001; 533(Pt 2): 389-405.
- 64 Kuromi H, Kidokoro Y. Selective replenishment of two vesicle pools depends on the source of Ca²⁺ at the Drosophila synapse. *Neuron* 2002; 35(2): 333-43.
- 65 Zefirov AL, Abdrakhmanov MM, Grigor'ev PN, Petrov AM. The intracellular calcium and mechanisms of endocytosis of synaptic vesicles at the frog nerve ending. *Tsitologiya* 2006; 48(1): 34-41.
- 66 Igarashi M, Watanabe M. Roles of calmodulin and calmodulin-binding proteins in synaptic vesicle recycling during regulated exocytosis at submicromolar Ca²⁺ concentrations. *Neurosci Res* 2007; 58(3): 226-33.
- 67 Clayton EL, Anggono V, Smillie KJ, Chau N, Robinson PJ, Cousin MA. The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurosci* 2009; 29(24): 7706-17.
- 68 Nicholson-Tomishima K, Ryan TA. Kinetic efficiency of endocytosis at mammalian CNS synapses requires synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(47): 16648-52.
- 69 Poskanzer KE, Marek KW, Sweeney ST, Davis GW. Synaptotagmin I is necessary for compensatory synaptic vesicle endocytosis *in vivo*. *Nature* 2003; 426(6966): 559-63.
- 70 Koch M, Holt M. Coupling exo- and endocytosis: An essential role for PIP(2) at the synapse. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821(8): 1114-32.
- 71 Honigsmann A, van den Bogaart G, Iraheta E, Risselada HJ, Milovanovic D, Mueller V, *et al.* Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate clusters act as molecular beacons for vesicle recruitment. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(6): 679-86.
- 72 Milosevic I, Sorensen JB, Lang T, Krauss M, Nagy G, Haucke V, *et al.* Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J Neurosci* 2005; 25(10): 2557-65.
- 73 Honing S, Ricotta D, Krauss M, Spate K, Spolaore B, Motley A, *et al.* Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol Cell* 2005; 18(5): 519-31.
- 74 Rudolf R, Salm T, Rustom A, Gerdes HH. Dynamics of immature secretory granules: Role of cytoskeletal elements during transport, cortical restriction, and F-actin-dependent tethering. *Mol Biol Cell* 2001; 12(5): 1353-65.
- 75 Neco P, Giner D, del Mar Frances M, Viniestra S, Gutierrez LM. Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells. *Eur J Neurosci* 2003; 18(4): 733-42.
- 76 Yoneda M, Nishizaki T, Tasaka K, Kurachi H, Miyake A, Murata Y. Changes in actin network during calcium-induced exocytosis in permeabilized GH3 cells: Calcium directly regulates F-actin

- disassembly. *J Endocrinol* 2000; 166(3): 677-87.
- 77 Sokac AM, Bement WM. Kiss-and-coat and compartment mixing: Coupling exocytosis to signal generation and local actin assembly. *Mol Biol Cell* 2006; 17(4): 1495-502.
- 78 Gasman S, Chasserot-Golaz S, Malacombe M, Way M, Bader MF. Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: A role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Mol Biol Cell* 2004; 15(2): 520-31.
- 79 Bond LM, Arden SD, Kendrick-Jones J, Buss F, Sellers JR. Dynamic exchange of myosin VI on endocytic structures. *J Biol Chem* 2012; 287(46): 38637-46.
- 80 Cheng J, Grassart A, Drubin DG. Myosin 1E coordinates actin assembly and cargo trafficking during clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* 2012; 23(15): 2891-904.
- 81 Galletta BJ, Mooren OL, Cooper JA. Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals. *Curr Opin Biotechnol* 2010; 21(5): 604-10.
- 82 Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG. A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* 2005; 123(2): 305-20.
- 83 Watanabe T, Noritake J, Kakeno M, Matsui T, Harada T, Wang S, *et al.* Phosphorylation of CLASP2 by GSK-3beta regulates its interaction with IQGAP1, EB1 and microtubules. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 16): 2969-79.
- 84 Torres-Benito L, Neher MF, Cano R, Ruiz R, Tabares L. SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals. *PLoS One* 2011; 6(10): e26164.
- 85 Rappoport JZ, Taha BW, Simon SM. Movement of plasma-membrane-associated clathrin spots along the microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2003; 4(7): 460-7.
- 86 Zhao Y, Gaidarov I, Keen JH. Phosphoinositide 3-kinase C2alpha links clathrin to microtubule-dependent movement. *J Biol Chem* 2007; 282(2): 1249-56.
- 87 Bates M, Huang B, Dempsey GT, Zhuang X. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science* 2007; 317(5845): 1749-53.
- 88 Montagnac G, Meas-Yedid V, Irondelle M, Castro-Castro A, Franco M, Shida T, *et al.* alphaTAT1 catalyses microtubule acetylation at clathrin-coated pits. *Nature* 2013; 502(7472): 567-70.
- 89 Yuan T, Liu L, Zhang Y, Wei L, Zhao S, Zheng X, *et al.* Diacylglycerol guides the hopping of clathrin-coated pits along microtubules for exo-endocytosis coupling. *Dev Cell* 2015; 35(1): 120-30.