

УДК 576.32/.36

ДЕСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ МЕТАБОТРОПНОГО ГЛУТАМАТНОГО РЕЦЕПТОРА 5 КИНАЗОЙ 2 РЕЦЕПТОРОВ, СОПРЯЖЕННЫХ С G-БЕЛКОМ, НЕ ЗАВИСИТ ОТ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В КЛЕТКАХ HEK 293[#]

© 2013 г. Z. Zhang, L. Xue, H. Guo, Y. Li, H. Ding, S. Huang*

Sino-France Laboratory for Drug Screening, Key Laboratory of Molecular Biophysics of Ministry of Education, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430074, Hubei, China

Поступила в редакцию 14.04.2012 г.

Принята к печати 13.06.2012 г.

Метаботропный глутаматный рецептор 5 (mGluR5) — один из важных рецепторов, возбуждающих нейромедиаторы ЦНС, и его десенсibilизация киназами рецепторов, сопряженных с G-белками (GRK), играет важную роль в защите нейрона от перевозбуждения рецептором. Известно, что киназа GRK2 может подавлять сигнал рецептора mGluR5 в клетках HEK 293 и в нейронах. Однако вопрос о роли фосфорилирования в GRK2-опосредованной десенсibilизации mGluR5 остается открытым. В настоящей работе показано, что интенсивность сигнала и кинетика десенсibilизации mGluR5 тормозится или изменяется киназой GRK2 в клетках HEK 293. Используя каталитически неактивный мутант киназы GRK2-K220R и мутантные формы рецепторов, лишённые потенциальных сайтов фосфорилирования на C-конце, мы показали, что проводимая киназой GRK2 десенсibilизация рецептора mGluR5 не зависит от фосфорилирования. Так, избыточная экспрессия N-концевого домена GRK2 (домена RH), гомологичного регулятору передачи сигнала G-белка (RGS), ослабляла передачу сигнала рецептором mGluR5, тогда как экспрессия мутанта киназы GRK2-D110A, не связывающего Gαq, не влияла на этот процесс. Таким образом, в работе представлены доказательства того, что GRK2 осуществляет независимую от фосфорилирования десенсibilизацию mGluR5 через взаимодействие между доменом RH и Gαq в клетках HEK 293.

Ключевые слова: GRK2, mGluR5, десенсibilизация.

PHOSPHORYLATION-INDEPENDENT DESENSITIZATION OF METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 BY G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR KINASE 2 IN HEK 293 CELLS, by Z. Zhang, L. Xue, H. Guo, Y. Li, H. Ding, S. Huang* (Sino-France Laboratory for Drug Screening, Key Laboratory of Molecular Biophysics of Ministry of Education, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430074, Hubei, China; *E-mail: slhuang@mail.hust.edu.cn). The metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) is one of the important excitatory neurotransmitter receptors in the central nervous system, and its desensitization by G protein-coupled receptor kinases (GRKs) plays an important role in neuron protection against receptor overstimulation. It is reported that GRK2 could down-regulate the mGluR5 signaling in both HEK 293 cells and neurons. However, whether GRK2-mediated mGluR5 desensitization is phosphorylation dependent remains controversial. Here, we demonstrated that the signal intensity and kinetics of mGluR5 desensitization was inhibited or changed by GRK2 in HEK 293 cells. By using the catalytically inactive GRK2 mutant K220R, and the receptor mutants that lack potential phosphorylation sites in the C-terminal tail, we demonstrated that the GRK2-mediated mGluR5 desensitization was phosphorylation-independent. Furthermore, overexpression of an N-terminal regulator of G protein signaling (RGS) homology (RH) domain of GRK2 was sufficient to attenuate the mGluR5 signaling, whereas the expression of GRK2 D110A mutant devoid in Gαq binding was unable to inhibit mGluR5 signaling. In summary, this study provides evidence that GRK2 mediates phosphorylation-independent mGluR5 desensitization via the interaction between the RGS domain and Gαq in HEK 293 cells.

Keywords: GRK2, mGluR5, desensitization.

DOI: 10.7868/S0026898413010163

Принятые сокращения: Gαq — альфа субъединица G-белка; GPCR — сопряженные с G-белком рецепторы; GRK — киназа сопряженных с G-белком рецепторов; InsP — инозитол-1,4,5-трифосфат; mGluR5 — метаботропный глутаматный рецептор 5; GIRK — сопряженный с G-белком калиевый канал внутреннего выпрямления; домен RH — плекстрин-гомологичный домен; RGS — регулятор передачи сигнала G-белка; домен RH — домен, гомологичный RGS.

[#] Текст подан авторами на английском языке.

* E-mail: slhuang@mail.hust.edu.cn

Глутамат – основной возбуждающий нейромедиатор в центральной нервной системе млекопитающих. Он активирует и ионотропные, и метаботропные рецепторы [1]. Метаботропные глутаматные рецепторы группы I (mGluR1 и mGluR5) принимают участие в некоторых формах синаптической активности, действуя через активацию гетеротримерных G-белков. Рецепторы mGluR1 и mGluR5 активируют фосфолипазу C через субъединицу G α q/11, что приводит к образованию диацилглицерина и инозитол-1,4,5-трифосфата (InsP), в результате чего из внутриклеточных депо высвобождаются ионы Ca²⁺ [2, 3].

Чтобы защитить клетки от чрезмерной стимуляции рецептором, большинство GPCR (сопряженных с G-белком рецепторов) теряют чувствительность при длительном воздействии агониста и подвергаются быстрой интернализации. Десенсibilизация GPCR запускается различными GRK или киназами, зависимыми от вторичного посредника, такими как PKC [4]. GRK состоит из трех функциональных доменов: гомологичный RGS домен (RH), центральный каталитический домен и C-концевой G β γ -связывающий плекстрин-гомологичный домен (PH). Домен RH способен взаимодействовать с субъединицей G α G-белка, а домен PH содержит сайты связывания субъединицы G β γ [5–9]. Показано, что GRK2 и GRK3 взаимодействуют с G α q/11 [5], тогда как GRK4 связывается с G α i [10–11]. GRK-опосредованная десенсibilизация GPCR осуществляется либо по зависимому от фосфорилирования пути, либо по независимому [4–10]. В канонической модели GRK-опосредованная зависимость от фосфорилирования десенсibilизации рецептора обусловлена фосфорилированием C-концевого участка или третьей внутриклеточной петли GPCR, что приводит к связыванию β -аррестина и интернализации рецептора [4]. В то же время, GRK-опосредованная десенсibilизация GPCR, независимая от фосфорилирования, заключается в присоединении субъединицы G α к домену RH GRK и субъединицы G β γ к домену PH [5].

Как и у большинства GPCR, активность рецепторов mGluR группы I регулируется киназами GRK [12–20]. Известно, что GRK2, GRK4 и GRK5 вовлечены в процессы десенсibilизации и интернализации рецептора mGluR1 как в клетках эмбриональной почки человека HEK 293 [13], так и в первичных нейронах [14]. GRK2-опосредованная десенсibilизация mGluR1a и mGluR1b не обусловлена фосфорилированием и связыванием аррестина, а реализуется путем взаимодействия киназы GRK2 с субъединицей G α q через аминокислотный остаток D110 в домене RH и одновременно с рецептором через аминокислотный остаток D527 в домене PH [15–17]. Ф. Рибейро (Ribeiro) и др. [18], изучая накопление InsP, показали, что GRK2 вызывает независимую от фосфо-

рирования десенсibilизацию рецептора mGluR5 и его интернализацию в нейронах полостного тела. В то же время, Ф. Соренсен (Sorensen) и др. [19], анализируя силу тока через связанный с G-белком калиевый канал внутреннего выпрямления (GIRK), выявили, что GRK2-опосредованная десенсibilизация mGluR5 зависит от фосфорилирования в клетках HEK 293. Таким образом, кинетика GRK2-зависимой десенсibilизации mGluR5 пока остается неясной и требует дальнейшего изучения.

В данной работе исследованы молекулярный механизм и кинетика процесса GRK2-опосредованной десенсibilизации рецептора mGluR5 в клетках HEK 293. Показано, что GRK2-опосредованная десенсibilизация mGluR5 не зависит от фосфорилирования рецептора, а обусловлена взаимодействием между доменом RH киназы GRK2 и субъединицей G α q.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. В работе использованы: квискалат фирмы “Tocris Cookson” (Великобритания); Fluo-4-AM Fluoropure фирмы “Life Science Technology PerkinElmer” (США); мио-инозитол, [2-³H(N)] 10–25 Ки (370–925 ГБк/ммоль) фирмы “PerkinElmer”. Высокоаффинные моноклональные (клон 3F10) анти-НА антитела крысы, конъюгированные с пероксидазой хрена (horseradish peroxidase, HRP) фирмы “Roche” (Германия). Мышечные анти-Flag моноклональные антитела фирмы “Sigma” (США). Козьи антимышечные IgG антитела, конъюгированные с HRP, фирмы “Jackson Immuno Research” (США). SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate фирмы “Pierce Biotechnology” (США).

Плазмидные конструкции. Плазида pRK5, кодирующая рецептор mGluR5 дикого типа крысы с тэгом Flag, получена из НА-меченых крысиных рецепторов mGluR5, как было описано ранее. Исходная плазида, кодирующая GRK2, любезно предоставлена доктором С. Фергюсоном (Dr. Stephen S.G. Ferguson). Исходная плазида, кодирующая GRK4, любезно предоставлена доктором М. Бувье (Dr. Michel Bouvier). Мутантные конструкции mGluR5-K677A, K678A, K679A, KAA, AAA, T840A, G847 Δ , G847 Δ T840A, а также GRK2-K220R, D110A, D527A получены методом олигонуклеотид-направленного мутагенеза *in vitro* с помощью ДНК-полимеразы Pfu (“Stratagene”, США).

Культуры клеток и трансфекция. Клетки HEK 293 выращивали в среде DMEM с 10% FBS и трансфицировали методом электропорации по методике [21]. Согласно методике, 10⁶ клеток трансфицировали 0.6 мкг mGluR5, 4 мкг GRK2, 2 мкг EAAC1, и 2 мкг Gq, доводя общее количе-

ство плазмидной ДНК до 10 мкг при помощи пустого вектора pRK5.

Анализ экспрессии целевых белков на поверхности клеток. Для детекции НА-меченых или Flag-меченых конструкций на поверхности клетки использовали метод ИФА (ELISA) [22]. Через 24 ч после трансфекции клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в PBS, блокировали 30 мин 5% FCS в PBS и инкубировали 30 мин с HRP-конъюгированными анти-НА крысиными моноклональными антителами (0.5 мкг/мл) или с мышинными анти-Flag моноклональными антителами (0.5 мкг/мл) в PBS, содержащем 5% FCS. В случае метки Flag клетки инкубировали с вторичными козьими антителами, конъюгированными с HRP (1 мкг/мл). HRP-меченые антитела детектировали методом хемилюминесценции с использованием субстрата SuperSignal ELISA Maximum Sensitivity Substrate и счетчика люминесценции Envision (“Perkin Elmer”).

Анализ накопления инозитолфосфата (InsP). Накопление InsP в клетках HEK 293 оценивали по ранее описанной методике [22]. Накопление InsP в трансфицированных клетках изучали в 96-луночных планшетах после инкубации клеток в течение ночи с [³H]мио-инозитолом. Количество образовавшегося InsP измеряли после 30 мин инкубации с 10 мМ LiCl в присутствии или в отсутствие квискалата. Реакцию останавливали с помощью 0.1 М муравьиной кислоты. Супернатанты удаляли, а продуцированный InsP очищали в 96-луночных планшетах методом ионно-обменной хроматографии на смоле Dowex. Радиоактивность измеряли с помощью планшетного жидкостного сцинтилляционного счетчика Wallac 1450 MicroBeta (“Perkin Elmer”). Результаты выражали как уровень радиоактивности, превышающий радиоактивность мембранной фракции, растворимой в 10% Triton X-100 и 0.1 М NaOH. Кривые зависимости эффекта от воздействия были построены с использованием программы GraphPad Prism и уравнения: $y = \{[y_{\max} - y_{\min}] / [1 + (x/EC_{50})^n]\} + y_{\min}$.

Измерение уровня внутриклеточного кальция. Уровень внутриклеточного кальция в трансфицированных клетках HEK 293 измеряли по методике [23]. Кратко, клетки HEK 293 после трансфекции рассеивали на покрытые полиорнитинном 96-луночные планшеты с темными стенками и прозрачным дном и растили в течение 24 ч. Клетки промывали свежеприготовленным буфером, содержащим 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ глюкозы, 15 мМ HEPES, pH 7.4, и в среду добавляли 2 мМ чувствительного к Ca²⁺ флуоресцентного красителя Fluo-4-AM на 1 ч при 37°C в темноте. Затем клетки промывали и добавляли по 50 мкл среды. В отдельном планшете подбирали концентрацию агониста, и затем

50 мкл двукратного раствора добавляли в каждую лунку через 20 с после начала эксперимента. Флуоресценцию (длина волны возбуждения 485 нм, испускания – 525 нм) измеряли при помощи флуоресцентного микропланшетного счетчика Flexstation3 (“Molecular Devices”, США) с интервалом 1.5 с в течение 70 с. Значения “Peak”, “Basal” и “Slope” получены на основании полученных данных и их обчета с помощью программы SoftMax Pro 5.0 (“Molecular Devices”). Peak – это максимальное значение флуоресценции в интервале 0–60 с, Basal – среднее значение в интервале от 0 до 20 с, Decline slope – крутизна падения кривой в интервале от 27 до 33 с. Нормализованная крутизна падения (%) = $[100\% \times (\text{Decline slope})] / (\text{Peak} - \text{Basal})$. Данные представляют собой среднее значение нескольких независимых экспериментов ± стандартная ошибка.

Анализ данных. Для анализа данных, построения графиков и дисперсионного анализа использована программа GraphPad Prism. Для подтверждения статистической значимости применяли критерий Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

GRK2, но не GRK4 регулирует передачу сигнала от mGluR5 в клетках HEK 293

Известно, что GRK2 ингибирует опосредованную рецептором mGluR5 активацию GIRK в клетках HEK 293, что показано в экспериментах по локальной фиксации потенциала в целых клетках [19]. В кортикальных нейронах GRK2 регулирует передачу сигнала mGluR5, влияя на индуцируемое DHPG (специфическим агонистом рецепторов mGluR группы I) образование InsP [18]. С целью выявить роль киназы GRK2 в передаче сигнала от mGluR5 в клетках HEK 293 мы использовали различные подходы для оценки активности транзитивно экспрессированных рецепторов mGluR5. Уровень экспрессии экзогенной НА-меченой GRK2, GRK4 (данные не представлены) и Flag-меченого mGluR5 (рис. 1а) на поверхности клеток HEK 293 измеряли при помощи иммуноферментного анализа (ELISA). Способность киназ GRK регулировать передачу сигнала от mGluR5 определяли, отслеживая формирование InsP, вызванное квискалатом в клетках, экспрессирующих одновременно mGluR5 и либо GRK2, либо GRK4. Как показано на рисунке 1б, вызванное агонистом накопление InsP снижалось на 70% в клетках, экспрессирующих GRK2, по сравнению с контролем, без изменения аффинности рецептора mGluR5 к квискалату. Напротив, избыточная экспрессия GRK4 оказала лишь небольшое стимулирующее действие на передачу сигнала рецептором mGluR5, что может быть связано с более высокой экспрессией рецепторов на поверх-

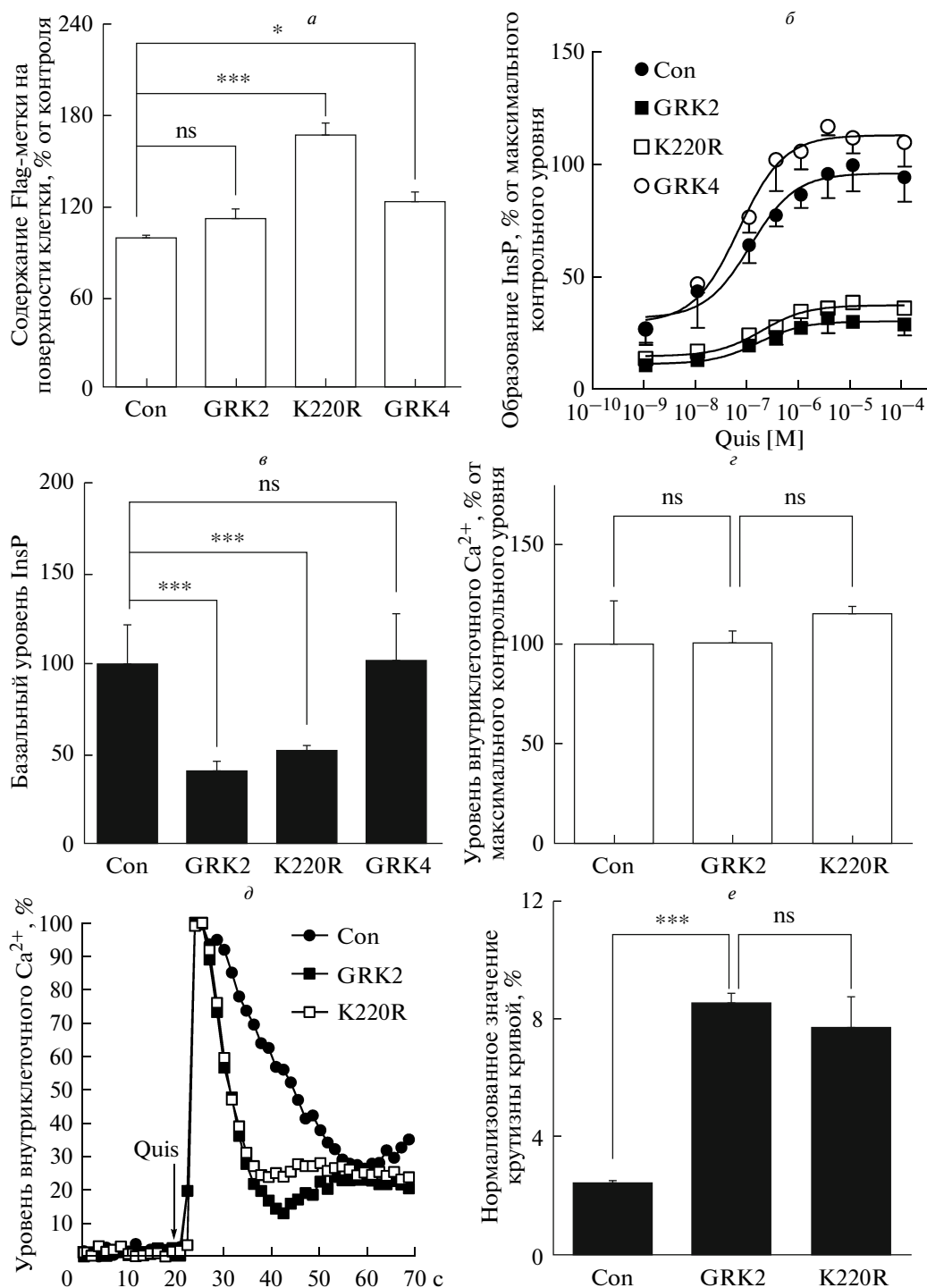


Рис. 1. Влияние киназы GRK2 и ее мутанта K220R на индуцируемое mGluR5-рецептором образование InsP₃ и высвобождение внутриклеточного кальция в клетках HEK 293. Четыре микрограмма плазмидных конструкций, содержащих GRK2, K220R, GRK4 или пустой вектор, и 0.6 мкг плазмиды, несущей ген Flag-меченого рецептора mGluR5 дикого типа, ко-экспрессировали в клетках HEK 293 в течение 24 ч. *а* – Количество экспрессируемого на поверхности GluR5 оценивали методом ИФА (ELISA) с использованием анти-Flag антител. *б* – Зависимость образования InsP₃ от концентрации квиксвалата при 37°C в течение 30 мин в присутствии GRK2, K220R, GRK4 или пустого вектора. *в* – Влияние GRK2, K220R и GRK4 на базальный уровень mGluR5-стимулируемого образования InsP₃. *г* – Максимальное значение (Peak) mGluR5-стимулируемого внутриклеточного высвобождения кальция в присутствии GRK2, K220R или пустого вектора. *д* – Типичная кривая mGluR5-стимулируемого высвобождения внутриклеточного кальция под действием квиксвалата (Quis) в присутствии GRK2 или K220R. *е* – Изменение крутизны падения кривой mGluR5-стимулируемого высвобождения внутриклеточного кальция как ответ на обработку квиксвалатом в присутствии GRK2 или K220R (7–13 с). Данные представлены как средние значения ± SE, рассчитанные на основании результатов трех параллелей одного из типичных экспериментов (*а* и *в*) или результатов трех (*б*) или четырех (*г* и *е*) независимых экспериментов. ****p* < 0.001; **p* < 0.05; ns – статистически незначимо.

ности этих клеток. Кроме того, обнаружено, что экспрессия GRK2 значительно снижает базальную активность Flag-mGluR5 в клетках НЕК 293 (рис. 1б).

Как известно, активация mGluR группы I приводит к повышению внутриклеточного уровня ионов Ca^{2+} в нейронах [24], поэтому измерение количества внутриклеточного кальция используют для отслеживания активности mGluR5 [25]. Мы также оценивали влияние экспрессии GRK2 на опосредованное рецептором mGluR5 высвобождение внутриклеточного кальция, что позволило отслеживать передачу сигнала рецептором mGluR5 в реальном времени. Результаты показывают, что 10 мкМ квискалат вызывает резкое высвобождение внутриклеточного кальция, и уровень кальция достигает пика через приблизительно 7 с после стимуляции квискалатом как в экспрессирующих GRK2, так и в контрольных клетках. Более того, нет никакой существенной разницы между значениями пиков в экспрессирующих GRK2 и в контрольных клетках (рис. 1з, д). Также выявлено, что уровень кальция после стимуляции квискалатом возвратился на плато через 20 с в присутствии GRK2 и через 40 с в контрольных клетках (рис. 1д). Однако интенсивность высвобождения внутриклеточного кальция связана также и с числом рецепторов на поверхности клетки [26]. Чтобы избежать влияния интенсивности активации, мы привели исходные наклонные кривые к нормированной крутизне падения (%) путем деления их на интенсивность активации. Как показано на рис. 1е, экспрессия GRK2 значительно увеличивает нормированную крутизну падения (%) по сравнению с контрольными клетками. Следовательно, GRK2 уменьшает чувствительность передачи сигнала mGluR5 по крайней мере через 7 с после стимуляции квискалатом. Эти результаты показывают, что GRK2 может принимать участие в регуляции mGluR5-опосредованной передаче сигнала в клетках НЕК 293.

GRK2-опосредованная “down”-регуляция mGluR5-сигналинга не зависит от фосфорилирования

С целью понять, является ли фосфорилирование необходимым условием GRK2-зависимого затухания сигнала mGluR5 в клетках НЕК 293, мы проверили влияние каталитически неактивного мутанта GRK2-K220R на передачу сигнала рецептора mGluR5 [27]. Как показано на рисунке 1а, K220R увеличивает экспрессию рецепторов mGluR5 на поверхности клетки и эффективно подавляет как индуцированную квискалатом, так и базальную активность mGluR5 (рис. 1б, в). Как и в случае с экспрессией GRK2, K220R также вызывает быстрое снижение уровня внутриклеточного

кальция после стимуляции квискалатом (рис. 1д). Интересно, что пиковое значение уровня кальция после стимуляции баклофеном в клетках, экспрессирующих K220R, было выше, чем в контрольных клетках (рис. 1д), что согласуется с предыдущими данными [19]. Тем не менее, лишенный киназной активности мутант K220R эффективно подавляет передачу сигнала от рецептора mGluR5, подтверждая, что ингибирующее действие киназы GRK2 на сигнал mGluR5 не связано с фосфорилированием, — и это согласуется с результатами, полученными ранее на нейронах полосатого тела [18].

Для подтверждения полученных результатов было сконструировано несколько мутантов рецептора mGluR5, лишенных потенциальных сайтов фосфорилирования на С-концевом участке (факт, установленный ранее [19, 28]). Экспрессию Flag-меченых mGluR5 и мутантов G847Δ, T840A и G847ΔT840A на поверхности клеток измеряли методом ELISA (рис. 2а). Анализ образования InsP показал, что все названные мутанты рецептора mGluR5 остались чувствительными к GRK2 (рис. 2б), из чего можно заключить, что эти вероятные сайты фосфорилирования в С-концевой части рецептора не являются необходимыми для GRK2-опосредованной десенсибилизации mGluR5.

Взаимодействие между доменом RH киназы GRK2 и Gαq важно для GRK2-опосредованной десенсибилизации mGluR5

Киназы GRK2 и GRK3 могут препятствовать связыванию Gαq с рецептором, связываясь с Gαq своим доменом RH [5–8]. Показано, что домен RH GRK2 может эффективно подавлять mGluR1-сигналинг в клетках НЕК 293 [16]. Роль домена RH киназы GRK2 в десенсибилизации mGluR5 в клетках НЕК 293 мы выяснили, исследуя образование InsP и высвобождение внутриклеточного кальция. Как и ожидалось, при сверхэкспрессии домена RH наблюдалось подавление базального и индуцированного агонистом накопления InsP и увеличивалась крутизна падения кривой концентрации внутриклеточного кальция по сравнению с клетками контроля ($p < 0.001$), хотя этот эффект отличался от вызываемого GRK2 ($p < 0.05$) (рис. 3б, в). Экспрессия другого домена, RH, увеличила как количество рецепторов mGluR5 на поверхности клетки (рис. 3а), так и рецептор-опосредованное формирование InsP (рис. 3б), но при этом не оказывала влияния на крутизну падения внутриклеточной концентрации кальция (рис. 3в). Полученные данные говорят о том, что для десенсибилизации сигнала от рецептора mGluR5 достаточно домена RH киназы GRK2.

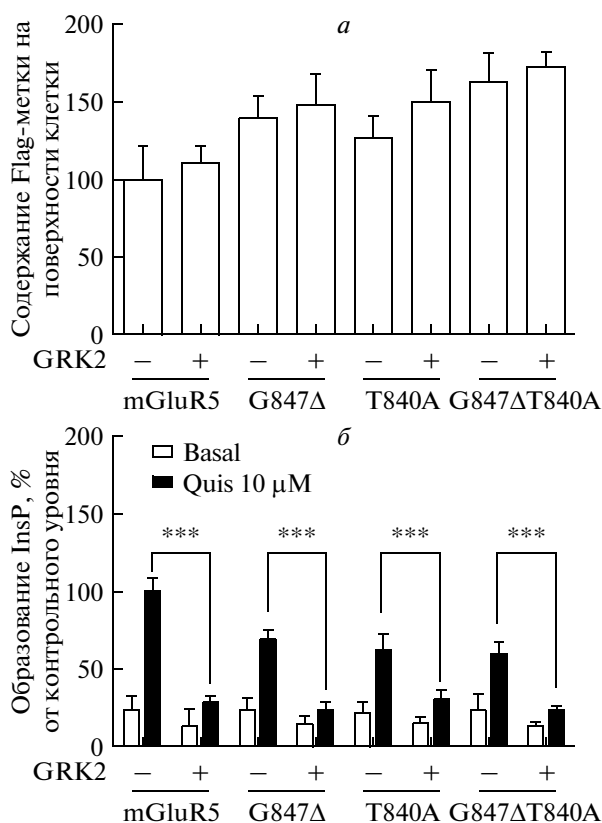


Рис. 2. Влияние GRK2 на опосредованное мутантными по С-концу mGluR5-рецепторами образование InsP₃ в клетках HEK 293. Четыре микрограмма GRK2-содержащей плазмиды и 0.6 мкг плазмиды, кодирующей Flag-меченый mGluR5 дикого типа или один из мутантов (G847Δ, T840A и G847ΔT840A), соэкспрессировали в клетках HEK 293 в течение 24 ч. *а* – Количество экспрессируемого на поверхности клеток mGluR5 или его мутантов оценивали методом ИФА с использованием анти-Flag антител. *б* – Влияние экспрессии GRK2 на базальный уровень образования InsP₃, стимулируемого mGluR5 или его мутантами, а также действие квискалата на образование InsP₃ (обработку 10 мкМ квискалатом проводили в течение 30 мин при 37°C). (–) – mGluR5 или мутанты, экспрессируемые отдельно; (+) – mGluR5 или мутанты, соэкспрессируемые с GRK2. Данные представлены как средние значения ±SE, рассчитанные на основании результатов трех параллелей одного из типичных экспериментов. *** $p < 0.001$.

Как известно из литературы, мутант GRK2-D110A, потерявший способность связывать субъединицу Gαq, не препятствует передаче сигнала от рецептора mGluR1 в клетках HEK 293 [15] и в нейронах полосатого тела [18]. Мы проверили эффект экспрессии этого мутанта (D110A) на сигналинг mGluR5 в клетках HEK 293. В отличие от киназы GRK2 дикого типа, мутант D110A не препятствовал накоплению InsP₃, индуцированному квискалатом, и не индуцировал быстрого снижения концентрации кальция в клетках HEK 293 (рис. 3б,в). Эти результаты подтверждают, что для

опосредованной GRK2 десенсibilизации mGluR5 в клетках HEK 293 необходимо связывание между GRK2 и Gαq. Экспрессию HA-меченых GRK2 1–185 (домен RH), 456–689 (домен PH), D110A в клетках HEK 293 подтверждали методом ELISA с HRP-мечеными анти-HA антителами (данные не приведены).

Предполагаемое взаимодействие между mGluR5 и GRK2 не критично для GRK2-опосредованной “down”-регуляции mGluR5-сигналинга

Сообщалось, что связывание GRK2 как с рецептором, так и с Gαq необходимо для десенсibilизации mGluR1 в клетках HEK 293 [17]. Аминокислотный остаток D527 в домене PH киназы GRK2 [9, 17] и несколько положительно заряженных аминокислотных остатков во второй внутриклеточной петле mGluR1 необходимы для взаимодействия между GRK2 и mGluR1 и десенсibilизации последнего [17]. Поскольку некоторые из положительно заряженных аминокислотных остатков второй внутриклеточной петли mGluR1 присутствуют и в рецепторе mGluR5, мы исследовали как роль консервативных положительно заряженных остатков рецептора, так и важность аминокислотного остатка D527 киназы GRK2 для десенсibilизации mGluR5.

Вопреки ожиданиям, экспрессия мутанта GRK2 D527A эффективно подавляла и базальный, и индуцированный квискалатом уровень накопления InsP₃ и увеличивала крутизну падения кривой концентрации внутриклеточного кальция после стимуляции квискалатом. Эти результаты свидетельствуют о том, что аминокислотный остаток D527 киназы GRK2 не требуется для десенсibilизации mGluR5 (рис. 3б,в).

Выясняя необходимость фосфорилирования второй внутриклеточной петли для GRK2-зависимого “down”-регулируемого mGluR5-сигналинга, мы исследовали несколько мутантов mGluR5 с заменами по гомологичным mGluR1 остаткам Lys во второй внутриклеточной петле: mGluR5-K677A, -K678A, -K679A, -K678A и -K679A [16]. Как и mGluR5 дикого типа, все эти мутанты достигали поверхности клетки (рис. 4а) и активировались квискалатом. Кроме того, избыточная экспрессия GRK2 подавляла уровень базального и индуцированного квискалатом накопления InsP₃, также как это происходило в клетках со сверх-экспрессией mGluR5 дикого типа (рис. 4б). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что исследованные аминокислотные остатки mGluR5 не критичны для GRK2-опосредованной десенсibilизации этого рецептора.

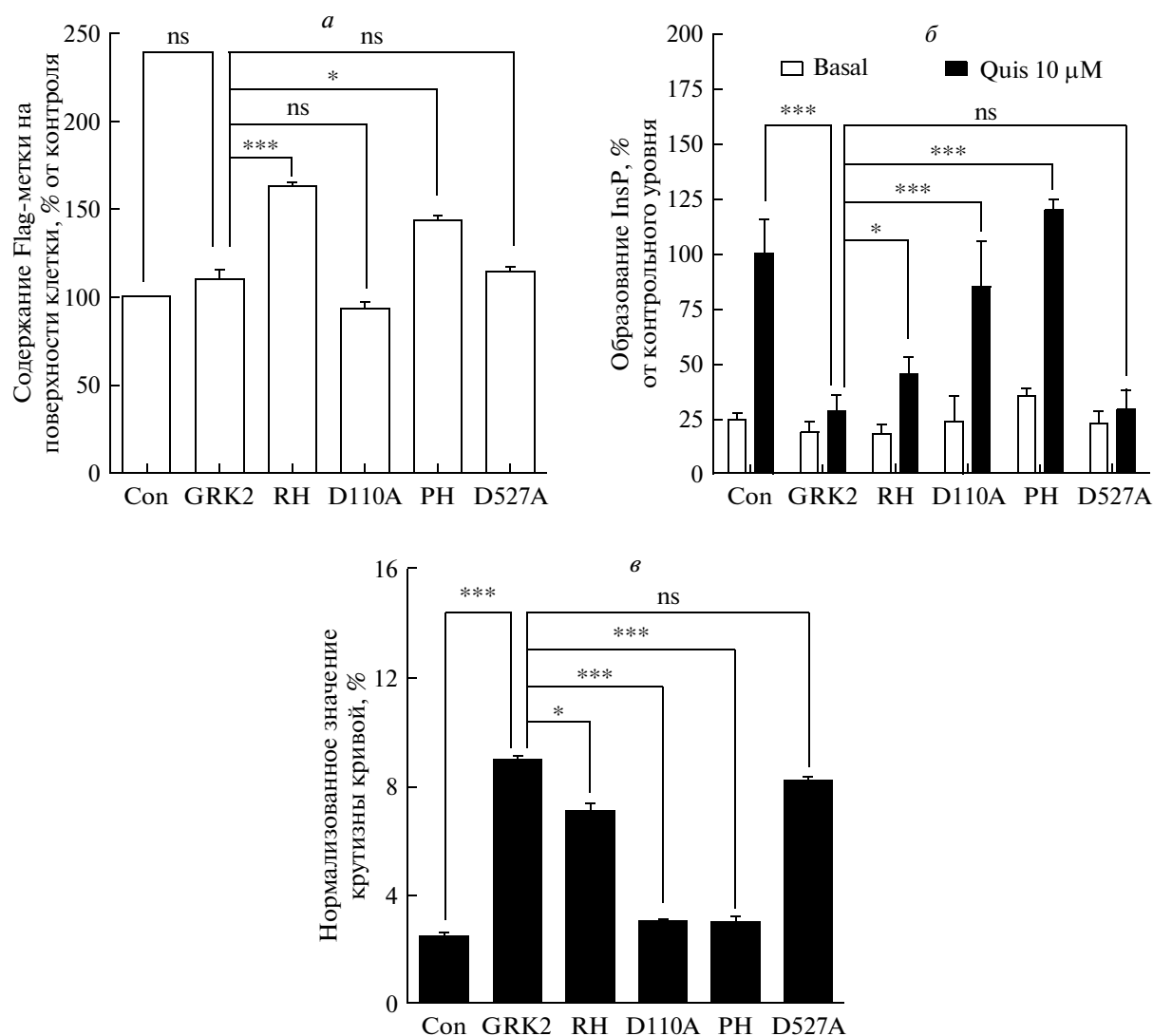


Рис. 3. Влияние мутантов GRK2 на стимулированное mGluR5 образование InsP и высвобождение внутриклеточного кальция в клетках HEK 293. Четыре микрограмма плазмиды, экспрессирующей киназу GRK2- или ее мутанты (RH, D110A, PH и D527A), и 0.6 мкг конструкции, экспрессирующей Flag-меченый mGluR5 дикого типа, созэкспрессировали в клетках HEK 293 в течение 24 ч. *a* – Количество экспрессируемого на поверхности mGluR5 оценивали методом ИФА с использованием анти-Flag антител. *б* – Влияние экспрессии GRK2 или его мутантов на фоновое значение mGluR5-стимулируемого образования InsP, а также действие квисквалата на образование InsP (обработку 10 мкМ квисквалатом проводили в течение 30 мин при 37°C). (–) – mGluR5, экспрессируемый отдельно; (+) – mGluR5, ко-экспрессируемый с GRK2 или мутантами. *в* – Изменение крутизны падения кривой mGluR5-стимулируемого высвобождения внутриклеточного кальция в присутствии GRK2 или ее мутантов как ответ на обработку 10 мкМ квисквалатом в течение 7–13 с. Данные представлены как средние значения \pm SE, рассчитанные на основании результатов трех параллелей типичного эксперимента. *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$; ns – статистически незначимо.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что передача сигнала от mGluR5 может далее регулироваться киназой GRK2 как в клетках HEK 293 [19], так и в нейронах [18], хотя информация о том, задействовано ли фосфорилирование mGluR5 в опосредованном GRK2 ослаблении сигналинга этого рецептора, весьма противоречива. Ф. Риберто (Riberto) и др. [18] объясняют несопоставимость результатов по исследованию регуляции активности mGluR5 киназой

GRK2 в клетках HEK 293 и в нейронах полосатого тела возможными различиями во внеклеточном окружении гетерологичной экспрессирующей системы и первичных нейронов. В этом исследовании нами показано, что осуществляемая GRK2 десенсibilизация mGluR5 в клетках HEK 293 не зависит от фосфорилирования, подобно тому, как это происходит в нейронах полосатого тела. Кроме того, выявлено, что мутант GRK2 K220R повышает пиковое значение, но увеличивает скорость падения уровня внутриклеточного кальция. Эти результа-

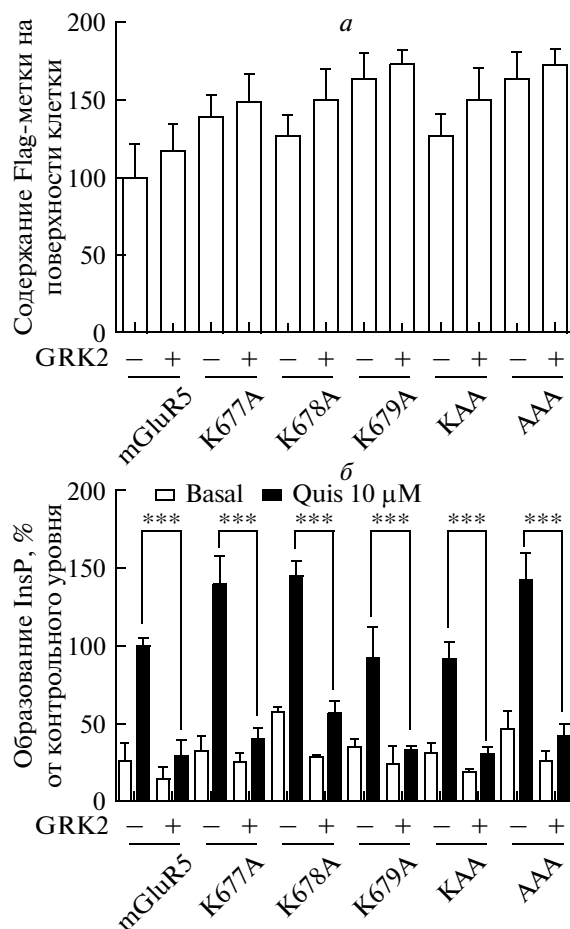


Рис. 4. Влияние GRK2 на образование InsP, опосредованное мутантами рецептора mGluR5 с аминокислотными заменами во второй внутриклеточной петле. Четыре микрограмма GRK2-конструкции и 0.6 мкг конструкции, экспрессирующей Flag-меченый рецептор mGluR5 дикого типа или мутантного (K677A, K678A, K679A, KAA и AAA), соэкспрессировали в клетках HEK 293 в течение 24 ч. *a* – Количество поверхностно-экспрессируемого mGluR5 оценивали методом ИФА с использованием анти-Flag антител. Данные представлены как средние значения \pm SE, рассчитанные на основании результатов трех параллелей типичного эксперимента. *b* – Влияние экспрессии GRK2 на базальный уровень mGluR5-стимулируемого образования InsP, а также действие квиквалата на образование InsP (обработку 10 мкМ квиквалатом проводили в течение 30 мин при 37°C). (–) – mGluR5 или его мутанты, экспрессируемые отдельно; (+) – mGluR5 или его мутанты, ко-экспрессируемые с GRK2. Данные представлены как средние значения \pm SE, рассчитанные на основании результатов четырех независимых экспериментов; *** $p < 0.001$.

ты позволяют предположить, что отмеченная Скоттом (Scott) и др. [19] неспособность мутанта GRK2 K220R подавлять передачу сигнала mGluR5 могла быть результатом использования неподходящих параметров для оценки mGluR5-сигналинга.

Помимо классического случая зависимой от фосфорилирования GRK-опосредованной десенсibilизации GPCR, для ряда рецепторов, таких как mGluR1 [13–15], GABA_BR [10–11], CCR2 [29] в клетках HEK 293 и mGluR5 в нейронах [18], выявлен не зависящий от фосфорилирования GRK-опосредованный путь ослабления сигнала GPCR. Так, показано, что взаимодействие между G-белком и доменом RH киназы GRK2 отвечает за ослабление комплекса G-белка с рецептором

вплоть до потери рецептором способности передавать сигнал [5–8]. Кроме того, Дхами (Dhami) с соавт. [15] также сообщили, что для опосредуемой GRK2 десенсibilизации mGluR1 требуется связывание киназы с рецептором. Нами показано, что экспрессия одного лишь домена RH киназы GRK2 ингибирует как базальную, так и индуцированную агонистом активность рецептора mGluR5, в то время как мутант GRK2 D110A не препятствовал mGluR5-сигналингу. Эти наблюдения позволяют сделать заключение о том, что не зависящая от фосфорилирования инактивация mGluR5 в клетках HEK 293 обусловлена взаимодействием между доменом RH киназы GRK2 и субъединицей G α q. Нами выяснено, что, в отличие от рецептора mGluR1, мутации как в GRK2, так и в mGluR5 по аминокислотным остаткам,

предположительно отвечающим за их взаимодействие, не приводят к существенным отличиям в клеточном ответе по сравнению с GRK2 и mGluR5 дикого типа. Причину этого несоответствия можно искать в различии механизмов взаимодействия GRK2 с рецепторами mGluR5 и mGluR1.

По сравнению с анализом количества сформированного InsP, который используется для оценки десенсibilизации рецепторов, связанных с $G\alpha_q$, анализ внутриклеточного кальция дает возможность отслеживать динамику сигнала в реальном времени уже на очень ранних временных отрезках стимуляции рецептора агонистом. Нами выявлено, что киназа GRK2 может ослаблять передачу mGluR5-сигнала приблизительно через 7 с после стимуляции агонистом. При этом существенных различий по динамике уровня кальция между клетками, экспрессирующими GRK2, и контрольными клетками в интервале 0–7 с не наблюдалось. Как сообщается в некоторых работах, киназы GRK могут перемещаться из цитозоля в плазматическую мембрану, формируя комплексы с рецепторами через 5 мин после активации или несколько позднее [11]. Согласно полученным результатам, сходство начальной стадии высвобождения кальция в клетках, экспрессирующих GRK2, и в контрольных клетках может свидетельствовать о том, что рецептор устанавливает нормальную связь с $G\alpha_q$ и активирует фосфолипазу C, а сокращенное время спада от пика до плато в экспрессирующих GRK2 клетках свидетельствует о том, что свободная GRK2 способна связываться с комплексом $G\alpha_q$ /рецептор через несколько секунд после стимуляции агонистом. Это препятствует высвобождению $G\alpha_q$ -GTP и ослабляет сигналинг рецептора.

Следует отметить, что Рибейро и др. [18] сообщили о том, что вызванное DHPG фосфорилирование mGluR5 усилено в экспрессирующих GRK2 нейронах полосатого тела по сравнению с контрольными клетками, а киназа GRK2 стимулирует индуцированную агонистом интернализацию рецептора mGluR5 в кортикальных нейронах и в GRK2-экспрессирующих нейронах полосатого тела. Нами показано, что экспрессия мутанта GRK2 K220R заметно увеличивает количество рецепторов mGluR5 на поверхности клетки, что согласуется с данными Сорренса и соавт. [19]. Также известно, что сверх-экспрессия домена PH может увеличивать эффективность mGluR1-сигналинга в клетках НЕК 293 [15]. Нами обнаружено, что в случае рецептора mGluR5 сверх-экспрессия домена PH тоже приводит и к увеличению количества этих рецепторов на поверхности клетки, и к повышению эффективности их активации. Все эти данные указывают на то, что существуют неизученные GRK2-опосредованные механизмы регуляции mGluR5 и mGluR1, и эти механизмы

отличаются от независимой от фосфорилирования десенсibilизации. В проведенном нами исследовании показано, что независимая от фосфорилирования GRK2-опосредованная десенсibilизация mGluR5 в клетках НЕК 293 и в нейронах происходит сходным образом, а значит, клетки НЕК 293 можно использовать как более простую гетерологичную систему для изучения независимой от фосфорилирования десенсibilизации mGluR5 и других, пока неизвестных, опосредуемых GRK2 механизмов регуляции mGluR5.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана Фондом естественных наук Китая (No. 31100548, для S.H.) и Китайским фондом поддержки ученых (No. 20100471184, для S.H.)

Вклад авторов: S.H. разработал план исследований и написал статью; Z.Z., L.X., H.G. и L.D. выполнили исследование; Z.Z. и S.H. проанализировали полученные данные.

REFERENCES

1. Dingledine R., Borges K., Bowie D., et al. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **51**, 7–61.
2. Conn P.J., Pin J.P. 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 205–237.
3. Nakanishi S. 1994. Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron.* **13**, 1031–1037.
4. Kelly E., Bailey C.P., Henderson G. 2008. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br. J. Pharmacol.* **153**, Suppl 1, S379–388.
5. Kozasa T. 2004. The structure of GRK2-G beta gamma complex: intimate association of G-protein signaling modules. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 61–63.
6. Sterne-Marr R., Tesmer J.J., Day P.W., et al. 2003. G protein-coupled receptor kinase 2/G alpha q/11 interaction. A novel surface on a regulator of G protein signaling homology domain for binding G alpha subunits. *J. Biol. Chem.* **278**, 6050–6058.
7. Ribas C., Penela P., Murga C., et al. 2007. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* **1768**, 913–922.
8. Carman C.V., Parent J. L., Day P.W., et al. 1999. Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase GRK2. *J. Biol. Chem.* **274**, 34483–34492.
9. Day P.W., Tesmer J. J., Sterne-Marr R., et al. 2004. Characterization of the GRK2 binding site of Galphaq. *J. Biol. Chem.* **279**, 53643–53652.
10. Perroy J., Adam L., Qanbar R., et al. 2003. Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J.* **22**, 3816–3824.

11. Kanaide M., Uezono Y., Matsumoto M., et al. 2007. Desensitization of GABA(B) receptor signaling by formation of protein complexes of GABA(B2) subunit with GRK4 or GRK5. *J. Cell Physiol.* **210**, 237–245.
12. Mao L.M., Liu X.Y., Zhang G.C., et al. 2008. Phosphorylation of group I metabotropic glutamate receptors (mGluR1/5) in vitro and in vivo. *Neuropharmacology*. **55**, 403–408.
13. Mundell S.J., Pula G., McIlhinney R.A., et al. 2004. Desensitization and internalization of metabotropic glutamate receptor 1a following activation of heterologous Gq/11-coupled receptors. *Biochemistry*. **43**, 7541–7551.
14. Salles M., Salvatore L., D'Urbano E., et al. 2000. The G-protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1. *FASEB J.* **14**, 2569–2580.
15. Dhami G.K., Dale L.B., Anborgh P.H., et al. 2004. G protein-coupled receptor kinase 2 regulator of G protein signaling homology domain binds to both metabotropic glutamate receptor 1a and Galphaq to attenuate signaling. *J. Biol. Chem.* **279**, 16614–16620.
16. Dhami G.K., Babwah A.V., Sterne-Marr R., et al. 2005. Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor 1 signaling requires G protein-coupled receptor kinase 2 binding to the second intracellular loop. *J. Biol. Chem.* **280**, 24420–24427.
17. Dhami G.K., Anborgh P.H., Dale L.B., et al. 2002. Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **277**, 25266–25272.
18. Ribeiro F.M., Ferreira L.T., Paquet M., et al. 2009. Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor 5 desensitization and internalization by G protein-coupled receptor kinase 2 in neurons. *J. Biol. Chem.* **284**, 23444–23453.
19. Sorensen S.D., Conn P.J. 2003. G protein-coupled receptor kinases regulate metabotropic glutamate receptor 5 function and expression. *Neuropharmacology*. **44**, 699–706.
20. Dhami G.K., Ferguson S.S. 2006. Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacol. Ther.* **111**, 260–271.
21. Brabet I., Parmentier M.L., De Colle C., et al. 1998. Comparative effect of L-CCG-I, DCG-IV and γ -carboxy-L-glutamate on all cloned metabotropic glutamate receptor subtypes. *Neuropharmacology*. **37**, 1043–1051.
22. Rondard P., Liu J.F., Huang S.L., et al. 2006. Coupling of agonist binding to effector domain activation in metabotropic glutamate-like receptors. *J. Biol. Chem.* **281**, 24653–24661.
23. Rondard P., Huang S.L., Monnier C., et al. 2008. Functioning of the dimeric GABA(B) receptor extracellular domain revealed by glycan wedge scanning. *EMBO J.* **27**, 1321–1332.
24. Rae M.G., Martin D.J., Collingridge G.L., et al. 2000. Role of Ca^{2+} stores in metabotropic L-glutamate receptor-mediated supralinear Ca^{2+} signaling in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **20**, 8628–8636.
25. Sidiropoulou K., Lu F.M., Fowler M.A., et al. 2009. Dopamine modulates an mGluR5-mediated depolarization underlying prefrontal persistent activity. *Nat. Neurosci.* **12**, 190–199.
26. Violin J.D., Dewire S.M., Barnes W.G., et al. 2006. G protein-coupled receptor kinase and beta-arrestin-mediated desensitization of the angiotensin II type 1A receptor elucidated by diacylglycerol dynamics. *J. Biol. Chem.* **281**, 36411–36419.
27. Kong G., Penn R., Benovic J.L. 1994. A beta-adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 13084–13087.
28. Dale L.B., Babwah A.V., Bhattacharya M., et al. 2001. Spatial-temporal patterning of metabotropic glutamate receptor-mediated inositol 1,4,5-triphosphate, calcium, and protein kinase C oscillations: protein kinase C-dependent receptor phosphorylation is not required. *J. Biol. Chem.* **276**, 35900–35908.
29. Jimenez-Sainz M.C., Murga C., Kavelaars A., et al. 2006. G protein-coupled receptor kinase 2 negatively regulates chemokine signaling at a level downstream from G protein subunits. *Mol. Biol. Cell.* **17**, 25–31.