

特约综述



心血管受体在心血管疾病的发生、发展及预防和治疗中具有举足轻重的地位。目前所开发的临床用药中50%是针对G蛋白偶联受体(GPCR)的。本课题组主要利用分子生物学、细胞生物学、模式动物、组学研究等手段围绕心血管受体与疾病的发生、发展的分子机制,开展基础与临床双向结合的转化医学研究。重点研究肾上腺素受体(adrenergic receptor)及相关信号蛋白与疾病。

<http://ivm.bjmu.edu.cn/>

β -arrestin与 β -肾上腺素受体

杨承志 李子健*

(北京大学第三医院心内科血管医学研究所, 卫生部心血管分子生物学与调节肽重点实验室, 分子心血管学教育部重点实验室, 心血管受体研究北京市重点实验室, 北京 100191)

摘要 2012年度诺贝尔化学奖授予了美国科学家罗伯特·莱夫科维茨(Robert J. Lefkowitz)和布莱恩·克比尔卡(Brian K. Kobilka), 以表彰他们在G蛋白偶联受体研究中的贡献。从Robert J. Lefkowitz最初研究 β -肾上腺素受体(β -adrenergic receptor, β -AR)减敏机制时发现 β -arrestin1至今已有20多年, 随着对 β -arrestin在细胞信号转导中作用研究的逐渐深入, 发现 β -arrestin参与 β -AR的减敏、内化和降解; 近年来又发现, 依赖 β -arrestin的 β -AR信号转导通路具有“偏向激活”现象, 并提示这种依赖 β -arrestin的“偏向激活”信号转导通路具有心脏保护作用。 β -肾上腺素受体阻滞剂的发现和临床应用被视为20世纪药物治疗学上里程碑式的进展, 是药物防治心脏疾病的最伟大突破, 很多心血管药物都以 β -AR为靶点。但是, 由于目前受体药物均是针对受体本身的调控, 这样在阻断了受体介导的病理性信号通路和功能的同时, 也阻断了受体介导的正常生理性信号通路和功能, 造成了严重的毒副作用。所以, 研发能选择性阻滞 β -AR过度激活介导的病理性信号通路和功能的同时, 保留受体介导的正常生理性信号通路和功能(如 β -arrestin信号通路)的药物, 对治疗心血管疾病有重要意义, 受体功能选择性的配体药物将成为未来药物的研究方向。该文将回顾 β -arrestin的发现过程, 综述其与 β -AR的相互作用, 期望能为心脏疾病的药物治疗提供参考。

关键词 β -arrestin; β -肾上腺素受体; G蛋白偶联受体

2012年度诺贝尔化学奖授予了美国科学家罗伯特·莱夫科维茨(Robert J. Lefkowitz)和布莱恩·克比尔卡(Brian K. Kobilka), 以表彰他们在G蛋白偶联受体研究中的贡献。 β -肾上腺素受体(β -adrenergic receptor, β -AR)属于G蛋白偶联受体家族, 分为 β 1-AR、 β 2-AR和 β 3-AR三种亚型。 β 1-AR、 β 2-AR主要分布于交感神经节后纤维末梢支配的效应器细胞膜上。在心脏中, β 1-AR与 β 2-AR广泛分布于心室和心房肌细胞, 数量上 β 1-AR与 β 2-AR的比值约为2:1; 而在窦房结和心电传导系统中 β 2-AR较多。 β 3-AR在人体主要表达于

脂肪组织, 参与脂质代谢, 在心脏中多位于冠状动脉血管床。心脏交感神经节后纤维末梢释放的去甲肾上腺素激活 β -AR, 产生正性变时、正性变力和正性变传导的作用, 而 β -AR的持续激活则会引起心脏结构重塑。激活的 β -AR一方面向细胞内传递信号, 对心脏发挥上述调节作用; 另一方面其本身会发生减

国家自然科学基金国际合作与交流项目(No.30910103902)、国家自然科学基金(No.81070078, No.81270157)和北京市自然科学基金(No.7102158)资助项目

*通讯作者。Tel: 010-82265519, E-mail: lizijian@bjmu.edu.cn

敏、内化和降解,从而减弱交感神经引起的兴奋效应。最初的研究只是认为 β -AR作为G蛋白偶联受体,通过结合并激活G蛋白发挥作用;而 β -AR激酶可以促使 β -AR减敏、内化。随着研究的深入,发现 β -AR的减敏、内化和降解还需要 β -arrestin——一种接头蛋白的参与才能完成。此外, β -arrestin还介导了独立于G蛋白的信号转导通路,而且 β -arrestin在 β -AR的信号转导通路中的作用还在不断被发现。

1 β -arrestin的发现

β -arrestin是在提纯 β -肾上腺素受体激酶(β -AR kinase, β -ARK)的过程中发现的一种重要的接头蛋白和信号转导调控蛋白,在G蛋白偶联受体(G-protein-coupled receptor, GPCR)信号转导中发挥着重要作用。最初,在研究G蛋白偶联受体信号转导过程中发现,在激动剂持续刺激时易发生转导信号的快速衰减,这种调节机制主要与G蛋白偶联受体激酶(G-protein-coupled receptor kinases, GRKs)有关。但在对视紫红质(与肾上腺素受体同属G蛋白偶联受体家族)研究时发现视紫红质被G蛋白偶联受体激酶1(G-protein receptor kinase 1, GRK1)磷酸化后,其介导的信号转导水平只是部分降低;但是,当加入一种存在于视网膜中的蛋白质arrestin后,视紫红质介导的信号转导水平则几乎被完全抑制,这是首次发现arrestin在G蛋白偶联受体减敏中的作用^[1]。之后, Benovic等^[2]在研究 β -AR激酶(β -AR kinase, β -ARK)介导的 β -AR减敏时发现,当 β -AR被部分纯化的 β -AR激酶(浓度 \approx 350倍牛脑组织粗提物)磷酸化时,失去了80%的活性;而当 β -AR激酶纯化程度增加时,使 β 2-AR失活的能力却下降了;当使用高度纯化的 β 2-AR激酶(\approx 20 000倍牛脑组织粗提物)时,则只能引起很少的 β 2-AR功能失活($16\% \pm 7\%$)。进一步实验表明,在纯化的 β 2-AR激酶制剂中加入视网膜arrestin后,可以部分恢复 β 2-AR激酶介导 β 2-AR减敏的功能,使 β 2-AR失活提高到 $41\% \pm 3\%$ 。据此,他们推断在视网膜之外的组织中可能存在类似于arrestin的蛋白质,与 β 2-AR激酶共同介导 β 2-AR的减敏,而且对 β 2-AR具有更高的亲和力。Southern blot分析表明,有4种编码arrestins的基因序列,由此推断应有4种arrestin蛋白质。通过分子克隆的方法,从牛脑互补DNA文库里克隆出了与arrestin类似的蛋白—— β -arrestin(β -arrestin1)^[3],它能抑制磷酸化激活的 β 2-AR与Gs偶联。 β -arrestin

与arrestin的结构非常相似,有60%的氨基酸序列相同。但是 β -arrestin与磷酸化的 β -AR的亲合力远高于arrestin,只需1.5倍 β -AR的摩尔量即可达到抑制磷酸化的 β -AR信号转导的作用。紧接着,从大鼠脑互补DNA文库里克隆出了 β -arrestin2^[4],它与 β -arrestin1有78%的氨基酸序列是一致的。

现在已经证实, β -arrestin1和 β -arrestin2广泛表达于哺乳动物除视网膜之外的各种组织细胞中,尤其在神经系统和淋巴系统高表达,调控大部分GPCR介导的信号通路^[5]。 β -arrestin1和 β -arrestin2与磷酸化的GPCR结合力基本相同,但是大部分细胞表达 β -arrestin2的数量远多于 β -arrestin1,达到(10~20):1^[6-7]。4种arrestin对GPCR的选择性也不尽相同, β -arrestin1、 β -arrestin2比arrestin1和arrestin4选择性低, β -arrestin1的选择性最低^[8]。对 β -arrestin基因敲除小鼠的研究发现,单独敲除 β -arrestin1或 β -arrestin2小鼠可以存活,说明 β -arrestin1和 β -arrestin2在功能上有重叠。敲除 β -arrestin1后,小鼠心脏对激动 β -AR的反应减弱^[9];敲除 β -arrestin2后,小鼠对吗啡的镇痛反应增强^[10];而同时敲除 β -arrestin1和 β -arrestin2则有胚胎致死性^[11]。

2 Arrestins的结构与功能

随着越来越多的 β -arrestins参与GPCR的信号转导作用被发现,解析其结构以及结构和功能的联系自然就成为一个迫切的课题,因为这对于理解 β -arrestins的作用机制至关重要。对 β -arrestins结构-功能的研究主要是在 β 2-AR和M2型毒蕈碱受体上进行的。使用的方法是对arrestins定点基因突变和X线结晶学技术解析立体结构。

研究发现,各种arrestin的氨基酸残基数都在400个左右,两种 β -arrestin有78%的氨基酸序列是一致的,区别主要位于C-端。对一系列各种剪短的和嵌合的arrestin所做的研究表明,arrestins不仅在氨基酸序列上高度同源,而且功能结构域在肽链上的位置也很相似。目前,4种arrestin蛋白的晶体结构都已被解析出来。从两栖动物到哺乳动物,arrestin家族的空间结构高度保守^[5,12],它们都包含两个反向平行的 β -折叠,分别是N-端和C-端结构域,每个 β -折叠包含7股肽链,中间由一个含12个氨基酸残基的铰链区连接。

N-端有3个功能区,疏水性的 β -折叠I、 α -螺旋I和一个隐藏的离子对(Asp30与Arg175)。 β -折叠I的第14、15位Lys位于激活受体识别域,在arrestin的

激活中起重要作用。11-Val、12-Ile和13-Phe参与arrestin分子内部的作用从而稳定分子结构使其处于静息状态^[13]。β-折叠V和VI组成一个“指形”环,参与结合磷酸化激活的受体。Asp30与Arg175是arrestin的磷酸感受器——极性核心的组成部分^[14]。

通过对截短的arrestin的研究发现, C-末端段不直接与受体相互作用, 只是起调节作用, 调控arrestin对磷酸化的配体激活的受体的特异性识别^[15]。截去C-末端段的arrestin对磷酸化的未激活的受体和非磷酸化的激活的受体亲和力大大增加。而用荧光基团结合arrestin形成空间位阻的方法则显示, N-端和C-端可以分别独立地与激活的受体结合^[16]。C-端向N-端延伸形成一个“尾巴”, 即C-tail。C-tail参与稳定

arrestin静息状态的结构^[17]。此外, C-端含一个潜在的Ca²⁺结合位点和多个潜在的磷酸化位点。

Arrestin铰链区主要由脯氨酸、甘氨酸和丙氨酸等柔性氨基酸组成, 富有弹性, 不参与稳定分子的相互作用, 主要作用是使C-端和N-端的两个结构域能够自由移动。在一定程度上增加或截短铰链长度, 只要保留基本长度, arrestin的功能并不受影响^[18]。

在功能结构域上, β-arrestin的N-端包含Src-SH3结合位点^[19], C-端包含JNK3结合位点, 调控GPCR信号通路和丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路。C-端还包含clathrin、AP2(adaptor protein)结合位点^[20-21], 是β-arrestin参与受体内化的结构基础(图1)。

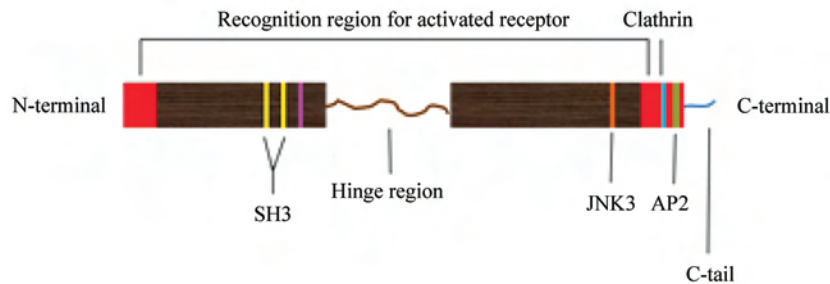


图1 arrestin一级结构示意图

Fig.1 The illustration of arrestin primary structure

在arrestin的三级结构上, N-端的Asp30、Arg175, C-端的Asp296、Asp303和C-尾的Arg382构成一个疏水的极性核心^[22]。极性核心中的Arg175是arrestin主要的磷酸感受器, 与其它4个氨基酸构成“盐桥”而保持稳定。当极性核心的氨基酸被突变为中性或带正电荷的氨基酸时, arrestin就会与未磷酸化激活的受体结合。生理情况下, 磷酸化激活的受体使极性核心变为电中性而打破这一盐桥, arrestin转而与Arg175结合并被激活。

Arrestin有两种相对稳定的结构和功能状态, 一种是与磷酸化激活的受体低亲和力的静息状态, 另一种是高亲和力的激活状态。arrestin在静息状态由3组分子内的相互作用维持^[17,22]: 首先是两个结构域之间大量的疏水性氨基酸形成的疏水性作用; 第二是极性核心; 第三是β-折叠I、α-螺旋I和C-tail组成的三元素相互作用。多个疏水性氨基酸介导的3组分子内相互作用一起维持了arrestin结构的稳定, 任何

一组相互作用被打乱都会引起arrestin的活化^[23]。

Arrestin从静息状态向激活状态转变的过程即是磷酸化的激活受体诱导其结构重排的过程^[24-25]。这一过程分多个步骤: 首先, 激活识别域与激活的受体结合; 然后, 受体结合的磷酸遇到arrestin N-端的β-折叠I磷酸结合位点第14、15位Lys, 它们参与把磷酸引向主要的磷酸感受器Arg175。两个Lys的移动扭曲了β-折叠I, 从而打乱了三元素相互作用并释放出C-tail。C-tail的移位使Arg382脱离极性核心。这些作用中和了极性核心的Arg175的正电荷。随后, 极性核心剩余的三个带负电荷的氨基酸相互排斥, 进一步瓦解了arrestin分子内稳的相互作用, 最终使arrestin松解为活性构象, 与受体紧密结合^[23]。

3 β-肾上腺素受体经典信号通路

β-肾上腺素受体作为重要的G蛋白偶联受体, 最早发现是通过G蛋白介导其信号通路。G蛋白是

由 α 、 β 、 γ 三个亚单位组成的三聚体。在静息状态, G蛋白以三聚体的形式存在, 并与GDP结合。心脏 β 1-AR与激动剂如肾上腺素结合后激活, 发生构象改变, 与Gs蛋白三聚体(鸟苷酸结合蛋白激动亚型)相互作用, 引起 $G\alpha$ 与 $G\beta\gamma$ 分离, 同时 α 亚单位构象发生改变, 使其结合的GDP与 $G\alpha$ 分离。随后, 细胞质中相对高浓度的GTP与 $G\alpha$ 结合并激活 $G\alpha$ 。激活的 $G\alpha$ 再激活其效应蛋白腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC), AC催化ATP生成第二信使cAMP。蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)与cAMP结合后被激活, 然后通过PKA信号通路发挥生理学及病理生理学功能。心脏 β 2-AR被激活后同 β 1-AR一样可激活Gs/PKA信号通路。不同的是, β 2-AR激活后还可以激活Gi蛋白(鸟苷酸结合蛋白抑制亚型), 使 $G\alpha$ 与

$G\beta\gamma$ 亚单位解离, $G\alpha$ 与AC结合并抑制其活性; 此外, β 2-AR还可以通过 $G\beta\gamma$ 激活磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K/protein kinase B, PKB)信号通路。最近, 我们实验室的研究还表明, β -肾上腺素受体激动后不仅能激活PKA, 在小鼠心脏成纤维细胞中还可以在激活cAMP后与Epac结合, 激活下游的PKC δ /p38信号转导通路^[26]。以上即是经典的 β -AR通过G蛋白介导的信号通路(图2)。随着研究的深入, 人们发现除了 β -肾上腺素受体G蛋白依赖信号途径之外, 还存在着一种 β -肾上腺素受体非G蛋白依赖信号途径, 即 β -arrestin介导的 β -肾上腺素受体信号途径。 β -arrestin可通过 β -AR的减敏、内化和cAMP的降解等机制负调控 β -AR介导的信号通路。

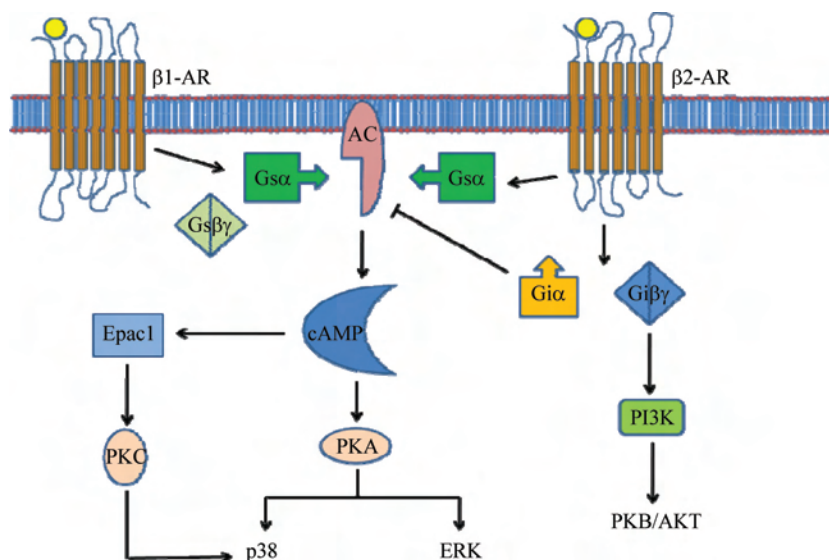


图2 G蛋白介导的经典 β -肾上腺素受体信号转导通路

Fig.2 The classical G protein-mediated β -AR signaling pathway

3.1 β -arrestin参与 β -AR减敏

当 β -AR持续激动时会发生其对激动剂的敏感性下降, 称为减敏(desensitization)。 β -AR减敏主要包括两种机制, 即慢速减敏机制和快速减敏机制。慢速减敏机制主要是 β -AR mRNA转录水平降低导致蛋白水平的表达减少, 即受体密度下调(down-regulation), 此为转录后调节, 需要若干小时才能完成; 另一机制是与Gs脱偶联(uncoupled)机制, 为快速减敏, $t_{1/2}$ 约为20秒。这一过程是由 β -AR激酶和 β -arrestin介导完成的。如前所述, β -arrestin1就是因为促进了 β 2-AR的减敏才被发现的。现在知道, β -AR激酶和 β -arrestin

介导的减敏是 β -AR减敏的普遍机制^[27]。这个过程分为两步: 首先, 被激动剂激活的 β -AR被 β -AR激酶磷酸化; 第二步, β -arrestin识别磷酸化激活的 β -AR并与其结合, 通过空间位阻效应抑制G蛋白与 β -AR的偶联, 从而终止或减弱 β -AR介导的信号通路。此外, β -arrestin尚可募集一些酶降解细胞内第二信使而促发减敏。例如, β -arrestin可募集4D型磷酸二酯酶5亚型到激活的 β -AR上, 催化cAMP降解^[28-29], 从而减弱依赖cAMP的PKA介导的下游信号通路, 抑制依赖PKA的生物学效应, 如糖原分解、细胞收缩力、基因转录等都被抑制。这一 β -arrestin介导的cAMP

降解可以对局部cAMP的浓度进行精确调节,从而实现依赖cAMP的信号通路的精细调控。

3.2 β -arrestin参与 β -AR内化与泛素化

最初在研究 β 2-AR的内化机制时发现 β -arrestin参与了 β 2-AR的内化^[30],细胞过表达 β -arrestin可以显著增强 β 2-AR的内化。 β -arrestins与被GRK磷酸化的 β -AR结合后即启动了 β -AR的内化。在未受 β -AR激动剂作用的细胞, β -arrestin以磷酸化状态位于细胞质中。 β -AR与激动剂结合激活后,胞质中的 β -arrestin迅速向胞膜转移并发生去磷酸化和泛素化,与活化的 β -AR结合^[31]。 β -arrestin作为衔接蛋白,对磷酸化的 β -AR和clathrin都有很高的亲和力,其衔接磷酸化的 β -AR、另一个衔接蛋白2(AP2)^[32]和clathrin形成复合体有被小窝(coated pit);紧接着,发动蛋白(dynamin)在有被小窝的颈部聚合,通过水解GTP调节收缩并将小窝与质膜割开,形成有被小泡并进入细胞质中发生内化。内化的 β -AR有两种去向,一是进入蛋白酶体被消化,二是去磷酸化后被运回到细胞膜循环利用^[33]。

更深入的研究显示,磷酸肌醇3激酶(PI3K)可以促进 β -arrestin介导的 β 2-AR内化^[34]。PI3K激活后生成的磷酸肌醇可以把AP2募集到 β -arrestin上,从而易化AP2与 β -arrestin的相互作用,促进了 β 2-AR内化。此外, β -arrestin还可通过 β -arrestin-NSF(N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein)相互作用^[35]、 β -arrestin-ARF6(ADP-ribosylation factor 6)相互作用^[36]参与 β -AR的内化。

前已述及, β -AR内化后的去向之一是进入蛋白酶体被消化降解,而 β -AR泛素化是其内化后进入蛋白酶体降解的前提。实验发现,在 β -arrestin基因敲除的细胞中, β 2-AR不能被泛素化,只有补救 β -arrestin后, β 2-AR才能发生泛素化^[37],说明 β 2-AR的泛素化需要 β -arrestin参与。在 β 2-AR泛素化的过程中, β -arrestin2作为衔接蛋白把E3泛素连接酶Nedd4(含HECT结构域)募集到激活的 β 2-AR,使 β 2-AR发生泛素化,进入蛋白酶体降解^[38]。另一方面, β -arrestin2又能作为去泛素化酶USP33和USP20的衔接蛋白使 β 2-AR去泛素化,促进 β 2-AR的循环和复敏^[39]。在此过程中, β -arrestin2本身也发生迅速的泛素化和去泛素化^[37]。泛素化的 β -arrestin2与 β 2-AR的亲和力更高,二者一起进入胞内体; β -arrestin2去泛素化后便从 β 2-AR解离下来。由此可推论,内化的 β -AR是被通

过泛素化途径降解还是循环后复敏,是受 β -arrestin直接调控的。

3.3 β -arrestin介导的 β -AR信号通路

β -arrestin不仅参与G蛋白介导的 β -AR减敏、内化、循环和降解,而且其本身还能作为信号分子介导 β -AR信号通路。最初发现, β -arrestin可以把酪氨酸激酶c-Src衔接到激活的 β 2-AR,最终激活细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)^[40],这与 β -AR介导的依赖G蛋白的ERK激活不同。首先,依赖G蛋白的ERK激活迅速而短暂,出现在 β -AR与激动剂结合后2~5 min,而依赖 β -arrestin的ERK激活发生的比较迟并且较持久^[41];其次,依赖G蛋白激活的ERK在细胞质和细胞核中都存在,而依赖 β -arrestin的ERK激活仅出现在细胞质中^[42-43]。

进一步的研究表明, β -AR是通过 β -arrestin转位激活表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)进而激活ERK信号通路^[44]的。 β 1-AR经配体激活后即被GRK5/6磷酸化,并募集 β -arrestin。 β -arrestin进而募集Src激活基质金属蛋白酶(matrix metal proteinase, MMP),MMP则促发肝素结合表皮生长因子(heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, HB-EGF)从细胞膜脱落进入细胞外基质。游离的HB-EGF可以结合EGFR,形成二聚体和催化自身磷酸化,由此激活下游ERK信号通路。此外,另有研究报道 β -arrestin可通过介导 β -AR与EGFR相互作用形成复合体转位激活EGFR,进而激活ERK。这种形式激活的ERK只限于细胞质中,细胞核中没有^[42]。在心脏中,依赖 β -arrestin的EGFR转位激活可以抑制 β -AR持续激动引起的心肌细胞凋亡和病理性心脏重塑,因而对心脏有保护作用^[42,44]。此外,在研究 β -AR内化的过程中还发现 β -arrestin介导 β -AR内化后,可以引起蛋白激酶B(PKB/Akt)的活化,活化的Akt参与了心肌细胞的肥大^[45]。

我们实验室的研究发现, β 2-AR激动可引起p38 MAPK两种时相的激活,即早期激活和延迟激活^[46]。早期激活速度快,程度强,在10 min时便可达到高峰,60 min时降至基础水平;而延迟激活出现在90 min,程度较早期激活弱,但可持续至6 h。进一步机制研究表明 β 2-AR激动通过 β -arrestin-1/Rac1/NADPH氧化酶途径引起p38 MAPK早期激活,通过经典的Gs/AC/cAMP/PKA通路调节p38 MAPK延迟激活。

总之, β -arrestin不仅参与了G蛋白介导的 β -AR

减敏、内化、循环和降解,而且其本身还能作为信号分子介导 β -AR信号转导通路(图3)。

4 β -arrestin信号通路的“偏向激活”与心血管疾病治疗

除了 β -AR存在依赖 β -arrestin的信号通路,在研究血管紧张素受体Ia亚型(angiotensin Ia receptor, AT1aR)被血管紧张素类似物SII([Sarcosine 1, Ile 4, Ile 8]AngII)

激动时发现其也是通过 β -arrestin激活ERK信号通路,而并没有通过激活G蛋白的信号通路^[47]。所有这些发现颠覆了以前对GPCR单一依赖G蛋白的信号通路的传统认识,出现了“偏向激活”的概念,即配体激活受体后能够选择性激活相应的信号通路。与受体结合后能引起“偏向激活”的配体称为“偏向激动剂”。

目前的研究表明,在心力衰竭进展过程中,长

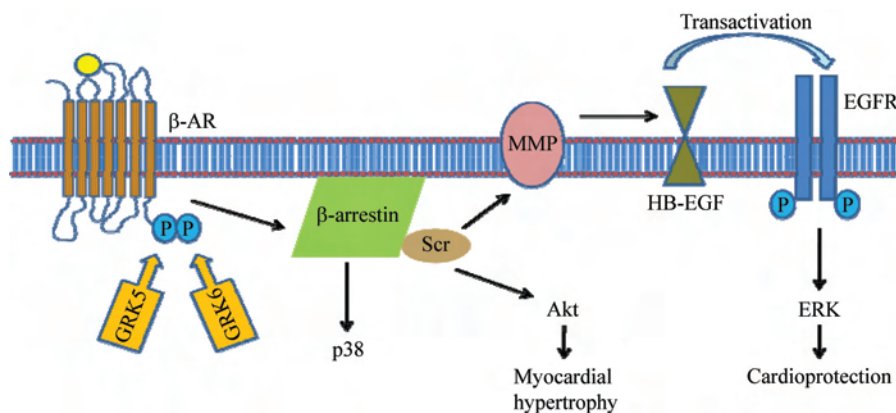


图3 β -arrestin介导的 β -AR信号通路

Fig.3 β -arrestin-mediated β -AR signaling pathway

期的儿茶酚胺刺激导致了G蛋白介导的 β -AR信号通路持续激活,引起 β -AR下调和心脏重塑,而 β -arrestin介导的 β -AR信号通路激活则有心脏保护作用。由此可见,对 β -AR的激活可以通过不同的下游信号通路产生不同的、甚至相反的生物学效应。而现有的治疗高血压、心力衰竭的 β -AR拮抗剂都是针对受体本身的调控,在阻断了受体介导的病理性信号通路和功能的同时,也阻断了受体介导的正常生理性信号通路和功能,造成了严重的毒副作用。因而可以设想:如果能找到在选择性阻断 β -AR过度激活介导的病理性信号通路和功能的同时,保留受体介导的正常生理性信号通路和功能(如 β -arrestin介导的信号通路)的药物,则高血压、心力衰竭的治疗将进入一个全新的高选择性时代。经过筛选,传统的 β -AR拮抗剂卡维地洛、布新洛尔和拉贝洛尔都能在不同程度上激活ERK通路,其中卡维地洛与 β -AR结合后通过 β -arrestin激活ERK通路的效应最为明显。在此之前的大规模临床试验已经证明,卡维地洛与地高辛、利尿剂、ACEI等传统抗心衰药相比,可显著降低心衰患者的死亡率。其机制可能正是卡

维地洛在阻断依赖G蛋白的信号通路的同时还激活了依赖 β -arrestin的信号通路,从两个方向发挥保护心脏的作用。故而,进一步发现或研制能选择性阻滞 β -AR的G蛋白信号通路同时能保留 β -arrestin信号通路的药物对于治疗心衰有重要意义。

5 展望

经过20多年的研究,我们对 β -arrestin与 β -AR相互作用及其机制的认识逐渐深入,同时新的发现也不断涌出:一方面,近年来的研究发现GPCR通过促进 β -arrestin1进核传递信号^[48],这不仅揭示了 β -arrestin1在细胞核内调节表观遗传修饰的新功能,也揭示了受体信息由细胞膜向细胞核内传递和药物作用的一条崭新途径;另一方面,有学者认为慢性应激状态下 β 2-AR持续激活 β -arrestin1介导的信号通路,可以抑制抑癌基因p53的表达水平,进而减弱了DNA损伤后的修复功能^[49];新近又有研究认为 β -arrestin参与了 β 2-AR诱导的活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,同时 β 2-AR激活后G蛋白和 β -arrestin介导的信号通路又都依赖ROS的参与;抑制ROS后,

β -arrestin和G蛋白介导的ERK1/2磷酸化即被阻断^[50]。

β -arrestin与 β -AR相互关系之复杂、研究成果之丰硕由此可见一斑。然而, 还是有许多重要问题亟待回答: 磷酸化的 β -AR是怎样募集 β -arrestin的? β -arrestin对 β -AR产生不同调节效应的结构基础又是什么? β -arrestin是如何选择与之相互作用的蛋白? 此外, 要研制出新一代选择性抗心血管疾病药物, 即能选择性阻滞 β -AR的G蛋白信号通路同时又能保留 β -arrestins信号通路的药物, 全面理解 β -arrestin介导的信号通路的调节机制仍是重中之重。因而, 对 β -arrestin与 β -AR的相互作用的研究仍然任重而道远。

参考文献 (References)

- 1 Wilden U, Hall SW, Kuhn H. Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 8(5): 1174-8.
- 2 Benovic JL, Kuhn H, Weyand I, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic-receptor by the beta-adrenergic-receptor kinase—potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(24): 8879-82.
- 3 Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin: A protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 1990; 248(4962): 1547-50.
- 4 Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, *et al.* Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* 1992; 267(25): 17882-90.
- 5 Gurevich VV, Gurevich EV. The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 2006; 110(3): 465-502.
- 6 Gurevich EV, Benovic JL, Gurevich VV. Arrestin2 and arrestin3 are differentially expressed in the rat brain during postnatal development. *Neuroscience* 2002; 10(3): 421-36.
- 7 Gurevich EV, Benovic JL, Gurevich VV. Arrestin2 expression selectively increases during neural differentiation. *J Neurochem* 2004; 91(6): 1404-16.
- 8 Gurevich VV, Dion SB, Onorato JJ, Ptasienski J, Kim CM, Sterne-Marr R, *et al.* Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 1995; 270(2): 720-31.
- 9 Conner DA, Mathier MA, Mortensen RM, Christe M, Vatner SF, Seidman CE, *et al.* Beta-arrestin1 knockout mice appear normal but demonstrate altered cardiac responses to beta-adrenergic stimulation. *Circ Res* 1997; 81(6): 1021-6.
- 10 Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* 1999; 286(5449): 2495-8.
- 11 Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, *et al.* Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(5): 2449-54.
- 12 Celver J, Vishnivetskiy SA, Chavkin C, Gurevich VV. Conservation of the phosphate-sensitive elements in the arrestin family of proteins. *J Biol Chem* 2002; 277(11): 9043-8.
- 13 Vishnivetskiy SA, Schubert C, Climaco GC, Gurevich YV, Velez MG, Gurevich VV. An additional phosphate-binding element in arrestin molecule. Implications for the mechanism of arrestin activation. *J Biol Chem* 2000; 275(52): 41049-57.
- 14 Gray-Keller MP, Detwiler PB, Benovic JL, Gurevich VV. Arrestin with a single amino acid substitution quenches light-activated rhodopsin in a phosphorylation-independent fashion. *Biochemistry* 1997; 36(23): 7058-63.
- 15 Gurevich VV, Benovic JL. Cell-free expression of visual arrestin. Truncation mutagenesis identifies multiple domains involved in rhodopsin interaction. *J Biol Chem* 1992; 267(30): 21919-23.
- 16 Skegrod D, Pulvermuller A, Krafft B, Granzin J, Hofmann KP, Buldt G, *et al.* N-terminal and C-terminal domains of arrestin both contribute in binding to rhodopsin. *Photochem Photobiol* 2007; 83(2): 385-92.
- 17 Hirsch JA, Schubert C, Gurevich VV, Sigler PB. The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: A model for arrestin's regulation. *Cell* 1999; 97(2): 257-69.
- 18 Vishnivetskiy SA, Hirsch JA, Velez MG, Gurevich YV, Gurevich VV. Transition of arrestin into the active receptor-binding state requires an extended interdomain hinge. *J Biol Chem* 2002; 277(46): 43961-7.
- 19 Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della RG, *et al.* Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-src protein kinase complexes. *Science* 1999; 283(5402): 655-61.
- 20 Seo J, Tsakem EL, Breitman M, Gurevich VV. Identification of arrestin-3-specific residues necessary for JNK3 kinase activation. *J Biol Chem* 2011; 286(32): 27894-901.
- 21 Kang DS, Kern RC, Puthenveedu MA, von Zastrow M, Williams JC, Benovic JL. Structure of an arrestin2-clathrin complex reveals a novel clathrin binding domain that modulates receptor trafficking. *J Biol Chem* 2009; 284(43): 29860-72.
- 22 Han M, Gurevich VV, Vishnivetskiy SA, Sigler PB, Schubert C. Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: Possible mechanism of receptor binding and membrane translocation. *Structure* 2001; 9(9): 869-80.
- 23 Hanson SM, Francis DJ, Vishnivetskiy SA, Kolobova EA, Hubbell WL, Klug CS, *et al.* Differential interaction of spin-labeled arrestin with inactive and active phosphorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(13): 4900-5.
- 24 Hubbell WL, Altenbach C, Hubbell CM, Khorana HG. Rhodopsin structure, dynamics, and activation: A perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking. *Adv Protein Chem* 2003; 63: 243-90.
- 25 Gurevich VV, Gurevich EV. The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25(2): 105-11.
- 26 Chen C, Du J, Feng W, Song Y, Lu Z, Xu M, *et al.* Beta-adrenergic receptors stimulate interleukin-6 production through EPAC-dependent activation of PKCdelta/p38 MAPK signaling in neonatal mouse cardiac fibroblasts. *Br J Pharmacol* 2012; 166(2): 676-88.

- 27 Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ. Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci* 2011; 36(9): 457-69.
- 28 Perry SJ, Baillie GS, Kohout TA, McPhee I, Magiera MM, Ang KL, *et al.* Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science* 2002; 298(5594): 834-6.
- 29 Lynch MJ, Baillie GS, Mohamed A, Li X, Maisonneuve C, Klussmann E, *et al.* RNA silencing identifies PDE4D5 as the functionally relevant cAMP phosphodiesterase interacting with beta arrestin to control the protein kinase A/AKAP79-mediated switching of the beta2-adrenergic receptor to activation of ERK in HEK293B2 cells. *J Biol Chem* 2005; 280(39): 33178-89.
- 30 Ferguson SS, Downey WR, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, Caron MG. Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted g protein-coupled receptor internalization. *Science* 1996; 271(5247): 363-6.
- 31 Lin FT, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher JA, *et al.* Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J Biol Chem* 1997; 272(49): 31051-7.
- 32 Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, Barak LS, Caron MG. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 2000; 275(30): 23120-6.
- 33 Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for g protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 2000; 275(22): 17201-10.
- 34 Naga PS, Laporte SA, Chamberlain D, Caron MG, Barak L, Rockman HA. Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex. *J Cell Biol* 2002; 158(3): 563-75.
- 35 McDonald PH, Cote NL, Lin FT, Premont RT, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation. *J Biol Chem* 1999; 274(16): 10677-80.
- 36 Claing A, Chen W, Miller WE, Vitale N, Moss J, Premont RT, *et al.* Beta-arrestin-mediated adp-ribosylation factor 6 activation and beta2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem* 2001; 276(45): 42509-13.
- 37 Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 2001; 294(5545): 1307-13.
- 38 Shenoy SK, Xiao K, Venkataramanan V, Snyder PM, Freedman NJ, Weissman AM. Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 2008; 283(32): 22166-76.
- 39 Berthouze M, Venkataramanan V, Li Y, Shenoy SK. The deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate beta2 adrenergic receptor recycling and resensitization. *EMBO J* 2009; 28(12): 1684-96.
- 40 Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della RG, *et al.* Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 1999; 283(5402): 655-61.
- 41 Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Mada-bushi S, *et al.* Beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 2006; 281(2): 1261-73.
- 42 Tilley DG, Kim IM, Patel PA, Violin JD, Rockman HA. Beta-arrestin mediates beta1-adrenergic receptor-epidermal growth factor receptor interaction and downstream signaling. *J Biol Chem* 2009; 284(30): 20375-86.
- 43 Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte S, Oakley RH, *et al.* The stability of the g protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* 2003; 278(8): 6258-67.
- 44 Noma T, Lemaire A, Naga PS, Barki-Harrington L, Tilley DG, Chen J, *et al.* Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J Clin Invest* 2007; 117(9): 2445-58.
- 45 Morisco C, Marrone C, Galeotti J, Shao D, Vatner DE, Vatner SF, *et al.* Endocytosis machinery is required for beta1-adrenergic receptor-induced hypertrophy in neonatal rat cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2008; 78(1): 36-44.
- 46 Gong K, Li Z, Xu M, Du J, Lv Z, Zhang Y. A novel protein kinase A-independent, beta-arrestin-1-dependent signaling pathway for p38 mitogen-activated protein kinase activation by beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 2008; 283(43): 29028-36.
- 47 Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, *et al.* Independent beta-arrestin 2 and g protein-mediated pathways for angiotensin ii activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(19): 10782-7.
- 48 Yue R, Kang J, Zhao C, Hu W, Tang Y, Liu X, *et al.* Beta-arrestin1 regulates zebrafish hematopoiesis through binding to YY1 and relieving polycomb group repression. *Cell* 2009; 139(3): 535-46.
- 49 Hara MR, Kovacs JJ, Whalen EJ, Rajagopal S, Strachan RT, Grant W, *et al.* A stress response pathway regulates DNA damage through beta2-adrenoreceptors and beta-arrestin-1. *Nature* 2011; 477(7364): 349-53.
- 50 Singh M, Moniri NH. Reactive oxygen species are required for beta2 adrenergic receptor-beta-arrestin interactions and signaling to ERK1/2. *Biochem Pharmacol* 2012; 84(5): 661-9.

β -arrestin and β -adrenergic Receptor

Yang Chengzhi, Li Zijian*

(Institute of Vascular Medicine, Peking University Third Hospital, Key Laboratory of Cardiovascular Molecular Biology and Regulatory Peptides, Ministry of Health, Key Laboratory of Molecular Cardiovascular Sciences, Ministry of Education and Beijing Key Laboratory of Cardiovascular Receptors Research, Beijing 100191, China)

Abstract The Nobel Prize in Chemistry 2012 was awarded jointly to Robert J. Lefkowitz and Brian K. Kobilka “for studies of G-protein-coupled receptors”. Robert J. Lefkowitz discovered β -arrestin1 more than 20 years ago, when he studied the mechanism of β -AR (β -adrenergic receptor) desensitization, and proved that it involves in the desensitization, internalization and degradation of β -AR in his subsequent researches. More recently, new evidence has revealed the “biased agonism” of β -arrestin dependent signal pathway of β -AR, which is independent of G protein. Excitingly, this biased signaling was suggested to confer cardioprotection. In addition, β -AR blockers were discovered and widely used in the pharmacotherapy of cardiovascular diseases among many other β -AR targeted cardiovascular drugs, which was a breakthrough in the 20th century. However, most of these drugs take effect only by regulating the β -AR itself and block all of the signal pathways and functions, including both the pathological signaling and effect induced by the increased stimulation of β -AR and the normal physiological ones, which leads to some severe adverse reactions. Therefore, it will be a great progress in the treatment of cardiovascular diseases to develop the drug that can both selectively block the harmful signaling and effect and activate the beneficial physiological signaling (such as the β -arrestin signaling) of β -AR. The research and development of ligand drug for β -AR will focus on its highly selective downstream signal pathways. This article is to review the discovery of the β -arrestin and its interaction with β -AR, to offer a reference for the pharmacotherapy of cardiovascular diseases.

Key words β -arrestin; β -adrenergic receptor; GPCR

This work was supported by the International Cooperation and Exchanges NSFC (No.30910103902), the National Natural Science Foundation