

囊泡转运复合物 Retromer 和 SNX 蛋白家族在发育和疾病中的作用

宋砚泽^{①②}, 沈成豪^③, 李雪^{①②}, 苏立波^{①②}, 林鑫华^①, 吴一卉^{①*}

① 中国科学院动物研究所, 膜生物学国家重点实验室, 北京 100101;

② 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049;

③ 温州医科大学眼视光学院, 温州 325035

* 联系人, E-mail: yihuiwu@ioz.ac.cn

收稿日期: 2015-07-23; 接受日期: 2015-08-20

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB943901, 2011CB943902)和国家自然科学基金(批准号: 31071284, 31371464)资助

摘要 逆向囊泡转运复合物 Retromer 主要负责介导货物蛋白从内体向反式高尔基体或细胞表面逆向转运, 是细胞内囊泡转运分选系统的重要成员. Retromer 复合物主要含有两个亚复合体: 货物选择复合体 VPS26-VPS29-VPS35 和膜结合复合体 SNX-BAR. 本文着重综述了 Retromer 复合物和 SNX 蛋白家族参与囊泡转运过程的分子机制以及它们在发育中对 Wnt 信号的调控作用; 并讨论了 Retromer 复合物在细胞极性形成、细胞凋亡、神经元信号传递中的重要作用; 以及该复合物与帕金森和阿尔茨海默病等退行性疾病之间的关系.

关键词 Retromer, 囊泡转运复合物, SNX 蛋白家族, 发育, 退行性疾病

内膜系统是真核生物的特有结构, 由内质网、高尔基体、溶酶体以及各种转运小泡组成. 内膜系统将真核细胞不同的细胞器分割开来形成一个个封闭环境, 使得各种反应得以顺利进行; 此外, 内膜系统参与内吞作用, 帮助调节新合成的蛋白质, 碳水化合物和脂质将废物排除胞外. 内膜系统将质膜和与深埋在细胞内部的膜细胞器相连, 在生物合成与分泌过程中发挥至关重要的作用.

内体网络(endosomal network)是起于质膜,

包含一系列囊泡的网络运输系统. 货物蛋白通过内吞作用进入早期内体(early endosome), 再经分选运输至不同的细胞器. 早期内体分选货物蛋白主要走向两个途径: (i) 内源溶酶体降解途径, 外界物质通过内吞作用进入到细胞内后, 从早期内体到达晚期内体, 最终在溶酶体中被降解, 其主要功能是下调信号受体; (ii) 货物蛋白的循环回收途径, 例如, 大部分的膜蛋白和脂类成分会重新返回到质膜.

引用格式: 宋砚泽, 沈成豪, 李雪, 等. 囊泡转运复合物 Retromer 和 SNX 蛋白家族在发育和疾病中的作用. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 36-51
Song Y Z, Shen C H, Li X, et al. Roles of Retromer complex and SNX protein family in development and diseases. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 36-51, doi: 10.1360/N052015-00221

1 Retromer 与 SNX 的基本结构

1.1 Retromer

(1) Retromer 的基本结构. 逆向囊泡转运复合物 Retromer 最早发现于酵母中^[1,2], 主要介导多种货物蛋白从囊泡前室向反式高尔基体网络(trans Golgi network, TGN)回收^[3~8]. 酵母 Retromer 复合物主要包括两部分^[2], (i) 货物选择复合体(cargo selective complex), 由囊泡蛋白结合蛋白 26(vacuolar protein-associated protein 26, VPS26), VPS29 和 VPS35 组成, VPS35 通过与货物蛋白的分选序列(sorting motif)结合来募集货物蛋白; (ii) 膜形变复合体(membrane deforming complex)^[9]或膜结合复合体, 由 VPS5, VPS17 与 SNXs(sorting nexins)组成. 哺乳动物的 Retromer 比较复杂, VPS5 蛋白有 2 种亚型, 分别为 SNX1 和 SNX2; VPS17 蛋白有 3 种亚型: SNX5, SNX6 以及 SNX32^[10~12]等.

(2) 货物选择复合体. 货物选择复合体的核心组分是 VPS35, VPS26 和 VPS29 分别连接在 VPS35 马蹄形 α 螺旋的两端^[13,14], 如图 1 所示: 货物选择复合体 VPS26-VPS29-VPS35 本身缺乏膜结合序列, 通过与 GTP 以及 Rab7 蛋白^[15~17]相互作用实现与早期内体结合. 货物选择复合体与 Rab7 的结合限制了本身的流动性, 使得 VPS35 募集的货物蛋白数量增加, 从而形成一个稳定的成核复合物; 此外, VPS26-VPS29-VPS35 复合体还与 Rab-GTP 酶激活蛋白(GAP)TBC1 结构域蛋白家族成员 5(TBC1 domain family member 5, TBC1D5)作用, Rab-GTP 酶激活蛋白的循环对成核复合物起调节作用, 作用机制与 Arf1-GTP 和 Sar1-GTP 类似——Arf1-GTP 和 Sar1-GTP 分别调控 COP I 和 COP II 上有被小泡的组装^[18].

(3) 膜结合复合体. 膜结合复合物是由 SNXs 组成的异源二聚体, SNX1, SNX2, SNX5, SNX6 和 SNX32 都属于 SNX-BAR 家族. 这些 SNXs 都具有一个 BAR 结构域和一个 PX(phox homology)结构域. BAR 结构域能够改变膜表面张力, 使膜发生变形并弯向胞质一侧. 随着更多的 SNX-BAR 结合在早期内体上, 膜的局部弯曲最后形成一个囊泡, 具有管状外观并富含货物蛋白. 囊泡最终与早期内体发生分离, 将货物蛋白运回 TGN. 研究表明, SNX1/SNX2 和 SNX5/SNX6/SNX32 与货物选择复合体之间的亲和

力很低, 可能 Retromer 在进化的过程中是由原来的五聚体, 逐渐分化形成两个功能不同的亚复合体, 二者是按照次序发挥作用, 而不是作为一个整体发挥作用^[19,20].

1.2 SNX 蛋白家族

(1) SNX 的定义, 基本结构和分类. Sorting nexins 蛋白家族是一类进化上保守的, 能与磷酸肌醇结合的大型蛋白家族. 这类蛋白的主要功能是通过细胞内膜转运系统来分选货物蛋白. 所有 SNXs 的 N 端都含有能与磷酸肌醇相结合的 PX 结构域(图 1)^[17,20]. 目前已发现 33 个哺乳动物 SNXs, 可分成 3 个家族: SNX-BAR, SNX-PX 以及其他 SNXs^[21].

(2) SNX-BAR. 所有 Retromer 复合物的 SNXs 都属 SNX-BAR 家族成员; SNX-BAR 具有 2 个膜结合序列: 1 个 BAR 结构域和 1 个 PX 结构域. SNX1 和 SNX2 的 PX 结构域可以与磷脂酰肌醇-3-磷酸(phosphatidylinositol-3-phosphate, PtdIn(3)P)和磷脂酰肌醇-3,5-二磷酸(phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate, PtdIn(3,5)P₂)相结合, 可识别特定囊泡(图 1)^[22]. BAR 结构域不仅能感知膜弯曲, 还能诱导管状囊泡形成. BAR 结构域是蛋白二聚体, 呈香蕉状, 凹面暴露带正电荷的残基, 通过静电作用与膜结合^[23]. 大量 SNX-BAR 二聚体聚化成螺旋结构, 稳定小泡形成, 并不断延伸小泡形成管状(图 2)^[24]. 许多数据表明, SNX-BAR 寡聚体利用“自我相似性”机制进行组装(self-similar assembly). 所谓的相似性即 SNX-BAR 有很多种类型, 但一个管状囊泡上只有同种类型的 SNX-BAR 二聚体对囊泡进行重塑和延伸, 这种特异性是通过每个 BAR 之间的“尖部对尖部”(tip-to-tip)作用实现的. SNX1 和 SNX2 的 BAR 结构域具有双亲性氨基酸末端(典型的 N-BAR 结构域)^[25], 在胞质-脂质交界面形成表面张力^[26], 使膜弯向胞质一侧, 局部的弯曲进一步扩大, 最终形成管状囊泡^[27].

(3) SNX-PX. 在酵母中, SNX-PX 家族的一个成员 Grd19/Snx3 可以作为 Retromer 货物识别分子(cargo-specific adaptor), 通过与 Retromer 复合物合作, 介导铁转运蛋白 Fet3p-Ftr1p 逆向运输. Grd19/Snx3 主要是通过 Ftr1p 的胞质尾部的一个分选序列与 Fet3p-Ftr1p 相结合, 然后在 Retromer 复合体的作用下从内体逆向运回到 TGN^[8].

(4) SNX27. 最近研究发现, SNX27 可以作为

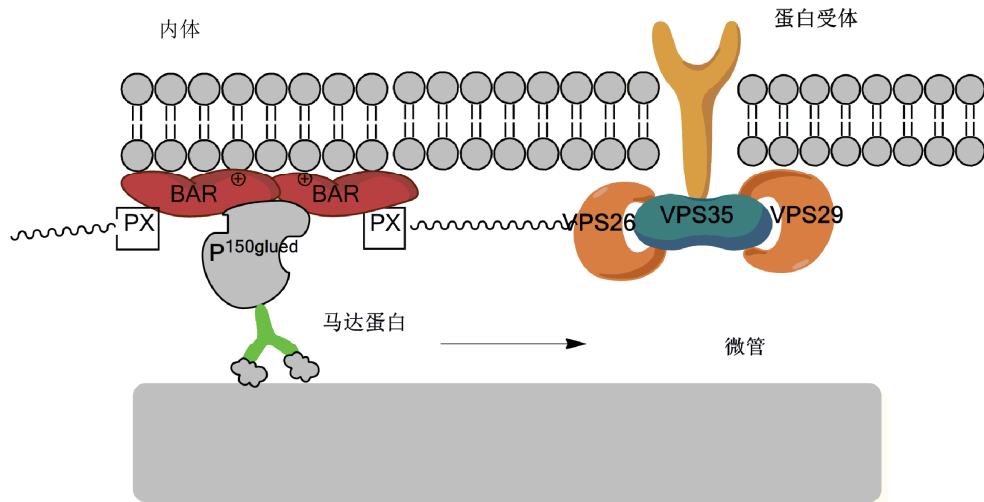


图 1 Retromer 复合物

SNX1/SNX2/SNX5/SNX6 特异性地结合成香蕉状 SNX-BAR 与膜结合导致膜的曲率发生变化, 通过 P150^{glued} 与动力蛋白的结合连接微管; 货物选择复合物通过 VPS26-VPS29-VPS35 识别货物蛋白的胞质尾部对货物蛋白进行分选

Retromer 复合物的货物蛋白配体将许多细胞表面受体运回质膜^[28,29]. SNX27 最初从脑中分离, SNX27 分选许多对神经功能十分重要的受体蛋白, 包括 AMPA 受体, β 2 肾上腺素能受体等^[30-33]. SNX27 具有 PX 结构域, 1 个 N 末端 PDZ 结构域和 1 个 C 末端类 FERM 结构域^[34,35]. SNX27 通过 2 个交界面与 Retromer 复合物相连接: SNX27 类 FERM(FERM-like) 结构域可直接与 SNX1 相结合, 同时 PDZ 结构域上由 10 个氨基酸围成的环可与 VPS26 结合^[28]. 另外 SNX27 还可通过 WASH 复合物间接被募集到 Retromer 复合物上^[29,35]. 此外 SNX27 结合肌动蛋白, 帮助管状囊泡从内体分离; SNX27 也能通过 NPXY/NXXY 分选序列来捕捉货物蛋白^[34,36].

另外两个含有类 FERM 结构域是 SNX17 和 SNX31^[34,36]. SNX17 通过识别 NPXY/NXXY 序列^[36] 负责整合蛋白和 LDL 受体相关蛋白从内体到质膜回收^[37-39]. 但是整合蛋白的分选不依靠 Retromer 复合物的任何亚基, 表明 SNX17 不是 Retromer 复合物的货物蛋白识别分子^[38].

2 囊泡转运复合物 Retromer 的转运机制

2.1 膜的分离以及辅助蛋白

当货物选择复合体和膜结合复合体大量聚集时, 两者结合部位的周围会募集一些辅助蛋白(accessory

protein), 这些辅助蛋白能够稳定管状囊泡的形成, 协助管状囊泡成熟化并从内体分离. 其中一类附属蛋白为含有螺旋-环-螺旋结构域的蛋白(EF-hand domain-containing protein, EHD)家族, EHD 蛋白家族具有类似发动蛋白(dynamin)的特性, 能够使囊泡形成颈部结构, 导致囊泡从内体分离(scission)^[40]. 此外, EHD 还与含有天冬酰胺-脯氨酸-苯丙氨酸(asparagine-proline-phenylalanine, NPF) 三肽(tripeptide)序列的蛋白相结合, 由此募集一些额外的蛋白帮助 Retromer 捕捉货物蛋白或者促进管状囊泡的形成^[41].

另外, 肌动蛋白和微管细胞骨架也参与管状囊泡的重塑过程(membrane remodeling)^[42,43]. SNX5/SNX6 通过识别 p150^{glued} 亚基, 产生依赖于马达蛋白并朝向微管负极方向的拉力^[21,44,45]; 同时, VPS35 与 WASH 复合物中 FAM21 蛋白结合, 利用 WASH 复合物与断裂因子发动蛋白-II(scission factor dynamin-II)以及 CAPZ 蛋白相互作用, 促进肌动蛋白多聚化而形成纵向力^[44,46,47]. 由此, SNX-BAR-Retromer 聚集了一个依靠马达蛋白的拉力, 和一个肌动蛋白多聚化产生的推力^[21,44], 大大提高了囊泡从内体分离的效率. 哺乳动物中, WASH 复合物能够介导 β 2 肾上腺素受体、GPCR 等特殊蛋白逆向运输^[29], 而 WASH 复合物在内体上的定位需要 Retromer 复合物, 提示 Retromer 复合物能够介导这些特异的货物蛋白逆向

运输至细胞表面。

2.2 管状囊泡的去组装

管状囊泡在到达 TGN 与其融合之前, 需要进行去包装(uncoating). 目前尚不了解囊泡去包装的机制. 由于 SNX-BAR 募集需要磷脂(phospholipid), 磷脂磷酸酶(phospholipid phosphatase)参与管状囊泡的去包装. 在线虫(*Caenorhabditis elegans*)中, Retromer 复合物运输 Wntless 蛋白需要 MTM6 和 MTM9 肌微管素脂磷酸酶^[48], 由此推测 MTM6 和 MTM9 对于管状囊泡去组装具有一定作用.

2.3 管状囊泡与 TGN 的锚定及融合

管状囊泡与 TGN 融合(fusion)的确切机制尚不清楚. 通常来讲, 囊泡(vesicle)与靶膜锚定和融合需要 SNARE(soluble-N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor)超家族参与^[49]. SNARE 超家族分为 v-SNAREs 和 t-SNAREs, t-SNAREs 定位于靶膜, v-SNAREs 定位于供膜, 二者形成的 SNARE 复合物迫使两个囊泡相互靠近, 同时 SNARE 复合物形成时释放的自由能会协助融合过程. STxB 蛋白的逆向运输依赖 t-SNAREs-Syntaxin6, Syntaxin16 和 Vti1a, 以及 v-SNAREs-VAMP4 和 VAMP3^[50]. 抑制 VAMP3 或者 VAMP4 都会导致 STxB 的运输障碍, 两个蛋白同时缺失会形成一个叠加效应, 暗示二者在 STxB 运输过程中都具有重要作用, 且两个蛋白之间可能存在功能性冗余(functional redundancy). Syntaxin10, Syntaxin6, Vti1a 和 VAMP3 都已被证实参与 CI-MPR 的逆向运输^[51]. 最近研究显示, 货物蛋白从动力蛋白上释放到 TGN 时需要磷脂酰肌醇-4-磷酸(phosphatidylinositol-4-phosphate, PtdIns(4)P). PtdIns(4)P 在 TGN 上高度富集, 通过募集运输蛋白 AP-1 和 GGAs 等介导特异性货物蛋白逆向运输至高尔基体^[25,27,52]. SNX6 可以作为货物蛋白配体, 与 SNX1/SNX2 及动力蛋白的亚基 p150^{glucd} 直接作用连接货物蛋白和动力蛋白^[21,22]. SNX6 的 PX 结构域与 PtdIns(4)P 具有低亲和力, PtdIns(4)P 的缺失会导致 SNX6 与 p150^{glucd} 作用加强, 阻止货物蛋白释放到 TGN, 由此推测货物蛋白在 TGN 上释放的作用机制可能为: 管状囊泡通过动力蛋白马到达 TGN 时, PtdIns(4)P 削弱 SNX6 与动力蛋白亚基 p150^{glucd} 之间的相互作用, 这种削弱作用或通过改变 SNX6 的蛋白

结构, 或通过 p150^{glucd} 竞争性争夺 SNX6, 最终导致货物蛋白的卸载^[53,54]. 研究表明, SNX4 能够通过结合动力蛋白轻链结合蛋白肾脑共表达蛋白(kidney and brain expressed protein, KIBRA)介导转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)逆向运输至类核状内吞回收小泡(juxtannuclear endocytic recycling compartment, ERC)^[55]. PtdIns(4)P 能够通过调节 SNX4 与 KIBRA 的相互作用来介导 TfR 回收到 ERC.

2.4 Retromer 复合物通过与 VARP 蛋白的作用调控膜融合过程

最新研究显示, Retromer 复合物通过与 VARP 蛋白(VPS9-结构域锚蛋白重复蛋白)相互作用调节膜融合过程, 膜融合主要通过 VAMP7 介导. VAMP7 不仅可以介导内体与内源性溶酶体或者溶酶体与溶酶体之间的融合, 还介导内源性溶酶体与质膜之间的融合^[56]. VARP 蛋白是 Rab32/38 的效应器, VARP 蛋白能够结合内体或溶酶体上 VAMP7, 抑制 SNARE 复合物的形成^[57], 从而阻止囊泡融合. 然而 VARP 的募集过程不依靠 Rab32 蛋白, 而是与 Retromer 复合物的 VPS29 直接作用, 一起被募集到囊泡上. 由此推断, VAMP7 蛋白的循环回收要依靠 VARP 和 Retromer 复合物的共同作用. 在黑素细胞中, VARP 与 Rab32/38 共定位在细胞器和黑素体上^[58]; 在其他类型的细胞中, VARP 主要定位于内体, 同时也出现在囊泡聚集的溶酶体上, 也出现在质膜上^[57]. VARP 蛋白有两个区域, 410~450 残基和 692~730 残基, 两个区域分别含有一个富含半胱氨酸的序列, 使得两个残基都能够独立地与 VPS29 结合^[59]. VARP 蛋白的疏水残基也参与 Retromer 复合物与 Rab-GAP-TBC1D5 的相互作用. Retromer 结合 TBC1D5 会导致 Retromer 复合物从膜上分解, 这主要是通过增加 Rab7A-GTP 酶的水解来实现^[17,20]. VARP 与 Retromer 复合物的结合会抑制 Retromer 与 TBC1D5 之间相互作用, 稳定的 Retromer-VARP 复合物牢固的结合在膜上行使蛋白质的分选和逆向运输的功能^[59].

3 Retromer 在发育中的功能

3.1 VPS26 蛋白在发育中的功能

Retromer 复合物也存在于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 有 3 个基因编码 VPS35 同型蛋白

(VPS35a, VPS35b 和 VPS35c), 有 2 个基因编码 VPS26(VPS26a, VPS26b), 只有一个基因编码 VPS29; 膜结合复合物 SNX 基因有 3 个, 分别编码 SNX1, SNX2a, SNX2b. 对于植物 Retromer 复合物早期研究显示, VPS29 蛋白对于内体稳态平衡, 蛋白运输, 以及生长素输出载体 PIN1 的回收十分重要^[60,61]. 功能受损的 VPS26 蛋白会影响 VPS35 蛋白的功能, 出现与 *vps29* 基因缺失相同的表型. 在 *vps26a-1/vps26b-1* 和 *VPS26a-2/vps26b-1* 基因双敲除的植物中种子生长和发育都受到抑制: 子叶的发育受到影响, 莲座的尺寸矮小; 成年的植物比于野生型植株矮小. 另外, 与 *vps29* 基因缺失株类似, *vps26a/vps26b* 基因双敲除植物初生根的发育受到明显的抑制^[62].

3.2 VPS35 蛋白在发育中的功能

在现已发现的 Retromer 复合物介导的货物蛋白中, 许多都是通过保守分选序列 [FW]L[MV] 与 VPS35 相结合, 例如, 甘露糖-6-磷酸受体 CI-MPR 和分拣蛋白(Sortilin)^[63]. 货物蛋白在和 Retromer 复合物作用之前必须先被 DHHC-15 棕榈酰化, 这是货物蛋白与 Retromer 复合物结合的前提条件^[64]. 有研究显示, 除了这个分选序列之外, 在 CI-MPR 和 VPS35 之间还存在另外一个胞质结合区域^[65]. 另外, 货物蛋白 Wntless(Wls)和 SorLA 同样具有 [FW]L[MV] 序列, 所以这个序列可能是货物蛋白与 Retromer 相互作用所必需的^[1]. 在酵母和哺乳动物体内, VPS26, VPS29 和 VPS35 相互作用会影响 VPS35 的富集; 然而在 VPS29 基因缺失的植物中, VPS35 在细胞质和微粒体的分布不受影响. 另外, 有证据显示, 拟南芥 Rab7 同源序列 RABG3f 可以通过与 VPS35 相互作用参与 Retromer 复合物的募集从而促进 Retromer 复合物与内源囊泡之间的相互作用^[62].

3.3 SNX1 在发育中的功能

研究显示, SNX1 介导 G 蛋白偶联受体的运输. SNX1 能通过识别 10 种不同 G 蛋白偶联受体(GPCR)的尾部, 从而介导蛋白酶活化受体 PAR1 进入溶酶体中降解, 同时通过一个回收途径调节 GPCR-P2Y₁ 受体的回收. 进一步的实验表明, 在没有货物选择复合体的情况下, SNX1 依然能够对 P2Y₁ 和 PAR1 进行分选, 说明 SNX1 对 GPCR 的分选采用一种独立的分选机制^[66-68].

3.4 Retromer 复合物调控 Wnt 信号的分子机制

Wnt 蛋白家族作为形态发生素, 是一类在进化上高度保守的分泌型糖蛋白. 它们通过作用于细胞表面特异受体, 激活 Wnt 信号的下游组成部分, 最终上调或抑制靶基因表达^[69,70], 从而在胚胎发育和成体稳态平衡系统中发挥重要作用^[70,71]. Wnt 信号的失调会导致多种人类疾病^[71,72]. Wntless(Wg)是 Wnt-1 在果蝇(*Drosophila melanogaster*)中的同源基因, 对果蝇成虫翅膀的发育起决定性作用^[73,74]. 脊椎动物中, Wnt 蛋白在神经管的形成过程中发挥重要作用^[75]; Wnt 蛋白同时还在结肠中的微绒毛的隐窝基底表达^[76]. 因此阐明 Wnt 的产生和分泌的机制对于揭示 Wnt 蛋白如何行使形态发生素的功能至关重要. Wnt 蛋白经过双重脂质修饰后被整合到脂蛋白的颗粒中^[77-79], 这种整合方式对于建立浓度梯度起一定作用^[80], 另外大量的实验表明, 硫酸类肝素蛋白多糖对于 Wg 信号的分布起决定作用^[81]. 最近研究显示, Wnt 浓度梯度的形成以及 Wnt 信号的产生是受精确调控的^[82,83], 目前已经发现有两种蛋白对 Wnt 的分泌起调节作用, 一个是 Porcupine 蛋白(Porc)^[84-86], Porc 属于膜结合 O 酰基转移酶家族^[87], 它对 Wnt 蛋白进行棕榈酰化修饰^[78,88]; 另一个是 Wntless(Wls)^[89-91], Wls 蛋白是定位于高尔基体和细胞表面的多次跨膜蛋白, 其功能是将 Wnt 蛋白从高尔基体运输到细胞表面, 随后 Wls 与 Wnt 蛋白分离, Wnt 蛋白分泌到细胞外, Wls 随后通过内吞作用进行回收(图 2)^[82,83]. 在缺失 *wls* 基因的果蝇体内, Wg 不会被分泌到细胞外, 而是在 Wg 生成细胞中积累^[89-91], 使用 RNAi 敲除 Wls 时, Wnt 蛋白的分泌量明显减少^[89,90].

(1) VPS35 对 Wnt 的调控. 在该领域, 本研究组已取得了重要发现, 发现了 Retromer 复合物通过调控 Wls 从细胞膜到 TGN 逆向运输从而调控 Wnt 蛋白分泌的分子机制^[92]. 在线虫体内, 缺失 VPS35 或 VPS26 会导致 Wnt 信号分泌缺陷^[82]; 在果蝇翅膀成虫盘中, VPS35(DVPS35)的缺失使得 Wnt 蛋白的分泌量下降, 而过表达 Wls 可以补偿 Wg 分泌的不足; 在腿成虫盘和翅成虫盘边缘区域, DVPS35 的缺失使得 Wg 蛋白在细胞中大量积聚. 在没有 Wnt 配体的哺乳动物细胞中过表达 DVPS35 可以显著地增强 Wls 蛋白的数量. 以上实验结果表明, DVPS35 通过与质膜和内体上的 Wls 特异性结合介导 Retromer 复合体将 Wls

回收至 TGN^[92]. 而且 Retromer 复合物的这种作用在进化上十分保守^[82], 哺乳动物中, Wnt3a 和 Wnt5a 参与经典的和非经典的 Wnt 信号通路. 哺乳细胞实验表明, 当 VPS35 缺失时, 培养液中分泌出的 Wnt3a 和 Wnt5a 含量明显减少, 说明无论是在果蝇体内还是哺乳动物体内, Retromer 复合物对于 Wnt 蛋白分泌至关重要^[92]. 不经过 Retromer 复合物的回收作用, Wls 蛋白会进入溶酶体降解. Wls 的作用是作为一个 Wnt 蛋白的受体, 将被 Porc 蛋白修饰的 Wnt 蛋白运输到细胞表面, 经过 Retromer 复合物的回收, 返回 TGN, 准备下一次 Wnt 蛋白的运输^[92].

(2) SNX3 对 Wnt 的调控. 在该领域, 本研究组也揭示了重要机制. 发现在果蝇翅膀成虫盘中 SNX3(DSNX3)的缺失导致 Wingless(Wg)分泌障碍; 在昆虫细胞系 S2 细胞中, SNX3 的缺失导致 Wg 的分泌量显著减少, 进一步实验表明, 在缺失 DSNX3 的细胞中, (Wntless)Wls 的量显著减少, 而过表达 *wls* 基因可以弥补 Wg 分泌不足的缺陷. DSNX3 可以和 Retromer 复合物的核心成分 VPS35 相结合, 与 VPS35 共定位在早期内体, 这些数据显示 SNX3 通过调控 Retromer 复合物介导的 Wls 的循环回收, 控制 Wg 蛋白的分泌(图 2). 另外, SNX1 和 SNX6, 两个经典的 Retromer 复合物对 Wg 的分泌不起作用, *snx1* 和 *snx6* 的异位表达不能弥补 Wg 在 DSNX3 缺失的翅膀成虫盘以及 S2 细胞中的分泌, 这说明 SNX3 和 Retromer 复合物存在特异性相互作用. SNX3 没有 BAR 结构域; 由此可以推测 DSNX3 具有一个特别的结构域结合 Retromer 复合物. 另外, DSNX3 可以直接和 Wls 蛋白结合, 两者之间的作用可能帮助 Wls 与 SNX3-Retromer 复合物更加紧密地结合^[93]. SNX3 的作用和 Grd19p 的功能类似, 酵母 SNX3 可识别铁离子转运蛋白 Fet3p-Ftr1p 以介导其逆向运输^[8,94,95].

3.5 Retromer 复合物对细胞极性形成的调控

细胞极性在生物中广泛存在. 许多分子参与上皮细胞极性的建立和维持, 膜蛋白 Crumbs(Crb)就是一个重要的顶端决定因子, Crb 提供膜的顶端标识^[96-99]. 早期实验表明, Crb 并不持续地定位在膜的顶端, 而是处于一种运动状态^[100-102]. 本研究发现, 果蝇体内缺失 *dvps35* 的胚胎出现角质层丢失, 这种丢失的变化差异由微弱到强烈不等. 角质层的丢失表明在缺失 *dvps35* 的胚胎中顶端和基底端的极性受

到了破坏, 上皮细胞形成不规则的非柱状的结构. 而进一步的实验表明, 是上皮细胞顶端极性而不是基底端极性, 会在缺失 *dvps35* 的胚胎中被破坏掉. 在缺失 *dvps35* 的胚胎中过表达 Crb 能够恢复部分地上皮细胞的极性. Crb 是 Retromer 复合体的一个货物蛋白, 缺失 Retromer 复合体, Crb 蛋白会被运输至溶酶体降解, 从而影响上皮细胞极性的形成^[103]. 在果蝇体内还有另一个极性调控元件 Scribble(Scrib), 它是一个侧壁(basolateral)调控蛋白^[104], 还能抑制果蝇组织的恶性生长^[105], 这使 Scrib 蛋白成为一个新的肿瘤抑制基因(tumor suppressor gene, TSG). Scrib 能对 Retromer 产生影响^[106], 这个调控作用比较复杂, 能够明确的是此调控作用不是一个正向调控, 因为在 Retromer 突变体中, 质膜上的 Crb 和 Wls 会进入溶酶体中降解, 在 Scrib 突变体中, Crb 会出现错配分选(misdistribution)的现象. 然而, Scrib 不是简单地负调控 Retromer 复合物, 因为 Retromer 功能的下调会增强 Scrib 蛋白的亚效等位基因表型(hypomorphic phenotype); 而 *scrib* 基因的双敲除会导致 Retromer 复合物亚基定位出现异常, 造成复合物的转运功能缺陷^[55,103], 可能 Scrib 的突变不会导致 Retromer 的功能上调和下调, 而是会导致 Retromer 复合物的分选功能出现异常(inappropriate sorting), 由此货物蛋白回到了质膜上的一个非正常位置上^[106]. 货物蛋白除了经 Retromer 复合物途径进行分选之外, 还会经过早期内体成熟为晚期内体途径进入溶酶体降解. 除此之外, 一些货物蛋白还通过 Rab11 从早期内体中出逃^[100,102,107], 当 Scrib 调控功能缺失影响 Retromer 时, 货物就会进入此途径^[106].

3.6 Retromer 复合物在果蝇复眼光感受器中的作用

研究显示, 在果蝇复眼中, 视紫红质(Rhodopsin)蛋白也需要 Retromer 复合物. 视紫红质是一类 G 蛋白偶联受体, 是果蝇复眼中光感受器(photoreceptors, PRs)的重要感光元件. 在人类和果蝇体内, 视紫红质蛋白的运输障碍会导致 PRs 的退化^[108-112]. 果蝇复眼中包含 800 个六边形小眼^[110,112-114]. 每个小眼包含 8 个 PRs(R1~R8), 每个 PR 都表达视紫红质蛋白^[110,112-115]. Rh1 是一个主要的视紫红质蛋白, 主要在 R1~R6 中表达^[110,112-114]. 在强光的作用下, 活化的 Rh1 通过内吞作用进入细胞内, 最后在溶酶体中降解. 虽然 Retromer 的缺失不会明显影响复眼的发育, 但

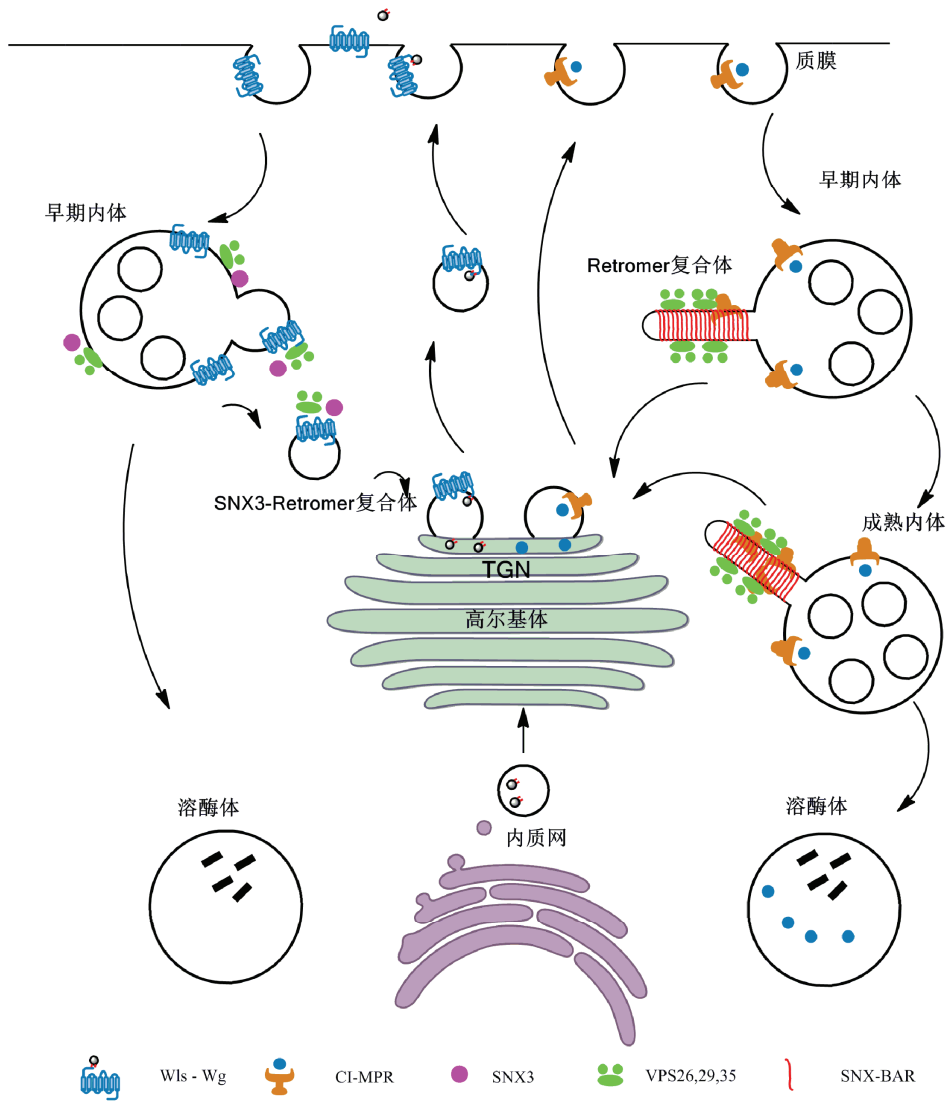


图2 Wntless 和 Cl-MPR 的逆向转运

Wingless 蛋白结合 Wntless 后被运输到细胞表面, 分泌到细胞外产生浓度梯度, 随后 Wntless 被内吞进入内体, 在内体富集化并通过 SNX3-Retromer 复合物回到反式高尔基体. Cl-MPR 将合成的水解酶直接运输到内体, 并且在内体释放水解酶. SNX-BAR-Retromer 复合物负责将 Cl-MPR 运送回反式高尔基体准备进行下一次的循环运输

是缺失 VPS26 和 VPS35 的果蝇会出现一种强光依赖性的 PR 功能退化现象. Rh1 会在内体和溶酶体中积累, Rh1 的过度内吞会导致溶酶体、溶酶体中间体, 以及晚期内体的数量迅速增多, 加快内源性溶酶体的快速成熟, 导致溶酶体数量的过度扩张. Rh1 平衡稳态的失调会压迫 PR 细胞, 导致 PR 细胞的退化. 在缺失 *vps26* 和 *vps35* 基因的 PR 细胞中补偿表达 VPS26 蛋白和 VPS35 蛋白能够显著抑制 PR 退化的发生, 说

明 Retromer 复合物对 Rh1 逆向运输, 维持 PR 的功能和完整性具有重要的作用^[116].

3.7 Retromer 复合物与细胞凋亡

吞噬受体 CED-1 介导吞噬性细胞识别凋亡细胞, 在缺失 Retromer 的情况下 CED-1 不会被回收, 而是靶向运输到溶酶体中降解^[117,118]. 然而, CED-1 缺乏分选序列[FW]L[MV], 表明 CED-1 利用另一种分选

序列与 Retromer 复合体相结合, 如果能够鉴别这个分选序列, 就能拓展 Retromer 分选蛋白的范围, 发现新的货物蛋白。

3.8 Retromer 复合体在神经元中的作用

最近研究显示, 在神经元中 Retromer 复合体能够协助神经信号受体的快速释放. 信号受体可以通过远距离扩散的方式被传送到树突末端^[119]; 或通过直接胞吐方式形成囊泡转运到树突^[120]; 然而存在第 3 种方式, 那就是膜插入的方式直接进入树突的轴区域, 这种方式不发生在神经棘中, 而是在细胞质膜上产生一个富集受体的稳定区域, 随后经短距离扩散方式进入相邻的突触或突触外区域^[121]. Retromer 复合体能够介导 β 2ARS(β 2 型肾上腺素受体)在神经元的表面的分泌. β 2ARS 在神经元树突中广泛分布, 在突触外分布的数量十分巨大^[122]. SNX27 识别 β 2ARS 胞质尾部从而介导 β 2ARS 与 Retromer 复合体相结合^[28,29,32], Retromer 将 β 2ARS 从内体迅速运输到树突表面, 同时促进 AMPA 和 NMDA 受体在神经元表面的表达^[123]; 神经元细胞能够通过树突迅速地传递特异性的信号受体是因为 Retromer 和内体广泛分布在树突轴附近约 2 μ m 的区域, 这种分布使 Retromer 和内体形成一种局部信号分配中心, 信号受体能够在短短的几秒钟内通过近距离膜插入的方式进入到树突传递信号发挥作用^[124].

4 Retromer 复合体与疾病的关系

4.1 Retromer 复合体与帕金森病

研究表明, 一个稀有的 *vps35* 常染色体显性突变 (D620N 突变) 会导致帕金森病 (Parkinson's disease, PD)^[125,126]. Retromer 对于 WASH 复合物的募集有一定的作用^[20], 而 WASH 复合物与一些膜蛋白如 β 2ARS, α 5 β 1 整合素, 葡萄糖转运体 GLUT-1 从内体到细胞表面的逆向运输密切相关^[127]. *VPS35*D620N 突变会破坏 Retromer 复合体与 WASH 之间的相互作用. 虽然这种破坏作用并不影响 Retromer 复合体 *VPS26*-*VPS29*-*VPS35* 的组装过程^[128], 但对 WASH 的功能产生影响. 研究发现, 在 D620N 突变的细胞中, 自噬反应 (autophagy) 功能异常, 同样的表型也出现在 WASH 复合物表达量下降或者过表达 FAM21

蛋白的细胞中. 过表达 FAM21 蛋白会引起 FAM21 蛋白竞争性结合 *VPS35*, 从而削弱 WASH 复合物与 Retromer 复合物的结合作用^[129-131]. 这说明自噬反应与 WASH-Retromer 复合物之间存在着某种联系. WASH-Retromer 复合物受到抑制会导致 ATG9A 在胞内定位和逆向运输异常, 而 ATG9A 对于自噬体的形成十分重要. ATG9A 在循环内体 (recycling endosome) 中滞留, 无法运输至自噬体, 自噬体的形成受到抑制. 其他影响 ATG9A 的运输同样会阻止自噬体的形成^[132-135]. 过表达 α -Synuclein 也会引起 ATG9A 运输异常. α -Synuclein 是 Lewy 体的重要组成部分, 其突变型与帕金森病的早发密切相关. 自噬反应能够去除损伤的线粒体以及特定的胞内病原体, 如沙门氏菌等^[136,137]. 而且, 自噬反应负责清除胞浆内有聚集倾向的蛋白质 (intracytoplasmic aggregate-prone proteins), 如亨廷顿氏舞蹈症 (huntingtin disease) 患者的亨廷顿蛋白, 以及 α -Synuclein^[138-140]. 自噬反应在 PD 病人中通常表现为异常. 与 *vps* 基因敲除不同, D620N 突变只会影响 Retromer 与 WASH 复合物的相互作用^[141]. GLUT-1 在胞内的定位与 WASH 复合物相关^[28,142], 所以, 在 D620N 突变的细胞中 GLUT-1 蛋白的定位会受到干扰; 同样, WASH 复合物与细胞的扩散密切相关, 因此 D620N 突变的细胞还表现出细胞扩散障碍^[129,143].

4.2 Retromer 复合体与阿尔茨海默病

大量研究表明, 淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 经蛋白酶分解产生的 β 淀粉样蛋白的大量沉积是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease) 发病的病理学基础^[144]. 而 Retromer 复合体介导的货物蛋白回收作用被认为与晚发型阿尔茨海默病密切相关. 在晚发型阿尔茨海默病病人的海马结构中 *VPS35* 和 *VPS26* 的量减少了大约 40%^[145]. 利用基因功能构建的动物模型实验显示, 在海马结构中部分 *VPS35* 和 *VPS26* 的缺失会诱导同样的阿尔茨海默病的病理特征的出现^[146].

5 展望

总之, Retromer 复合体在发育中的作用与其所介导货物蛋白的功能密不可分, 表 1 列出了与 Retromer 复合物相互作用的蛋白, 包括一些调节内膜转运的

表 1 Retromer 复合物与其相互作用的蛋白

与 Retromer 复合物作用的蛋白或者蛋白复合物	机制或作用	参考文献
CI-MPR	溶菌酶的回收	[3~8]
β 2ARS	G 蛋白偶联受体, 负责儿茶酚胺类物质, 如肾上腺素的运输	[109~111]
Wntless	转运和分泌 Wnt 蛋白	[77~79]
CED-1	调控吞噬细胞识别凋亡细胞	[104~105]
Crumbs	细胞顶端极性的建立和维持	[92~99]
Scribble	细胞侧壁极性的调控	[41,99~102]
Fet3-Ftr1	铁离子转运受体	[8]
P2Y ₁	腺苷二磷酸受体	[61~63]
KIBRA	肾脑共表达蛋白与 Retromer 的结合	40
PIN1	auxin(植物激素)受体	[56~57]
SorLA	帮助识别 retromer 运输的蛋白	[1]
VARP	调控神经突的生长	[112]
Rhodopsin	光感受器	[116~124]
WASH	奥尔德里奇综合征蛋白和 scar 同源复合物	[20,25,28,45,127~135,141~143]
APP	淀粉样前体蛋白	[144]
Sortilin	反式高尔基体跨膜蛋白	[59]
Dynactin	通过结合马达蛋白和驱动蛋白协助微管进行物质运输	[25~27]
integrin	介导细胞和胞外基质相互作用的主要黏附分子家族	[53~54]
LDL receptor	介导高胆固醇低密度脂蛋白的内吞作用	[55]

表 2 Retromer 复合物相关基因突变导致的表型

基因	突变产生的发育或者疾病相关的表型	参考文献
<i>vps26</i>	矮植株表型; 初生根发育缺陷; Wg 蛋白分泌缺陷	[58,78]
<i>vps29</i>	内体稳态失调; PIN 蛋白动态循环失调; 矮植株表型	[56,57]
<i>vps35</i>	Wg 分泌缺陷; 果蝇胚胎顶端-基底极性缺失; 帕金森; 阿尔茨海默综合征	[91,99,125,126]
<i>snx3</i>	Wg 蛋白分泌缺陷	[88]

重要调节因子. 即使单纯的 Retromer 组分的缺失就会导致 Wnt 等重要发育信号分子的失调, 对生物的发育产生严重影响(表 2). 随着更多深入的研究, 与 Retromer 复合物相互作用的蛋白会越来越多, 将揭示出 Retromer 在生物体发育中更多样化的生理功能, 如最新发现 Retromer 复合物在神经元中转运一些重要的神经信号受体, 协助完成神经信号在细胞之间的迅速传递等. 但在该领域, 仍有很多未解之谜:

Retromer 复合物还参与哪些重要的生理功能? Retromer 复合物以及 SNX 蛋白家族和许多蛋白或者蛋白复合物的结合序列以及相互作用机制如何? 我们相信, 深入了解这些作用机制, 将为细胞囊泡转运以及物质运输的发生发展机理提供宝贵线索, 加深对细胞等生命体活动的认识, 有助于人类阐明癌症、神经退行性疾病等致病机制, 为治疗这些疾病提供重要的科学理论依据.

参考文献

- 1 McGough I J, Cullen P J. Recent advances in retromer biology. *Traffic*, 2011, 12: 963-971
- 2 Seaman M N, McCaffery J M, Emr S D. A membrane coat complex essential for endosome-to-golgi retrograde transport in yeast. *J Cell Biol*, 1998, 142: 665-681
- 3 Bachhawat A K, Suhan J, Jones E W. The yeast homolog of h < beta > 58, a mouse gene essential for embryogenesis, performs a role in the delivery of proteins to the vacuole. *Genes Dev*, 1994, 8: 1379-1387
- 4 Horazdovsky B F, Davies B A, Seaman M N, et al. A sorting nexin-1 homologue, Vps5p, forms a complex with Vps17p and is required

- for recycling the vacuolar protein-sorting receptor. *Mol Biol Cell*, 1997, 8: 1529–1541
- 5 Kohrer K, Emr S D. The yeast *Vps17* gene encodes a membrane-associated protein required for the sorting of soluble vacuolar hydrolases. *J Biol Chem*, 1993, 268: 559–569
 - 6 Paravicini G, Horazdovsky B F, Emr S D. Alternative pathways for the sorting of soluble vacuolar proteins in yeast: a *Vps35* null mutant missorts and secretes only a subset of vacuolar hydrolases. *Mol Biol Cell*, 1992, 3: 415–427
 - 7 Seaman M N, Marcusson E G, Cereghino J L, et al. Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, *Vps10p*, requires the function of the *Vps29*, *Vps30*, and *Vps35* gene products. *J Cell Biol*, 1997, 137: 79–92
 - 8 Strohlic T I, Setty T G, Sitaram A, et al. *Grd19/Snx3p* functions as a cargo-specific adapter for retromer-dependent endocytic recycling. *J Cell Biol*, 2007, 177: 115–125
 - 9 Seaman M N, Williams H P. Identification of the functional domains of yeast sorting nexins *Vps5p* and *Vps17p*. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 2826–2840
 - 10 Carlton J G, Bujny M V, Peter B J, et al. Sorting nexin-2 is associated with tubular elements of the early endosome, but is not essential for retromer-mediated endosome-to-TGN transport. *J Cell Sci*, 2005, 118: 4527–4539
 - 11 Griffin C T, Trejo J, Magnuson T. Genetic evidence for a mammalian retromer complex containing sorting nexins 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 15173–15177
 - 12 Wassmer T, Attar N, Bujny M V, et al. A loss-of-function screen reveals *SNX5* and *SNX6* as potential components of the mammalian retromer. *J Cell Sci*, 2007, 120: 45–54
 - 13 Hierro A, Rojas A L, Rojas R, et al. Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature*, 2007, 449: 1063–1067
 - 14 Norwood S J, Shaw D J, Cowieson N P, et al. Assembly and solution structure of the core retromer protein complex. *Traffic*, 2011, 12: 56–71
 - 15 Balderhaar H J, Arlt H, Ostrowicz C, et al. The Rab GTPase *Ypt7* is linked to retromer-mediated receptor recycling and fusion at the yeast late endosome. *J Cell Sci*, 2010, 123: 4085–4094
 - 16 Rojas R, van Vlijmen T, Mardones G A, et al. Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol*, 2008, 183: 513–526
 - 17 Seaman M N, Harbour M E, Tattersall D, et al. Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase *Rab7* and inhibited by the Rab-GAP *TBC1D5*. *J Cell Sci*, 2009, 122: 2371–2382
 - 18 Pucadyil T J, Schmid S L. Conserved functions of membrane active gtpases in coated vesicle formation. *Science*, 2009, 325: 1217–1220
 - 19 Collins B M, Skinner C F, Watson P J, et al. *Vps29* has a phosphoesterase fold that acts as a protein interaction scaffold for retromer assembly. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12: 594–602
 - 20 Harbour M E, Breusegem S Y, Antrobus R, et al. The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *J Cell Sci*, 2010, 123: 3703–3717
 - 21 Wassmer T, Attar N, Harterink M, et al. The retromer coat complex coordinates endosomal sorting and dynein-mediated transport, with carrier recognition by the trans-Golgi network. *Dev Cell*, 2009, 17: 110–122
 - 22 Cozier G E, Carlton J, McGregor A H, et al. The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J Biol Chem*, 2002, 277: 48730–48736
 - 23 Zimmerberg J, McLaughlin S. Membrane curvature: how bar domains bend bilayers. *Curr Biol*, 2004, 14: R250–R252
 - 24 McMahon H T, Gallop J L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, 2005, 438: 590–596
 - 25 Bhatia V K, Madsen K L, Bolinger P Y, et al. Amphipathic motifs in bar domains are essential for membrane curvature sensing. *EMBO J*, 2009, 28: 3303–3314
 - 26 Peter B J, Kent H M, Mills I G, et al. Bar domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin bar structure. *Science*, 2004, 303: 495–499
 - 27 Frost A, Unger V M, De Camilli P. The bar domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell*, 2009, 137: 191–196
 - 28 Steinberg F, Gallon M, Winfield M, et al. A global analysis of *SNX27*-retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport. *Nat Cell Biol*, 2013, 15: 461–471
 - 29 Temkin P, Lauffer B, Jager S, et al. *SNX27* mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 715–721

- 30 Balana B, Maslennikov I, Kwiatkowski W, et al. Mechanism underlying selective regulation of g protein-gated inwardly rectifying potassium channels by the psychostimulant-sensitive sorting nexin 27. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 5831–5836
- 31 Joubert L, Hanson B, Barthet G, et al. New sorting nexin (SNX27) and NHERF specifically interact with the 5-HT4A receptor splice variant: roles in receptor targeting. *J Cell Sci*, 2004, 117: 5367–5379
- 32 Lauffer B E, Melero C, Temkin P, et al. SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane. *J Cell Biol*, 2010, 190: 565–574
- 33 Loo L S, Tang N, Al-Haddawi M, et al. A role for sorting nexin 27 in AMPA receptor trafficking. *Nat Commun*, 2014, 5: 3176
- 34 Ghai R, Mobli M, Norwood S J, et al. Phox homology band 4.1/ezrin/radixin/moesin-like proteins function as molecular scaffolds that interact with cargo receptors and Ras GTPases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 7763–7768
- 35 Kajii Y, Muraoka S, Hiraoka S, et al. A developmentally regulated and psychostimulant-inducible novel rat gene *mrtl* encoding PDZ-PX proteins isolated in the neocortex. *Mol Psychiatry*, 2003, 8: 434–444
- 36 Ghai R, Bugarcic A, Liu H, et al. Structural basis for endosomal trafficking of diverse transmembrane cargos by PX-FERM proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: E643–E652
- 37 Botcher R T, Stremmel C, Meves A, et al. Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of beta1 integrins by binding to the beta1-integrin tail. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 584–592
- 38 Steinberg F, Heesom K J, Bass M D, et al. SNX17 protects integrins from degradation by sorting between lysosomal and recycling pathways. *J Cell Biol*, 2012, 197: 219–230
- 39 van Kerkhof P, Lee J, McCormick L, et al. Sorting nexin 17 facilitates LRP recycling in the early endosome. *EMBO J*, 2005, 24: 2851–2861
- 40 Daumke O, Lundmark R, Vallis Y, et al. Architectural and mechanistic insights into an ehd atpase involved in membrane remodelling. *Nature*, 2007, 449: 923–927
- 41 Naslavsky N, Caplan S. Ehd proteins: key conductors of endocytic transport. *Trends Cell Biol*, 2011, 21: 122–131
- 42 Campellone K G, Welch M D. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 237–251
- 43 Soldati T, Schliwa M. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 897–908
- 44 Derivery E, Sousa C, Gautier J J, et al. The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell*, 2009, 17: 712–723
- 45 Hong Z, Yang Y, Zhang C, et al. The retromer component SNX6 interacts with dynactin p150(Glued) and mediates endosome-to-TGN transport. *Cell Res*, 2009, 19: 1334–1349
- 46 Gomez T S, Billadeau D D. A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev Cell*, 2009, 17: 699–711
- 47 Jia D, Gomez T S, Metlagel Z, et al. WASH and WAVE actin regulators of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family are controlled by analogous structurally related complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 10442–10447
- 48 Silhankova M, Port F, Harterink M, et al. Wnt signalling requires MTM-6 and MTM-9 myotubularin lipid-phosphatase function in Wnt-producing cells. *EMBO J*, 2010, 29: 4094–4105
- 49 Sudhof T C, Rothman J E. Membrane fusion: grappling with snare and sm proteins. *Science*, 2009, 323: 474–477
- 50 Mallard F, Tang B L, Galli T, et al. Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two snare complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol*, 2002, 156: 653–664
- 51 Ganley I G, Espinosa E, Pfeffer S R. A syntaxin 10-snare complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells. *J Cell Biol*, 2008, 180: 159–172
- 52 Roux A, Koster G, Lenz M, et al. Membrane curvature controls dynamin polymerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 4141–4146
- 53 Cullen P J, Korswagen H C. Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 29–37
- 54 Niu Y, Zhang C, Sun Z, et al. Ptdins(4)P regulates retromer-motor interaction to facilitate dynein-cargo dissociation at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol*, 2013, 15: 417–429
- 55 Pocha S M, Wassmer T, Niehage C, et al. Retromer controls epithelial cell polarity by trafficking the apical determinant crumbs. *Curr Biol*, 2011, 21: 1111–1117
- 56 Chaineau M, Danglot L, Galli T. Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking. *FEBS Lett*, 2009, 583: 3817–3826

- 57 Schäfer I B, Hesketh G G, Bright N A, et al. The binding of Varp to VAMP7 traps VAMP7 in a closed, fusogenically inactive conformation. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19: 1300–1309
- 58 Wasmeier C, Romao M, Plowright L, et al. Rab38 and Rab32 control post-Golgi trafficking of melanogenic enzymes. *J Cell Biol*, 2006, 175: 271–281
- 59 Hesketh G G, Perez-Dorado I, Jackson L P, et al. VARP is recruited on to endosomes by direct interaction with retromer, where together they function in export to the cell surface. *Dev Cell*, 2014, 29: 591–606
- 60 Shimada T, Koumoto Y, Li L, et al. AtVPS29, a putative component of a retromer complex, is required for the efficient sorting of seed storage proteins. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47: 1187–1194
- 61 Jaillais Y, Santambrogio M, Rozier F, et al. The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants. *Cell*, 2007, 130: 1057–1070
- 62 Zelazny E, Santambrogio M, Pourcher M, et al. Mechanisms governing the endosomal membrane recruitment of the core retromer in arabidopsis. *J Biol Chem*, 2013, 288: 8815–8825
- 63 Seaman M N. Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-mediated endosome-to-TGN retrieval. *J Cell Sci*, 2007, 120: 2378–2389
- 64 McCormick P J, Dumaresq-Doiron K, Pluviose A S, et al. Palmitoylation controls recycling in lysosomal sorting and trafficking. *Traffic*, 2008, 9: 1984–1997
- 65 Arighi C N, Hartnell L M, Aguilar R C, et al. Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol*, 2004, 165: 123–133
- 66 Heydorn A, Sondergaard B P, Ersboll B, et al. A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins erm-binding phosphoprotein 50 (EBP50), n-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP). *J Biol Chem*, 2004, 279: 54291–54303
- 67 Nisar S, Kelly E, Cullen P J, et al. Regulation of P2Y1 receptor traffic by sorting Nexin 1 is retromer independent. *Traffic*, 2010, 11: 508–519
- 68 Wang Y, Zhou Y, Szabo K, et al. Down-regulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 1965–1976
- 69 Gurdon J B, Bourillot P Y. Morphogen gradient interpretation. *Nature*, 2001, 413: 797–803
- 70 Logan C Y, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 781–810
- 71 Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*, 2012, 149: 1192–1205
- 72 Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17: 45–51
- 73 Neumann C J, Cohen S M. Long-range action of wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development*, 1997, 124: 871–880
- 74 Zecca M, Basler K, Struhl G. Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell*, 1996, 87: 833–844
- 75 Kiecker C, Niehrs C. A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development*, 2001, 128: 4189–4201
- 76 Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 695–723
- 77 Nusse R. Wnts and hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development*, 2003, 130: 5297–5305
- 78 Takada R, Satomi Y, Kurata T, et al. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell*, 2006, 11: 791–801
- 79 Willert K, Brown J D, Danenberg E, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 2003, 423: 448–452
- 80 Panakova D, Sprong H, Marois E, et al. Lipoprotein particles are required for hedgehog and wingless signalling. *Nature*, 2005, 435: 58–65
- 81 Baeg G H, Lin X, Khare N, et al. Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of wingless. *Development*, 2001, 128: 87–94
- 82 Coudreuse D Y, Roel G, Betist M C, et al. Wnt gradient formation requires retromer function in wnt-producing cells. *Science*, 2006, 312: 921–924

- 83 Hausmann G, Banziger C, Basler K. Helping wingless take flight: how wnt proteins are secreted. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 331–336
- 84 Kadowaki T, Wilder E, Klingensmith J, et al. The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in wingless processing. *Genes Dev*, 1996, 10: 3116–3128
- 85 Rocheleau C E, Downs W D, Lin R, et al. Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell*, 1997, 90: 707–716
- 86 Tanaka K, Kitagawa Y, Kadowaki T. *Drosophila* segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 2002, 277: 12816–12823
- 87 Hofmann K. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25: 111–112
- 88 Zhai L, Chaturvedi D, Cumberledge S. *Drosophila* wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine. *J Biol Chem*, 2004, 279: 33220–33227
- 89 Banziger C, Soldini D, Schutt C, et al. Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell*, 2006, 125: 509–522
- 90 Bartscherer K, Pelte N, Ingelfinger D, et al. Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell*, 2006, 125: 523–533
- 91 Goodman R M, Thombre S, Firtina Z, et al. Sprinter: a novel transmembrane protein required for Wg secretion and signaling. *Development*, 2006, 133: 4901–4911
- 92 Belenkaya T Y, Wu Y, Tang X, et al. The retromer complex influences wnt secretion by recycling wntless from endosomes to the trans-Golgi network. *Dev Cell*, 2008, 14: 120–131
- 93 Zhang P, Wu Y, Belenkaya T Y, et al. SNX3 controls Wingless/Wnt secretion through regulating retromer-dependent recycling of Wntless. *Cell Res*, 2011, 21: 1677–1690
- 94 Voos W, Stevens T H. Retrieval of resident late-Golgi membrane proteins from the prevacuolar compartment of *saccharomyces cerevisiae* is dependent on the function of Grd19p. *J Cell Biol*, 1998, 140: 577–590
- 95 Zhou C Z, Li de La Sierra-Gallay I, Quevillon-Cheruel S, et al. Crystal structure of the yeast Phox homology (PX) domain protein GRD19p complexed to phosphatidylinositol-3-phosphate. *J Biol Chem*, 2003, 278: 50371–50376
- 96 Bachmann A, Schneider M, Theilenberg E, et al. *Drosophila* stardust is a partner of crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature*, 2001, 414: 638–643
- 97 Hong Y, Stronach B, Perrimon N, et al. *Drosophila* stardust interacts with crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature*, 2001, 414: 634–638
- 98 Tepass U, Theres C, Knust E. Crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell*, 1990, 61: 787–799
- 99 Wodarz A, Hinz U, Engelbert M, et al. Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell*, 1995, 82: 67–76
- 100 Blankenship J T, Fuller M T, Zallen J A. The *Drosophila* homolog of the Exo84 exocyst subunit promotes apical epithelial identity. *J Cell Sci*, 2007, 120: 3099–3110
- 101 Lu H, Bilder D. Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*. *Nat Cell Biol*, 2005, 7: 1232–1239
- 102 Roeth J F, Sawyer J K, Wilner D A, et al. Rab11 helps maintain apical crumbs and adherens junctions in the *Drosophila* embryonic ectoderm. *PLoS One*, 2009, 4: e7634
- 103 Zhou B, Wu Y, Lin X. Retromer regulates apical-basal polarity through recycling crumbs. *Dev Biol*, 2011, 360: 87–95
- 104 Yamanaka T, Ohno S. Role of Lgl/Dlg/Scribble in the regulation of epithelial junction, polarity and growth. *Front Biosci*, 2008, 13: 6693–6707
- 105 Bilder D. Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev*, 2004, 18: 1909–1925
- 106 de Vreede G, Schoenfeld J D, Windler S L, et al. The scribble module regulates retromer-dependent endocytic trafficking during epithelial polarization. *Development*, 2014, 141: 2796–2802
- 107 Fletcher G C, Lucas E P, Brain R, et al. Positive feedback and mutual antagonism combine to polarize crumbs in the *Drosophila* follicle

- cell epithelium. *Curr Biol*, 2012, 22: 1116–1122
- 108 Galy A, Roux M J, Sahel J A, et al. Rhodopsin maturation defects induce photoreceptor death by apoptosis: a fly model for RhodopsinPro23His human retinitis pigmentosa. *Human Mol Genet*, 2005, 14: 2547–2557
- 109 Ryoo H D, Steller H. Unfolded protein response in *Drosophila*: why another model can make it fly. *Cell Cycle*, 2007, 6: 830–835
- 110 Wang T, Montell C. Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*. *Pflugers Arch*, 2007, 454: 821–847
- 111 Kang M J, Chung J, Ryoo H D. CDK5 and MEK1 mediate pro-apoptotic signalling following endoplasmic reticulum stress in an autosomal dominant retinitis pigmentosa model. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 409–415
- 112 Xiong B, Bellen H J. Rhodopsin homeostasis and retinal degeneration: lessons from the fly. *Trends Neurosci*, 2013, 36: 652–660
- 113 Yau K W, Hardie R C. Phototransduction motifs and variations. *Cell*, 2009, 139: 246–264
- 114 Kumar J P. Building an ommatidium one cell at a time. *Dev Dyn*, 2012, 241: 136–149
- 115 Alvarez C E. On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evol Biol*, 2008, 8: 222
- 116 Wang S, Tan K L, Agosto M A, et al. The retromer complex is required for rhodopsin recycling and its loss leads to photoreceptor degeneration. *PLoS Biol*, 2014, 12: e1001847
- 117 Chen D, Xiao H, Zhang K, et al. Retromer is required for apoptotic cell clearance by phagocytic receptor recycling. *Science*, 2010, 327: 1261–1264
- 118 Lu N, Shen Q, Mahoney T R, et al. Three sorting nexins drive the degradation of apoptotic cells in response to Ptdins(3)P signaling. *Mol Biol Cell*, 2011, 22: 354–374
- 119 Adesnik H, Nicoll R A, England P M. Photoinactivation of native AMPA receptors reveals their real-time trafficking. *Neuron*, 2005, 48: 977–985
- 120 Kennedy M J, Davison I G, Robinson C G, et al. Syntaxin-4 defines a domain for activity-dependent exocytosis in dendritic spines. *Cell*, 2010, 141: 524–535
- 121 Passafaro M, Piech V, Sheng M. Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat Neurosci*, 2001, 4: 917–926
- 122 Aoki C, Joh T H, Pickel V M. Ultrastructural localization of beta-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the cortex and neostriatum of rat brain. *Brain Res*, 1987, 437: 264–282
- 123 Wang X, Zhao Y, Zhang X, et al. Loss of sorting nexin 27 contributes to excitatory synaptic dysfunction by modulating glutamate receptor recycling in down's syndrome. *Nat Med*, 2013, 19: 473–480
- 124 Choy R W, Park M, Temkin P, et al. Retromer mediates a discrete route of local membrane delivery to dendrites. *Neuron*, 2014, 82: 55–62
- 125 Vilarino-Guell C, Wider C, Ross O A, et al. Vps35 mutations in parkinson disease. *Am J Human Genet*, 2011, 89: 162–167
- 126 Zimprich A, Benet-Pages A, Struhal W, et al. A mutation in Vps35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset parkinson disease. *Am J Human Genet*, 2011, 89: 168–175
- 127 Seaman M N, Gautreau A, Billadeau D D. Retromer-mediated endosomal protein sorting: all washed up! *Trends Cell Biol*, 2013, 23: 522–528
- 128 Winslow A R, Chen C W, Corrochano S, et al. Alpha-synuclein impairs macroautophagy: implications for parkinson's disease. *J Cell Biol*, 2010, 190: 1023–1037
- 129 Harbour M E, Breusegem S Y, Seaman M N. Recruitment of the endosomal WASH complex is mediated by the extended “tail” of Fam21 binding to the retromer protein Vps35. *Biochem J*, 2012, 442: 209–220
- 130 Jia D, Gomez T S, Billadeau D D, et al. Multiple repeat elements within the Fam21 tail link the wash actin regulatory complex to the retromer. *Mol Biol Cell*, 2012, 23: 2352–2361
- 131 Helfer E, Harbour M E, Henriot V, et al. Endosomal recruitment of the WASH complex: active sequences and mutations impairing interaction with the retromer. *Biol Cell*, 2013, 105: 191–207
- 132 Young A R, Chan E Y, Hu X W, et al. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci*, 2006, 119: 3888–3900
- 133 Webber J L, Tooze S A. Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J*, 2010, 29: 27–40
- 134 Takahashi Y, Meyerkord C L, Hori T, et al. Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy*, 2011, 7: 61–73

- 135 Tang H W, Wang Y B, Wang S L, et al. Atg1-mediated myosin II activation regulates autophagosome formation during starvation-induced autophagy. *EMBO J*, 2011, 30: 636–651
- 136 Birmingham C L, Smith A C, Bakowski M A, et al. Autophagy controls salmonella infection in response to damage to the salmonella-containing vacuole. *J Biol Chem*, 2006, 281: 11374–11383
- 137 Kageyama S, Omori H, Saitoh T, et al. The LC3 recruitment mechanism is separate from Atg9L1-dependent membrane formation in the autophagic response against salmonella. *Mol Biol Cell*, 2011, 22: 2290–2300
- 138 Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein D C. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Human Mol Genet*, 2002, 11: 1107–1117
- 139 Webb J L, Ravikumar B, Atkins J, et al. Alpha-synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem*, 2003, 278: 25009–25013
- 140 Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*, 2004, 36: 585–595
- 141 Zavodszky E, Seaman M N, Moreau K, et al. Mutation in Vps35 associated with parkinson's disease impairs wash complex association and inhibits autophagy. *Nat Commun*, 2014, 5: 3828
- 142 Piotrowski J T, Gomez T S, Schoon R A, et al. WASH knockout T cells demonstrate defective receptor trafficking, proliferation, and effector function. *Mol Cell Biol*, 2013, 33: 958–973
- 143 Zech T, Calaminus S D, Caswell P, et al. The Arp2/3 activator WASH regulates alpha5beta1-integrin-mediated invasive migration. *J Cell Sci*, 2011, 124: 3753–3759
- 144 Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002, 297: 353–356
- 145 Small S A, Kent K, Pierce A, et al. Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 2005, 58: 909–919
- 146 Muhammad A, Flores I, Zhang H, et al. Retromer deficiency observed in Alzheimer's disease causes hippocampal dysfunction, neurodegeneration, and abeta accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 7327–7332

Roles of Retromer Complex and SNX Protein Family in Development and Diseases

SONG YanZe^{1,2}, SHEN ChengHao³, LI Xue^{1,2}, SU LiBo^{1,2}, LIN XinHua¹ & WU YiHui¹

1 State Key Laboratory of Membrane, Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China;

2 College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3 School of Optometry and Ophthalmology, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

Retromer, a retrograde membrane-trafficking complex, is an essential part of intracellular cargo-sorting networks. It is critical for mediating the proteins retrieval from endosome to the trans-Golgi network or the plasma membrane. Retromer complex comprises two sub-complexes, VPS26-VPS29-VPS35 and SNX-BAR. They function as cargo-selective sub-complex and membrane-deforming sub-complex, respectively. This review focuses on the molecular mechanisms of retromer complex and SNX family proteins in the retrograde membrane-transportation, and their regulation of Wnt proteins during development. Meanwhile, this review highlights the importance of retromer complex in mediating cell polarity, cell apoptosis, neurotransmitter delivery, and in the functional associations with neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's diseases.

Retromer, membrane-trafficking complex, SNX proteins family, development, neurodegenerative disease

doi: 10.1360/N052015-00221