

G 蛋白偶联受体相关分选蛋白功能特征与相关疾病研究进展

张敏, 梁丽鸿, 鲁雅洁, 曹新

南京医科大学医学遗传学系, 南京 211166

摘要: G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)作为最大的一类膜蛋白受体家族, 可被多种配体激活并发挥相应的信号转导功能, 参与生物体内重要的生理过程。G 蛋白偶联受体相关分选蛋白(G protein-coupled receptors associated sorting proteins, GASPs)则对内存后的 GPCRs 分选过程发挥着重要的作用, 并介导受体进入降解或再循环途径, 进而调控细胞的信号转导等过程。研究发现 GASPs 的功能缺陷与多种疾病相关, 包括神经系统疾病、肿瘤和耳聋等。本文重点介绍了 G 蛋白偶联受体相关分选蛋白的功能特征及其相关信号通路, 描述了 GASPs 功能缺陷与疾病的关联性及其家族蛋白与 GPCRs 的相互作用、GASPs 分选途径的发现、参与的信号通路及对基因转录调控, 以期对 GASPs 相关多种疾病的治疗提供新的思路 and 策略。

关键词: G 蛋白偶联受体; G 蛋白偶联受体相关分选蛋白; 信号转导; 疾病

G protein-coupled receptor-associated sorting proteins: function and relevant disorders

Min Zhang, Lihong Liang, Yajie Lu, Xin Cao

Department of Medical Genetics, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

Abstract: G protein-coupled receptors (GPCRs), the largest family of membrane protein receptors, can be activated by a variety of ligands and participate in signaling transduction, and they are essential in the physiologic process *in vivo*. GPCR-associated sorting proteins (GASPs) play an important role in the post-endocytic sorting of GPCRs. They mediate the degradation or recycling pathway, and regulate cell signaling transduction and other biological processes. The functional defects of GASPs have been reported to be implicated in pathogenesis of some neurological diseases, tumors and deafness and so on. In this review, we summarize the GASPs' function, GPCR-GASP interactions, GPCR sorting pathway and GASP-related signaling pathways implicated in the transcriptional regulation. It could help to understand the potential linkage between GASPs' dysfunction and diseases, and provide a new approach and strategy for the treatment of

收稿日期: 2020-02-19; 修回日期: 2020-04-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31571302)和江苏省财政厅转化医学实验室平台建设项目资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31571302), and Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation]

作者简介: 张敏, 在读硕士研究生, 专业方向: 遗传学。E-mail: zmzhangmin@njmu.edu.cn

通讯作者: 鲁雅洁, 在读博士, 高级实验师, 研究方向: 疾病的分子遗传学。E-mail: luyajie@njmu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.20-020

网络出版时间: 2020/5/26 9:40:40

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200525.1507.004.html>

GASP-related diseases.

Keywords: G protein-coupled receptors (GPCRs); G protein-coupled receptor-associated sorting proteins (GASPs); signal transduction; disease

G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)是哺乳动物中最大且用途最为广泛的信号受体家族^[1]。它们可以被各种外界物质如气体、光子、蛋白质、肽、化学物质、激素、脂质和糖类等信号激活,从而将细胞外信号转导至细胞内^[2],影响个体心血管、免疫及神经等多系统的生理及病理作用。不仅如此,GPCRs 还是细胞内的一类关键调节剂,是人体最大的一类治疗药物靶标,据分析已超过 1/3 的药物作用于 GPCRs 的家族成员^[3,4]。与 GPCRs 相互作用蛋白如 G 蛋白偶联受体相关分选蛋白(GPCR associated sorting proteins, GASPs)、Na⁺/H⁺ 交换调节因子/埃兹蛋白结合蛋白 50(Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor, NHERF/ezrin radixin moesin-binding protein 50 kDa, EBP50)、 β -arrestin 等在 GPCRs 信号转导、内吞及内吞后分选过程中发挥着重要的作用^[5-8]。GASPs 家族作为 GPCRs 分选转运的重要因子,主要通过与其 C 末端保守序列相互结合,通过磷酸化或泛素化的作用对内吞后的 GPCRs 进行分选,介导受体发生复敏或脱敏,参与调节 GPCRs 活性、GPCRs 转运过程、信号转导以及相关基因转录^[9,10],进而影响相关疾病的发生或靶向 GPCRs 药物的效果。因此深入研究 GASPs 分子作用机制和功能特征,揭示 GASPs 功能缺陷与疾病的关系,将为以 GASPs 为靶标的生物医学的应用提供理论依据。本文对 GASPs 家族的结构特征、分选作用机制、相关信号转导、基因转录方面起的重要作用及其与疾病发生的关系进行系统的综述。

1 GPCRs 与 GASPs

1.1 GPCRs 及其信号转导

GPCRs 作为哺乳动物体内最大的跨膜受体家族,不仅种类众多,且其家族成员具有相同的结构特征:7 次跨膜 α 螺旋,在其肽链的羧基端和连接第 5 及第 6 个跨膜螺旋的胞内环(即第 3 个胞内环)上都有

鸟苷酸结合蛋白的结合位点,但其氨基酸的序列在进化上缺乏保守性,因而也使 GPCRs 的功能呈现复杂多样性^[11,12]。GPCRs 均具有与异三聚 G $\alpha\beta\gamma$ 蛋白相互作用的能力, $\beta\gamma$ 二聚体通过共价键结合于膜上起稳定 α 亚基的作用,而 α 亚基本身具有 GTP 酶活性,它们作为 GTPase 活性中心从而启动下游信号的转导。按其序列的相似度主要可分为谷氨酸(glutamate, G)、视紫红质(rhodopsin, R)、粘附力(adhesion, A)、Frizzled/ Tastes (F)、分泌素(secretin, S)5 个家族,简称为 GRAFS^[13]。其中, G 家族成员较少,主要包括代谢型谷氨酸受体和钙受体样受体等,其氨基末端有 500~600 个氨基酸残基,ICL3 很短且高度保守,羧基末端无棕榈酰化位点,不形成 ICL4^[14],其家族成员功能异常将导致慢性癫痫、阿尔兹海默病和帕金森病等神经系统疾病^[15]。R 家族是视紫红质样受体和肾上腺素受体,该亚家族包含了绝大多数种类的 G 蛋白偶联受体,构成基础多肽链的结构具有氨基末端氨基酸残基数少的特点,第三胞内环(ICL3)较长,羧基末端有棕榈酰化的半胱氨酸,形成第四胞内环(ICL4)^[14],其功能缺失主要与心血管疾病有关,如高血压、急性心肌梗塞和心力衰竭^[16]。A 家族受体具有一些 GPCRs 非经典特征,包括一个较长的细胞外氨基末端和一个自催化 GPCR 蛋白水解位点(GPCR proteolysis site, GPS),其主要与血管生成、炎症、男性不育及某些遗传病有关^[13]。F 家族包括 10 个 frizzled 受体(hFZD1-10)和一个平滑受体(hSmo),以及 25 个 Taste2 或苦味受体,而 Frizzled/Tastes 类受体缺乏 R 家族 GPCRs 中大多数保守性特征,但是 Smo 结构依旧显示出保守的 7 次跨膜结构,该家族成员的功能异常将导致慢性鼻窦炎、哮喘、囊性纤维化和癌症等疾病^[17]。S 家族包括 15 种不同类型的受体,其在体内的天然配体多为多肽类激素,它们在氨基末端的氨基酸残基多达 100 多个,ICL3 较长,羧基末端无棕榈酰化位点,不形成 ICL4^[14];该家族成员的功能缺陷会导致肥胖、癌症及心脑血管疾病,因此它们也是临床相

关疾病治疗的重要靶标^[18]。

GPCRs 配体的多样性决定 GPCRs 涉及细胞内多种信号通路, 因此 GPCRs 信号通路是细胞内比较重要的一类信号通路。目前认为 GPCRs 介导和调控生理功能主要经由两条途径: 受体激活的 G 蛋白途径和配体激活的 β -arrestin 途径^[19]。前者, G 蛋白偶联受体(GPCRs)若被各种不同的外界信号激活, 激活 G 蛋白信号途径, 包括 cAMP 通路、磷脂酰肌醇信号通路和 MAPK/Erk 信号通路等^[20~23]。由于持续的 GPCRs 信号将会影响细胞存活和发生不良应激反应, 因此需要严格调控 GPCRs 信号的终止。后者, β -arrestin 途径不仅能阻断 G 蛋白的信号转导, 同时还与网格蛋白和网格蛋白衔接蛋白相互作用, 从而促进了活化受体的内化, 在 GPCRs 的脱敏、复敏、细胞增殖和基因转录的过程中起重要作用^[24]。受体内吞可能发生两种变化: (1)在衣被小泡内发生去磷酸化, 通过再循环回到质膜表面; (2)经过内体分选, 有些非泛素化的受体蛋白再循环至细胞膜表面, 有些受体蛋白则在溶酶体中发生降解。

1.2 GASP 结构特征与表达分布

GASPs 是在酵母双杂交筛选中利用 δ -阿片受体 (DOR)胞质的羧基尾作为诱饵而首次筛选出的新型分选蛋白, 并通过与 GPCRs 的羧基末端相互作用介导了 DOR 的降解, 该靶蛋白被命名为 GASP-1^[25]。

GASP-1 已被证明可以在体内和体外调节 GPCRs 的转运特性^[25~27], 后续与 GASP-1 结构与功能相似成员被鉴定, 迄今共有 10 个家族成员, 即 GASP-1~GASP-10^[8]。除 GASP-8 外, 所有 GASP 成员均定位于 X 染色体的 q22.1~q22.2 区域, 人类有两个 GASP-8 基因拷贝, 分别定位于人类 7 号染色体(含有 7 个外显子, 可产生 4 种剪切变体)和 3 号染色体(只含有一个编码蛋白质的外显子, 一种剪切变体)上^[27]。

GASP-1~GASP-10 具有从 249~1395 个不等的氨基酸, 各成员之间有明显的序列相似性, 在近氨基端都存在含 250 个保守的氨基酸残基的羧基末端区(玃猓类重复)的跨膜区^[27]。GASP-1 具有最长的氨基酸序列, 其羧基末端与其它 GASP 家族成员的羧基末端之间约有 20%~77%的序列相似性(图 1), 而 GASP-10 具有最短的氨基酸序列^[28]。根据 GASPs 的序列特点将家族成员可分为两个亚家族, 亚家族 I 包括 GASP-1 到 GASP-5, 它们在羧基末端之外都含有 15 个高度保守的氨基酸残基组成的重复基序, 称为“GASP 基序”, “GASP 基序”中含有 4 个高度保守的氨基酸残基 SWFW, 其是与 GPCRs 的 C 末端发生相互作用的关键部位。GASP-1 含有 22 个 GASP 基序, 从 GASP-2 到 GASP-5 都含有 2 个 GASP 基序。而亚家族 II 包括 GASP-6 到 GASP-10, 它们均不含有 GASP 基序^[28]。

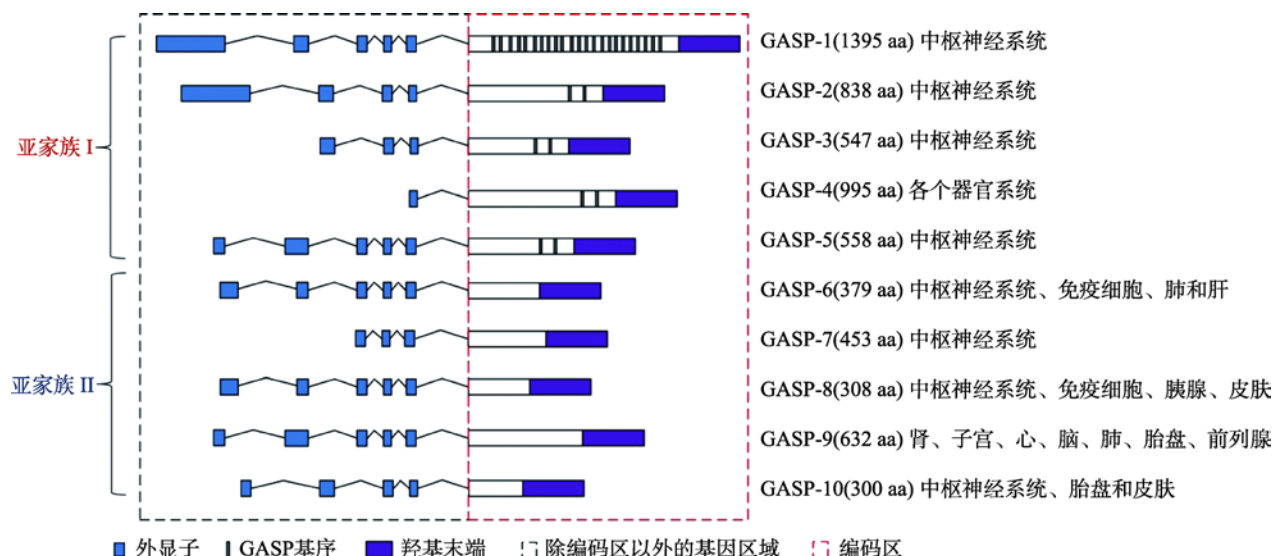


图 1 GASP 家族成员的比较

Fig. 1 The comparison of GASP family members

尽管 GASPs 家族成员在生物体内普遍表达^[29], 但大部分成员主要在中枢神经系统(CNS)中高度表达, 而 GASP-6 主要分布于免疫细胞、肺和肝组织中; GASP-8 和 GASP-10 主要分布于胰和皮肤中; GASP-9 在肾、子宫、心脏、脑、肺、胎盘以及前列腺等器官高度表达^[30]。与此同时, 超过 90% 的 GPCRs 也在 CNS 中表达, 这种表达模式与 GASPs 家族参与调节这些受体的活性以及 GASPs 家族和 GPCRs 之间的相互作用相一致。

1.3 GASPs 及其相互作用伴侣

GASPs 根据其结构特征, 其主要的相互作用伴侣是 GPCRs (表 1)。由于亚家族 I 成员的结构域主要是由氨基端跨膜域、GASP 基序和羧基端肽类重复序列 3 个部分构成, 而人们分别研究了这 3 个区域与 GPCRs 的结合作用。Bornert 等^[28]通过前期 GASP-1 蛋白的截短体共免疫沉淀实验结果表明, GASP-1 的氨基端跨膜域与 GPCRs 之间不存在结合

作用; 只含有 GASP-1 保守的羧基末端区域与 GPCRs (ADRB1 和 M1) 几乎无相互作用, 而与 DOR 受体仅有微弱的结合; 相反的, 含有 GASP-1 的中央结构域保留有 70% 与 GPCRs (ADRB1 和 M1) 结合作用, 与 DOR 受体结合作用留有 30%; 而含有 GASP-1 的中央结构域和羧基末端两个区域与 GPCRs (DOR、ADRB1 和 M1) 结合作用很强, 与完整的 GASP-1 的结合能力相似。因此, 研究发现该亚家族 I 成员 GASP-1 与 GPCRs 存在两种类型的相互作用关系: 一类 GPCRs 靶向 GASP-1 的中间部位(GASP 基序)相结合; 而另一些 GPCRs 与 GASP-1 的中间部位和羧基端都能发生相互作用^[28]。这表明 GASP-1 中央结构域的 GASP 基序是与 GPCRs 相互作用的关键部位。该中央结构域基序也存在于 GASP-2 到 GASP-5 的相应中央部分, 因此提示在 GPCRs 与这些 GASP 亚家族成员之间的相互作用中 GASP 基序可能也发挥着重要作用。GASP-1 不仅能与 GPCRs 发生结合, 还能与接头蛋白(Gab1)^[31]及微管(microtubules)^[32]发

表 1 GASPs 及其相互作用伴侣

Table 1 GASPs and interacting partners

GASPs	别名	互作伴侣	结合位点			主要功能	参考文献
			氨基末端	羧基末端	GASP 基序		
GASP-1	PIPS/KIAA0443	GPCRs		√	√	参与转运和降解	[25]
		Period 1	√		√	与昼夜节律调控相关	[38]
		Gab 1	结合位点尚未明确			与生长发育相关	[39]
		Microtubules		√	√	维持细胞骨架相关	[32]
GASP-2	HIP15	GPCRs		√	√	参与转运和降解	[30]
		Htt		√		与亨廷顿舞蹈症相关	[40]
		Smoothed		√		参与 Hedgehog 信号通路	[41]
		mGluR5		√		与自闭症有关	[42]
GASP-3	P60TRP/BHLHB9	GPCRs		√	√	参与转运和降解	[28]
		PPP2R5E	结合位点尚未明确			与神经元的生长调节有关	[43]
		IPO5	结合位点尚未明确			与神经元的生长调节有关	[43]
GASP-5	ARMCX5	GPCRs		√	√	参与转运和降解	[28]
GASP-6	ALEX3/ARMCX3	Sox10		√		与转录有关	[44]
GASP-7	ALEX1/ARMCX1	GPCRs		√		参与转运和降解	[28]
		PP110	结合位点尚未明确			与肿瘤的发生和发展有关	[29]
GASP-8	SVH	P53		√		与肿瘤的发生和发展有关	[37]
GASP-9	ALEX2/ARMCX2	VIM	结合位点尚未明确			维持细胞骨架相关	[33]

生相互作用,从而对细胞骨架的形成与解聚进行动态调控。在 GASP 家族中 GASP-2 与 GASP-1 的序列同源性最为相似,因此 GASP-2 也同样具有类似 GASP-1 的功能,其可以与亨廷顿蛋白(Huntingtin, HTT)^[33]、多巴胺 D₂^[34]受体以及病毒趋化因子受体 US28(由人巨细胞病毒 HCMV 所编码的 G 蛋白偶联受体^[35,36])等受体相结合,将它们靶向至再循环或降解途径。据报道^[28], GASP-3 及 GASP-5 也能与 GPCRs 发生强结合。由于 GASP 亚家族 II 的结构域主要由两部分构成: N 端跨膜域和 C 端犹猿类重复序列,不包含 GASP 基序,因此与 GASP 亚家族 I 相比,亚家族 II 与 GPCRs 的羧基末端作用比较弱^[28]。尽管亚家族 II 的成员与 GPCRs 的作用较弱,但是它们仍然能与部分 GPCRs 发生作用,如 GASP-6、GASP-7 与肾上腺素能受体(ADRB1)、降钙素受体(CALCR)、血栓素 A₂ 受体(TXA₂)存在一定的相互作用^[28],而 GASP-8 虽不与 GPCRs 发生相互作用,但是 P53 可以作为其相互作用伴侣^[37],从而参与肿瘤发生发展过程。因此可见, GASP 家族的羧基端保守区域对其与 GPCRs 相互作用的过程发挥着重要作用。

2 GASPs 分子功能

2.1 GASPs 调控 GPCRs 内吞后的分选过程

GPCRs 激活后被靶细胞内吞,其后面临两个分选途径:(1)去磷酸化进入再循环到胞膜;(2)受体经过内体分选,有些非泛素化的受体蛋白再循环至细胞膜表面,有些受体蛋白则在溶酶体中发生降解(图 2)。当配体与 GPCRs 结合后, G 蛋白偶联受体激酶将磷酸化细胞膜上的蛋白受体,一旦磷酸化,在 β -arrestins 作用下 GPCRs 与 G 蛋白解偶联,并通过网格蛋白有被小泡内化至分选内体^[45],实现受体内吞作用。受体内吞后的分选途径的选择主要取决于内吞后受体的磷酸化以及泛素化过程,当受到激动剂的作用后, GPCRs 发生磷酸化,这对受体的内吞以及受体再循环至质膜途径是至关重要的^[46],通过快速再循环途径将内化的 GPCRs 运送质膜上,以恢复受体的功能,并促进受体介导的信号转导的重新

致敏性。相反的,当 GPCRs 羧基端的赖氨酸残基与泛素化蛋白相互作用时,将促进受体的内吞和受体进入溶酶体中降解途径^[47],促进了受体蛋白的水解和下调,从而导致细胞信号转导的衰减效应延长^[48]。目前,已经发现多个受体内吞后再循环途径和受体内吞后降解途径相关的蛋白,而这些相关蛋白通常可以通过与 GPCRs 的羧基末端结构域相互作用,从而特异性靶向 GPCRs,它们可以再循环利用受体也可以降解受体^[5]。在此过程中, GASPs 在调控 GPCRs 内吞后的分选过程中发挥了重要的作用。GASP-1 作为该家族的较早发现的成员已被广泛地研究, GASP-1 主要通过其羧基末端与受体的 Helix-8 相互作用^[30],从而介导受体进入溶酶体中,如 GASP-1 可以与内吞作用后的 δ -阿片类受体、多巴胺 D₂受体、多巴胺 D₃受体、大麻素受体等多个 GPCRs 的降解有关^[49-51]。因此其羧基端区域的破坏,有可能抑制受体的降解,从而促进受体的再循环。但是, GASP-1 并不能与所有内吞后的 GPCRs 进行相互作用,如 μ -阿片类受体和多巴胺 D₁受体不能与 GASP-1 相互作用,从而它们会被“再循环蛋白”运送回细胞膜上。GASP-1 不仅在细胞上发挥重要的作用,而且其可以将病毒趋化因子受体 US28 靶向至晚期核内体和溶酶体内,这一过程对病毒的外包是至关重要的^[36]。最近, Edfawy 等^[42]研究发现 GASP-2 可以利用其内吞分选作用,调节代谢型谷氨酸受体的表面有效性,而 I 型代谢型谷氨酸受体在小脑和海马结构突触可塑性中起重要作用,它们的激活导致 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(AMPA)受体的内化。当急性过表达 GASP-2 时,细胞膜表面的代谢型谷氨酸受体 5 (mGluR5)的信号降低 20%左右;相反的,当敲除 GASP-2 时,在细胞膜表面的 mGluR5 聚集增加,这揭示 GASP-2 功能的异常干扰了受体内化后正常的分选机制^[42]。GASPs 参与的 GPCRs 分选保证细胞外信号向细胞内传递具有适度的强度和时空上的特异性,以及精确调控细胞膜上 GPCRs 的数量、活性及分布。若 GPCRs 结构异常或功能失调或者 GASPs 功能缺陷均会影响 GPCRs 内吞分选机制的正常调控,从而导致人类多疾病的发生,如阿尔兹海默病、肿瘤和耳聋等。因此, GASPs 的正常调控对于维持细胞功能具有及其重要的作用。

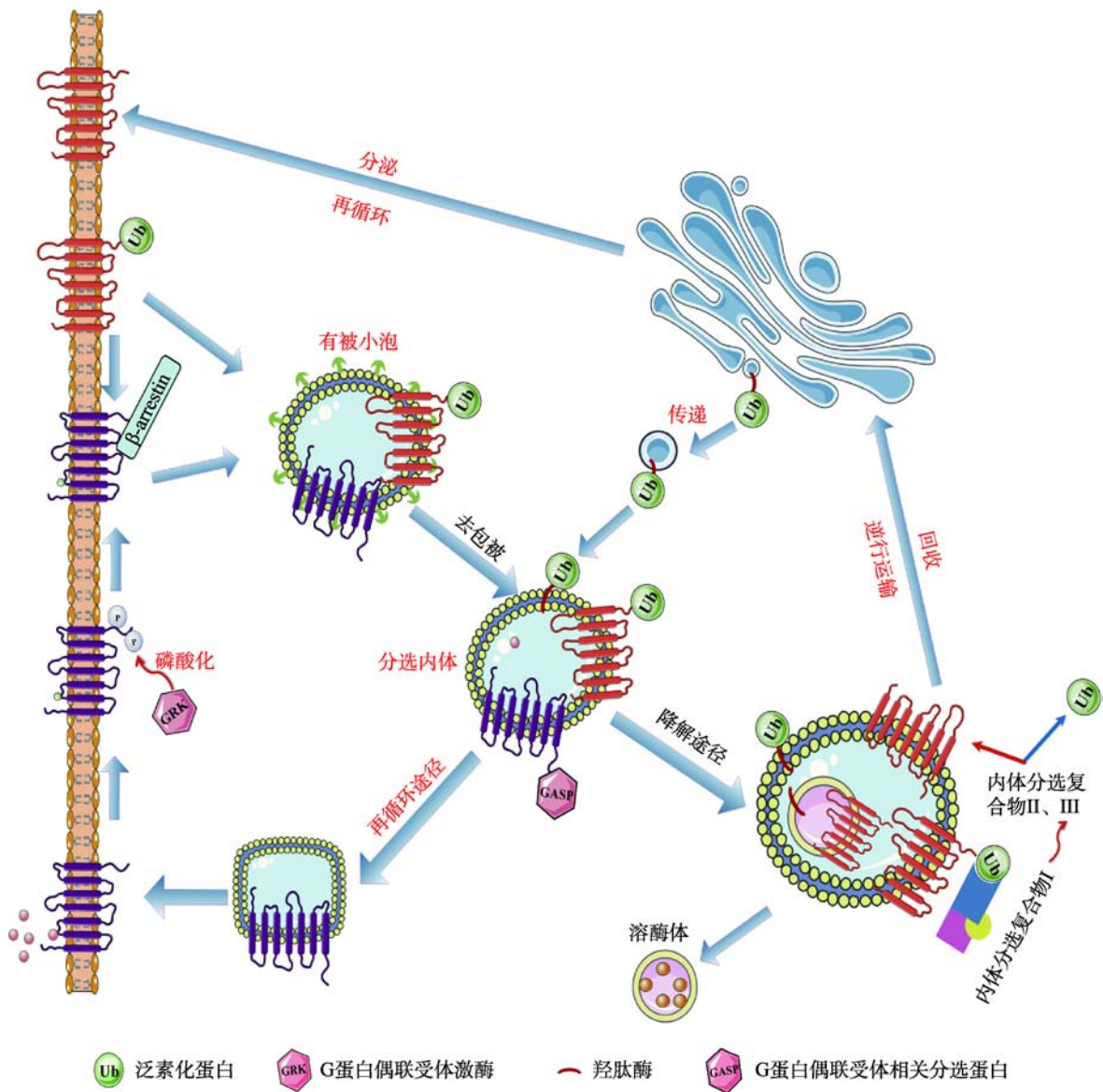


图 2 GSPs 参与内吞后的 GPCRs 分选

Fig. 2 GSPs participate in GPCR sorting after endocytosis

2.2 GSPs 调控 GPCRs 相关的信号转导

GSPs 家族蛋白的重要功能一方面是在 GPCRs 内吞后分选过程中发挥作用；另一方面，GASP 家族对 GPCRs 的信号转导同样起到重要作用，而且 GASP 家族可能是连接这两个过程的重要调控因子。在 HEK293 细胞中敲除内源性的 GASP-1 会破坏 US28 介导的 $G_{aq}/PLC/inositol\ phosphate(IP)$ 的累积，但当 GASP-1 过表达增强了 IP 的累积，与此同时，US28 介导的相关核转录因子 NF- κ B、cAMP 应答元

件结合蛋白(CREB)也会随着 GASP-1 的过表达或敲除而表现出相应的上调或者下调^[36]，因此，GASP-1 不仅调节了 US28 的内吞后运输，而且还调节了 US28 的信号转导能力。目前推测 GASP-1 的过表达上调 US28 的信号转导，主要可能由两个方面造成：一是 US28 受体与 GASP-1 结合后会呈现出一种更有活性的构象状态，从而增强下游信号的转导；二是 GASP-1 靶向 US28 至细胞内特定区域，进而增强信号转导。通过 GST 融合实验发现^[30]，R 家族(即视紫红质类受体家族)的阿片类受体的羧基末端可以

与 GASP-1 结合;不仅如此,还发现虽然 S 家族(分泌素家族)的降钙素受体的羧基末端区域与 R 亚家族成员没有序列同源性,但是同样也可以与 GASP-1 结合^[30]。而 G 家族(即谷氨酸家族)的 G 蛋白偶联受体 mGluR5 在可塑性、神经棘形态、突触通讯^[52~56]和神经突伸展^[57]中起到关键作用,Heydorn 等^[26]提出 GPRASPs 可以调节代谢型谷氨酸受体(metabotropic glutamate receptor, mGluRs),研究者利用在转染后的 HT-22 细胞中证实了 GPRASP2 和 mGluR5 的相互作用,且缺失 GPRASP2 基因会干扰受体内吞后的正常机制,表现出异常的 mGluR 信号转导^[42]。Jung 等^[41]研究发现, GASP-2 蛋白可以与 Smo 蛋白和 Pitchfork 蛋白形成纤毛靶向复合体,能够调节 Smo 向初级纤毛的易位,从而参与 Hedgehog 通路的正常调控。Hedgehog(Hh)信号通路是一条从无脊椎动物到脊椎动物都高度保守的信号通路,在胚胎期多种组织器官的发育、纤毛形成及肿瘤发生发展中都发挥着重要的作用^[58]。Hh 信号传导通路核心组成部分包括分泌型糖蛋白配体(Hh)、膜蛋白受体复合物、核转录因子及下游目的基因 4 个部分。膜蛋白受体 Ptch 由肿瘤抑制基因 Patched 编码, Ptch 是一种 12 次跨膜受体;而受体 Smo 作为 Ptch 蛋白的下游分子,其由原癌基因 Smoothened 编码,它属于 G 蛋白偶联受体相关蛋白,由 7 个跨膜区的单一肽链构成, N 端位于细胞外, C 端位于细胞内,其磷酸化部位位于羧基末端的丝氨酸和苏氨酸残基上,该蛋白家族成员只有维持蛋白全长时才具有转录启动活性,从而启动下游靶基因的转录^[59,60]。而当 GASP-2 蛋白缺失时,将导致 Smo 蛋白易位的失败和抑制 Hh 靶基因的激活,从而抑制 Hedgehog 信号通路的激活。

因此, GASPs 家族成员的作用不仅仅体现在 GPCRs 内吞后的分选过程,还体现在参与相关的信号转导过程,且 GASPs 可能是连接两个过程的重要调控因子。

2.3 GASPs 与 GPCR 相互作用的机制

经配体激活后,大多数 GPCRs 将受到一系列涉及脱敏和内吞作用的调节。内化后的受体会被再循环至质膜中或者靶向至溶酶体中降解。有文献报道^[26,61], GASP-1 可以与许多 GPCRs 的羧基末端进

行相互作用,而在大部分 GPCRs 的羧基末端存在 helix-8, 其是参与 GASP 和 GPCRs 相互作用的主要区域^[30]。而受体再循环至质膜主要取决于一些受体的羧基末端含有“回收序列”,此“回收序列”可以与 NHERF/ EPB50 等再循环蛋白进行相互作用,从而促进受体迅速再循环^[34]。Thompson 等^[34]在人类 HEK293 细胞中发现, MOR 受体羧基末端的“回收序列”决定了 MOR 不与 GASP-1 结合,但当截短 MOR 受体的末尾 17 个氨基酸时,经免疫沉淀结果显示 MOR 可以与 GASP-1 进行结合,进而将受体运送至溶酶体中降解。

因此,可以通过破坏与再循环蛋白的相互作用,或通过突变增强受体对 GASP 的亲和力来促进受体与 GASP 的相互作用,从而改变受体内吞后的命运。

2.4 GASPs 调控基因转录表达

研究表明 GASPs 家族成员参与基因转录表达调控。Matsuki 等^[62]关于 GASP-1 的研究表明, GASP-1 可以与 Period-1 (与哺乳动物昼夜节律调控相关的重要蛋白并且在转录调节过程中发挥着重要的作用)发生相互作用,并且在同一细胞中共表达这两种蛋白质可以促进 GASP-1 靶向细胞核,在神经生长因子(nerve growth factor, NGF)处理后的 PC12 细胞中进一步发现 GASP-1 发生了核转位。此外,在用 GASP-1 siRNA 预处理的细胞中, NGF 可以使 PC12 细胞免于细胞凋亡或死亡。这些结果表明,在 NGF 介导作用下, GASP-1 通过核转位调节相关靶基因的转录,从而保护细胞免于凋亡^[38,39]。不仅是 GASP-1, GASP-3 主要定位在细胞质中,有些则在细胞核中。GASP-3 的序列中存在 bHLH 转录因子家族特有的碱性螺旋-环-螺旋基序,这表明 GASP-3 可能参与基因调控转录。另一方面,在血清饥饿诱导条件下用 siRNA 干扰 GASP-3 处理 PC12 细胞的研究中,发现 GASP-3 对神经元细胞的存活和增殖起到重要的调控作用,可能参与了相关基因的转录调节^[27]。据报道, GASPs 亚家族 II 中的 GASP-6 定位于线粒体的外膜中,其可与转录因子 Sox10 相互作用。Mou 等^[44]外源性过表达 GASP-6 后,发现线粒体中 Sox10 的数量增加。另外,尽管 GASP-6 不具有固有的转录活性,但它确实增强了 Sox10 对烟碱乙酰胆碱受体(nACh) $\alpha 3$ 和 $\beta 4$ 亚基的基因启动子的反式激活,

Sox10 与 GASP-6 能够通过直接相互作用增加转录功能及细胞核与线粒体之间进行信号转导级联的可能性。而 GASP-6 与 GASP-8 均能通过与转录因子相互作用调节转录^[37,63]；在 QSG-1701(正常肝细胞系)中发现过表达 GASP-8 能加速细胞生长，而抑制或干扰 GASP-8 表达则诱导肝癌细胞发生凋亡。

由此，GASPs 家族成员可以通过参与胞内基因的转录调控从而影响细胞的存活与增殖。

3 GASPs 功能缺陷与疾病

3.1 GASPs 功能异常与肿瘤

越来越多研究表明 GASP 家族成员的功能异常与癌症发生和发展存在密切关系，Tuszynski 等^[64]研究发现在早期乳腺癌患者的血清中存在 GASP-1 的特定蛋白片段，而正常患者的血清中则没有；同时在 7 例 2 期和 3 期乳腺癌的肿瘤提取物中也检测到 GASP-1 表达，但在相邻的正常组织中未检测到。而且 GASP-1 在多种癌症病人的血清中都显著过表达^[65]，包括乳腺癌、脑癌和肺癌等，因此 GASP-1 可以作为一类潜在的肿瘤生物标记物。在几种结肠直肠癌细胞系和原发性肿瘤中都发现了 GASP-3 基因启动子 CpG 岛的高甲基化，并且这几类肿瘤都与 GASP-3 的表达缺陷相关^[66]，结果表明 GASP-3 参与了细胞的恶性转化。此外，Rickman 等^[67]对经手术治疗发生转移和未发生转移的 186 例原发性头颈部鳞状细胞癌进行分析，研究发现与手术后未发生转移的患者相比，这些最初接受手术后发生转移的患者中其 GASP-2 和 GASP-3 在头颈部鳞状细胞癌中的表达水平也显著上调，这表明 GASP-2 和 GASP-3 可能参与了肿瘤的转移和恶化。还有研究发现 GASP-5 可以作为 ZNF217 的下游靶基因，而 ZNF217 广泛分布在各种肿瘤细胞中，其在肿瘤转化过程和基因转录调控中起关键作用，该基因水平下调时可能导致与分化相关的 GASP-5 基因下调，导致细胞去分化并促使细胞加速增殖，进而诱发癌症的发生^[68]。在肺癌、前列腺癌、结肠癌、胰腺癌和卵巢癌中以及在不同人癌细胞系中都发现 GASP-7 和 GASP-9 转录物的表达缺失或下调^[30]，而且在肝细胞癌中 GASP-8 的亚型 2 表达上调，过表达这种

亚型的人肝癌细胞系生长比率增高，促进肿瘤的发生发展，而干扰其 RNA 表达能够诱导肝癌细胞凋亡^[63]。这些结果均揭示 GASPs 家族蛋白可以作为肿瘤发展早期的生物标志物，可能代表癌症治疗的新靶标。

3.2 GASPs 功能异常与神经系统疾病

GASPs 家族成员广泛分布于中枢神经系统，GASP 家族成员大部分位于 X 染色体 q22.1~q22.2，该区域与人类的精神疾病有着很大的关联。尤其是 GASP-1 和 GASP-2。研究表明^[69]，GASP-1 基因敲除的小鼠表现出程序性的记忆丧失，小鼠缺乏获得性反应和复杂反应的能力。Horn 等^[40]研究发现 HTT 和 GASP-2 之间可以发生相互作用，从而影响受体的再循环和降解途径。由于 HTT 出现延长的 polyQ 序列^[70]，影响了 GASP2 和 HTT 之间亲和力，从而可能直接影响患者神经元受体的表面密度，这一过程与亨廷顿舞蹈症有很大的关联性。此外，GASP-2 可以与 7 次跨膜受体 Smo 以及 Pitchfork (Pifo) 形成复合物，在 Smo 转运至初级纤毛的过程中起到重要的作用，GASP-2 或者 Pifo 的缺失会导致 Hedgehog 信号通路的异常，从而无法激活 Hh 靶基因，进而会引起小脑发育异常、颅面缺陷、共济失调等症状^[41]。特别是 Xq22.1 区域内的 0.35 Mb 的缺失，会导致个体表现出呼吸障碍、腭裂和癫痫等症状^[71]。此外，GASP-3 可能通过与两个重要的细胞内信号激酶 RanBP5 (importin- β 样运输受体) 和 PP2A (调控 tau 蛋白磷酸化的磷酸酶) 发生相互作用，从而参与调控神经元细胞的存活和生长。而在 AD 患者的大脑组织中发现 GASP-3 mRNA 水平下降，同时在阿尔茨海默症中观察到多种神经元的退化和死亡^[43]，这揭示了 GASP-3 在神经元细胞正常的生长和发育中发挥着重要作用，并且研究者还将 GASP-2 和 GASP-4 列入帕金森病患者大脑组织中 892 个高度失调的优先基因列表中，这些失调的优先基因可能位于疾病过程的核心，并且可以作为治疗 PD 疾病的新靶标^[72]。这些研究表明，GASPs 与神经系统性疾病密切相连。

3.3 GASPs 功能异常与耳聋

在内耳的发育过程中，许多 GPCRs，包括 Vlg1r、Lgr5 和腺苷酸受体等在内耳中都有表达。其中，

Vlgr1 蛋白是目前已知最大的 G 蛋白偶联受体,其主要表达在毛细胞的纤毛根部,参与纤毛踝连接的形成^[73]。同时,Vlgr1 基因的突变可以引起 Usher 综合征^[74,75],实验表明腺苷酸环化酶 AC6 在纤毛上与 Vlgr1 共定位,从而推测可能通过 G 蛋白激活腺苷酸酶 AC6,从而参与 cAMP 介导的信号传递途径^[76],其异常导致静纤毛形态的异常,从而影响听觉转导和内耳发育。Lgr5,又称为 GPR49,研究发现当内耳毛细胞受损伤刺激,激活 Wnt 信号通路可以促进 Lgr5 阳性细胞的增殖,而抑制 Notch 信号通路可以显著地促进 Lgr5 阳性细胞分化成毛细胞,从而显著地促进毛细胞的再生^[77],这在损伤模型中通过前体细胞再生来恢复耳蜗结构和功能奠定了理论和实验基础。而最新研究表明,能够靶向 GPCRs 的 GASPs 家族也与听觉功能密切相关。本实验室在一个中国人遗传性耳聋大家系中发现了 GASP-2 突变的遗传学效应^[78],该突变造成蛋白质侧链的位阻和极性的改变,导致蛋白质的结构变化,进而患者出现耳廓畸形、内耳道闭锁(狭窄)、先天性传导性或混合性听力丧失、双侧上睑下垂伴随面部畸形等临床表现。随后,Liu 等^[79]利用原位杂交和逆转录聚合酶链反应揭示了 GASP-2 主要在斑马鱼的内耳和神经系统中表达,GASP-2 的分子致聋机制正在研究中,有望对 GASPs 家族相关的致聋机制提供理论与实验依据。

4 结语与展望

GPCRs 作为哺乳动物体内分布最广、种类最多的一类膜表面受体^[80],广泛参与体内体外多种生理过程,如免疫系统的调节、自主神经系统的调节和维持机体稳态等,它一直是人们研究的热点以及药物研究的靶点。如今,近一半的临床使用药物通过靶向不同种类的 GPCRs 而发挥作用^[81]。GASPs 作为重要的 GPCRs 互作蛋白,在调控 GPCRs 的活性、内吞分选及信号转导等过程发挥重要的作用,如通过对 δ -阿片类受体、mGluR5、HTT 和 Smo 等受体蛋白的靶向结合作用,参与多种疾病的发生、发展,如神经系统疾病、肿瘤、耳聋形成等。随着人们对 GASPs 家族的具体分选机制功能及调节过程的研究不断深入,有助于更好地理解这些 GASPs 的精确的

分子功能,研究靶向 GASPs 及其相互作用伴侣,期望作为神经退行性疾病\癌症及耳聋等疾病新的药物治疗靶点,进而为其相关疾病的诊治或干预策略提供新的思路与方向。

参考文献(References):

- [1] Nieto Gutierrez A, McDonald PH. GPCRs: Emerging anti-cancer drug targets. *Cell Signal*, 2018, 41: 65–74. [DOI]
- [2] Edson MA, Lin YN, Matzuk MM. Deletion of the novel oocyte-enriched gene, Gpr149, leads to increased fertility in mice. *Endocrinology*, 2010, 151(1): 358–368. [DOI]
- [3] Wootten D, Christopoulos A, Sexton PM. Emerging paradigms in GPCR allostery: Implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(8): 630–644. [DOI]
- [4] Wang CI, Lewis RJ. Emerging opportunities for allosteric modulation of G-protein coupled receptors. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(2): 153–162. [DOI]
- [5] Hanyaloglu AC, von Zastrow M. Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008, 48: 537–568. [DOI]
- [6] West AE, Griffith EC, Greenberg ME. Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3(12): 921–931. [DOI]
- [7] Moser E, Kargl J, Whistler JL, Waldhoer M, Tschische P. G protein-coupled receptor-associated sorting protein 1 regulates the postendocytic sorting of seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptors. *Pharmacology*, 2010, 86(1): 22–29. [DOI]
- [8] Ji BY, Chen J, Bai B. Research progress of G protein coupled receptor-related sorting proteins. *J Jining Med Univ*, 2013, 36(04): 287–291.
季丙元, 陈京, 白波. G 蛋白偶联受体相关分选蛋白研究进展. *济宁医学院学报*, 2013, 36(04): 287–291. [DOI]
- [9] Charfi I, Abdallah K, Gendron L, Pineyro G. Delta opioid receptors recycle to the membrane after sorting to the degradation path. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(12): 2257–2271. [DOI]
- [10] Jung B, Messias AC, Schorpp K, Geerloff A, Schneider G, Saur D, Hadian K, Sattler M, Wanker EE, Hasenöder S, Lickert H. Novel small molecules targeting ciliary transport of Smoothed and oncogenic Hedgehog pathway activation. *Sci Rep*, 2016, 6: 22540. [DOI]
- [11] Flor PJ, Acher FC. Orthosteric versus allosteric GPCR activation: The great challenge of group-III mGluRs. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(4): 414–424. [DOI]

- [12] Herraiz C, Journé F, Abdel-Malek Z, Ghanem G, Jiménez-Cervantes C, García-Borrón JC. Signaling from the human melanocortin 1 receptor to ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases involves transactivation of cKIT. *Mol Endocrinol*, 2011, 25(1): 138–156. [DOI]
- [13] Bassilana F, Nash M, Ludwig MG. Adhesion G protein-coupled receptors: opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(11): 869–884. [DOI]
- [14] Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE, Gaitanaris GA. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(8): 4903–4908. [DOI]
- [15] Dal Prà I, Armato U, Chiarini A. Family C G-protein-coupled receptors in Alzheimer's Disease and therapeutic implications. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1282. [DOI]
- [16] Wang JL, Gareri C, Rockman HA. G protein-coupled receptors in heart disease. *Circ Res*, 2018, 123(6): 716–735. [DOI]
- [17] Alfonso-Prieto M, Giorgetti A, Carloni P. Multiscale simulations on human Frizzled and Taste2 GPCRs. *Curr Opin Struct Biol*, 2019, 55: 8–16. [DOI]
- [18] Routledge SJ, Simms J, Clark A, Yeung HY, Wigglesworth MJ, Dickerson IM, Kitchen P, Ladds G, Poyner DR. Receptor component protein, an endogenous allosteric modulator of family B G protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2019, 27: 183174. [DOI]
- [19] Zhang XR, Zhang ZR, Chen SY, Wang WW, Wang XS, He JC, Xie CL. β -arrestin2 alleviates L-dopa-induced dyskinesia via lower D1R activity in Parkinson's rats. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(24): 12315–12327. [DOI]
- [20] Rodríguez CI, Setaluri V. Cyclic AMP (cAMP) signaling in melanocytes and melanoma. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 563: 22–27. [DOI]
- [21] Archbold JK, Martin JL, Sweet MJ. Towards selective lysophospholipid GPCR modulators. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(5): 219–226. [DOI]
- [22] Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res*, 2000, 39(1): 41–82. [DOI]
- [23] Rayasam GV, Tulasi VK, Davis JA, Bansal VS. Fatty acid receptors as new therapeutic targets for diabetes. *Expert Opin Ther Targets*, 2007, 11(5): 661–671. [DOI]
- [24] Violin JD, Lefkowitz RJ. β -arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28(8): 416–422. [DOI]
- [25] Whistler JL, Enquist J, Marley A, Fong J, Gladher F, Tsuruda P, Murray SR, Von Zastrow M. Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science*, 2002, 297(5581): 615–620. [DOI]
- [26] Heydorn A, Jacky BPS, Ersbøll B, Holst B, Nielsen FC, Haft CR, Whistler J, Schwartz TW. A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP). *J Biol Chem*, 2004, 279(52): 54291–54303. [DOI]
- [27] Abu-Helo A, Simonin F. Identification and biological significance of G protein-coupled receptor associated sorting proteins (GASPs). *Pharmacol Ther*, 2010, 126(3): 244–250. [DOI]
- [28] Bornert O, Møller T C, Boeuf J, Candusso MP, Wagner R, Martinez KL, Simonin F. Identification of a novel protein-protein interaction motif mediating interaction of GPCR-associated sorting proteins with G protein-coupled receptors. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56336. [DOI]
- [29] Kurochkin IV, Yonemitsu N, Funahashi SI, Nomura H. ALEX1, a novel human armadillo repeat protein that is expressed differentially in normal tissues and carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280(1): 340–347. [DOI]
- [30] Simonin F, Karcher P, Julien JM, Matifas A, Kieffer BL. Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *J Neurochem*, 2004, 89(3): 766–775. [DOI]
- [31] Kiyama A, Isojima Y, Nagai K. Role of Per1-interacting protein of the suprachiasmatic nucleus in NGF mediated neuronal survival. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339(2): 514–519. [DOI]
- [32] Sakamoto T, Uezu A, Kawauchi S, Kuramoto T, Makino K, Umeda K, Araki N, Baba H, Nakanishi H. Mass spectrometric analysis of microtubule co-sedimented proteins from rat brain. *Genes Cells*, 2008, 13(4): 295–312. [DOI]
- [33] Goehler H, Lalowski M, Stelzl U, Waelter S, Stroedicke M, Worm U, Droege A, Lindenberg KS, Knoblich M, Haenig C, Herbst M, Suopanki J, Scherzinger E, Abraham C, Bauer B, Hasenbank R, Fritzsche A, Ludewig AH, Büsow K, Coleman SH, Gutekunst CA, Landwehrmeyer BG, Lehrach H, Wanker EE. A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol Cell*, 2004, 15(6): 853–865. [DOI]
- [34] Thompson D, Pusch M, Whistler JL. Changes in G protein-coupled receptor sorting protein affinity regulate postendocytic targeting of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 2007, 282(40): 29178–29185. [DOI]
- [35] Cai ZZ, Xu JG, Zhou YH, Zheng JH, Lin KZ, Zheng SZ,

- Ye MS, He Y, Liu CB, Xue ZX. Human cytomegalovirus-encoded US28 may act as a tumor promoter in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2016, (9): 2789–2798. [DOI]
- [36] Tschische P, Moser E, Thompson D, Vischer HF, Parzmair GP, Pommer V, Platzer W, Schwarzbraun T, Schaidler H, Smit MJ, Martini L, Whistler JL, Waldhoer M. The G-protein coupled receptor associated sorting protein GASP-1 regulates the signalling and trafficking of the viral chemokine receptor US28. *Traffic*, 2010, 11(5): 660–674. [DOI]
- [37] Huang R, Xing Z, Luan Z, Wu T, Hu G. A specific splicing variant of SVH, a novel human armadillo repeat protein, is up-regulated in hepatocellular carcinomas. *Cancer Res*, 2003, 63(13): 3775–3782. [DOI]
- [38] Matsuki T, Kiyama A, Kawabuchi M, Okada M, Nagai K. A novel protein interacts with a clock-related protein, rPer. *Brain Res*, 2001, 916(1–2): 1–10. [DOI]
- [39] Kiyama A, Isojima Y, Nagai K. Role of Per1-interacting protein of the suprachiasmatic nucleus in NGF mediated neuronal survival. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339(2): 514–519. [DOI]
- [40] Horn SC, Lalowski M, Goehler H, Dröge A, Wanker EE, Stelzl U. Huntingtin interacts with the receptor sorting family protein GASP2. *J Neural Transm (Vienna)*, 2006, 113(8): 1081–1090. [DOI]
- [41] Jung B, Padula D, Burtscher I, Landerer C, Lutter D, Theis F, Messias AC, Geerlof A, Sattler M, Kremmer E, Boldt K, Ueffing M, Lickert H. Pitchfork and Gprasp2 target Smoothened to the primary cilium for Hedgehog pathway activation. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149477. [DOI]
- [42] Edfawy M, Guedes JR, Pereira MI, Laranjo M, Carvalho MJ, Gao X, Ferreira PA, Caldeira G, Franco LO, Wang D, Cardoso AL, Feng G, Carvalho AL, Peça J. Abnormal mGluR-mediated synaptic plasticity and autism-like behaviours in Gprasp2 mutant mice. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1431. [DOI]
- [43] Heese K, Yamada T, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Nagai Y, Sawada T. Characterizing the new transcription regulator protein p60TRP. *J Cell Biochem*, 2004, 91(5): 1030–1042. [DOI]
- [44] Mou Z, Tapper AR, Gardner PD. The armadillo repeat-containing protein, ARM CX 3, physically and functionally interacts with the developmental regulatory factor Sox10. *J Biol Chem*, 2009, 284(20): 13629–13640. [DOI]
- [45] Santini F, Gaidarov I, Keen JH. G protein-coupled receptor/arrestin3 modulation of the endocytic machinery. *J Cell Biol*, 2002, 156(4): 665–676. [DOI]
- [46] Marchese A, Benovic JL. Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem*, 2001, 276(49): 45509–45512. [DOI]
- [47] Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*, 2007, 315(5809): 201–205. [DOI]
- [48] Tsao P, Cao T, von Zastrow M. Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 2001, 22(2): 91–96. [DOI]
- [49] Hanyaloglu AC, von Zastrow M. A novel sorting sequence in the β_2 -adrenergic receptor switches recycling from default to the Hrs-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 2007, 282(5): 3095–3104. [DOI]
- [50] Cho DI, Zheng M, Min C, Kwon KJ, Shin CY, Choi HK, Kim KM. ARF6 and GASP-1 are post-endocytic sorting proteins selectively involved in the intracellular trafficking of dopamine D₂ receptors mediated by GRK and PKC in transfected cells. *Br J Pharmacol*, 2013, 168(6): 1355–1374. [DOI]
- [51] Thompson D, Whistler JL. Dopamine D(3) receptors are down-regulated following heterologous endocytosis by a specific-interaction with G protein-coupled receptor-associated sorting protein-1. *J Biol Chem*, 2011, 286(2): 1598–1608. [DOI]
- [52] Conquet F, Bashir ZI, Davies CH, Daniel H, Ferraguti F, Bordi F, Franz-Bacon K, Reggiani A, Matarese V, Condé F. Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature*, 1994, 372(6503): 237–243. [DOI]
- [53] Kelly L, Farrant M, Cull-Candy SG. Synaptic mGluR activation drives plasticity of calcium-permeable AMPA receptors. *Nat Neurosci*, 2009, 12(5): 593–601. [DOI]
- [54] Huber KM, Kayser MS, Bear M F. Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science*, 2000, 288(5469): 1254–1257. [DOI]
- [55] Snyder EM, Philpot BD, Huber KM, Dong X, Fallon JR, Bear MF. Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nat Neurosci*, 2001, 4(11): 1079–1085. [DOI]
- [56] Oh WC, Hill TC, Zito K. Synapse-specific and size-dependent mechanisms of spine structural plasticity accompanying synaptic weakening. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(4): E305–E312. [DOI]
- [57] Mion S, Corti C, Neki A, Shigemoto R, Corsi M, Fumagalli G, Ferraguti F. Bidirectional regulation of neurite elaboration by alternatively spliced metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) isoforms. *Mol Cell Neurosci*, 2001, 17(6): 957–972. [DOI]
- [58] Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF, Spohr TCLSE. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 11. [DOI]

- [59] Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(5): 331–344. [DOI]
- [60] Lee H, Ko HW. Ciliary smoothened-mediated noncanonical hedgehog signaling promotes tubulin acetylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480(4): 574–579. [DOI]
- [61] Karg J, Balenga NA, Platzer W, Martini L, Whistler JL, Waldhoer M. The GPCR-associated sorting protein 1 regulates ligand-induced down-regulation of GPR55. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(8): 2611–2619. [DOI]
- [62] Hirata Y, Enoki R, Kuribayashi-Shigetomi K, Oda Y, Honma S, Honma KI. Circadian rhythms in *Per1*, *PER2* and Ca^{2+} of a solitary SCN neuron cultured on a microisland. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 18271. [DOI]
- [63] Zhou XY, Yang GH, Huang RM, Chen XT, Hu GX. SVH-B interacts directly with p53 and suppresses the transcriptional activity of p53. *FEBS Lett*, 2007, 581(25): 4943–4948. [DOI]
- [64] Tuszyński GP, Rothman VL, Zheng XY, Gutu M, Zhang XM, Chang F. G-protein coupled receptor-associated sorting protein 1 (GASP-1), a potential biomarker in breast cancer. *Exp Mol Pathol*, 2011, 91(2): 608–613. [DOI]
- [65] Furuta J, Nobeyama Y, Umebayashi Y, Otsuka F, Kikuchi K, Ushijima T. Silencing of peroxiredoxin 2 and aberrant methylation of 33 CpG islands in putative promoter regions in human malignant melanomas. *Cancer Res*, 2006, 66(12): 6080–6086. [DOI]
- [66] Jacinto FV, Ballestar E, Ropero S, Esteller M. Discovery of epigenetically silenced genes by methylated DNA immunoprecipitation in colon cancer cells. *Cancer Res*, 2007, 67(24): 11481–11486. [DOI]
- [67] Rickman DS, Millon R, De Reynies A, Thomas E, Wasylyk C, Muller D, Abecassis J, Wasylyk B. Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays. *Oncogene*, 2008, 27(51): 6607–6622. [DOI]
- [68] Kris SR, Jin VX, Bieda MC, O'Geen H, Yaswen P, Green R, Farnham PJ. Identification of genes directly regulated by the oncogene ZNF217 using ChIP-chip assays. *J Biol Chem*, 2007, 282(13): 9703–9712. [DOI]
- [69] Jakubík J, El-Fakahany EE. Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2010, 3(9): 2838–2860. [DOI]
- [70] Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neuro Sci*, 2005, 6(12): 919–930. [DOI]
- [71] Cao Y, Aypar U. A novel Xq22.1 deletion in a male with multiple congenital abnormalities and respiratory failure. *Eur J Med Genet*, 2016, 59(5): 274–277. [DOI]
- [72] Moran LB, Graeber MB. Towards a pathway definition of Parkinson's disease: a complex disorder with links to cancer, diabetes and inflammation. *Neurogenetics*, 2008, 9(1): 1–13. [DOI]
- [73] Sun JP, Li R, Ren HZ, Xu AT, Yu X, Xu ZG. The very large G protein coupled receptor (VLGR1) in hair cells. *J Mol Neurosci*, 2013, 50(1): 204–214. [DOI]
- [74] Weston MD, Luijendijk MW, Humphrey KD, Möller C, Kimberling WJ. Mutations in the VLGR1 gene implicate G-protein signaling in the pathogenesis of Usher syndrome type II. *Am J Hum Genet*, 2004, 74(2): 357–366. [DOI]
- [75] Ebermann I, Wiesen MH, Zrenner E, Lopez I, Pigeon R, Kohl S, Löwenheim H, Koeneke RK, Bolz HJ. GPR98 mutations cause Usher syndrome type 2 in males. *J Med Genet*, 2009, 46(4): 277–280. [DOI]
- [76] Michalski N, Michel V, Bahloul A, Lefèvre G, Barral J, Yagi H, Chardenoux S, Weil D, Martin P, Hardelin JP, Sato M, Petit C. Molecular characterization of the ankle-link complex in cochlear hair cells and its role in the hair bundle functioning. *J Neurosci*, 2007, 27(24): 6478–6488. [DOI]
- [77] Chen Y, Lu XL, Guo L, Ni WL, Zhang YP, Zhao LP, Wu LJ, Sun S, Zhang SS, Tang ML, Li WY, Chai RJ, Li HW. Hedgehog signaling promotes the proliferation and subsequent hair cell formation of progenitor cells in the neonatal mouse cochlea. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 426. [DOI]
- [78] Xing GQ, Yao J, Liu CY, Wei QJ, Qian XL, Wu LX, Lu YJ, Cao X. GPRASP2, a novel causative gene mutated in an X-linked recessive syndromic hearing loss. *J Med Genet*, 2017, 54(6): 426–430. [DOI]
- [79] Liu C, Lin C, Yao J, Wei Q, Xing G, Cao X. Dynamic expression analysis of *armc10*, the homologous gene of human GPRASP2, in zebrafish embryos. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 5931–5937. [DOI]
- [80] Li FF, Li WQ, Jing Q. G protein-coupled receptors in vascular development. *Hereditas(Beijing)*, 2013, 35(4): 459–467.
李方方, 李文庆, 荆清. G 蛋白偶联受体在血管发育中的作用. 遗传, 2013, 35(4): 459–467. [DOI]
- [81] Zhang BL, Gao DS, Xu YX. G protein-coupled receptor 3: a key factor in the regulation of the nervous system and follicle development. *Hereditas(Beijing)*, 2013, 35(5): 578–586.
张宝乐, 高殿帅, 徐银学. G 蛋白偶联受体 3: 调控神经系统和卵泡发育的关键因子. 遗传, 2013, 35(5): 578–586. [DOI]