

Ca²⁺诱导的 synaptophysin 蛋白的脂筏分布

吕继华, 何立, 隋森芳

(清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084)

摘要: 文章研究了 Ca²⁺ 对 synaptophysin (Syp) 蛋白的脂筏分布的影响。研究结果证明, Syp 蛋白的脂筏分布明显受到 Ca²⁺ 的特异性调控。在无 Ca²⁺ 的条件下, Syp 为典型的非脂筏蛋白; 而在低浓度 Ca²⁺ 的条件下, Syp 可以转变为脂筏结合蛋白。文章还研究了 Syp 在 Ca²⁺ 的诱导下进入脂筏膜微区的分子机制。研究结果表明, Syp 在 Ca²⁺ 的诱导下进入脂筏这一现象依赖于其 C 末端胞质区, 确定了 Syp 的胞质区在这种调节中的重要性。

关键词: synaptophysin ; 脂筏; Ca²⁺

中图分类号: Q735

0 引言

近期研究表明, 一些参与神经递质释放的重要蛋白, 如 t-SNARE 蛋白和 v-SNARE 蛋白等, 都可以分布在富含胆固醇的脂筏膜微区, 脂筏在神经递质的释放过程中发挥着重要作用^[1-7]。Synaptophysin (Syp) 是最早被发现的囊泡蛋白之一^[8], 在神经递质释放过程中发挥重要作用^[9]。然而人们对 Syp 蛋白与脂筏的关系了解很少, 仅有的研究结果也有矛盾, 结论不是太清楚^[2,6,10]。因此研究 Syp 蛋白是否在脂筏里分布及其调控机制, 有助于人们进一步了解脂筏与递质释放的关系。

我们分离纯化鼠脑的突触囊泡, 分析 Syp 蛋白在其脂筏的分布情况, 然后观察了 Ca²⁺ 对该分布的影响, 发现 Syp 蛋白的脂筏分布可以明显受到 Ca²⁺ 的特异性调控。在无 Ca²⁺ 的条件下, Syp 为典型的非脂筏蛋白; 而在低浓度 Ca²⁺ 的条件下, Syp 可以明显转变为脂筏结合蛋白。

最后我们研究了 Syp 在 Ca²⁺ 的诱导下进入脂筏膜微区的分子机制。通过对比 Syp 及其胞质区缺失突变体在 Ca²⁺ 处理条件下与脂筏作用的区别, 我们发现 Syp 在 Ca²⁺ 的诱导下进入脂筏这一现象依赖于其 C 末端胞质区的存在, 确定了 Syp 的胞质区在这种调节中的重要性。

本文为进一步了解 Ca²⁺ 及脂筏对递质释放的作用提供了一些信息: Syp 蛋白的这种受 Ca²⁺ 信号诱导的脂筏分布, 很可能是神经细胞在空间和时

间上调控 Syp 的状态和功能的一种途径。囊泡的脂筏区可能不仅静态地决定 Syp 等融合相关蛋白与膜的作用及其分布, 而且在 Ca²⁺ 等信号刺激下动态地调节递质释放和膜融合过程。

1 材料和方法

1.1 试剂

Syp、Synaptobrevin (Syb) 等抗体购自 Santa Cruz; Synapsin、Rab3a、Rabphilin3A 等抗体购自 BD Bioscience; Xpress™ 抗体购自 Invitrogen。其他生化试剂购自 Sigma 公司。

1.2 鼠脑囊泡的分离

将成年鼠的鼠脑置于 4℃ 预冷的 HES 缓冲液 (4 mmol/L HEPES-NaOH, 4 mmol/L EDTA, 320 mmol/L 蔗糖, pH 7.4) 中匀浆。匀浆前加蛋白酶抑制剂 (1 mmol/L PMSF, 4 mmol/L EDTA, 2 μg/mL 亮抑蛋白酶, 1 μg/mL 胃蛋白酶抑制剂) 和磷酸酶抑制剂 (10 mmol/L NaF 或 1 mmol/L 钒酸钠)。匀浆后离心, 800 g, 15 min, 上清再经 12000 g, 20 min 离心, 所得沉淀即为突触体。将突触体重悬于无蔗糖低渗缓冲液 (4 mmol/L

收稿日期: 2008-03-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30340420442, 30330160) 和国家重点基础研究发展规划项目 (2004 CB720005)

通讯作者: 隋森芳, 电话: (010)62784768, 传真: (010)62793367,

E-mail: suisf@mail.tsinghua.edu.cn

HEPES-NaOH, 4 mmol/L EDTA, pH 7.4) 中, 匀浆后于冰上静置 30 min, 低渗破裂突触体, 释放突触囊泡。然后 25000 g、25 min 离心, 收集上清, 囊泡组分用 $5 \times \text{PBS}$ (4.3 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.4 mmol/L KH_2PO_4 , 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, pH 7.4) 调节至等渗。用无蔗糖 HEPES 缓冲液配制 0.2、0.4、0.6 mol/L 不连续蔗糖梯度, 样品置于梯度顶部, 从顶部至最下层 0.6 mol/L 蔗糖体积比为 1 : 1 : 1 : 3, 然后 65000 g 离心 2 h。离心结束后, 处于 0.4 和 0.6 mol/L 间的白色区带即为突触囊泡富集区域, 将此区域的组分 160000 g 沉淀收集突触囊泡。提取囊泡经电镜观察和酶学检测纯度。以上操作都在低温条件 (4 或冰上) 下完成, 试剂均预冷。

1.3 脂筏的提取

用不连续的蔗糖密度梯度悬浮的办法提取质膜的脂筏^[12]。将突触囊泡悬于含 1% TritonX-100 的 MBS 缓冲液 (25 mmol/L MES-NaOH, 150 mmol/L NaCl, pH 6.5) 中, 匀浆并冰上静置 20 min。用 80% 的蔗糖溶液将匀浆液调至蔗糖浓度为 40%, 置于 5% 和 30% 蔗糖溶液的底部, 从上到下三种蔗糖溶液体积比为 4 : 6 : 3。240000 g 离心 18 h 后, 从上到下依次收集共 13 等份组分, 沉淀混悬于等体积的 MBS 为第 14 份组分。脂筏组分由于具有较低的浮力密度而悬浮在 5% 与 30% 的界面上 (第 4~6 管), 而 TritonX-100 可溶性的蛋白则分布在 40% 蔗糖层内 (第 10~13 管), 不溶性的密度较大的组分沉淀在最底部 (第 14 管)。合并第 4~6 管为脂筏组分, 合并第 10~13 管为可溶性组分。

进行胆固醇抽提实验时, 用含 0.5% TritonX-100 和 0.5% Saponin 的 MBS 溶解囊泡。进行温度影响实验时, 用 37 代替 4, 其他条件均相同。进行 Ca^{2+} 敏感性实验时, 分别用 4 mmol/L EDTA 或 1 mmol/L Ca^{2+} 处理提取的鼠脑突触囊泡, 其他条件均相同。

1.4 质粒的构建

含 Syp 的 pBlueScript 质粒由 Prof. Rudolf Leube (Heidelberg, Germany) 惠赠, pcDNA4.0/His-max 质粒由清华大学段明星教授惠赠。以下野生型 Syp 及其缺失胞质区的突变体被分别亚克隆到 pcDNA4/HisMax 质粒中并测序验证: Syp、Syp¹⁻²²³ (1-223)、Syp¹⁻²⁶⁰ (1-260)。

1.5 细胞培养和转染

HEK293T 使用 DMEM 培养基培养。培养基中

含 10% (体积比) 牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素。细胞在 37 含 5% CO_2 的细胞培养箱中培养。用磷酸钙共沉淀的方法瞬时转染细胞, 转染两天后收集细胞分析。

2 结果和讨论

2.1 Ca^{2+} 对 Syp I 蛋白在囊泡脂筏中分布的影响

脂筏是一种富含胆固醇和磷脂的膜微区^[11,12]。人们最早发现质膜上的脂筏^[11]之后, 在很多亚细胞器膜上也发现存在脂筏, 包括内吞体、高尔基体以及内质网^[13,14]。近期研究表明, 一些参与神经递质释放的重要蛋白, 如 SNARE 蛋白、钙离子通道等^[25], 都在富含胆固醇的脂筏膜微区中有分布, 暗示脂筏在神经递质的释放过程中发挥着重要作用。早期研究显示突触囊泡的磷脂组成与质膜有一定区别, 而且突触囊泡膜上更富含胆固醇, 因此突触囊泡膜上也可能存在脂筏。我们实验室曾研究证明突触囊泡膜上具有典型的脂筏, 并报道了相关的分离纯化方法^[15]。

Synaptophysin (Syp) 是最早被发现的囊泡蛋白之一^[8], 在神经递质释放过程中发挥重要作用^[9]。然而人们对 Syp 蛋白与脂筏的关系了解很少, 仅有的研究结果也有矛盾, 结论不是太清楚^[6,16]。因此我们认为研究 Syp 蛋白是否在脂筏里分布及其调控机制, 对于进一步了解脂筏对递质释放的作用是非常有用的。

生物膜上的脂筏是一种液态有序的微区, 它具有在 4 时不溶于去污剂和低浮力密度的特性。现在, 人们普遍采用分离去污剂不溶的膜组分 (DRMs) 的方法研究脂筏^[17]。有研究显示, Syp 在 0.1% 的 Triton 中有弱的脂筏分布^[10]。我们和前人的研究显示, 4 时 Syp 蛋白完全处于 1% Triton 可溶组分中, 是一个非脂筏蛋白^[2,15]。

Ca^{2+} 是神经递质释放的重要信使, 可以调控很多蛋白的功能和状态。关于 Syp 与递质释放的关系, 以及 Syp 与其他蛋白之间的相互作用已经有大量研究报道^[18-23]。自从 1995 年人们发现 Syp 可以结合 Ca^{2+} 以来^[24], 对于 Syp 和 Ca^{2+} 的作用一直没有进一步的研究。我们通过观察加入 Ca^{2+} 后 Syp 蛋白在脂筏中分布是否发生变化, 来模拟研究囊泡融合时 Ca^{2+} 对囊泡蛋白 Syp 分布的影响。结果表明 (图 1A), Ca^{2+} 可以明显改变 Syp 的分

布, 即促使 Syp 由非脂筏蛋白转变为脂筏结合蛋白。提示在 Ca²⁺ 引发的递质释放过程中, Syp 与脂筏的结合是有变化的。

由于脂筏的 Triton 不溶性具有胆固醇依赖性和温度依赖性^[25,26], 因此抽提胆固醇或升高温度会破坏脂筏, 使之溶于 Triton。此特性对于鉴定脂筏非常便利。因此, 我们进一步抽提了囊泡的胆固醇, 结果显示 Syp 的这种 Ca²⁺ 诱导的 DRM 分布确实是胆固醇依赖的 (图 1A); 我们又进行了温度敏感实验, 结果显示 (图 1B) Ca²⁺ 诱导的 Syp 的脂筏分布是温度依赖的。这进一步证明了 Syp 在 Ca²⁺ 诱导下进入了典型的脂筏区。而作为对照 (图 2), Syb 在囊泡脂筏中的分布基本没有变化^[27]; 非脂筏蛋白 Rabphilin3A、Synapsin、Rab3a 仍是非脂筏蛋白^[26,27]。

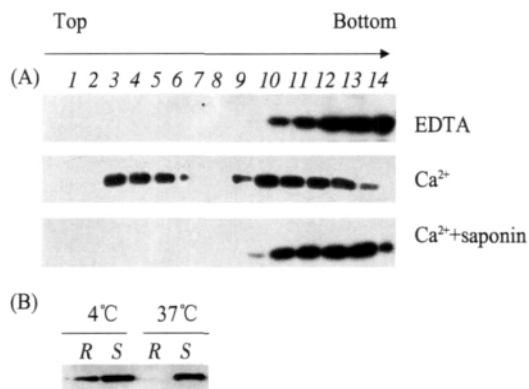


Fig.1 Analysis of the raft association of Syp I. (A) Ca²⁺ triggers the association of Syp I with the raft fraction of synaptic vesicles, which disappears after the cholesterol extraction by saponin; (B) The effect of Ca²⁺ on the distribution of Syp I is temperature-dependent. Rafts were prepared from synaptic vesicles using 1% Triton X-100 in the presence of 4 mmol/L EDTA or 1 mmol/L Ca²⁺. Ca²⁺+Saponin: using saponin to extract cholesterol in the presence of 1 mmol/L Ca²⁺. 37°C was applied with a control of 4°C. Detergent-resistant raft fractions, R; solubilized fractions, S. Synaptic vesicles isolated from rat brain were solubilized in cold 1% Triton X-100 and fractionated on a discontinuous sucrose gradient. The gradient fractions (fractions 1-14) correspond to equal divisions from the top to the bottom of the tube. Equal volumes of each gradient fraction were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane for immunoblot analysis using the antibody against Syp I. The fractions 4-6 were pooled as the raft fractions; the fractions 10-13 were pooled as the solubilized fractions

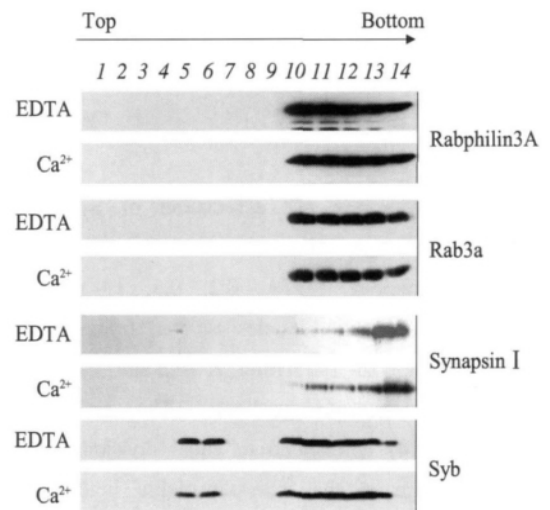


Fig.2 The presence of Ca²⁺ has no influence on the raft association of other proteins on the synaptic vesicles. Synaptic vesicles were treated using 1% Triton X-100 in the presence of 4 mmol/L EDTA or 1 mmol/L Ca²⁺, and then fractionated on a discontinuous sucrose gradient. The gradient fractions (fractions 1-14) correspond to equal divisions from the top to the bottom of the tube. Equal volumes of the gradient fractions from were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose for immunoblot analysis by using specific antibodies against the indicated proteins

2.2 Syp I 蛋白的脂筏分布对 Ca²⁺ 的敏感性和特异性

在 Ca²⁺ 的促进下 Syp 可进入脂筏, 那么 Syp 对多大浓度的 Ca²⁺ 有反应, Syp 是否对所有的二价阳离子都有反应, 也就是 Syp 蛋白的脂筏分布对 Ca²⁺ 的敏感性和特异性是我们接下来要研究的问题。

有研究认为在 Ca²⁺ 信号到来时, 突触前膜附近的 Ca²⁺ 浓度可以在瞬间提高到 0.2 mmol/L 甚至更高^[28,29], 因此, 我们选择了 0 (4 mmol/L EDTA)、0.2、0.5、1.0 mmol/L 四种浓度的 CaCl₂ 进行检测。结果显示 (图 3), 在低至 0.2 mmol/L Ca²⁺ 的条件下, Syp 就可以明显在脂筏分布; 而对照 Syb 蛋白在脂筏的分布没有随 Ca²⁺ 浓度发生明显变化。这意味着 Syp 的这种分布状态的改变在生理条件下是可能发生的。

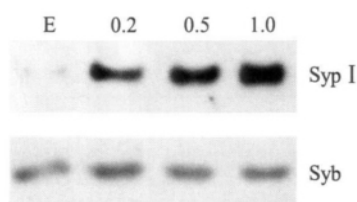


Fig.3 Analysis the raft association of Syp I and Syb under the different concentration of Ca^{2+} . E, 0.2, 0.5, 1.0 represent 4 mmol/L EDTA, 0.2, 0.5, 1.0 mmol/L CaCl_2 , respectively. Synaptic vesicles isolated from rat brain were solubilized in cold 1% Triton X-100 and fractionated on a discontinuous sucrose gradient. The gradient fractions (fractions 1-14) correspond to equal divisions from the top to the bottom of the tube. Insoluble lipid rafts have a lower buoyant density and float to the interface between the 30% and 5% sucrose layers. The fractions 4-6 were pooled as the raft fractions. Equal volumes of each example were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose for immunoblot analysis using specific antibodies against Syp I and Syb

我们还采用多种二价阳离子对囊泡进行处理, 以检测 Syp 对于不同离子的反应情况。结果表明 (图 4), Ca^{2+} 对 Syp 进入脂筏的促进作用最强烈, Mg^{2+} 和 Cs^{2+} 也有明显的促进作用。而 Zn^{2+} 和 Ni^{2+} 对 Syp 进入脂筏几乎没有促进作用。这些结果说明 Syp 进入脂筏具有一定的离子特异性。 Ca^{2+} 是细胞内重要的第二信使以及囊泡释放的重要触发信号^[28, 29], 因此 Syp 对 Ca^{2+} 的响应可能更具有生理意义。

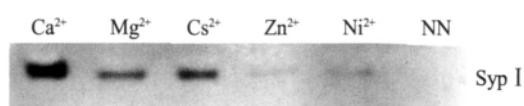


Fig.4 Analysis of the raft association of Syp I under the different bivalent cations. Synaptic vesicles isolated from rat brain were solubilized in cold 1% Triton X-100 with the presence of 1.0 mmol/L of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cs^{2+} , Zn^{2+} , or Ni^{2+} , respectively, and then fractionated on a discontinuous sucrose gradient. The gradient fractions (fractions 1-14) correspond to equal divisions from the top to the bottom of the tube. Insoluble lipid rafts have a lower buoyant density and float to the interface between the 30% and 5% sucrose layers. The fractions 4-6 were pooled as the raft fractions. Equal volumes of each example were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose for immunoblot analysis using the antibody specific for Syp I. NN: the blank control

2.3 Syp I 的胞质区在其 Ca^{2+} 诱导的脂筏分布中的作用

Syp 是最早发现的囊泡蛋白之一^[9], 占囊泡表面总蛋白量的 7%。它是一个四次跨膜的蛋白质^[30], N、C 端都在胞质里 (图 5)^[31]。其中 Syp 蛋白的 C 端胞质区含有十个典型的五肽重复序列, 受到人们的广泛关注: 人们发现 Syp 蛋白的 C 端胞质区可以结合 dynamin^[32], 也可以结合 AP-1 复合体中的 adaptin^[16], 并且有研究报道 Syp 的 Ca^{2+} 结合域在其 C 端胞质区^[33-36]。因此我们推测 C 端胞质区对 Ca^{2+} 诱导的 Syp 的脂筏分布行为具有一定的作用, 并进一步通过观察 Syp 的 C 端胞质区删除后脂筏分布是否发生变化, 以及 Ca^{2+} 是否还影响其脂筏分布, 来研究 Ca^{2+} 诱导的 Syp 脂筏分布的机制。

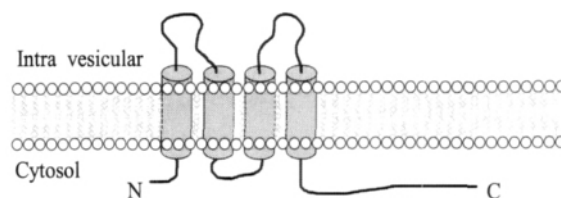


Fig.5 Schematic representation of Syp I^[30]. Syp I is an integral membrane protein with four transmembrane domains and cytoplasmic N and C termini. The C terminus is larger

首先我们在 293T 细胞中转染表达 Syp 蛋白, 转染后的细胞分别用 EDTA 和 Ca^{2+} 处理并分离提取脂筏。结果显示 (图 6A), Ca^{2+} 可以明显诱导 Syp 蛋白进入 293T 细胞的脂筏, 表明 Syp 在 293T 细胞内同样存在 Ca^{2+} 诱导的脂筏结合。分别表达 Syp 的胞质区缺失突变体 Syp¹⁻²²³ 和 Syp¹⁻²⁶⁰ 的 293T 细胞也经同样的两种条件处理。结果显示 (图 6B): Syp¹⁻²²³ (C 端胞质区完全删除的突变体, 仅含 N 端胞质区和跨膜区) 对 Ca^{2+} 没有响应, 无论在何种条件下都完全不与脂筏结合, 说明 Syp 蛋白的 N 端胞质区和跨膜区不能单独和脂筏结合且没有感受 Ca^{2+} 而进入脂筏的能力; 而保留了部分 C 端胞质区的 Syp¹⁻²⁶⁰ 仍可明显受 Ca^{2+} 诱导进入细胞脂筏 (图 6C), 说明 Syp 的 C 端胞质区对于其 Ca^{2+} 依赖的脂筏分布非常重要。

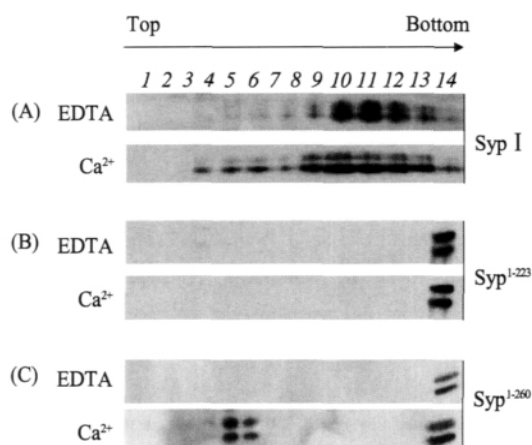


Fig.6 Association of Syp I, Syp¹⁻²²³ and Syp¹⁻²⁶⁰ with rafts in 293T cells. Syp I (A), Syp¹⁻²²³ (B) and Syp¹⁻²⁶⁰ (C) were expressed in 293T cells respectively and rafts were prepared from these cells using 1% Triton X-100 in the presence of 4 mmol/L EDTA or 1 mmol/L Ca²⁺. Cells were solubilized in cold 1% Triton X-100 and fractionated on a discontinuous sucrose gradient. The gradient fractions (fractions 1-14) correspond to equal divisions from the top to the bottom of the tube. Equal volumes of the gradient fractions from were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose for immunoblot analysis by using antibody against the Xpress-tag of the plasmid

综上所述，我们发现囊泡膜上大量存在的 Syp 蛋白的脂筏分布明显受到 Ca²⁺ 的特异性调控：无 Ca²⁺ 的条件下 Syp 为典型的非脂筏蛋白；而经低浓度的 Ca²⁺ 处理后，Syp 可以明显转变为脂筏结合蛋白。这种作用在生理条件（较低浓度 Ca²⁺ 时）即可发生，暗示这一现象具有其生理意义。

最后，我们研究了 Syp 受 Ca²⁺ 诱导进入脂筏的分子机制，发现这一现象依赖于 Syp 的 C 端胞质区。Syp 蛋白受 Ca²⁺ 信号诱导的脂筏定位，很可能是神经细胞在空间和时间上调控 Syp 的活性或状态，或调节其构成融合孔道等功能的一种方式。

参考文献:

- [1] Chamberlain LH, Gould GW. The vesicle- and target-SNARE proteins that mediate Glut4 vesicle fusion are localized in detergent-insoluble lipid rafts present on distinct intracellular membranes. *J Biol Chem*, 2002,277 (51): 49750-49754
- [2] Chamberlain LH, Burgoyne RD, Gould GW. SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001,98(10):5619-5624
- [3] Lang T, Bruns D, Wenzel D, Riedel D, Holroyd P, Thiele C, Jahn R. SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J*, 2001,20(9):2202-2213
- [4] Pombo I, Rivera J, Blank U. Munc18-2/syntaxin3 complexes are spatially separated from syntaxin3-containing SNARE complexes. *FEBS Letters*, 2003,550(1-3):144-148
- [5] Xia FZ, Gao XD, Kwan E, Lam PP, Chan L, Sy K, Sheu L, Wheeler MB, Gaisano HY, Tsushima RG. Disruption of pancreatic beta-cell lipid rafts modifies K(v)2.1 channel gating and insulin exocytosis. *J Biol Chem*, 2004,279(23): 24685-24691
- [6] Gil C, Soler-Jover A, Blasi J, Aguilera J. Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329(1):117-124
- [7] Salaun C, Gould GW, Chamberlain LH. Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem*, 2005,280(20):19449-19453
- [8] Evans GJO, Cousin MA. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem Soc Trans*, 2005,33(6):1350-1353
- [9] Phelan P, Gordon-Weeks PR. Widespread distribution of synaptophysin, a synaptic vesicle glycoprotein, in growing neurites and growth cones. *Eur J Neurosci*, 1992,4 (11): 1180-1190
- [10] Russelakis-Carneiro M, Hetz C, Maundrell K, Soto C. Prion replication alters the distribution of synaptophysin and caveolin 1 in neuronal lipid rafts. *Am J Pathol*, 2004,165(5): 1839-1848
- [11] Simons K, van Meer G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 1988,27(17):6197-6202
- [12] 杨福愉. 生物膜结构研究的一些进展. *生物化学与生物物理进展*, 2003,30(4):495-502
- [13] Seivlever D, Pickett S, Mann KJ, Sambamurti K, Medof ME, Rosenberry TL. Glycosylphosphatidylinositol-anchor intermediates associate with Triton-insoluble membranes in subcellular compartments that include the endoplasmic reticulum. *Biochem J*, 1999,343(3):627-635
- [14] 李春雷, 段文娟, 杨福愉, 张旭家. 肌质网中存在 Caveolin-3 锚定的脂筏微区. *生物物理学报*, 2006,22(增刊):281
- [15] He L, Lv JH, Zhou QH, Sui SF. Lipid Rafts Identified on Synaptic Vesicles from Rat Brain. *Tsinghua Sci Technol*, 2006,11(4):452-458
- [16] Horikawa HP, Kneussel M, El Far O, Betz H. Interaction of synaptophysin with the AP-1 adaptor protein gamma-adaptin. *Mol Cell Neurosci*, 2002,21(3):454-462
- [17] Brown DA. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and

- raft targeting signals. *Physiology*, 2006,21:430-439
- [18] Janz R, Südhof TC, Hammer RE, Uni V, Siegelbaum S, Bolshakov VY. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin and synaptophysin. *Neuron*, 1999,24(3): 687-700
- [19] Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays*, 2004,26(4):445-453
- [20] Yelamanchili SV, Reisinger C, Becher A, Sikorra S, Bigalke H, Binz T, Ahnert-Hilger G. The C-terminal transmembrane region of synaptobrevin binds synaptophysin from adult synaptic vesicles. *Eur J Cell Biol*, 2005,84(4):467-475
- [21] Reisinger C, Yelamanchili SV, Hinz B, Mitter M, Becher A, Bigalke H, Ahnert-Hilger G. The synaptophysin/synaptobrevin complex dissociates independently of neuroexocytosis. *J Neurochem*, 2004,90(1):1-8
- [22] Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol*, 2000,2(1):42-49
- [23] Tarsa L, Goda Y. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002,99(2):1012-1016
- [24] Edelmann L, Hanson PI, Chapman ER, Jahn R. Synaptobrevin binding to synaptophysin — a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J*, 1995,14(2):224-231
- [25] Chamberlain LH. Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Letters*, 2004,559(1-3):1-5
- [26] Hooper NM. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae. *Mol Membr Biol*, 1999,16:145-156
- [27] Lv JH, He L, Sui SF. Lipid rafts association of synaptotagmin I on synaptic vesicles. *Biochemistry (Moscow)*, 2008,73(3):283-288
- [28] Llinás R, Sugimori M, Silver RB. Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science*, 1992,256(5057):677-679
- [29] Augustine GJ, Neher E. Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol*, 1992,450:247-271
- [30] Alder J, Kanki H, Valtorta F, Greengard P, Poo MM. Overexpression of synaptophysin enhances neurotransmitter secretion at xenopus neuromuscular synapses. *J Neurosci*, 1995,15(1):511-519
- [31] Johnston PA, Jahn R, Südhof TC. Transmembrane topography and evolutionary conservation of synaptophysin. *J Biol Chem*, 1989,264(2):1268-1273
- [32] Daly C, Ziff EB. Ca^{2+} -dependent formation of a dynamin-synaptophysin complex: potential role in synaptic vesicle endocytosis. *J Biol Chem*, 2002,277(11):9010-9015
- [33] Yin Y, Dayanithi G, Lemos JR. Ca^{2+} -regulated, neurosecretory granule channel involved in release from neurohypophysial terminals. *J Physiol*, 2002,539:409-418
- [34] Arthur CP, Stowell MH. Structure of synaptophysin: a hexameric MARVEL-domain channel protein. *Structure*, 2007, 15:707-714
- [35] Rehm H, Wiedenmann B, Betz H. Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO J*, 1986,5: 535-541
- [36] Wiedenmann B, Franke WW. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*, 1985,4: 1017-1028

Ca²⁺ TRIGGERED RAFT ASSOCIATION OF SYNAPTOPHYSIN

LÜ Ji-hua, HE Li, SUI Sen-fang

(Department of Biological Sciences & Biotechnology, State-Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: In the work, the authors studied the effect of Ca²⁺ on the distribution of Synaptophysin (Syp) and found that the raft association of Syp was greatly promoted by Ca²⁺. Without Ca²⁺, Syp was a nonraft protein, while under the condition with Ca²⁺, syp became a raft protein. The authors further studied the mechanism of the Ca²⁺-triggered raft association of Syp . They found that this Ca²⁺-triggered raft association was dependent on the C-terminal cytoplasmic domain of Syp , which suggested that this domain was important in such regulation.

Key Words: Synaptophysin ; Lipid rafts; Ca²⁺

This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30670501, 30628007) and The National Basic Research Program of China (2004 CB720005)

Received: Mar 26, 2008

Corresponding author: SUI Sen-fang, Tel : +86(10)62784768 , Fax : +86(10)62793367 , E-mail : suisf@mail.tsinghua.edu.cn