

文章编号:1003-2754(2019)10-0931-05

VPS35 对多巴胺受体 D1 降解的调控机制研究

王 琛, 肖乃安, 马琪林, 詹奕红

摘 要: **目的** 研究囊泡分拣蛋白 35(vacuolar protein sorting-35,VPS35)是否影响 G 蛋白偶联(G protein-coupled)的多巴胺受体 D1(Dopamine receptor D1)的降解过程及其机制。**方法** 依据放线菌酮(cycloheximide, CHX)可以有效抑制生物体内蛋白的合成原理,我们 CHX 处理细胞,来研究 VPS35 对 DRD1 的降解可能存在的影 响。**结果** 过表达 VPS35 之后,DRD1 蛋白的降解速率比对照组加快了。相反的,在下调 VPS35 水平后,DRD1 的降解速率减慢。另外,VPS35 能加速 DRD1 的溶酶体和泛素蛋白酶体降解,但增加溶酶体降解的效果更加显著。**结论** (1)VPS35 能够有效调控 DRD1 的降解速率;(2)VPS35 主要通过溶酶体途径调控 DRD1 的降解。

关键词: 囊泡分拣蛋白 35; 多巴胺受体 D1; 降解; 帕金森病

中图分类号:R742.5 **文献标识码:**A

Mechanistic study on the degradation of dopamine receptor D1 by VPS35 WAHG Chen,XIAO Naian,MA Qilin,et al. (Department of Neurology,The First Affiliated Hospital,School of Medicine,Xiamen University,Xiamen 361000,China)

Abstract: Objective To study whether the vacuolar protein sorting-35 (VPS35) could effect the process of degradation of G protein coupled receptor dopamine receptor D1 (DRD1) and its possible mechanism. **Methods** Depend on the cycloheximide (CHX) can restrain the synthesis of the proteins of the organism effectively. We handle cells with CHX to study whether VPS35 effects the degradation of DRD1. **Results** VPS35 accelerates the degradation of DRD1 after over-expressing it in HEK 293T cells. On the contrary,after knock-down the VPS35 level the rate of degradation of DRD1 was reduced. In addition,the VPS35 could accelerate the degradation of DRD1 through the pathway of lysosome and ubiquitin proteasome when the effect through pathway of lysosome is more significant. **Conclusion** VPS35 can regulate the degradation of DRD1 effectively mainly through the pathway of lysosome.

Key words: Vacuolar protein sorting-35; Dopamine receptor D1; Degradation; Parkinson's disease

帕金森病(Parkinson's disease,PD)是一种常见的年龄相关的神经变性疾病,病情常呈慢性进行性加重,中枢神经系统中黑质纹状体等部位的多巴胺能神经元进行性退变、死亡,多巴胺合成或传导能力减弱,导致锥体外系主导的运动调节功能受损是其主要病理变化。神经递质多巴胺(dopamine)通过神经末梢上的受体结合,激活下游信号通路,参与多种神经系统的功能。多巴胺受体(Dopamine receptor)为 7 个跨膜区域组成的 G 蛋白偶联(G protein-coupled)受体家族。目前根据对腺苷酸环化酶(adenyl cyclase)的激活或者抑制作用已经鉴定出 5 种多巴胺受体亚型,分为 D1 类和 D2 类^[1]。前者包括 D1 和 D5 受体;后者包括 D2、D3、D4 受体。囊泡分拣蛋白 35(vacuolar protein sorting-35,VPS35)是 Retromer 复合体(VPS26、VPS29、VPS35 和 SNXs)的重要原件,主要负责分拣膜蛋白并介导其在胞内体至细胞膜及高尔基体之间的转运。有研究表明 VPS35 在帕金森患者的黑质等部位含量下降,且 VPS35 的 D620N 突变与帕金森病发病相关。目前对 VPS35

缺陷(突变)参与帕金森病发病机制的研究主要集中在 线粒体功能障碍, α 突触核蛋白(α -synuclein)堆积以及神经元发育重塑缺陷等方面^[2]。

VPS35 能够调控 CI-M6PR 配体和 cathepsin D 的内吞再循环,促使 α -synuclein 通过溶酶体途径降解,进而减少其异常聚集^[3]。除了经典的自噬溶酶体途径,VPS35 还参与蛋白的泛素化降解(Ubiquitin proteasome),如 VPS35 能与 Hrs 相互作用^[4],识别被泛素化修饰的受体,并分拣转运至溶酶体而降 解^[5]。在前期的实验中,我们发现过表达 VPS35 能

收稿日期:2019-06-14;修订日期:2019-09-30

基金项目:福建省自然科学基金面上项目(No. 2019J01576);厦门大学附属第一医院内青年科研发展基金资助项目(XYY2016015);厦门市科技重大专项:厦门市重大疾病急救技术研究与急救网络体专项-脑卒中综合诊疗技术研究与救治网络建设(3502Z20171005-20170801)

作者单位:(厦门大学附属第一医院神经内科,福建 厦门 361003)

通讯作者:王 琛,E-mai:wangchen1986xm@ 163. com;詹奕红,E-mail:yihongzhan31@ 163. com

够促进内吞的 DRD1 蛋白水平迅速下降,一方面,这可能是由于过表达 VPS35 促进了内吞的 DRD1 再循环上膜^[6]。考虑到内吞蛋白还可能被转运到溶酶体降解,我们进一步研究 VPS35 是否影响 DRD1 的降解过程。依据 CHX 可以有效抑制生物体内蛋白的合成原理,我们用放线菌酮 (cycloheximide, CHX) 处理细胞,来研究 VPS35 对 DRD1 的降解可能存在的影。

1 实验和材料

1.1 细胞株及神经元 HEK 293T (human embryonic kidney 293T, 人胚肾细胞): 厦门大学神经科学研究所提供。

1.2 菌种 E. coli DH5 α , 厦门大学神经科学研究所提供。

1.3 培养基 (1) 细胞培养基 HEK293T 培养基: DMEM、10% FBS、1% 双抗; (2) 细菌培养基 大肠杆菌培养基: NaCl (10 g)、east Extract (5 g)、Tryptone (10 g)、琼脂糖粉 (15 g) (固体时需加), 加 900 ml 的单蒸水溶解, 5 mol NaOH 调 pH 值至 7.0 后定容至 1 L, 高压蒸汽灭菌 120 °C 20 min, 4 °C 保存。

1.4 质粒 pCMV-myc (哺乳动物表达载体, C 端带有 myc 标签)、pCMV-HA (哺乳动物表达载体, C 端带有 HA 标签)、DRD1-HA、shVPS35 质粒均由厦门大学神经科学研究所构建并保存。VPS35-myc 质粒由新加坡分子与细胞生物学研究提供。

1.5 抗体、试剂及化学药品

1.5.1 抗体 HA-tag (26D11) 抗体: Abmart 公司; VPS35 抗体: Millipore 公司; DRD1、Normal mouse IgG 及 Myc (9E10) 抗体: 购自 Santa Cruz 公司; GAPDH 抗体: Cell Signaling Technology 公司。

1.5.2 主要试剂及化学药品 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium): Thermo scientific, Hyclone 公司; 0.25% Trypsin-EDTA (1 ×), (100X) (Penicillin-Streptomycin Solution) 双抗: Invitrogen 公司; Neurobasal、FBS (Fetal Bovine Serum)、HBSS 及 Opti-MEM® I: Gibco 公司。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Ladder Marker 和 Premix PrimerSTAR HS: TaKaRa 公司; Rever Tra Ace qPCR RT Kit: TOYOBO 东洋纺公司; Protein Ladder: Piercenet 公司; 放线菌酮 (Cycloheximide, CHX): Sigma-Aldrich 公司; MG-132: Selleck 公司; 0.22、0.45 μ mol PVDF WB 膜: Millipore 公司; 质粒大提试剂盒: ome-

gascientific 公司; 医用 X 光感蓝胶片: 白云三和公司; 氯化铵、谷胱甘肽、N-N' 亚甲基双丙烯酰胺、过硫酸铵、丙烯酰胺、SDS 等分析纯均国产。

2 实验方法

2.1 实验所需质粒构建 (1) 根据 Pubmed 基因库人源 DRD1 基因 (Gene ID: 1812) 序列, 用 Primer Primer 5.0 软件设计出 pcmv-DRD1-HA 正向引物: 5'-CGGAATTCATGAGGACTCTGAACACCTCTG-3' (限制性内切酶 EcoRI) 以及反向引物 5'-CCTC-GAGTCAGGTTGGGTGCTGACCGTTTTGT-3' (XhoI); 由广州英潍捷基生物公司合成。(2) 采用 PCR 技术从人的胎脑 cDNA (互补 DNA) 文库中克隆出 DRD1 的 cDNA, 将克隆出的 cDNA 和 pcmv-HA 载体用限制性内切酶进行双向酶切; (3) 用 T4 DNA 连接酶连接酶切回收的 DRD1 cDNA 和线性化 pcmv-HA 载体, 连接产物于 E. coli DH5 α 感受态大肠杆菌细胞中转化, 后涂于含氨苄西林抗生素的固体 LB 培养皿平板上, 37 °C 正置 30 min 后倒置培养 12 h ~ 16 h; 选取合适的单克隆菌落挑取接种于含氨苄西林的液体 LB 中, 于 37 °C 摇床上震荡培养 12 h ~ 16 h; 取适量 (1 ~ 2 μ l) 菌液进行 PCR 鉴定, 将克隆呈阳性的菌液送至英潍捷基公司双向测序, 结果正确的克隆阳性菌液于 4 °C 储存备大提。(4) 根据文献报道^[27] 已知人源 VPS35: shRNA1: 5'-TCA-GAGGATGTTGTATCTTTACAAGTCTC-3', shRNA2: 5'-GCTTCACACTGCCACCTTTGGTATTTGCA-3', 干扰序列的靶基因 mRNA 水平干扰效果 (见图 1)。

2.2 DRD1 降解实验 于 HEK 293T 细胞中瞬时转染 DRD1-HA 质粒, 4 h ~ 6 h 后等量传代至 100 mm 培养盘中。24 h 后瞬时转染等量的对照载体 pcmv-myc 和 VPS35-myc 质粒, 或等量的对照 shRNA 和 VPS35-sh1, 4 h ~ 6 h 后等量传代至 6-well 培养盘中继续培养 24 h 后加 500 μ mol CHX, 根据实验设计分别处理 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h 和 8 h (用 DMSO 作为 0 h 对照), TNEN 裂解细胞并 Western blotting 检测目的蛋白的表达量, 分别用 myc 和 VPS35 抗体检测 VPS35, HA 抗体检测外源的 DRD1-HA, 以 GAPDH 为内参, 胶图用 Image J 软件灰度定量分析, GraphPad Prism 5 分析数据并作图, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。于 HEK 293T 细胞中瞬时转染等量的对照载体 pcmv-myc 和 VPS35-myc 质粒, 4 h ~ 6 h 后等量传代至 6-well 培养盘中。18 h ~ 24 h 后瞬用 500 μ mol CHX、及 20 μ mol MG132 或者

30 mmol NH₄CL 处理 6 h(用 DMSO 作为 0 h 阴性对照),TNEN 裂解细胞并 Western blotting 检测目的蛋白的表达量,分别用 myc 标签抗体检测 VPS35,HA 抗体检测外源的 DRD1-HA,以 GAPDH 为内参,胶图用 Image J 软件灰度定量分析,GraphPad Prism 5 分析数据并作图,**P* < 0.05,***P* < 0.01,****P* < 0.001,n. s.; not significant。(每组用 DMSO 处理的 DRD1 蛋白量定为 1)。

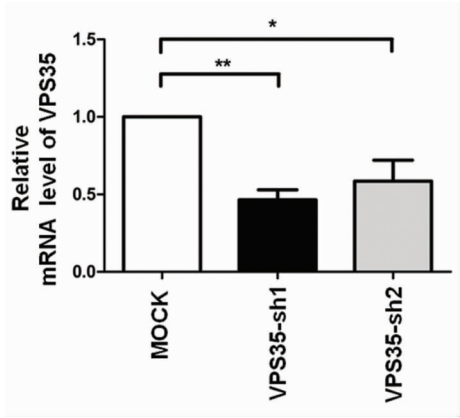
2.3 统计学分析 需要定量数据均为 3 个或 3 个以上的独立实验结果取平均值,用 Image J 软件进行灰度定量分析;用 Graphpad prism 5 统计软件作图统计分析,显著性差异由 unpaired *t* test 或 paired 检验确定,用“*”符号表示:**P* < 0.05,***P* < 0.01,****P* < 0.001。

3 结果

我们用 CHX 处理细胞,来研究 VPS35 对 DRD1 的降解可能存在的影响。首先在稳定表达外源性带 HA 标签的人源 DRD1 蛋白的 HEK293T 细胞中瞬时转染对照载体 pcmv-myc 和 VPS35-myc 质粒(见图 2A),4 h~6h 后等量传代至 6-well 培养盘中继续培养 24 h 后加 500 μmol CHX,根据实验设计分别处理 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h 和 8 h(用 DMSO 作为 0 h 对照),TNEN 裂解细胞并 Western blotting 检测目的蛋白的表达量。结果显示在过表达 VPS35 之后,DRD1 蛋白的降解速率比对照组加快了,说明 VPS35 促进了 DRD1 的降解。相反的,在下调 VPS35 水平后(见图 2B),DRD1 蛋白的降解速率比对照组减慢了。这些结果表明,VPS35 能够调控 DRD1 的降解。

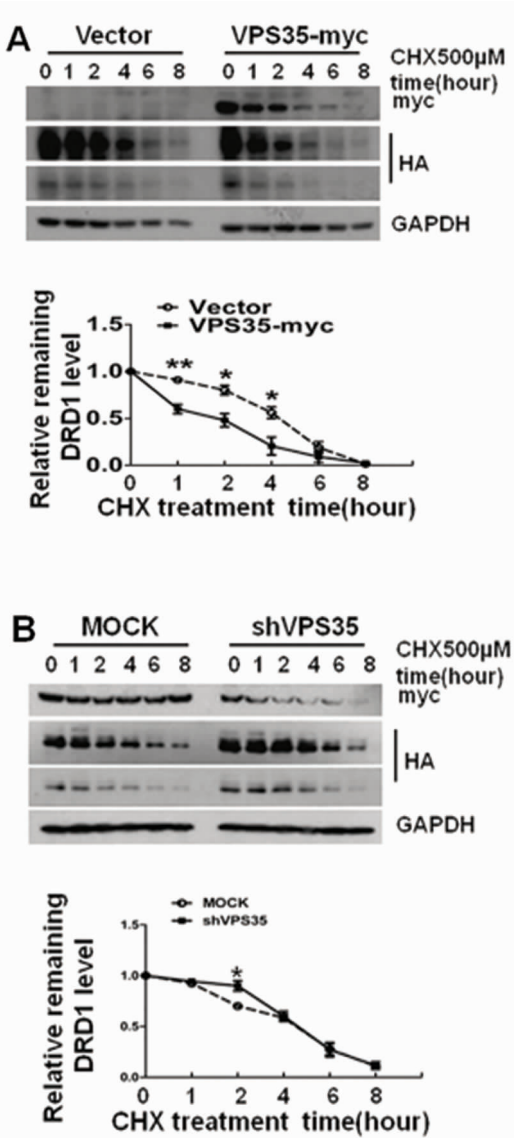
为了更深入地了解 VPS35 对 DRD1 降解的调控方式,我们采用 20 μmol MG132 和 30 mmol NH₄CL 处理细胞作为阳性对照,DMSO 作为 0 h 阴性对照(见图 2C)的降解实验来分析 VPS35 调控 DRD1 降解的途径。用 TNEN 裂解细胞并 Western blotting 检测目的蛋白的表达量。结果显示,在转 Vector 细胞中,NH₄Cl 和 MG132 处理组的 DRD1 蛋白量比对照组都有所升高,但 NH₄Cl 组升高更明显,提示 DRD1 在正常情况下主要通过溶酶体途径降解,这与七次跨膜蛋白的降解特点相吻合。而在转 VPS35 细胞中,NH₄Cl 和 MG132 处理组的 DRD1 蛋白量比对照组的升高趋势较 Vector 组都有所增加,提示 VPS35 过表达时,能增加 DRD1 的溶酶体和泛素蛋白酶体降解,但增加溶酶体降解的效果更

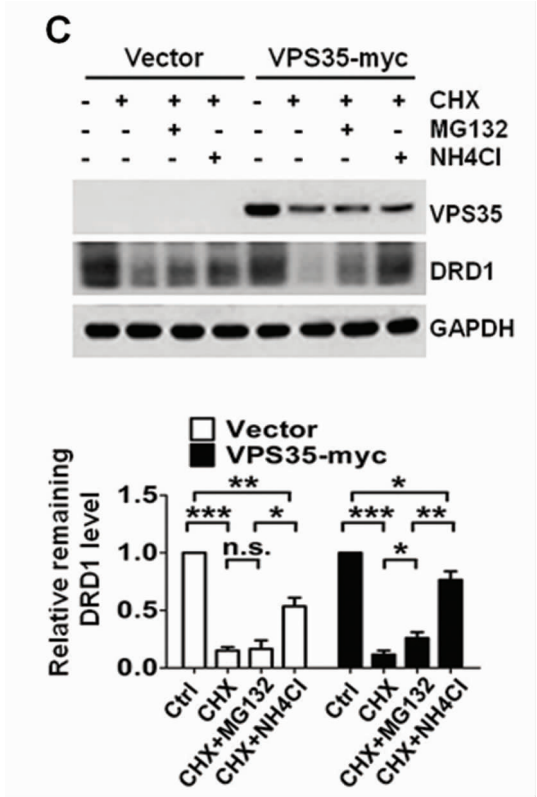
加显著,因此抑制溶酶体才能更多地恢复其水平。



注:HEK293T 细胞中转染 hVPS35,shRNA 及对照质粒。72 h 后收集细胞提 RNA 并反转录,β-actin 作为内参,Real-time PCR 检测 hVPS35 表达量 **P* < 0.05,***P* < 0.01

图 1 靶基因 mRNA 水平干扰效果





注:在过表达 VPS35 之后(A),DRD1 蛋白的降解速率与对照组比较;在下调 VPS35 水平后(B),DRD1 蛋白的降解速率与对照组比较;过表达 VPS35、CHX 及 20 μ mol MG132 或者 30 mmol NH4CL 处理细胞(用 DMSO 作为 0 h 阴性对照)(C),DRD1 蛋白的降解程度之间比较,以 GAPDH 为内参,胶图用 Image J 软件灰度定量分析,GraphPad Prism 5 分析数据并作图 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, n. s. :not significant(每组用 DMSO 处理的 DRD1 蛋白量定为 1)

图2 VPS35 影响 DRD1 的降解

4 讨论

帕金森病是一种病情呈进行性加重神经变性疾病,已成为威胁中老年人健康的“杀手”之一,PD 多发于 60 岁以上的老年人群中,且低龄化趋势愈发加重。由于 PD 是中枢神经系统退行性疾病,黑质纹状体等部位的多巴胺能神经元进行性退变、死亡,多巴胺合成或传导能力减弱,导致锥体外系主导的运动调节功能受损是 PD 的主要病理变化。PD 的一个重要病理特征就是 α -synuclein 突触核蛋白异常聚集形成的路易小体(Lewy body)。此外,MPTP 和 rotenone 等环境毒素的影响造成神经元线粒体的功能障碍,促进氧化应激和有害自由基的生成,也会致使多巴胺能神经元大量变性死亡^[7]。目前对 PD 发病机制的研究主要涉及遗传、年龄老化、环境、免疫炎症、氧化应激、线粒体功能障碍、细胞凋亡等方面。已被证实与 PD 相关的基因包括 α -synuclein (PARK1、PARK4)、Parkin 基因 (PARK2)、UCH-L1

(PARK5)、PINK1 (PARK6)、DJ-1 (PARK7)、LRRK2 (PARK8)、ATP13A2 (PARK9)、GBA 等数 10 种^[8]。PD 致病基因多样化证实了遗传多态性在 PD 发病中所起的重要作用。

VPS35 是 Retromer 复合体的最重要元件,它与 VPS26 和 VPS29 组成复合体并与 GTP 以及 Rab7 相互作用于 EEA^[9],在流动性下降的同时募集更多的货物蛋白,继而形成稳定的成核复合体,从 endosome 向 TGN 中以囊泡的方式转运高尔基体、内质网、溶酶体、核膜等部位之间的大小不同的颗粒物质^[10],保证了许多跨膜的受体蛋白的代谢平衡和重复利用^[11]。研究表明 VPS35 的常染色体显性突变 D620N (Asp620Asn)、P316S (Pro316Ser)、R524W (Arg524Trp)等会导致 PD 发病^[12],但具体病理机制尚不明确,目前关于突变体及 VPS35 表达不足或功能缺失,对于 PD 的致病机制研究主要集中在 α -synuclein 的异常聚集^[13]、线粒体功能障碍导致多巴胺能神经元的损失^[14]、抑制 VPS35 与 WASH 复合体结合^[15]、增加 MPP+ 的毒性作用^[16]、干扰 AMPA 受体的转运、神经元突触成熟障碍^[17]等方面。

有研究显示,VPS35 缺乏对多巴胺能神经元的损伤尤其严重,并且在临床 PD 患者的黑质区域也出现了 VPS35 减少的现象^[18]。抑制 VPS35 的表达会导致新生的海马区神经元树突棘和轴突肿胀而表现出变性样的形态。有趣的是 PD 的病理特点是这些区域的多巴胺能神经元的变性死亡,而这些区域也是 DRD1 表达最丰富的部位。一些研究证实,参与细胞内外物质转运的蛋白介质如 DRiP78^[19]、COPI^[20]、SNX5^[21]等都能与 DRD1 相互作用并调控其在质膜和细胞表面的运输和成熟分布。在化学性质上,DRD1 属于 G 蛋白偶联(G protein coupled)受体家族的七次跨膜蛋白,其从产生、运输以及最终成熟定位在细胞膜上,时刻处于一个动态的过程。VPS35 与 GTP 以及 Rab7 相互作用并与早期内体(early endosome)结合^[9],由胞内体向高尔基体网状结构逆向转运细胞膜、高尔基体、内质网、溶酶体、核膜等部位之间的货物蛋白,这些蛋白与 DRD1 的生化性质以及转运特点都高度相似。根据相关报道显示,在 VPS35 参与转运的货物蛋白中,有些与神经退行性疾病密切相关,如 APP^[22]、BACE1^[23]、AMPA 受体^[24]等,作为 PD 中有重要作用的 DRD1,我们猜想 VPS35 是否也能够调控其转运过程。前期研究结果表明,VPS35 虽然对 DRD1 的基因表达水平影响不大,但能够有效增加 DRD1 蛋白在细胞膜上的水平,从而增加接受传导多巴胺的受体数量,并且促进内吞入胞的 DRD1 再循环至细胞膜上,而内吞入

胞的 DRD1 除了再循环返回细胞膜上^[6]。在本文降解实验中,我们发现 VPS35 能够显著促进胞内 DRD1 通过溶酶体途径降解(见图2)。有趣的是,之前有报道显示 VPS35 与 VPS26 和 VPS29 在 EEA 的囊泡表面形成复合体,将 Cargo 蛋白逆向转运至 TGN,避免其被运至溶酶体而降解^[25],而有些研究结果则表明 VPS35 促进诸如 α -synuclein 等蛋白的降解,从而减少神经损伤^[26,27]。因此 VPS35 对 DRD1 降解调控的具体机制仍需要更深入地探索研究。VPS35 的 D620N、R524W、P316S 等突变已被证实与 PD 相关,我们前期证实 VPS35 (D620N c. 1858G > A) 突变不能有效地调控细胞膜上 DRD1 的内吞及再循环上膜及在信号转导,说明 D620N 突变干扰了 VPS35 的正常生理功能,而 VPS35 的相关突变是否影响 DRD1 的降解也有待进一步研究阐明。

本研究证实了 VPS35 有效通过溶酶体途径调控 DRD1 的降解,随着对 VPS35 功能的深入研究,其在以帕金森病和阿尔茨海默病为代表的神经退行性疾病中的相关作用机制也将得到更加详尽的揭示。

[参考文献]

- [1] Paul ML, Graybiel AM, David JC, et al. D1-like and D2-like dopamine receptors synergistically activate rotation and c-fos expression in the dopamine-depleted striatum in a rat model of Parkinson's disease [J]. *J Neurosci*, 1992, 12(10):3729-3742.
- [2] Bonifacino JS, Hurley JH. Retromer [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(4):427-436.
- [3] Follett J, Norwood SJ, Hamilton NA, et al. The Vps35 D620N mutation linked to Parkinson's disease disrupts the cargo sorting function of retromer [J]. *Traffic*, 2014, 15(2):230-244.
- [4] Popoff V, Mardones GA, Bai SK, et al. Analysis of articulation between clathrin and retromer in retrograde sorting on early endosome [J]. *Traffic*, 2009, 10(12):1868-1880.
- [5] Komada M, Kitamura N. The Hrs/STAM complex in the downregulation of receptor tyrosine kinases [J]. *J Biochem*, 2005, 137(1):1-8.
- [6] Chen Wang, Mengxi Niu, Zehua Zhou, et al. VPS35 regulates cell surface recycling and signaling of dopamine receptor D1 [J]. *Neurobiol Aging*, 2016, 46:22-31.
- [7] Parsian A, Racette B, Zhang ZH, et al. Mutation, sequence analysis, and association studies of alpha-synuclein in Parkinson's disease [J]. *Neurology*, 1998, 51:1757-1759.
- [8] Chai A, Hoarau-Vechot J, Ladjimi M. Applying chaperones to protein-misfolding disorders: molecular chaperones against α -synuclein in Parkinson's disease [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 60:196-205.
- [9] Balderhaar HJ, 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]. *J Cell Sci*, 2010, 123:4085-4094.
- [10] Van Weering JR, Cullen PJ. Membrane-associated cargo recycling by tubule-based endosomal sorting [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 31:40-47.

- [11] Attar N, Cullen PJ. The retromer complex [J]. *Adv Enzyme Regul*, 2010, 50(1):216-236.
- [12] Vilarino-Guell C, Wider C, Ross OA, et al. Vps35 mutations in parkinson disease [J]. *Am J Human Genet*, 2011, 89:162-167.
- [13] Dhungel N, Eleuteri S, Li L B, et al. Parkinson's disease genes VPS35 and EIF4G1 interact genetically and converge on α -synuclein [J]. *Neuron*, 2015, 85(1):76-87.
- [14] Fu-Lei Tang, Wei Liu, Jin-Xia Hu, et al. VPS35 deficiency or mutation causes dopaminergic neuronal loss by impairing mitochondrial fusion and function [J]. *Cell Rep*, 2015, 12(10):1631-1643.
- [15] Zavodszky E, Seaman MN, Moreau K, et al. Mutation in Vps35 associated with parkinson's disease impairs wash complex association and inhibits autophagy [J]. *Nat Commun*, 2014, 5:3828.
- [16] Fountaine TM, Venda LL, Warrick N, et al. The effect of alpha-synuclein knockdown on MPP+ toxicity in models of human neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 2008, 28(12):2459-2473.
- [17] Tian Y, Tang FL, Sun X, et al. VPS35-deficiency results in an impaired AMPA receptor trafficking and decreased dendritic spine maturation [J]. *Mol Brain*, 2015, 8(1):70.
- [18] MacLeod DA, Rhinn H, Kuwahara T, et al. RAB7L1 interacts with LRRK2 to modify intraneuronal protein sorting and Parkinson's disease risk [J]. *Neuron*, 2013, 77:425-439.
- [19] Bermak JC, Li M, Bullock C, et al. Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(5):492-498.
- [20] Bermak JC, Li M, Bullock C, et al. Interaction of gamma-COP with a transport motif in the D1 receptor C-terminus [J]. *Eur J Cell Biol*, 2002, 81(2):77-85.
- [21] Villar VA, Armando I, Sanada H, et al. Novel role of sorting nexin 5 in renal D(1) dopamine receptor trafficking and function: implications for hypertension [J]. *FASEB J*, 2013, 27(5):1808-1819.
- [22] Vieira SI, Rebelo S, Esselmann H, et al. Retrieval of the Alzheimer's amyloid precursor protein from the endosome to the TGN is S655 phosphorylation state-dependent and retromer-mediated [J]. *Mol Neurodegener*, 2010, 5:40.
- [23] Wen L, Tang FL, Hong Y, et al. VPS35 haploinsufficiency increases Alzheimer's disease neuropathology [J]. *J Cell Biol*, 2011, 195(5):765-779.
- [24] Munsie LN, Milnerwood AJ, Seibler P, et al. Retromer-dependent neurotransmitter receptor trafficking to synapses is altered by the Parkinson's disease VPS35 mutation p. D620N [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(6):1691-1703.
- [25] Harrison MS, Hung CS, Liu TT, et al. A mechanism for retromer endosomal coat complex assembly with cargo [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2014, 111:267-272.
- [26] Miura E, Hasegawa T, Konno M, et al. VPS35 dysfunction impairs lysosomal degradation of α -synuclein and exacerbates neurotoxicity in a Drosophila model of Parkinson's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 71:1-13.
- [27] Belenkaya TY, Wu Y, Tang X, et al. The retromer complex influences Wnt secretion by recycling wntless from endosomes to the trans-Golgi network [J]. *Dev Cell*, 2008, 14:120-131.