

单分子生物物理技术在神经递质释放研究中的应用*

田芷淇 胡亚冲 龙建纲 刘健康 刁佳杰**

(西安交通大学生命科学与技术学院, 线粒体生物医学研究所, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 西安 710049)

摘要 神经递质的释放在神经信号传导中起着至关重要的作用。神经递质释放严格依赖 SNARE 蛋白的动态组装和钙离子触发的膜融合过程。最新研究发现, 神经递质释放还受到神经退行性疾病中关键的标志蛋白分子的影响。当前研究者以体外膜融合重组体系为基础, 发展了多种单分子生物物理技术, 为进一步阐明神经递质释放的分子机制和神经退行性疾病的发病机理提供了新的视角和手段。

关键词 单分子生物物理技术, 神经递质释放, 膜融合, 神经退行性疾病

学科分类号 Q6-3, Q51

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0152

大脑的结构及其功能始终都是人类自我认知过程中的重要研究目标, 而对传递和释放神经递质的分子机制的研究又是重中之重。在中枢神经系统中, 神经元之间的信号传导都是通过神经突触来完成的: 携带神经递质的突触囊泡在相关蛋白质和蛋白质复合物的调控下, 经过一系列转运步骤, 最终到达突触前膜的活性区域, 并在相应信号刺激下与突触前膜发生融合, 迅速释放出的神经递质作用于突触后膜受体, 最终完成整个信号传导的过程^[1]。对神经递质传递和释放机制的研究, 一方面能为研究神经认知功能打下基础, 另一方面也有助于了解神经退行性疾病(如阿尔茨海默病, 帕金森病和亨廷顿病等)的发生机制, 进而指导其临床的预防和治疗。

本文总结了最近 2~3 年国内外运用单分子生物物理技术研究神经递质释放的最新进展, 并进一步概括了与此相关的神经退行性疾病关联蛋白质研究。我们期望能起到抛砖引玉的作用, 启发更多的学者采用单分子生物物理技术开展相关研究。

1 神经递质释放的分子机制

在神经递质的释放过程中, 最重要的步骤是突触小泡与突触前膜的融合。在真核细胞中, 膜融合

(membrane fusion) 由可溶性 NSF 附着蛋白受体(soluble NSF attachment protein receptor, SNARE) 介导^[2-3]。SNARE 蛋白通过 SNARE 基序相互结合, 两者配对共同构成一个完整的 SNARE 系统, 形成一个像发卡形状的复合物结构来介导膜融合的过程。此 SNARE 复合体由 15 层盐桥保守位点作用。根据 SNARE 复合物晶体结构^[4]形成的零层处盐桥保守位点的氨基酸残基种类或者所处位置, SNARE 可简单分为两大类, 即位于突触囊泡膜上的提供一个精氨酸的 R-SNARE 或 v-SNARE 和位于靶膜上的提供 3 个谷氨酰胺的 Q-SNARE 或 t-SNARE^[5]。在神经系统中, 小突触小泡蛋白 2 (synaptobrevin-2, 又称为 vesicle associated membrane protein 2, VAMP2) 提供 1 个 R-SNARE 基序, syntaxin-1 和 SNAP-25 蛋白提供 3 个 Q-SNARE 基序, 构成 4 个 α 螺旋平行排列的结合区^[4]。与其他系统不同, 神经系统中 SNARE 蛋白负责神经元间神经递质的亚毫秒级超快速释放^[6]。

* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2015CB856300)。

** 通讯联系人。

Tel: 029-82665849, E-mail: diaojj@gmail.com

收稿日期: 2016-08-24, 接受日期: 2016-09-30

动作电位向神经细胞内传递信号的过程是通过钙离子实现的。去极化的突触前膜向细胞内快速转运钙离子, 钙离子与突触小泡上的突触结合蛋白(synaptotagmin)结合使后者激活, 激活后的synaptotagmin促进v-SNARE与t-SNARE的结合, 进而实现膜融合, 完成神经递质的释放^[7]。在整个过程中, 还有其他多种蛋白参与, 如complexin、Munc13、Munc18等^[8-9]。四位科学家(Randy W Schekman、James E. Rothman、Thomas C. Sudhof、Richard H. Scheller)因为对该机制的研究分别获得了2002年和2013年的拉斯克(Lasker)基础医学奖。他们其中的前三位还分享了2013年诺贝尔(Nobel)生理学/医学奖。

2 若干神经退行性疾病相关蛋白影响神经递质释放过程

SNARE复合物的组装及其介导膜融合过程受到多种蛋白的影响, 其中包括与神经退行性疾病密切相关的半胱氨酸字符串蛋白(cysteine-string protein- α , CSP α)和突触核蛋白(α -synuclein, α -Syn)等^[10]。CSP α 是一种突触前膜蛋白, 它能够与HSC70^[11]、SGT^[12]形成复合物。该复合物可直接与单体可溶性NSF附着蛋白(SNAP)-25结合, 防止后者发生自身聚集, 最终促进SNARE复合物的形成。敲除CSP α 会导致SNAP-25形成异常的构象并发生泛素化后被蛋白酶体降解, 并且可以损伤突触功能进而引起小鼠的神经退行性病变^[13]。CSP α 被敲除的小鼠中会出现两个显著变化: SNAP-25表达降低50%以及与其对应的SNARE复合物组装能力下降^[14]; 相反, CSP α 的过表达则能够抑制自然条件下SNAP-25的降解^[15]。这些研究表明, CSP α 在维持SNARE快速循环的过程中具有重要作用。 α -Syn蛋白是一种由140个氨基酸残基组成的多肽, 可以在突触前膜上大量以单体形式表达^[16]。该蛋白与神经递质的转运和释放有关, 在帕金森病个体中存在多种突变体, 在路易氏体中含量很高。最新的研究发现, 在正常的生理条件下 α -Syn具有维持SNARE正常组装的功能, 具体机制为: α -Syn直接结合R-SNARE蛋白synaptobrevin-2/VAMP2, 促进SNARE复合物的组装^[17]。 α -Syn被敲除的小鼠会出现严重的衰老依赖性的神经功能障碍, 而过表达 α -Syn则能够抑制CSP α 敲除引起的致死性神经退变^[18], 这种保护正

是通过促进SNARE组装而实现的。 β 淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)是阿尔茨海默病的关键标志分子之一, 它是由淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)经过 β 及 γ 分泌酶剪切生成的, 含有38~42个氨基酸的剪切体。A β 单体以 β 折叠的形式在神经元胞外聚集, 形成淀粉样沉淀^[19]。一般认为A β 沉积是阿尔茨海默病患者中突触功能损伤及认知功能障碍的必要条件。最新研究发现, 生理条件下, 通过抑制胞外A β 降解而升高A β 浓度的方法可以促进海马神经元神经突触的神经递质释放活性, 这就提示了A β 可能有利于SNARE复合物组装^[20]。但同时也有其他研究发现SNARE复合物的组装在阿尔茨海默病患者脑内受到了抑制^[21]。

综上所述, 越来越多的研究表明, 神经退行性疾病(包括阿尔茨海默病和帕金森病)中若干标志蛋白分子, 不同程度地影响了由SNARE介导的膜融合及神经递质的释放过程。它们之间的相互关联和机制研究已经成为了国际研究的热点。

3 单分子生物物理技术研究神经递质毫秒级释放分子机制的若干进展

在突触前膜活性区域, 携带神经递质的突触囊泡需要经历拴系、锚定、成熟和膜融合4个重要过程, 每个过程都涉及重要蛋白质、磷脂及其相关复合物的协同作用。然而, 目前该领域的研究工作仍然不能解释为何在神经突触前膜、突触囊泡和质膜的融合过程在毫秒级别就可以完成。因为传统研究中获得的膜融合信号来源于大量形态不一的囊泡膜融合事件的平均值。另外, 传统的集群式研究中, 囊泡的拴系、锚定、成熟和膜融合的动态过程被平均化, 无法被区分开来, 导致难以探究SNARE诱导囊泡进行膜融合的动态过程。

当前, 基于荧光能量共振转移(FRET)的体外人工囊泡重组技术已经广泛应用于突触蛋白介导的膜融合机制研究^[22]。荧光共振能量转移是一种用于对生物大分子之间相互作用定性、定量检测的有效方法。通过在人工囊泡上标记成对的FRET分子, 可以观察到由膜融合导致的FRET变化, 从而研究膜融合机制。单分子探测可对体系中的单个分子进行探测, 通过与时间相关过程的测量, 实时了解生物大分子构象变化的信息。相对于集群式的群体分子或囊泡水平研究, 可以在单个囊泡水平上, 结合荧光显微技术, 分析多种蛋白在融合前后和超快速

膜融合过程中的作用. 此技术还可以观测蛋白质与蛋白质、蛋白质与磷脂分子、蛋白质复合物和生物膜之间在某一时刻的空间分布, 以及它们的实时相互作用和动态结构变化. 这将会大大推进我们对大脑神经系统分子机制的认知.

为此, 世界各国研发了一系列用于研究细胞膜融合的单分子荧光能量共振技术^[22-24], 此技术将单分子荧光能量转移技术巧妙地应用到了细胞膜融合的研究中. 其中比较成功的例子是基于不同蛋白质重组的囊泡-囊泡融合技术(vesicle-vesicle fusion)^[25-28]. 研究采用荧光受体(acceptor)和供体(donor)分别标识膜分子(lipid)或者内容物(content)的囊泡, 再在囊泡上重组待研究的膜蛋白(图 1). 当两种不同的囊泡在膜蛋白的作用下发生融合时, 标识用的受体和供体之间就会发生荧光共振能量转移. 运用单分子荧光能量转移技术可以准确地探测到以前无法观测的如锚定(docking)、半融合(hemifusion)以及全融合(full fusion)等分步骤, 并大大提高了探测的时空分辨率^[29], 为揭示膜融合的分子机制提供了有力的工具. 最新研究采用了单分子技术观察快速融合中神经递质释放的分子机制. 研究者采用 SNARE 和 synaptobrevin-2 重构的脂质体, 研究在有钙离子参与的情况下 100 ms 内 2 个相互融合的囊泡膜结构的变化, 并在冷冻电镜下观察到了同步融合和异步融合两种融合途径. 值得注意的是, 在研究钙离子触发的立即融合过程中, 他们发现, 从膜与膜相互接触开始到彻底融合, 并没有出现一个“半融合”的中间体, 即使真的存在中间体, 也是 2 个囊泡之

间先形成一层相对稳定的半融合的隔膜, 数秒钟或更长时间后才完成彻底的融合^[29]. 他们还发现 complexin 蛋白在体内神经递质的快速释放中起着至关重要的作用: 这种蛋白可以促使囊泡立即融合. 在目前常用的单分子技术方法有: 分别观测膜融合(lipid mixing)或内容物融合(content mixing)^[30-31], 以及能同时观测膜分子融合(lipid mixing)和内容物融合(content mixing)的单分子荧光共振能量转移技术^[32-33]. 与传统测量不同, 这些单分子技术还可以观测膜融合之前的膜相互作用^[34-35], 这为研究诸如 complexin 和 Munc18 等辅助蛋白在整个膜融合过程中的作用打下了基础^[36-38].

4 单分子生物物理技术研究神经退行性疾病相关蛋白对膜融合的影响

通过构建体外的神经元 SNARE 单分子荧光技术研究 CSP α 、 α -Syn 及 $A\beta$ 在神经元 SNARE 介导膜融合不同阶段的作用及机制, 可以为神经退行性疾病的 SNARE 假说提供理论支持和实验证据. 很多课题组使用单分子荧光能量共振技术对神经退化相关联蛋白进行深入研究, 发现了与帕金森病相关的 α -Syn 蛋白在神经递质释放过程中的重要作用(图 2): 即单体 α -Syn 蛋白通过同时与膜和 synaptobrevin-2 蛋白作用, 促成神经突触囊泡的聚集, 为其他蛋白质调控提供基础^[39-40], 而非正常聚集的 α -Syn 蛋白^[41]会阻碍快速膜融合^[42]. 该过程中, α -Syn 蛋白聚合体主要影响的是囊泡锚定过程而不是融合的过程. α -Syn 蛋白对膜融合的影响可能存在多种机制, 在高浓度的情况下, α -Syn 蛋白会与带负电磷脂而不是与 v-SNARE 结合, 进而抑制锚定过程; 在浓度很低的情况下, α -Syn 蛋白会直接影响 v-SNARE 在膜融合中的介导作用^[40]. 此外, Yeon-Kyun Shin 团队最新研究表明, $A\beta$ 聚合物可以通过与 SNARE 蛋白中的 syntaxin-1 结合来抑制 SNARE 复合物的形成, 从而直接影响 SNARE 介导的胞吐作用来阻碍膜融合, 这可能就是与阿尔茨海默病相关的神经突触障碍的形成机制^[43]. 在膜融合被抑制的过程中, 存在 $A\beta$ 和 α -Syn 蛋白的协同作用, 两者之中任何一个的单独存在都无法抑制膜融合过程, α -Syn 蛋白聚合体需要 $A\beta$ 的参与才能形成, $A\beta$ 和 α -Syn 蛋白聚合体能够选择性识别 synaptobrevin-2/VAMP2, 进而直接抑制 SNARE 的锚定过程^[44].

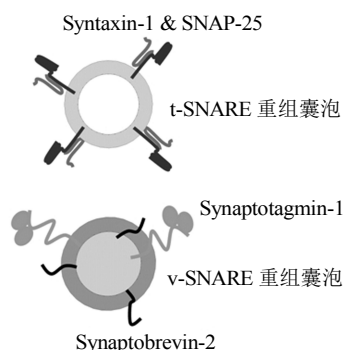


Fig. 1 In vitro protein-reconstitution system for vesicle-vesicle fusion assay

图 1 体外蛋白质重组的囊泡-囊泡融合系统

syntaxin: 突触融合蛋白; SNAP: 可溶性 NSF 附着蛋白; synaptotagmin: 突触结合蛋白; synaptobrevin: 小突触小泡蛋白.

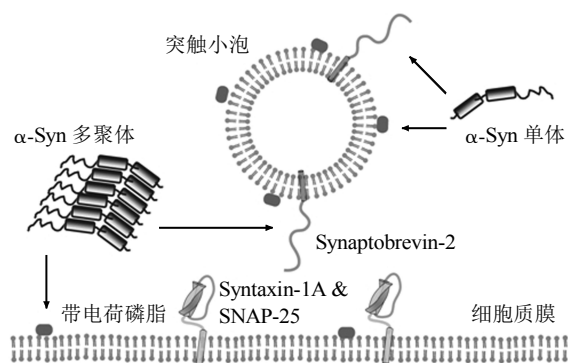


Fig. 2 Through interactions with membrane and synaptobrevin-2, α -Syn monomers promote SNARE formation, while large oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking

图 2 通过与磷脂膜和 synaptobrevin-2 蛋白的相互作用, α -Syn 单体促进 SNARE 形成, 而大块的多聚体阻碍 SNARE 介导的入坞过程

Syn: 突触核蛋白; synaptobrevin: 小突触小泡蛋白; syntaxin: 突触融合蛋白; SNAP: 可溶性 NSF 附着蛋白。

5 总 结

在过去 20 年中, 科学家们利用体外膜融合体系成功模拟了神经递质释放过程, 并体外重现了参与神经递质释放相关蛋白的重要功能。这将有损于加深我们对神经信号传递过程的认识, 开发新的神经系统相关疾病的治疗方式。随着单分子技术的发展, 蛋白质介导的膜融合实验研究将会愈发成熟, 神经细胞中神经递质释放相关的膜融合机制也将会越来越清晰, 该研究将会朝着实时监测活体神经细胞释放神经递质过程中膜融合的方向发展。

今后, 越来越多的研究将会利用先进单分子生物物理技术来探测神经递质释放受神经退行性疾病相关蛋白的影响。相对于研究比较深入的帕金森病相关的突触核蛋白, 与阿尔茨海默病密切相关的 β 淀粉样蛋白在神经递质释放的影响还处于起步阶段。此方向需要更进一步解决关键的问题在于: $A\beta$ 促进神经递质释放的作用是否为 $A\beta$ 直接结合并调控 SNARE 复合物组装的结果; 以及在不同生理和病理条件下, 不同种类的 $A\beta$ 剪切体和 $A\beta$ 自身构象及聚合形式是否对 SNARE 复合物组装发挥着不同的作用。另外, $A\beta$ 具体如何与 SNARE 蛋白相互作用, 与 SNARE 蛋白中的哪个蛋白相互作用, 如何影响 SNARE 复合物组装, 以及 $A\beta$ 的功

能差异与 $A\beta$ 自身构象的关系等问题都需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Rizo J, Sudhof T C. Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Biol*, 1998, **5**(10): 839–842
- [2] Chernomordik L V, Kozlov M M. Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, **15**(7): 675–683
- [3] Wickner W, Schekman R. Membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, **15**(7): 658–664
- [4] Sutton R B, Fasshauer D, Jahn R, *et al.* Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 angstrom resolution. *Nature*, 1998, **395**(6700): 347–353
- [5] Fasshauer D, Sutton R B, Brunger A T, *et al.* Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(26): 15781–15786
- [6] Rizo J, Rosenmund C. Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, **15**(7): 665–674
- [7] Söllner T, Bennett M K, Whiteheart S W, *et al.* A protein assembly-disassembly pathway *in vitro* that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, 1993, **75**(3): 409–418
- [8] Sudhof T C, Rothman J E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*, 2009, **323**(5913): 474–477
- [9] Ma C, Su L, Seven A B, *et al.* Reconstitution of the vital functions of Munc18 and Munc13 in Neurotransmitter release. *Science*, 2012, **339**(6118): 421–425
- [10] Wang C, Zhao C, Li D, *et al.* Versatile structures of alpha-synuclein. *Front Mol Neurosci*, 2016, **9**: 48
- [11] Chamberlain L H, Burgoyne R D. The molecular chaperone function of the secretory vesicle cysteine string proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(50): 31420–31426
- [12] Nemani V M, Lu W, Berge V, *et al.* Increased expression of α -synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron*, 2010, **65**(1): 66–79
- [13] Fernandez-Chacon R, Wolfel M, Nishimune H, *et al.* The synaptic vesicle protein CSP α prevents presynaptic degeneration. *Neuron*, 2004, **42**(2): 237–251
- [14] Garcia-Junco-Clemente P, Cantero G, Gomez-Sanchez L, *et al.* Cysteine string protein- α prevents activity-dependent degeneration in GABAergic synapses. *J Neurosci*, 2010, **30**(21): 7377–7391
- [15] Sharma M, Burré J, Sudhof T C. CSP- α promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nature Cell Biology*, 2010, **13**(1): 30–39
- [16] Burré J, Vivona S, Diao J, *et al.* Properties of native brain alpha-synuclein. *Nature*, 2013, **498**(7453): E4–6; discussion E6–7
- [17] Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, *et al.* α -Synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro*. *Science*, 2010, **329**(5999): 1663–1667
- [18] Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, *et al.* α -Synuclein

- cooperates with CSP- α in preventing neurodegeneration. *Cell*, 2005, **123**(3): 383–396
- [19] Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*, 2012, **148**(6): 1188–1203
- [20] Abramov E, Dolev I, Fogel H, *et al.* Amyloid- β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nature Neuroscience*, 2009, **12**(12): 1567–1576
- [21] Sharma M, Burré J, Sudhof T. Proteasome inhibition alleviates SNARE-dependent neurodegeneration. *Science Transl Med*, 2012, **4**(147): 147ra113
- [22] Brunger A T, Cipriano D J, Diao J. Towards reconstitution of membrane fusion mediated by SNAREs and other synaptic proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2015, **50**(3): 10: 231–241
- [23] Brunger A T, Weninger K, Bowen M, *et al.* Single-molecule studies of the neuronal SNARE fusion machinery. *Annu Rev Biochem*, 2009, **78**: 903–928.
- [24] Diao J, Ishitsuka Y, Bae W R. Single-molecule FRET study of SNARE-mediated membrane fusion. *Biosci Rep*, 2011, **31**(6): 457–463
- [25] Diao J J, Zhao M L, Zhang Y X, *et al.* Studying protein-reconstituted proteoliposome fusion with content indicators *in vitro*. *Bioessays*, 2013, **35**(7): 658–665
- [26] Lai Y, Diao J J, Liu Y X, *et al.* Fusion pore formation and expansion induced by Ca^{2+} and synaptotagmin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(4): 1333–1338
- [27] Lai Y, Lou X, Diao J, *et al.* Molecular origins of synaptotagmin 1 activities on vesicle docking and fusion pore opening. *Sci Rep*, 2015, **5**: 9267
- [28] Lai Y, Zhao L, Bu B, *et al.* Lipid molecules influence early stages of yeast SNARE-mediated membrane fusion. *Phys Biol*, 2015, **12**(2): 025003
- [29] Diao J, Grob P, Cipriano D J, *et al.* Synaptic proteins promote calcium-triggered fast transition from point contact to full fusion. *ELife*, 2012, **1**: e00109
- [30] Diao J, Ishitsuka Y, Lee H, *et al.* A single vesicle-vesicle fusion assay for *in vitro* studies of SNAREs and accessory proteins. *Nature Protocols*, 2012, **7**(5): 921–934
- [31] Diao J, Su Z L, Ishitsuka Y, *et al.* A single-vesicle content mixing assay for SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Commun*, 2010, **1**: 54
- [32] Kyoung M J, Zhang Y X, Diao J J, *et al.* Studying calcium-triggered vesicle fusion in a single vesicle-vesicle content and lipid-mixing system. *Nature Protocols*, 2013, **8**(1): 1–16
- [33] Lai Y, Diao J J, Cipriano D J, *et al.* Complexin inhibits spontaneous release and synchronizes Ca^{2+} -triggered synaptic vesicle fusion by distinct mechanisms. *Elife*, 2014, **3**: e03756
- [34] Diao J, Yoon T Y, Su Z L, *et al.* C2AB: a molecular glue for lipid vesicles with a negatively charged surface. *Langmuir*, 2009, **25**(13): 7177–7180
- [35] Diao J J, Cipriano D J, Zhao M L, *et al.* Complexin-1 enhances the on-rate of vesicle docking *via* simultaneous SNARE and membrane interactions. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(41): 15274–15277
- [36] Diao J, Su Z L, Lu X B, *et al.* Single-vesicle fusion assay reveals Munc18-1 binding to the SNARE core is sufficient for stimulating membrane fusion. *Acs Chemical Neuroscience*, 2010, **1**(3): 168–174
- [37] Lai Y, Choi U B, Zhang Y, *et al.* N-terminal domain of complexin independently activates calcium-triggered fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(32): E4698–4707
- [38] Zhang Y, Diao J, Colbert K N, *et al.* Munc18a does not alter fusion rates mediated by neuronal SNAREs, synaptotagmin, and complexin. *J Biol Chem*, 2015, **290**(16): 10518–10534
- [39] Diao J, Burre J, Vivona S, *et al.* Native alpha-synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics *via* binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2. *Elife*, 2013, **2**: e00592
- [40] Lai Y, Kim S, Varkey J, *et al.* Nonaggregated alpha-synuclein influences SNARE-dependent vesicle docking *via* membrane binding. *Biochemistry*, 2014, **53**(24): 3889–3896
- [41] Hu R, Diao J, Li J, *et al.* Intrinsic and membrane-facilitated alpha-synuclein oligomerization revealed by label-free detection through solid-state nanopores. *Sci Rep*, 2016, **6**: 20776: 1–11
- [42] Choi B K, Choi M G, Kim J Y, *et al.* Large alpha-synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(10): 4087–4092
- [43] Yang Y, Kim J, Kim H Y, *et al.* Amyloid-beta oligomers may impair SNARE-mediated exocytosis by direct binding to syntaxin 1a. *Cell Rep*, 2015, **12**(8): 1244–1251
- [44] Choi B K, Kim J Y, Cha M Y, *et al.* beta-Amyloid and alpha-synuclein cooperate to block SNARE-dependent vesicle fusion. *Biochemistry*, 2015, **54**(9): 1831–1840

Single-molecule Biophysical Studies of Neurotransmitter Release*

TIAN Zhi-Qi, HU Ya-Chong, LONG Jian-Gang, LIU Jian-Kang, DIAO Jia-Jie**

(Center for Mitochondrial Biology and Medicine, The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education,
School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract Fast neurotransmitter release plays an important role in neuron communications. The membrane fusion process mediated by SNAREs can be significantly influenced by proteins related to neurodegeneration. In order to understand the molecular mechanism, a series of single molecule biophysical assays have been developed for observing content mixing rather than (or in addition to) lipid mixing at the single-vesicle level. Based on proteoliposomes reconstituted with v- or t-SNARE proteins, people have developed single vesicle-vesicle fusion assays that monitor lipid or content mixing and both lipid and content of individual vesicle-vesicle pairs. By simultaneously observing lipid and content mixing indicators of single vesicle pairs, these assays provide a foundation to investigate the influence of other regulation factors on SNARE-mediated membrane fusion. Furthermore, these single vesicle-vesicle fusion assays have been applied for systematically characterizing proteins related to neurodegeneration (CSP α , α -Syn, and A β) during different stages (docking, hemifusion, and full fusion) of SNARE-mediated membrane fusion.

Key words single-molecule biophysics, neurotransmitter release, membrane fusion, neurodegeneration

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0152

* This work was supported by a grant from The National Basic Research Program Funding (2015CB856304).

**Corresponding author.

Tel: 86-29-82665849, E-mail: diaojj@gmail.com

Received: August 24, 2016 Accepted: September 30, 2016