

- receptor kinase reveal distinctive cell-type-specific roles in agonist-induced desensitization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (25): 12193~12197
- 6 Kaneko S, Takahashi H, Satoh M. Metabotropic responses to acetylcholine and serotonin of xenopus oocytes injected with rat brain mRNA are transduced by different G-protein subtypes. *FEBS-Lett*, 1992, **299** (2): 179~182
- 7 Watkins D C, Moxham C M, Morris A J, *et al.* Research communication suppression of G_{i2} enhances phospholipase C signalling. *Biochem J*, 1994, **299** (Pt 3): 593~596
- 8 de la Pena P, del Camino D, Pardo L A, *et al.* Gs couples thyrotropin-releasing hormone receptors expressed in xenopus oocytes to phospholipase C. *J Biochem*, 1995, **270** (8): 3554~3559

Antisense Technology and the Application in G-Protein Studies. YU Fang-Yuan, ZHOU Yuan-Guo

(*Research Institute of Surgery and Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China*).

Abstract Antisense technology at least include antisense oligonucleotides technology, antisense RNA technology and ribozyme technology. Antisense technology has been widely used in the studies of G-proteins, G-protein coupled receptors and their subtypes, the specific property of G-protein in signal transduction and the "cross talk" of G-proteins involved signal transduction system with other signal transduction systems.

Key words antisense technology, antisense oligonucleotides, antisense RNA, ribozyme, G-protein

谷氨酸受体可逆磷酸化及其功能*

高 灿 张光毅

(徐州医学院生物化学与分子生物学研究中心, 徐州 221002)

摘要 谷氨酸受体 (GluRs) C 端区存在被多种蛋白激酶磷酸化的位点, 同时又能被多种蛋白磷酸酶去磷酸化, 磷酸化的结果可使 Ca^{2+} 内流增加, 增强 GluRs 功能; 去磷酸化作用则相反. 正常情况下 GluRs 可逆磷酸化处于一种动态平衡状态, 在突触可塑性机制如长时程增强 (LTP) 中起重要作用, 而在病理状态如缺血性脑损伤中, 这种平衡失衡加重兴奋性神经元损伤.

关键词 谷氨酸受体, 蛋白激酶, 蛋白磷酸酶, 磷酸化, 长时程增强, 兴奋毒

学科分类号 Q517

蛋白质磷酸化在中枢神经系统 (CNS) 信号转导和调控中具有重要意义, 几乎所有受体活性调控的共同方式亦是最重要的方式就是磷酸化. 神经组织是许多蛋白激酶和蛋白磷酸酶含量最丰富的组织, 多功能的蛋白激酶主要是 cAMP 依赖性蛋白激酶 (PKA), Ca^{2+} 、磷脂依赖性蛋白激酶 (PKC), Ca^{2+} 、钙调素依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 及蛋白酪氨酸激酶 (PTK). GluRs 是 CNS 主要的兴奋性神经递质受体, 其可逆磷酸化在 CNS 信号转导中具有重要作用.

1 GluRs 的分子结构

根据药理学和电生理学研究, 将 GluRs 分成三种亚型: NMDA 受体、非 NMDA (AMPA 和 KA) 受体和代谢型受体 (mGluRs). 其中 NMDA 受体

(NRs) 是受配基调节的离子通道, 与 Ca^{2+} 通道相耦联; AMPA/KA 受体也是受配基调控的离子通道, 对 Na^+ 、 K^+ 有通透性, 现在证明一些受体亚型对 Ca^{2+} 也有通透性; mGluRs 则与 G 蛋白耦联. 近来对 GluRs 的分子克隆研究鉴定了一些同源亚基^[1]: AMPA 受体为 GluR1-GluR4; KA 受体为 GluR5-GluR7、KA1 和 KA2; NRs 为 NR1、NR2A-NR2D; mGluRs 有 mGluR1-mGluR8.

对于离子型 GluRs 跨膜拓扑结构, 以前曾普遍认为同其他神经递质受体一样, 具有四个跨膜区, 近年许多研究表明这一模型是不正确的^[2]. 现在认为离子型 GluRs 有三个或五个跨膜区, 而不是四

* 国家自然科学基金资助项目 (39770177).

收稿日期: 1998-05-14, 修回日期: 1998-08-03

个, C 端是在细胞内而不是在细胞外 (图 1), C 端区存在被多种蛋白激酶磷酸化的位点, 也有作者认为磷酸化位点在胞内 M3~ M4 环上^[3] (图 2). 由

于 GluRs 在突触可塑性中起关键作用, 而 GluRs 过度激活会引起神经元死亡, 因而了解其真正的跨膜结构及其可逆磷酸化具有重要意义.

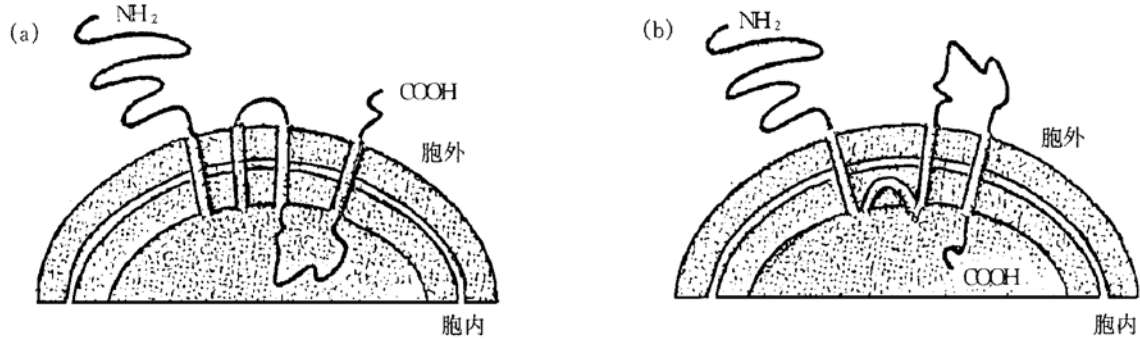


图 1 GluRs 跨膜拓扑结构
(a) 旧模型; (b) 新模型.

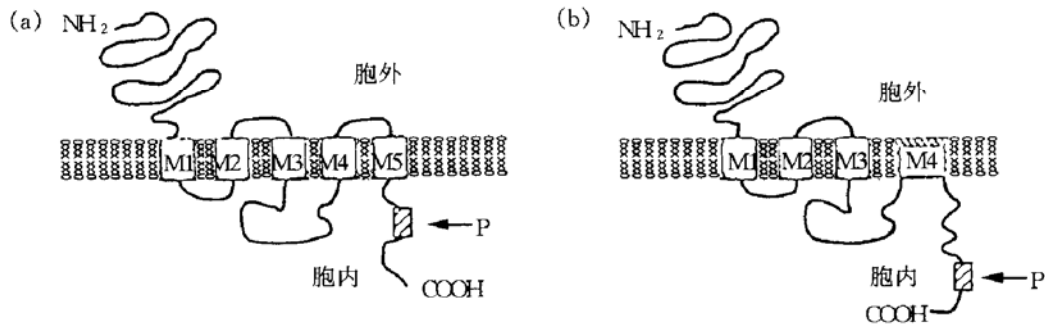


图 2 GluRs 磷酸化位点
“←P”代表磷酸化位点.

2 GluRs 磷酸化

2.1 NRs 磷酸化

NRs 是异聚体, NR1 是功能亚基, NR2 是调节亚基, NR2A 和 NR2B 在前脑是主要的 NRs 调节亚单位. NR2B 的 Ser1303 是 CaM PK II 的主要磷酸化位点, 这是第一个确定的 CaM PK II 磷酸化位点^[4]. PKC 磷酸化 NR1 亚基出现在几个特定区域, 大部分位点在 C 端区的单一可变剪切外显子, 并且 C 端结构域在胞内^[5]. 纯化的 PKC 和内源 CaM PK II 使突触后致密体 (PSD) 中 NR/通道部位不同位点磷酸化, Ca²⁺ 内流增加, 这是一种变构内流. PKC 提高 NR 反应是通过提高通道开放能力和降低电压依赖 Mg²⁺ 对 NR 通道的阻滞. 新近发现, PKC 能磷酸化 NR1 和 CaM 结合的 Ser 位点^[6]. CaM 也能调节通道敏感性, CaM 和 NR1 以 Ca²⁺ 依赖方式结合引起可逆的 NMDA 通道的失活, 这种负反馈系统调节 Ca²⁺ 通过 NRs 进入的量. 然而当 NR1 和 CaM 结合的 Ser 位点被 PKC 磷

酸化后, CaM 就不能和 NR1 结合, 以致不能使 NMDA 通道失活, 这可能导致长时程增强 (LTP) 的产生.

腺苷酸环化酶抑制剂毛喉素能提高 NRs 介导的突触反应, 并能逆转 μ 阿片样物质的抑制作用, 说明 NRs 功能受 PKA 调节, μ 阿片样物质能通过抑制突触后神经元 cAMP 级联反应抑制 NMDA 电流.

此外, PTK 也能直接作用 NRs. 在培养的海马神经元兴奋性突触有高水平的磷酸酪氨酸和 GluRs 共存. NR2A 和 NR2B 的 Tyr 位点能被 PTK 磷酸化, NR1 则不能, 这和 NR2 是调节亚单位观点一致. 低量 NR2 Tyr 磷酸化不仅说明存在基础磷酸化水平, 也说明在不同生理和/或病理条件反应时允许信息量放大.

2.2 非 NRs 磷酸化

对非 NRs 磷酸化研究较多的是 GluR1 和 GluR6. PKA 磷酸化 GluR1 Ser845, 导致通过 GluR1 同源通道峰电流提高 40%; PKC 磷酸化

Ser831 位点. 这些都和近来假设的 GluRs 跨膜拓扑模型一致, 即 C 端在胞内. AMPA 型 GluRs 是 CaM PK II 在突触后的主要靶物^[7]. 将 PSD 和 Ca²⁺、CaM 共同孵育, 可以提高 GluR1 和 GluR2/3 磷酸化. GluR1 磷酸化能被 CaM PK II 抑制剂明显阻止, 说明在 PSD, GluRs 能被 Ca²⁺/CaM 激活的内源激酶磷酸化. 对 GluR1, 主要是 CaM PK II 作用^[8]. CaM PK II 能使 GluR1 Ser627 位点磷酸化, 这个 CaM PK II 磷酸化位点存在于所有 AMPA/KA 型 GluRs^[3]. 这种 Ca²⁺/CaM 依赖的 GluRs 磷酸化可能是 LTP 中突触后受体反应增加的机制. CaM PK II 磷酸化非 NMDA 通道提高电流的机制仍在研究, 可能和改变通道特性有关 (如单通道传导和/或开放), 另一种可能是 GluRs 磷酸化提高了受体装配或插入膜. 此外, 在表达 GluR6 的 HEK 细胞, PKA 可直接磷酸化 GluR6 的 Ser684.

2.3 mGluRs 磷酸化

mGluRs 也能被磷酸化调节. mGluR1 α 的激动剂可在克隆的 BHK 细胞观察到显著、快速、短暂的基础水平的磷酸化, 这种快时程剂量依赖的磷酸化能被 PKC 抑制剂消除, 说明 PKC 和受体激动剂介导的磷酸化有关. PKC 对 mGluR5 α Thr840 位点的磷酸化, 与胞内钙浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 摆动有关, 首次证明了 PKC 磷酸化 G 蛋白偶联受体在产生胞内 Ca²⁺ 信号摆动中重要性, 说明 mGluR5 引发的 $[Ca^{2+}]_i$ 摆动在 Glu 传递中与多种胞内信号有关^[9]. 此外, CaM 亦能和 mGluR5 的 C 端区两个位点结合, 而 PKC 能磷酸化这两个 CaM 结合区.

3 GluRs 去磷酸化

GluRs 不仅被 PKs 磷酸化, 同时也被蛋白磷酸酶 (PPs) 去磷酸化. 突触的 NRs 可能处于磷酸化和去磷酸化状态的动态平衡, 这依赖于突触刺激率和 Ca²⁺ 通过 NRs 内流的大小^[10].

Lieberman 等^[11]用电生理方法研究了内源性 Ca²⁺ 依赖性 PP2B (即 CaN) 对 NR 通道的作用, 认为在成熟神经元, 通过 NMDA 通道的 Ca²⁺ 激活 CaN, 缩短了通道开放的持续时间, 从而形成一种负反馈, 防止 Ca²⁺ 堆积, 减轻兴奋毒对细胞损害. CaN 作为 Ca²⁺ 敏感的负反馈机制通过突触前机制限制了神经终末去极化时 Ca²⁺ 升高引起的囊泡释放能力. Wang 等^[12]研究了使 GluRs 或其他配体门控通道去磷酸的 PPs 主要是 PP1 和 PP2A. 此外, 磷酸酪氨酸磷酸酶 (PTPs) 也能作用磷酸化的

NRs, PTKs 和 PTPs 是细胞信号转导途径中的关键酶. 蛋白酪氨酸磷酸化是调节 NRs 新机制, 可能在神经发育、可塑性和毒性中有重要作用.

4 GluRs 可逆磷酸化在 CNS 中作用

4.1 在突触可塑性中的作用

短暂高频刺激引起海马 LTP, NRs 激活而引起的突触后 Ca²⁺ 浓度增加为诱发 LTP 所必需, LTP 的维持则和递质释放的持久性及 AMPA 型 GluRs 反应增加有关. 突触可塑性被 Ca²⁺ 介导的磷酸化和去磷酸化平衡的改变调节. Ca²⁺ 通过 NRs 内流, 启动快速的 Ca²⁺ 依赖的 Thr286 自身磷酸化而激活 CaM PK II, 活化的 CaM PK II (非 Ca²⁺ 依赖) 催化 AMPA 型受体某一位点磷酸化, 提高 AMPA 型受体的反应. LTP 的产生需共同激活 mGluRs 和 NRs^[6], NR 通道的激活对 LTP 是必需的, 但 mGluRs 的激活不是必需的. PKC 可使 NR1 和 CaM 结合的 Ser 位点磷酸化, 以致不能使 NMDA 通道失活, 这可能导致 LTP 的产生. LTD 即长时程抑制是由 Glu 释放下降介导的一种突触可塑性, 磷酸酶的作用包括 CaN 与突触反应下降有关. 磷酸化 AMPA 型 GluRs 引起 LTP, 同一位点去磷酸化产生 LTD, LTP 和 LTD 处于动态平衡, 这种平衡部分依赖于通过 NMDA 通道内流的 Ca²⁺·PKA、PTK 也参与了 LTP 的产生. 大量实验表明缺乏这些 PKs 或加入 PKs 抑制剂将阻止 LTP 产生^[8].

4.2 在脑缺血兴奋毒损伤中的作用

对于缺血后神经元损伤的机制, 主要是兴奋性氨基酸 (EAA) 的神经毒性作用和细胞内 Ca²⁺ 超载所引发的级联反应. Glu 是 CNS 主要的 EAA, 过量的 Glu 作用于 GluRs, 主要是 NRs, 产生 Ca²⁺ 内流使胞内 Ca²⁺ 升高, 激活 Ser/Thr 激酶 PKC 和 CaM PK II 及 Ser/Thr 磷酸酶 CaN, 此外还能激活蛋白酪氨酸磷酸化.

许多实验表明, 缺血或过量 Glu 导致 CaM PK II Thr286 发生自身磷酸化, 产生非 Ca²⁺ 依赖 CaM PK II 而激活, 活化的 CaM PK II (非 Ca²⁺ 依赖) 作用于底物, 包括 GluRs, 使之磷酸化增强, GluRs 可逆磷酸化的正反馈加强; 脑缺血时可能缺乏 CaN, 这就意味着负反馈的丧失^[11], 这样可使 NMDA 受体反应增强, Ca²⁺ 大量内流, 引起生化和生理改变, 导致神经元死亡^[13]. 另一方面还可引起 CaM PK II 向颗粒部位的转位, 转位的 CaM

PK II 和 PSD 结合, Thr286 自身磷酸化的 CaM PK II 主要被 PP2A 去磷酸化, 而和 PSD 结合后, 起作用的主要是 PP1, 即和 PSD 结合使之从 PP2A 的底物转变成 PP1 的底物, 这也许和兴奋毒损伤有关^[14]. 脑缺血兴奋毒也可使 PKC 活性下降、PKC 发生转位^[15]. PKC 的转位和随后的活性下降在皮质、海马和其他选择性的敏感神经元短暂缺血后的迟发损伤中的机制尚不清楚.

综上所述, GluRs 受磷酸化和去磷酸化的双重调节, 其可逆磷酸化在信号转导中起重要作用, 在缺血性脑损伤机制中的作用日益受到重视.

参 考 文 献

- Kaczmarek L, Kossut M, Kramka J. Glutamate receptors in cortical plasticity molecular and cellular biology. *Physiol Rev*, 1997, **77** (1): 217~ 255
- Barinaga M. A new face for the glutamate receptor. *Science*, 1995, **267** (5195): 177~ 178
- Yakel J L, Vissanajhala P, Derkach V A, *et al.* Identification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (5): 1376~ 1380
- Omkumar R V, Kiely M J, Rosenstein A J. Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-Methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem*, 1996, **271** (49): 31670~ 31678
- Tingley W G, Roche K W, Thompson A K, *et al.* Regulation of NR phosphorylation by alternative splicing of C-terminal domain. *Nature*, 1993, **364** (6432): 70~ 73
- Hisatsune C, Umemori H, Inoue T, *et al.* Phosphorylation-dependent regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by calmodulin. *J Biol Chem*, 1997, **272** (33): 20805~ 20810
- Hayashi Y, Ishida A, Katagiri H, *et al.* Calcium- and calmodulin-dependent phosphorylation of AMPA type glutamate receptor subunits by endogenous protein kinase in the post synaptic density. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997, **46** (1~ 2): 338~ 342
- Soderling T R. Modulation of glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Neurochem Int*, 1996, **28** (4): 358~ 361
- Kawabata S, Tsutsumi R, Kohara A, *et al.* Control of calcium oscillations by phosphorylation of metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 1996, **383** (6595): 89~ 92
- Tong G, Shepherd D, Jahr C E. Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. *Science*, 1995, **267** (5203): 1510~ 1512
- Lieberman D N, Mody I. Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca²⁺-dependent phosphatase. *Nature*, 1994, **369** (6477): 235~ 239
- Wang L Y, Orser B A, Brautigam O L, *et al.* Regulation of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons by protein phosphatases I and 2A. *Nature*, 1994, **369** (6477): 230~ 232
- Hajimochammadreza I, Probert A W, Coughenour L L, *et al.* A specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II provides neuroprotection against NMDA and hypoxia/hypoglycemia-induced cell death. *J Neurosci*, 1995, **15** (5): 1093~ 1101
- Strack S, Barban M A, Wadzinski B E, *et al.* Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases I and 2A. *J Neurochem*, 1997, **68** (5): 2119~ 2128
- Durkin J P, Tremblay R, Buchan A, *et al.* An early loss in membrane protein kinase C activity precedes the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J Neurochem*, 1996, **66** (3): 951~ 962

Reversible Phosphorylation of Glutamate Receptors and Its Effects. GAO Can, ZHANG Guang-Yi (*Research Center of Biochemistry and Molecular Biology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China*).

Abstract There are phosphorylation sites within the C terminal domain of glutamate receptors (GluRs) which not only can be phosphorylated by protein kinases but can be dephosphorylated by protein phosphatases also. The effects of phosphorylation can enhance Ca²⁺ influx and improve the function of GluRs, whereas dephosphorylation do on the contrary. The reversible phosphorylation of GluRs keep balance in normal conditions which play an important role in synaptic plasticity such as LTP, but it can enhance excitatory neuronal damage in pathological events such as ischemic brain damage when the balance lose.

Key words glutamate receptors, protein kinases, protein phosphatases, phosphorylation, long term potentiation, excitotoxicity