

G 蛋白偶联受体激酶的调控

谢毅 龚兴国* 钟文涛

(浙江大学生物大分子与酶工程研究所, 杭州 310027)

摘要 G 蛋白偶联受体激酶(G protein-coupled receptor kinase, GRK)特异地使活化的 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)发生磷酸化及脱敏化, 从而终止后者介导的信号转导通路。研究表明, GRK 的功能被高度调控, 并具有下行调节 GPCR 的能力。调控 GRK 功能的机制包括两个层次: (1)多种途径调控激酶的亚细胞定位及活性, 包括 GPCR 介导、G 蛋白偶联、磷脂作用、Ca²⁺ 结合蛋白调控、蛋白激酶 C 活化、MAPK 反馈抑制、小窝蛋白抑制等; (2)调控 GRK 表达水平, 主要体现在其与某些疾病的联系。

关键词 G 蛋白偶联受体激酶; G 蛋白偶联受体; 调控; 脱敏化

上世纪 80 年代中期, 发现 β 肾上腺素受体(β -adrenergic receptor, β AR)激酶是视紫红质(rhodopsin)激酶的功能同源物, 提示了一类丝氨酸/苏氨酸激酶基因家族的存在, 此家族成员能特异地使与激动剂结合的 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)磷酸化。这种 GPCR 激酶(后来称为 G protein-coupled receptor kinase, 即 GRK)所催化的受体磷酸化反应是受体与 G 蛋白解偶联的起始及关键步骤, 可导致 GPCR 转导信号的减弱或脱敏化。目前已经成功鉴定出 7 种 GRK。本文总结了目前对 GPCR 的多种调控过程, 以及在不同生理条件下影响 GPCR 调控的生化及分子机制。

1 GRK 亚细胞定位及活性的调控

早期对 GRK 的结构功能研究表明, 其 C 端在膜定位或转移中具有重要作用, 而 N 端具有受体识别功能。近来发现了更多的 GRK 结合蛋白, 确定在 GRK 两端都存在若干的蛋白质结合区域(图 1)^[1]。研究表明, 各种 GRK 结合蛋白对 GRK 的膜/底物定位和激酶活性的调控方式是不同的。

1.1 GPCR 介导

早期发现, 当与它的相关受体即视紫红质结合时, 视紫红质激酶(GRK1)的催化活性会得到加强。Fowles 等^[2]注意到 GRK1 在体外催化某种多肽底物磷酸化时依赖于视紫红质和光的存在, 而活化受体(β_2 -肾上腺素受体或视紫红质)的存在将增加 GRK2 (β ARK1)催化蛋白磷酸化反应的 EC₅₀ 和 V_{max}^[3]。近来有研究证明活化的阿片样物质受体(opioid receptor)介导了 GRK2 与 G $\beta\gamma$ 亚基结合、向细胞膜转移过程及催化活性, 相信是受体-GRK 的相互作用诱导

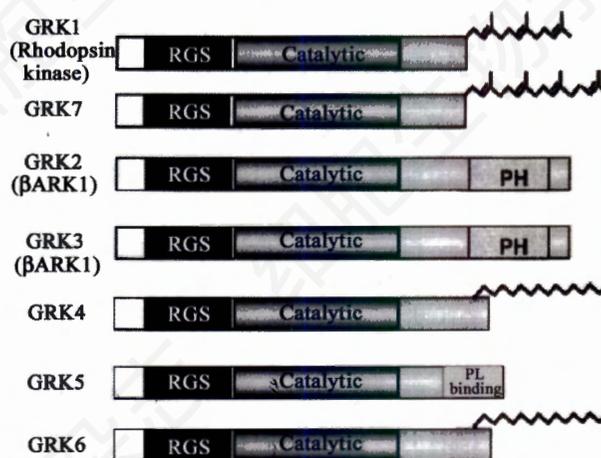


Fig.1 Dominant structure of G protein-coupled receptor kinase (GRK)^[1]

RGS: regulator of G protein signaling homology domain. PH: pleckstrin homology domain. PL: phospholipid.

GRK 发生构象改变, 从而解除自身抑制, 这与多种激酶的活化方式一致。

1.2 与 G 蛋白偶联

GRK2 和 GRK3 被 GPCR 活化后, 发生转移到达细胞膜。一旦 GPCR-G 蛋白被激活, G $\beta\gamma$ 亚基与 α 亚基的分离促使 $\beta\gamma$ 亚基与 GRK2、GRK3 以及 GRK2 和 GRK3 与细胞膜的结合。GRK2 上的 G $\beta\gamma$ 结合区定位于血小板-白细胞 C 激酶底物(pleckstrin)同源框的 β 折叠 III 及其延伸端的 α 螺旋。若此结合区发生突变, 将导致 GRK2 失去结合 G $\beta\gamma$ 或失去磷酸化 GPCR 的能力。小肽 minigene(β ARKct)也含有此

结构域,研究表明它对自由的 $G\beta\gamma$ 亚基存在阻滞效应,并协助某些信号转导过程^[1]。最近在 GRK2 的 N 端发现另一个 $G\beta\gamma$ 结合区可调控催化受体磷酸化过程,并抑制由 $G\beta\gamma$ 激活的信号转导过程^[4]。

GRK2 与活化的 $G\alpha_q$ (即 G_q 的 α 亚基)具有高亲和力,两者的结合能有效抑制完整细胞中由 $G\alpha_q$ 介导的磷脂酶 C 活性。GRK2 和 GRK3 的 N 端存在由 120 个氨基酸残基组成的 G 蛋白信号调控子(regulator of G protein signaling, RGS), 而其中的大部分保守氨基酸残基也被发现存在于 GRK 家族其他成员的 RGS 疏水核心区中。

1.3 磷脂促进 GRK 的膜定位及催化活性

除了 $G\beta\gamma$, 磷脂也能与 GRK2、GRK3 直接结合, 实现两者的膜定位。同时, 磷脂能显著地增强激酶的催化活性, 例如脂质体的存在可以增加 GRK2 催化的多肽及可溶性蛋白质磷酸化。

GRK5 跟 GRK4、GRK6 一样, 在 C 端存在高度保守的磷脂结合区域。若去除此结构域将严重损害 GRK5 与脂质体的作用, 并大大增加视紫红质磷酸化反应的 K_m (酶促反应动力学常数)值。

另外, GRK4、GRK5、GRK6 的 N 端可能含有单独的磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP_2)特异性结合区域。在纯粹由卵磷脂组成的脂质体中加入 PIP_2 , GRK4、GRK5 或 GRK6 催化的重组 β_2AR 磷酸化水平被显著提高, 相信 PIP_2 结合区能够介导 GRK 到达细胞膜上的 PIP_2 富集区域。但值得注意的是, 若在 COS-1 细胞中表达 C 端缺失的 GRK5, 那么假定的 N 端 PIP_2 结合区域并不足以促使完成蛋白膜定位^[5]; 而对于融合绿色荧光蛋白的 GRK5, 其 C 端的磷脂结合区似乎也具有细胞膜结合能力。

1.4 Ca^{2+} 结合蛋白对 GRK 的调控

Ca^{2+} 结合蛋白能对 GRK 的所有亚型进行调控, 如介导视紫红质激酶的某种抑制过程。GRK1 可与视觉恢复蛋白(recoverin)结合并受到抑制, 后者是 23 kDa 的质子受体特异性 Ca^{2+} 结合蛋白, 其对 GRK 的抑制作用能通过豆蔻酰化得到加强。视觉恢复蛋白与 GRK1 N 端 25 个氨基酸区域内的单一位点结合, 通过对 GRK1- 视紫红质的空间构型产生位阻效应, 从而抑制其活性。

GRK2、GRK3、GRK4、GRK5 和 GRK6 在体外能被钙调蛋白(CaM)所调控。GRK 具有两个 CaM 结合位点, 其中定位于 N 端的位点相对保守, 定位于 C 端的位点则随 GRK 的亚型不同而发生位置变换。GRK5 C 端的 CaM 结合区与磷脂结合区发生重叠, 从而解释了 CaM 对 GRK5 与脂质体结合, 及其对膜结合受体磷酸化的抑制。因为任意的 CaM 结合位点都足以抑制受体磷酸化, 故只有同时对 GRK5 的 N 端和 C 端进行突变或缺失才能使其对 CaM

不敏感。

CaM 促使 GRK5 在其 C 端的一个或多个丝氨酸残基处发生自磷酸化, 从而直接抑制后者与视杆细胞外膜(rod outer segment membrane, ROS membrane)的结合以及视紫红质的磷酸化。即使将胞内升高的 Ca^{2+} 浓度($[Ca^{2+}]_i$)恢复至正常水平, 这种自磷酸化也足以延续 CaM 对 GRK5 的抑制作用。

最近在微管蛋白和共核蛋白(synuclein)家族等新发现的 GRK 非受体底物的磷酸化过程中, 确认 CaM 介导了更复杂的调控过程。肌动蛋白与 GRK5 的 N 端结合, 并抑制 GRK5 对受体底物或非受体底物的磷酸化。但当 CaM 取代肌动蛋白与 GRK5 结合时, 结果只有可溶性底物的磷酸化程度得到了增加^[6]。

1.5 PKC 活化 GRK

PKC 活化 GRK2 的能力已在人单核细胞中得到证实。GRK2 被 PKC 磷酸化后, 对非受体底物的催化活性并无增强, 但增加了膜结合视紫红质的活性^[7], 说明 PKC 通过加强其向膜的转运而实现 GRK2 的活化。

GRK5 C 端的 26 个氨基酸区域内也存在两个 PKC 磷酸化位点。与 GRK2 相反, PKC 介导的 GRK5 磷酸化显著减少了 GRK5 与 ROS 膜的结合及受体磷酸化, 并极大降低了 GRK5 对非受体底物的磷酸化能力。

已经证明 Ca^{2+}/CaM 、PKC 对 GRK2 和 GRK5 存在作用, 提示它们被 G_i 或 G_q 偶联受体激活时对 GPCR 具有协调调控作用(图 2)^[8]。

若在同一细胞中同时激活多种 GPCR, 则会产生 Ca^{2+}/CaM 、PKC 增强 GRK2 活性和受体底物脱敏性的净效应。相反地, Ca^{2+}/CaM 、PKC 对 GRK5 的抑制维持了后者介导的受体底物信号转导过程。在转基因小鼠的心脏中, GRK2 和 GRK5 都可以调

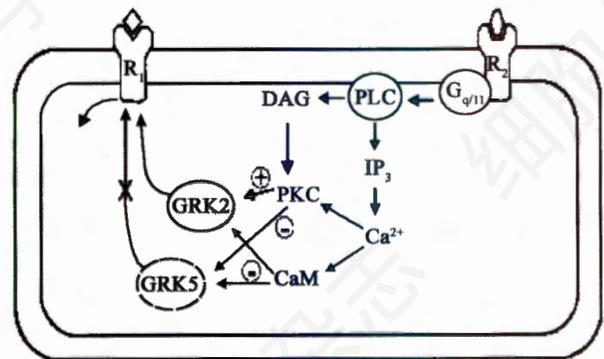


Fig.2 Proposed mechanism of GRK regulation by Ca^{2+}/CaM and PKC^[8]

Activation of phospholipase C results in Ca^{2+}/CaM and PKC activation, which preferentially inhibits GRK5 phosphorylation of GRK5-specific receptor substrates. In contrast, GRK2 may be activated (PKC) or inhibited (Ca^{2+}/CaM) by these pathways.

控 β_2 ARs, 并与 G_s 、cAMP 偶联^[9,10]。但被 PLC、PKC 偶联激活的心肌 1A 型血管收缩素 II 受体只受到 GRK2 的调控, 而不受 GRK5 影响^[10]。在表达 G_q 偶联 α_{1b} 肾上腺素受体的 COS-7 和 HEK293 细胞中, 观察到类似的 GRK5 介导脱敏化的抵抗, 提示 GRK5 与 GRK2、GRK3 不同, 其并不引起激动剂依赖性的磷酸化和脱敏化水平增加^[11]。

1.6 p42/p44 MAPK、Src 对 GRK 的反馈抑制

不依赖 GPCR-G 蛋白的信号通路(如 RPTK-p42/p44 MAPK 通路)也存在对 GRK 的调控^[12]。在体外, p44 MAPK 可使 GRK2 的 Ser670 发生磷酸化, 显著降低后者的催化能力及对 $G\beta\gamma$ 的敏感性。此外, 在共转染 β_2 AR 和 GRK2 基因的 HEK293 细胞中, MEK1 (p42/p44 的上游激活子)显性负突变体的表达可大大提高依赖去甲肾上腺素的 β_2 AR 磷酸化。

近来证明, 另一个促有丝分裂信号通路的重要成分——酪氨酸激酶 Src 也存在对 GRK2 的磷酸化调控作用^[13]。如果使持续活化的 Src 突变体过度表达, 将导致共表达的 GRK2 发生酪氨酸磷酸化, 从而增加后者对受体底物和非受体底物的活性。

研究表明, p42/p44 和 Src 是 GRK 活性的生理调控分子, 由此提出了受体酪氨酸激酶和 GPCR 信号通路交叉调控的模式。

1.7 小窝蛋白对 GRK 的抑制

小窝蛋白(caveolin)是细胞膜内陷微区的主要结构蛋白。作为信号分子复合物的骨架, 小窝蛋白直接导致许多信号分子的失活或钝化。GPCR 在细胞膜内陷微区的发现以及 GRK2 的 C 端 PH 结构域小窝蛋白结合基序的存在, 提示了 GRK 与小窝蛋白的反应原理^[14]。在体外, GRK2、GRK1、GRK5(虽然两者并没有 PH 结构域)显示了与 GST-小窝蛋白 1 融合蛋白的特异结合, 其 N 端结合位点在 GRK 中高度保守。在 A431 和 NIH3T3 细胞中, 内源 GRK2 与小窝蛋白被共分馏(cofractionation), 从而揭示了两者的联系, COS-1 细胞中 GRK2 与小窝蛋白的免疫共沉淀也进一步支持了这一点。同时, GRK2 的催化活性能被小窝蛋白 1 和小窝蛋白 3 的骨架区多肽强烈抑制。以上研究提示, 细胞膜内陷对 GRK 的分隔具有重要作用, 这种潜在的 GRK 快速活化/去活机制对于某些信号通路转导来说可能是必要的。

2 GRK 表达调控与某些疾病的关系

除了上述的快速、动态调控, GRK 蛋白的表达存在另一种调控方式。在大部分细胞中, GRK 以管家基因蛋白形式呈低水平表达。但在肺细胞中, 观察到 GRK2 表达与 β_2 AR 脱敏化之间存在明显联系, 而促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin

releasing factor, CRF)或 urocortin 也能通过诱导 GRK3 的上调导致 CRF 受体脱敏化的增加。另外, 吗啡或雌激素的处理也能引起 GRK 的上调或下调反应, 表明 GRK 的表达是激动剂依赖的 GPCR 脱敏化过程中的限制因素^[15,16]。

2.1 GRK 的表达与心脏疾病的关系

在心肌层中对 GRK 进行有目的的过度表达或抑制, 发现 GRK2 对 GPCR 和心肌功能的调控具有关键作用。强心剂引发的 GRK2 或 GRK5 过量表达严重损害了 β AR 信号转导和 β 激动剂介导的收缩功能^[9,10]。相对地, 如果过度表达抑制 GRK2 的小肽 minigene (β ARKct)则出现相反效应^[9]。另外, 对于 β ARKct 过量表达且 GRK2 基因剔除的杂合体小鼠, 其杂交后代同时出现了 GRK2 活性的减弱和心肌收缩功能的加强^[17], 提示心脏收缩功能对 GRK2 的表达水平非常敏感。

Fowler 等^[18]在人心力衰竭时发现了 β AR 的脱敏化及下调情况。Ungerer 等^[19]随后证实, GRK2 的 mRNA 浓度和蛋白质活性在心力衰竭末期得到提高, 提示 GRK2 与 β AR 脱敏化、心力衰竭密切相关。在其他如血压超荷、心肌缺血和心肌梗塞等心脏病理研究中, 也观察到类似的 GRK2 活性或表达水平的上调(2~3 倍)。

Choi 等^[20]评价了 GRK2 和心力衰竭之间的关系。强心剂引发的 β ARKct 过量表达逆转了 β AR 的脱敏, 并实现 β 受体反应钝化。因此在肥大心脏中引入 GRK2, 可以调节 β AR 脱敏, 缓解横向大动脉的收缩压力, 降低肌肉收缩程度。类似地, β ARKct 过量表达的小鼠和 LIM 基因剔除的小鼠的杂合后代也不再出现 β AR 脱敏, 并伴有心脏收缩功能降低, 且其左心室也不再增大^[21]。

虽然在心力衰竭时诱导 GRK2 表达增加的机制还不清楚, 但近来的研究支持了心力衰竭初期明显加深的病症会刺激 GRK2 表达的模型。Iaccarino 等^[22]将去甲肾上腺素持续注入小鼠体内, 导致心肌肥大、 β AR 脱敏及 GRK2 mRNA、蛋白质表达量的增加。相反, 持续注入 β AR 激动剂则减少了 GRK2 的表达。另一项实验发现, 在多巴胺 β 羟化酶缺乏的小鼠心肌细胞中, GRK2 蛋白量及其活性出现降低, 而 β AR 反应性和细胞收缩能力则得到增强^[23]。以上研究表明, 体内 GRK2 的表达受到了儿茶酚胺的调控。

2.2 GRK 表达和高血压的关系

最近研究证明, 在高血压状态时 GRK2 的表达存在选择性调控。对正常血压和临界高血压的个体进行比较, 发现 GRK2 蛋白在血淋巴细胞中的表达与血压正相关, 而与 β_2 AR 介导的腺苷酸环化酶活性反相关^[24]。研究表明, GRK2 表达的增加损害了

β 肾上腺素介导的血管舒张, 从而引起高血压。而 GRK4 γ 的单核苷多态性能增加 GRK 的活性, 引起人原发性高血压^[25]。

2.3 GRK 表达与炎症反应的关系

Lombardi 等^[26]揭示了 GRK 在炎症反应中存在下调过程。在关节炎病人的脾细胞和肠淋巴结细胞中, GRK2、GRK3、GRK6 的表达水平及活性大幅降低, 而在胸腺细胞和非免疫器官如心脏或垂体中并没有发现这种效应。现在认为是高氧压引起了这种免疫系统的组织特异性反应^[27], 并造成 GPCR (如 β_2 AR) 反应能力的提高。

3 展望

虽然已做了大量的探索, 但目前关于 GRK 活性调控的分子机制仍来自推测。随着近来发现小窝蛋白、肌动蛋白、微管蛋白和 G 蛋白异三聚体等具有 GRK 作用的蛋白质, 相信答案将一步步得到阐述。GRK 的受体底物和非受体底物之间竞争的存在, 要求多种机制来相互阻遏, 或在胞液、细胞骨架和质膜间实现 GRK 的动态分配。许多重要的细胞信号转导过程和外部刺激都能在一定的细胞类型中对 GRK 蛋白的重新分配和活性调控进行稳定、动态的指导。确定这些机制之间的相互作用, 解释信号转导调控的过程, 将成为下一个前沿课题。

参考文献 (References)

- [1] Pitcher JA *et al.* *Ann Rev Biochem*, 1998, **67**: 653
- [2] Fowles C *et al.* *FEBS Lett*, 1988, **238**: 56
- [3] Chen CY *et al.* *J Biol Chem*, 1993, **268**: 7825
- [4] Eichmann T *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 8052
- [5] Pronin AN *et al.* *J Biol Chem*, 1998, **273**: 31510
- [6] Freeman JL *et al.* *J Biol Chem*, 1998, **273**: 20653
- [7] Winstel R *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 2105
- [8] Penn RB *et al.* *Trends Cardiovasc Med*, 2000, **10**: 81
- [9] Koch WJ *et al.* *Science*, 1995, **268**: 1350
- [10] Rockman HA *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 9954
- [11] Diviani D *et al.* *J Biol Chem*, 1996, **271**: 5049
- [12] Pitcher JA *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 34531
- [13] Sarnago S *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 34411
- [14] Carman CV *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 8858
- [15] Fan X *et al.* *Neuropharmacology*, 2002, **43**: 809
- [16] Ansonoff MA *et al.* *Brain Res*, 2001, **898**: 186
- [17] Rockman HA *et al.* *J Biol Chem*, 1998, **273**: 18180
- [18] Fowler MB *et al.* *Circulation*, 1986, **74**: 1290
- [19] Ungerer M *et al.* *Circulation*, 1993, **87**: 454
- [20] Choi DJ *et al.* *J Biol Chem*, 1997, **272**: 17223
- [21] Rockman HA *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 7000
- [22] Iaccarino G *et al.* *Circulation*, 1998, **98**: 1783
- [23] Cho MC *et al.* *Circulation*, 1999, **99**: 2702
- [24] Gros R *et al.* *Clin Pharmacol Ther*, 1999, **65**: 545
- [25] Felder RA *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 3872
- [26] Lombardi MS *et al.* *J Immunol*, 2001, **166**: 1635
- [27] Lombardi MS *et al.* *Mol Pharmacol*, 2002, **62**: 379

Regulation of G Protein-coupled Receptor Kinase

Yi Xie, Xing-Guo Gong*, Wen-Tao Zhong

(Institute of Bio-macromolecules and Enzymatic Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract G protein-coupled receptor kinase (GRK) specifically phosphorylate the agonist-activated form of G protein-coupled receptor (GPCR), raising its desensitization and then terminating the GPCR-induced signaling. Upon the discovery of GRK family since mid-1980s, it's desired for understanding the biochemical and molecular mechanism of regulation of the GPCR responsiveness. Recent studies demonstrated that the function of GRK is highly regulated, and in this manner regulates the responsiveness of GPCR, among those seven have been identified. The regulating mechanism of the GRK function could be understood in two aspects: (1) subcellular localization and the regulation of GRK kinase activity, including the interaction with GPCR, G protein, phospholipids, Ca²⁺-binding protein, PKC, MAPK, and caveolin; (2) the regulation of GRK expression level in correlation with some diseases, such as cardiovascular disease, hypertension, and inflammation.

Key words G protein-coupled receptor kinase (GRK); G protein-coupled receptor (GPCR); regulation; desensitization