

学校编码: 10384

分类号密级

学号: 24520141153461

UDC

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

SNX27 调节突触传导和突触可塑性

SNX27 regulates synaptic transmission and plasticity

高月

指导教师姓名: 孙 灏 教授

专 业 名 称: 微生物学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席:

评阅人:

2017 年 5 月

SXXXXX 调节突触传导和突触可塑性

高月

指导教师

孙灏 教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年月日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

() 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于年月日解密，解密后适用上述授权。

() 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年月日

摘要

目的: SNX27 作为一种重要的分选蛋白, 主要参与膜受体从内涵体重新转运到细胞膜上的过程, SNX27 的缺失会导致到突触受体循环过程受到阻碍。本研究通过构建人 SNX27 转基因小鼠探讨过表达 SNX27 对于突触功能的影响。

方法: 采用 SNX27 转基因小鼠作为研究对象, 通过 Camk2a 启动子诱导人 SNX27 基因在小鼠皮层以及海马中过表达。在一月龄 SNX27 转基因小鼠和 WT 小鼠海马脑片上检测 CA1 区锥体神经元 (Pyramidal neuron) 的微小兴奋性/抑制性突触后电流 (miniature excitatory/inhibitory postsynaptic currents, mEPSCs/mIPSCs)。另外, 在二月龄小鼠急性分离脑片上检测两组小鼠海马 CA1 区基础突触传导功能和突触可塑性, 具体指标包括: 输入/输出 (input/output, I/O)、双脉冲比率 (paired pulse ratio, PPR) 和长时程增强 (Long term potentiation, LTP)。最后, 为了确认 SNX27 转基因小鼠是否会出现癫痫样脑电波, 我们对小鼠进行脑电图 (EEG) 检测。

结果: 本实验中, 首先检测小鼠海马 CA1 区兴奋性突触后电位 (excitatory postsynaptic currents, EPSCs) 输入/输出 I/O, 实验结果表明 SNX27 过表达小鼠突触后响应能力强于 WT 小鼠。并且在 CA3-CA1 谢弗侧枝 (Schaffer collateral pathway) 环路诱导的长时程可塑性 LTP 增强, 然而 EPSCs 的双脉冲比率 PPR 比值没有表现出明显的差异。通过记录小鼠海马 CA1 区锥体神经元的微小突触后电流 mEPSCs/mIPSCs 显示 SNX27 转基因小鼠的兴奋性突触后电流的幅度明显升高, 但是频率没有表现出明显的变化。最后, 由小鼠的脑电图记录表明, SNX27 过表达小鼠并没有表现出癫痫样脑电波。

结论: 我们成功构建了在前脑皮层和海马特异表达 SNX27 的转基因小鼠 (Camk2a-SNX27 Tg mice)。通过电生理实验记录表明, SNX27 过表达可以增强 LTP 和兴奋性突触的功能, 提示增强了学习记忆能力。除此之外, 通过小鼠脑电图 (EEG) 记录发现 SNX27 过表达小鼠并没有表现出癫痫样脑电波。由此提示 SNX27 过表达可以提高小鼠的突触可塑性和学习记忆能力, 但是并未影响小鼠大脑皮层的兴奋性与抑制性平衡状态, 未造成小鼠癫痫样表型。

关键词：SNX27；海马；突触可塑性；学习记忆

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Objective: Among sorting nexin family proteins, SNX27 is a unique one as it plays crucial role in sorting and recycling transmembrane proteins from endosome-to-plasma membrane. SNX27 deficiency disrupts trafficking of synaptic receptors and leads to synaptic dysfunction. In this study, we will determine the functions of SNX27 using a SNX27 transgenic mouse model.

Method: In order to study SNX27's function *in vivo*, we generated a SNX27 transgenic mouse model in which human SNX27 transgene is driven by a CamK2a promoter. Immunoblot analysis indicates that SNX27 transgene is specifically expressed in cortical and hippocampal regions but not in cerebellum. To determine whether SNX27 overexpression affects pre- or post-synaptic function, we recorded mini-excitatory/inhibitory postsynaptic current (mEPSC/mIPSC) in CA1 pyramidal neurons. In addition, basal synaptic transmission was examined by input/output (I/O) and paired pulse ratio (PPR). In order to evaluate whether SNX27 overexpression affects synaptic plasticity, we recorded long-term potentiation (LTP). To ascertain whether SNX27 transgenic mice display epilepsy-like phenotype, we also performed EEG recording.

Results : mEPSC recording shows that SNX27 transgenic mice have higher postsynaptic response capability than their WT littermates, however, it seems that presynaptic function was not compromised in SNX27 transgenic mice, this has also been proved by unchanged PPR. Higher Schaffer collateral pathway LTP in SNX27 transgenic mice indicates enhanced function of CA3-CA1 neural circuit. Although SNX27 transgenic mice show enhanced excitatory synaptic function, our EEG recording displays a relatively normal pattern in SNX27 transgenic mice.

Conclusion: Electrophysiological recording indicates that SNX27 overexpression enhances LTP and excitatory synaptic function; EEG recording suggests that SNX27 transgenic mice did not show epilepsy-like phenotypes. In summary, SNX27

overexpression strengthens synaptic function, learning and memory, but may not affect excitatory-inhibitory balance in SNX27 transgenic mouse cortex.

Keywords: SNX27; hippocampus; synaptic plasticity; learning and memory

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要	I
Abstract	III
第一章绪论	1
1.1 SNX 蛋白家族	1
1.1.1 SNX-BAR 亚家族	3
1.1.2 FERM-样结构域	6
1.1.3 PDZ 结构域	4
1.2 SNXs 家族蛋白功能	5
1.2.1 以微管结构为基础的内体分选	6
1.2.2 SNXs 相关的信号通路	6
1.2.2.1 SNXs 与 EGFR 信号通路	7
1.2.2.2 SNXs 介导 EGFR 降解过程	7
1.3 SNXs 与疾病发生	8
1.3.1 肿瘤	8
1.3.2 阿尔茨海默症	9
1.3.3 其他神经系统疾病	9
1.4 记忆与突触存储过程	9
1.4.1 海马结构与功能	12
1.4.2 海马功能学说	14
1.4.3 LTP 形成机制	15
1.4.4 LTP 相关的谷氨酸受体	15
1.4.5 NMDA 依赖性 LTP	16
1.4.6 LTP 的表达机制	18
1.4.7 LTP 的维持	19
1.5 本论文的研究目的、内容和意义	20
第二章实验材料与方法	22
2.1 实验材料	22
2.1.1 实验动物	22
2.1.2 试剂与药品	22
2.1.3 实验仪器设备	24
2.1.4 实验溶液配制	24
2.2 实验方法	31
2.2.1 小鼠脑片制备	25
2.2.2 记录电极的制备	26
2.2.3 电生理实验的记录系统	27
2.2.4 全细胞记录过程	27
2.2.5 海马脑片场电位的记录	28
2.2.6 膜片钳数据采集和统计结果分析	29

2.2.7 蛋白质免疫印迹 (SDS-PAGE) 分析.....	29
2.2.7.1 蛋白样品的制备.....	29
2.2.7.2 BCA 法测蛋白质浓度.....	29
2.2.7.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳.....	30
2.2.7.4 转膜和膜封闭过程.....	30
2.2.7.5 抗原抗体反应.....	30
2.2.7.6 ECL 显色.....	31
2.2.8 SNX27 转基因小鼠基因型鉴定.....	31
2.2.8.1 DNA 提取.....	31
2.2.8.2 琼脂糖凝胶电泳.....	33
2.2.9 建立癫痫小鼠模型.....	33
2.2.9.1 小鼠脑电图记录过程.....	33
第三章实验结果.....	34
3.1 构建 hSNX27 转基因小鼠.....	34
3.2 SNX27 增强基础突触传导.....	35
3.3 SNX27 增强突触可塑性.....	36
3.4 SNX27 过表达不影响海马 CA1 区 PPR.....	37
3.5 SNX27 特异性增强兴奋性突触功能.....	38
3.6 SNX27 转基因小鼠脑电图 (EEG) 正常.....	40
第四章讨论与分析.....	48
参考文献.....	44
缩略词.....	52
致谢.....	54

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter I Introduction	1
1.1 The sortig nexins	1
1.1.1 The SNX-BAR subfamily	3
1.1.2 The FERM-like domain	6
1.1.3 The PDZ domain	4
1.2 Functions of sorting nexins	5
1.2.1 Tubular-based endosomal sorting	6
1.2.2 SNXs relative signaling pathway	6
1.2.2.1 SNXs and EGFR signaling pathway	7
1.2.2.2 SNXs mediate EGFR degradation process	7
1.3 Sorting nexins and diseases	8
1.3.1 Tumor	8
1.3.2 Alzheimer's disease	9
1.3.3 Other neurological diseases	9
1.4 Memory and synaptic storage	9
1.4.1 Hippocampal structure and function	12
1.4.2 Theory of hippocampal function	14
1.4.3 Formation mechanism of LTP	15
1.4.4 LTP relevant glutamate receptors	15
1.4.5 NMDA dependent LTP	16
1.4.6 Expression mechanism of LTP	18
1.4.7 Maintaining LTP	19
1.5 Purpose, significance and contents of this study	20
Chapter II Experimental Materials and Methods	22
2.1 Experimental materials	22
2.1.1 Experimental animals	22
2.1.2 Reagents and drugs	22
2.1.3 Experimental instruments and equipments	24
2.1.4 Experimental solutions preparation	24
2.2 Materials and Methods	31
2.2.1 Preparation of brain slices	25
2.2.2 Preparation of recording electrodes	26
2.2.3 Electrophysiology recording system	27
2.2.4 Whole-cell recording process	27
2.2.5 Field potential recording of hippocampal slices	28
2.2.6 Patch data statistical acquisition and analysis	29

2.2.7 SDS-PAGE analysis	29
2.2.7.1 Protein sample preparation	29
2.2.7.2 Determination of protein concentration by BCA assay	29
2.2.7.3 SDS polyacrylamide gel electrophoresis	30
2.2.7.4 Protein electrotransfer and membrane blocking	30
2.2.7.5 Antigen-antibody reaction	30
2.2.7.6 ECL developing	31
2.2.8 SNX27 Transgenic mice identification	31
2.2.8.1 DNA Extraction	31
2.2.8.2 Agarose gel electrophoresis	33
2.2.9 Construct epilepsy mouse model	33
2.2.9.1 EEG recording of mice	33
Chapter III Results	34
3.1 Construct hSNX27 transgenic mice	34
3.2 SNX27 increases basal synaptic transmission	35
3.3 SNX27 enhances synaptic plasticity	36
3.4 SNX27 overexpression has no influence on PPR of hippocampal CA1 ..	37
3.5 SNX27 specifically enhances excitatory synaptic function	38
3.6 Normal EEG pattern of SNX27 transgenic mice	40
Chapter IV Analysis and discussion	34
Reference	44
Abbreviation	52
Acknowledgement	52

第一章 绪论

1.1 SNX 蛋白家族

内吞途径的组分主要包含早期内体 (Early endosome, EE)、晚期内体 (Late endosome, LE)、循环内体 (Recycling endosome, RE)、TGN (trans-Golgi network) 和溶酶体 (Lysosome)。内体主要作为细胞中配体与受体分选和分离场所, 细胞膜上的蛋白质或者胞外的大分子经过网格蛋白包被的囊泡被内吞进入细胞内, 首先进入早期内体, 该处的一部分蛋白可以选择直接进入循环内体再经循环至细胞膜上, 另一部分蛋白可以通过早期内体的分选转运至晚期内体, 晚期内体中的蛋白一部分返回到 TGN, 一部分转运至溶酶体降解或者行使其他功能^[1]。

Sorting nexins (SNXs) 是一类含有 phox-homology (PX) 结构域的蛋白家族。目前在哺乳动物中发现 33 种 SNX 蛋白, 酵母中发现 10 种 SNX 蛋白^[2,3] (图 1.1), SNXs 通过其 PX 结构域与早期内吞网络中富含磷脂酰肌醇-3-磷酸 (PtdIns3P) 的元件相互作用^[2]。其功能包括多种形式分别为内吞作用、内体分选、内体信号传导^[2,3] (图 1.2)。SNXs 在脊椎动物中主要参与胞内分子转运, 包括调节蛋白的内吞, 调节内吞体介导的蛋白分选和降解。在酵母中主要参与 cargo 蛋白的转运^[1]。近几年研究表明, SNXs 不仅对于调控细胞信号通路具有重要作用, 也可以调控疾病的发生。例如 Alzheimer's disease 和病理性感染等疾病的关联^[4,5]。

SNXs 家族蛋白根据结构域组成将其分为五个亚家族: SNX-PX, SNX-BAR、SNX-FERM (protein4.1/ezrin/radixin/moesin), SNX-PXA-RGS-PX 和 SNX-MIT 亚家族^[6]。SNX-BAR 亚家族成员、SNX-FERM 亚家族中的 SNX27 以及 SNX-PX 亚家族中的 SNX3 对于复合体 retromer 功能的发挥都是非常重要的。

SNXs 蛋白除包含 PX 结构域以外, 还包含其他结构域, 根据所含结构域的不同, 可以将 SNXs 家族蛋白分为三类^[7]: 第一类包含 PX 结构域且其 C 端还带有 BAR 结构域 (Bin/amphiphysin/Rvs domain), 包括 SNX1、SNX2、SNX4、SNX5、SNX6、SNX7、SNX8、SNX9、SNX18、SNX30、SNX32 和 SNX33 等成员。第二类只包含 PX 结构域, 包括 SNX3、SNX10、SNX11、SNX12、SNX16、, SNX20、SNX21、SNX22、SNX24 和 SNX29 等蛋白成员, 该类蛋白结构相对简单, 具体

功能还不是很明确。第三类包含 PX 结构域，以及除 PX、BAR 以外的结构域，包括成员 SNX13、SNX14、SNX15、SNX17、SNX19、SNX23、SNX25、SNX26，SNX27、SNX28 和 SNX31 等蛋白成员，该类蛋白结构域较为复杂，由此也导致该类蛋白在细胞中的功能各有不同。第一类 SNXs 中，SNX3、SNX12 依赖于 PX 结构域与 3-磷脂酰肌醇的相互作用，可定位至早期内涵体，调节细胞内囊泡形成和 EGFR 的分选进入多囊泡细胞内体^[8]。第二类 SNXs，例如 SNX1 和 SNX2 也可以通过 PX 结构域定位至早期内体上，由此介导 EGFR 从多囊泡体转移至溶酶体中进行降解^[9]。第三类 SNXs，SNX15 不仅需要依赖于 PX 结构域与 3-磷脂酰肌醇定位至早期内涵体，还需要经过非经典网格蛋白结合盒（clathrin-binding box）直接与包被网格蛋白的囊泡结合，进而调节 EGFR 经过内吞转运至早期内涵体。有研究发现，SNX11 包含着新的 PX 结构域，即延长 PX 结构域，在 PX 基础状态下，其 C 端增加两个 α 螺旋，主要功能可能参与抑制 SNX10 诱导形成多囊泡复合体。在 SNXs 蛋白家族中，除了包含 BAR、PX 结构域以外，还包含其它一些结构域，例如 MIT、SH3 等。SNXs 蛋白中 SNX15 蛋白包含 MIT 结构域，MIT 依赖于钙离子的结合进而增强微管与磷酸肌醇的结合活性，由此完成对于蛋白转运和内吞的调控^[10]。

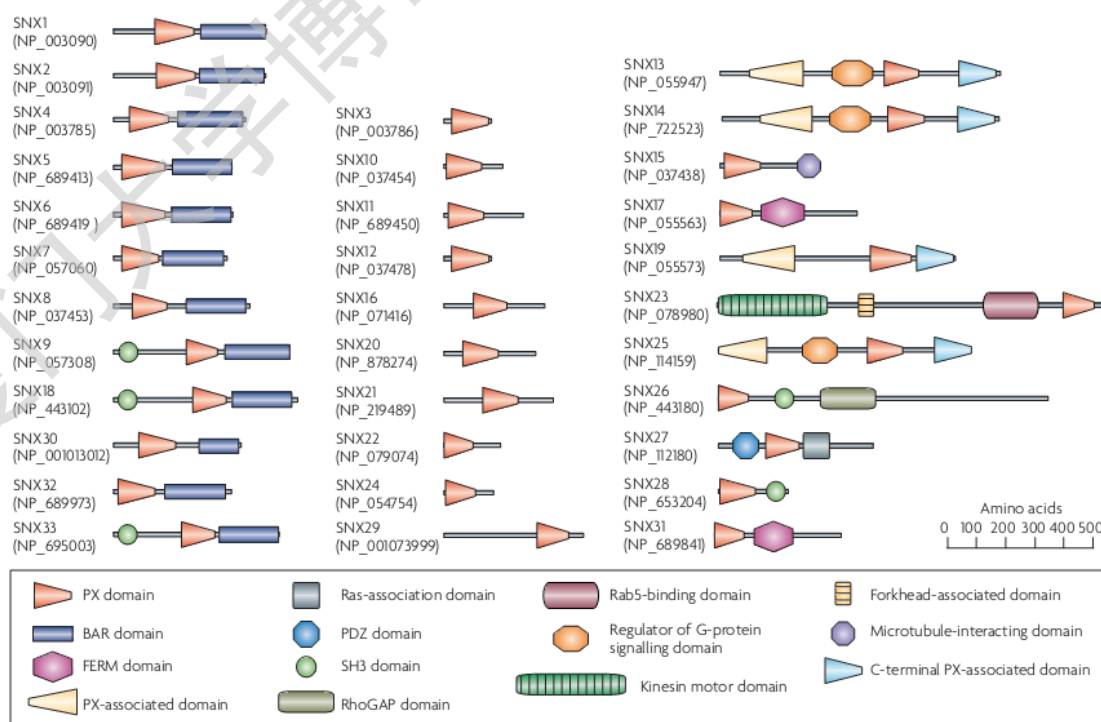


图 1.1 哺乳动物 SNXs 结构域构型

SNXs 家族主要分为三个亚家族:除了 SNX-PX 结构域还包含 C-末端 BAR (Bin, amphiphysin, Rvs) 结构域 (图中左侧组); 只包含了 SNX-PX 结构域 (中间组); 除 SNX-PX 结构域还包含其他识别结构域, 其中很多参与细胞信号传输 (图中右侧组)。

(引自 Peter J et al. *Nat Rev Mol Cell Bio*2008)

1.1.1 SNX-BAR 亚家族

SNX-BAR 亚家族中的 SNXs 在 C-末端均包含 BAR 结构域^[11], BAR 结构域包含三个 α -螺旋, 通过二聚化可以形成类似香蕉的结构^[12]。通过 BAR 结构域可以使 SNX-BARs 形成特异的同源二聚体或者异源二聚体^[13]。BAR 结构域二聚体的凹面包含的基础残基可以与细胞膜形成静电结合^[14]。该曲面结构以及基础残基的排列引导 BAR 与细胞膜曲面相互结合^[15]。SNX9、SNX18 和 SNX33 被认为与细胞的内存具有相互关联^[17,18]。SNX4 在早期内体到循环内体的运输中发挥作用^[19], SNX8 被认为在内体到反面高尔基复合体的转运中发挥作用^[20]。SNX1、SNX2、SNX5、SNX6、SNX32 形成的 SNX-BAR 亚复合体可以与哺乳动物的 retromer 复合体相互作用^[21], SNX-BAR retromer 亚复合体结合内涵体囊泡膜形成转运蛋白的管状运载体。此外, SNX5、SNX6 可以连接 retromer 运载体至微管骨架结构^[8], SNX-BAR 亚复合体与动力蛋白连接可以使包含转运蛋白的运载体沿微管转运^[23]。SNX6 的 SNX-PX 结构域与磷脂酰肌醇 4-单磷酸 (PI4P) 在 TGN 相互作用会干扰 SNX6 与 p150glued 的相互作用, 导致 retromer 运载体从动力蛋白-动力蛋白激活蛋白复合体中解离出来^[24]。

1.1.2 FERM-样结构域

SNX-FERM 亚家族包括 SNX17、SNX27 和 SNX31。FERM 结构域通常用于调节细胞膜或者细胞骨架与细胞质蛋白的相互作用^[29], 由 300 个氨基酸组成, 分为三个模块 F1、F2、F3。每一个模块都具有特定的结构: F1 模块包括泛素化折叠, F2 模块包括 α -螺旋结构, F3 模块结构类似于磷酸化酪氨酸结合结构域 (PTB) ^[29]。SNX17, SNX27, SNX31 中的 FERM-样结构域类似于经典 FERM

结构域，除了 F2 模块中包含三个而非四个短螺旋结构。FERM-样结构域通过与 F3 模块中凹槽部位的 NPXY 相结合进而与其他蛋白相互作用^[30]。SNX17 中 FERM-样结构域的结合体最具特色，胞浆蛋白通过 NPXY\FERM-样结构域依赖方式(KRIT1)和微管驱动蛋白(KIF1B)^[31]与 SNX17 相互结合。大多数与 SNX17 相互作用的为跨膜转运蛋白，主要依赖于 SNX17 进行内涵体到细胞膜的循环转运；其中包括低密度脂蛋白受体 (LDLR)^[32]、LDLR-相关蛋白 1 (LRP1)^[33,34]、上皮细胞黏附分子 P-选择素^[35]、成束蛋白/表皮生长因子-样 (EGF)/层黏连素类型 EGF-样/连接结构域包括 scavenger 受体-1 (FEEL-1)^[36]、APP^[37]和 β -整合素^[38]，最近发现与 SNX17 相似，SNX31 可以结合整合素并调节其表达水平^[38,39]。

1.1.3 PDZ 结构域

SNX27 是 SNX 家族中唯一含有 PDZ 结构域的蛋白^[40]。PDZ 结构域的晶体结构显示其在 $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\alpha 1$ - $\beta 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 2$ - $\beta 6$ 排列中有普遍的 5-6 个 β -链和 2 个 α -螺旋^[41]。SNX27 中的 PDZ 结构域，符合 PDZ 核心结构的构型。此外在环状结构的 $\beta 2$ 链和 $\beta 4$ 链之间多一条 β 链，所以 SNX27 在 $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ - $\alpha 1$ - $\beta 5$ - $\beta 6$ - $\alpha 2$ - $\beta 7$ 排列中含有 7 条 β 链和 2 个 α -螺旋^[43]。PDZ 结构域调节蛋白间相互作用最常见的机制为：PDZ 结构域结合搭档蛋白 C-末端的小肽结构，即 PDZ-结合模块(PDZbinding motif, PDZbm)。PDZbm 作为另一个 β -链嵌入到 PDZ 结构域的 $\beta 2$ 和 $\alpha 2$ 之间^[44,45]。PDZbm 中的最后四个氨基酸对于 PDZ 结构域识别搭档蛋白具有重要作用。

SNX27 中 PDZ 结构域的 $\beta 3$ - $\beta 4$ 环通过 VPS26 凹槽中的残基与 VPS26 运载体亚基结合^[46]。 $\beta 3$ - $\beta 4$ 环的位置区别于 PDZbm-结合位点，允许 SNX27 作为转运蛋白胞浆尾部的分选信号同时参与转运复合体和 PDZbms，连接转运蛋白循环转运至内涵体^[47]。例如 AMPA 受体^[49]、钾离子通道 Kir3.3 等由内涵体至细胞膜的循环过程即依赖于 SNX27 运载体^[50]。此外研究发现，SNX27 敲除小鼠体型较小，有痉挛现象，很多在胚胎期或者出生后一个月内即死亡^[51]。SNX27 杂合敲除小鼠表现出学习和记忆的缺失，同时离子型谷氨酸受体包括 NMDA 受体和 AMPA 受体的水平发生减少。此外，SNX27 的缺失与唐氏综合征 (Down's syndrome) 疾病发生存在关联性，在唐氏综合征患者脑中 SNX27 表达水平降低，而上调 SNX27 却可以逆转唐氏综合征小鼠认知功能缺陷^[52]。由此表明，SNX27 的参与

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库