

VAR-ДОМЕН-СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ КАК ВОЗМОЖНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ БЕЛКОВОЙ ЖИДКОЙ ФАЗЫ В НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЯХ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

© 2023 г. А. Г. Шишков^a, Н. В. Нифантова^a, О. М. Коренькова^a,
Е. С. Сопова^{a, b}, Л. Бродин^b, О. В. Шупляков^{a, b, *}

^aСанкт-Петербургский государственный университет,
Институт трансляционной биомедицины, лаборатория биологии синапсов,
Санкт-Петербург, 199034 Россия

^bОтдел нейронаук, Каролинский институт, Стокгольм, 17177 Швеция

*e-mail: oleg.shupliakov@ki.se

Поступила в редакцию 10.11.2022 г.

После доработки 18.12.2022 г.

Принята к публикации 20.12.2022 г.

VAR-белки являются одними из ключевых компонентов секреторного везикулярного цикла в нервных окончаниях. Они участвуют в регуляции секреции нейромедиаторов при слиянии синаптических везикул с пресинаптической мембраной, а также в рециркуляции везикул в результате эндоцитоза. Локализация этих белков в зонах нервных окончаний, где формируются жидкие белковые фазы, предполагает дополнительные функции этих молекул. В данном обзоре мы обсуждаем функции VAR-домен-содержащих белков на различных этапах секреторного цикла, включая их возможную роль в регуляции формирования белковых жидких фаз в нервных окончаниях при синаптической активности. Мы предполагаем, что VAR-белки, помимо регуляции экзо- и эндоцитоза, играют важную роль в организации резервного пула везикул и на промежуточных этапах секреторного цикла.

Ключевые слова: синапс, цикл синаптических везикул, экзоцитоз, эндоцитоз, VAR-белки, разделение жидких фаз

DOI: 10.31857/S0233475523030088, **EDN:** FBJBWX

ВВЕДЕНИЕ

VAR-домен-содержащие белки (VAR domain proteins) широко известны как молекулы, контролирующие изменения кривизны биологических мембран. Они играют ключевую роль в жизнедеятельности всех клеточных систем. Сокращение VAR определяется первыми буквами названий трех белков, которые входят в это суперсемейство: Bin1 [1], Amphiphysin [2], обнаруженных у млекопитающих, и Rvs167, обнаруженного у дрожжей [3]. Характерной структурной особенностью VAR-белков является наличие уникального домена, состоящего из ~200–280 аминокислот, который формирует пучок альфа-спиралей, расположенных антипараллельно. При димеризации белковых молекул эти домены образуют положительно заряженную поверхность, которая способна связываться с отрицательно заряженными липидами клеточной мембраны и контролировать ее кривизну (рис. 1а, 1б) [4, 5]. Это уникальное свойство определяет участие VAR-белков во многих процессах в клетке, таких как образование внутри-

клеточных пузырьков, секреция, а также создание мембранных структур различной формы, например, T-системы клеток скелетной мускулатуры, эндосом, филоподий, митохондрий и аутофагосом [4, 6].

Из широкого разнообразия VAR-белков выделяют три группы: N-VAR, F-VAR, I-VAR. N-VAR-белки при димеризации образуют заряженную поверхность в форме полумесяца, способную стабилизировать наибольшую кривизну мембраны [4]. Особенностью VAR-домена N-VAR-белков является N-терминальная амфипатическая спираль, которая впервые была описана для белка амфифизина [7]. Впоследствии оказалось, что такая амфипатическая спираль характерна также для эндофилина [8], нардина (RICH1) [9] и некоторых других белков. Белки, стабилизирующие меньшую кривизну поверхности мембраны, были названы по именам характерных представителей группы Fes/CIP4 homology-VAR-белков, сокращенно F-VAR-белками [10, 11]. Белки, димеры которых стабилизируют обратную кривизну мем-

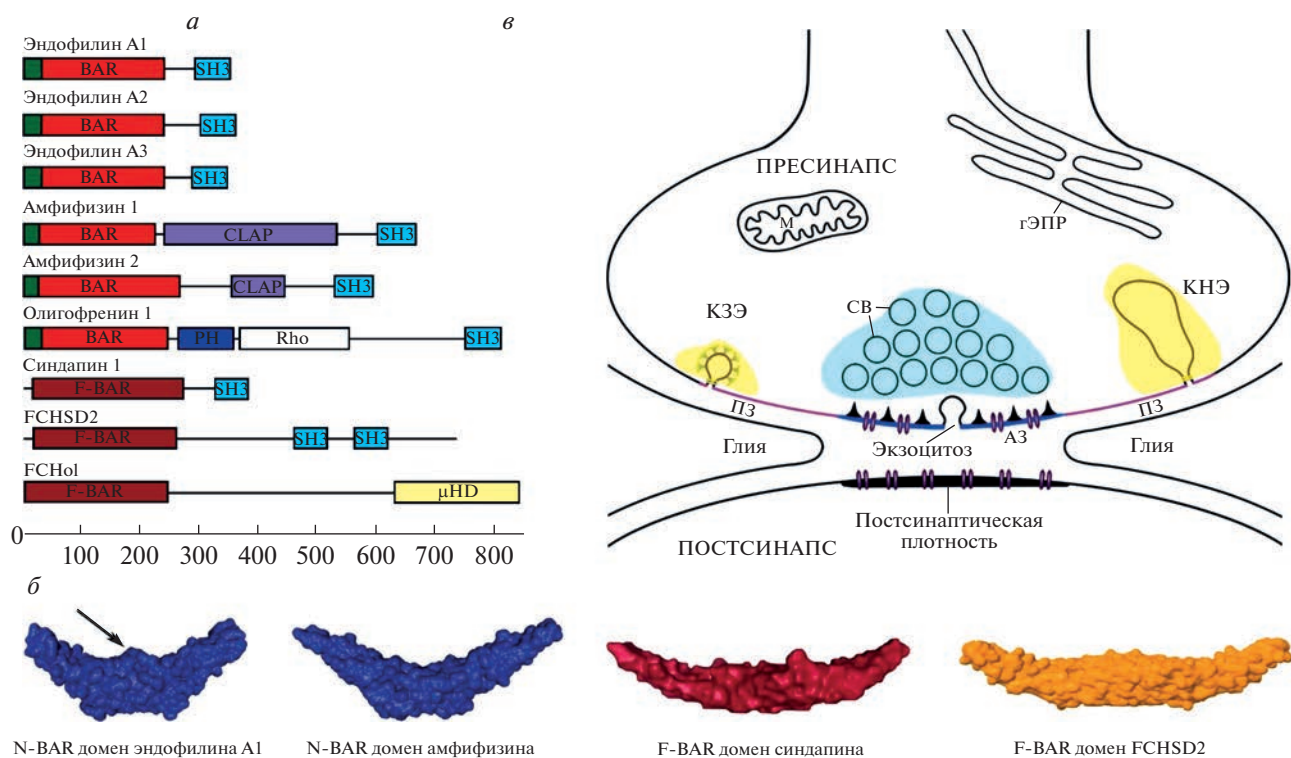


Рис. 1. BAR-белки и локализация белковых жидких конденсатов, участвующих в цикле синаптических везикул в пресинапсе.

a – Схематическое изображение доменной организации изоформ BAR-белков, участвующих в цикле синаптических везикул. BAR-домены показаны красным, дополнительная N-терминальная амфипатическая спираль у N-BAR-белков выделена зеленым; CLAP – клатрин/AP2 связывающий участок, PH – pleckstrin homology-домен, Rho – RhoGAP-домен, регулирующий активность GTP-аз; шкала показана для оценки относительной длины аминокислотных последовательностей белков.

б – Кристаллическая структура димеров BAR-доменов некоторых белков. Показано различие в степени кривизны у N-BAR- и F-BAR-димеров. Стрелка указывает на центральную амфипатическую спираль (CAH) эндофилина.

в – Схематическое изображение локализации жидких белковых конденсатов, участвующих в цикле синаптических везикул. Жидкая белковая фаза организует кластер синаптических везикул в пресинапсе (обозначена голубым цветом) и области периактивной зоны (ПЗ), в которых происходит клатрин-зависимый (КЗЭ) и клатрин-независимый эндоцитоз (КНЭ) (обозначены желтым цветом). Жидкая белковая фаза, организующая пресинаптические проекции в активной зоне (АЗ), выделена синим.

СВ – синаптические везикулы, М – митохондрия, гЭПР – гладкий эндоплазматический ретикулум.

браны, получили название Inverse-BAR или I-BAR [12–14]. Группы BAR-белков различаются как углом стабилизации кривизны, так и длиной участка, взаимодействующего с клеточной мембраной, что определяет способность этих молекул формировать различные по физическим свойствам мембранные трубки и везикулы *in vitro* и *in vivo* [15–18]. В структуру BAR-белков, как правило, включены и другие домены, которые позволяют им взаимодействовать с широким спектром белков и сигнальных молекул. Так, например, в структуру BAR-белков могут входить pleckstrin homology (PH) и rhoX homology (PX) домены, позволяющие белкам осуществлять дополнительные взаимодействия с липидами, а также GEF (guanine nucleotide exchange factor) и GAP (GTP hydrolysis-activat-

ing protein) домены, регулирующие активность GTP-аз [7]. Среди дополнительных доменов наиболее часто встречаются Src homology 3 (SH3) домены, которые взаимодействуют с пролин-богатыми белковыми последовательностями – PRD [19, 20]. Это взаимодействие прежде всего играет роль в рекрутировании других белков, участвующих в различных клеточных процессах. Интересно, что SH3-домены BAR-белков обладают способностью замыкаться на пролин-богатую последовательность внутри самого белка, переводя его таким образом в неактивную форму [21–23].

В данном обзоре мы обсуждаем функции BAR-белков, непосредственно участвующих в цикле секреторных везикул в межнейронных синапсах в центральной нервной системе (ЦНС).

СЕКРЕТОРНЫЙ ЦИКЛ И РАЗДЕЛЕНИЕ ЖИДКИХ ФАЗ В ХИМИЧЕСКОМ СИНАПСЕ

Межнейронный химический синапс — это специализированный контакт между нервными клетками, который выполняет функцию передачи возбуждающего или тормозного сигнала между нейронами в ЦНС. Химические синапсы асимметричны по структуре и направленно передают информацию от пресинаптической к постсинаптической клетке (рис. 1а). Пресинапс и постсинапс разделены синаптической щелью шириной приблизительно 20 нм, которая окружена отростками глиальных клеток. Передача сигнала запускается потенциалом действия, приходящим в нервное окончание, и осуществляется в результате работы секреторного цикла синаптических везикул, который завершается экзоцитозом везикул и выходом нейромедиаторов в синаптическую щель. Нейромедиатор взаимодействует с рецепторами на постсинаптической мембране, активирует ионные каналы и таким образом осуществляет передачу сигнала на другой нейрон. Нейромедиаторы сконцентрированы в синаптических везикулах, или пузырьках, которые аккумулируются в кластер на специализированном участке пресинаптической мембраны, в так называемой активной зоне (рис. 1а). В состоянии покоя часть синаптических везикул в кластере связана с пресинаптической мембраной, образуя функциональный пул везикул, готовых к немедленному слиянию с пресинаптической мембраной и выбросу нейромедиатора в синаптическую щель при возникновении нейрональной активности (*readily releasable pool*). Помимо этого, существуют два дополнительных функциональных пула синаптических везикул: циркулирующий пул (*recycling pool*) и резервный пул (*reserve pool*), везикулы которых мобилизуются при умеренной и интенсивной активности нейрона соответственно [24].

Вокруг активной зоны пресинапса располагается так называемая периактивная зона, где происходит восстановление синаптических везикул после экзоцитоза (рис. 1а) [25]. Основным механизмом формирования везикул является клатрин-зависимый эндоцитоз [26, 27]. Кроме того, существуют и другие сценарии восстановления пула синаптических везикул. Известны, например, быстрый тип эндоцитоза и “*kiss-and-run*”, которые реализуются без участия клатрина и происходят как в периактивной, так и в активной зоне [28–31]. При высоком уровне синаптической активности, который сопровождается экзоцитозом большого количества везикул в короткий промежуток времени, может происходить компенсаторный захват и отпочковывание больших

участков мембраны по типу “*bulk*”-эндоцитоза. Это приводит к формированию эндосом, из которых в дальнейшем формируются синаптические везикулы [32]. Следует отметить, что эти механизмы эндоцитоза являются вспомогательными и оказываются не в состоянии поддерживать работу синаптического цикла при выключении классического клатрин-зависимого эндоцитоза [27]. Вновь сформированные везикулы заполняются нейромедиатором, транспортируются в область кластера над активной зоной и вновь вовлекаются в процесс экзоцитоза, замыкая таким образом синаптический секреторный цикл [33–35].

Открытие жидких белковых конденсатов и процессов разделения и трансформации жидких фаз (*liquid-liquid phase transitions, LLPTs*) в клетках во многом изменило наши представления о механизмах клеточных процессов [36, 37]. Как показали исследования последних лет, пресинаптические компартменты, в которых происходит цикл синаптических везикул, также организованы по принципу разделения жидких фаз [38] (рис. 1а). Способность в определенных условиях формировать поверхность раздела фаз *in vitro* демонстрируют: основной белок резервного пула синапсин [39, 40], белки пресинаптического уплотнения RIM, RIM-BP и ELKS в комплексе с потенциал-зависимыми кальциевыми каналами (VGCC) [38, 41–44], а также белки-инициаторы клатрин-зависимого эндоцитоза FCHO 1/2 и eps15 [45] и клатрин-независимого эндоцитоза синдапин 1 и динамин 1xA [46]. Примечательно, что синаптические везикулы по-разному взаимодействуют с жидкой фазой синапсина и жидкой фазой RIM/RIM-BP/ELKS, инкапсулируясь в первой и распределяясь по поверхности раздела фаз второй [47]. Взаимодействуют между собой и сами жидкие фазы синапсина и RIM/RIM-BP или RIM/ELKS. Вне зависимости от порядка добавления белков в смесь жидкая фаза синапсина инкапсулирует белковые капли, образованные RIM/RIM-BP и RIM/ELKS, но не смешивается с ними, то есть образуется структура вида “жидкая фаза внутри жидкой фазы”. Авторам работы удалось сконструировать такую организацию жидких фаз *in vitro*. Жидкая фаза белков RIM/RIM-BP, которая формировалась на мембране гигантской униламеллярной везикулы со встроенными в нее VGCC, связывала на своей поверхности синаптические везикулы, и сама была инкапсулирована жидкой фазой синапсина с включенными в нее везикулами. Эти эксперименты поддерживают гипотезу, что такое разделение жидких фаз существует и в живом синапсе [47].

Молекулярной основой перехода белков в состояние жидкой фазы являются слабые электростатические взаимодействия между аминокислотными остатками их неорганизованных участков (*intrinsically disordered regions*, IDR), которые при определенных условиях становятся для молекул энергетически более выгодными, чем взаимодействие IDR с молекулами растворителя. На возможность этого перехода влияют такие факторы, как pH, температура, ионная сила раствора и посттрансляционные модификации белков (за счет изменения распределения зарядов в IDR) [48]. Необходимым условием образования жидкой фазы также является преодоление белками концентрационного порога, чему способствует явление “молекулярного краудинга” – присутствие в среде других высокомолекулярных соединений, конкурирующих с белками за молекулы растворителя. Кроме того, пороговые концентрации белков могут достигаться локально за счет их взаимодействия с другими молекулами. Так, в экспериментах *in vitro* показано, что жидкая фаза белков активной зоны RIM/RIM-BP/ELKS образуется при более низких концентрациях этих белков в присутствии VGCC, с которыми RIM взаимодействует напрямую через PDZ-домен (комбинация первых букв названий белков PSD95, Dlg1, Zo-1), а RIM-BP – через SH3-домены [42].

RIM/RIM-BP/ELKS способны вступать в специфические взаимодействия друг с другом, но не с синапсином. Жидкие фазы RIM/RIM-BP/ELKS и синапсина обладают разной плотностью и, соответственно, различаются по силе поверхностного натяжения на границе раздела фаз, что объясняет, почему они не смешиваются [47].

Взаимодействие синаптических везикул с жидкими фазами, вероятно, определяется их взаимодействием с белками, входящими в состав фазы. Так, синапсин напрямую связывается с мембранной везикул с помощью мотива в консервативном домене C и ALPS (*amphipathic lipid-packing sensor*) мотива, а эндоцитозные белки – с помощью своих BAR-доменов [7, 49]. Важную роль в концентрации белков, образующих жидкую фазу, имеют трансмембранные белки синаптических везикул, например, синаптофизин [50]. Таким образом, синаптические везикулы оказываются непосредственно внутри жидкой фазы этих белков в момент ее образования. В то же время белки RIM/RIM-BP/ELKS не имеют доменов, способных напрямую связываться с мембранными липидами, что снижает вероятность включения везикул в жидкую фазу.

В процессе синаптического цикла везикулы преодолевают разделы жидких фаз, организация

и белковый состав которых меняется в зависимости от уровня синаптической активности (рис. 1). Раздел фаз позволяет происходить диффузии молекул между жидкими белковыми конденсатами и цитозолем, однако является непроницаемым для крупных молекулярных комплексов и органелл [48, 51]. Ряд белков, присутствующих в таком компартменте, выступает в роли регуляторных, изменяя условия образования жидкой фазы [52]. Свойства BAR-белков позволяют предполагать, что эта группа белков участвует в организации жидких фаз в синапсе в качестве регуляторных молекул, которые наряду с известными функциями в процессах экзо- и эндоцитоза способствуют переходу везикул в различные пресинаптические компартменты по ходу секреторного цикла.

BAR-БЕЛКИ СИНАПТИЧЕСКОГО ВЕЗИКУЛЯРНОГО ЦИКЛА

В настоящее время известно шесть BAR-белков, участвующих в работе цикла синаптических везикул – это N-BAR-белки: амфифизин, эндофилин; F-BAR-белки: синдапин, FCHo и FCHSD, а также BAR-белок олигофренин. Данных об участии I-BAR-белков в синаптическом цикле в настоящее время нет [14]. Исследования последних лет показали, что в работе цикла участвуют определенные изоформы BAR-белков, а именно: амфифизины 1/2, эндофилин A1, олигофренин 1, синдапин 1, FCHo 1/2 и FCHSD 1/2 [53, 54]. Участие данных изоформ предположительно определяется кинетическими свойствами самого цикла, основным из которых является высокая скорость и эффективность секреторного процесса [53–55].

Амфифизины 1/2. Амфифизины 1/2 в геноме человека кодируются двумя разными генами, *AMPH* и *BINI* (NCBI Gene ID: 273, 274) (рис. 1а). Амфифизин 1 преимущественно экспрессируется в ЦНС [56] и является ключевым белком синаптического цикла [55]. Амфифизин 2, также носящий названия SH3P9 и BIN1 (*bridging integrator-1*), экспрессируется и в других тканях, например, в мышцах [57, 58].

В структуру амфифизина 1/2 входят три основных домена: N-терминальный BAR-домен, клаатрин/AP2-связывающий домен (CLAP) и C-терминальный SH3-домен [59]. N-BAR-домены белка при димеризации образуют структуру в форме дуги (рис. 1б) [7]. Такая структура обладает свойством стабилизировать кривизну мембраны путем связывания с отрицательно заряженной поверхностью липидного слоя мембраны [60]. CLAP-домен амфифизина 1 взаимодействует с ключевыми белками клаатрин-зависимого эндо-

цитоза – адаптерным комплексом AP2 и кластрином [59]. С-терминальный SH3-домен амфифизина обладает способностью рекрутировать другие белки, имеющие в своей структуре пролин-богатые последовательности (PRD) [61]. Амфифизины 1/2 могут образовывать гомо- и гетеродимеры [62].

Амфифизины обладают внутримолекулярным механизмом, который переводит белок в неактивную форму в результате замыкания SH3-домена на BAR-домен [22, 23, 63]. Показано, что SH3-домен способен связываться с пролин-богатой последовательностью H0-спирали N-BAR-домена, что приводит к изменению конформации белка, в результате чего он теряет способность участвовать в тубуляции мембран и снижается эффективность его связывания с мембранными липидами [63]. Это свойство предполагает наличие механизмов регуляции активности белка, в частности, посредством фосфорилирования–дефосфорилирования. Исследования на синапсоматомах показали, что Cdk5-киназа фосфорилирует амфифизин 1 при синаптической активности [64]. При эндоцитозе происходит дефосфорилирование амфифизина [64–66]. Предполагается, что это осуществляется с помощью Ca²⁺/кальмодулин-зависимой фосфатазы кальциневрина (CaN) [66].

Эндофилин А1. В геноме млекопитающих присутствуют три гена *SH3GL1–3* (NCBI Gene ID: 6455, 6456, 6457; *Homo sapiens*), кодирующих эндофилины А1–А3, и два гена *SH3GLB1, 2* (NCBI Gene ID: 56904, 54673; *Homo sapiens*), кодирующих эндофилины В1 и В2 (рис. 1а). Эндофилин А1 специфичен для ЦНС, эндофилин А2 экспрессируется во всех тканях, эндофилин А3 найден в мозге и семенниках [67–69]. Эндофилины В1 и В2 экспрессируются во всех тканях, включая мозг [16]. В нервных терминалях эндофилины А ассоциированы с синаптической мембраной [19]. Эндофилины В преимущественно обнаружены в ассоциации с такими мембранными органеллами, как митохондрии, аутофагосомы, лизосомы и эндоплазматический ретикулум (ЭПР) [70–72]. На поверхности некоторых органелл, например, аутофагосом, эндофилины А колокализуются с эндофилинами В [71, 72].

Определение кристаллической структуры эндофилина показало, что белки включают в себя два основных домена: N-терминальный BAR-домен и С-терминальный SH3-домен, соединенные вариabельным участком [8]. Эндофилин – единственный из N-BAR-белков, имеющий дополнительную H1-вставку (H11) в структуре N-BAR-домена. При димеризации благодаря наличию этой вставки на поверхности белка, обращенной

в сторону мембраны, образуется центральная амфипатическая спираль (central amphipathic helix – CAH) [8, 69] (рис. 1б). Эта особенность структуры позволяет эндофилинам не только стабилизировать, но и активно генерировать кривизну мембраны: CAH встраивается в липидный слой, задавая его асимметрию и, соответственно, кривизну [9].

Центральный участок эндофилина А1 может подвергаться фосфорилированию, что влечет за собой изменение радиуса кривизны мембранных структур, которые этот белок стабилизирует *in vitro* [73]. Предполагается, что BAR-белки переходят в активное состояние при дефосфорилировании кальциневрином. В соответствии с этим предположением, повышенная протеинкиназная активность и фосфорилирование BAR-белков в синаптической терминали приводит к снижению эффективности эндоцитоза [74].

Известно, что эндофилин, как и амфифизин, обладает внутримолекулярным механизмом замыкания, который регулируется посттрансляционными модификациями белка [23, 75]. SH3-домен также способен связываться с H0-спиралью N-BAR-домена, что приводит к конформационным изменениям в BAR-домене [23].

Олигофренин 1. Олигофренин 1 кодируется геном *OPHN1* (NCBI Gene ID: 4983; *Homo sapiens*) и представляет собой RhoGAP-белок, регулирующий активность GTP-аз семейства Rho. Олигофренин 1 экспрессируется в ЦНС и присутствует как в нервных терминалях, так и в дендритах нейронов [76]. Структура белка включает BAR-домен, расположенный на N-конце, PH-домен, центральный RhoGAP-домен и SH3-домен на С-конце молекулы [77, 78]. Белок участвует как в цикле синаптических везикул [78], так и в морфогенезе дендритных шипиков [79]. Для олигофренина не описано механизма аутоингибирования. Мутации белка связывают с развитием X-сцепленной умственной отсталости у человека [76].

Синдапин 1. В геноме млекопитающих присутствуют три гена F-BAR-белка синдапина (*PACSIN1–3*), кодирующих три его изоформы – синдапины 1–3 (NCBI Gene ID: 29993, 11252, 2976; *Homo sapiens*). Синдапин 1 экспрессируется исключительно в ЦНС и аккумулируется в нервных окончаниях. Синдапин 2 обнаруживается во всех тканях и органах. Экспрессия синдапина 3 наиболее высока в скелетной и сердечной мускулатуре, но также выявляется в легких, почках, мозге, плаценте, поджелудочной железе [80].

Мономер синдапина 1 включает F-BAR-домен, вариabельный участок и С-концевой SH3-домен. Рентгеноструктурный анализ показал, что

в целом структура F-BAR-домена синдапина схожа с таковой у других F-BAR-белков. F-BAR-домен у димера синдапина имеет меньшую кривизну поверхности, чем у N-BAR-доменов димеров эндофилина и амфифизина. На границе центрального и дистального участков F-BAR-домена синдапина также находятся гидрофобные петли, позволяющие синдапинам 1 и 2 активно изменять кривизну мембраны [81, 82].

Синдапин 1, так же как эндофилин A1 и амфифизины 1 и 2, способен к аутоингибированию, при котором его SH3-домены взаимодействуют с F-BAR-доменом, блокируя часть его мембраносвязывающей поверхности. Однако взаимодействие доменов происходит не через каноническое SH3/PRD-взаимодействие, а за счет формирования водородных связей и солевых мостиков, поэтому является чувствительным к pH и ионной силе раствора [82]. Хотя синдапин 1 имеет сразу несколько сайтов фосфорилирования, преимущественно расположенных на N-конце F-BAR-домена и вариабельном участке, ни один из этих сайтов не обладает свойством регулировать состояние аутоингибирования синдапина. Вместо этого, выход синдапина из аутоингибирования регулируется взаимодействием пролин-богатых последовательностей других белков с его SH3-доменами, например, динамина, в результате которого димер меняет конформацию и вновь приобретает способность связываться с мембраной [83].

FCHSD1/2. Геном позвоночных содержит два гена белков FCHSD (F-BAR and double SH3 domains protein): *FCHSD1* и *FCHSD2* (NCBI Gene ID: 89848, 9873; *Homo sapiens*) [84]. Преобладающей изоформой является *FCHSD2*, экспрессия которого выявляется почти во всех тканях, в частности, в коре мозга, мозжечке, почках, печени, семенниках, в то время как *FCHSD1* экспрессируется на гораздо более низком уровне [85].

В структуру FCHSD1/2 входят N-концевой F-BAR-домен, два SH3-домена и C-концевой пролин-богатый участок. Важное отличие FCHSD1/2 от других F-BAR-белков состоит в том, что их мембраносвязывающая поверхность имеет нулевую кривизну, то есть FCHSD1/2 могут связываться с плоскими участками мембраны и не способны к ее тубуляции [86]. Показано, что гомолог FCHSD2 у дрозофилы, Nervous Wreck, обладает внутримолекулярным механизмом замыкания, подобным механизму аутоингибирования синдапина. При этом SH3-домены белка (главную роль в этом играет SH3b-домен) связываются с положительно заряженными участками на концах F-BAR-домена за счет электростатических взаимодействий. Интересно, что взаимодей-

ствие SH3- и F-BAR-доменов у данного белка может не только уменьшать взаимодействие с мембраной, но и приводить к образованию различных олигомеров на ее поверхности при изменениях заряда липидной мембраны [21]. Как работает механизм аутоингибирования FCHSD2 у млекопитающих, еще предстоит выяснить.

FCHo1/2. В геноме млекопитающих присутствуют два гена белков FCHo (сокращение от англ. Fer/Cip4 homology domain-only): *FCHo1* и *FCHo2* (NCBI Gene ID: 23 149, 115 548; *Homo sapiens*), кодирующих две соответствующие изоформы белка. Экспрессия обеих изоформ обнаруживается во множестве органов и тканей, однако в мозге *FCHo1* показывает более высокий уровень экспрессии, чем *FCHo2* [87].

FCHo-белки имеют в составе F-BAR-домен и μ HD-домен, соединенные неупорядоченным линкерным участком [88]. F-BAR-домен у димера FCHo имеет небольшую кривизну мембраносвязывающей поверхности и S-образную форму, однако менее выраженную, чем у синдапина [89]. Для FCHo-белков не описано механизма аутоингибирования.

Важно отметить, что в аминокислотных последовательностях у многих BAR-белков наблюдаются IDRs, которые могут участвовать в формировании жидкой белковой фазы [90]. Взаимодействие с мембраной везикул, наличие IDRs и SH3-доменов и способность к аутоингибированию являются значимыми аргументами в пользу того, что данные молекулы могут регулировать состояние белковых жидких фаз в нервной терминали.

ФУНКЦИИ BAR-БЕЛКОВ В ЦИКЛЕ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ И ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ЖИДКОЙ ФАЗЫ

BAR-белки в синаптическом цикле были исходно идентифицированы как молекулы, участвующие в процессе эндоцитоза. Дальнейшие исследования показали, что BAR-белки в синапсах также играют важную роль на других этапах синаптического цикла, от сопряжения процессов экзо- и эндоцитоза до возвращения везикул в кластер в активной зоне. Считается, что некоторые BAR-белки постоянно присутствуют в периактивной зоне, а ряд BAR-белков находится в кластере синаптических везикул в состоянии покоя и мигрирует в периактивную зону при синаптической активности [59, 91–93]. Так, эндофилин, амфифизин и синдапин локализованы в кластерах синаптических везикул, организованных жидкой фазой синапсина, над активной зоной, и

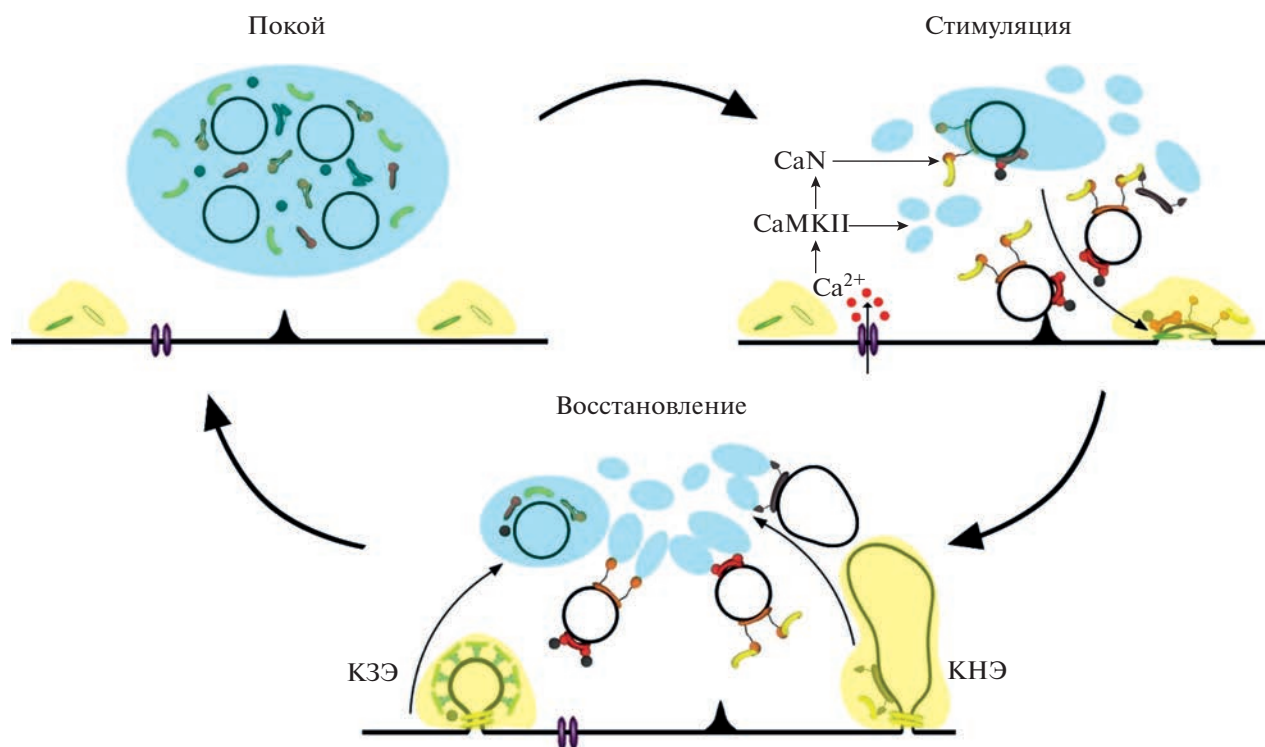


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая участие BAR-белков в регуляции жидких белковых фаз, образующихся на различных этапах синаптического цикла.

Слева в верхней части схемы показана организация резервного пула в состоянии покоя. BAR-белки находятся в мономерном аутоингибированном состоянии и стабилизируют жидкую фазу синапсина, организующую везикулы в кластер. F-BAR-белки (FCHo, FCHSD и частично синдапин) локализованы в периактивной зоне.

При стимуляции (справа) вход кальция через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы приводит к фосфорилированию синапсина с помощью CaMKII и разрушению жидкой фазы в кластере. N-BAR-белки подвергаются дефосфорилированию и димеризации, что приводит к взаимодействию с мембраной синаптических везикул и с другими эндоцитозными белками, например с динамином и синаптоянином, которые также локализуются в кластере в состоянии покоя. Динамин при этом может одновременно и связывать синдапин, и взаимодействовать с амфифизином, находящимся на мембране везикул. Везикулы перемещаются в активную зону и сливаются с пресинаптической мембраной. BAR-белки, участвующие в регуляции этих стадий, находятся в растворимом состоянии в аксоплазме.

При эндоцитозе (внизу) BAR-белки снова включаются в состав жидкого белкового конденсата в периактивной зоне (желтая). При отпочковывании везикул от мембраны с помощью GTP-азы динамина происходят посттрансляционные модификации белков и разрушение жидкой фазы. BAR-белки взаимодействуют с синапсином, что приводит к увеличению его локальной концентрации. Дефосфорилирование синапсина и последующее усиление его взаимодействия с везикулами приводят к замещению BAR-белков на поверхности везикул и формированию жидкой фазы. Посттрансляционные изменения и образование аутоингибированных мономеров BAR-белков приводят к стабилизации жидкой фазы и организации везикул в кластер. Подробности в тексте.

Большие стрелки указывают направление синаптического цикла. Голубым цветом показана жидкая фаза синапсина, оранжевым – амфифизин, красным – эндофилин А, серым – синдапин I, желтым – динамин, зеленым – FCHo и FCHSD, фиолетовым – потенциал-зависимые кальциевые каналы, красными кружками – ионы кальция, серыми кружками – синаптоянин. CaMKII – Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая протеинкиназа II, CaN – кальциневрин, КЗЭ – клатрин-зависимый эндоцитоз, КНЭ – клатрин-независимый эндоцитоз.

при синаптической активности доставляются в периактивную зону пресинапса после слияния везикул с мембраной в активной зоне [59, 91–94]. Вместе с названными BAR-белками мигрирует и целый ряд эндоцитозных белков, таких как динамин, синаптоянин и интерсектин [91, 95, 96]. При этом белки подвергаются дефосфорилированию кальциневрином (CaN) [53, 66, 91–93] (рис. 2).

В связи с имеющимися данными о свойствах обсуждаемых белков возникает вопрос: каким об-

разом BAR-белки осуществляют свои функции в пресинаптическом секреторном цикле и участвуют в регуляции LLPTs?

Пресинаптические BAR-белки в состоянии покоя.

Как уже отмечалось ранее, синаптические везикулы организованы в кластер жидкой фазой пресинаптического белка синапсина. Эксперименты *in vitro* показали, что жидкая фаза синапсина образуется благодаря слабым взаимодействиям между IDR молекул белка [39]. Для этого его вза-

имодействие с SH3-доменами BAR-белков должно быть нарушено. В пользу этого говорят эксперименты, которые показывают, что введение антител к IDR синапсина нарушает организацию резервного пула везикул в пресинапсе миогии в покое [40]. Можно предположить, что дефосфорилирование синапсина и его последующее взаимодействие с мембраной везикул с помощью ALPS-мотива и C-домена в жидкой фазе приводит к смещению BAR-белков с поверхности мембраны и к их переходу в мономерное закрытое состояние или, как в случае с эндофилином, белок может находиться в связанном состоянии с VGLUT1 (везикулярным транспортером глутамата) [97]. В пользу инактивации SH3-взаимодействий говорит эксперимент, в котором блокирование антителами SH3-доменов амфифизина и SH3A-домена интерсектина не приводит к разрушению резервного пула в покое [40]. При этом наличие IDRs в структуре BAR-белков может способствовать поддержанию жидкой фазы синапсина, как это было показано для других белков [98–100]. С этим также согласуется предположение, что SH3-домены других эндоцитозных белков в сформированной жидкой фазе синапсина не активны [101].

Эксперименты показали, что синапсин при возникновении синаптической активности подвергается комплексному фосфорилированию [39, 53, 102] (рис. 2). Фосфорилирование с помощью кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMK II) вызывает переход белка (LLPT) из состояния жидкой фазы в растворимую форму, позволяя синаптическим везикулам мигрировать в активную зону пресинапса [39]. Дефосфорилирование BAR-белков кальций/кальмодулин-зависимой фосфатазой — кальциневрином (CaN) при этом переводит их в активное состояние, способствующее переходу в активную и затем в периактивную зоны [53, 54, 66, 91].

Экзоцитоз. Исследования последних лет позволяют предполагать участие BAR-доменов-содержащих белков в различных этапах экзоцитоза в пресинапсе, включая формирование поры при слиянии везикул с пресинаптической мембраной. Так, повышенная экспрессия эндофилина увеличивает вероятность высвобождения нейромедиатора [103]. На примере глутаматергических нейронов коры головного мозга крысы было показано, что взаимодействие эндофилина A1 с везикулярным транспортером глутамата VGLUT1 снижает эффективность экзоцитоза [97]. В основе этого взаимодействия лежит сродство пролин-богатой последовательности VGLUT1 к SH3-домену эндофилина A1. Таким образом, VGLUT1

связывает мономеры эндофилина A1, снижая количество “активного” эндофилина на поверхности мембраны везикул, участвующих в синаптическом цикле.

Кроме того, взаимодействие SH3-домена эндофилина может являться важным фактором в процессе положительной регуляции экзоцитоза. Так, синаптический скаффолд-белок интерсектин связывается с эндофилином в результате взаимодействия их SH3-доменов [104]. Предполагается, что эндофилин-интерсектиновый комплекс играет важную роль в экзоцитозе. Подтверждение этой гипотезы было получено в работе на хромаффинных клетках надпочечников, которые используют везикулы, подобные таковым в синапсах, для секреции биологически активных молекул. Было показано, что эндофилины A1 и A2 действуют в тандеме с интерсектином, увеличивая вероятность выделения медиатора [105]. Была выдвинута гипотеза, что механизм такой стимуляции осуществляется через взаимодействие интерсектина с белками SNARE, которое регулируется эндофилином. Требуются дополнительные исследования, чтобы подтвердить, работает ли данный механизм в межнейронных синапсах.

Вероятная роль амфифизина 1 в экзоцитозе была показана на синапсосомах, изолированных из мозга мышей. В экспериментах по оценке эффективности выделения флуоресцентного красителя, загруженного в везикулы, было выявлено, что в случае нокаута по гену амфифизина 1 (при котором также наблюдается пониженная экспрессия амфифизина 2) интенсивность экзоцитоза существенно снижается по сравнению с диким типом [55]. Также участие амфифизина 1 в экзоцитозе получило подтверждение в модельных экспериментах со слиянием везикул с пресинаптической мембраной в нейроэндокринных клетках. Это исследование указало на непосредственное рекрутирование амфифизина 1 в зону слияния везикул [106].

Олигофренин 1 является еще одним BAR-белком, роль которого связана с регуляцией экзоцитоза в центральных синапсах. Опыты на гиппокампальных культурах нейронов мышей показали, что данный белок повышает вероятность слияния синаптических везикул с мембраной [107]. Кроме того, предполагается, что он играет роль в сопряжении процессов экзо- и эндоцитоза. С одной стороны, олигофренин 1 инактивирует сигнальный путь RhoA/ROCK, который, в свою очередь, подавляет эндоцитоз посредством фосфорилирования эндофилина [77]. С другой стороны, PRD-участок олигофренина 1 непосредственно взаимодействует с SH3-доменом эндофилина A1, и

нарушение этого взаимодействия при мутациях в PRD-домене олигофренина 1 приводит к замедлению рециркуляции синаптических везикул [78]. Молекулярный механизм, лежащий в основе этого явления, был недавно подробно проанализирован [108]. Было высказано предположение, что олигофренин 1 связан с образованием поры при слиянии везикулы с пресинаптической мембраной через GAP-домен и контролирует последующий захват мембраны везикул при помощи BAR-домена. Таким образом, белок обеспечивает пространственное и временное сопряжение экзоцитоза и эндоцитоза.

Эндоцитоз. При восстановлении синаптических везикул в периактивной зоне белковые комплексы, участвующие в различных формах эндоцитоза, вновь формируют жидкую фазу (рис. 2). Как уже упоминалось, одним из ключевых механизмов восстановления синаптических везикул является клатрин-зависимый эндоцитоз, который инициируется на участках пресинаптической мембраны, насыщенных фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатом ($PI(4,5)P_2$). Эндоцитоз протекает в несколько стадий, в результате которых синаптическая везикула отпочковывается от мембраны. BAR-белки являются ключевыми участниками этого процесса. Ряд исследований позволяет предполагать, что некоторые F-BAR-белки могут постоянно присутствовать в периактивной зоне и рекрутироваться к местам эндоцитоза комплексами белков, связанными с везикулярной мембраной, насыщенной $PI(4,5)P_2$ [46, 109]. Первыми среди F-BAR-белков к области формирования будущего пузырька рекрутируются белки FCHo1/2, которые в свою очередь привлекают к сайту эндоцитоза белки eps15 и интерсектин [110]. Исследования *in vitro* показали, что гомодимеры FCHo2 формируют на поверхности мембраны кольцеобразные структуры, сопоставимые по размерам с сайтами клатрин-зависимого эндоцитоза, что способствует кластеризации молекул $PI(4,5)P_2$ [111]. Кроме того, линкерный участок FCHo1/2 способен взаимодействовать с адаптерным белком AP2, что также приводит к его кластеризации в составе мембраны и дестабилизации его закрытой конформации. После этого $PI(4,5)P_2$, а также клатрин и другие эндоцитозные белки начинают конкурировать с FCHo1/2 за связывание с AP2, что ведет к переходу адаптерного белка в открытую конформацию и запуску последующих этапов эндоцитоза [112]. Предполагается, что жидкая фаза может формироваться на самых начальных этапах сборки клатрин-окаймленной ямки [45].

Эндофилин и амфифизин рекрутируются в зону формирования клатрин-окаймленной ямки

уже на ранних стадиях эндоцитоза [113]. Так, введение антител против эндофилина введет к остановке эндоцитоза в периактивной зоне в гигантском аксоне миноги на начальных стадиях инвагинации мембраны клатрин-окаймленной ямки [114], а введение антител против CLAP-домена амфифизина – к нарушениям формы клатриновых пузырьков, что также указывает на нарушение сборки клатриновой оболочки на ранних стадиях [59].

Эксперименты, проведенные на живых организмах, и модельные эксперименты с использованием липосом *in vitro* показали активное участие N-BAR-белков эндофилина A1 и амфифизина 1/2 на стадиях отпочковывания везикул от мембраны и снятия клатриновой оболочки [53, 54]. Например, при нарушении взаимодействия амфифизина с динамином в гигантском синапсе миноги в результате введения SH3-домена амфифизина происходит накопление сокращенных клатрин-окаймленных ямок в периактивной зоне [20]. В то же время, при избыточной экспрессии SH3-доменов эндофилина в пресинапсе, наряду с аккумуляцией сокращенных клатрин-окаймленных ямок вокруг активной зоны, также обнаруживаются многочисленные везикулы, покрытые клатриновой оболочкой [115]. Тройной нокаут генов эндофилина A1–A3 у мышей также приводит к накоплению клатрин-окаймленных везикул в аксоплазме [116]. Эндофилин имеет средство как к динамину, так и к синаптоянину, участвующему в процессе снятия клатриновой оболочки с везикул [19, 116]. Вместе эти данные указывают на решающую роль амфифизина на стадиях подготовки к срезанию клатрин-окаймленной ямки с поверхности мембраны, а эндофилина – в рекрутировании синаптоянина и последующем снятии клатриновой оболочки у вновь сформированных везикул.

Амфифизин взаимодействует с пролин-богатым участком динамина с помощью SH3-домена, рекрутируя GTP-азу для полимеризации вокруг шейки клатрин-окаймленной ямки для последующего отпочковывания везикулы от мембраны [20, 53]. Это происходит в результате механохимической активности динамина [117]. После отпочковывания везикулы происходит быстрое снятие ее клатриновой оболочки. В этом процессе участвует полиинозитолфосфатаза синаптоянин [53, 118]. Синаптоянин рекрутируется SH3-доменом эндофилина и осуществляет гидролиз $PI(4,5)P_2$ до $PI4P$, вследствие чего происходит отсоединение всех адаптерных белков с поверхности пузырька, и создается платформа для рекру-

тирования ауксина и других молекул, участвующих в разборке клатриновой оболочки [53, 119].

Недавнее исследование также показало, что интерсектин через SH3–SH3-взаимодействие рекрутирует в основание клатрин-окаймленной ямки F-BAR-белок FCHSD2, который связывается с плоскими участками мембраны в основании ямки, и запускает полимеризацию актина, опосредованную активацией N-WASP и Arp2/3. Предположительно, полимеризация актина, направленная от основания ямки к клатриновой оболочке будущей везикулы, облегчает протекание финальных этапов клатрин-опосредованного эндоцитоза [86]. Важно отметить, что гомолог этого белка в нервно-мышечных синапсах дрозофилы, Nervous Wreck (NWK), локализуется исключительно в периактивной зоне в процессе синаптического цикла, что позволяет предполагать аналогичную локализацию FCHSD2 в центральных синапсах [86]. Нарушение рекрутирования NWK к местам сборки везикул приводит к нарушению размера пузырьков, что указывает на важную роль этого F-BAR-белка уже на ранних стадиях эндоцитоза [120].

BAR-белки участвуют также в других неклассических сценариях эндоцитоза. Так, было показано, что эндофилин А вовлечен в рециркуляцию синаптических везикул посредством сверхбыстрого эндоцитоза (ultrafast endocytosis) [28–30] и быстрого эндофилин-опосредованного эндоцитоза (fast endophilin-mediated endocytosis – FEME) [121–123, обзор 124]. Кроме того, было обнаружено участие в сверхбыстром эндоцитозе синдапина 1, который, как показали эксперименты на первичных культурах нейронов и с изолированными белками, выступает в качестве адаптера между пресинаптической мембраной и молекулами сплайс-изоформы динамина Dyn1xA с образованием белкового конденсата, или жидкой фазы. Предполагается, что таким образом происходит подготовительное локальное накопление динамина в зоне эндоцитоза, что ускоряет кинетику процесса [46].

Синдапин 1 также играет важнейшую роль в процессе bulk-эндоцитоза. В экспериментах на гигантских аксонах миноги, а также на первичных культурах нейронов млекопитающих, было продемонстрировано, что для протекания bulk-эндоцитоза необходимо не только присутствие функционально активного синдапина, но и его взаимодействие с динамином 1 [82, 94]. Условием этого взаимодействия является дефосфорилирование динамина 1 со стороны Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой фосфатазы кальциневрина [125]. Блокирование взаимодействия кальциневрина с

динамином 1 приводит к нарушению формирования синаптических везикул на поверхности bulk-эндосом и невозможности восстановления резервного пула [126].

Формирование пресинаптического кластера везикул. Есть основания полагать, что после отпочковывания везикул от пресинаптической мембраны и снятия клатриновой оболочки такие белки, как эндофилин и амфифизин, остаются на поверхности везикул (рис. 2). Не исключено, что синдапин попадает в кластер с везикулами большего диаметра, образованными в процессе клатрин-независимого эндоцитоза [46]. Интересным свойством SH3-доменов эндофилина, амфифизина и синдапина является способность взаимодействовать с синапсином [127–129]. Эти взаимодействия могут способствовать увеличению локальной концентрации синапсина на поверхности вновь сформированных везикул для последующего перехода синапсина в жидкую фазу. Четких подтверждений роли BAR-белков в восстановлении кластера везикул при синаптической активности в настоящее время нет. Требуются дальнейшие исследования для выяснения детальных механизмов участия этих белков. В поддержку нашей гипотезы говорят эксперименты, в которых нокаут генов эндофилина сопровождается уменьшением размеров кластеров синаптических везикул в синапсах [116], однако этому могут быть и другие объяснения, связанные, например, с нарушениями работы эндоцитоза. Выключение генов амфифизина 1 и синдапина 1 существенно не влияют на организацию кластеров синаптических везикул в нервных окончаниях [55, 130]. Не исключено, что функции белков дублируются, поскольку на этом этапе секреторного цикла работают и другие пресинаптические молекулы. Функцию концентрации синапсина у активной зоны пресинапса выполняет, например, скаффолд-белок интерсектин, который имеет кассету из SH3-доменов и может образовывать мультимерные комплексы, связывающие синапсин [39, 40, 101, 131]. Биохимические опыты показали, что в случае интерсектина взаимодействие с синапсином возможно только в условиях, стимулирующих фосфорилирование белков. Это позволяет предположить, что синапсин связывается с SH3-доменами в фосфорилированном состоянии [101, 131].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Научные эксперименты, проведенные в последние годы, указывают на то, что BAR-белки участвуют в работе синаптического секреторного цикла на многих его этапах. Способность некото-

рых синаптических белков претерпевать фазовый переход из раствора в жидкую фазу с особыми свойствами коренным образом изменила наши представления о принципах работы синаптического секреторного цикла. Целый ряд гипотез, высказанных в данном обзоре, требует дополнительного подтверждения. Следует отметить, что функции BAR-белков в нервных окончаниях не ограничиваются циклом синаптических везикул. Так, показано участие эндофилинов в аутофагии и модификациях митохондриальной мембраны [71, 72, 132–134]. Амфифизины и NWK/FCHCD2 могут участвовать в сопряжении мембранных процессов с перестройкой цитоскелета [86, 109, 135, 136]. Новые данные указывают на участие LLPTs и в этих процессах [137–139]. Дальнейшие исследования роли LLPTs в центральных синапсах будут способствовать более широкому пониманию клеточных механизмов, обеспечивающих передачу сигналов в нервных окончаниях, и потенциальных источников развития патологий в центральной нервной системе.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-15-00227) и Шведского Совета по научным исследованиям (The Swedish research Council, grants 2020-01731, 2020-01952), а также грантов СПбГУ (ID 93026594) и Шведского фонда исследований мозга (Hjärnfonden).

Соответствие принципам этики. Все работы, цитируемые в обзоре, выполнены с соблюдением международных, национальных и/или институциональных принципов ухода и использования животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sakamuro D., Elliott K.J., Wechsler-Reya R., Prendergast G.C. 1996. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat. Genet.* **14**, 69–77.
- Lichte B., Veh R.W., Meyer H.E., Kilimann M.W. 1992. Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *EMBO J.* **11**, 2521–2530.
- Sivadon P., Bauer F., Aigle M., Crouzet M. 1995. Actin cytoskeleton and budding pattern are altered in the yeast rvs161 mutant: The Rvs161 protein shares common domains with the brain protein amphiphysin. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 485–495.
- Nishimura T., Morone N., Suetsugu S. 2018. Membrane re-modelling by BAR domain superfamily proteins via molecular and non-molecular factors. *Biochem. Soc. Trans.* **46**, 379–389.
- Itoh T., De Camilli P. 2006. BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim. Biophys. Acta.* **1761**, 897–912.
- Frost A., Unger V.M., De Camilli P. 2009. The BAR domain superfamily: Membrane-molding macromolecules. *Cell.* **137**, 191–196.
- Peter B.J., Kent H.M., Mills I.G., Vallis Y., Butler P.J., Evans P.R., McMahon H.T. 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: The amphiphysin BAR structure. *Science.* **303**, 495–499.
- Weissenhorn W. 2005. Crystal structure of the endophilin-A1 BAR domain. *J. Mol. Biol.* **351**, 653–661.
- Gallop J.L., Jao C.C., Kent H.M., Butler P.J., Evans P.R., Langen R., McMahon H.T. 2006. Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J.* **25**, 2898–2910.
- Itoh T., Erdmann K.S., Roux A., Habermann B., Werner H., De Camilli P. 2005. Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Curr. Biol.* **9**, 791–804.
- Frost A., De Camilli P., Unger V.M. 2007. F-BAR proteins join the BAR family fold. *Structure.* **15**, 751–753.
- Ahmed S., Goh W.I., Bu W. 2010. I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **21**, 350–356.
- Zhao H., Pykalainen A., Lappalainen P. 2011. I-BAR domain proteins: Linking actin and plasma membrane dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 14–21.
- Chatzi C., Westbrook G. L. 2021. Revisiting I-BAR proteins at central synapses. *Front. Neural Circuits.* **15**, 787436.
- Takei K., Slepnev V.I., Haucke V., De Camilli P. 1999. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell. Biol.* **1**, 33–39.
- Farsad K., Ringstad N., Takei K., Floyd S.R., Rose K., De Camilli P. 2001. Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J. Cell. Biol.* **155**, 193–200.
- Richnau N., Fransson A., Farsad K., Aspenstrom P. 2004. RICH-1 has a BIN/Amphiphysin/Rvsp domain responsible for binding to membrane lipids and tubulation of liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1034–1042.
- Carman P.J., Dominguez R. 2018. BAR domain proteins—a linkage between cellular membranes, signaling pathways, and the actin cytoskeleton. *Biophys. Rev.* **10**, 1587–1604.
- Ringstad N., Nemoto Y., De Camilli P. 1997. The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: Binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 8569–8574.
- Shupliakov O., Low P., Grabs D., Gad H., Chen H., David C., Takei K., De Camilli P., Brodin L. 1997.

- Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science*. **276**, 259–263.
21. Kelley C.F., Messelaar E.M., Eskin T.L., Wang S., Song K., Vishnia K., Becalska A.N., Shupliakov O., Hagan M.F., Danino D., Sokolova O.S., Nicastro D., Rodal A.A. 2015. Membrane charge directs the outcome of F-BAR domain lipid binding and autoregulation. *Cell Rep.* **13**, 2597–2609.
 22. Kojima C., Hashimoto A., Yabuta I., Hirose M., Hashimoto S., Kanaho Y., Sumimoto H., Ikegami T., Sabe H. 2004. Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *EMBO J.* **23**, 4413–4422.
 23. Chen Z., Chang K., Capraro B.R., Zhu C., Hsu C.J., Baumgart T. 2014. Intradimer/intermolecular interactions suggest autoinhibition mechanism in endophilin A1. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 4557–4564.
 24. Rizzoli S.O., Betz W.J. 2005. Synaptic vesicle pools. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 57–69.
 25. Roos J., Kelly R.B. 1999. The endocytic machinery in nerve terminals surrounds sites of exocytosis. *Curr. Biol.* **9**, 1411–1414.
 26. Maycox P.R., Link E., Reetz A., Morris S.A., Jahn R. 1992. Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling. *J. Cell. Biol.* **118**, 1379–1388.
 27. Granseth B., Odermatt B., Royle S.J., Lagnado L. 2006. Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron*. **51**, 773–786.
 28. Watanabe S., Liu Q., Davis M.W., Hollopeter G., Thomas N., Jorgensen N.B., Jorgensen E.M. 2013. Ultrafast endocytosis at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *Elife*. **2**, e00723.
 29. Watanabe S., Rost B.R., Camacho-Perez M., Davis M.W., Sohl-Kielczynski B., Rosenmund C., Jorgensen E.M. 2013. Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*. **504**, 242–247.
 30. Watanabe S., Mamer L.E., Raychaudhuri S., Luvsanjav D., Eisen J., Trimbuch T., Sohl-Kielczynski B., Fenske P., Milosevic I., Rosenmund C., Jorgensen E.M. 2018. Synaptojanin and endophilin mediate neck formation during ultrafast endocytosis. *Neuron*. **98**, 1184–1197.e6.
 31. Shin W., Wei L., Arpino G., Ge L., Guo X., Chan C.Y., Hamid E., Shupliakov O., Bleck C.K.E., Wu L.G. 2021. Preformed omega-profile closure and kiss-and-run mediate endocytosis and diverse endocytic modes in neuroendocrine chromaffin cells. *Neuron*. **109**, 3119–3134.
 32. Wu W., Wu L. G. 2007. Rapid bulk endocytosis and its kinetics of fission pore closure at a central synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 10234–10239.
 33. Cousin M.A., Nicholls D.G. 1997. Synaptic vesicle recycling in cultured cerebellar granule cells: Role of vesicular acidification and refilling. *J. Neurochem.* **69**, 1927–1935.
 34. Cousin M.A., Robinson P.J. 1999. Mechanisms of synaptic vesicle recycling illuminated by fluorescent dyes. *J. Neurochem.* **73**, 2227–2239.
 35. Rizzoli S. O. 2014. Synaptic vesicle recycling: Steps and principles. *EMBO J.* **33**, 788–822.
 36. Banani S.F., Lee H.O., Hyman A.A., Rosen M.K. 2017. Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **18**, 285–298.
 37. Shin Y., Brangwynne C.P. 2017. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*. **357**
 38. McDonald N.A., Fetter R.D., Shen K. 2020. Assembly of synaptic active zones requires phase separation of scaffold molecules. *Nature*. **588**, 454–458.
 39. Milovanovic D., Wu Y., Bian X., De Camilli P. 2018. A liquid phase of synapsin and lipid vesicles. *Science*. **361**, 604–607.
 40. Pechstein A., Tomilin N., Fredrich K., Vorontsova O., Sopova E., Evergren E., Haucke V., Brodin L., Shupliakov O. 2020. Vesicle clustering in a living synapse depends on a synapsin region that mediates phase separation. *Cell Rep.* **30**, 2594–2602.e3.
 41. Wang S.S.H., Held R.G., Wong M.Y., Liu C., Karakhanyan A., Kaeser P.S. 2016. Fusion Competent synaptic vesicles persist upon active zone disruption and loss of vesicle docking. *Neuron*. **91**, 777–791.
 42. Wu X., Cai Q., Shen Z., Chen X., Zeng M., Du S., Zhang M. 2019. RIM and RIM-BP form presynaptic active-zone-like condensates via phase separation. *Mol. Cell*. **73**, 971–984.e5.
 43. Emperador-Melero J., Wong M.Y., Wang S.S.H., de Nola G., Nyitrai H., Kirchhausen T., Kaeser P.S. 2021. PKC-phosphorylation of Liprin-alpha3 triggers phase separation and controls presynaptic active zone structure. *Nat. Commun.* **12**, 3057.
 44. Liang M., Jin G., Xie X., Zhang W., Li K., Niu F., Yu C., Wei Z. 2021. Oligomerized liprin-alpha promotes phase separation of ELKS for compartmentalization of presynaptic active zone proteins. *Cell Rep.* **34**, 108901.
 45. Day K.J., Kago G., Wang L., Richter J.B., Hayden C.C., Lafer E.M., Stachowiak J.C. 2021. Liquid-like protein interactions catalyse assembly of endocytic vesicles. *Nat. Cell. Biol.* **23**, 366–376.
 46. Imoto Y., Raychaudhuri S., Ma Y., Fenske P., Sandoval E., Itoh K., Blumrich E.M., Matsubayashi H.T., Mamer L., Zarebidaki F., Sohl-Kielczynski B., Trimbuch T., Nayak S., Iwasa J.H., Liu J., Wu B., Ha T., Inoue T., Jorgensen E.M., Cousin M.A., Rosenmund C., Watanabe S. 2022. Dynamin is primed at endocytic sites for ultrafast endocytosis. *Neuron*. **110**, 2815–2835.e13.
 47. Wu X., Ganzella M., Zhou J., Zhu S., Jahn R., Zhang M. 2021. Vesicle tethering on the surface of phase-separated active zone condensates. *Mol. Cell*. **81**, 13–24.e7.
 48. Alberti S. 2017. Phase separation in biology. *Curr. Biol.* **27**, R1097–R1102.

49. Krabben L., Fassio A., Bhatia V.K., Pechstein A., Onofri F., Fadda M., Messa M., Rao Y., Shupliakov O., Stamou D., Benfenati F., Haucke V. 2011. Synapsin I senses membrane curvature by an amphipathic lipid packing sensor motif. *J. Neurosci.* **31**, 18149–18154.
50. Park D., Wu Y., Lee S.E., Kim G., Jeong S., Milovanovic D., De Camilli P., Chang S. 2021. Cooperative function of synaptophysin and synapsin in the generation of synaptic vesicle-like clusters in non-neuronal cells. *Nat. Commun.* **12**, 263.
51. Boeynaems S., Alberti S., Fawzi N.L., Mittag T., Polymenidou M., Rousseau F., Schymkowitz J., Shorter J., Wolozin B., Van Den Bosch L., Tompa P., Fuxreiter M. 2018. Protein phase separation: A new phase in cell biology. *Trends Cell. Biol.* **28**, 420–435.
52. Ghosh A., Mazarakos K., Zhou H.X. 2019. Three archetypical classes of macromolecular regulators of protein liquid-liquid phase separation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **116**, 19474–19483.
53. Saheki Y., De Camilli P. 2012. Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a005645.
54. Chanaday N.L., Cousin M.A., Milosevic I., Watanabe S., Morgan J.R. 2019. The synaptic vesicle cycle revisited: New insights into the modes and mechanisms. *J. Neurosci.* **39**, 8209–8216.
55. Di Paolo G., Sankaranarayanan S., Wenk M.R., Daniell L., Perucco E., Caldarone B.J., Flavell R., Piccioletto M.R., Ryan T.A., Cremona O., De Camilli P. 2002. Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron.* **33**, 789–804.
56. Slepnev V.I., Ochoa G.C., Butler M.H., De Camilli P. 2000. Tandem arrangement of the clathrin and AP-2 binding domains in amphiphysin 1 and disruption of clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites. *J. Biol. Chem.* **275**, 17583–17589.
57. Cowling B.S., Prokic I., Tasfaout H., Rabai A., Humbert F., Rinaldi B., Nicot A. S., Kretz C., Friant S., Roux A., Laporte J. 2017. Amphiphysin (BIN1) negatively regulates dynamin 2 for normal muscle maturation. *J. Clin. Invest.* **127**, 4477–4487.
58. Prokic I., Cowling B.S., Laporte J. 2014. Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J. Mol. Med. (Berl.)*. **92**, 453–463.
59. Evergren E., Marcucci M., Tomilin N., Low P., Slepnev V., Andersson F., Gad H., Brodin L., De Camilli P., Shupliakov O. 2004. Amphiphysin is a component of clathrin coats formed during synaptic vesicle recycling at the lamprey giant synapse. *Traffic.* **5**, 514–528.
60. Arkhipov A., Yin Y., Schulten K. 2009. Membrane-bending mechanism of amphiphysin N-BAR domains. *Biophys. J.* **97**, 2727–2735.
61. Loll P.J., Swain E., Chen Y., Turner B.T., Zhang J.F. 2008. Structure of the SH3 domain of rat endophilin A2. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **64**, 243–246.
62. Wigge P., McMahon H.T. 1998. The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci.* **21**, 339–344.
63. Farsad K., Slepnev V., Ochoa G., Daniell L., Haucke V., De Camilli P. 2003. A putative role for intramolecular regulatory mechanisms in the adaptor function of amphiphysin in endocytosis. *Neuropharmacology.* **45**, 787–796.
64. Tomizawa K., Sunada S., Lu Y.F., Oda Y., Kinuta M., Ohshima T., Saito T., Wei F. Y., Matsushita M., Li S.T., Tsutsui K., Hisanaga S., Mikoshiba K., Takei K., Matsui H. 2003. Cophosphorylation of amphiphysin I and dynamin I by Cdk5 regulates clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. *J. Cell. Biol.* **163**, 813–824.
65. Micheva K.D., Ramjaun A.R., Kay B.K., McPherson P.S. 1997. SH3 domain-dependent interactions of endophilin with amphiphysin. *FEBS Lett.* **414**, 308–312.
66. Bauerfeind R., Takei K., De Camilli P. 1997. Amphiphysin I is associated with coated endocytic intermediates and undergoes stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J. Biol. Chem.* **272**, 30984–30992.
67. Giachino C., Lantelme E., Lanzetti L., Saccone S., Bella Valle G., Migone N. 1997. A novel SH3-containing human gene family preferentially expressed in the central nervous system. *Genomics.* **41**, 427–434.
68. So C.W., Sham M.H., Chew S.L., Cheung N., So C.K., Chung S.K., Caldas C., Wiedemann L.M., Chan L.C. 2000. Expression and protein-binding studies of the EEN gene family, new interacting partners for dynamin, synaptojanin and huntingtin proteins. *Biochem. J.* **348**, Pt 2, 447–458.
69. Kjaerulff O., Brodin L., Jung A. 2011. The structure and function of endophilin proteins. *Cell Biochem. Biophys.* **60**, 137–154.
70. Pierrat B., Simonen M., Cueto M., Mestan J., Ferrigno P., Heim J. 2001. SH3GLB, a new endophilin-related protein family featuring an SH3 domain. *Genomics.* **71**, 222–234.
71. Soukup S.F., Verstreken P. 2017. EndoA/endophilin-A creates docking stations for autophagic proteins at synapses. *Autophagy.* **13**, 971–972.
72. Hernandez-Diaz S., Ghimire S., Sanchez-Mirasierra I., Montecinos-Oliva C., Swerts J., Kuenen S., Verstreken P., Soukup S.F. 2022. Endophilin-B regulates autophagy during synapse development and neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **163**, 105595.
73. Ambroso M.R., Hegde B.G., Langen R. 2014. Endophilin A1 induces different membrane shapes using a conformational switch that is regulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 6982–6987.
74. Matta S., Van Kolen K., da Cunha R., van den Bogaart G., Mandemakers W., Miskiewicz K., De Bock P.J., Morais V.A., Vilain S., Haddad D., Delbroek L., Swerts J., Chavez-Gutierrez L., Esposito G., Daneels G., Karran E., Holt M., Gevaert K.,

- Moechars D.W., De Strooper B., Verstreken P. 2012. LRRK2 controls an EndoA phosphorylation cycle in synaptic endocytosis. *Neuron*. **75**, 1008–1021.
75. Vazquez F.X., Unger V.M., Voth G.A. 2013. Autoinhibition of endophilin in solution via interdomain interactions. *Biophys. J.* **104**, 396–403.
76. Billuart P., Bienvenu T., Ronce N., des Portes V., Vinet M.C., Zemni R., Roest Crollius H., Carrie A., Fauchereau F., Cherry M., Briault S., Hamel B., Fryns J.P., Beldjord C., Kahn A., Moraine C., Chelly J. 1998. Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature*. **392**, 923–926.
77. Khelifaoui M., Pavlowsky A., Powell A.D., Valnegri P., Cheong K.W., Blandin Y., Passafaro M., Jefferys J.G., Chelly J., Billuart P. 2009. Inhibition of RhoA pathway rescues the endocytosis defects in Oligophrenin1 mouse model of mental retardation. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2575–2583.
78. Nakano-Kobayashi A., Kasri N.N., Newey S.E., Van Aelst L. 2009. The Rho-linked mental retardation protein OPHN1 controls synaptic vesicle endocytosis via endophilin A1. *Curr. Biol.* **19**, 1133–1139.
79. Govek E.E., Newey S.E., Akerman C.J., Cross J.R., Van der Veken L., Van Aelst L. 2004. The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat. Neurosci.* **7**, 364–372.
80. Kessels M.M., Qualmann B. 2004. The syndapin protein family: Linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* **117**, 3077–3086.
81. Wang Q., Navarro M.V., Peng G., Molinelli E., Goh S.L., Judson B.L., Rajashankar K.R., Sondermann H. 2009. Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pascin/Syndapin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 12700–12705.
82. Rao Y., Ma Q., Vahedi-Faridi A., Sundborger A., Pechstein A., Puchkov D., Luo L., Shupliakov O., Saenger W., Haucke V. 2010. Molecular basis for SH3 domain regulation of F-BAR-mediated membrane deformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 8213–8218.
83. Quan A., Robinson P.J. 2013. Syndapin—a membrane remodelling and endocytic F-BAR protein. *FEBS J.* **280**, 5198–5212.
84. Katoh M., Katoh M. 2004. Identification and characterization of human FCHO2 and mouse Fcho2 genes in silico. *Int. J. Mol. Med.* **14**, 327–331.
85. Uhlen M., Fagerberg L., Hallstrom B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson A., Kampf C., Sjostedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szgyarto C. A., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J.O., Hober S., Alm T., Edqvist P.H., Berling H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J.M., Hamsten M., von Feilitzen K., Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Ponten F. 2015. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. **347**, 1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
86. Almeida-Souza L., Frank R.A. W., Garcia-Nafria J., Colussi A., Gunawardana N., Johnson C.M., Yu M., Howard G., Andrews B., Vallis Y., McMahon H.T. 2018. A flat BAR protein promotes actin polymerization at the base of clathrin-coated pits. *Cell*. **174**, 325–337.e14.
87. Fagerberg L., Hallstrom B.M., Oksvold P., Kampf C., Djureinovic D., Odeberg J., Habuka M., Tahmasebpour S., Danielsson A., Edlund K., Asplund A., Sjostedt E., Lundberg E., Szgyarto C.A., Skogs M., Takanen J.O., Berling H., Tegel H., Mulder J., Nilsson P., Schwenk J.M., Lindskog C., Danielsson F., Mardinoglu A., Sivertsson A., von Feilitzen K., Forsberg M., Zwahlen M., Olsson I., Navani S., Huss M., Nielsen J., Ponten F., Uhlen M. 2014. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*. **13**, 397–406.
88. Reider A., Barker S.L., Mishra S.K., Im Y.J., Maldonado-Baez L., Hurley J.H., Traub L.M., Wendland B. 2009. Syp1 is a conserved endocytic adaptor that contains domains involved in cargo selection and membrane tubulation. *EMBO J.* **28**, 3103–3116.
89. Henne W.M., Kent H.M., Ford M.G., Hegde B.G., Daumke O., Butler P.J., Mittal R., Langen R., Evans P.R., McMahon H. T. 2007. Structure and analysis of FCHO2 F-BAR domain: A dimerizing and membrane recruitment module that effects membrane curvature. *Structure*. **15**, 839–852.
90. Brodin L., Milovanovic D., Rizzoli S.O., Shupliakov O. 2022. alpha-Synuclein in the synaptic vesicle liquid phase: Active player or passive bystander? *Front. Mol. Biosci.* **9**, 891508.
91. Shupliakov O. 2009. The synaptic vesicle cluster: A source of endocytic proteins during neurotransmitter release. *Neuroscience*. **158**, 204–210.
92. Bai J., Hu Z., Dittman J.S., Pym E.C., Kaplan J.M. 2010. Endophilin functions as a membrane-bending molecule and is delivered to endocytic zones by exocytosis. *Cell*. **143**, 430–441.
93. Denker A., Krohnert K., Buckers J., Neher E., Rizzoli S.O. 2011. The reserve pool of synaptic vesicles acts as a buffer for proteins involved in synaptic vesicle recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 17183–17188.
94. Andersson F., Jakobsson J., Low P., Shupliakov O., Brodin L. 2008. Perturbation of syndapin/PACSIN impairs synaptic vesicle recycling evoked by intense stimulation. *J. Neurosci.* **28**, 3925–3933.
95. Haffner C., Takei K., Chen H., Ringstad N., Hudson A., Butler M.H., Salcini A.E., Di Fiore P.P., De Camilli P. 1997. Synaptojanin 1: Localization on coated endocytic intermediates in nerve terminals and interaction of its 170 kDa isoform with Eps15. *FEBS Lett.* **419**, 175–180.
96. Evergren E., Gad H., Walther K., Sundborger A., Tomilin N., Shupliakov O. 2007. Intersectin is a nega-

- tive regulator of dynamin recruitment to the synaptic endocytic zone in the central synapse. *J. Neurosci.* **27**, 379–390.
97. De Gois S., Jeanclos E., Morris M., Grewal S., Varoqui H., Erickson J.D. 2006. Identification of endophilins 1 and 3 as selective binding partners for VGLUT1 and their co-localization in neocortical glutamatergic synapses: Implications for vesicular glutamate transporter trafficking and excitatory vesicle formation. *Cell Mol. Neurobiol.* **26**, 679–693.
 98. Willet A.H., Igarashi M.G., Chen J.S., Bhattacharjee R., Ren L., Cullati S.N., Elmore Z.C., Roberts-Galbraith R.H., Johnson A.E., Beckley J.R., Gould K.L. 2021. Phosphorylation in the intrinsically disordered region of F-BAR protein Imp2 regulates its contractile ring recruitment. *J. Cell. Sci.* **134** (16), jcs258645.
 99. Su M., Zhuang Y., Miao X., Zeng Y., Gao W., Zhao W., Wu M. 2020. Comparative study of curvature sensing mediated by F-BAR and an intrinsically disordered region of FBP17. *iScience.* **23**, 101712.
 100. Mangione M.C., Snider C.E., Gould K.L. 2019. The intrinsically disordered region of the cytokinetic F-BAR protein Cdc15 performs a unique essential function in maintenance of cytokinetic ring integrity. *Mol. Biol. Cell.* **30**, 2790–2801.
 101. Winther A.M., Vorontsova O., Rees K.A., Nareoja T., Sopova E., Jiao W., Shupliakov O. 2015. An endocytic scaffolding protein together with synapsin regulates synaptic vesicle clustering in the drosophila neuromuscular junction. *J. Neurosci.* **35**, 14756–14770.
 102. Evergren E., Benfenati F., Shupliakov O. 2007. The synapsin cycle: A view from the synaptic endocytic zone. *J. Neurosci. Res.* **85**, 2648–2656.
 103. Weston M.C., Nehring R.B., Wojcik S.M., Rosenmund C. 2011. Interplay between VGLUT isoforms and endophilin A1 regulates neurotransmitter release and short-term plasticity. *Neuron.* **69**, 1147–1159.
 104. Pechstein A., Gerth F., Milosevic I., Japel M., Eichhorn-Grunig M., Vorontsova O., Bacetic J., Maritzen T., Shupliakov O., Freund C., Haucke V. 2015. Vesicle uncoating regulated by SH3-SH3 domain-mediated complex formation between endophilin and intersectin at synapses. *EMBO Rep.* **16**, 232–239.
 105. Gowrisankaran S., Houy S., Del Castillo J.G.P., Steubler V., Gelker M., Kroll J., Pinheiro P.S., Schwitters D., Halbsgut N., Pechstein A., van Weering J.R.T., Maritzen T., Haucke V., Raimundo N., Sorensen J.B., Milosevic I. 2020. Endophilin-A coordinates priming and fusion of neurosecretory vesicles via intersectin. *Nat. Commun.* **11**, 1266.
 106. Somasundaram A., Taraska J.W. 2018. Local protein dynamics during microvesicle exocytosis in neuroendocrine cells. *Mol. Biol. Cell.* **29**, 1891–1903.
 107. Khelifaoui M., Denis C., van Galen E., de Bock F., Schmitt A., Houbron C., Morice E., Giros B., Ramakers G., Fagni L., Chelly J., Nosten-Bertrand M., Billuart P. 2007. Loss of X-linked mental retardation gene oligophrenin1 in mice impairs spatial memory and leads to ventricular enlargement and dendritic spine immaturity. *J. Neurosci.* **27**, 9439–9450.
 108. Houy S., Estay-Ahumada C., Croise P., Calco V., Haerberle A.M., Bailly Y., Billuart P., Vitale N., Bader M.F., Ory S., Gasman S. 2015. Oligophrenin-1 connects exocytotic fusion to compensatory endocytosis in neuroendocrine cells. *J. Neurosci.* **35**, 11045–11055.
 109. Del Signore S.J., Kelley C.F., Messelaar E.M., Lemos T., Marchan M.F., Ermanoska B., Mund M., Fai T.G., Kaksonen M., Rodal A.A. 2021. An autoinhibitory clamp of actin assembly constrains and directs synaptic endocytosis. *Elife.* **10**, e69597.
 110. Henne W.M., Boucrot E., Meinecke M., Evergren E., Vallis Y., Mittal R., McMahon H.T. 2010. FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science.* **328**, 1281–1284.
 111. El Alaoui F., Casuso I., Sanchez-Fuentes D., Arpin-Andre C., Rathar R., Baecker V., Castro A., Lorca T., Viaud J., Vassilopoulos S., Carretero-Genevriev A., Picas L. 2022. Structural organization and dynamics of FCHo2 docking on membranes. *Elife.* **11**, e73156.
 112. Zaccai N.R., Kadlecova Z., Dickson V.K., Korobchevskaya K., Kamenicky J., Kovtun O., Uma-sankar P.K., Wrobel A.G., Kaufman J.G.G., Gray S.R., Qu K., Evans P.R., Fritzsche M., Sroubek F., Honing S., Briggs J.A.G., Kelly B.T., Owen D.J., Traub L.M. 2022. FCHO controls AP2's initiating role in endocytosis through a PtdIns(4,5)P2-dependent switch. *Sci. Adv.* **8**, eabn2018.
 113. Sundborger A., Soderblom C., Vorontsova O., Evergren E., Hinshaw J.E., Shupliakov O. 2011. An endophilin-dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *J. Cell. Sci.* **124**, 133–143.
 114. Ringstad N., Gad H., Low P., Di Paolo G., Brodin L., Shupliakov O., De Camilli P. 1999. Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron.* **24**, 143–154.
 115. Gad H., Ringstad N., Low P., Kjaerulf O., Gustafsson J., Wenk M., Di Paolo G., Nemoto Y., Crun J., Ellisman M.H., De Camilli P., Shupliakov O., Brodin L. 2000. Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron.* **27**, 301–312.
 116. Milosevic I., Giovedi S., Lou X., Raimondi A., Collesi C., Shen H., Paradise S., O'Toole E., Ferguson S., Cremona O., De Camilli P. 2011. Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron.* **72**, 587–601.
 117. Antony B., Burd C., De Camilli P., Chen E., Daumke O., Faelber K., Ford M., Frolov V.A., Frost A., Hinshaw J.E., Kirchhausen T., Kozlov M.M., Lenz M., Low H.H., McMahon H., Merrifield C., Pollard T.D., Robinson P.J., Roux A., Schmid S. 2016. Membrane

- fission by dynamin: What we know and what we need to know. *EMBO J.* **35**, 2270–2284.
118. Cao M., Wu Y., Ashrafi G., McCartney A.J., Wheeler H., Bushong E.A., Boassa D., Ellisman M.H., Ryan T.A., De Camilli P. 2017. Parkinson sac domain mutation in synaptojanin 1 impairs clathrin uncoating at synapses and triggers dystrophic changes in dopaminergic axons. *Neuron.* **93**, 882–896.e5.
 119. Massol R.H., Boll W., Griffin A.M., Kirchhausen T. 2006. A burst of auxilin recruitment determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 10265–10270.
 120. Shupliakov O., Akkuratova N., Korenkova O., Onochin K., Sopova E., Winther Å.M.E. 2020. Targeting of an F-BAR domain protein to the synaptic periaxonal zone ensures a uniform size of synaptic vesicles. *Eur. Neuropsychopharm.* **40**, 440–441.
 121. Boucrot E., Ferreira A.P., Almeida-Souza L., Debard S., Vallis Y., Howard G., Bertot L., Sauvonnnet N., McMahon H.T. 2015. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature.* **517**, 460–465.
 122. Renard H.F., Simunovic M., Lemiere J., Boucrot E., Garcia-Castillo M.D., Arumugam S., Chambon V., Lamaze C., Wunder C., Kenworthy A.K., Schmidt A.A., McMahon H.T., Sykes C., Bassereau P., Johannes L. 2015. Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature.* **517**, 493–496.
 123. Ferreira A.P.A., Casamento A., Roas S.C., Panambalana J., Subramaniam S., Schützenhofer K., Halff E.F., Wah Hak L.C., McGourty K., Kittler J.T., Thalassinou K., Martinvalet D., Boucrot E. 2021. Cdk5 and GSK3 β inhibit fast endophilin-mediated endocytosis. *Nat. Commun.* **12**, 2424.
 124. Casamento A., Boucrot E. 2020. Molecular mechanism of fast endophilin-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **477**, 2327–2345.
 125. Clayton E.L., Anggono V., Smillie K.J., Chau N., Robinson P.J., Cousin M.A. 2009. The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J. Neurosci.* **29**, 7706–7717.
 126. Cheung G., Cousin M.A. 2019. Synaptic vesicle generation from activity-dependent bulk endosomes requires a dephosphorylation-dependent dynamin-syndapin interaction. *J. Neurochem.* **151**, 570–583.
 127. Modregger J., Schmidt A.A., Ritter B., Huttner W.B., Plomann M. 2003. Characterization of endophilin B1b, a brain-specific membrane-associated lysophosphatidic acid acyl transferase with properties distinct from endophilin A1. *J. Biol. Chem.* **278**, 4160–4167.
 128. Qualmann B., Roos J., DiGregorio P.J., Kelly R.B. 1999. Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 501–513.
 129. Onofri F., Giovedi S., Kao H.T., Valtorta F., Bongiorno Borbone L., De Camilli P., Greengard P., Benfenati F. 2000. Specificity of the binding of synapsin I to Src homology 3 domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 29857–29867.
 130. Schneider K., Seemann E., Liebmann L., Ahuja R., Koch D., Westermann M., Hubner C.A., Kessels M.M., Qualmann B. 2014. ProSAP1 and membrane nanodomain-associated syndapin I promote postsynapse formation and function. *J. Cell. Biol.* **205**, 197–215.
 131. Gerth F., Japel M., Pechstein A., Kochlamazashvili G., Lehmann M., Puchkov D., Onofri F., Benfenati F., Nikonenko A. G., Fredrich K., Shupliakov O., Maritzen T., Freund C., Haucke V. 2017. Intersectin associates with synapsin and regulates its nanoscale localization and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 12057–12062.
 132. Takahashi Y., Meyerkord C.L., Wang H.G. 2009. Bif-1/endophilin B1: A candidate for crescent driving force in autophagy. *Cell Death Differ.* **16**, 947–955.
 133. Karbowski M., Jeong S.Y., Youle R.J. 2004. Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J. Cell. Biol.* **166**, 1027–1039.
 134. Yang Y., Chen J., Guo Z., Deng S., Du X., Zhu S., Ye C., Shi Y.S., Liu J.J. 2018. Endophilin A1 promotes actin polymerization in dendritic spines required for synaptic potentiation. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 177.
 135. Meunier B., Quaranta M., Daviet L., Hatzoglou A., Leprince C. 2009. The membrane-tubulating potential of amphiphysin 2/BIN1 is dependent on the microtubule-binding cytoplasmic linker protein 170 (CLIP-170). *Eur. J. Cell. Biol.* **88**, 91–102.
 136. Chapuis J., Hansmann F., Gistelinc M., Mounier A., Van Cauwenberghe C., Kolen K. V., Geller F., Sottejeau Y., Harold D., Dourlen P., Grenier-Boley B., Kamatani Y., Delepine B., Demiautte F., Zelenika D., Zommer N., Hamdane M., Bellenguez C., Dartigues J.F., Hauw J.J., Letronne F., Ayril A.M., Sleegers K., Schellens A., Broeck L.V., Engelborghs S., De Deyn P.P., Vandenberghe R., O'Donovan M., Owen M., Epelbaum J., Mercken M., Karran E., Bantscheff M., Drewes G., Joberty G., Campion D., Octave J.N., Berr C., Lathrop M., Callaerts P., Mann D., Williams J., Buee L., Dewachter I., Van Broeckhoven C., Amouyel P., Moechars D., Deraut B., Lambert J.C., GERAD consortium. 2013. Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol. Psychiatry.* **18**, 1225–1234.
 137. Noda N.N., Wang Z., Zhang H. 2020. Liquid-liquid phase separation in autophagy. *J. Cell. Biol.* **219**, e202004062.
 138. Fujioka Y., Alam J.M., Noshiro D., Mouri K., Ando T., Okada Y., May A.I., Knorr R.L., Suzuki K., Ohsumi Y., Noda N.N. 2020. Phase separation organizes the site of autophagosome formation. *Nature.* **578**, 301–305.
 139. La Cunza N., Tan L.X., Thamban T., Germer C.J., Rathnasamy G., Toops K.A., Lakkaraju A. 2021. Mitochondria-dependent phase separation of disease-relevant proteins drives pathological features of age-related macular degeneration. *JCI Insight.* **6**, e142254.

BAR Domain Proteins As Putative Regulators of the Protein Liquid Phase in Nerve Terminals in the Central Nervous System

A. G. Shishkov¹, N. V. Nifantova¹, O. M. Korenkova¹, E. S. Sopova^{1,2}, L. Brodin², O. Shupliakov^{1, 2, *}

¹*Institute of Translational Biomedicine, St.-Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia*

²*Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm, 17177 Sweden*

**e-mail: oleg.shupliakov@ki.se*

BAR proteins are key components of the synaptic vesicle cycle in nerve terminals. They participate in the regulation of neurotransmitter release during the fusion of synaptic vesicles with the presynaptic membrane and synaptic vesicle recycling. Localization of these proteins at sites of liquid–liquid phase separation in nerve terminals suggests additional functions of these molecules. In the current review, we discuss the tasks of BAR proteins at different stages of the secretory cycle, including their putative role in liquid–liquid phase transitions in nerve terminals during synaptic activity. We suggest that BAR proteins, along with their established functions in exo- and endocytosis, play crucial roles in the organization of the reserve pool of synaptic vesicles and at the intermediate stages of the vesicle cycle.

Keywords: synapse, synaptic vesicle cycle, exocytosis, endocytosis, BAR proteins, liquid–liquid phase transition