

文章编号: 1004-0374(2011)11-1057-06

## 调控型分泌的分子机制研究进展

杨松<sup>1</sup>, 徐涛<sup>1,2\*</sup>

(1 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074; 2 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**摘要:** 调控型分泌途径对于维持内分泌细胞和神经元的功能非常重要。内分泌和神经系统的细胞将神经递质、神经肽和激素等包装在分泌囊泡内, 然后在受到刺激时将这些物质释放到细胞外。调控型分泌囊泡, 从生成、转运到与细胞膜的融合都需要许多蛋白质的参与和调节。简要总结参与这些过程的一些重要蛋白质的研究进展。

**关键词:** 分泌; 囊泡; 生成; 转运; 激素; 神经肽

**中图分类号:** Q2-33; Q813

**文献标志码:** A

## Progress in studying the molecular mechanism of regulated exocytosis

YANG Song<sup>1</sup>, XU Tao<sup>1,2\*</sup>

(1 College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

2 Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** Regulated secretory pathway is important for the function of endocrine cells and neurons. Cells in the endocrine and nervous systems package neurotransmitters, neuropeptides and hormones into secretory vesicles for release in a regulated manner upon stimulation. The biogenesis, translocation and fusion of regulated secretory vesicles require the regulation and participation of many proteins. In this article, research progress of some key factors has been reviewed.

**Key words:** secretion; vesicle; biogenesis; translocation; hormones; neuropeptides

内分泌和神经系统的细胞将激素、神经肽和特异的神经生长因子包装在分泌囊泡 (secretory vesicle) 内, 然后在受到刺激时将这些物质释放到细胞外。这种分泌方式称为调控型分泌途径 (regulated secretory pathway)。它对于调节内分泌功能、神经传递和神经元可塑性是很重要的。在细胞胞体内, 囊泡从反式高尔基网状系统 (trans-Golgi network, TGN) 生成 (biogenesis) 后, 通过以微管为基础的转运系统被运输到细胞膜附近。接着, 囊泡被转移到肌动蛋白纤维皮层 (actin filaments cortex)。滞留在肌动蛋白纤维的囊泡库可作为贮存库, 而栓系 (tethering) 到细胞膜的囊泡库里的一部分囊泡, 经过锚定 (docking) 和启动 (priming), 从而形成可释放囊泡库 (readily releasable pool, RRP)。在受到刺激或细胞兴奋时, 可释放囊泡库里的囊泡立即与细胞膜融合, 将囊泡的内容物释放到细胞外; 而贮

存库的囊泡, 则在可释放囊泡库通过胞吐作用排空后, 补充到细胞膜附近。

除了调控型分泌途径, (神经) 内分泌细胞与其他细胞一样, 也有组成型分泌途径, 组成型途径分泌的蛋白质是不依赖于刺激的。组成型分泌囊泡在 TGN 合成后不断地被运输到细胞膜附近, 然后与细胞膜融合。它们或是直接从 TGN 运输到细胞膜, 或是通过中间的内涵体被运输到细胞膜。在 (神经) 内分泌细胞中, 组成型分泌为细胞的存活、分化和生长提供受体及一些分泌蛋白。

调控型分泌囊泡根据其大小及内容物的不同又

收稿日期: 2011-07-11

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 项目) (2010CB833701)

\*通信作者: E-mail: xutao@ibp.ac.cn

分为两类：突触囊泡 (synaptic vesicle, SV) 和致密核心大囊泡 (dense-core vesicle, DCV)。典型的神经递质贮存在突触囊泡内，例如谷氨酸、促肾上腺皮质激素和甘氨酸等；而多肽类神经递质、胰岛素和激素等则贮存在 DCV 内。

本文简要总结了调控型分泌的 DCV 从生成、成熟到被运输至细胞膜附近并释放的一系列过程相关的研究进展。

## 1 DCV的生成

DCV 的生成包括不成熟的分泌囊泡从 TGN 出芽 (budding)，以及之后经历一系列的成熟步骤变成成熟的 DCV。成熟过程主要是新形成的 DCV 酸化，以激活加工分泌蛋白所必需的激素原转换酶 (prohormone convertases, PCs) 和羧肽酶 (carboxypeptidases) 等，然后去除一些组成型分泌蛋白和溶酶体酶，去除网格蛋白 (clathrin) 包被和其他包被蛋白，最后囊泡的内容物浓缩，形成成熟的囊泡。

调控型分泌蛋白，如肽类激素的前体、加工酶和粒蛋白家族 (Granins) 等，在 TGN 的微酸性且高钙的区域聚集。这个聚集过程不包括组成型分泌蛋白。然后，聚合物结合到 TGN 膜上，或者结合到膜上的分选受体。Granins 是神经内分泌细胞内含量丰富的一类蛋白质，包括嗜铬粒蛋白 A (chromogranin A, CgA)<sup>[1-2]</sup>、嗜铬粒蛋白 B (CgB)、分泌粒蛋白 II-IV (secretogranin II-IV, SgII-IV)<sup>[3-5]</sup>，它们对于分泌蛋白的聚集以及聚合物与分选受体的结合很重要。在垂体细胞和海马神经元中，TGN 膜上的羧肽酶 E (carboxypeptidase E, CPE) 作为分选受体将促黑素细胞皮质素原 (proopiomelanocortin, POMC)、促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 和脑源性神经营养因子原 (pro-brain-derived neuro-trophic factor, pro-BDNF) 分选到分泌囊泡<sup>[4]</sup>。

一些激素原加工酶的 C 端结构域能直接插入 TGN 的脂筏，如  $\alpha$  酰胺化单氧化酶 ( $\alpha$ -amidating monooxygenase, PAM) 的跨膜区就含有能将其正确分选到囊泡的信息。CPE、激素原转化酶 1/3 (prohormone convertase 1/3, PC1/3) 和激素原转化酶 2 (prohormone convertase 2, PC2) 的 C 端跨膜区都能与脂筏作用，并且对于它们定位到分泌囊泡是至关重要的<sup>[6]</sup>。

在 TGN 上，衔接蛋白 (adaptor protein 1, AP-1) 和 GGA (Golgi localized,  $\gamma$ -ear-containing, ADP-ribosyla-

tion factor binding protein) 等介导网格蛋白包被要出芽的囊泡。同时，AP-1 还能介导囊泡上的弗林蛋白酶 (furin) 重新回到 TGN<sup>[6]</sup>。在分泌囊泡上检测到 AP-1 和 GGA 的存在，表明它们的确是介导网格蛋白包被的囊泡的出芽。还有其他一些含有 AP-1 和 GGA 结合序列的蛋白，如  $\beta$  分泌酶、sorLA (sorting protein-related receptor containing LDLR class A repeats)、甘露糖 -6- 磷酸受体 (mannose-6-phosphate receptor) 和弗林蛋白酶，都辅助参与 AP-1 介导的网格蛋白包被囊泡的过程<sup>[6]</sup>。

接下来的酸化过程对分泌蛋白的正确加工很重要。用 V-ATP 酶的阻断剂巴佛洛霉素 A1 (bafilomycin A1) 处理 PC12 细胞，会显著降低 CgA 到 DCV 的分选。在 AtT-20 细胞中阻断 V-ATP 酶则会降低分泌囊泡的数目<sup>[4]</sup>。不成熟的囊泡内酸化是激素原转化酶等加工酶活化必需的，激素原转化酶活化后开始加工胰岛素原、POMC 和 secretogranin II 等激素原。

在胰腺  $\beta$  细胞内，Arvan 和 Castle 发现在不成熟的囊泡内除了胰岛素原，还有其他的蛋白质，如溶酶体酶和错误包装到不成熟囊泡的蛋白质。在囊泡成熟的过程中，这些蛋白质的去除也很关键<sup>[6]</sup>。在这一过程中，CPE 可能还作为滞留受体，将胰岛素留在囊泡里<sup>[6]</sup>。而另一种跨膜蛋白酶，即弗林蛋白酶，最初也存在于不成熟的分泌囊泡内，当其 C 端被酪蛋白激酶 2 (casein kinase-2) 磷酸化后，会与衔接蛋白 AP-1 结合，然后，包含在网格蛋白包被的小泡里，从不成熟的囊泡里面去除<sup>[7]</sup>。

在一些细胞中，成熟过程除了以上这些还包括融合事件。在 PC12 细胞中不成熟与成熟的囊泡相比，不论大小还是密度都有很大区别。不成熟囊泡之间的融合及浓缩能在成熟过程中增加囊泡的大小和密度。融合过程可能需要 syntaxin6、synaptotagmin IV 和 VAMP4 等，这些蛋白都在最后以网格蛋白包被的小囊泡的形式而被去除。网格蛋白包被不仅去除这些蛋白，还能带走富余的脂膜<sup>[3,7]</sup>。

## 2 DCV的转运

DCV 从高尔基体出芽后，通过基于微管的转运系统被转移到细胞膜附近。AtT20 和 PC12 细胞内的嗜铬粒蛋白 B 囊泡、含有神经生长因子及神经营养因子的囊泡，都是通过微管运输的<sup>[6]</sup>。马达蛋白 (motor protein) 中的驱动蛋白 (kinesin) 沿着微管，将囊泡从胞体顺向转运到分泌之处，胞浆动力蛋白

(dynein) 则负责逆向转运到胞体<sup>[3]</sup>。有研究发现, kinesin-1 作为内分泌细胞中主要的马达蛋白, 能够将囊泡(组成型和调控型)转移到靠近细胞膜附近的微管末端。最近还发现不同的调控型分泌囊泡有特定的马达蛋白。kinesin-2,3 介导促肾上腺皮质激素囊泡的顺向运输<sup>[8]</sup>。在线虫中, kinesin-3 的同源蛋白 UNC-104, 作为马达蛋白负责 DCV 沿着轴突的顺向运输<sup>[9]</sup>。细胞受到刺激时, kinesin 的活性和沿着微管的分布都会调整, 以有利于调控型囊泡的分泌<sup>[8]</sup>。

囊泡通过微管运输还需要许多的衔接蛋白<sup>[3]</sup>。动力蛋白激活蛋白(dynactin)就是一种很重要的衔接蛋白。在非神经细胞和果蝇神经元中的研究发现, 马达蛋白中的驱动蛋白和胞浆动力蛋白都与动力蛋白激活蛋白有相互作用<sup>[10-11]</sup>。在原代培养的海马神经元的研究中发现, BDNF 囊泡沿着微管的转运就需要 dynactin 作为马达蛋白的衔接蛋白, 并且 dynactin 参与 BDNF 囊泡在轴突及树突的双向运输<sup>[12]</sup>。

调控型分泌囊泡上的跨膜蛋白如 CPE 等的胞浆基序(cytoplasmic motif), 通过一些衔接蛋白和胞浆内的马达蛋白连在一起。马达蛋白沿着微管方向性地运动。囊泡上的跨膜蛋白 CPE 不仅能介导胞吞的囊泡返回到高尔基体, 还能帮助促肾上腺皮质激素囊泡通过衔接蛋白 dynactin 与微管马达作用<sup>[6]</sup>。在含有激素或 BDNF 的囊泡上只需要很少数量的 CPE 胞浆基序, 就能与马达蛋白结合, 运输囊泡<sup>[6]</sup>。

囊泡到达微管结构的末端后被转移到细胞膜附近的肌动蛋白皮层(actin cortex)<sup>[6]</sup>。有假说认为肌球蛋白 V(myosin V) 和纤维型肌动蛋白(F-actin) 等马达蛋白, 都参与转移的过程。Myosin V 沿着肌动蛋白皮层将囊泡转运到分泌位点。F-actin 不仅在这一转运过程中起作用, 还有可能参与调节 DCV 的分泌<sup>[13]</sup>。Myosin 家族里面的 myosin Va 是将调控型分泌的 DCV 转运到可释放囊泡库的主要亚型。在 PC12 细胞里表达缺陷的 myosin Va 不仅会阻断分泌囊泡到达分泌位点, 还会降低囊泡在肌动蛋白皮层的运动能力<sup>[14]</sup>。胰腺  $\beta$  细胞里胰岛素的调控型分泌同样也受 myosin Va 的影响<sup>[15]</sup>。含有胰岛素和神经肽 Y 等激素或神经肽的 DCV 的成熟、转运和胞吐都有 myosin Va 的参与。基因沉默 myosin Va 或者表达缺陷型的 myosin Va 都导致高糖刺激诱导的胰岛素的分泌显著降低, 这主要是细胞膜附近锚定的囊泡数目的减少而导致的<sup>[16]</sup>。Myosin Va 通过 Rab27a 及其效应物被募集到 DCV 的膜上<sup>[6]</sup>。

此外, PAM 的跨膜部分也有助于囊泡在肌动蛋白皮层上的转运。PAM 的胞浆基序通过与其 C 末端相互作用的蛋白, 以及能够识别 F-actin 的 Rho 家族的一种 GDP/GTP 交换因子 kalirin, 将囊泡联系到 F-actin, 从而影响到囊泡的转运<sup>[6]</sup>。而在 AtT20 细胞中的研究发现, 糖皮质激素调节蛋白中的膜联蛋白 A1(annexin A1) 通过甲酰基肽受体和 Rho 激酶信号途径来增强肌动蛋白的聚合作用, 从而阻止胞吐作用, 抑制激素的分泌, 这也表明肌动蛋白对于囊泡运输及分泌是很重要的<sup>[13]</sup>。

### 3 DCV的栓系和锚定

DCV 达到细胞膜附近后, 多种蛋白共同参与及调节囊泡的栓系和锚定, 其中包括 RAB 家族和它们的效应物。此外, 调控型分泌囊泡在细胞膜附近的锚定也有 myosin Va 的参与, 这与其马达活性无关<sup>[17]</sup>。

Rab 家族中的 Rab3 和 Rab27 就是参与栓系过程的两种主要蛋白。在刺激后, Rab3 和 Rab27 被迅速募集到新合成的囊泡上, 参与调节囊泡的分泌过程。在 PC12 细胞中的研究表明, Rab3 和 Rab27 协同作用调节 DCV 的锚定<sup>[18]</sup>。Rab27 及其效应分子结合到 DCV, 可能参与调节 DCV 的栓系、锚定、启动和胞吐。Rab27 的效应蛋白有 Slp 家族(synaptotagmin-like proteins, Slp)、rabphilin、Noc2、Slac 家族(Slp homologue lacking C2 domains, Slac2) 和 Munc13-4 等<sup>[19]</sup>。Slp 家族和 rabphilin 含有与 Rab27 结合的结构域, 以及与钙和磷酸化脂酶结合的串联的 C2 结构域<sup>[18,20]</sup>。Tsuboi<sup>[19]</sup> 在 PC12 细胞中研究 Slp4-a 和 rabphilin 对 DCV 的调节, 提出两种模型。Rab27 以 GTP 结合的活化形式结合到囊泡上, Slp4-a 通过其 N 端 Rab27 结合结构域与 Rab27 结合, 然后, Slp4-a 作为桥梁将囊泡连接到细胞膜上的 Munc18-1/syntaxin1-a 复合物上; 而 rabphilin 则是通过其 N 端结构域与 Rab27 结合, 同时, C2B 结构域与 SNAP-25 相互作用, 从而将结合在 Rab27 上的 DCV 拉在细胞膜附近。

Munc18 作为调节囊泡分泌的重要蛋白, 其在分泌过程中的功能是很保守的。小鼠 Munc18-1 的基因敲除后, 神经递质的释放几乎完全消失<sup>[21]</sup>。肾上腺细胞 DCV 的胞吐也被严重阻断, 下降到野生型的 10%~15%, 而这一部分的胞吐可能是由于 Munc18-2 的作用<sup>[22]</sup>。线虫 UNC-18、酵母 Sec1p、果蝇 ROP 都有相似的作用。线虫 *unc-18* 缺失导致

严重的运动障碍,这主要是由于神经肌肉连接处的神经递质分泌减少造成的<sup>[23]</sup>。Munc18-1的功能可能三个方面:(1)作为 syntaxin 的分子伴侣帮助 syntaxin 表达和正确定位;(2)促进 SNARE 复合物 [soluble N-ethyl-maleimide sensitive fusion protein attachment protein (SNAP) receptor complex, SNARE complex] 介导的膜融合;(3)帮助囊泡锚定到细胞膜附近<sup>[24]</sup>。Munc18-1 对于 DCV 的锚定是很重要的, Munc18 缺失的肾上腺细胞的电镜结果显示 90% 的 DCV 都没有锚定在细胞膜附近,这与细胞的分泌降低 85%~90% 是一致的<sup>[25]</sup>。同时, syntaxin-1 的缺失也会导致类似的锚定缺陷<sup>[26]</sup>。在 Munc18 缺陷的细胞中, syntaxin-1 的表达及定位异常<sup>[24]</sup>。因此, Munc18 导致的锚定缺陷是不是其直接导致的还有待研究。Munc18 很可能通过调节 SNARE 蛋白,如 syntaxin-1, 影响 DCV 的锚定<sup>[27]</sup>。de Wit 等<sup>[28]</sup>通过对基因敲除的肾上腺嗜铬细胞的电镜切片的研究发现, SNAP-25 缺失的细胞同样也有锚定缺陷。在 Munc18-1 缺失的细胞中,过表达 SNAP-25 能够恢复锚定的表型,尽管仍不能恢复分泌。而在 synaptotagmin-1 和 Munc18-1 双缺失的细胞中,过表达 Munc18-1 或者 SNAP-25 都不能恢复锚定表型。这说明 synaptotagmin-1 对于锚定复合物的形成也很重要。他们推测,囊泡上的 synaptotagmin-1 可能通过与 SNARE 复合物中的 SNAP-25/syntaxin-1 连接在一起来锚定囊泡。而 Munc18-1 则是通过调节 syntaxin-1 的构象参与这一过程,并且起到促进和稳定的作用<sup>[28]</sup>。

#### 4 启动

DCV 通过启动后变成可立即释放的囊泡库,这个过程包括形成 SNARE 复合物,复合物包括 syntaxin、SNAP-25 和 synaptobrevin。在线虫的研究中发现,DCV 和 SV 的启动过程需要不同的蛋白参与。CAPS/UNC-31 是 DCV 的锚定和启动所需要的<sup>[29]</sup>,而 UNC-13 则参与 SV 的锚定和启动<sup>[30]</sup>。但是,在肾上腺细胞以及胰腺  $\beta$  细胞中的研究表明, Munc13-1 通过影响 DCV 的启动进而会影响 DCV 的分泌<sup>[31-34]</sup>。而且在 CAPS 缺失的神经元中能够融合的 SV 几乎没有,这就导致神经递质的快速释放受到很大影响<sup>[35]</sup>。因此, Munc13 和 CAPS 对大小囊泡的调节作用可能是相互交替的。

Deng 等<sup>[36]</sup>通过研究基因敲除的小鼠,提出了 Munc13 参与 SV 锚定或启动过程的新模型。研究

认为,同源的两个 Munc13 形成复合物,这种同源二聚体会抑制 Munc13 的活性;当细胞受到刺激时, RIM 替代这个二聚体中的一个 Munc13 后, Munc13 才具有活性,从而促进 SV 的启动。Munc13 的 MHD 结构域可能对于其启动功能是必需的<sup>[37]</sup>。

CAPS 蛋白也有一个与 Munc13 同源的 MHD 结构域和一个可以与磷脂结合的 PH 结构域,以及介导其与 DCV 结合的 C 端膜结合域。CAPS 很可能通过促进 syntaxin 转变为开放构象,然后锚定 DCV。因为在线虫中的研究发现,过表达处于开放构象的 syntaxin 能够直接绕过 DCV 锚定时对 CAPS 的需求<sup>[38]</sup>。Martin 等的研究发现, CAPS 与 SNARE 蛋白中的 syntaxin 和 SNAP-25 有很高的亲和力,而与 synaptobrevin 的亲和力稍弱。并且, syntaxin-1 与 CAPS 结合和 C 末端位点同它与 Munc18 结合的位点并不重叠<sup>[39-40]</sup>。这表明, CAPS 可能直接与 SNARE 蛋白中的一种或几种结合以促进 SNARE 复合物的形成,从而调控 DCV 的启动。当然,这还有待进一步的实验验证。

#### 5 融合

调控型分泌囊泡最终与细胞膜的融合 (fusion) 过程是由钙离子触发的。作为感受钙并结合钙的蛋白, synaptotagmin 在囊泡与细胞膜的融合过程中起着非常重要的作用<sup>[41]</sup>。在哺乳动物中,至少有 16 种 synaptotagmin 存在<sup>[42]</sup>。可以推测,在不同钙敏感性的不同类型的囊泡的分泌过程中有着特异的 synaptotagmin 在调节这些过程。在一些神经元中, synaptotagmin-1 作为钙感受器对于 SV 的同步释放很重要<sup>[43]</sup>。而在嗜铬细胞中的研究发现 synaptotagmin-1 在快速的、对钙敏感性高的 DCV 的胞吐过程中也有很重要的作用<sup>[44]</sup>。在 INS-1 细胞中, synaptotagmin-1 的基因沉默会抑制胰岛素的释放<sup>[45]</sup>。Synaptotagmin-1 有两个 C2 结构域, C2A 和 C2B 结构域,这种结构域有类似于  $\beta$ -sandwich 的结构,而  $\beta$ -sandwich 的 loop 的顶部能结合钙离子和磷脂<sup>[46]</sup>。Synaptotagmin-1 可能通过 C2B 结构域及其表面丰富的碱性残基介导膜的同步结合,以钙依赖的方式将两种膜成分拉近。Synaptotagmin-1 除了与膜结合,还能直接与 SNAREs 相互作用, synaptotagmin-1 和 SNARE 复合物的功能就在钙触发的释放过程中联系起来<sup>[47]</sup>。有种模型就认为, synaptotagmin 可能同时与膜和磷脂结合,形成 SSCAP 复合物 (SNARE – synaptotagmin-1 –  $\text{Ca}^{2+}$  – phospholipid complex, SSCAP

complex)。在这种模型中, C2B 结构域的顶端和底部还能与相对的膜作用, 并在 SNAREs 的协助下将膜拉在一起, 而且 C2B 结构域末端和 SNARE 复合物的 C 端在一起产生正的静电势, 从而引起膜的负曲率并使膜弯曲, 最终导致膜融合<sup>[47]</sup>。

SNARE 蛋白 syntaxin、SNAP-25 和 synaptobrevin 通过四个  $\alpha$  螺旋聚合形成三聚体的 SNARE 复合物。囊泡膜蛋白 synaptobrevin 提供一个  $\alpha$  螺旋, 细胞膜附着蛋白 SNAP-25 提供两个  $\alpha$  螺旋, 最后一个  $\alpha$  螺旋由细胞膜蛋白 syntaxin 提供。SNARE 复合物的形成使囊泡膜与细胞膜非常接近<sup>[48]</sup>, 促进其脂质的混和, 最后导致融合。针对任何一个 SNARE 蛋白的扰动, 如用梭菌毒素切割或者直接使用其抗体, 都可以抑制囊泡的融合<sup>[49-51]</sup>。而且, 仅仅包含 SNARE 蛋白的重构囊泡, 不需要其他蛋白的协助就可以直接融合<sup>[52]</sup>。

## 6 总结

囊泡从生成、转运到与细胞膜的融合这一系列过程中有许多因子参与, 它们调控着不同类型囊泡的转运及分泌的不同步骤。目前的研究已经为相关蛋白如何参与调控这些过程提出了许多有理有据的模型, 但是其中一些蛋白质的作用机制还不是很清楚; 有些蛋白除了已知的功能, 可能还有其他功能或参与囊泡分泌的其他过程; 此外, 更多新的调节蛋白还有待发现。细胞系、线虫、大鼠等各种研究模型以及电生理、光学显微技术、电镜等研究手段的发展与成熟也为今后的深入研究提供了更好的条件。

### [参 考 文 献]

- [1] Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, et al. Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell*, 2001, 106(4): 499-509
- [2] Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, et al. Large dense-core secretory granule biogenesis is under the control of chromogranin A in neuroendocrine cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 971: 323-31
- [3] Park JJ, Koshimizu H, Loh YP. Biogenesis and transport of secretory granules to release site in neuroendocrine cells. *J Mol Neurosci*, 2009, 37(2): 151-9
- [4] Kim T, Gondre-Lewis MC, Arnaoutova I, et al. Dense-core secretory granule biogenesis. *Physiology: Bethesda*, 2006, 21: 124-33
- [5] Courel M, Soler-Jover A, Rodriguez-Flores JL, et al. Prohormone secretogranin II regulates dense core secretory granule biogenesis in catecholaminergic cells. *J Biol Chem*, 2010, 285(13): 10030-43
- [6] Park JJ, Loh YP. How peptide hormone vesicles are transported to the secretion site for exocytosis. *Mol Endocrinol*, 2008, 22(12): 2583-95
- [7] Tooze SA, Martens GJ, Huttner WB. Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol*, 2001, 11: 116-22
- [8] Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, et al. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, 10: 686-96
- [9] Zahn TR, Angleson JK, MacMorris MA, et al. Dense core vesicle dynamics in *Caenorhabditis elegans* neurons and the role of kinesin UNC-104. *Traffic*, 2004, 5(7): 544-59
- [10] Deacon SW, Serpinskaya AS, Vaughan PS, et al. Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *J Cell Biol*, 2003, 160(3): 297-301
- [11] Ligon LA, Tokito M, Finklestein JM, et al. A direct interaction between cytoplasmic dynein and kinesin I may coordinate motor activity. *J Biol Chem*, 2004, 279(18): 19201-8
- [12] Kwinter DM, Lo K, Mafi P, et al. Dynactin regulates bidirectional transport of dense-core vesicles in the axon and dendrites of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, 2009, 162(4): 1001-10
- [13] Olofsson CS, Hakansson J, Salehi A, et al. Impaired insulin exocytosis in neural cell adhesion molecule-/- mice due to defective reorganization of the submembrane F-actin network. *Endocrinology*, 2009, 150(7): 3067-75
- [14] Rudolf R KT, Kuznetsov SA, Salm T, et al. Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells. *J Cell Sci*, 2003, 116: 1339-48
- [15] Varadi A TT, Rutter GA. Myosin Va transports dense core secretory vesicles in pancreatic MIN6  $\beta$ -cells. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 2670-80
- [16] Eichler TW, Kogel T, Bukoreshtliev NV, et al. The role of myosin Va in secretory granule trafficking and exocytosis. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34(Pt 5): 671-4
- [17] Kogel T, Bittins CM, Rudolf R, et al. Versatile roles for myosin Va in dense core vesicle biogenesis and function. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38(Pt 1): 199-204
- [18] Tsuboi T, Fukuda M. Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 11): 2196-203
- [19] Tsuboi T. Molecular mechanism of docking of dense-core vesicles to the plasma membrane in neuroendocrine cells. *Med Mol Morphol*, 2008, 41(2): 68-75
- [20] Fukuda M, Yamamoto A. Assay of the Rab-binding specificity of rabphilin and Noc2: Target molecules for Rab27. *Methods Enzymol*, 2005, 403: 469-81
- [21] Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, et al. Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science*, 2000, 287(5454): 864-9
- [22] Voets T, Toonen RF, Brian EC, et al. Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron*, 2001, 31(4): 581-91
- [23] Weimer RM, Richmond JE. Synaptic vesicle docking: a putative role for the Munc18/Sec1 protein family. *Curr Top Dev Biol*, 2005, 65: 83-113

- [24] Han GA, Malintan NT, Collins BM, et al. Munc18-1 as a key regulator of neurosecretion. *J Neurochem*, 2010, 115(1): 1-10
- [25] de Wit H. Morphological docking of secretory vesicles. *Histochem Cell Biol*, 2010, 134(2): 103-13
- [26] de Wit H, Cornelisse LN, Toonen RF, et al. Docking of secretory vesicles is syntaxin dependent. *PLoS One*, 2006, 1: e126
- [27] Han L, Jiang T, Han GA, et al. Rescue of Munc18-1 and -2 double knockdown reveals the essential functions of interaction between Munc18 and closed syntaxin in PC12 cells. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(23): 4962-75
- [28] de Wit H, Walter AM, Milosevic I, et al. Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. *Cell*, 2009, 138(5): 935-46
- [29] Zhou KM, Dong YM, Ge Q, et al. PKA activation bypasses the requirement for UNC-31 in the docking of dense core vesicles from *C. elegans* neurons. *Neuron*, 2007, 56(4): 657-69
- [30] Speese S, Petrie M, Schuske K, et al. UNC-31 (CAPS) is required for dense-core vesicle but not synaptic vesicle exocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 2007, 27(23): 6150-62
- [31] Kang L, He Z, Xu P, et al. Munc13-1 is required for the sustained release of insulin from pancreatic  $\beta$  cells. *Cell Metab*, 2006, 3(6): 463-8
- [32] Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, et al. Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J*, 2000, 19(14): 3586-96
- [33] Sheu L, Pasyk EA, Ji J, et al. Regulation of insulin exocytosis by Munc13-1. *J Biol Chem*, 2003, 278(30): 27556-63
- [34] Yuan QX, Teng LP, Zhou JY, et al. Characterization of Munc13-1 and insulin secretion during pancreatic development in rats. *J Endocrinol Invest*, 2008, 31(7): 630-5
- [35] Jockusch WJ, Speidel D, Sigler A, et al. CAPS-1 and CAPS-2 are essential synaptic vesicle priming proteins. *Cell*, 2007, 131(4): 796-808
- [36] Deng L, Kaeser PS, Xu W, et al. RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13. *Neuron*, 2011, 69(2): 317-31
- [37] Guan R, Dai H, Rizo J. Binding of the Munc13-1 MUN domain to membrane-anchored SNARE complexes. *Biochemistry*, 2008, 47(6): 1474-81
- [38] Hammarlund M, Watanabe S, Schuske K, et al. CAPS and syntaxin dock dense core vesicles to the plasma membrane in neurons. *J Cell Biol*, 2008, 180(3): 483-91
- [39] James DJ, Kowalchuk J, Daily N, et al. CAPS drives trans-SNARE complex formation and membrane fusion through syntaxin interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(41): 17308-13
- [40] Daily NJ, Boswell KL, James DJ, et al. Novel interactions of CAPS ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activator protein for secretion) with the three neuronal SNARE proteins required for vesicle fusion. *J Biol Chem*, 2010, 285(46): 35320-9
- [41] Shin OH, Rizo J, Sudhof TC. Synaptotagmin function in dense core vesicle exocytosis studied in cracked PC12 cells. *Nat Neurosci*, 2002, 5(7): 649-56
- [42] Craxton M. Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. *BMC Genomics*, 2004, 5: 43
- [43] Brose N, Petrenko AG, Sudhof TC, et al. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, 1992, 256(5059): 1021-5
- [44] Voets T, Moser T, Lund PE, et al. Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(20): 11680-5
- [45] Xiong X, Zhou KM, Wu ZX, et al. Silence of synaptotagmin I in INS-1 cells inhibits fast exocytosis and fast endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 347(1): 76-82
- [46] Fernandez I, Arac D, Ubach J, et al. Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron*, 2001, 32(6): 1057-69
- [47] Arac D, Chen X, Khant HA, et al. Close membrane-membrane proximity induced by  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent multivalent binding of synaptotagmin-1 to phospholipids. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(3): 209-17
- [48] Hanson PI, Roth R, Morisaki H, et al. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*, 1997, 90(3): 523-35
- [49] Chen YA, Scales SJ, Patel SM, et al. SNARE complex formation is triggered by  $\text{Ca}^{2+}$  and drives membrane fusion. *Cell*, 1999, 97(2): 165-74
- [50] Chen YA, Scales SJ, Scheller RH. Sequential SNARE assembly underlies priming and triggering of exocytosis. *Neuron*, 2001, 30(1): 161-70
- [51] Xu T, Rammner B, Margittai M, et al. Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell*, 1999, 99(7): 713-22
- [52] Weber T, Zemelman BV, McNew JA, et al. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 1998, 92(6): 759-72