

Complexin 在囊泡运输中的作用 *

李小红 龚吉红 林显光 阳小飞 **

(中南民族大学生物医学工程学院, 脑认知国家民委重点实验室、膜离子通道与药物研发实验室, 武汉 430074)

摘要 神经递质释放对维持生物体正常的生命活动有着重要的意义, 它是由囊泡运输介导完成的. 神经元细胞中囊泡运输涉及许多蛋白质间的相互作用, 共同调控这一复杂的过程, 可溶性小分子蛋白 Complexin (Cpx)在这一过程中起着重要的作用, 它同时具有抑制囊泡自发发放和促进囊泡诱发发放的功能. 本文综合国内外近 20 年的研究, 着重介绍了 Cpx 蛋白各部分结构域的功能, 及其与一些囊泡分泌相关蛋白, 如 SNARE 复合体、Synaptotagmin (Syt), 间的相互作用机制及其最新进展.

关键词 囊泡运输, Complexin, SNARE, Synaptotagmin

学科分类号 Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0334

细胞在新陈代谢过程中需要将大量的物质进行分选、包装并在特定的时间运送到特定的地点, 而此过程需要囊泡介导完成, 细胞内囊泡运输系统是细胞生命活动的支柱.

在中枢神经系统中, 神经元细胞传递信息主要通过两种方式来完成: 在一个细胞内通过电信号来传递信息; 细胞之间通过化学信号来传递信息. 这一化学信号叫做神经递质, 它们储存在突触小泡中. 神经递质释放对神经元细胞间的相互交流是至

关重要的, 它是由复杂而精确的蛋白质机制来调控的. 因此, 研究神经递质的释放机制具有重要意义.

神经元突触中细胞胞吐作用的最后一个步骤是突触囊泡膜与突触前膜的融合, 这也是神经递质释放的标志. 有许多蛋白质共同参与、调控囊泡膜与细胞膜融合的过程, 可溶性小分子蛋白 Complexin (Cpx)就是其中的一种. 研究 Cpx 蛋白在囊泡膜融合中的作用机制, 一直是神经科学领域的重大问题.

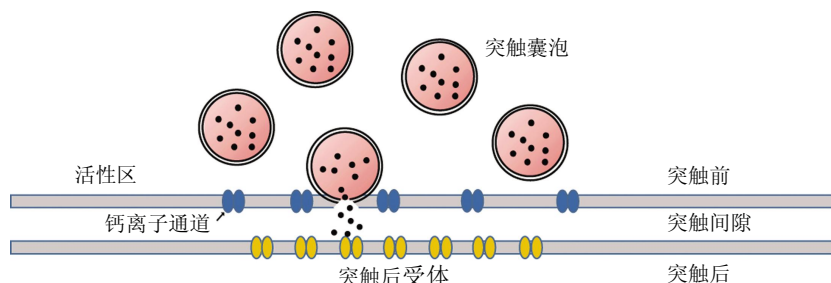


Fig. 1 The mechanisms of presynaptic vesicle release

图 1 突触前膜的释放机制

红色部分为突触囊泡(synaptic vesicles, SV), 活性区(active zone)带有 Ca^{2+} 通道(蓝色), 黄色部分为突触后膜受体(postsynaptic receptors). 图中活性区有一个突触囊泡正在经历膜融合的过程, 释放神经递质.

* 国家自然科学基金资助项目(31300892).

** 通讯联系人.

Tel: 027-67841231, E-mail: sunlittlefly@hotmail.com

收稿日期: 2015-01-18, 接受日期: 2015-03-17

1 囊泡运输中的核心蛋白: SNARE 复合体

在胞吐作用之前, 突触囊泡经历了一系列的趋向成熟的过程. 近些年来, 人们发现了许多参与这一系列步骤的蛋白质. 虽然目前它们的精确功能和作用机制尚未完全阐明, 但是有 3 种蛋白质被认为在膜融合过程中起到了关键性的作用^[1]. 这三种蛋白质分别为 VAMP(亦称 Synaptobrevin)、SNAP-25 和 Syntaxin, 它们共同组成 SNARE 复合体.

SNARE 蛋白是一类大家族的膜融合蛋白, 尽管它们在结构和大小上相差很大, 但都具有一段由 60~70 个氨基酸组成的序列, 称为 SNARE 模体(SNARE motif). SNARE 蛋白主要有两种分类方法: a. 根据 SNARE 蛋白分布的位置, 分为囊泡膜 SNARE 蛋白(v-SNARE, 主要有 VAMP 及其相关蛋白)和靶膜 SNARE 蛋白(t-SNARE, 主要包括 Syntaxin 和 SNAP-25^[2]); b. 根据 SNARE 蛋白结构域中氨基酸残基的种类, 分为精氨酸 SNARE 蛋白(R-SNARE)和谷氨酰胺 SNARE 蛋白(Q-SNARE)^[3]. SNARE 复合体由 3 个 Q-SNARE 和 1 个 R-SNARE 构成. 其中 Q-SNARE 又分为 Qa-SNARE、Qb-SNARE 和 Qc-SNARE. R-SNARE 对应 VAMP, Qa-SNARE 对应 Syntaxin, 而 Qb-SNARE 和 Qc-SNARE 分别与 SNAP-25 的 N 端和 C 端相对应^[4-5].

SNARE 复合体的核心是一个稳定的三聚体, 由 Synaptobrevin/VAMP 的 R-SNARE 序列、Syntaxin-1 的 Qa-SNARE 序列以及 SNAP-25 的 Qb-和 Qc-SNARE 序列按照 1:1:1:1 的比例共同构成^[6]. Syntaxin N 端区域形成反向平行的三螺旋束与其 C 端结构域结合, 形成一个闭合结构. 该结构可以与 n-Sec1 稳定结合. 当 Syntaxin 与 n-Sec1 的结和解离时, Syntaxin 的结构发生改变, 其 SNARE 模体暴露出来, 参与形成核心复合体. Syntaxin、SNAP-25 和 VAMP 共同形成一个平行的四螺旋束核心复合体^[7]. 这种装配好的 SNARE 三聚体结构非常稳定, 可以在膜融合过程中提供能量.

体外实验表明 SNARE 复合体是能完成膜融合的最小结构^[8], 但仅有 SNARE 复合体不足以实现囊泡膜与细胞膜的快速融合^[9]. 膜融合过程是一个多种蛋白质相互作用, 精确配合的过程, Cpx、Syt、SM(类似 Sec1/Munc18 的蛋白)等蛋白都在膜融合过程中起到至关重要的作用.

2 Cpx 蛋白的种类、分布以及结构

Cpx 是一种可溶性小分子蛋白, 在分子生物学中又被称作 Synaphin. 在突触囊泡分泌的过程中, Cpx 蛋白与 SNARE 复合体组装在一起, 参与调控神经递质的释放^[10]. 哺乳动物中, Cpx 蛋白主要存在四种亚型, 其中 Cpx I 和 Cpx II 主要在中枢神经系统中表达, 而 III 和 IV 亚型的 Cpx 蛋白主要在视网膜膜中表达^[11].

Cpx I 又称为 Synaphin II, 而 Cpx II 称为 Synaphin I. 大鼠中 Cpx 蛋白的这两种亚型都包含 134 个氨基酸序列, 并且有 86%是完全一样的, 小鼠和人体内这两种亚型也是高度同源的^[12-13]. 这两种蛋白在哺乳动物中的氨基酸序列较为保守. 在许多大脑区域中, Cpx I、Cpx II mRNA 的表达区域是重叠的. Cpx I 主要表达于中枢神经系统, 而 Cpx II 的 mRNA 和蛋白在非神经元组织中也能检测到^[14-15]. 尽管 Cpx I 与 Cpx II 在嗅球、大脑皮层、海马、小脑和丘脑中的表达水平不同, 但在神经递质释放的过程中, 这两种蛋白的表达并不能完全分离, 说明许多神经元类型都能表达这两种蛋白^[16-17]. Cpx 蛋白的亚型也存在于其他物种中, 包括冈比亚按蚊、线虫、海鞘、果蝇、水蛭、乌贼和蟾蜍, 它们与哺乳动物中的 Cpx I 与 Cpx II 的结构十分类似^[16]. 哺乳动物中, Cpx III 和 Cpx IV 蛋白分别含有 158 和 160 个氨基酸, 主要位于带状突触的感光细胞和两极神经元细胞中, 可能对视网膜感觉神经元递质释放有其独特的作用. 它们的蛋白序列有 58%的同一性, 但与 I 和 II 亚型的同源性较低, 只有 24%~28%^[16].

Cpx 蛋白的结构大体上分为四部分(以 Cpx I 为例, 如图 2 所示), N 端区域(N-terminal domain, NTD)、两个 α 螺旋(α -helix)和一个 C 端区域(C-terminal domain, CTD). 其中, 48~70 位氨基酸为中心 α 螺旋(central α -helix, CH), Cpx 通过 CH 结构与 SNARE 复合体结合, 对实现 Cpx 的功能有着重要的作用^[18-19]. Cpx III 和 Cpx IV 亚型的不同之处在于, 它们的 CTD 有一种 CAAX 模体(C 代表半胱氨酸, A 代表脂肪族氨基酸, X 是指任意氨基酸, 但更倾向于半胱氨酸、丝氨酸、丙氨酸和谷氨酸). 除去 CAAX 模体的 Cpx 突变体, 不能够抑制突触的自发性膜融合, 说明 CAAX 对囊泡膜的融合是有一定功能的^[20-21].

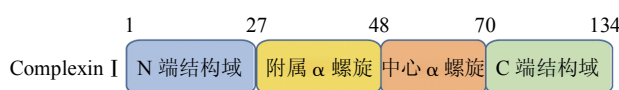


Fig. 2 Domain structure of Cpx I

图 2 Cpx I 蛋白的结构示意图

3 Cpx 的功能域

Cpx 蛋白的分子质量小、结构简单,但是它却有着至关重要的作用.同时缺失 Cpx I 和 II 的小鼠出生致死^[12].去除 Cpx 蛋白会严重损伤 Ca^{2+} 诱发的递质释放,但对自发性的神经递质释放来说,Cpx 的功能在不同的物种中并不完全相同.这一现象可能是 Cpx 蛋白不同区域间相互作用的结果^[10, 22-25].众所周知,Cpx 的 CH 区域对于 Cpx 的激活和抑制功能是至关重要的,但是它的附属 α 螺旋(accessory α -helix, AH)被认为只能够抑制神经递质释放^[19, 26].Cpx 的 NTD 能够促进 Ca^{2+} 诱发的递质释放,解除 AH 对神经递质释放的抑制作用^[27-28].而 Cpx 的 CTD 对于其功能的完整性也是很重要的,它在神经递质释放的过程中起到固定和触发的作用^[10, 29].

Cpx 的 CH 区域是实现 Cpx 生理功能的基础,其功能已被研究得较为清楚.研究表明 CH 区域能够与 SNARE 复合体相结合,从而进一步稳定 SNARE 复合体^[18].其中 Cpx 第 52 位和第 70 位的酪氨酸分别表现出很强的与 Syntaxin 和 Synaptobrevin 蛋白结合能力.缺失与 SNARE 蛋白结合能力的 CH 区域突变体(R48A/R59A/K69A/Y70A)不能恢复 Cpx 蛋白缺失引起的功能障碍^[19],这说明通过 CH 区域与 SNARE 复合体结合是 Cpx 行使功能的前提.

我们知道 Cpx 的 AH 区域能够抑制神经递质释放,但是它的作用机制并不清楚,虽然也有一些模型来解释 AH 是如何干扰囊泡膜融合^[26, 30].然而近来,Trimbuch、Xu 等^[31]通过一系列多样的生物物理学技术分析,认为这些模型并不能准确地描述这一过程.他们基于分子的静电特性,提出了一种新的模型.他们发现,从果蝇的 Cpx 中提取的 AH 比哺乳动物中的 AH 所带的负电荷更多,能更好地阻止神经递质释放,当把 AH 上的一些负电荷换成正电荷时,囊泡膜融合变得更加容易了.所以他们

认为 AH 上的负电荷能够使囊泡膜和细胞质膜分离.当然这个模型是否准确,还需要更多的研究来证明.

去除 Cpx 的 NTD 区域(1~40 位的氨基酸序列),Cpx 的功能完全消失,但是 Cpx 的 CH 仍能够与 SNARE 复合体结合,说明 Cpx 的 NTD 能够促进快速囊泡膜融合.仅仅 CH 与 SNARE 复合体结合并不能实现 Cpx 的功能,还需要 NTD 的参加^[9].那么人们不禁想到 NTD 是否参与 SNARE 复合体的形成呢?生物物理学研究表明,Cpx 的 NTD 通过与 SNARE 复合体 C 端的相互作用结合到 SNARE 复合体上.研究认为 Cpx 的 NTD 与 SNARE 复合体的结合可能有两方面的作用:
a. SNARE 复合体的 C 端结构不稳定,Cpx 的 NTD 通过稳固 SNARE 的 C 端从而促进囊泡膜融合;
b. 由于 Cpx 的 AH 会抑制神经递质释放,而其 NTD 可能会解除这一抑制作用^[27].

Cpx 的 CTD 在整个分子中所占的比例很大,几乎是整个序列的 1/2,但是相对于 Cpx 的其他区段,其具体作用机制目前研究较少.近年来一些研究表明,Cpx I 的 CTD 对可释放囊泡库的维持和囊泡的自发发放功能是必不可少的,但是它的缺失对于 Ca^{2+} 促发的囊泡释放却并无影响,所以人们认为 Cpx I 在对囊泡自发发放和 Ca^{2+} 促发释放上的作用机制是分开的^[10].Jorquera 等^[32]研究发现果蝇的 Cpx 蛋白 CTD 的两种突变体,在囊泡触发和 Ca^{2+} 促发囊泡释放的功能上是完全不同的.然而,Cpx I 的 CTD 是如何发挥功能的呢?Wragg 等^[29]通过一系列的生理生化研究发现,只有与囊泡膜相连接的 Cpx I 突变体才能恢复对递质释放的固定功能.因此他们提出了一种新的模型,认为 Cpx I 的主要功能是将 Cpx I 靶向囊泡膜,Cpx I 与囊泡膜相互作用才能抑制自发性神经递质释放.体外实验研究发现,Cpx I 的 CTD 对突触囊泡停靠速率的增加起着关键性的作用^[33].要真正揭示 CTD 的作用机制,还需要更多的研究,这也是进一步研究 Cpx 功能的热点问题之一.

4 Cpx 蛋白参与 SNARE 复合体的形成和解聚

细胞内的突触膜融合一般由 SNARE 蛋白(NSF 的受体蛋白)、SM 蛋白、Cpx 蛋白和 Syt 蛋白共同调控,在膜融合的过程中,它们经历了聚合和解体的循环过程.

4.1 SNARE 复合体的形成

在 SNARE 复合体形成之前, Syntaxin-1 处于一种闭合的结构, 不能够参与 SNARE 复合体的形成, 所以要形成 SNARE 复合体, 必须是 Syntaxin-1 的构象发生变化, 即激活^[34-35]. Munc18-1 最初与闭合的 Syntaxin-1 结合, 当 Syntaxin-1 的构象变为开放结构时, SNARE 复合体形成, Munc18-1 通过与 Syntaxin-1 的 N 端肽相互作用从而结合到 SNARE 复合体上^[36]. SNARE/SM 蛋白复合体的组装能够调控膜融合, 而这些复合体的解聚使得 SNARE、SM 蛋白能够循环使用. SNARE/SM 蛋白复合体的组装是由 chaperones 蛋白来维持的, chaperone 功能紊乱会导致神经退行性病变^[37-38].

我们知道, 一旦 SNARE 复合体部分形成, 这时 Cpx 蛋白通过其 CH 结构与 SNARE 复合体结合, 增强囊泡膜融合触发状态. 最初, 生物化学研究显示, Cpx I 和 Cpx II 的 CH 区域是与组装过的 SNARE 复合体相互作用, 并不与单独的构成 SNARE 复合体的原件结合^[11, 39]. 但是最近一项单分子荧光实验发现, Cpx I 能够与 Syntaxin 和 SNAP-25 构成的二聚体结合, 并稳定这一结构^[40].

Cpx I 和 Cpx II 与 SNARE 复合体的结合是基于 Syntaxin 存在的条件下, 当 syntaxin-1 成为 SNARE 复合体的一部分时, 这种结合是最稳固的^[41]. 与 Cpx I、Cpx II 一样, Cpx III 和 Cpx IV 同样通过与 Syntaxin-1 的结合而与 SNARE 复合体相互作用, 但 Cpx IV 与 SNARE 复合体的亲和力比其他三种亚型要低^[16].

4.2 SNARE 复合体的解聚

当膜融合完成之后, SNARE 复合体中的 SNARE 蛋白都位于同一细胞膜上, 我们称此时的 SNARE 复合体为顺式 -SNARE (*cis*-SNARE) 复合体. 为了保持分泌的持续性, SNARE 复合体要解聚成游离的单体, 继续循环利用^[42]. *cis*-SNARE 复合体的解聚需要 NSF 和可溶性 NSF 附着蛋白 (soluble NSF attachment protein, SNAPs). NSF 是一类 AAA-ATP 家族酶, 它与 SNAPs 结合能够水解 ATP 成 ADP 和 Pi, SNARE 复合体在 MgATP 的作用下被解聚成 SNARE 单体^[43]. 然而, 反式 -SNARE (*trans*-SNARE) 复合体却不能被 NSF 和 SNAPs 解聚, 具体原因尚未可知^[44].

那么在这一过程中, Cpx 蛋白扮演着什么角色呢? 早前有报道称, Cpx 蛋白与 SNAP 有着竞争关

系, 参与调控 SNARE 复合体的聚合 - 解聚循环^[11]. 2000 年, Pabst 等^[39]在体外模拟 SNARE 复合体的解聚过程, 发现 Cpx 的存在与否对 SNARE 复合体的解聚没有影响, 即使在 Cpx 蛋白含量是 SNAP 的 20 倍的情况下, SNARE 复合体仍然会解聚. 因此, 他们认为 Cpx 蛋白对 SNARE 复合体的解聚没有影响. 但生物体是一个相对复杂的环境, Cpx 蛋白在 SNARE 复合体的解聚中到底处于什么样的位置, 仍需要进一步研究.

5 Cpx 与 Syt 间的相互关系

Syt 是一类在进化中相对保守的大家族跨膜蛋白, 在神经内分泌系统中有着重要作用, 到目前为止在哺乳动物中一共发现 17 种亚型^[45]. Syt 的基本结构为: N 端糖基化区域, 位于囊泡内腔, 一个单独的跨膜区 (TMR) 和位于细胞质中的 2 个重复的 C₂ 区域 -C₂A、C₂B, 在加上 1 个保守的 C 端^[46-47]. Syt 在组织中的分布并不相同, Syt1、Syt2、Syt9 和 Syt12 都位于突触囊泡中, 组成突触囊泡膜的重要成分^[48].

Syt 的 C₂ 区域因与蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 有着相似的片段而命名, 然而它们的功能最初是在 Syt1 中发现的, C₂ 区域的主要功能是作为 Ca²⁺ 的结合区域^[49]. Syt1 的 C₂ 区域原子结构显示, C₂ 结构域是由 8 个链折叠成的稳定三明治结构, 它的顶端有着松散的环 (loop), 这是 Ca²⁺ 的主要结合部位. C₂A 区域可结合 3 个 Ca²⁺, 而 C₂B 区域可以结合 2 个 Ca²⁺, 所以 Syt1 总共可以结合 5 个 Ca²⁺^[50].

最开始, 人们假设在神经递质的释放过程中, Syt1 的功能是作为 Ca²⁺ 的感受器. 将 Syt1 的基因敲除 (knockout, KO) 后, 神经突触囊泡快速同步递质释放受到严重影响, 证实了这一假设^[51]. 在 Ca²⁺ 存在的情况下, Syt 能够促进突触囊泡膜融合, 但是这一过程还需要一个辅助因子 Cpx, 将 Cpx 蛋白 KO 会严重损伤 Syt 促发的突触囊泡分泌^[52].

那么 Cpx 和 Syt 如何在 Ca²⁺ 促发的突触囊泡膜融合中起作用呢? 生化数据显示, Cpx 的中心 α 螺旋与 SNARE 复合体的结合位点和 Syt1 的结合位点是重叠的. Ca²⁺ 与 Syt1 的结合会促发其取代 Cpx 的中心 α 螺旋, 从而与 SNARE 复合体结合. 基于这些电生理及生化研究, 人们建立了一个这样的模型: 当 Cpx 与部分组装的 SNARE 复合体结合, 使这些囊泡处于激活状态, 同时起到固定的作

用。Ca²⁺与Syt的结合促发Syt同时与SNARE复合体和磷脂层结合,同时解除Cpx的固定功能,以拉链式的方式拉开SNARE复合体,使得融合孔开放^[53]。最近一项研究发现,Cpx I并不能完全被Syt1取代,而是它们之间存在着相互竞争的关系^[54-55]。研究海马神经元基因间的相互关系显示,无论Syt1是否存在,Cpx对神经递质释放的调控作用是类似的,说明Cpx的功能并不依赖于Syt1,但这个结果并不能排除Cpx与Syt1之间存在着相互作用,它们共同调控囊泡膜融合^[26-27]。例如,Jorquera等^[56]发现,果蝇中只有在Syt1存在的情况下,去除Cpx才会引起自发性递质释放的大幅度增加。Syt1同时去除时,这种作用则没有那么明显。

6 小结与展望

在神经系统中,囊泡运输对于维持正常的神经递质释放有着十分重要的作用。在过去的20年里,许多研究机构都以此作为研究的重点方向。Cpx蛋白作为神经系统中囊泡运输的关键组成部分,近年来已成为学者们研究的热点内容。Cpx蛋白虽然分子质量很小,哺乳动物中,Cpx I和Cpx II的亚型仅由134个氨基酸构成,却在神经系统囊泡运输中扮演着极有分量的角色。Cpx蛋白有4个结构域,每个结构域都有着自己独特而又重要的生理功能,但它们又需要相互协作才能完整表现出Cpx蛋白的功能。目前,对于Cpx蛋白的研究都集中在前面几个结构域,Cpx蛋白C端的作用机制尚未可知。研究发现,C端对于实现Cpx蛋白的抑制功能是必不可少的,但具体的作用机理尚未清楚。目前我们研究发现,只有将Cpx蛋白的C端定位到囊泡膜上才能实现它对递质释放的抑制功能,所以我们大胆推测,Cpx的C端可能参与了将Cpx蛋白优先定位到囊泡膜的过程,当然这还需要进一步的研究。

研究发现,Cpx蛋白与某些疾病也有着密切的关系。Cpx缺失会导致小鼠学习记忆能力显著下降,在一些精神分裂症、亨廷顿舞蹈病病人中也发现Cpx的表达水平出现异常,因此人们认为Cpx蛋白可能与这些神经退行性疾病有关。相信随着研究的进一步深入,人们对于Cpx之间、Cpx与其他SNAREs之间相互作用的具体作用机制会逐步阐明。随着人们对神经系统囊泡运输机制的逐渐了解,有望找到控制及治疗神经疾病的有效方法。

参 考 文 献

- [1] Xu T, Rammner B, Margittai M, *et al.* Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell*, 1999, **99**(7): 713-722
- [2] Sanderfoot A A, Kovaleva V, Zheng H, *et al.* The t-SNARE AtVAM3p resides on the prevacuolar compartment in Arabidopsis root cells. *Plant Physiol*, 1999, **121**(3): 929-938
- [3] 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
- [4] Jahn R. Principles of exocytosis and membrane fusion. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, **1014**: 170-178
- [5] Jahn R, Scheller R H. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, **7**(9): 631-643
- [6] Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, *et al.* Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J*, 1994, **13**(21): 5051-5061
- [7] Gerber S H, Rah J C, Min S W, *et al.* Conformational switch of Syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion. *Science*, 2008, **321**(5895): 1507-1510
- [8] Weber T, Zemelman B V, McNew J A, *et al.* SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 1998, **92**(6): 759-772
- [9] Südhof T C. Neurotransmitter Release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 2013, **80**(3): 675-690
- [10] Kaeser-Woo Y J, Yang X, Südhof T C. C-terminal complexin sequence is selectively required for clamping and priming but not for Ca²⁺ triggering of synaptic exocytosis. *J Neurosci*, 2012, **32**(8): 2877-2885
- [11] McMahon H T, Missler M, Li C, *et al.* Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell*, 1995, **83**(1): 111-119
- [12] Reim K, Mansour M, Varoqueaux F, *et al.* Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell*, 2001, **104**(1): 71-81
- [13] Raevskaya N M, Dergunova L V, Vladychenskaya I P, *et al.* Structural organization of the human complexin 2 gene (CPLX2) and aspects of its functional activity. *Gene*, 2005, **359**: 127-137
- [14] Freeman W, Morton A J. Differential messenger RNA expression of complexins in mouse brain. *Brain Res Bull*, 2004, **63**(1): 33-44
- [15] Ishizuka T, Saisu H, Odani S, *et al.* Distinct regional distribution in the brain of messenger RNAs for the two isoforms of Synaphin associated with the docking/fusion complex. *Neuroscience*, 1999, **88**(1): 295-306
- [16] Reim K, Wegmeyer H, Brandstatter J H, *et al.* Structurally and functionally unique complexins at retinal ribbon synapses. *J Cell Biol*, 2005, **169**(4): 669-680
- [17] Freeman W, Morton A J. Regional and progressive changes in brain expression of complexin II in a mouse transgenic for the

- Huntington's disease mutation. *Brain Res Bull*, 2004, **63**(1): 45–55
- [18] Chen X, Tomchick D R, Kovrigin E, *et al.* Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron*, 2002, **33**(3): 397–409
- [19] Maximov A, Tang J, Yang X, *et al.* Complexin controls the force transfer from SNARE complexes to membranes in fusion. *Science*, 2009, **323**(5913): 516–521
- [20] Cho R W, Song Y, Littleton J T. Comparative analysis of *Drosophila* and mammalian complexins as fusion clamps and facilitators of neurotransmitter release. *Mol Cell Neurosci*, 2010, **45**(4): 389–397
- [21] Xue M, Lin Y Q, Pan H, *et al.* Tilting the balance between facilitatory and inhibitory functions of mammalian and *Drosophila* Complexins orchestrates synaptic vesicle exocytosis. *Neuron*, 2009, **64**(3): 367–380
- [22] Huntwork S, Littleton J T. A complexin fusion clamp regulates spontaneous neurotransmitter release and synaptic growth. *Nat Neurosci*, 2007, **10**(10): 1235–1237
- [23] Hobson R J, Liu Q, Watanabe S, *et al.* Complexin maintains vesicles in the primed state in *C. elegans*. *Curr Biol*, 2011, **21**(2): 106–113
- [24] Martin J A, Hu Z, Fenz K M, *et al.* Complexin has opposite effects on two modes of synaptic vesicle fusion. *Curr Biol*, 2011, **21**(2): 97–105
- [25] Yang X, Cao P, Südhof T C. Deconstructing complexin function in activating and clamping Ca^{2+} -triggered exocytosis by comparing knockout and knockdown phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(51): 20777–20782
- [26] Xue M, Reim K, Chen X, *et al.* Distinct domains of complexin I differentially regulate neurotransmitter release. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, **14**(10): 949–958
- [27] Xue M, Craig T K, Xu J, *et al.* Binding of the complexin N terminus to the SNARE complex potentiates synaptic-vesicle fusogenicity. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(5): 568–575
- [28] Yang X, Kaeser-Woo Y J, Pang Z P, *et al.* Complexin clamps asynchronous release by blocking a secondary Ca^{2+} sensor *via* its accessory alpha helix. *Neuron*, 2010, **68**(5): 907–920
- [29] Wragg R T, Snead D, Dong Y M, *et al.* Synaptic vesicles position complexin to block spontaneous fusion. *Neuron*, 2013, **77**(2): 323–334
- [30] Bykhovskaia M, Jagota A, Gonzalez A, *et al.* Interaction of the complexin accessory helix with the C-terminus of the SNARE complex: molecular-dynamics model of the fusion clamp. *Biophys J*, 2013, **105**(3): 679–690
- [31] Trimbuch T, Xu J J, Flaherty D, *et al.* Re-examining how complexin inhibits neurotransmitter release. *Elife*, 2014, **3**: e02391
- [32] Buhl L K, Jorquera R A, Akbergenova Y, *et al.* Differential regulation of evoked and spontaneous neurotransmitter release by C-terminal modifications of complexin. *Mol Cell Neurosci*, 2013, **52**: 161–172
- [33] Diao J, Cipriano D J, Zhao M, *et al.* Complexin-I enhances the on-rate of vesicle docking *via* simultaneous SNARE and membrane interactions. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(41): 15274–15277
- [34] Dulubova I, Sugita S, Hill S, *et al.* A conformational switch in Syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J*, 1999, **18**(16): 4372–4382
- [35] Misura K M, Scheller R H, Weis W I. Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-Syntaxin 1a complex. *Nature*, 2000, **404**(6776): 355–362
- [36] Dulubova I, Khvotchev M, Liu S, *et al.* Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(8): 2697–2702
- [37] Burré J, Sharma M, Tssetsenis T, *et al.* Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro*. *Science*, 2010, **329**(5999): 1663–1667
- [38] Sharma M, Burré J, Südhof T C. CSP α promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nat Cell Biol*, 2011, **13**(1): 30–39
- [39] Pabst S, Hazzard J W, Antonin W, *et al.* Selective interaction of complexin with the neuronal SNARE complex. Determination of the binding regions. *J Biol Chem*, 2000, **275**(26): 19808–19818
- [40] Weninger K, Bowen M E, Choi U B, *et al.* Accessory proteins stabilize the acceptor complex for Synaptobrevin, the 1 : 1 Syntaxin/SNAP-25 complex. *Structure*, 2008, **16**(2): 308–320
- [41] Bajohrs M, Darios F, Peak-Chew S Y, *et al.* Promiscuous interaction of SNAP-25 with all plasma membrane Syntaxins in a neuroendocrine cell. *Biochem J*, 2005, **392**(Pt 2): 283–289
- [42] Jahn R, Lang T, Südhof T C. Membrane fusion. *Cell*, 2003, **112**(4): 519–533
- [43] 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
- [44] Weber T, Parlati F, McNew J A, *et al.* SNAREpins are functionally resistant to disruption by NSF and alphaSNAP. *J Cell Biol*, 2000, **149**(5): 1063–1072
- [45] Moghadam P K, Jackson M B. The functional significance of synaptotagmin diversity in neuroendocrine secretion. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, **4**: 124
- [46] Bai J, Chapman E R. The C2 domains of synaptotagmin--partners in exocytosis. *Trends Biochem Sci*, 2004, **29**(3): 143–151
- [47] Kim C F, Jackson E L, Woolfenden A E, *et al.* Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, 2005, **121**(6): 823–835
- [48] Cao P, Maximov A, Südhof T C. Activity-dependent IGF-1 exocytosis is controlled by the Ca^{2+} -sensor synaptotagmin-10. *Cell*, 2011, **145**(2): 300–311
- [49] Davletov B A, Südhof T C. A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca^{2+} /phospholipid binding. *J Biol Chem*, 1993, **268**(35): 26386–26390
- [50] Shao X, Davletov B A, Sutton R B, *et al.* Bipartite Ca^{2+} -binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science*, 1996, **273**(5272): 248–251
- [51] Geppert M, Goda Y, Hammer R E, *et al.* Synaptotagmin I : a major

- Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 1994, **79**(4): 717–727
- [52] Cao P, Yang X, Südhof T C. Complexin activates exocytosis of distinct secretory vesicles controlled by different synaptotagmins. *J Neurosci*, 2013, **33**(4): 1714–1727
- [53] Südhof T C. Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, **4**(1): a011353
- [54] Dai H, Shen N, Araç D, *et al.* A quaternary SNARE-synaptotagmin-Ca²⁺-phospholipid complex in neurotransmitter release. *J Mol Biol*, 2007, **367**(3): 848–863
- [55] Xu J, Brewer K D, Perez-Castillejos R, *et al.* Subtle interplay between synaptotagmin and complexin binding to the SNARE complex. *J Mol Biol*, 2013, **425**(18): 3461–3475
- [56] Jorquera R A, Huntwork-Rodriguez S, Akbergenova Y, *et al.* Complexin controls spontaneous and evoked neurotransmitter release by regulating the timing and properties of synaptotagmin activity. *J Neurosci*, 2012, **32**(50): 18234–18245

The Function of Complexin in Vesicle Transmission*

LI Xiao-Hong, GONG Ji-Hong, LIN Xian-Guang, YANG Xiao-Fei**

(Key Laboratory of Cognitive Science, Laboratory of Membrane Ion Channels and Medicine, College of Biomedical Engineering,
South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract Neurotransmitter release is critical for maintaining normal organism function, it is mediated by the vesicle transportation. A bundle of proteins regulate the complicated neuronal vesicle transmission by interacting with each other. The small soluble protein Complexin (Cpx) plays an important role that can both inhibit spontaneous vesicle fusion and promote evoked Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. In this review, we highlight the recent advances in the function of each domain of Cpx and the mechanisms of interacting with other vesicle exocytosis associated proteins such as SNARE complex and synaptotagmin.

Key words vesicle transmission, complexin, SNARE, synaptotagmin

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0334

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(31300892).

**Corresponding author.

Tel: 86-27-67841231, E-mail: sunlittleyfly@hotmail.com

Received: January 18, 2015 Accepted: March 17, 2015