



网格蛋白介导型胞吞作用的分子机制研究和抑制剂开发进展

韩璐¹, 贺樟平¹, 杨紫雁¹, 陈志明^{1,2,3*}

1. 南华大学衡阳医学院基础医学院细胞与遗传研究所, 衡阳 421001;

2. 南华大学衡阳医学院附属第一医院检验科, 衡阳 421001;

3. 南华大学衡阳医学院附属妇幼保健院(湖南省妇幼保健院), 国家卫生健康委出生缺陷研究与预防重点实验室, 长沙 410008

* 联系人, Email: Zhiming.Chen@usc.edu.cn

收稿日期: 2023-05-26; 接受日期: 2023-09-12; 网络版发表日期: 2023-10-09

摘要 网格蛋白介导型胞吞作用(clathrin-mediated endocytosis, CME)是代谢产物、激素、蛋白质和某些病毒进入细胞的主要途径. 前期研究已报道超过50种胞吞辅助蛋白(endocytic accessory proteins, EAPs)参与到CME的进程中, 但是其复杂的分子调控机制仍有待厘清. 近年来显微成像技术及CME抑制剂的发展为更好地解析CME的分子机制提供了机会. 本文重点介绍了哺乳动物细胞中CME的分阶段调控机制以及CME抑制剂的开发现状.

关键词 网格蛋白, 胞吞作用, 显微镜成像, 抑制剂

网格蛋白介导型胞吞作用(clathrin-mediated endocytosis, CME)作为货物入胞的主要途径, 不仅参与调控细胞的营养摄取和信号转导, 也具有调节细胞免疫应答和维持内环境稳态的功能^[1,2]. 越来越多的证据表明, CME的功能失常与多种疾病密切相关, 包括神经发育疾病、心血管疾病和癌症等. 此外, 包括艾滋病毒、登革病毒、丙型肝炎病毒、新冠病毒在内的多种病毒通过该途径进入细胞. 因此, 深入解析CME的分子机制, 并开发可用于调控CME功能的分子工具, 能够为相关重大疾病的诊疗提供科学依据, 已经成为一个重要的国际前沿研究领域.

装形成网格蛋白包被小窝(clathrin-coated pit, CCP), 进而内凹闭合并脱离质膜形成包裹着货物的网格蛋白包被囊泡(clathrin-coated vesicle, CCV)的过程(图1)^[3]. 除了clathrin, 此过程还受到胞吞货物^[4]、磷脂酰肌醇家族化合物(phosphatidylinositol phosphates, PIPs)^[5]以及超过50种胞吞辅助蛋白(endocytic accessory protein, EAP)^[6]的高度调控. CME进程可大致分为5个阶段, 分别是启动、稳定、成熟、脱离质膜和解除包被(图1). 不同的调控因子在CME的各个阶段中发挥着独立或重叠的功能, 赋予了CME一定的弹性. 以下主要介绍哺乳动物细胞中CME的分阶段调控机制及其检测手段.

1 CME的分阶段调控机制及检测手段

CME的进程是网格蛋白(clathrin)在细胞质膜上组

1.1 CME的分阶段调控机制

衔接蛋白AP2是启动CME的关键因子^[7], 并且研

引用格式: 韩璐, 贺樟平, 杨紫雁, 等. 网格蛋白介导型胞吞作用的分子机制研究和抑制剂开发进展. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 1361–1369
Han L, He Z P, Yang Z Y, et al. Molecular mechanism and inhibitors of clathrin-mediated endocytosis (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2023, 53: 1361–1369, doi: [10.1360/SSV-2023-0091](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0091)

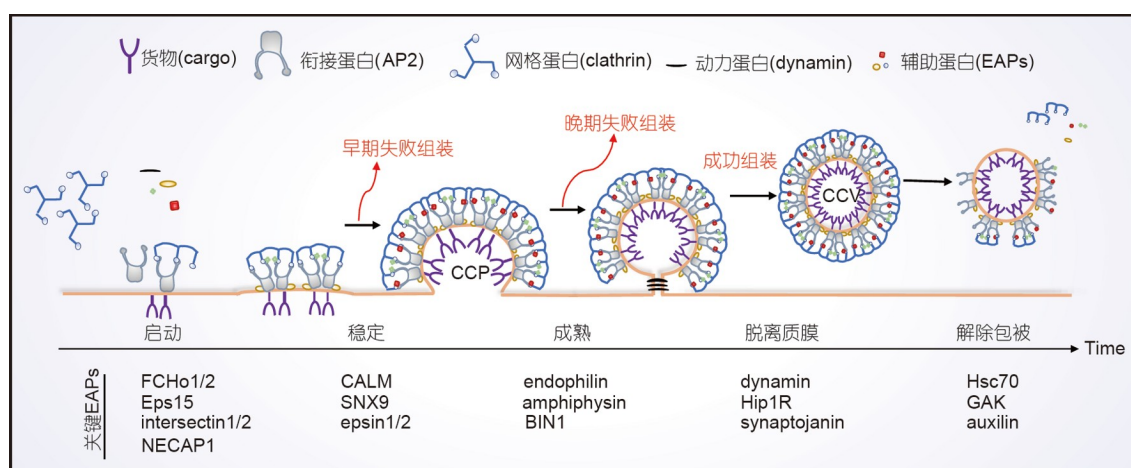


图1 网格蛋白介导型胞吞作用示意图

Figure 1 Schematic diagram of CME

研究表明其可能与脚手架蛋白(scaffolding protein) FCHo1/2, Eps15及intersectin1/2结合形成一个启动CME的先驱复合结构^[8]。Clathrin不直接与细胞膜相互作用,而是通过与质膜上的衔接蛋白结合而被招募,其中AP2是招募网格蛋白最主要的衔接蛋白。在CME启动阶段,胞质中的AP2通过结合质膜上的磷脂酰肌醇(4,5)二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PI (4,5)P₂)发生从封闭到开放的构象变化^[9,10],并通过与FCHo1/2^[11], NECA1^[12]相互作用稳定其开放构象。Eps15及intersectin1/2的加入促进了AP2的聚集成CME位点,启动clathrin的招募和组装。

货物的招募是CME稳定和成熟阶段的一个重要过程。质膜上的AP2处于开放构象,其表面暴露的货物结合位点可以与含有特定基序的货物结合,促进货物招募的同时也稳定其开放构象。除了AP2,大量clathrin衔接蛋白和脚手架蛋白也被证实可与特定货物结合并发挥引导货物入胞的功能^[13]。衔接蛋白与货物蛋白的相互作用主要通过短线性基序或货物蛋白的共价修饰,如磷酸化或泛素化。以CALM为例,CALM作为v-SNARE蛋白的衔接蛋白^[14],可将v-SNARE蛋白整合到CCV中,以确保入胞囊泡的靶向和融合。

质膜的内凹是CME稳定和成熟阶段的另一个重要过程。其中,驱使质膜内凹的主要动力可能是网格蛋白组装形成包被结构后对质膜产生的脚手架效应。此外,体外的生物化学和生物物理学研究表明,其他因素也可促进CCV形成过程中的质膜弯曲^[3,15],例如,

EAP可通过BAR(Bin/Amphiphysin/Rvs)结构域(如endophilin, amphiphysin和SNX9)的脚手架效应,两亲/疏水基团(如epsin1和CALM)的楔形效应,以及CCP有限空间内衔接蛋白和货物蛋白聚集所产生的拥挤效应等。

在经典的CME模型中,已成功装载货物并内凹的成熟CCP脱离质膜形成CCV的过程主要受到大GTP酶dynamin和含有BAR结构域蛋白(amphiphysin, SNX9)的协同调控^[16,17]。Amphiphysin和SNX9具有吸附到弯曲的细胞膜上并招募dynamin的能力,被招募的dynamin多聚化后形成环状螺旋结构的多聚体,促使质膜收缩形成一个连结CCV与质膜的颈部结构,然后通过水解GTP使质膜进一步收缩,切断颈部质膜^[18,19],释放CCV入胞。也有报道表明,哺乳动物细胞中脱离质膜阶段需要肌动蛋白丝的牵引协助。

入胞后,辅助蛋白auxilin被clathrin招募到CCV上,并进一步招募热休克蛋白Hsc70^[20]。在ATP存在的条件下,Hsc70水解ATP破坏clathrin-clathrin互作网络的稳定性,使CCV脱去包被,释放CME功能蛋白得以循环利用,同时无包被囊泡与早期胞内体融合启动胞内囊泡运输。值得注意的是,磷脂酰肌醇的磷酸位点转换在调节CME的各个阶段中也可能具有关键作用^[5,21],在本文中不做展开叙述。

1.2 CME的检测手段

早期的CME研究大多使用直接或间接的生化分

析来测量细胞内货物(如转铁蛋白受体和低密度脂蛋白受体)的积累^[22], 进而从货物胞吞效率的角度表征CME的功能。然而, 这种测量方法无法灵敏检测CME早期的启动、稳定和成熟阶段的分子调控机制。事实上, 这些早期形成阶段的分子调控对于CME的成功与否具有决定性的作用^[23]。因此, 开发更灵敏的检测技术以深入解析CME早期形成的分子调控机制具有重大意义。

全内反射荧光显微镜(total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM)成像分析技术的发展为在活细胞中灵敏检测CME从启动到稳定, 再到成熟这一连续的过程提供了可能性。通过荧光蛋白标记clathrin或AP2, 并进行活细胞TIRFM延时成像(time-lapsed imaging), Merrifield课题组^[24]和Kirchhausen课题组^[7]实现了对CME进程中各种EAP招募动态的灵敏检测。在成像的基础上, Schmid和Danuser课题组长期致力于开发基于Matlab软件分析的CME分析软件平台^[25-27]。他们合作开发的cmeAnalysis软件实现了对TIRFM成像数据中所有clathrin包被结构的荧光强度和寿命分布的自动检测、追踪和统计。近期, 他们在cmeAnalysis的基础上进一步开发了更先进的DASC分析方法^[23], 实现了对成功和失败的clathrin组装的自动区分。cmeAnalysis结合DASC分析可以全面、客观、准确地分析CME早期阶段的变化, 在检测EAP功能以及CME补偿机制方面有更高的灵敏度, 是目前CME研究中前沿且高效的技术手段。

应用TIRFM成像分析技术, 研究人员发现clathrin的组装存在着三种命运: (i) 早期失败组装, 即不稳定的组装在早期解体; (ii) 晚期失败组装, 即形成了稳定的包被结构, 但于晚期解体; (iii) 成功组装, 即组装形成CCV将货物吞入胞内(图1)。值得注意的是, 哺乳动物细胞中30%~50%的clathrin组装会中途解体^[23]。导致CME失败的原因除了相关EAP招募异常及质膜张力过高等可能阻碍CME正常进程的因素外, 前期研究还提出了一个货物检查点(cargo checkpoint)的调控机制: CCP中的货物分子数量如果低于一个阈值, 则CCP会中途解体或者延缓成熟以招募更多货物^[4,25]。非神经元细胞产生的CCP寿命从20~120秒不等(神经突触上CME的速率可以快几个数量级)^[28], CCP寿命的异质性可能受到EAP招募、膜张力及货物装载的调控。

除了TIRFM成像分析技术, 近年来光电联用显微

成像(correlative light and electron microscopy, CLEM)^[29-31]、TIRFM-结构照明显微镜(structured illumination microscopy, SIM)联用成像^[32]以及快速原子力显微镜成像(high-speed atomic force microscopy, HS-AFM)^[33]等也越来越多地被用于CME研究。这些具有高分辨率的活细胞显微成像技术的应用, 将进一步提高对CME时空动态检测的灵敏度, 为阐明CME的复杂分子调控机制提供有力手段。

2 CME抑制剂的开发

在基础研究方面, 高效的CME抑制剂常被用于货物入胞途径的特异性研究。在临床应用方面, Chew等人^[34]发现, 阻断CME是一种可以改善人类依赖细胞毒性介导抗体的临床反应的有效策略; Powell等人^[35]则发现, 抑制CME可以减轻类似炎症疼痛的症状。因此, 开发CME抑制剂无论是在基础研究, 还是在临床应用上均具有重大意义。

前期对于抑制CME的技术手段已有较多报道, 但是不足之处也显而易见。研究表明, 对细胞内环境进行干扰(如钾离子消耗、高渗处理以及胞质酸化), 虽然可显著抑制CME^[36-38], 但是此类处理对细胞整体环境造成较大影响, 明显无特异性。另有许多研究采用基因沉默、突变或敲除技术, 如敲低clathrin^[39,40]和dynammin^[6]或是重组细胞使之过表达clathrin^[22]和dynammin^[41]的突变体等, 虽然也能显著抑制CME, 但是基因手段的时效性差且无法避免细胞中补偿机制的发生, 不易转化为治疗用途。小分子抑制剂和多肽抑制剂的开发可以在一定程度上实现对CME的快速、可逆且特异性抑制, 以下主要讨论已知的CME小分子抑制剂和多肽抑制剂的抑制效果、作用机制和不足之处(表1)。

2.1 靶向clathrin的抑制剂

Clathrin重链的N端结构域存在多个EAP结合位点, 是CME的一个蛋白互作中心^[42], 因而成为开发CME抑制剂的一个重要靶点。从17000个小分子文库中筛选出的Pitstop1和Pitstop2化合物是目前关注较多的靶向clathrin的CME抑制剂^[43,44], 具体表现为抑制CCP的生成, 进而抑制转铁蛋白的摄取, 并干扰突触小泡的循环^[43]。鉴于Pitstop1的细胞摄取有限, 细胞渗透性较好的Pitstop2更常被用于细胞实验中^[45]。结构生

表 1 CME抑制剂

Table 1 Inhibitors of CME

抑制剂类别	抑制剂	作用方式	评价	参考文献
靶向clathrin	Pitstop1	结合clathrin重链N端结构域	细胞摄取有限	[43~49]
	Pitstop2	结合clathrin重链N端结构域	特异性存疑, 具有细胞穿透性和细胞毒性	[43~45]
	ES9	结合clathrin重链N端结构域	抑制效果受自身质子载体功能影响	[50,51]
	ES9-17	结合clathrin重链N端结构域	较ES9更强特异性	[51,52]
靶向dynammin	Dynasore	结合dynammin的GTPase结构域	非特异性	[53]
	Dyngo-4a	结合dynammin的GTPase结构域	非特异性	[54,55]
	Pyrimidyn6/7	阻碍动力蛋白与磷脂的相互作用, 也阻碍GTP与dynammin的结合	特异性未知	[56]
	MiTMAB/OcTMAB	阻碍dynammin与磷脂的相互作用	不影响动力蛋白的组装	[57~59]
	RTIL-13	影响dynammin与脂质的相互作用	—	[60]
	Dynoles	抑制dynammin的GTPase活性	Dynole 2-24比Dynole34-2细胞毒性低, 抑制效果更好	[61]
	双磷酸盐类	结合dynammin的PH结构域结合	特异性未知	[64,65]
	Rhodadyn C10/Rhodadyn D10	抑制dynammin的GTPase活性	—	[66]
	Imidodyn2	抑制dynammin的GTPase活性	—	[59]
	氯丙嗪	抑制dynammin的GTPase活性	非特异性, 抑制CIE, 细胞形态发生改变	[47,67~69]
靶向Hsc70	Apoptozole	抑制Hsc70的ATPase活性	阻碍细胞内Hsc70与clathrin的相互作用	[70]
其他小分子抑制剂	Phenylarsine oxide(PAO)	未知	非特异性, 导致细胞骨架紊乱	[71]
	Monodansylcadaverine (MDC)	未知	非特异性, 干扰肌动蛋白细胞骨架	[47,72,73]
	Chloroquine	未知	非特异性	[47,73]
	Phenothiazine	阻断dynammin产生抑制效果	非特异性	[34,47,67,73]
	Ikarugamycin	—	具有细胞毒性, 不抑制CIE	[74~76]
多肽抑制剂	Wbox2	结合AP2和SNX9	具有一定的细胞毒性, 但优于Pitstop2	[22]

物学研究表明, Pitstops结合到clathrin重链N端结构域的“clathrin-box”位点, 从而竞争性地影响clathrin与相关EAP的相互作用^[43]。但是随后的多篇研究对Pitstop的抑制特异性及作用机制提出了质疑^[46], 包括: (i) Pitstop2在敲除clathrin的细胞中对多种不依赖clathrin入胞(clathrin-independent endocytosis, CIE)的货物有抑制作用^[47]; (ii) 突变“clathrin-box”的关键氨基酸不影响Pitstop2对转铁蛋白胞吞的抑制作用^[48]; (iii) Pitstop2在低于其CME抑制浓度时已表现出明显的细胞毒性^[49]。因此, Pitstops作为CME抑制剂的特异性和作用机制仍有待进一步验证。

质子载体Endosidin9(ES9)^[50]是另一种已知靶向clathrin重链N端结构域的CME抑制剂^[51], 但是ES9的原子载体特性影响了其作为抑制剂的使用范围。因此,

前期研究开发了ES9的类似物ES9-17, 可有效降低人细胞对转铁蛋白的摄取^[52], 以及拟南芥对亲脂性苯乙烯基内吞示踪剂(FM4-64)的摄取并抑制拟南芥根生长^[51]。与ES9相比, ES9-17具有更强的特异性^[50], 是目前已知的唯一能够可逆抑制拟南芥中CME的小分子抑制剂^[51]。

2.2 靶向dynammin的抑制剂

对CCV脱离质膜起主要调控作用的dynammin也是筛选CME抑制剂的热门靶标。

(1) Dynasore和Dyngo-4a. Dynasore是从6000个小分子化合物中筛选出的, 第一个在生化实验中被鉴定为阻断dynammin1/2 GTPase活性的化合物。它已经被证明可以快速和可逆地阻断细胞中的CME^[53]。Dynasore

得到了广泛的应用,但是具有明显的非特异性,可抑制mTORC1活性并诱导自噬. Dyngo-4a是一种改进的Dynasore结构模拟类似物,具有比Dynasore更低的细胞毒性和更强的dynamins1/2抑制作用^[54]. 但是也有报道表明, Dyngo-4a具有脱靶效应,会抑制骨髓间充质干细胞对葡聚糖的巨噬细胞作用^[55].

(2) Pyrimidins. McGeachie等人^[56]基于嘧啶结构,设计了一个小型的Pyrimidins文库,并鉴定出Pyrimidin6和Pyrimidin7具有较强的CME抑制作用. Pyrimidin6和Pyrimidin7不仅能阻碍dynamins与磷脂的相互作用,也阻碍GTP与dynamins的结合,这表明它们通过双重作用机制同时针对GTPase结构域和PH结构域^[56].

(3) 长链铵盐类. 经预测发现,长链铵盐的疏水分子可能通过与PH结构域的相互作用抑制dynamins功能^[57],其中十八烷基三甲基溴化铵(octadecyl trimethylammonium bromide, OcTMAB)和十四烷基三甲基溴化铵(myristyl trimethyl ammonium bromide, MiTMAB)对dynamins抑制效果最好. MiTMAB为长链的季铵盐结构^[57,58],通过与磷脂竞争性结合到dynamins的PH结构域,与GTP形成非竞争抑制关系,显著抑制受体介导的胞吞^[58,59],但是不影响dynamins的组装^[58]. OcTMAB也是一种长链铵盐,具有与MiTMAB类似的结构和抑制作用机制. 2007年,一种新的长链季铵盐RTIL-13被筛选出来^[60],其同样在dynamins的PH结构域起作用,影响dynamins与脂质的相互作用,进而抑制CME.

(4) Dynoles及其类似物. Dynoles是以吡啶为母核,作用在dynamins GTPase结构域的dynamins抑制剂^[61]. 第一代化合物Dynole 34-2可以有效抑制CME. Tremblay等人^[62]在小鼠模型实验中发现, Dynole 34-2与现代化疗具有高度协同作用,能有效治疗癌症. Gordon等人^[63]在此基础上又开发出第二代化合物Dynole 2-24,其细胞毒性较上一代明显降低的同时也增强了对细胞中CME的抑制作用.

(5) 双磷酸盐类. 双磷酸盐(bisphosphonates, BPs)是一种合成的吡啶磷酸盐类似物,其中阿仑膦酸(alendronate)、唑来膦酸(zoledronate)和依地膦酸(risedronate)都能抑制转铁蛋白的胞吞^[64]. 经过酸性磷脂的滴定实验验证, BPs能与dynamins2的PH结构域结合,但是具体作用机制仍不明确^[64,65].

(6) 其他靶向dynamins的抑制剂. Rhodadyn C10和Rhodadyn D10以罗丹宁为母核^[66], Imidodyn 2^[59]则是

经改造二聚化的酪氨酸磷酸化抑制剂(trypostins)的结构而后得,三者均可抑制dynamins的GTPase活性,并抑制转铁蛋白的胞吞. 此外,抗精神病药物氯丙嗪(chlorpromazine)^[47]也被报道可以通过抑制dynamins的GTPase活性^[67],阻断CME. 然而chlorpromazine对CIE也有抑制作用,且会改变细胞形态^[68,69].

2.3 靶向Hsc70的抑制剂

Hsc70在CME进程中起到重要的解除包被的功能,这与其ATPase活性密切相关. Apoptozole是Hsc70蛋白的一个ATPase抑制剂. 生化研究结果表明, Apoptozole可与Hsc70,而非其他类型的热休克蛋白结合^[70]. 细胞实验结果表明, Apoptozole可破坏细胞内Hsc70与clathrin的相互作用,有效抑制CME过程中CCV的解离^[70].

2.4 其他小分子抑制剂

氧化苯乙素(phenylarsine oxide, PAO)是一种三价砷,能与二硫醇发生特异性反应^[71]. 低剂量PAO即可高效抑制CME,但是作用机制尚不清晰. PAO具有一系列严重的副作用,可导致细胞骨架紊乱,并对巨噬和胞吞作用都会产生影响.

单丹磺酰戊二胺(monodansylcadaverine, MDC)、氯喹(chloroquine)和吩噻嗪(phenothiazine)都能够通过影响CCV的形成来抑制CME^[47]. 其中MDC是一种竞争性的转谷氨酰胺酶抑制剂,能可逆地抑制肌纤维的成熟,干扰肌动蛋白细胞骨架组织和动力学^[72]. 目前MDC和chloroquine产生抑制作用的途径尚不清楚,但是有研究表明phenothiazine可能通过阻断dynamins产生抑制效果^[34,67]. 这些化合物都存在对CME抑制的脱靶效应和非特异性的问题^[47,73].

Ikarugamycin是一种广谱抗生素^[74],能够有效抑制转铁蛋白的胞吞^[75,76]. 虽然ikarugamycin不抑制小窝蛋白介导型胞吞作用和CIE,但在低于其CME抑制的浓度下能观察到细胞毒性,其作用模式目前尚不清楚^[76].

2.5 多肽抑制剂

近期本课题组^[22]通过模拟clathrin的蛋白-蛋白互作位点设计了一系列多肽,并筛选出一个模拟“W-box”位点的多肽——Wbox2. 实验表明, Wbox2可以竞争性结合AP2和SNX9,从而快速、可逆且高效地抑制

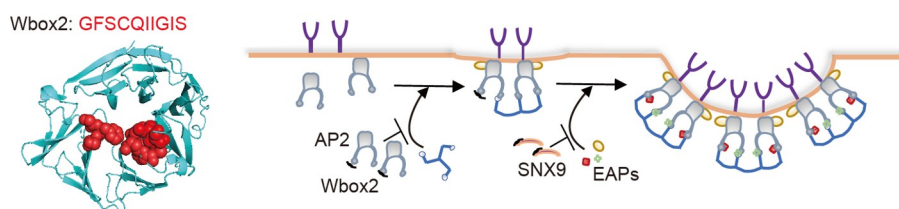


图 2 CME多肽抑制剂——Wbox2. 左: 网格蛋白重链的N端结构域(PDB: 1bpo)中红色标出Wbox2的氨基酸序列; 右: Wbox2通过竞争AP2和SNX9抑制CME的示意图

Figure 2 CME peptide inhibitor: Wbox2. Left: amino acid sequence of Wbox2 is shown as red-colored spheres in the N-terminal domain of clathrin heavy chain (PDB: 1bpo); right: schematic diagram showing that Wbox2 inhibits CME via competing for AP2 and SNX9

CME(图2). Wbox2的开发为CME研究提供了首个工作机理明确且高效的多肽抑制剂, 也为如何开发CME抑制剂用于科学研究和疾病治疗指出了方向。

3 结论与展望

尽管关于CME的研究已经持续超过40年, 大多数参与CME进程的蛋白也已经被鉴定出, 但是这些蛋白如何密切协作, 共同调控CME的分子机制尚不清晰, 尤其是CME早期阶段的分子调控机制还有许多重要

问题有待厘清, 比如: (i) 货物如何调控CME的启动、稳定和成熟? (ii) 调控CCP内凹的关键因子有哪些? 此外, 开发快速且特异性的CME抑制剂迫切且具有重大意义. 尽管前期研究开发了多种CME抑制剂, 但是如何改进抑制剂的设计以提高其抑制效果和特异性, 同时降低细胞毒性, 并结合疾病模型进一步开展动物实验和临床试验以验证其应用转化, 是当前需要努力的方向. 通过进一步深入探索回答这些问题可以为研究CME失调引发的疾病以及拓展CME在健康中的重要性提供新思路.

参考文献

- Mettlen M, Chen P H, Srinivasan S, et al. Regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 2018, 87: 871–896
- Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 313–326
- Chen Z, Schmid S L. Evolving models for assembling and shaping clathrin-coated pits. *J Cell Biol*, 2020, 219: e202005126
- Henry A G, Hislop J N, Grove J, et al. Regulation of endocytic clathrin dynamics by cargo ubiquitination. *Dev Cell*, 2012, 23: 519–532
- He K, Marsland III R, Upadhyayula S, et al. Dynamics of phosphoinositide conversion in clathrin-mediated endocytic traffic. *Nature*, 2017, 552: 410–414
- Bhave M, Mettlen M, Wang X, et al. Early and nonredundant functions of dynamin isoforms in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*, 2020, 31: 2035–2047
- Cocucci E, Aguet F, Boulant S, et al. The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell*, 2012, 150: 495–507
- Ma L, Umasankar P K, Wrobel A G, et al. Transient Fcho1/2·Eps15/R·AP-2 nanoclusters prime the AP-2 clathrin adaptor for cargo binding. *Dev Cell*, 2016, 37: 428–443
- Kovtun O, Dickson V K, Kelly B T, et al. Architecture of the AP2/clathrin coat on the membranes of clathrin-coated vesicles. *Sci Adv*, 2020, 6: eaba8381
- Kelly B T, Graham S C, Liska N, et al. AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science*, 2014, 345: 459–463
- Zaccai N R, Kadlecova Z, Dickson V K, et al. FCHO controls AP2's initiating role in endocytosis through a PtdIns(4,5)P₂-dependent switch. *Sci Adv*, 2022, 8: eabn2018
- Ritter B, Murphy S, Dokainish H, et al. NECA1 regulates AP-2 interactions to control vesicle size, number, and cargo during clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol*, 2013, 11: e1001670
- Traub L M, Bonifacio J S. Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5: a016790
- Miller S E, Sahlender D A, Graham S C, et al. The molecular basis for the endocytosis of small R-SNAREs by the clathrin adaptor CALM. *Cell*,

2011, 147: 1118–1131

- 15 Bassereau P, Jin R, Baumgart T, et al. The 2018 biomembrane curvature and remodeling roadmap. *J Phys D-Appl Phys*, 2018, 51: 343001
- 16 Antonny B, Burd C, De Camilli P, et al. Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J*, 2016, 35: 2270–2284
- 17 Neumann S, Schmid S L. Dual role of BAR domain-containing proteins in regulating vesicle release catalyzed by the GTPase, dynamin-2. *J Biol Chem*, 2013, 288: 25119–25128
- 18 Mattila J P, Shnyrova A V, Sundborger A C, et al. A hemi-fission intermediate links two mechanistically distinct stages of membrane fission. *Nature*, 2015, 524: 109–113
- 19 Cheng X, Chen K, Dong B, et al. Dynamin-dependent vesicle twist at the final stage of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol*, 2021, 23: 859–869
- 20 Xing Y, Böcking T, Wolf M, et al. Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: mechanism of Hsc70-facilitated disassembly. *EMBO J*, 2010, 29: 655–665
- 21 Posor Y, Eichhorn-Grünig M, Haucke V. Phosphoinositides in endocytosis. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1851: 794–804
- 22 Chen Z, Mino R E, Mettlen M, et al. Wbox2: a clathrin terminal domain-derived peptide inhibitor of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol*, 2020, 219: e201908189
- 23 Wang X, Chen Z, Mettlen M, et al. DASC, a sensitive classifier for measuring discrete early stages in clathrin-mediated endocytosis. *eLife*, 2020, 9: e53686
- 24 Taylor M J, Perrais D, Merrifield C J, et al. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol*, 2011, 9: e1000604
- 25 Loerke D, Mettlen M, Yasar D, et al. Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation. *PLoS Biol*, 2009, 7: e57
- 26 Aguet F, Antonescu C N, Mettlen M, et al. Advances in analysis of low signal-to-noise images link dynamin and AP2 to the functions of an endocytic checkpoint. *Dev Cell*, 2013, 26: 279–291
- 27 Jaqaman K, Loerke D, Mettlen M, et al. Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nat Methods*, 2008, 5: 695–702
- 28 Watanabe S, Mamer L E, Raychaudhuri S, et al. Synaptojanin and endophilin mediate neck formation during ultrafast endocytosis. *Neuron*, 2018, 98: 1184–1197.e6
- 29 Sochacki K A, Dickey A M, Strub M P, et al. Endocytic proteins are partitioned at the edge of the clathrin lattice in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 2017, 19: 352–361
- 30 Sochacki K A, Heine B L, Haber G J, et al. The structure and spontaneous curvature of clathrin lattices at the plasma membrane. *Dev Cell*, 2021, 56: 1131–1146.e3
- 31 Avinoam O, Schorb M, Beese C J, et al. Endocytic sites mature by continuous bending and remodeling of the clathrin coat. *Science*, 2015, 348: 1369–1372
- 32 Willy N M, Ferguson J P, Akatay A, et al. *De novo* endocytic clathrin coats develop curvature at early stages of their formation. *Dev Cell*, 2021, 56: 3146–3159.e5
- 33 Yoshida A, Sakai N, Uekusa Y, et al. Morphological changes of plasma membrane and protein assembly during clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol*, 2018, 16: e2004786
- 34 Chew H Y, De Lima P O, Gonzalez Cruz J L, et al. Endocytosis inhibition in humans to improve responses to ADCC-mediating antibodies. *Cell*, 2020, 180: 895–914.e27
- 35 Powell R, Young V A, Pryce K D, et al. Inhibiting endocytosis in CGRP⁺ nociceptors attenuates inflammatory pain-like behavior. *Nat Commun*, 2021, 12: 5812
- 36 Carpentier J L, Sawano F, Geiger D, et al. Potassium depletion and hypertonic medium reduce “non-coated” and clathrin-coated pit formation, as well as endocytosis through these two gates. *J Cell Physiol*, 1989, 138: 519–526
- 37 Hansen S H, Sandvig K, van Deurs B. Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J Cell Biol*, 1993, 121: 61–72
- 38 Cosson P, de Curtis I, Pouyssegur J, et al. Low cytoplasmic pH inhibits endocytosis and transport from the trans-Golgi network to the cell surface. *J Cell Biol*, 1989, 108: 377–387
- 39 Hinrichsen L, Harborth J, Andrees L, et al. Effect of clathrin heavy chain- and α -adaptin-specific small inhibitory RNAs on endocytic accessory

- proteins and receptor trafficking in HeLa cells. *J Biol Chem*, 2003, 278: 45160–45170
- 40 Deborde S, Perret E, Gravotta D, et al. Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature*, 2008, 452: 719–723
- 41 van der Blik A M, Redelmeier T E, Damke H, et al. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol*, 1993, 122: 553–563
- 42 Robinson M S. Forty years of clathrin-coated vesicles. *Traffic*, 2015, 16: 1210–1238
- 43 von Kleist L, Stahlschmidt W, Bulut H, et al. Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell*, 2011, 146: 471–484
- 44 Robertson M J, Horatscheck A, Sauer S, et al. 5-Aryl-2-(naphtha-1-yl)sulfonamido-thiazol-4(5H)-ones as clathrin inhibitors. *Org Biomol Chem*, 2016, 14: 11266–11278
- 45 Smith C M, Haucke V, McCluskey A, et al. Inhibition of clathrin by pitstop 2 activates the spindle assembly checkpoint and induces cell death in dividing HeLa cancer cells. *Mol Cancer*, 2013, 12: 4
- 46 Lemmon S K, Traub L M. Getting in touch with the clathrin terminal domain. *Traffic*, 2012, 13: 511–519
- 47 Dutta D, Donaldson J G. Search for inhibitors of endocytosis: intended specificity and unintended consequences. *Cell Logist*, 2012, 2: 203–208
- 48 Willox A K, Royle S J. Functional analysis of interaction sites on the N-terminal domain of clathrin heavy chain. *Traffic*, 2012, 13: 70–81
- 49 Rosselli-Murai L K, Yates J A, Yoshida S, et al. Loss of PTEN promotes formation of signaling-capable clathrin-coated pits. *J Cell Sci*, 2018, 131, 8: jcs208926
- 50 Dejonghe W, Kuenen S, Mylle E, et al. Mitochondrial uncouplers inhibit clathrin-mediated endocytosis largely through cytoplasmic acidification. *Nat Commun*, 2016, 7: 11710
- 51 Dejonghe W, Sharma I, Denoo B, et al. Disruption of endocytosis through chemical inhibition of clathrin heavy chain function. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 641–649
- 52 Prichard K L, O'Brien N S, Murcia S R, et al. Role of clathrin and dynamin in clathrin mediated endocytosis/synaptic vesicle recycling and implications in neurological diseases. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 754110
- 53 Kirchhausen T, Macia E, Pelish H E, et al. Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Methods Enzymol*, 2008, 438: 77–93
- 54 McCluskey A, Daniel J A, Hadzic G, et al. Building a better dynasore: the dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis. *Traffic*, 2013, 14: 1272–1289
- 55 Zhang Y, Zhu J, Xu H, et al. The off-target effects of dynamin inhibitor Dyngo-4a during the internalization of dextran by bone marrow mesenchymal stem cells in rat (in Chinese). *Chin J Cell Mol Immunol*, 2023, 39: 57–62 [张颖, 朱静, 许皓, 等. 发动蛋白(dynamin)抑制剂 Dyngo-4a在大鼠骨髓间充质干细胞内吞葡聚糖过程中存在脱靶效应. *细胞与分子免疫学杂志*, 2023, 39: 57–62]
- 56 McGeachie A B, Odell L R, Quan A, et al. Pyrimidin compounds: dual-action small molecule pyrimidine-based dynamin inhibitors. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 1507–1518
- 57 Hill T A, Odell L R, Quan A, et al. Long chain amines and long chain ammonium salts as novel inhibitors of dynamin GTPase activity. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14: 3275–3278
- 58 Quan A, McGeachie A B, Keating D J, et al. Myristyl trimethyl ammonium bromide and octadecyl trimethyl ammonium bromide are surface-active small molecule dynamin inhibitors that block endocytosis mediated by dynamin I or dynamin II. *Mol Pharmacol*, 2007, 72: 1425–1439
- 59 Hill T A, Mariana A, Gordon C P, et al. Iminochromene inhibitors of dynamins I and II GTPase activity and endocytosis. *J Med Chem*, 2010, 53: 4094–4102
- 60 Ren Y, Wong S M, Lim L Y. Folic acid-conjugated protein cages of a plant virus: a novel delivery platform for doxorubicin. *Bioconjug Chem*, 2007, 18: 836–843
- 61 Robertson M J, Deane F M, Robinson P J, et al. Synthesis of Dynole 34-2, Dynole 2-24 and Dyngo 4a for investigating dynamin GTPase. *Nat Protoc*, 2014, 9: 851–870
- 62 Tremblay C S, Chiu S K, Saw J, et al. Small molecule inhibition of Dynamin-dependent endocytosis targets multiple niche signals and impairs leukemia stem cells. *Nat Commun*, 2020, 11: 6211
- 63 Gordon C P, Venn-Brown B, Robertson M J, et al. Development of second-generation indole-based dynamin GTPase inhibitors. *J Med Chem*, 2013, 56: 46–59
- 64 Masaike Y, Takagi T, Hirota M, et al. Identification of dynamin-2-mediated endocytosis as a new target of osteoporosis drugs, bisphosphonates.

- Mol Pharmacol, 2010, 77: 262–269
- 65 Eschenburg S, Reubold T F. Modulation of dynamin function by small molecules. *Biol Chem*, 2018, 399: 1421–1432
 - 66 Robertson M J, Hadzic G, Ambrus J, et al. The rhodadyns, a new class of small molecule inhibitors of dynamin GTPase activity. *ACS Med Chem Lett*, 2012, 3: 352–356
 - 67 Daniel J A, Chau N, Abdel-Hamid M K, et al. Phenothiazine-derived antipsychotic drugs inhibit dynamin and clathrin-mediated endocytosis. *Traffic*, 2015, 16: 635–654
 - 68 Wang L H, Rothberg K G, Anderson R G. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol*, 1993, 123: 1107–1117
 - 69 Vercauteren D, Vandenbroucke R E, Jones A T, et al. The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol Ther*, 2010, 18: 561–569
 - 70 Cho H J, Kim G H, Park S H, et al. Probing the effect of an inhibitor of an ATPase domain of Hsc70 on clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biosyst*, 2015, 11: 2763–2769
 - 71 Frost S C, Lane M D, Gibbs E M. Effect of phenylarsine oxide on fluid phase endocytosis: Further evidence for activation of the glucose transporter. *J Cell Physiol*, 1989, 141: 467–474
 - 72 Kang S J, Shin K S, Song W K, et al. Involvement of transglutaminase in myofibril assembly of chick embryonic myoblasts in culture. *J Cell Biol*, 1995, 130: 1127–1136
 - 73 Chen C L, Hou W H, Liu I H, et al. Inhibitors of clathrin-dependent endocytosis enhance TGF β signaling and responses. *J Cell Sci*, 2009, 122: 1863–1871
 - 74 Jomon K, Kuroda Y, Ajisaka M, et al. A new antibiotic, ikarugamycin. *J Antibiot*, 1972, 25: 271–280
 - 75 Hasumi K, Shinohara C, Naganuma S, et al. Inhibition of the uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophage J774 by the antibiotic ikarugamycin. *Eur J Biochem*, 1992, 205: 841–846
 - 76 Elkin S R, Oswald N W, Reed D K, et al. Ikarugamycin: a natural product inhibitor of clathrin-mediated endocytosis. *Traffic*, 2016, 17: 1139–1149

Molecular mechanism and inhibitors of clathrin-mediated endocytosis

HAN Lu¹, HE ZhangPing¹, YANG ZiYan¹ & CHEN ZhiMing^{1,2,3}

1 Institute of Cytology and Genetics, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China;

2 Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China;

3 National Health Commission Key Laboratory of Birth Defect Research and Prevention, The Affiliated Maternal and Child Health Care Hospital (Hunan Provincial Maternal and Child Care Hospital), Hengyang Medical School, University of South China, Changsha 410008, China

Clathrin-mediated endocytosis (CME) is the major route for cells to uptake metabolites, hormones, proteins and some viruses. More than 50 endocytic accessory proteins (EAPs) have been reported to be involved in CME; however, its complicated regulation mechanism remains elusive. Recent advances in microscopy imaging and the developments of CME inhibitors provide opportunities to better resolve the molecular mechanism of CME. This work highlights the step-wise regulation mechanism of CME in mammalian cells and introduces the developments of CME inhibitors.

clathrin, endocytosis, microscopy, inhibitor

doi: 10.1360/SSV-2023-0091