



## Syntaxin-1通过激活突触递质传递加速早期突触的形成\*

裴青\*\* 林寅\*\* 荣伊\*\* 刘孟雪 吴世平 阳小飞\*\*\*

(认知科学重点实验室, 湖北省医学信息分析与肿瘤诊疗重点实验室, 膜离子通道与药物研发实验室, 中南民族大学生物医学工程学院, 武汉 430074)

**摘要** Syntaxin-1是一种多结构域蛋白, 通过与 synaptobrevin-2 和 SNAP-25 形成 SNARE 复合体调节囊泡融合。然而, syntaxin-1 在突触形成过程中是否发挥作用, 目前尚不清楚。本研究显示 syntaxin-1 的表达水平与突触形成过程高度相关。Syntaxin-1 的 R151A 和 I155A 突变影响其在突触形成中的促进作用, 而  $H_{abc}$  结构域或跨膜结构域在突触形成中无显著作用。结果表明, syntaxin-1 通过激活突触囊泡释放来加速突触的形成。

**关键词** syntaxin-1, 突触形成, 突触囊泡, 动作电位触发的胞吐作用

**中图分类号** Q189, R318

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2019.0288

神经元之间的信号传导是神经系统工作的基础。突触是神经元与其他神经元或靶细胞进行信号传导的基本结构。为了了解突触是如何形成和行使功能的, 许多研究从突触前和突触后两个方向进行<sup>[1]</sup>。在突触中, 信号转导主要是由 SNARE 蛋白(可溶性 N-乙基顺丁烯二酰亚胺敏感因子附着蛋白的受体蛋白)介导的囊泡膜与突触前膜融合从而释放神经递质实现的。SNARE 蛋白由 synaptobrevin-2、syntaxin-1 和 SNAP-25 组成<sup>[2-3]</sup>。在神经系统的 SNARE 复合体中, syntaxin-1 对于调节 SNARE 复合体的活性至关重要<sup>[4]</sup>。Syntaxin-1 蛋白包含一个 N 端序列(N-peptide)、一个三螺旋束(也称  $H_{abc}$  域)、一个连接区、一个 C 端 SNARE 模体( $H_3$  域)和一个跨膜结构域<sup>[5]</sup>。已有研究表明, syntaxin-1 的  $H_3$  结构域参与形成 SNARE 复合体,  $H_{abc}$  结构域可折叠结合覆盖  $H_3$  结构域, 以保护后者<sup>[6]</sup>。Syntaxin-1 的 N 端在 t-SNAREs 中调节开放和关闭状态<sup>[7-8]</sup>。Syntaxin-1 的跨膜结构域(TMR)在融合孔打开的过程中起重要作用<sup>[9]</sup>。目前, syntaxin-1 在神经递质释放中的基本功能已被广泛接受, 但其是否参与突触形成的过程尚不清楚。近年来, 相关研究报道了 syntaxin-1 在其介导的 N2a 细胞分化的

促进作用, 尤其是在分化的早期阶段<sup>[10]</sup>。因此, 囊泡融合相关蛋白极有可能参与突触形成。

为了研究 syntaxin-1 是否在原代神经元的突触形成中发挥作用, 在培养的小鼠大脑皮层神经元中侵染了表达 syntaxin-1 野生型(WT)和其不同突变体的慢病毒。研究发现, 在细胞分化的早期, 过表达 syntaxin-1 增加了突触密度和微小型抑制性突触后电流(mIPSCs)的频率, 而抑制 syntaxin-1 的表达则降低了突触的大小。此外, 无论是 syntaxin-1 的 N 端  $H_{abc}$  结构域还是 C 端 TMR 都不是导致突触形成加速的结构, 而其连接区 R151A 和 I155A 突变反而消除了其促进突触形成的能力。结果表明, syntaxin-1 对早期突触形成的加速功能是通过激活突触递质释放来实现的。

\* 国家自然科学基金(31670850)和中南民族大学基础研究基金(CZY19022和CZY19040)资助项目。

\*\* 并列第一作者。

\*\*\* 通讯联系人。

Tel: 15271869616, E-mail: sunlittlefly@hotmail.com

收稿日期: 2019-11-27, 接受日期: 2020-06-09

## 1 实验材料和仪器

### 1.1 实验材料

HEK 293T 细胞 (CRL-11268, ATCC), 由本实验室保存; 昆明白小鼠.

### 1.2 试剂与仪器

#### 1.2.1 实验试剂

胎牛血清 (FBS, Gibco); 胰蛋白酶 (Gibco); MEM 培养基 (Gibco); B27 (Gibco); PEI (Polyethyleneimine, Polysciences); 本实验所需药品 NaCl、EGTA、Na-GTP、Mg-ATP、阿糖胞苷 (Ara-C)、L-多聚赖氨酸 (poly-L-Lysine) 等均来自于 Sigma 公司, 耗材购买于 NEST 公司.

#### 1.2.2 实验仪器

洁净工作台 (苏州净化设备有限公司); 水套式二氧化碳培养箱 (Thermo Fisher); 低速离心机 (Thermo Fisher); 渗透压仪 (雅森国际); C2 激光共聚焦显微镜 (尼康); P-97 电极拉制仪 (SUTTER INSTRUMENT); EPC10 膜片钳放大系统 (HEKA).

## 2 实验方法

### 2.1 慢病毒质粒的构建

对 Syntaxin-1 选择两个保守区域作为 shRNAs 的靶区: AGAGGCAGCTGGAGATCAC 和 GATCATCATTTGCTGTGTG, 合成 shRNA 寡核苷酸 (检测序列: TCGACCAGAGGCAGCTGGAGATCACTTCAAGAGAGTGATCTCCAGCTGCCTCTGGTTTTTGGAAAT 和 CGCGCCCGATCATCATTTGCTGTGTGTTCAAGAGACACACAGCAAATGATGATCATTTTTTGGAAA) 插入 L309 载体<sup>[11]</sup>. Syntaxin-1 及其突变体的构建参照文献 [11-13].

### 2.2 HEK 293T 细胞的培养

HEK 293T 细胞在 5% 二氧化碳的恒温恒湿细胞培养箱中 37°C 培养. 待细胞密度达到 80%~90%, 进行传代培养. 用胰蛋白酶 (0.05% Trypsin-EDTA) 37°C 消化 2 min. 终止消化后 300 g 离心. 使细胞重新悬浮接种于 6 孔板, 放入细胞培养箱培养.

### 2.3 神经元的原代培养

随机选取出生 0 天的野生型幼鼠 (P0), 分离培养大脑皮层神经元<sup>[14]</sup>. 将断头处死并剥离的小鼠大脑皮层放入预冷的解剖液 (HBS), 0.25% 胰蛋白酶 37°C 消化 12 min, 加培养基以终止消化. 神经细胞生长在涂有 L-多聚赖氨酸的圆形玻片上,

用 2% (v/v) B27, 0.5% (w/v) 葡萄糖, 100 mg/L 转铁蛋白, 5% (v/v) 胎牛血清和 2 μmol/L 阿糖胞苷的 MEM 培养基体外培养. 所有动物程序均按照中南民族大学动物使用规则和动物使用委员会的批准进行.

### 2.4 慢病毒的制备

采用聚乙烯亚胺法 (PEI, 浓度为 1 g/L in ddH<sub>2</sub>O) 转染 HEK 293T 细胞, 用慢病毒表达载体和三个慢病毒包装质粒 (pRSV-REV、pMDLg/pRRE 和 pVSVg) 共转染 HEK 293T 细胞. PEI:pFUGW:pVSVg:pRRE:REV 质量比为 24:3:1:2:2. 共转染 48 h 后, 收集包含病毒的细胞上清液, 3 000 g 离心 5 min. 用蔗糖缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸 [EDTA]) 按体积比 4:1 比例浓缩病毒, 4°C 离心. 加 PBS 后 4°C 冰箱过夜, 使病毒重新悬浮. 所有步骤均在二级生物安全条件下进行. 神经元在体外培养的第 4 天 (DIV 4) 被慢病毒感染, 第 10 天进行分析.

### 2.5 免疫荧光染色

小鼠皮层神经元感染各种慢病毒后, 用 4% 多聚甲醛 (PFA) 固定, 0.2% Triton X-100 渗透穿孔, 用抗突触蛋白 synapsin (单克隆; Sigma) 和抗 MAP2 (多克隆; E028) 一抗孵育过夜, 用 Alexa Fluor 488 山羊抗兔和 Alexa Fluor 546 山羊抗鼠二抗 (分子探针) 显像. 图像采集使用尼康 C2 共聚焦显微镜, 并用 60×油浸物镜成像. 在实验中, 对所有样本采用相同的参数设置.

### 2.6 电生理记录

体外培养的神经元, 以全细胞膜片钳方式进行记录. 使用硼硅酸盐玻璃毛细管 (World Precision Instruments, Inc.) 制备电极. 使入液电极电阻在 3~5 MOhm 之间. 细胞内液含 120 mmol/L CsCl, 10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L EGTA, 0.3 mmol/L Na-GTP, 3 mmol/L Mg-ATP, 5 mmol/L QX-314 (CsOH 调节 pH 7.2). 细胞外溶液中含有 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L HEPES-NaOH 和 10 mmol/L 葡萄糖 (NaOH 调节 pH 7.4). 在所有的记录中, 神经元都被钳制在 -70 mV 的电压下. 记录抑制性突触后电流 (IPSCs) 时细胞外液添加阻断剂 20 μmol/L AMPA-受体阻断剂 CNQX 和 50 μmol/L AP-5 阻断其他电流. 记录自发抑制性突触后电流 (mIPSCs) 时细胞外液除添加阻断剂

CNQX和AP-5外, 还需加1  $\mu\text{mol/L}$  TTX阻断动作电位. 记录自发兴奋性突触后电流 (mEPSCs) 时在外液中添加100  $\mu\text{mol/L}$  GABAA-受体阻断剂 picrotoxin和AP-5, 还需加1  $\mu\text{mol/L}$  TTX阻断动作电位. 记录eIPSC和eEPSC时每15 s给细胞一个去极化刺激. 数据用Clampfit 10模板匹配搜索并进行分析. 数据由实验者进行分析, 以确定是否将其统计在内.

### 2.7 统计分析

数据用Image J和Clampfit 10 (Molecular Devices) 进行分析. 使用Graphpad Prism 6.01进行统计检验, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示. 对组间数据进行 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 时即认为两组间有统计学差异, 如图例所示.

## 3 结 果

### 3.1 大脑皮层神经元中syntaxin-1A的表达水平与突触的形成高度相关

为了研究syntaxin-1是否在突触形成过程中发挥作用, 我们使用syntaxin-1的shRNA特异性敲低(KD)生成syntaxin-1缺陷神经元<sup>[11]</sup>, 并通过用一系列syntaxin-1A突变体慢病毒感染皮层神经元进行回补实验. 首先在培养的小鼠大脑皮层神经元中感染空白载体(control)和表达syntaxin-1A野生型(WT)慢病毒(Syntaxin<sup>WT</sup>), 并在神经元分化的早期(DIV 10)分别用MAP-2和synapsin抗体标记树突和突触, 统计突触的密度和大小. 定量分析结果表明, syntaxin-1A的过表达增加了突触的密度(图1a, b). 为了进一步研究增加的突触是否具有功能, 我们记录了自发的微小型抑制性突触后电流(mIPSCs). 与对照组神经元相比, syntaxin-1A过表达的神经元中mIPSCs的频率显著增加(图1c, d). 此外, 为了确认syntaxin-1A过表达对不同类型突触的影响是否一致, 我们还记录了syntaxin-1过表达的神经元中自发的微小型兴奋性突触后电流(mEPSCs). 统计发现, 过表达syntaxin-1的神经元mEPSCs频率增加(附件图S1a, b). mIPSCs和mEPSCs的频率增加说明syntaxin-1A过表达增加的突触是有功能的. 因此, syntaxin-1的过表达加速功能性突触的形成.

由于syntaxin-1A的过表达导致了神经元的加速生长, 我们接下来想确定syntaxin-1的缺失是否会影响神经元突触的形成. 为此, 将表达syntaxin-

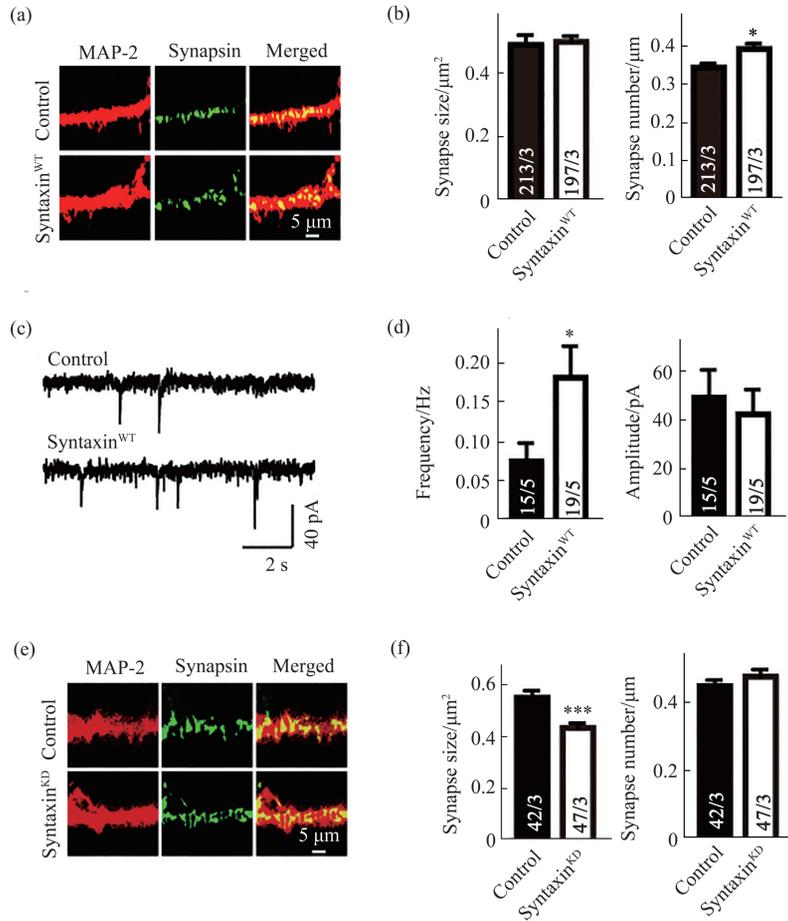
1 KD序列的慢病毒(Syntaxin<sup>KD</sup>)加入培养的神经元, 并记录突触反应. 与以往的研究结果一致<sup>[11-13]</sup>, syntaxin-1缺失神经元中mIPSCs的频率降低(附件图S1c, d), 从而证实了syntaxin-1对突触分泌的重要性. 抑制内源性syntaxin-1表达降低了突触的大小, 而突触密度未受明显影响(图1e, f), 进一步证实了syntaxin-1在突触形成中的加速作用.

### 3.2 Syntaxin-1A的N端和C端区域都不是促进突触形成所必需的结构域

Syntaxin-1在调节囊泡融合过程中的功能/结构依赖性已经得到了很好的研究. 研究发现, syntaxin-1的N端序列, 包括N端肽和H<sub>abc</sub>结构域, 分别与Munc18-1相互作用, 以不同的机制调控突触释放<sup>[15-16]</sup>. Syntaxin-1的C端跨膜区紧紧锚定在质膜上, 对打开融合孔起着至关重要的作用<sup>[9, 17-18]</sup>. 由于syntaxin-1 N端的H<sub>abc</sub>结构域和C端跨膜区域对囊泡释放都很重要, 我们想知道这些结构域是否参与了突触的形成. 为此, 在培养的皮层神经元中分别表达了N端H<sub>abc</sub>结构域缺失的syntaxin-1A突变体(Syntaxin<sup>ΔHabc</sup>)和被syntaxin-19c脂质锚定取代C端跨膜区域的突变体(Syntaxin<sup>ΔTMR</sup>)<sup>[13]</sup>. 分析结果表明, 在体外培养的第10天, 与对照组神经元相比, N端H<sub>abc</sub>结构域缺失(图2a, b)和C-末端TMR缺失(图2c, d)的syntaxin-1A突变体神经元突触密度增加, 这表明syntaxin-1的H<sub>abc</sub>结构域和TMR都不能影响突触的形成. 而H<sub>abc</sub>结构域对自发释放至关重要<sup>[11]</sup>. 因此, 加速突触的形成不需要神经元之间的自发递质释放.

### 3.3 Syntaxin-1A的RI突变阻断了突触形成的加速作用

对syntaxin-1的N端和C端序列在调节突触融合中的作用机制已研究得较为清楚, 但无论是N端H<sub>abc</sub>结构域还是C端TMR缺失均不影响动作电位触发的诱发性释放<sup>[11, 13]</sup>. 因此推测, syntaxin-1增加动作电位触发的突触活动可能是加速突触形成的关键. 为了验证这一假设, 我们统计了对照组神经元(control)和表达了syntaxin-1A R151A和I155A突变体(Syntaxin<sup>RI</sup>)神经元的突触反应及突触的密度和大小. 该突变体由于缺乏与Munc13-1的相互作用而阻断了syntaxin-1A参与的动作电位触发的突触递质释放<sup>[12]</sup>. 与在成熟神经元中结果一致的是,



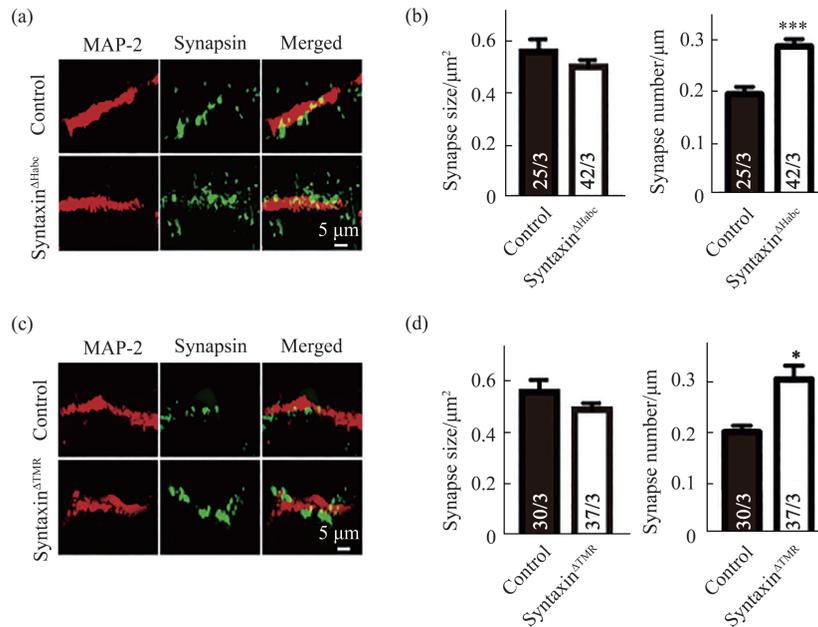
**Fig. 1 The expression of syntaxin-1 altered synapse formation**

(a, b) Representative images (a) and summary graphs of synapse size (b, left) and density (b, right) of cultured mouse cortical neurons infected with a control lentivirus (control) or lentivirus expressing wild type syntaxin-1A (Syntaxin<sup>WT</sup>), respectively. (c, d) Sample trace (c) and summary graphs of the frequency (d, left) and amplitude (d, right) of mIPSCs monitored in neurons as described for a. (e, f) Representative images (e) and summary graphs of synapse size (f, left) and density (f, right) of cortical neurons infected with a control lentivirus (control) or lentivirus expressing syntaxin-1 shRNAs (Syntaxin<sup>KD</sup>), respectively. Data shown in summary graphs are  $\bar{x} \pm s$ ; numbers of cells/independent cultures analyzed were listed in the bars. Statistical assessments were performed by the Student's *t* test comparing each condition to the indicated control experiment (\**P*<0.05, \*\*\**P*<0.001).

在生长10天表达Syntaxin<sup>RI</sup>的神经元中, 诱发IPSC (eIPSC) 的幅值显著降低 (图3a), 再次证实了syntaxin-1-Munc13-1相互作用对动作电位触发突触反应的重要性. 有趣的是, Syntaxin<sup>RI</sup>消除了syntaxin-1引起的突触密度的增加 (图3b, c). 这一结果, 以及之前Syntaxin<sup>ΔHabc</sup> Syntaxin<sup>ΔTMR</sup>的结果表明, syntaxin-1A的连接区对突触形成十分重要, 动作电位触发的突触反应增加可能是syntaxin-1A促进突触形成的一个重要原因.

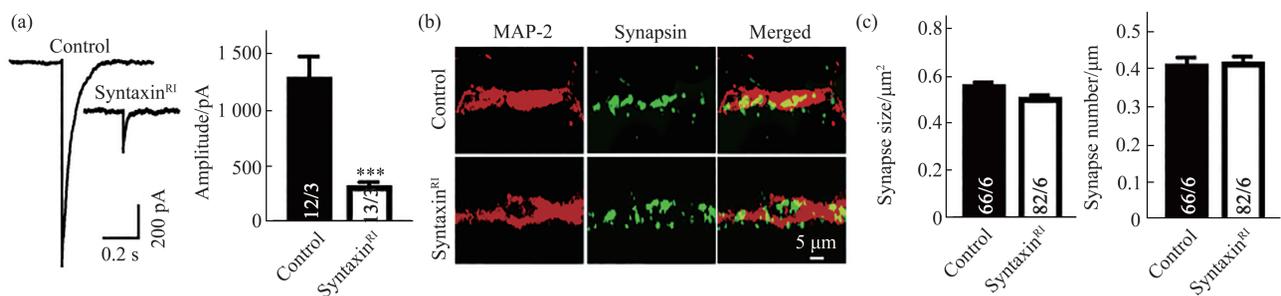
Syntaxin<sup>RI</sup>的表达在突触形成中所观察到的抑制现象说明syntaxin-1连接区域的重要性, 而Syntaxin<sup>RI</sup>突变抑制其激活动电位触发囊泡释放

的能力<sup>[12]</sup>, 因此提示, syntaxin-1在突触形成中的功能可能依赖于其激活能力. 为了验证激活动作电位触发囊泡释放的能力对syntaxin-1影响突触形成过程是否起重要作用, 我们将培养9d的神经细胞用TTX处理24h, 以阻断这期间可能由动作电位产生而触发的释放. 结果与之前一致, syntaxin-1过表达引起的突触密度增加和mIPSCs频率增加均被TTX抑制 (附件图S2), 进一步证实了syntaxin-1诱导的动作电位触发的突触活动在促进突触形成中可能起着至关重要的作用. 我们的研究结果表明, 动作电位触发的突触反应增加可能是syntaxin-1A促进突触形成的一个重要原因.



**Fig. 2 The H<sub>abc</sub> domain and TMR of syntaxin-1 were not responsible for facilitating synapse formation**

(a, b) Representative images (a) and summary graphs of synapse size (b, left) and density (b, right) of mouse cortical neurons infected with a control lentivirus (control) or lentivirus expressing syntaxin-1A lacking H<sub>abc</sub> domain (Syntaxin<sup>ΔHabc</sup>), respectively. (c, d) Representative images (c) and summary graphs of synapse size (d, left) and density (d, right) of cultured cortical neurons infected with a control lentivirus (control) or lentivirus expressing TMR truncated syntaxin-1A (Syntaxin<sup>ΔTMR</sup>), respectively. Data shown in summary graphs are  $\bar{x} \pm s$ ; numbers of cells/independent cultures analyzed were listed in the bars. Statistical assessments were performed by the Student's *t* test comparing each condition to the indicated control experiment (\**P*<0.05, \*\*\**P*<0.001).



**Fig. 3 The syntaxin-1 RI ( R151 , I155 ) residues were critical for accelerating synapse formation**

(a) Sample traces (left) and summary amplitude (right) of evoked IPSC recorded in cultured mouse cortical neurons infected with a control lentivirus (control) or lentivirus expressing full length syntaxin-1A with the R151A, I155A mutations (Syntaxin<sup>RI</sup>), respectively. (b, c) Representative images (b) and summary graphs of synapse size (c, left) and density (c, right) of neurons described for A. Data shown in summary graphs are  $\bar{x} \pm s$ ; numbers of cells/independent cultures analyzed were listed in the bars. Statistical assessments were performed by the Student's *t* test comparing each condition to the indicated control experiment (\*\*\*)*P*<0.001).

## 4 讨 论

囊泡释放相关蛋白，包括 SNARE 蛋白、synaptotagmin、complexin、Munc18、Munc13 等，不仅在突触胞吐中起重要作用，而且参与调控突触

的形成。之前的研究表明，SNAP-25 的表达水平与树突棘的成熟和功能相关<sup>[19]</sup>。Complexin-2 在突触形成和调节神经递质释放过程中发挥作用<sup>[20]</sup>。我们发现，调节神经递质释放的核心成分 syntaxin-1 改变了突触形成的速度，这与突触形成早期过程中

syntaxin-1的表达水平相关。

研究表明, syntaxin-1的过表达导致培养的神经元突触密度增加, syntaxin-1表达的抑制则导致突触大小的减小。这些结果是否意味着 syntaxin-1在突触形成中有着不同的作用机制?与之前相关报道的成熟神经元突触大小相比<sup>[21-22]</sup>, 对照组和 syntaxin-1A过表达神经元在第10天时突触大小相似, 但这些神经元的突触密度低于成熟神经元。同样地, 对照组和 syntaxin-1A过表达神经元的 mIPSCs 频率也较低。另一方面, syntaxin-1缺失神经元的突触大小小于成熟神经元。因此推测, 突触的密度和大小与 syntaxin-1的表达水平相关。根据已有文献, 突触的生长存在平台期, 突触成熟后大小基本不变<sup>[21-22]</sup>。当 syntaxin-1高表达时, 突触大小与成熟神经元相当, 而对照组的突触大小小于成熟神经元, 由此推测, syntaxin-1会加速突触形成以提前达到平台期的突触大小。所以, syntaxin-1的加速作用在突触形成的早期是特异性的, 神经元更倾向于先将已开始形成的突触扩大到正常大小, 而不是生成更多新的未成熟突触。

另一个问题是 syntaxin-1在突触形成过程中的加速是否是暂时的。之前的研究表明, syntaxin-1的抑制和过表达均未改变成熟神经元的突触密度和大小<sup>[13]</sup>。此外, 过表达 syntaxin-1没有增加成熟神经元的突触释放能力, 这表明过表达 syntaxin-1并没有导致功能性突触的增加。因此, syntaxin-1的加速作用在突触形成的早期是特异性的, 并将在成熟突触中达到饱和。在 Munc18或 Munc13缺陷神经元中也发现了类似的结果, 在神经突触形成早期, 通过抑制 Munc18或 Munc13的表达, 可以降低突触的生长速度<sup>[23]</sup>。

Syntaxin-1作为一种多结构域蛋白, 大量研究已经阐明其功能/结构依赖性。SNARE 模体与 SNAP-25和 synaptobrevin-2形成 SNARE 复合体, 介导囊泡融合<sup>[24]</sup>。N端肽与 Munc18结合, 促进囊泡释放。H<sub>abc</sub>结构域也与 Munc18结合, 折叠回 syntaxin-1的 SNARE 基序, 以维持“封闭”构象<sup>[25]</sup>。此外, syntaxin-1的 H<sub>abc</sub>域调节自发微小释放<sup>[13]</sup>, TMR被认为具有打开融合孔的作用<sup>[18, 26]</sup>。灵活的连接区域允许构象的变化, 以暴露 syntaxin-1的 SNARE 模体<sup>[27]</sup>。Syntaxin-1的功能/结构依赖性已经被很好地剖析, 因此 syntaxin-1在加速早期突触形成过程中是否具有结构依赖性成为一个问题。

我们发现, 至少 H<sub>abc</sub>结构域和 TMR 没有参与突触的加速形成。相反, 连接区的 RI 突变消除了 syntaxin-1在突触形成中的促进作用。我们的数据显示, syntaxin-1加速了早期突触的形成, 这种加速可能依赖于其增加动作电位触发的突触活动, 而不是 syntaxin-1的 H<sub>abc</sub>结构域或 TMR。因此, 我们的研究结果说明 syntaxin-1在加速突触形成过程中更依赖于其功能而非其结构。我们的发现表明, 囊泡释放相关蛋白在突触形成中可能发挥着重要作用。

在调控囊泡释放方面, syntaxin-1与许多其他蛋白质相互作用, 包括 SNAP-25、synaptobrevin-2、synaptotagmin-1、complexin、Munc18、Munc13等。在加速突触形成的过程中, 这些相互作用是全部的还是部分的?由动作电位触发的突触活动引起的突触形成加速是否是其他 syntaxin-1相互作用蛋白质的共同机制?这些加速是直接还是需要 CAMs 参与的吗?突触生成速度异常的后果是什么?由于所有这些问题仍不清楚, 突触囊泡融合调节蛋白在突触形成中的重要性目前可能被低估。

总之, 我们的数据显示 syntaxin-1加速了早期突触的形成。这种加速可能依赖于动作电位触发的突触活动, 而不是 syntaxin-1的 H<sub>abc</sub>域或 TMR。研究结果提示囊泡胞吐相关蛋白质在突触形成中可能发挥的作用。

附件 20190288\_图 S1、图 S2 见本文网络版(<http://www.cnki.net>或 <http://www.pibb.ac.cn>)。

## 参 考 文 献

- [1] Südhof T C, Malenka R C. Understanding synapses: past, present, and future. *Neuron*, 2008, **60**(3): 469-476
- [2] Südhof T C. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 2013, **80**(3): 675-690
- [3] Lou X, Shin Y K. SNARE zippering. *Biosci Rep*, 2016, **36**(3). pii: e00327
- [4] Südhof T C, Rothman J E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*, 2009, **323**(5913): 474-477
- [5] Rizo J, Xu J. The synaptic vesicle release machinery. *Annual Review of Biophysics*, 2015, **44**(1): 339-367
- [6] 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
- [7] Dawidowski D, Cafiso D S. Munc18-1 and the syntaxin-1 N terminus regulate open-closed states in a t-SNARE complex. *Structure*, 2016, **24**(3): 392-400
- [8] Shen C, Liu Y, Yu H, *et al.* The N-peptide-binding mode is critical to Munc18-1 function in synaptic exocytosis. *J Biol Chem*, 2018,

- 293(47): 18309-18317
- [9] Han X, Wang C T, Bai J, *et al.* Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Science*, 2004, **304**(5668): 289-292
- [10] Liu M, Lin Y, Rong Y, *et al.* The effects and mechanisms of syntaxin-1 on the differentiation of murine neuroblastoma. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2017, **44**(11): 1037-1040
- [11] Zhou P, Pang Z, Yang X, *et al.* Syntaxin-1 N-peptide and H<sub>abc</sub>-domain perform distinct essential functions in synaptic vesicle fusion. *The EMBO Journal*, 2013, **32**(1): 159-171
- [12] Wang S, Choi U B, Gong J, *et al.* Conformational change of syntaxin linker region induced by Munc13s initiates SNARE complex formation in synaptic exocytosis. *The EMBO Journal*, 2017, **36**(6): 816-829
- [13] Zhou P, Bacaj T, Yang X, *et al.* Lipid-anchored SNAREs lacking transmembrane regions fully support membrane fusion during neurotransmitter release. *Neuron*, 2013, **80**(2): 470-483
- [14] Yu Y, Chen S, Mo X, *et al.* Accessory and central  $\alpha$ -helices of complexin selectively activate Ca<sup>2+</sup> triggering of synaptic exocytosis. *Front Mol Neurosci*, 2018, **11**: 61
- [15] 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
- [16] Rathore S S, Bend E G, Yu H, *et al.* Syntaxin N-terminal peptide motif is an initiation factor for the assembly of the SNARE-Sec1/Munc18 membrane fusion complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(52): 22399-22406
- [17] Lu X, Zhang Y, Shin Y K. Supramolecular SNARE assembly precedes hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, **15**(7): 700-706
- [18] Shi L, Shen Q T, Kiel A, *et al.* Pincet SNARE proteins: one to fuse and three to keep the nascent fusion pore open. *Science*, 2012, **335**(6074): 1355-1359
- [19] Tomasoni R, Repetto D, Morini R, *et al.* SNAP-25 regulates spine formation through postsynaptic binding to p140Cap. *Nat Commun*, 2013, **4**: 2136
- [20] Lee H J, Song J Y, Kim J W, *et al.* Association study of polymorphisms in synaptic vesicle-associated genes, SYN2 and CPLX2, with schizophrenia. *Behav Brain Funct*, 2005, **1**: 15
- [21] Jiang W, Wei M, Liu M, *et al.* Identification of protein tyrosine phosphatase receptor type O (PTPRO) as a synaptic adhesion molecule that promotes synapse formation. *J Neurosci*, 2017, **37**(41): 9828-9843
- [22] 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
- [23] Broeke J H, Roelandse M, Luteijn M J, *et al.* Munc18 and Munc13 regulate early neurite outgrowth. *Biol Cell*, 2010, **102**(8): 479-488
- [24] Südhof T C, Rizo J. Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, **3**(12): a005637
- [25] Rickman C, Medine C N, Bergmann A, *et al.* Functionally and spatially distinct modes of munc18-syntaxin 1 interaction. *J Biol Chem*, 2008, **282**(16): 12097-12103
- [26] Stein A, Weber G, Wahl M C, *et al.* Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane. *Nature*, 2009, **460**(7254): 525-528
- [27] Yang X, Xu P, Xiao Y, *et al.* Domain requirement for the membrane trafficking and targeting of syntaxin 1A. *J Biol Chem*, 2006, **281**(22): 15457-15463

## Syntaxin-1 Accelerates Early Synapse Formation *via* Activating Synaptic Transmission\*

PEI Qing\*\*, LIN Yin\*\*, RONG Yi\*\*, LIU Meng-Xue, WU Shi-Ping, YANG Xiao-Fei\*\*\*

(Key Laboratory of Cognitive Science, Hubei Key Laboratory of Medical Information Analysis and Tumor Diagnosis & Treatment, Laboratory of Membrane Ion Channels and Medicine, College of Biomedical Engineering, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

**Abstract** Syntaxin-1, known as a multi-domain protein, regulates vesicle fusion by forming SNARE complex with synaptobrevin-2 and SNAP-25. However, the role of syntaxin-1 in synapse formation remains uncovered. Here we demonstrated that the expression level of syntaxin-1 was highly associated with the process of synaptogenesis. The R151A and I155A mutations but not H<sub>abc</sub> or transmembrane domain truncations of syntaxin-1 impaired its facilitation in synapse formation. Our results suggested that syntaxin-1 accelerated synapse formation *via* activating synaptic vesicle release.

**Key words** syntaxin-1, synapse formation, synaptic vesicle, action potential triggered exocytosis

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2019.0288

---

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31670850) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities, South-Central University for Nationalities (CZY19022, CZY19040).

\*\* These authors contributed equally to this work.

\*\*\* Corresponding author.

Tel: 15271869616, E-mail: sunlittelfly@hotmail.com

Received: November 27, 2019 Accepted: June 9, 2020