



G蛋白偶联受体的化学动态修饰和化学干预

徐萍^{1,2}, 胡骏驰³, 高玉婷⁴, 文鑫⁵, 曹玉婷⁶, 郭祖奉³, 易文⁶, 杨帆^{5*}, 李亦舟^{4*},
党永军^{3*}, 张岩^{2*}

1. 南华大学, 衡阳医学院, 基础医学院, 细胞与遗传研究所, 衡阳 421001

2. 浙江大学基础医学院, 杭州 310012

3. 重庆医科大学, 新靶标与化学干预教育部医药基础研究创新中心, 重庆 400016

4. 重庆大学药学院, 创新药物研究中心, 重庆 401331

5. 山东大学基础医学院, 济南 250012

6. 浙江大学生命科学院, 杭州 310058

*通讯作者, E-mail: yangfan1357@163.com; yizhouli@cqu.edu.cn; yjdang@cqmu.edu.cn; zhang_yan@zju.edu.cn

收稿日期: 2024-12-03; 接受日期: 2025-01-08; 网络版发表日期: 2025-02-17

国家自然科学基金(编号: 92353303)资助项目

摘要 G蛋白偶联受体(GPCR)在细胞信号转导中发挥关键核心作用, 其功能通过多种化学修饰精细调控. 本文综述了GPCR的主要化学修饰类型, 包括磷酸化、糖基化、泛素化和棕榈酰化, 并探讨了这些修饰如何影响受体的活性、稳定性、膜定位及信号转导. 特别是, 磷酸化修饰通过G蛋白偶联受体激酶(GRKs)调控 β -Arrestin的结合, 进而调节信号转导的强度和持续时间. 糖基化修饰影响受体的膜表面表达以及信号偏向性, 而泛素化与棕榈酰化修饰则涉及受体的降解、内吞以及膜定位的调控. 本文还探讨了这些化学修饰在药物开发中的潜在应用, 特别是在心血管疾病、神经退行性疾病和代谢紊乱等领域的最新研究进展, 为未来药物设计提供了新的策略和视角. 最后, 本文总结了GPCR修饰研究在生物学和临床应用中的前景与挑战.

关键词 G蛋白偶联受体, 化学修饰, 磷酸化, 糖基化, 化学干预

1 引言

G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)是人体细胞表面的一类重要膜蛋白, 在细胞信号传导中发挥关键作用^[1,2]. GPCR通过与多样的配体结合, 通过产生构象变化激活细胞内的G蛋白或招募 β -Arrestin, 进而触发复杂的信号转导路径, 影响细胞的多种生物学功能^[3,4]. 近年来, 随着对GPCR结构和功能研究的

深入了解, 多项科学研究揭示了化学动态修饰在调控GPCR活性中的重要角色^[5], 这不仅深化了我们对GPCR工作原理的理解, 还为药物设计和疾病治疗开辟了新的途径.

GPCR的化学动态修饰主要有磷酸化修饰、糖基化修饰、泛素化修饰和棕榈酰化修饰等, 其中磷酸化修饰是研究最深入的一种. 这一过程通常发生在GPCR的特定区域, 如C末端或胞内环, 这些区域对于

引用格式: Xu P, Hu JC, Gao YT, Wen X, Cao YT, Guo ZF, Yi W, Yang F, Li YZ, Dang YJ, Zhang Y. Dynamic chemical modifications and chemical interventions of G protein-coupled receptor. *Sci Sin Chim*, 2025, 55: 877–891, doi: 10.1360/SSC-2024-0276

G蛋白的结合至关重要^[6,7]。磷酸化不仅是调控受体活性的开关,还能调节其后续的命运,如内吞和降解,从而精细调整信号传递的强度和时程^[8~10]。糖基化和棕榈酰化修饰也是重要的修饰方式,它们分别影响受体的结构稳定性和膜定位,进一步调控受体的功能^[11,12]。

GPCR作为药物研发的重要靶点,其化学动态修饰和化学干预的研究对于开发新型药物具有重要意义。通过深入探索GPCR的化学动态修饰机制,以期设计出更加精准的药物,干预特定的信号通路,达到治疗疾病的目的^[13]。药物研发技术,如高通量筛选、虚拟筛选、结构导向药物设计以及DNA编码化合物库技术,都是当前寻找新型GPCR靶向药物的重要手段。高通量筛选是一种快速、高效的方法,通过自动化技术对大量化合物进行筛选,以发现具有潜在活性的分子。虚拟筛选则利用计算机模拟技术,对化合物库进行筛选,以预测其与GPCR的结合能力^[14]。结构导向的药物设计则是基于GPCR的三维结构,设计出与其结合的分子^[15]。DNA编码文库是一种新兴的技术,通过编码化合物的DNA序列,实现对化合物的快速筛选^[16,17]。这些方法不仅加速了新药的发现,也提高了药物的特异性和安全性,为靶向GPCR化学修饰的调控,以及治疗心血管疾病、神经退行性疾病、代谢紊乱等提供了新的希望^[18]。

综上,通过深入研究GPCR的化学动态修饰机制并探索相应的化学干预策略,学界正开辟出一条通向更高效、更安全药物设计的道路^[1]。这些进展不仅增进了我们对GPCR复杂功能及调控网络的认识,而且为治疗策略的创新奠定了基础。利用这些新知识,研究人员能够靶向特定的GPCR信号路径,设计出特异性强、副作用小的新型药物,从而在治疗多种疾病时提供更精准的解决方案^[3]。此外,这一领域的研究持续深化,不断揭示新的调控机制,为未来药物研发提供了更多的可能,确保了药物开发的前沿性与治疗效果的优化^[19]。

2 GPCR的化学动态修饰类型及功能

GPCR的化学动态修饰涉及功能基团在酶的作用下与特定氨基酸的共价连接,通过调节蛋白质的丰度或活性影响蛋白质的功能^[20,21]。GPCR的化学修饰控制受体功能的各个方面,包括调节受体折叠、生物合

成、运输、二聚化等。这一过程通常发生在GPCR的N端、胞外环(ECLs)、胞内环(ICLs)、跨膜结构域和C末端。目前已在GPCR报道了多种化学修饰,包括磷酸化、糖基化、泛素化、棕榈酰化等^[22]。GPCR化学修饰的紊乱导致信号反应不足或过多,与多种疾病有关,如神经退行性疾病^[23]、免疫功能障碍^[24]和癌症^[25,26]等。深入了解不同化学修饰调节GPCR功能的作用和机制,对于理解疾病中的失调机制以及改进和完善GPCR的药物开发手段至关重要。

2.1 GPCR糖基化

大多数哺乳动物的GPCR在其N端或ECLs区域发生糖基化,包括N-连接糖基化和O-连接糖基化。N-连接糖基化发生在N-X-S/T($X \neq P$)序列中的天冬酰胺(Asn)残基上,并在内质网开始合成,随后在高尔基体中加工。绝大多数GPCR的N端含有至少一个N-X-S/T序列,而ECL1、ECL2和ECL3区域的糖基化概率分别为14%、66%和20%^[27~29]。O-糖基化则发生在丝氨酸或苏氨酸残基上,其合成由一系列N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)转移酶在高尔基体中进行,糖链结构复杂多样(图1)。目前,已有60多种GPCR被发现具有O-糖基化修饰,且有预测显示约350种GPCR可能具备O-糖基化位点^[30]。糖基化广泛影响GPCR的折叠、转运、二聚化、配体结合和信号转导等生物学功能^[31]。

N-糖基化在调节GPCR的细胞膜表面表达方面起着重要作用。对于 β_2 -肾上腺素受体(β_2AR)、血管紧张素1型受体(AT1R)等,干扰N-糖基化或突变糖基化位点会显著降低其在细胞膜表面表达^[32~37]。例如,突变AT1R的所有N-糖基化位点会完全消除其膜表达,而保留ECL2区域的Asn176位点可恢复其表达^[38]。此外,糖基化缺陷的嘌呤能受体P2Y2和 α_1D 肾上腺素受体体会被滞留在内质网,并通过内质网相关降解途径(ERAD)清除^[39,40]。

N-糖基化还通过调节GPCR的配体结合^[41]和G蛋白偶联来影响信号转导。研究表明,干扰N-糖基化可导致一些GPCR(如促甲状腺素受体、视紫红质等)无法有效与配体结合^[42,43]。然而,某些情况下,如凝血酶受体(PAR1)的ECL2区域N-糖基化缺失,反而促进了配体与受体的结合,并增强了与G蛋白的偶联信号^[44]。N-糖基化还可影响GPCR的信号偏向性。例如,PAR1的N-糖基化突变导致其更偏向于与 $G_{12/13}$ 偶联,而不是 G_q 蛋

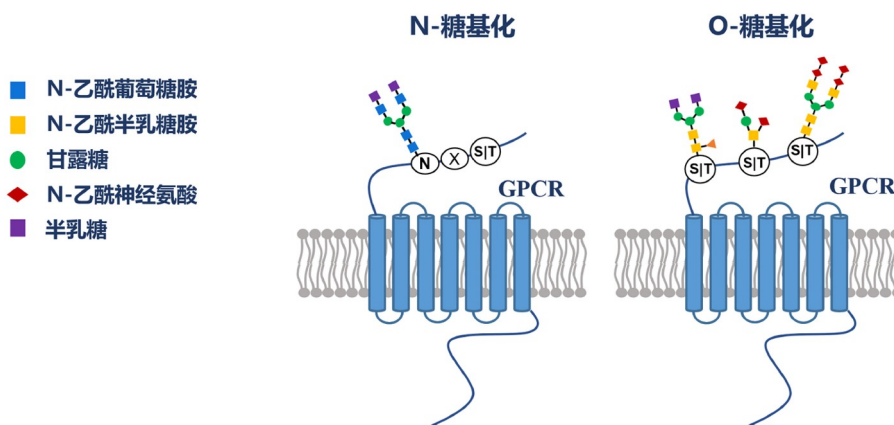


图 1 (网络版彩图) GPCR的糖基化修饰

Figure 1 (Color online) The glycosylation modifications of GPCR.

白^[45]。此外, N-糖基化对GPCR的二聚化也具有重要影响。缺失N端糖基化会减少 $\beta 1AR$ 和 $\beta 2AR$ 的同源二聚化, 而在 γ 氨基丁酸B型受体(GABA(B))异二聚体界面引入N-糖基化则可阻碍GABAB1和GABAB2的结合^[46]。

尽管O-糖基化对GPCR的细胞表面表达、配体结合和信号转导等方面已被部分研究, 但其具体机制仍未完全阐明。未来的研究需结合生物信息学、结构生物学等多学科技术, 深入探讨O-糖基化对GPCR功能的影响。

2.2 GPCR磷酸化

GPCR通过与G蛋白和阻遏蛋白(Arrestin)相互作用, 将外部刺激转化为细胞内信号。GPCR激活G蛋白后, 通过调节细胞内第二信使水平发挥作用, 而Arrestin则通过招募下游蛋白, 导致受体的脱敏、内吞或启动Arrestin自身的信号转导途径^[47,48]。GPCR与Arrestin的结合需要受体的磷酸化修饰, 这一过程是由GRKs催化的, 通常发生在受体的C末端或第三个胞内环^[49]。磷酸化的GPCR通过不同的磷酸化模式影响Arrestin的结合, 进而调节下游信号通路的活性。

GPCR磷酸化在信号转导中的作用可通过“笛子模型”理论来理解。该模型假设, GPCR的C末端具有多个潜在磷酸化位点, 形成多种磷酸化组合。类似于笛子手指按孔的方式, 这些磷酸化组合可激活不同的Arrestin功能(图2)。研究表明, GRK2磷酸化的模式(1-4-6-7组合)能够激活网格蛋白, 引发受体内吞; 而

GRK6磷酸化模式(1-5组合)则通过激活SRC信号通路促进细胞迁移。不同的磷酸化模式可以导致Arrestin形成不同的构象, 影响其与GPCR及下游信号分子的结合效率与特异性。由于磷酸化位点组合的多样性, 理论上受体的磷酸化模式可以生成超过1000种Arrestin的特异性构象, 揭示了GPCR信号转导的复杂性^[50]。

此外, GPCR磷酸化还与Arrestin在细胞信号传导中的选择性分配密切相关。研究发现, GPCR尾部的磷酸化“条形码”通过别构调控机制影响Arrestin中的多聚脯氨酸(polyproline)区域, 进而决定其与下游蛋白的结合(图2)。例如, Arrestin的多聚脯氨酸区域是GPCR与含SH3结构域蛋白(SH3-CPs)结合的关键位点。通过这种机制, GPCR可以精确地调控不同的信号通路。科学家们提出了“Arrestin多聚脯氨酸分选码头模型”, 该模型揭示了GPCR通过磷酸化调节Arrestin构象变化, 从而选择性地激活特定的信号通路, 为开发靶向GPCR信号通路的药物提供了新的理论基础^[51]。

GPCR磷酸化的时序效应也是信号转导中的关键因素。研究表明, 单一磷酸化位点的改变可以通过调控Arrestin的构象变化, 介导不同的信号转导进程(图2)。通过基因密码子扩展技术和荧光共振能量转移(FRET)技术, 科学家发现单个磷酸化位点对Arrestin的作用并不一致^[52]。不同的磷酸化位点结合的优先次序可能决定其他位点是否可以结合, 进一步影响Arrestin的功能。例如, 特定的磷酸化缺陷可改变Arrestin与MEK和c-Raf-1的结合方式, 进而影响下游信号通路的调控^[53]。

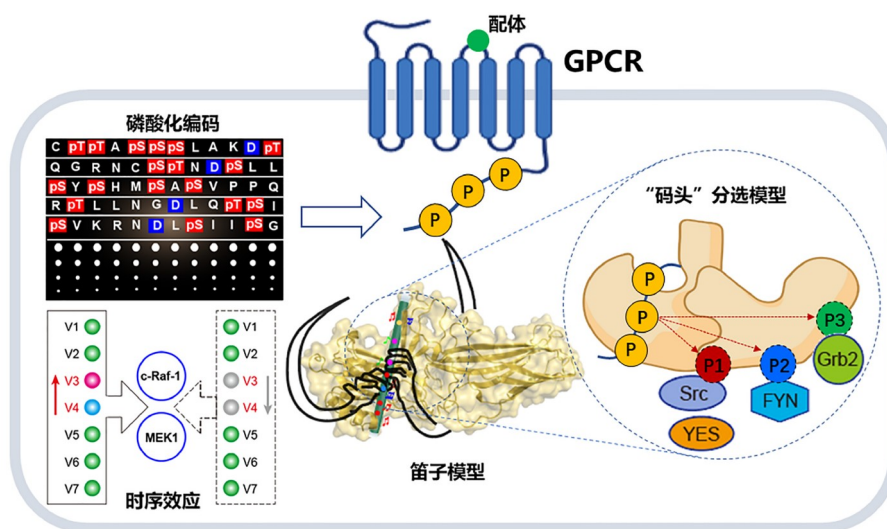


图2 (网络版彩图) GPCR磷酸化编码的“笛子模型”理论, Arrestin多聚脯氨酸码头分选理论, GPCR磷酸化编码的时序效应机制。橘黄色P: 磷酸根; 红色P1: 多聚脯氨酸P1区域; 蓝色P2: 多聚脯氨酸P2区域; 绿色P3: 多聚脯氨酸P3区域

Figure 2 (Color online) The “Flute Model” theory of GPCR phosphorylation coding, the Arrestin polyproline dock sorting theory, and the temporal effect mechanism of GPCR phosphorylation coding. Orange P: phosphorylated residue (phosphate group); red P1: polyproline P1 region; blue P2: polyproline P2 region; green P3: polyproline P3 region.

随着结构生物学方法的发展,特别是冷冻电镜技术的进步,许多GPCR磷酸化与Arrestin复合物的高分辨率结构已被解析^[54-59],其中我国科学家亦做出突出贡献,浙江大学研究团队通过冷冻电镜技术揭示了大麻素受体磷酸化后与Arrestin的相互作用^[60]。研究表明, GPCR磷酸化在Arrestin的招募和激活中起到了关键作用,尤其是磷酸根在受体与Arrestin结合过程中的重要性。研究表明,磷酸化可以诱导GPCR C末端结构域从无序结构转变为瞬时 β 折叠结构, Arrestin可以识别该 β 折叠结构,稳定GPCR与Arrestin的相互作用^[61]。

综上所述, GPCR的磷酸化不仅通过影响Arrestin的功能,调控信号传导的效率和特异性,还揭示了信号转导中的多样性机制。未来,深入研究GPCR磷酸化模式与不同信号通路的调控机制,将有助于全面理解GPCR信号转导的内在机理,并为开发新型药物提供理论依据。

2.3 GPCR的其他化学修饰

除糖基化和磷酸化外, GPCR还可发生其他多种翻译后修饰,包括泛素化、棕榈酰化、SUMO化、S-硝基化、酪氨酸硫酸化和精氨酸甲基化等^[62](图3)。这些修饰在调节受体功能、信号转导及细胞反应中发

挥重要作用,为GPCR的功能调控提供了多维度的机制,并为开发靶向GPCR的药物提供了新的方向。

2.3.1 泛素化

GPCR的泛素化是通过泛素与受体结合,标记其进行降解。泛素是一种包含76个氨基酸的小蛋白,通过E1、E2、E3酶系统与受体的赖氨酸残基形成共价结合,从而完成修饰。泛素化可调节GPCR的内体-溶酶体运输和蛋白酶体降解^[63-65]。研究表明,泛素化影响不同GPCR的信号传导,调节其与信号效应物的相互作用^[66],其功能可能因各GPCR类型、细胞类型和生理功能而异。泛素化为可逆的翻译后修饰,去泛素化在调控细胞反应中非常关键。泛素在底物蛋白上的积累依赖于E1、E2、E3的活性和去泛素酶(DUBs)的作用^[67]。去泛素酶负责切割泛素间或泛素与底物蛋白的键,同时在GPCR的转运和细胞膜表面表达中起重要作用,防止泛素-蛋白酶体途径的降解。去泛素酶的活动决定受体命运,包括降解或回收^[68]。激动剂激活的GPCR泛素化也对生物功能重要,尽管相关研究相对较少,去泛素酶将在受体信号调控中发挥关键作用^[69]。

泛素化分为组成型泛素化和配体诱导泛素化^[70]。组成型泛素化发生在GPCR合成过程中,有助于受体

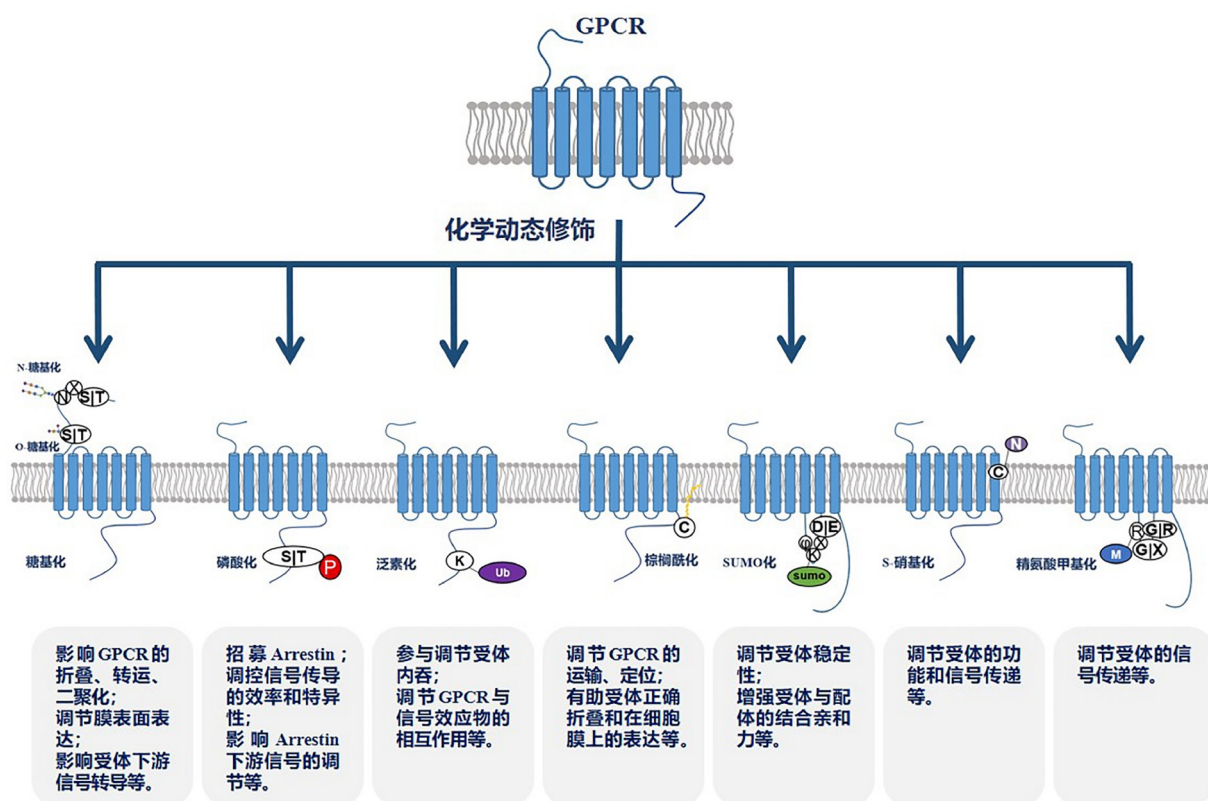


图 3 (网络版彩图) GPCR化学动态修饰类型及功能

Figure 3 (Color online) The types and functions of dynamic chemical modifications of GPCR.

折叠和运输。未正确折叠的受体会通过ERAD途径被降解^[71~73]。配体诱导的泛素化则与受体的磷酸化和 β -Arrestin的招募相关,参与调节受体的内吞过程^[74,75]。泛素化还在一些特定的信号转导中起到关键作用,例如在炎症反应和内涵体信号转导^[66,76~80]。

2.3.2 棕榈酰化

GPCR的棕榈酰化修饰通常发生在受体C末端的半胱氨酸残基上,形成与棕榈酸的共价结合。约70%的GPCR在第7个跨膜螺旋域的羧基端含有棕榈酰化位点,棕榈酰化在调节GPCR的运输、定位和功能中起着至关重要的作用^[81~83]。这一过程大多是可逆的,且受激动剂刺激的影响。棕榈酰化有助于受体正确折叠并促进其在细胞膜上的表达。例如,缺乏棕榈酰化的GPCR表现出折叠错误,导致蛋白酶体降解^[84]。棕榈酰化还影响GPCR在脂筏中的定位,进而调节其与脂筏的结合及信号转导^[85~88]。此外,棕榈酰化还与GPCR的

二聚化、内化和G蛋白偶联特性密切相关,影响信号复合物的组装与信号传递^[89~91]。

2.3.3 SUMO化

SUMO化修饰是将11 kDa的SUMO蛋白附加到GPCR的特定赖氨酸残基上,调节受体的功能和稳定性^[92]。SUMO化修饰传统上被认为发生在细胞核,但近年来的研究表明,它也与膜蛋白,特别是GPCR相关^[92~96]。SUMO化能增强某些GPCR与配体的结合亲和力,提高信号传导效率。例如,毒蕈碱M1受体(M1R)通过K327位点的SUMO化,增强了其信号传导和受体内吞的效率^[96]。激动剂处理可诱导某些受体的SUMO化,如血清素5-羟色胺1A受体的SUMO化调节其内吞作用^[97]。

2.3.4 S-硝基化

S-硝基化是通过一氧化氮(NO)与GPCR的半胱氨酸

酸残基共价结合发生的修饰。S-硝基化通常影响GPCR的功能和信号传递。例如, $\alpha 1$ -肾上腺素受体($\alpha 1AR$)的S-硝基化与血管收缩反应的降低相关, 而血管紧张素2型受体(AT2R)的S-硝基化则减少了其对血管紧张素的亲和力^[98~100]。

2.3.5 酪氨酸硫酸化

酪氨酸硫酸化是一种少数趋化因子受体的修饰, 发生在高尔基体中, 涉及将硫酸基团附加到酪氨酸残基上, 形成酪氨酸O-硫酸盐^[101]。这一修饰增强了趋化因子配体的亲和力和特异性, 已在CCR2和CCR3等趋化因子受体中得到证实^[102~104]。

2.4 GPCR化学修饰的检测方法

在体外和体内检测GPCR化学修饰的方法不仅有助于了解受体信号传导的生理机制, 而且有助于全面理解配体的信号传导特性。检测GPCR化学修饰的经典方法是使用放射性探针对受体进行代谢标记, 然后进行放射自显影。比如可以用于检测GPCR棕榈酰化以及胰蛋白酶磷酸肽图谱用于检测GPCR磷酸化^[105], 这种方法的主要缺点是不能提供有关化学修饰精确位点的信息。免疫沉淀靶蛋白结合免疫印迹是一种广泛使用的检测GPCR化学修饰的策略, 可用于检测GPCR磷酸化、糖基化和泛素化^[76]。生物信息学、质谱、分子生物学和基因工程领域的最新进展极大助力了GPCR化学修饰的鉴定。基于生物信息学的化学修饰预测工具的开发, 可以用来预测GPCR磷酸化、糖基化、泛素化和棕榈酰化^[106]。随着高分辨质谱技术的发展, 基于质谱的蛋白质组学研究可对细胞或组织中GPCR的所有化学修饰位点进行系统分析^[107,108]。该技术不需要放射性标记, 并且可以确定受体化学修饰位点的精确位置。但是由于该技术需要相对大量的纯化受体蛋白, 这对通常在细胞中低水平表达的受体来说是一个挑战。此外, 分子生物学和生化技术通过对已知或预测的GPCR化学修饰位点进行定点突变和免疫印迹, 以检测GPCR泛素化、糖基化和棕榈酰化等化学修饰^[109]。基于生物发光共振能量转移(BRET)的技术被用于实时检测完整细胞中GPCR的泛素化^[110]。体外生物素开关技术被用于测定GPCR的S-硝基化^[111]。此外, Steentoft等^[30]开发了一种基因工程策略, 通过阻断延伸过程来产生截短和均匀的O-聚糖, 结合质谱方

法, 用于鉴定各种肽上的O-糖基化位点。近年来, 生物正交标记或点击化学已被用于研究GPCR的棕榈酰化^[112]。

除此之外, 结构生物学所揭示的GPCR化学修饰也有助于我们更加深入地理解化学修饰调节GPCR构象和功能的分子机制。膜蛋白结构生物学的技术突破为理解GPCR结构和药理学做出了重大贡献。然而, 这些高分辨率结构中很少存在化学修饰, 这可能是因为大多数化学修饰位于高度灵活的区域, 如N端和C末端。冷冻电镜的发展推动了在高分辨率GPCR结构中直接观察到化学修饰的进程。比如在CD97和HCAR2-Gi1复合物的冷冻电镜结构中都观察到糖基化修饰, 其中CD97的N406、N413和N520被糖基化, HCAR2在N17存在糖基化修饰^[113,114]。在M2R- β -Arrestin1复合物中观察到T307、S309、T310和S311四个磷酸化位点^[115]。此外, 通过冷冻电镜技术还能观察到复合物和多肽配体的化学修饰, 比如GPR97-G蛋白复合物中G α C351存在棕榈酰化修饰并且增强下游信号转导^[116], 在CCK1R和CCK2R与G蛋白的复合物中观察到多肽配体的硫酸化修饰, 并且影响对CCK受体亚型的偏好^[117]。

然而, 由于原代细胞或组织中的受体低表达和化学修饰的低化学计量比, 生理条件下的GPCR化学修饰表征仍然是一个长期的挑战。因此, 需要更灵敏的技术来表征内源性GPCR上的化学修饰位点, 并分析疾病进展过程中GPCR化学修饰的空间和时间动态。

3 GPCR化学干预技术与方法进展

对GPCR化学动态修饰在重要生理及病理过程中功能的精确理解, 为开发更有效、更具选择性、更安全的GPCR靶点干预策略提供了全新理论依据。与此同时, 新兴的GPCR化学干预新技术也不断涌现, 如高通量筛选技术、虚拟筛选与结构导向的药物设计和DNA编码分子库技术等(图4)。

3.1 针对GPCR的药物筛选方法

GPCR在多种生理和病理过程中发挥重要作用, 是约34%药物的靶点。自1970年Lefkowitz等^[118]利用放射性标记激素研究GPCR以来, 针对GPCR的药物筛选方法逐步壮大。随着技术的进步, 传统的放射性标记方

法已逐渐被新型筛选技术所取代, 如基于G蛋白信号通路的检测和 β -Arrestin招募实验等(图5). 以下是这些筛选方法的详细介绍.

3.1.1 G蛋白信号通路的检测

cAMP和 Ca^{2+} 作为GPCR信号传导中的重要第二信使, 广泛用于评估GPCR的激动或拮抗作用. 基于FRET原理的cAMP生物传感器, 如G-Flamp1和高通量筛选试剂盒(HTRF), 能灵敏、快速地检测cAMP变化. 荧光素酶生物发光法通过检测cAMP对蛋白激酶A活性的调控, 广泛应用于GPCR调节剂的筛选中^[119-123]. 荧光钙指示剂(如fluo-3、fluo-4)用于检测细胞内 Ca^{2+} 浓度变

化. 对 $\text{G}\alpha_s$ 和 $\text{G}\alpha_{i/o}$ 偶联的受体, 可以通过改造G蛋白来耦合钙信号通路, 从而实现筛选^[124-128]. 报告基因分析法通过将报告基因(如荧光素酶、 β -半乳糖苷酶等)与特定信号通路相联接, 间接反映GPCR的激活状态^[129,130]. FRET和BRET能够检测分子间近距离的相互作用, 在GPCR相关的高通量筛选中, FRET和BRET技术可用于标记G蛋白亚基, 检测配体诱导的GPCR激活过程, 并识别具有不同激活偏向性的配体. 此外, BRET也可用于研究GPCR的二聚化现象^[131-136].

3.1.2 β -Arrestin募集检测法

β -Arrestin是GPCR信号的关键调节蛋白, 在GPCR激活

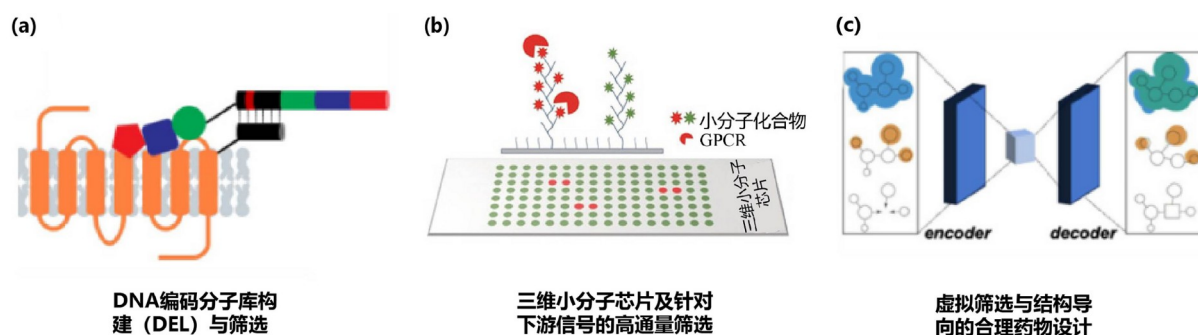


图 4 (网络版彩图)针对GPCR的化学干预技术

Figure 4 (Color online) Chemical intervention techniques of GPCR.

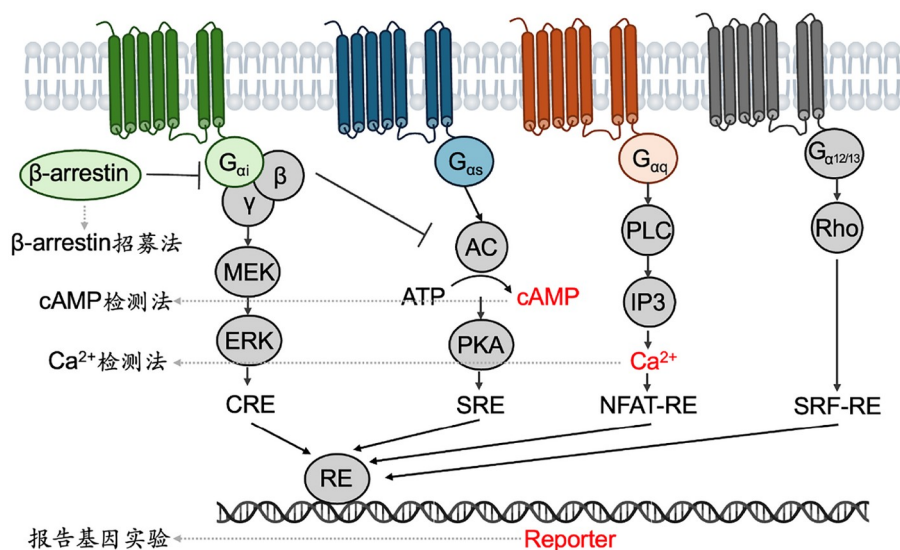


图 5 (网络版彩图)针对GPCR构象变化或相互作用的检测方法

Figure 5 (Color online) Methods for detecting conformational changes or interactions of GPCR.

后迅速招募至受体复合体中,成为监测GPCR激活状态的有效标志。1999年,Xu等^[137]提出了利用BRET技术检测蛋白质相互作用的概念。此后,PathHunter技术和TANGO技术等方法使得 β -Arrestin招募的检测更加简便和直观。PathHunter利用酶互补原理检测 β -Arrestin招募,TANGO则通过报告基因反映 β -Arrestin的动态变化。利用这些技术,研究者成功筛选了多种GPCR激动剂和拮抗剂,并拓宽了 β -Arrestin在药物筛选中的应用^[138~141]。

3.1.3 亲和选择-质谱技术

亲和选择-质谱(AS-MS)技术基于特定分子间的选择性结合,用于筛选GPCR的潜在配体。通过将GPCR与化合物孵育,使用质谱技术分析其结合的配体,从而筛选药物候选分子。最初的AS-MS应用于M2R的配体筛选,随后广泛应用于趋化因子受体等的配体筛选。此外,Qin等^[142]发展了一种新型的AS-MS方法,直接利用细胞膜上的野生型GPCR进行高通量筛选,避免了蛋白纯化过程,简化了操作^[143,144]。

3.2 结合虚拟筛选与合理药物设计靶向GPCR的药物开发

在GPCR药物开发领域,虚拟筛选与合理药物设计的结合展示了在靶点识别、结合模式优化及候选化合物成药性提升等方面的强大优势,取得了显著成果。阿片受体家族包括 μ (MOR)、 δ (DOR)、 κ (KOR)和阿片相关痛觉肽受体(NOP),是疼痛治疗的重要靶点。虚拟筛选在MOR受体的选择性激活研究中取得了重要进展,基于MOR非活性构象筛选发现了具有强 $G_{i/o}$ 激活和低 β -Arrestin活化的MOR激动剂^[145]。此外,以阿片受体家族四个亚型与多肽的冷冻电镜结构为导向设计阿片受体突变体,结合细胞水平的功能实验以确定突变体如何改变受体信号传导,了解这些相互作用可以用来设计对阿片受体亚型具有选择性的药物^[146]。Apelin受体在心血管系统中发挥着关键作用,是心血管疾病的一个有前景的治疗靶点。Zhang等^[147]基于结构进行合理药物设计,开发了两种仅激活G蛋白的偏向性激动剂。综上所述,虚拟筛选与合理药物设计的结合在多个GPCR靶点的药物开发中取得了显著进展。通过精确的靶点识别和分子优化,虚拟筛选不仅提高了药物发现的效率,还为靶向特定病理状态的精准治疗提

供了新的可能。

3.3 DNA编码分子库技术

DNA编码分子库(DNA-encoded library, DEL)技术作为一种新兴的化合物发现手段,正逐渐成为获得精准调控蛋白质功能小分子的重要技术途径^[148,149]。在针对GPCR这类重要的药物靶标的研究中,DEL的使用不仅加速了相关药物先导化合物的发现进程,而且为干预GPCR动态修饰的小分子的发现提供了途径,为重大疾病的治疗带来了新突破^[150]。2017年,杜克大学Lefkowitz等^[17]通过去污剂来稳定纯化的 β_2 AR靶标,通过DEL技术筛选获得了 β_2 AR的小分子负向变构调节剂(NAM)。随后,Lefkowitz课题组^[151]通过纳米盘法获得了 β_2 AR的稳定结构,并通过DEL筛选获得了 β_2 AR的小分子正向变构调节剂(PAM)。2024年,斯坦福大学医学院Kobilka等^[152]通过筛选药明康德(WuXi Apptec)提供的包含44亿个分子多样性的DEL,获得一种名为368的新型 μ -阿片受体(μ OR)NAM。该化合物能够与纳洛酮(naloxone)协同作用,有效对抗体内阿片类药物过量引发的影响,同时能够大幅度缓解戒断症状,为优化当前阿片类药物过量治疗方案奠定了基础。

尽管将DEL技术在GPCR先导化合物的开发中展现出独特优势,但其应用也面临诸多挑战。GPCR作为膜蛋白,其重组表达和纯化存在难度,保留其特定的生物活性构象颇具挑战;GPCR位于复杂的细胞膜环境中,不同种类的GPCR涉及多种细胞信号传导途径。如上所述,针对GPCR的DEL筛选需借助去垢剂、纳米盘、突变或者其他技术手段以稳定膜蛋白质的功能结构,并保持正确构象。为克服这些局限,重庆大学李亦舟课题组与香港大学李笑宇课题组^[153]团队合作,基于配体诱导DNA探针光交联原理,发展了针对以GPCR为代表的活细胞膜蛋白药物筛选新策略:通过特异性DNA探针,对活细胞复杂生理环境中膜蛋白进行“精确标记”,结合DEL高效构建和灵敏筛选的特点,实现针对活细胞上膜蛋白的活性配体高通量筛选(图6)。该技术能够针对GPCR超大家族、表皮生长因子受体(EGFR)等靶标进行活性化合物筛选,成功克服靶标GPCR纯化上的挑战,得以实现在活细胞水平上针对靶标GPCR膜蛋白进行直接筛选,且无需靶标过量表达。这一策略推动了基于GPCR动态修饰的靶向化学干预与膜蛋白筛选方法的进步,对于发现治疗相关疾

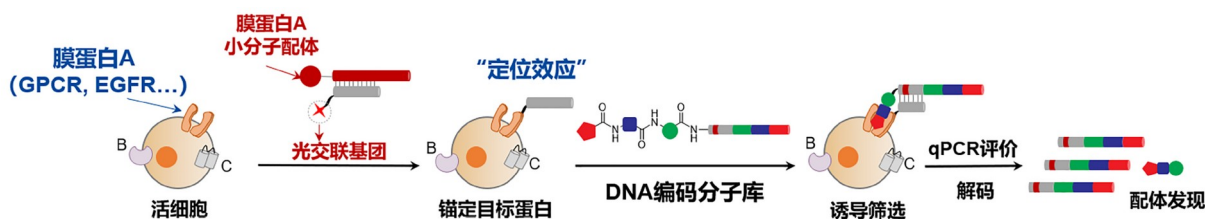


图 6 (网络版彩图) 针对活细胞上内源膜蛋白的DEL筛选策略. 通过在靶标上引入DNA标签作为引导探针, 提升分子库杂交效率从而加强配体结合. 该策略无需靶标过量表达, 可实现低浓度靶标下的筛选

Figure 6 (Color online) Selection of DNA-encoded libraries against endogenous membrane proteins on live cells. By introducing DNA tags as guiding probes on the target, the hybridization efficiency of the molecular library is enhanced, thereby strengthening ligand binding. This approach allows for screening at low concentrations without the need for excessive expression of the target.

病的先导药物具有重大意义.

为了更高效地获得靶向干预GPCR动态修饰的小分子, 重庆大学李亦舟课题组^[154]近期开发了针对蛋白质特定氨基酸残基(例如赖氨酸)的交联探针. 偶联四唑的DNA探针在302 nm光照射下, 对蛋白质赖氨酸表现出良好的交联效率(图7). 该研究拓展了四唑作为蛋白质光交联化学探针的应用范围的同时, 能提高针对特定GPCR靶标的探针交联效率, 提升基于DEL的GPCR筛选效率.

DEL的多样性直接决定着筛选结果. 李亦舟课题组^[154,155]发展了聚焦于四唑的DEL合成策略, 通过DNA-四唑偶联物与伯胺或羧酸的光介导偶联反应, 实现了DNA-二酰胺或DNA-三唑衍生物的高效合成(图8); 鉴于商业可获得羧酸或伯胺种类繁多且数量庞

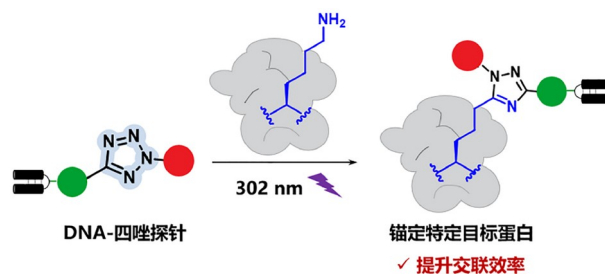


图 7 (网络版彩图) 偶联四唑的DNA探针对于蛋白质赖氨酸表现出良好的交联效率

Figure 7 (Color online) DNA probes linked to tetrazoles demonstrate high cross-linking efficiency with protein lysines.

大, 这一策略将极大地丰富分子库的化学多样性. 除了偶联反应, 官能团转化也是丰富DEL化学多样性的有效策略. 基于此, 李亦舟课题组^[156]发展了一种 K_2RuO_4

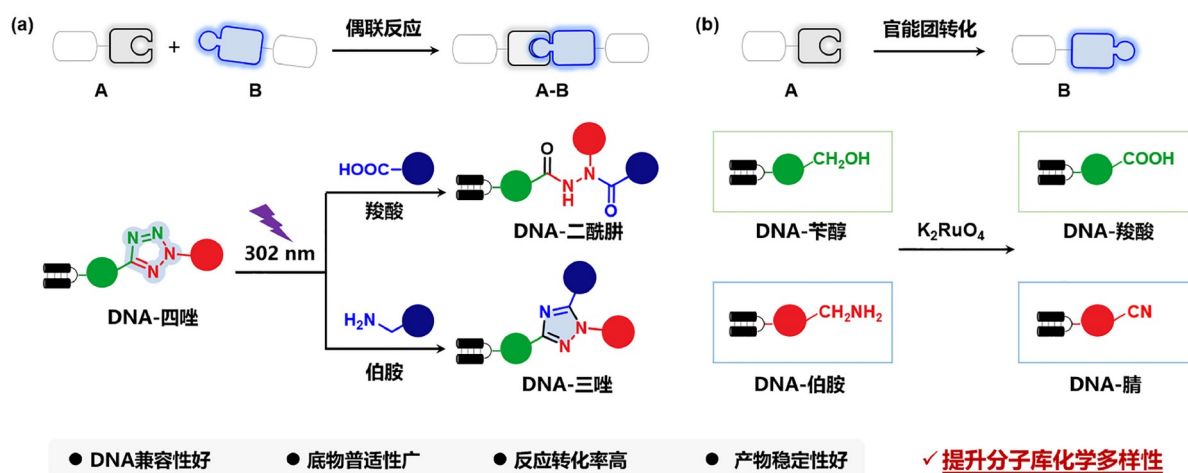


图 8 (网络版彩图) DEL构建反应新方法. (a) 光介导的基于DNA-四唑的偶联反应; (b) K_2RuO_4 介导的DNA兼容的氧化官能团转化反应

Figure 8 (Color online) New methods for constructing DNA-encoded libraries. (a) Light-mediated DNA-tetrazole-based coupling reaction; (b) DNA-compatible functional group transformations via K_2RuO_4 -mediated oxidation.

介导的DNA兼容的氧化策略,能够将苄醇和芳香醛氧化生成羧酸,且能实现从伯胺出发氧化生成腈的官能团转化。该方法可以在DNA上原位生成羧基和腈基,作为DEL合成中的活性官能团及结构基元连接基团,丰富分子库的化学多样性。

通过前期的发展,DEL技术正逐渐成为获得精准调控GPCR功能小分子的新兴技术途径。更具化学多样性的DEL将被构建并应用于复杂生理环境下的特定靶标筛选,这将为筛选获得针对GPCR动态修饰的靶向化学干预小分子提供更丰富的物质基础。

4 总结与展望

GPCR作为重要的药物靶点,其化学动态修饰和化学干预研究对理解其功能和开发新型调控分子具有重要意义。化学修饰为GPCR对生理功能的调节提供了新颖多样的机制,并为新药或改良药物开发提供了机会。本文综述了GPCR的主要化学动态修饰类型,包括糖基化、磷酸化、泛素化、棕榈酰化等,并探讨了这些修饰对GPCR表达、功能、信号转导和内吞等方面的影响。同时,本文还介绍了针对GPCR的化学干预技术与方法进展,包括高通量筛选、虚拟筛选和结构导向的药物设计、DEL技术等。然而,GPCR化学动态修饰和化学干预研究仍面临着许多挑战和机遇。需要进一步阐明不同化学动态修饰之间的相互关系和作用机制,以及它们对GPCR功能的影响。例如,GPCR的糖基化修饰对受体功能的影响机制尚不明确,需要借助生物信息学、结构生物学、基因工程和质谱等多种学科和技术手段来揭示。此外,GPCR的结构复杂性和多样性,以及糖基化过程的复杂性和动态性,也为研究带来了挑战。

针对GPCR的化学干预技术与方法不断进步,为药物开发提供了新的思路 and 工具。多学科的结合为GPCR化学干预领域提供了巨大的机遇。GPCR的多种化学动态修饰并非孤立存在,而是相互影响,共同调控GPCR的功能。例如糖基化和泛素化修饰可以共同影响GPCR的细胞表面表达和信号转导。因此,只有深入研究不同化学动态修饰之间的相互作用机制,才能更全面地理解GPCR的功能调控。GPCR的化学动态修饰也可以影响其折叠、转运、二聚化、配体结合、信号转导和内吞等过程^[157],进而影响其功能。

结构生物学的发展让GPCR化学修饰可视化,为化学修饰调节受体信号转导的研究及调控分子的设计提供了分子基础^[157]。目前,针对GPCR的化学干预技术与方法主要包括高通量筛选、虚拟筛选、结构导向的药物设计、DEL技术等。开发新型GPCR化学干预技术与方法,如基于人工智能的GPCR药物设计方法、基于CRISPR/Cas9技术的GPCR功能研究方法等,是提高GPCR药物开发的效率和成功率的重要策略。GPCR化学干预在疾病治疗领域展现出巨大潜力,尤其在心血管疾病、神经系统疾病和炎症性疾病等领域,但其信号转导与疾病的关系仍待阐明。例如,心力衰竭中 β 肾上腺素能受体磷酸化导致脱敏和降解;泛素化与癌症和心血管疾病相关;棕榈酰化影响大脑功能和神经退行性疾病等。研究化学修饰对GPCR功能的影响,需要多学科交叉合作和新技术开发。深入研究GPCR干预机制,开发GPCR靶向药物和特定功能的调节剂,评估干预安全性,将推动个体化治疗策略的发展。

总之,多学科交叉合作和新技术的开发推动GPCR化学动态修饰和化学干预研究取得进一步突破,为开发新型GPCR药物和治疗相关疾病提供新的思路和方法。

参考文献

- 1 Weis WI, Kobilka BK. *Curr Opin Struct Biol*, 2008, 18: 734–740
- 2 Cheng L, Xia F, Li Z, Shen C, Yang Z, Hou H, Sun S, Feng Y, Yong X, Tian X, Qin H, Yan W, Shao Z. *Mol Biomed*, 2023, 4: 46
- 3 Seyedabadi M, Ghahremani MH, Albert PR. *Pharmacol Ther*, 2019, 200: 148–178
- 4 Hilger D, Masureel M, Kobilka BK. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25: 4–12
- 5 Shimada I, Ueda T, Kofuku Y, Eddy MT, Wüthrich K. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 59–82
- 6 van Blesien T, Hawes BE, Luttrell DK, Krueger KM, Touhara K, Porfflri E, Sakaue M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. *Nature*, 1995, 376: 781–784
- 7 Liu S, Anderson PJ, Rajagopal S, Lefkowitz RJ, Rockman HA. *Circ Res*, 2024, 135: 174–197
- 8 Vass M, Kooistra AJ, Yang D, Stevens RC, Wang MW, de Graaf C. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39: 494–512

- 9 Nalawansha DA, Paiva SL, Rafizadeh DN, Pettersson M, Qin L, Crews CM. *ACS Cent Sci*, 2019, 5: 1079–1084
- 10 Zhang M, Chen T, Lu X, Lan X, Chen Z, Lu S. *Sig Transduct Target Ther*, 2024, 9: 88
- 11 Chalhoub G, McCormick PJ. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2022, 193: 195–211
- 12 Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73: 953–990
- 13 Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3: 353–359
- 14 Villanueva MT. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21: 879
- 15 Congreve M, de Graaf C, Swain NA, Tate CG. *Cell*, 2020, 181: 81–91
- 16 Liang Q, He J, Zhao X, Xue Y, Zuo H, Xu R, Jin Y, Wang J, Li Q, Zhao X. *J Med Chem*, 2021, 64: 4196–4205
- 17 Ahn S, Kahsai AW, Pani B, Wang QT, Zhao S, Wall AL, Strachan RT, Staus DP, Wingler LM, Sun LD, Sinnaeve J, Choi M, Cho T, Xu TT, Hansen GM, Burnett MB, Lamerdin JE, Bassoni DL, Gavino BJ, Husemoen G, Olsen EK, Franch T, Costanzi S, Chen X, Lefkowitz RJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 1708–1713
- 18 Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 993–996
- 19 Lohse MJ, Bock A, Zaccolo M. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2024, 64: 387–415
- 20 Tang X, Bian J, Li Z. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2022, 323: C84–C94
- 21 Goldtzvik Y, Sen N, Lam SD, Orengo C. *Curr Opin Struct Biol*, 2023, 81: 102640
- 22 Lemos Duarte M, Devi LA. *Trends Neurosci*, 2020, 43: 417–432
- 23 Fang P, Xie JJ, Sang S, Zhang L, Liu M, Yang L, Xu Y, Yan G, Yao J, Gao X, Qian W, Wang Z, Zhang Y, Yang P, Shen H. *Anal Chem*, 2020, 92: 867–874
- 24 Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P, Wyatt R, Cayabyab M, Gerard NP, Gerard C, Sodroski J, Choe H. *Cell*, 1999, 96: 667–676
- 25 Chen S, Zhu B, Yin C, Liu W, Han C, Chen B, Liu T, Li X, Chen X, Li C, Hu L, Zhou J, Xu ZX, Gao X, Wu X, Goding CR, Cui R. *Nature*, 2017, 549: 399–403
- 26 Xiao X, Tang JJ, Peng C, Wang Y, Fu L, Qiu ZP, Xiong Y, Yang LF, Cui HW, He XL, Yin L, Qi W, Wong CCL, Zhao Y, Li BL, Qiu WW, Song BL. *Mol Cell*, 2017, 66: 154–162.e10
- 27 Wheatley M, Hawtin SR. *Hum Reprod Update*, 1999, 5: 356–364
- 28 Lanctot PM, Leclerc PC, Clément M, Auger-Messier M, Escher E, Leduc R, Guillemette G. *Biochem J*, 2005, 390: 367–376
- 29 Wheatley M, Wootten D, Conner MT, Simms J, Kendrick R, Logan RT, Poyner DR, Barwell J. *Br J Pharmacol*, 2012, 165: 1688–1703
- 30 Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KTBG, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Paul Bennett E, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Levery SB, Clausen H. *EMBO J*, 2013, 32: 1478–1488
- 31 Goth CK, Petäjä-Repo UE, Rosenkilde MM. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2020, 3: 237–245
- 32 Karpa KD, Lidow MS, Pickering MT, Levenson R, Bergson C. *Mol Pharmacol*, 1999, 56: 1071–1078
- 33 Lanctôt PM, Leclerc PC, Escher E, Leduc R, Guillemette G. *Biochemistry*, 1999, 38: 8621–8627
- 34 Compton SJ, Sandhu S, Wijesuriya SJ, Hollenberg MD. *Biochem J*, 2002, 368: 495–505
- 35 Michineau S, Muller L, Pizard A, Alhenc-Gélas F, Rajerison RM. *Biol Chem*, 2004, 385: 49–57
- 36 Marada S, Navarro G, Truong A, Stewart DP, Arensdorf AM, Nachtergaele S, Angelats E, Opferman JT, Rohatgi R, McCormick PJ, Ogden SK, Robbins DJ. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1005473
- 37 Wang T, Nakagawa S, Miyake T, Setsu G, Kunisue S, Goto K, Hirasawa A, Okamura H, Yamaguchi Y, Doi M. *Sci Rep*, 2020, 10: 4429
- 38 Deslauriers B, Ponce C, Lombard C, Larguier R, Bonnafous JC, Marie J. *Biochem J*, 1999, 339: 397–405
- 39 Nakagawa T, Takahashi C, Matsuzaki H, Takeyama S, Sato S, Sato A, Kuroda Y, Higashi H. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 485: 427–431
- 40 Janezic EM, Lauer SML, Williams RG, Chungyoun M, Lee KS, Navaluna E, Lau HT, Ong SE, Hague C. *Sci Rep*, 2020, 10: 7209
- 41 Lee SM, Jeong Y, Simms J, Warner ML, Poyner DR, Chung KY, Pioszak AA. *J Mol Biol*, 2020, 432: 1996–2014
- 42 Kaushal S, Ridge KD, Gobind Khorana H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 4024–4028
- 43 Russo D, Chazenbalk GD, Nagayama Y, Wadsworth HL, Rapoport B. *Mol Endocrinol*, 1991, 5: 29–33
- 44 Soto AG, Trejo JA. *J Biol Chem*, 2010, 285: 18781–18793
- 45 Soto AG, Smith TH, Chen B, Bhattacharya S, Cordova IC, Kenakin T, Vaidehi N, Trejo JA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E3600–E3608
- 46 Rondard P, Huang S, Monnier C, Tu H, Blanchard B, Oueslati N, Malhaire F, Li Y, Trinquet E, Labesse G, Pin JP, Liu J. *EMBO J*, 2008, 27:

- 1321–1332
- 47 Whalen EJ, Rajagopal S, Lefkowitz RJ. *Trends Mol Med*, 2011, 17: 126–139
- 48 Kenakin T. *Br J Pharmacol*, 2013, 168: 554–575
- 49 Gurevich VV, Gurevich EV. *Pharmacol Ther*, 2006, 110: 465–502
- 50 Yang F, Yu X, Liu C, Qu CX, Gong Z, Liu HD, Li FH, Wang HM, He DF, Yi F, Song C, Tian CL, Xiao KH, Wang JY, Sun JP. *Nat Commun*, 2015, 6: 8202
- 51 Yang F, Xiao P, Qu C, Liu Q, Wang L, Liu Z, He Q, Liu C, Xu J, Li R, Li M, Li Q, Guo X, Yang Z, He D, Yi F, Ruan K, Shen Y, Yu X, Sun J, Wang J. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 876–886
- 52 Huang SM, Yang F, Cai BY, He QT, Liu Q, Qu CX, Han MJ, Kong W, Jia YL, Li F, Yu X, Sun JP, Wang J. *Anal Chem*, 2019, 91: 14936–14942
- 53 He QT, Xiao P, Huang SM, Jia YL, Zhu ZL, Lin JY, Yang F, Tao XN, Zhao RJ, Gao FY, Niu XG, Xiao KH, Wang J, Jin C, Sun JP, Yu X. *Nat Commun*, 2021, 12: 2396
- 54 Huang W, Masureel M, Qu Q, Janetzko J, Inoue A, Kato HE, Robertson MJ, Nguyen KC, Glenn JS, Skiniotis G, Kobilka BK. *Nature*, 2020, 579: 303–308
- 55 Staus DP, Hu H, Robertson MJ, Kleinhenz ALW, Wingler LM, Capel WD, Latorraca NR, Lefkowitz RJ, Skiniotis G. *Nature*, 2020, 579: 297–302
- 56 Lee Y, Warne T, Nehmé R, Pandey S, Dwivedi-Agnihotri H, Chaturvedi M, Edwards PC, Garcia-Nafria J, Leslie AGW, Shukla AK, Tate CG. *Nature*, 2020, 583: 862–866
- 57 Bous J, Fouillen A, Orceel H, Trapani S, Cong X, Fontanel S, Saint-Paul J, Lai-Kee-Him J, Urbach S, Sibille N, Sounier R, Granier S, Mouillac B, Bron P. *Sci Adv*, 2022, 8: eabo7761
- 58 Cao C, Barros-Álvarez X, Zhang S, Kim K, Dämgen MA, Panova O, Suomivuori CM, Fay JF, Zhong X, Krumm BE, Gumpfer RH, Seven AB, Robertson MJ, Krogan NJ, Hüttenhain R, Nichols DE, Dror RO, Skiniotis G, Roth BL. *Neuron*, 2022, 110: 3154–3167.e7
- 59 Zhou XE, He Y, de Waal PW, Gao X, Kang Y, Van Eps N, Yin Y, Pal K, Goswami D, White TA, Barty A, Latorraca NR, Chapman HN, Hubbell WL, Dror RO, Stevens RC, Cherezov V, Gurevich VV, Griffin PR, Ernst OP, Melcher K, Xu HE. *Cell*, 2017, 170: 457–469.e13
- 60 Liao YY, Zhang H, Shen Q, Cai C, Ding Y, Shen DD, Guo J, Qin J, Dong Y, Zhang Y, Li XM. *Cell*, 2023, 186: 5784–5797.e17
- 61 Guillien M, Mouhand A, Sagar A, Fournet A, Allemand F, Pereira GAN, Thureau A, Bernadó P, Banères JL, Sibille N. *Structure*, 2023, 31: 1394–1406.e7
- 62 Han Y, Jiang J. *Methods Mol Biol*, 2022, 2374: 139–147
- 63 Petäjä-Repo UE, Hogue M, Laperrière A, Walker P, Bouvier M. *J Biol Chem*, 2000, 275: 13727–13736
- 64 Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. *Cell*, 2001, 106: 145–155
- 65 Milojević T, Reiterer V, Stefan E, Korkhov VM, Dorostkar MM, Ducza E, Ogris E, Boehm S, Freissmuth M, Nanoff C. *Mol Pharmacol*, 2006, 69: 1083–1094
- 66 Grimsey NJ, Aguilar B, Smith TH, Le P, Soohoo AL, Puthenveedu MA, Nizet V, Trejo JA. *J Cell Biol*, 2015, 210: 1117–1131
- 67 Zheng N, Shabek N. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 129–157
- 68 Berthouze M, Venkataramanan V, Li Y, Shenoy SK. *EMBO J*, 2009, 28: 1684–1696
- 69 Mines MA, Goodwin JS, Limbird LE, Cui FF, Fan GH. *J Biol Chem*, 2009, 284: 5742–5752
- 70 Does MR, Trejo JA. *Mol Pharmacol*, 2012, 82: 563–570
- 71 Petäjä-Repo UE, Hogue M, Laperrière A, Bhalla S, Walker P, Bouvier M. *J Biol Chem*, 2001, 276: 4416–4423
- 72 Cook LB, Zhu CC, Hinkle PM. *Mol Endocrinol*, 2003, 17: 1777–1791
- 73 Huang Y, Niwa J, Sobue G, Breitwieser GE. *J Biol Chem*, 2006, 281: 11610–11617
- 74 Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ. *Science*, 2001, 294: 1307–1313
- 75 Shenoy SK, Xiao K, Venkataramanan V, Snyder PM, Freedman NJ, Weissman AM. *J Biol Chem*, 2008, 283: 22166–22176
- 76 Lee S, Park S, Lee H, Han S, Song J, Han D, Suh YH. *eLife*, 2019, 8: e44502
- 77 Leclair HM, Dubois SM, Azzi S, Dwyer J, Bidère N, Gavard J. *BMC Cell Biol*, 2014, 15: 38
- 78 Grimsey NJ, Narala R, Rada CC, Mehta S, Stephens BS, Kufareva I, Lapek J, Gonzalez DJ, Handel TM, Zhang J, Trejo JA. *Cell Rep*, 2018, 24: 3312–3323.e5
- 79 Grimsey NJ, Lin Y, Narala R, Rada CC, Mejia-Pena H, Trejo JA. *J Biol Chem*, 2019, 294: 5867–5878

- 80 Cheng N, Pimentel JM, Trejo JA. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2024, 326: C1605–C1610
- 81 O'Brien PJ, Zatz M. *J Biol Chem*, 1984, 259: 5054–5057
- 82 Korycka J, Lach A, Heger E, Boguslawska DM, Wolny M, Toporkiewicz M, Augoff K, Korzeniewski J, Sikorski AF. *Eur J Cell Biol*, 2012, 91: 107–117
- 83 Naglekar A, Chattopadhyay A, Sengupta D. *J Phys Chem B*, 2023, 127: 11000–11010
- 84 Adams MN, Christensen ME, He Y, Waterhouse NJ, Hooper JD, Kanellopoulos J. *PLoS ONE*, 2011, 6: e28018
- 85 Barnett-Norris J, Lynch D, Reggio PH. *Life Sci*, 2005, 77: 1625–1639
- 86 Villar VA, Cuevas S, Zheng X, Jose PA. *Methods Cell Biol*, 2016, 132: 3–23
- 87 Oddi S, Dainese E, Sandiford S, Fezza F, Lanuti M, Chiurchiù V, Totaro A, Catanzaro G, Barcaroli D, De Laurenzi V, Centonze D, Mukhopadhyay S, Selent J, Howlett AC, Maccarrone M. *Br J Pharmacol*, 2012, 165: 2635–2651
- 88 Oddi S, Totaro A, Scipioni L, Dufresine B, Stepniewski TM, Selent J, Maccarrone M, Dainese E. *Biotech App Biochem*, 2018, 65: 16–20
- 89 O'Dowd BF, Hnatiowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Bouvier M. *J Biol Chem*, 1989, 264: 7564–7569
- 90 Hukovic N, Panetta R, Kumar U, Rocheville M, Patel YC. *J Biol Chem*, 1998, 273: 21416–21422
- 91 Doi T, Sugimoto H, Arimoto I, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y. *Biochemistry*, 1999, 38: 3090–3099
- 92 Geiss-Friedlander R, Melchior F. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 947–956
- 93 Luo J, Ashikaga E, Rubin PP, Heimann MJ, Hildick KL, Bishop P, Girach F, Josa-Prado F, Tang LTH, Carmichael RE, Henley JM, Wilkinson KA. *Neuromol Med*, 2013, 15: 692–706
- 94 Choi JH, Park JY, Park SP, Lee H, Han S, Park KH, Suh YH. *Neuropharmacology*, 2016, 102: 229–235
- 95 Zhang J, Liu Y, Jiang K, Jia J. *Sci Rep*, 2017, 7: 42749
- 96 Xu J, Tan P, Li H, Cui Y, Qiu Y, Wang H, Zhang X, Li J, Zhu L, Zhou W, Chen H. *FASEB J*, 2019, 33: 3237–3251
- 97 Li Q, Muma NA. *Psychoneuroendocrinology*, 2013, 38: 2542–2553
- 98 Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 193–197
- 99 Nozik-Grayck E, Whalen EJ, Stamler JS, McMahon TJ, Chitano P, Piantadosi CA. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290: L136–L143
- 100 Leclerc PC, Lancot PM, Auger-Messier M, Escher E, Leduc R, Guillemette G. *Br J Pharmacol*, 2006, 148: 306–313
- 101 Niu H, Li M-Y, Gao Y, Li J-G, Jiang J, Ying Y-L, Long Y-T. *Nat Chem Biol*, 2024, <https://doi.org/10.1038/s41589-024-01734-x>
- 102 Liu J, Louie S, Hsu W, Yu KM, Nicholas Jr. HB, Rosenquist GL. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 38: 738–743
- 103 Zhu JZ, Millard CJ, Ludeman JP, Simpson LS, Clayton DJ, Payne RJ, Widlanski TS, Stone MJ. *Biochemistry*, 2011, 50: 1524–1534
- 104 Ludeman JP, Stone MJ. *Br J Pharmacol*, 2014, 171: 1167–1179
- 105 Prihandoko R, Bradley SJ, Tobin AB, Butcher AJ. *CP Pharmacol*, 2015, 69: 2.13.1–2.13.26
- 106 Wang JR, Huang WL, Tsai MJ, Hsu KT, Huang HL, Ho SY, Hancock J. *Bioinformatics*, 2017, 33: 661–668
- 107 Kitata RB, Choong WK, Tsai CF, Lin PY, Chen BS, Chang YC, Nesvizhskii AI, Sung TY, Chen YJ. *Nat Commun*, 2021, 12: 2539
- 108 Hansen FM, Tanzer MC, Brüning F, Bludau I, Stafford C, Schulman BA, Robles MS, Karayel O, Mann M. *Nat Commun*, 2021, 12: 254
- 109 Park D, Park S, Song J, Kang M, Lee S, Horak M, Suh YH. *FASEB Journal*, 2020, 34: 14977–14996
- 110 Nagi K, Shenoy SK. *Methods Mol Biol*, 2019, 1957: 93–104.
- 111 Forrester MT, Foster MW, Benhar M, Stamler JS. *Free Radical Biol Med*, 2009, 46: 119–126
- 112 Ebersole B, Petko J, Levenson R. *Anal Biochem*, 2014, 451: 25–27
- 113 Mao C, Zhao RJ, Dong YJ, Gao M, Chen LN, Zhang C, Xiao P, Guo J, Qin J, Shen DD, Ji SY, Zang SK, Zhang H, Wang WW, Shen Q, Sun JP, Zhang Y. *Mol Cell*, 2024, 84: 570–583.e7
- 114 Mao C, Gao M, Zang SK, Zhu Y, Shen DD, Chen LN, Yang L, Wang Z, Zhang H, Wang WW, Shen Q, Lu Y, Ma X, Zhang Y. *Nat Commun*, 2023, 14: 7620
- 115 Maharana J, Sano FK, Sarma P, Yadav MK, Duan L, Stepniewski TM, Chaturvedi M, Ranjan A, Singh V, Saha S, Mahajan G, Chami M, Shihoya W, Selent J, Chung KY, Banerjee R, Nureki O, Shukla AK. *Science*, 2024, 383: 101–108
- 116 Ping YQ, Mao C, Xiao P, Zhao RJ, Jiang Y, Yang Z, An WT, Shen DD, Yang F, Zhang H, Qu C, Shen Q, Tian C, Li Z, Li S, Wang GY, Tao X, Wen X, Zhong YN, Yang J, Yi F, Yu X, Xu HE, Zhang Y, Sun JP. *Nature*, 2021, 589: 620–626
- 117 Ding Y, Zhang H, Liao YY, Chen LN, Ji SY, Qin J, Mao C, Shen DD, Lin L, Wang H, Zhang Y, Li XM. *Cell Discov*, 2022, 8: 55
- 118 Lefkowitz R J, Roth J, Pastan I. *Science*, 1970, 170: 633–635

- 119 Wang L, Wu C, Peng W, Zhou Z, Zeng J, Li X, Yang Y, Yu S, Zou Y, Huang M, Liu C, Chen Y, Li Y, Ti P, Liu W, Gao Y, Zheng W, Zhong H, Gao S, Lu Z, Ren PG, Ng HL, He J, Chen S, Xu M, Li Y, Chu J. *Nat Commun*, 2022, 13: 5363
- 120 Chen MM, Yin ZQ, Zhang LY, Liao H. *Chin J Nat Meds*, 2015, 13: 667–672
- 121 Hunter MR, Glass M. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2015, 71: 42–45
- 122 Myers MC, Bilder DM, Cavallaro CL, Chao HJ, Su S, Burford NT, Nayeem A, Wang T, Yan M, Langish RA, Dabros M, Li YX, Rose AV, Behnia K, Onorato JM, Gargalovic PS, Wexler RR, Lawrence RM. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30: 126955
- 123 Ayukawa K, Suzuki C, Ogasawara H, Kinoshita T, Furuno M, Suzuki G. *SLAS Discov*, 2020, 25: 287–298
- 124 Minta A, Kao JPY, Tsien RY. *J Biol Chem*, 1989, 264: 8171–8178
- 125 Johnson PL, Smith W, Baynham TC, Knisley SB. *Ann Biomed Eng*, 1999, 27: 563–571
- 126 Emkey R, Rankl NB. *Methods Mol Biol*, 2009, 565: 145–158
- 127 Zhang Y, Kowal D, Kramer A, Dunlop J. *SLAS Discov*, 2003, 8: 571–577
- 128 Hansen KB, Brauner-Osborne H. *Methods Mol Biol*, 2009, 552: 269–278
- 129 Cheng Z, Garvin D, Paguio A, Stecha P, Wood K, Fan F. *Curr Chem Genom*, 2010, 4: 84–91
- 130 Latif R, Morshed SA, Ma R, Tokat B, Mezei M, Davies TF. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 372
- 131 Lohse MJ, Nuber S, Hoffmann C. *Pharmacol Rev*, 2012, 64: 299–336
- 132 Spillmann M, Thurner L, Romantini N, Zimmermann M, Meger B, Behe M, Waldhoer M, Schertler G, Berger P. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 4949
- 133 Schihada H, Vandenabeele S, Zabel U, Frank M, Lohse MJ, Maiellaro I. *Commun Biol*, 2018, 1: 105
- 134 Bedini A. *Methods Mol Biol*, 2015, 1230: 115–128
- 135 Ramsay D, Kellett E, McVEY M, Rees S, Milligan G. *Biochem J*, 2002, 365: 429–440
- 136 Hunter MR, Finlay DB, Macdonald CE, Cawston EE, Grimsey NL, Glass M. *Methods Enzymol*, 2017, 593: 43–59
- 137 Xu Y, Piston DW, Hirschie Johnson C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 151–156
- 138 Asher WB, Terry DS, Gregorio GGA, Kahsai AW, Borgia A, Xie B, Modak A, Zhu Y, Jang W, Govindaraju A, Huang LY, Inoue A, Lambert NA, Gurevich VV, Shi L, Lefkowitz RJ, Blanchard SC, Javitch JA. *Cell*, 2022, 185: 1661–1675.e16
- 139 Zhao X, Jones A, Olson KR, Peng K, Wehrman T, Park A, Mallari R, Nebalasca D, Young SW, Xiao SH. *SLAS Discov*, 2008, 13: 737–747
- 140 Barnea G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, Axel R, Lee KJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 64–69
- 141 Li F, Jiang X, Luo LL, Xu YM, Huang XX, Huang C, Zhang Y. *Cell Commun Signal*, 2019, 17: 49
- 142 Qin S, Meng M, Yang D, Bai W, Lu Y, Peng Y, Song G, Wu Y, Zhou Q, Zhao S, Huang X, McCorvy JD, Cai X, Dai A, Roth BL, Hanson MA, Liu ZJ, Wang MW, Stevens RC, Shui W. *Chem Sci*, 2018, 9: 3192–3199
- 143 Whitehurst CE, Nazef N, Annis DA, Hou Y, Murphy DM, Spacciapoli P, Yao Z, Ziebell MR, Cheng CC, Shipps, Jr. GW, Felsch JS, Lau D, Nash HM. *SLAS Discov*, 2006, 11: 194–207
- 144 Whitehurst CE, Yao Z, Murphy D, Zhang M, Taremi S, Wojcik L, M. Strizki J, D. Bracken J, C. Cheng C, Yang X, W. Shipps G, Ziebell M, Nickbarg E. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2012, 15: 473–485
- 145 Manglik A, Lin H, Aryal DK, McCorvy JD, Dengler D, Corder G, Levit A, Kling RC, Bernat V, Hübner H, Huang XP, Sassano MF, Giguère PM, Löber S, Da Duan S, Scherrer G, Kobilka BK, Gmeiner P, Roth BL, Shoichet BK. *Nature*, 2016, 537: 185–190
- 146 Wang Y, Zhuang Y, DiBerto JF, Zhou XE, Schmitz GP, Yuan Q, Jain MK, Liu W, Melcher K, Jiang Y, Roth BL, Xu HE. *Cell*, 2023, 186: 413–427.e17
- 147 Wang WW, Ji SY, Zhang W, Zhang J, Cai C, Hu R, Zang SK, Miao L, Xu H, Chen LN, Yang Z, Guo J, Qin J, Shen DD, Liang P, Zhang Y, Zhang Y. *Cell*, 2024, 187: 1460–1475.e20
- 148 Peterson AA, Liu DR. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, 22: 699–722
- 149 Satz AL, Brunschweiler A, Flanagan ME, Gloger A, Hansen NJV, Kuai L, Kunig VBK, Lu X, Madsen D, Marcaurelle LA, Mulrooney C, O'Donovan G, Sakata S, Scheuermann J. *Nat Rev Methods Primers*, 2022, 2: 3
- 150 Brown DG, Brown GA, Centrella P, Certel K, Cooke RM, Cuozzo JW, Dekker N, Dumelin CE, Ferguson A, Fiez-Vandal C, Geschwindner S, Guie MA, Habeshian S, Keefe AD, Schlenker O, Sigel EA, Snijder A, Soutter HT, Sundström L, Troast DM, Wiggin G, Zhang J, Zhang Y, Clark MA. *SLAS Discov*, 2018, 23: 429–436
- 151 Ahn S, Pani B, Kahsai AW, Olsen EK, Husemoen G, Vestergaard M, Jin L, Zhao S, Wingler LM, Rambarat PK, Simhal RK, Xu TT, Sun LD, Shim PJ, Staus DP, Huang LY, Franch T, Chen X, Lefkowitz RJ. *Mol Pharmacol*, 2018, 94: 850–861

- 152 O'Brien ES, Rangari VA, El Daibani A, Eans SO, Hammond HR, White E, Wang H, Shiimura Y, Krishna Kumar K, Jiang Q, Appourchaux K, Huang W, Zhang C, Kennedy BJ, Mathiesen JM, Che T, McLaughlin JP, Majumdar S, Kobilka BK. *Nature*, 2024, 631: 686–693
- 153 Huang Y, Meng L, Nie Q, Zhou Y, Chen L, Yang S, Fung YME, Li X, Huang C, Cao Y, Li Y, Li X. *Nat Chem*, 2021, 13: 77–88
- 154 Zhang J, Liu J, Li X, Ju Y, Li Y, Zhang G, Li Y. *J Am Chem Soc*, 2024, 146: 2122–2131
- 155 Zhang J, Liu J, Zhang G, He X, Xiong F, Fan X, Li Y, Li Y. *Org Lett*, 2024, 26: 1094–1099
- 156 He P, Zhao G, Zhu M, Li Y, Zhang G, Li Y. *Org Chem Front*, 2024, 11: 2851–2856
- 157 Zhang B, Li S, Shui W. *Front Chem*, 2022, 10: 843502

Dynamic chemical modifications and chemical interventions of G protein-coupled receptor

Ping Xu^{1,2}, Jun-Chi Hu³, Yu-Ting Gao⁴, Xin Wen⁵, Yu-Ting Cao⁶, Zu-Feng Guo³, Wen Yi⁶, Fan Yang^{5*}, Yi-Zhou Li^{4*}, Yong-Jun Dang^{3*}, Yan Zhang^{2*}

¹ Institute of Cytology and Genetics, School of Basic Medical Sciences, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China

² School of Basic Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China

³ Basic Medicine Research and Innovation Center for Novel Target and Therapeutic Intervention, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

⁴ Innovative Drug Research Center, School of Pharmaceutical Sciences, Chongqing University, Chongqing 401331, China

⁵ School of Basic Medical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China

⁶ College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

*Corresponding authors (email: yangfan1357@163.com; yizhouli@cqu.edu.cn; yjdang@cqmu.edu.cn; zhang_yan@zju.edu.cn)

Abstract: G protein-coupled receptor (GPCR) plays a key role in cell signal transduction, and its function is finely regulated by a variety of chemical modifications. This article reviews the main types of chemical modifications of GPCR, including phosphorylation, glycosylation, ubiquitination, and palmitoylation, and discusses how these modifications affect receptor activity, stability, membrane localization, and signal transduction. In particular, phosphorylation of GPCR via G protein-coupled receptor kinases (GRKs) regulates the binding of β -Arrestin, thereby regulating the strength and duration of signal transduction. Glycosylation modification affects the membrane surface expression and signal bias of the receptor, while ubiquitination and palmitoylation modifications involve the regulation of receptor degradation, endocytosis and membrane localization. This paper also discusses the potential applications of these chemical modifications of GPCR in drug development, especially the recent research progress in the fields of cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases and metabolic disorders, providing new strategies and perspectives for future drug design. Finally, this paper summarizes the prospects and challenges of GPCR modification research in biology and clinical applications.

Keywords: G protein-coupled receptor, chemical modification, phosphorylation, glycosylation, chemical intervention

doi: [10.1360/SSC-2024-0276](https://doi.org/10.1360/SSC-2024-0276)