

DOI: 10.13376/j.cblls/2014027

文章编号: 1004-0374(2014)02-0181-07

· 评述与综述 ·

G蛋白偶联受体与G蛋白相互作用的最新研究进展

姜云璐^{1,2}, 龚磊², 白波^{2*}, 陈京^{2,3*}

(1 曲阜师范大学生命科学学院, 曲阜 273165; 2 济宁医学院神经生物学研究所, 济宁 272000; 3 英国华威大学华威医学院, 考文垂 999020, 英国)

摘要: 传统观念认为, 在激动剂作用下, G蛋白偶联受体(GPCRs)能够激活G蛋白的 α 亚基, 从而使 $G\alpha$ 亚基与 $G\beta\gamma$ 亚基分离, 被激活的 $G\alpha$ 亚基通过信号转导进一步参与细胞的生理过程。但是, 最新研究发现GPCRs和G蛋白存在多种偶联关系, GPCRs不仅能够激活 $G\alpha$ 亚基, 还可以与 $G\beta\gamma$ 亚基相互靠近, 甚至会使G蛋白亚基构象发生重排而不分离, 这对于疾病发病机制的研究及新的药物靶点的发现具有重要意义。就GPCRs与G蛋白之间的相互作用以及最新研究技术作一简要综述。

关键词: G蛋白偶联受体; G蛋白; 荧光共振能量转移; 生物发光共振能量转移; 全内反射荧光显微镜
中图分类号: Q516 **文献标志码:** A

Advances in the research of interaction between G protein-coupled receptors and G proteins

JIANG Yun-Lu^{1,2}, GONG Lei², BAI Bo^{2*}, CHEN Jing^{2,3*}

(1 Department of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China; 2 Department of Neurobiology, Jining Medical University, Jining 272000, China; 3 Warwick Medical School, University of Warwick, Coventry 999020, UK)

Abstract: The interaction of G protein-coupled receptors (GPCRs) and G protein is an important part of signal transduction. Traditionally, GPCRs are able to activate $G\alpha$ subunit following agonist stimulation, resulting in the dissociation of $G\alpha$ subunit and $G\beta\gamma$ subunit. Activated $G\alpha$ then participates in the physiological processes of cells. However, recent researches reveal there are multiple coupling relationships between GPCRs and G protein. GPCRs can interact with different subtypes of $G\alpha$ and get close to $G\beta\gamma$ subunit. Even more, it was reported that activation of some heterotrimeric G proteins may trigger subunit rearrangement instead of dissociation of subunits, which is of great significance for researching the pathogenesis of disease and discovering new drug targets. In this paper, we review the interaction between GPCRs and G protein and the last research techniques.

Key words: G protein-coupled receptors; G protein; fluorescence resonance energy transfer; bioluminescence resonance energy transfer; total internal reflection fluorescence microscope

G蛋白偶联受体(G protein coupled receptors, GPCRs)是迄今发现的最大的膜蛋白受体超家族之一, 能够对胞外的信号产生应答, 并将其转化为胞内信号, 广泛参与人体内多种生理功能, 如心血管系统、神经系统、免疫系统与内分泌系统等, 是重要的药物靶点^[1-3]。传统模式认为, 在激动剂的作用下, GPCRs构象改变(图1 A-B), 暴露G蛋白的结合位点, 在鸟苷酸转换因子的协助下, 将 $G\alpha$ 亚基上GDP替换为GTP, 并促使 $G\alpha$ 亚基与 $G\beta\gamma$ 亚基分离^[1]。 $G\alpha$ -GTP可致第二信使分子(如cAMP、

IP_3 、DAG、 Ca^{2+} 等)大量生成, 进而激活蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)、蛋白激酶C(protein kinase

收稿日期: 2013-06-29; 修回日期: 2013-08-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(3097108, 3127-1243, 81070961, 81241052); 山东省自然科学基金项目(ZR2011CM027, 2012GSF11806); 泰山学者建设专项资金

*通信作者: E-mail: bbai@mail.jnmc.edu.cn; Tel: 0537-3616002(白波); E-mail: chenjnmc@163.com(陈京)

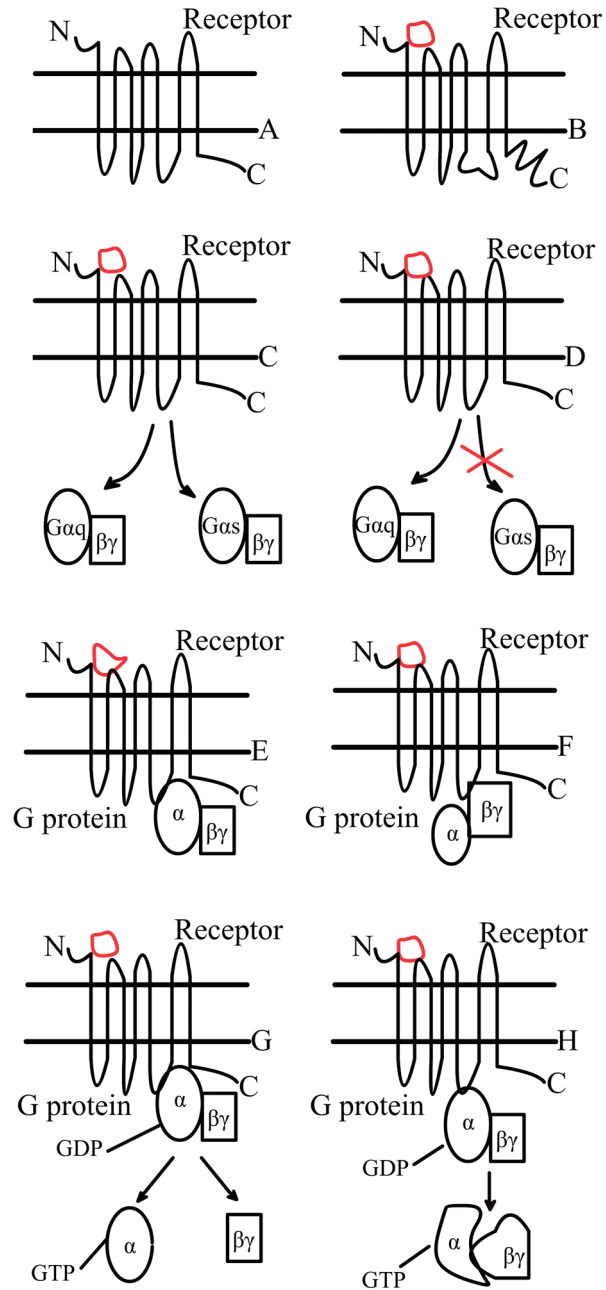
C, PKC) 等多种下游信号分子^[4-5]。当 $G\alpha$ 亚基再次与 GDP 结合时, 即处于失活状态, 随之会与 $G\beta\gamma$ 亚基结合, 抑制信号转导。活化的 GPCRs 通过脱敏、内化到细胞内, 被降解或再循环到细胞表面继续介导新的信号级联反应^[6]。因此, 明确 GPCRs 依赖 G 蛋白的信号转导途径至关重要。在过去的研究中, 人们将大量的精力集中于对 GPCRs 和 $G\alpha$ 相互作用的研究, 而忽略了 $G\beta\gamma$; 随着对 GPCRs 活化机制研究的不断深入和一些新型技术的出现, 如荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)、生物发光共振能量转移 (bioluminescence resonance energy transfer, BRET) 及全内反射荧光显微镜 (total internal reflection fluorescence microscope, TIRF) 技术等, GPCRs 和 G 蛋白各个亚基的相互作用得到了进一步详细的研究。本实验室也利用这些技术证实了除传统模式外, GPCRs 活化后与 $G\beta\gamma$ 亚基相互靠近, 甚至会使 G 蛋白各亚基间更加紧密, 发生构象重排而不发生分离, 这有利于揭示相关疾病发生的分子机理, 探寻相关疾病治疗的新突破点, 以及为新药开发提供理论依据。因此, 本文基于 G 蛋白介导的 GPCRs 的信号转导途径, 就 GPCRs 与 G 蛋白偶联的作用机制以及研究技术作一简要综述。

早在 20 世纪 60 至 70 年代, 随着放射性配体结合实验的运用, 使得 G 蛋白偶联受体的概念逐渐成熟^[7]。经过人们不断的努力, Lefkowitz 等^[8]于 1980 年提出配体-受体-G 蛋白三元复合体模型, 这一模型的提出为 GPCRs 领域开辟了新的研究视野。而几乎与此同时, Orly 和 Schramm^[9]提出了受体与 G 蛋白“碰撞偶联”的学说。这一学说认为, 受体与 G 蛋白在细胞膜上自由分布, 当受体活化以后作用于相对应的 G 蛋白。随后发现, GPCRs 种类繁多, 并且 G 蛋白也有众多亚型, 那么活化的受体是怎样迅速、准确、直接地作用于相关联的 G 蛋白, 人们对此提出了质疑。随后的几年里, Neubig 等^[10]提出了“预偶联”学说, 这在一定程度上合理解释了信号转导的特异性, 但依然存在着不足。新型技术的发展(如前所述), 使得实时监测活细胞内大分子物质的动态变化成为现实。目前, 这些技术已经成熟地运用于活细胞内蛋白质之间的相互作用、受体活化及活化的 G 蛋白的构象变化等领域, 同时也大大促进了 GPCRs 与 G 蛋白偶联的相互作用机制的研究。

1 GPCRs 激活 G 蛋白的信号转导模式

1.1 GPCRs 选择性地激活不同亚型 $G\alpha$ 亚基

除了上述传统模式以外, GPCRs 也可以通过其他模式激活 G 蛋白。近几年, 研究发现部分



A-B: 配体激活GPCRs后, 使其空间构象发生改变, 尤其是第3、6个跨膜螺旋区域; C-D: 不同的配体结合GPCRs, 激活不同亚型的G蛋白; E-F: 配体与受体结合以后, GPCRs 激活 $G\alpha$ 亚基, 与 $G\beta\gamma$ 亚基相互靠近; G-H: 活化的G蛋白伴随着 α 亚基上GDP被GTP的替代, $G\alpha$ -GTP与 $G\beta\gamma$ 亚基分离, 部分活化的G蛋白可呈现各亚基构象重排而不是彼此分离。

图1 GPCRs与G蛋白相互作用模式图

GPCRs 激活后能够选择性地与不同亚型的 $G\alpha$ 蛋白相结合, 从而激活相应的信号途径 (图 1 C-D)。例如, 利用不同激动剂刺激毒蕈碱乙酰胆碱受体 (muscarinic acetylcholine receptor, M-AChR) 会激活不同亚型的 G 蛋白。当卡可林 (carbachol) 作用于 M-AChR 时, 能同时激活 $G\alpha_q$ 与 $G\alpha_s$ 介导的胞内反应, 而匹罗卡品 (pilocarpine) 作用于此受体时, 则只能激活由 $G\alpha_q$ 介导的磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 信号途径, 而不能激活 $G\alpha_s$ 介导的信号途径^[11]。此外, 在研究 δ -阿片受体 (delta opioid receptor, DOR) 与感觉神经元特异性受体 (sensory neuron-specific receptor, SNSR-4) 时, 发现 DOR 与 SNSR-4 的二聚体偏向性地作用于 $G\alpha_q$ 的级联反应, 而不能激活 $G\alpha_i$ 下游信号途径。

1.2 GPCRs与G $\beta\gamma$ 亚基相互靠近

GPCRs 不仅能够选择性激活不同类型的 $G\alpha$ 亚基, 研究发现活化的 GPCRs 的第三个胞内环与 $G\beta\gamma$ 亚基彼此靠近 (图 1 E-F)。过去人们认为, 只有 G 蛋白的 α 亚基才能传递信息, $G\beta\gamma$ 二聚体只发挥稳定 $G\alpha$ 亚基的作用, 不会引起下游级联反应。Hein 等^[12] 和 Hommers 等^[13] 研究发现, 在共表达标记黄色荧光蛋白的 α_{2A} -肾上腺素受体 (α_{2A} -AR-YFP)、 $G\alpha_{i1}$ 、标记青色荧光蛋白的 $G\beta_1\gamma_2$ ($G\beta_1\gamma_2$ -CFP) 的 HEK293 细胞中, 当给予去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE) 刺激, FRET 信号随着 NE 浓度的升高而增强; 而在表达有 YFP 空载体、 $G\alpha_{i1}$ 、 $G\beta_1\gamma_2$ -CFP 的 HEK293 细胞中, 给予相同的刺激, 却检测不到任何 FRET 信号, 证实 α_{2A} -AR 被激活后与 $G\beta_1\gamma_2$ 亚基之间的距离是缩短的, 即 α_{2A} -AR 与 $G\beta_1\gamma_2$ 亚基在活化时彼此靠近。然而, 当用百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX) 预处理表达有 α_{2A} -AR-YFP、 $G\alpha_{i1}$ 、 $G\beta_1\gamma_2$ -CFP 的 HEK293 的细胞时 (PTX 阻断 $G\alpha_i$ 亚基上 ADP 与 ATP 的交换, 使 $G\alpha_i$ 失活), 给予 NE 刺激后, 由 $G\beta\gamma$ 亚基介导的 GIRK (G protein-coupled inwardly rectifying potassium) 完全失活, 但仍然能检测到 FRET 信号, 这表明失活的 $G\alpha_i$ 亚基不与 $G\beta\gamma$ 亚基分离, $G\beta\gamma$ 因未被激活而不能介导 GIRK 通道, 但 α_{2A} -AR 仍可与失活的 G 蛋白三聚体发生相互作用, 从而检测到 FRET 信号。值得关注的是, 这一实验现象与近期研究的同一个 G 蛋白的 $\beta\gamma$ 和 α 亚基相继与活化的视紫红质偶联的现象^[14] 相符合。受体活化后与 $G\beta\gamma$ 亚基相互靠近, 彼此距离缩短, 这是否意味着受体与 $G\beta\gamma$ 亚基也存在相互作用, 有待进一步研究。

1.3 异源三聚体G蛋白构象重排

近些年, 随着 GPCRs 与 G 蛋白的偶联机制的不断突破, G 蛋白构象变化方面的研究也有了新发现。传统上认为, G 蛋白活化后, $G\alpha$ 亚基与 $G\beta\gamma$ 亚基发生完全分离^[1]。这一反应机制能够解释由 $G\alpha$ 亚基引起的下游信号, 但却难以诠释由 $G\beta\gamma$ 亚基直接介导的信号途径 (如对 PTX 敏感的受体多由 $G\beta\gamma$ 亚基介导胞内反应)。近年来证实, 并不是所有 G 蛋白活化以后 $G\alpha$ 亚基都与 $G\beta\gamma$ 亚基相互分离。Vilardaga 等^[15] 提出, $G\alpha_{i1-3}$ 和 $G\alpha_z$ 亚型的 G 蛋白活化后, 其亚基之间并未相互分离, 而是空间构象发生了重排。与此同时, Bunemann 等^[16] 也证实了 $G\alpha_s$ 与 $G\alpha_i$ 亚型的 G 蛋白发生了空间构象的变化。这些结果表明, 细胞中 $G\alpha_i$ 蛋白激活后可能引发亚基重组而非完全解离, 从而在理论上合理解释 $G\alpha$ 亚基可引发某些 $G\beta\gamma$ -效应器介导的独特信号转导途径 (图 1 G-H)。本实验室利用 BRET^[17] 和 FRET (未发表) 技术研究了 apelin 受体 (APJ) 信号转导过程, 发现 APJ 能够激活 $G\alpha_{i2}$ 与 $G\alpha_{i3}$ 通路, 但是 G 蛋白的活化机制与传统不同, G 蛋白活化后 $G\alpha_i$ 亚基与 $G\beta_1\gamma_2$ 亚基不但不分离, 反而更加紧密。这一实验现象打破了传统观念认为的活化的 G 蛋白 $G\alpha$ 与 $G\beta\gamma$ 相互分离的观念, 提出了 APJ 偶联 G 蛋白机制的新观点, 也为研究由 APJ 介导的某些生理学功能 (如神经保护功能等) 提供了新思路。

2 决定GPCRs偶联G蛋白类型的因素

胞内蛋白种类数不胜数, 而 GPCRs 能够准确偶联并激活不同 G 蛋白, 从而介导下游信号级联反应。例如, M1 乙酰胆碱受体能同时偶联 $G\alpha_q$ 和 $G\alpha_{i1}$, 激活促进细胞增殖分化的有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 途径, 这与 GPCRs 和 G 蛋白的空间构象、偏向性配体的类型等是密不可分的。如前所述, 受体的空间构象在很大程度上决定了与 G 蛋白的偶联状况, 而配体的类型与受体间的相互作用却是影响受体空间构象变化的主要因素。

2.1 配体诱导的受体构象多样性

根据配体对受体的作用功效, 可将激动剂分为: 全效激动剂、部分激动剂、拮抗剂。全效激动剂与部分激动剂可将受体从非活化状态转变为活化状态, 并偶联 G 蛋白介导下游级联反应, 而拮抗剂却稳定受体的非活化状态。不同的配体能诱导受体产生不同的空间构象, 配体至少从三个方面影响受

体的空间构象变化。(1) 配体结合口袋的结构。GPCRs 的晶体结构显示,受体主要存在两种配体结合口袋,其主要结合口袋是由跨膜螺旋区 III (transmembrane helix III, TM₃)、IV、V、VI、和 VII 形成的,而次要结合口袋是由跨膜螺旋 I、II、III 和 VII 形成的^[18]。在研究偏向性配体时发现, TM2 上含有保守的脯氨酸,而它可能是决定配体偏向性的因素^[18]。(2) 受体中心区域的全面重排。比较 β_2 -肾上腺素受体 (β_2 -AR) 的活化构象与非活化构象的变化,发现 TM5 和 TM7 重排,也可看到 TM6 的胞质端远离细胞膜^[19-20]。(3) 受体胞内末端构象变化。在研究精氨酸抗利尿激素受体 (V2 arginine vasopressin receptor, V2R) 时发现, AVP (V2R 的全效激动剂) 不仅能改变 TM6 的构象,激活 $G\alpha_s$ 通路,且能诱导 TM7-H8 区域发生改变而募集 β -arrestin。V2R 的部分激动剂 MCF14 仅改变 TM6 的构象,激活 $G\alpha_s$ 通路,而不影响 TM7-H8 的空间构象^[21]。因此,配体主要从配体结合口袋的不同、受体中心区域的重排和受体胞内末端构象的变化来诱导受体构象的多样性以选择性偶联 G 蛋白,调节胞内的生理信号途径。

2.2 受体间的相互作用

受体构象的变化不仅与配体的特性有关,也受到受体间相互作用的影响。近年来通过应用原子力显微镜 (atomic force microscopy) 和共振能量转移技术等,获得了许多有力的证据支持 GPCRs 二聚或高阶寡聚体的存在,并且二聚体或高阶寡聚体的形成能够从构象上直接改变受体状态。受体构象的改变一方面是由于二聚体或高阶寡聚体能够形成新的结合口袋^[22],这种结合口袋能准确识别特定配体的结合。例如,6'-guanidinonaltrindole (6-GNTI) 可作用于 δ -阿片受体 (DOR) 与 κ -阿片受体 (KOR) 的二聚体,从而发挥镇痛功效,而对任一单个受体无效。此外,受体间的相互作用还能形成适合二价配体的结合位点。MDAN-18 是一种含有 μ -阿片受体 (MOR) 激动剂 (羟吗啡酮) 与 DOR 的拮抗剂 (NTI) 的化合物,是 MOR-DOR 二聚体的特异性的二价配体。研究发现,当 MDAN-18 作用于 MOR-DOR 二聚体时,能够产生比羟吗啡酮作用于 MOR 受体或 NTI 作用于 DOR 受体更强的抗损害性。另一方面,受体的相互作用能够通过变构调节改变受体的构象^[22]。采用 FRET 研究发现,二聚体形成的过程中,一个受体构象的改变将会引发邻近受体状态发生改变,如多巴胺受体 1 (dopamine receptor 1, D1) 和多巴胺受

体 2 (D2) 单体分别激活 $G\alpha_s$ 与 $G\alpha_i$ 信号途径,但形成 D1-D2 二聚体后, D1 受体空间构象的变化对 D2 受体产生变构调节作用,使二聚体转向激活 $G\alpha_{q/11}$ 介导的信号途径。

2.3 G蛋白不同亚型之间的竞争

GPCRs 的构象变化能够改变与 G 蛋白的偶联过程,种类繁多的 G 蛋白同样能影响其与受体的相互作用。虽然 G 蛋白根据编码氨基酸序列同源性可分为 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{12}$ 等众多亚型,但它们的基因序列具有很强的保守性^[23]。研究表明, $G\alpha_q$ 类的 6 个内含子在基因序列上的位置与 $G\alpha_i$ 类相同,且 $G\alpha_q$ 类、 $G\alpha_i$ 类均有 3 个与 $G\alpha_s$ 类的基因序列相同 ($G\alpha_q$ 的 1、3、4, $G\alpha_i$ 的 1、4、5 与 $G\alpha_s$ 的 1、6、8) 的内含子; $G\alpha_{11-2}$ 、 $G\alpha_o$ 和 $G\alpha_{11-3}$ 的所有内含子在基因序列上的位置均相同,并且其基因编码区具有相同的外显子-内含子序列。这表明不同亚型的 G 蛋白存在相似的空间结构,因此,它们可能存在竞争同一受体的能力,如在 HEK293 细胞中, $G\alpha_i$ 和 $G\alpha_q$ 都可以与缓激肽 II 受体结合,共同激活 Raf 及其后的 ERK/MAPK 信号途径。此外,细胞内的其他信号分子也会竞争性地作用于 GPCRs,如 β -arrestin 与 G 蛋白在 GPCRs 上具有相似的结合位点 (IL2、IL3、CIL3),从而竞争性地与受体结合^[24],而这种竞争的机制至今尚不明确,有待进一步研究。

3 研究GPCRs与G蛋白相互作用的新技术

研究 GPCRs 与 G 蛋白相互作用的传统技术包括免疫共沉淀、免疫共定位、GST 融合蛋白沉降等,这些技术自身存在一定的不足,无法满足在生理条件下检测受体或蛋白的相互作用。而 BRET、TIRF 及 FRET 等相关技术的出现解决了这一难题,它们可以实时、动态、连续地监测生理状态下受体-受体、受体-G 蛋白间的动力学关系,并且不会对细胞造成损伤,这为受体与 G 蛋白相互作用的动力学研究提供了更加便利、准确的研究手段。

FRET 是近年发展起来的用于研究蛋白质与蛋白质之间相互作用的新技术,如能量供体与能量受体之间的距离小于 10 nm,且供体的发射光谱与受体的激发光谱存在重叠区域,当用适当的激发光激发供体时,供体与受体之间会通过偶极-偶极耦合的作用发生非辐射的能量共振转移,从而实现 FRET 检测^[25-26] (图 2A)。Frank 等^[26] 在研究 α -肾上腺素受体 (α_{2A} -AR) 与 G 蛋白相互作用关系时,发现由 α_{2A} -AR 激活的 $G\alpha_{i1}$ 的 B-C ($\alpha_{B/C}$) 区域与 $G\beta_1\gamma_2$

的N末端相互靠近,而与 $G\beta_1\gamma_2$ 的C末端彼此分离。随后,他们利用FRET技术证实了 $G\alpha_{11-3}$ 与 $G\alpha_z$ 在被 α_{2A} -AR激活时, $G\alpha_{11-3}$ 及 $G\alpha_z$ 与 $G\beta_1\gamma_2$ 亚基发生构象重排,而 $G\alpha_o$ 与 $G\beta_1\gamma_2$ 亚基彼此分离,进一步实验证明 $G\alpha_i$ 蛋白的N末端区域(AA1-99)与 $\alpha_{B/C}$ 区域是引起 $G\alpha_i$ 亚基重排的主要因素。

BRET技术是另一种利用非辐射的共振能量转移来检测蛋白质与蛋白质之间相互作用的技术(图2B)。该技术利用生物发光素酶催化底物发出的光来激发荧光受体(如绿色荧光蛋白),完成供体与受体间的能量转移^[28-29]。Ayoub等^[30]运用BRET技术在研究蛋白酶激活受体1(protease-activated receptor 1, PAR1)与异源三聚体G蛋白的相互作用关系时,发现PAR1能够激活 $G\alpha_{11}$ 亚基,对 $G\alpha_{12}$ 、 $G\alpha_{13}$ 、 $G\alpha_o$ 亚基却几乎没有作用。利用时间分辨FRET(time-resolved FRET, TR-FRET)技术研究PAR1,

他们得出了与BRET相一致的结果。由此推测,同一受体对G蛋白不同亚基的亲和力是不同的,它可能选择性作用于某一个亚基。

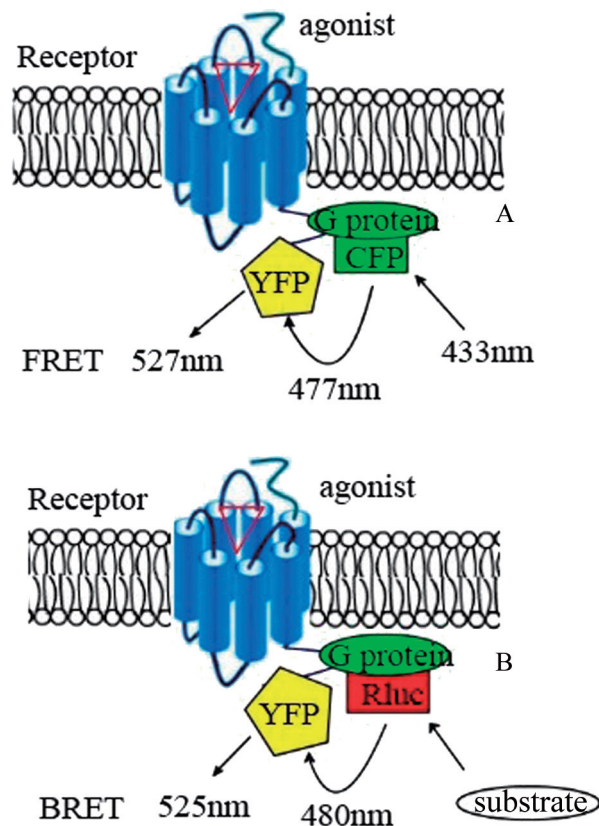
虽然FRET与BRET技术在细胞分子机制的研究方面具有传统技术无法比拟的优越性,也取得了一定的成果,但技术本身依然存在不足。首先,能量供体与能量受体的发射光谱有较大的重叠,因而增加了串色导致假阳性的可能^[31]。其次,FRET与BRET技术要求被监测的生物大分子本身没有内源性的荧光基团可以作为供体或受体,如色氨酸残基(Trp)^[32]、血红素等。此外,在研究受体二聚化、蛋白质之间相互作用及受体与蛋白质之间相互作用的领域中,这些技术基本都是应用于蛋白质的过表达系统,而这一过表达系统往往会造成许多假阳性结果。因此,已经发展起来的FRET、BRET技术因实验要求需要进一步的完善,如近期发展的小动物活体成像技术^[33-35]、BRET3^[36]、BRET6等。这种技术不存在自体荧光光漂白和与荧光团激发相关的组织衰减现象,有较高的光输出和高灵敏度,适合检测活体小动物中蛋白质与蛋白质的相互作用,能够反映在生物体内原生环境中的生理或病理刺激对蛋白质系统产生的复杂影响,这也许能从根本上解决上述蛋白质过表达系统导致的假阳性。

TIRF是在单分子水平上研究活细胞内信号转导机制的新技术。它的荧光激发深度在0~200 nm的薄层范围内,这一独特的优势能够实现单个荧光分子的直接探测,从而大大促进了细胞表面科学,如受体-配体相互作用、膜组分动力学、细胞信号转导和膜蛋白的相互作用的研究^[37]。运用TIRF技术证实了2-毒蕈碱受体与 γ -氨基丁酸受体可以形成异源二聚体^[38-39],但由于TIRF技术的荧光激发深度只有200 nm左右,使用范围比较局限。

4 结语

GPCRs与G蛋白的相互作用是信号转导途径中的关键环节,也是将胞外信号传递到胞内信号的重要枢纽。无论是受体还是G蛋白异常都将影响下游信号转导途径,引起机体正常生理状态的改变,从而导致疾病^[15,40-41]。因此,许多研究聚焦于GPCRs对各个亚型G蛋白的特异性作用及其机制,并在该领域取得了一定的成果。

就目前发展形势,未来几十年内,以GPCRs为药物靶点的药物将日益增加,明确GPCRs与G蛋白相互作用关系的细微变化将成为研发新药物的



A: 能量供体(CFP)与能量受体(YFP)之间的距离小于10 nm,当用适当的荧光(433 nm)激发CFP时,能量从CFP非辐射地共振转移到YFP上,产生有效的FRET信号; B: 当供体与受体之间的距离小于10 nm时,由生物发光素酶催化底物发出的光来激发受体,完成供体与受体之间的能量转移,产生有效的BRET信号。

图2 FRET和BRET的基本原理图

主流。FRET、BRET 等新兴技术的出现以及各种技术的联合使用, 为 GPCRs 与 G 蛋白的作用机制提供了更有力的研究手段。这些技术不仅能从横向上全方位地研究受体-受体、G 蛋白亚基-亚基间的相互作用, 而且从纵向上更深入地解释了配体与受体结合、受体与 G 蛋白偶联以及 G 蛋白介导的信号转导途径等过程^[24]。此外, 还可利用这些技术辨别出 GPCRs 与 G 蛋白的结合状态在机体正常和疾病时的不同。对 GPCRs 与 G 蛋白的动力学关系的研究拓宽了研究视野, 提高了 GPCRs 作为药物靶点的特异性, 也为新药的研发与疾病的个性化治疗夯实了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Lohse MJ, Hein P, Hoffmann C, et al. Kinetics of G-protein-coupled receptor signals in intact cells. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(Suppl 1): S125-32
- [2] Moreno JL, Holloway T, Gonzalez-Maeso J. G protein-coupled receptor heterocomplexes in neuropsychiatric disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2013, 117: 187-205
- [3] Lagerstrom MC, Schiöth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(4): 339-57
- [4] Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, et al. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev*, 2003, 24(6): 765-81
- [5] Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 1991, 349(6305): 117-27
- [6] Magalhaes AC, Dunn H, Ferguson SS. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(6): 1717-36
- [7] Hill SJ. G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br J Pharmacol*, 2006, 147(Suppl 1): S27-37
- [8] De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 1980, 255(15): 7108-17
- [9] Orly J, Schramm M. Coupling of catecholamine receptor from one cell with adenylate cyclase from another cell by cell fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73(12): 4410-4
- [10] Neubig RR, Gantz RD, Thomsen WJ. Mechanism of agonist and antagonist binding to α_2 adrenergic receptors: evidence for a precoupled receptor-guanine nucleotide protein complex. *Biochemistry*, 1988, 27(7): 2374-84
- [11] Fisher A, Heldman E, Gurwitz D, et al. Selective signaling via unique M1 muscarinic agonists. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, 695: 300-3
- [12] Hein P, Frank M, Hoffmann C, et al. Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *EMBO J*, 2005, 24(23): 4106-14
- [13] Hommers LG, Klenk C, Dees C, et al. G proteins in reverse mode: receptor-mediated GTP release inhibits G protein and effector function. *J Biol Chem*, 2010, 285(11): 8227-33
- [14] Herrmann R, Heck M, Henklein P, et al. Sequence of interactions in receptor-G protein coupling. *J Biol Chem*, 2004, 279(23): 24283-90
- [15] Vilardaga JP, Bunemann M, Feinstein TN, et al. GPCR and G proteins: drug efficacy and activation in live cells. *Mol Endocrinol*, 2009, 23(5): 590-9
- [16] Bunemann M, Frank M, Lohse MJ. Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 16077-82
- [17] Bai B, Tang J, Liu H, et al. Apelin-13 induces ERK1/2 but not p38 MAPK activation through coupling of the human apelin receptor to the Gi2 pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, 40(4): 311-8
- [18] Rosenkilde MM, Benned-Jensen T, Frimurer TM, et al. The minor binding pocket: a major player in 7TM receptor activation. *Trends Pharmacol Sci*, 2010, 31(12): 567-74
- [19] Kahsai AW, Xiao K, Rajagopal S, et al. Multiple ligand-specific conformations of the β_2 -adrenergic receptor. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(10): 692-700
- [20] Preininger AM, Meiler J, Hamm HE. Conformational flexibility and structural dynamics in GPCR-mediated G protein activation: a perspective. *J Mol Biol*, 2013, 425(13): 2288-98
- [21] Rahmeh R, Damian M, Cottet M, et al. Structural insights into biased G protein-coupled receptor signaling revealed by fluorescence spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(17): 6733-8
- [22] Rozenfeld R, Devi LA. Receptor heteromerization and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*, 2010, 31(3): 124-30
- [23] Baltoumas FA, Theodoropoulou MC, Hamdrakas SJ. Interactions of the α -subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: a critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *J Struct Biol*, 2013, 182(3): 209-18
- [24] Zheng H, Chu J, Qiu Y, et al. Agonist-selective signaling is determined by the receptor location within the membrane domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(27): 9421-6
- [25] Lohse MJ, Nuber S, Hoffmann C. Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacol Rev*, 2012, 64(2): 299-336
- [26] Xia Z, Liu Y. Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. *Biophys J*, 2001, 81(4): 2395-402
- [27] Frank M, Thumer L, Lohse MJ, et al. G Protein activation without subunit dissociation depends on a $G\alpha_i$ -specific region. *J Biol Chem*, 2005, 280 (26): 24584-90
- [28] Pflieger KD, Eidne KA. Illuminating insights into protein-

- protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods*, 2006, 3(3): 165-74
- [29] Pflieger KD, Seeber RM, Eidne KA. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nat Protoc*, 2006, 1(1): 337-45
- [30] Ayoub MA, Al-Senaïdy A, Pin JP. Receptor-G protein interaction studied by bioluminescence resonance energy transfer: lessons from protease-activated receptor 1. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012, 3: 82
- [31] Ganesan S, Ameer-Beg SM, Ng TT, et al. A dark yellow fluorescent protein (YFP)-based resonance energy-accepting chromoprotein (REACH) for forster resonance energy transfer with GFP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(11): 4089-94
- [32] Guptasarma P, Raman B. Use of tandem cuvettes to determine whether radiative (trivial) energy transfer can contaminate steady-state measurements of fluorescence resonance energy transfer. *Anal Biochem*, 1995, 230(1): 187-91
- [33] Dragulescu-Andrasi A, Chan CT, De A, et al. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(29): 12060-5
- [34] De A, Gambhir SS. Noninvasive imaging of protein-protein interactions from live cells and living subjects using bioluminescence resonance energy transfer. *FASEB J*, 2005, 19(14): 2017-9
- [35] De A, Loening AM, Gambhir SS. An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. *Cancer Res*, 2007, 67(15): 7175-83
- [36] De A, Ray P, Loening AM, et al. BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals. *FASEB J*, 2009, 23(8): 2702-9
- [37] Irannejad R, Tomshine JC, Tomshine JR, et al. Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature*, 2013, 495(7442): 534-8
- [38] Boyer SB, Slesinger PA. Probing novel GPCR interactions using a Paul A. combination of FRET and TIRF. *Commun Integr Biol*, 2010, 3(4): 343-6
- [39] Sohn HW, Tolar P, Brzostowski J, et al. A method for analyzing protein-protein interactions in the plasma membrane of live B cells by fluorescence resonance energy transfer imaging as acquired by total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol*, 2010, 591: 159-83
- [40] Smrcka AV. Molecular targeting of G α and G $\beta\gamma$ subunits: a potential approach for cancer therapeutics. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34(5): 290-8
- [41] Seifert R. Regulation of G protein subunit composition in cardiomyocytes: pharmacological implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2013, 386(6): 455-7