

人趋化因子受体CCR3与 β -arrestin
相互作用研究*

刘恒垣 宋彦卓 李计强 丁彦之 葛保胜**

(中国石油大学(华东)生物工程与技术中心, 重质油国家重点实验室, 青岛 266580)

摘要 G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)主要负责介导细胞内外跨膜信号转导功能,是重要的药物靶点。 β -arrestin作为GPCRs行使功能的重要途径之一,其对调节GPCRs信号转导过程有重要意义。但目前对于 β -arrestin如何与GPCRs相互作用并调控其信号转导功能尚不十分清楚。本文以趋化因子受体3(CC chemokine receptor 3, CCR3)为研究对象,构建了 β -arrestin与CCR3的共表达体系,利用激光共聚焦荧光成像与荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术研究了 β -arrestin与CCR3在活细胞水平的相互作用,利用RNAi和趋化实验考察了 β -arrestin对CCR3稳转细胞趋化行为的调控作用,并在体外利用石英晶体微天平(quartz crystal microbalance, QCM)技术测定了 β -arrestin突变体(R169E)与CCR3之间结合常数。结果显示,趋化因子CCL11(chemokine C-C motif ligand 11)刺激CCR3表达细胞,会使 β -arrestin与CCR3在胞内的距离发生变化, β -arrestin蛋白被募集到细胞膜处,证明 β -arrestin参与了CCR3介导的信号转导过程,二者存在显著相互作用。通过转染 β -arrestin-siRNA将 β -arrestin沉默后,CCL11、CCL24诱导CCR3稳转细胞迁移数明显降低,而CCL5对CCR3稳转细胞的迁移效率未受到显著影响,表明不同趋化因子对CCR3与 β -arrestin相互作用具有不同的调控效果,体外结合实验进一步证实 β -arrestin与CCR3相互作用, β -arrestin突变体与CCR3的体外结合常数(K_D)为 1.35×10^{-7} 。综上所述, β -arrestin可以与CCR3发生相互作用,在CCR3介导的细胞跨膜信号转导及细胞趋化过程中发挥着重要作用。

关键词 β -arrestin, CCR3, 趋化作用, GPCRs**中图分类号** Q5**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0049

G蛋白偶联受体属于人体内最大的膜蛋白超家族,可以与光、化学分子、多肽、激素等结合,介导细胞内外的跨膜信号传递,是一类重要的药物靶点分子。G蛋白和 β -arrestin是GPCRs行使功能的两种重要的信号途径。近年来研究发现, β -arrestin作为多功能支架蛋白,参与调节GPCRs的多种信号转导过程^[1],如细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)活化、原活化蛋白激酶(mapkinase, MAP)激活以及细胞凋亡等^[2]。据报道, β -arrestin还在GPCRs的偏好性激活过程中发挥关键作用。例如:CCL19和CCL21作为CCR7的内源性配体,均可诱导G蛋白信号传导,但只有CCL19能够诱导 β -arrestin募集,促使CCR7内化^[3-7];CCL27和CCL28均可以作用于CCR10,进而通过抑制cAMP的形成,进行高效的G蛋白信号传导,但是只有CCL27能够募集

β -arrestin并诱导受体内化^[8];对于CCR4的两种内源性配体CCL17和CCL22也显著不同,其中CCL22能够诱导CCR4与 β -arrestin相互作用,是调节受体内化、触发钙流、趋化作用的主要配体,而CCL17并未参与这些信号转导过程^[9]。目前对于 β -arrestin介导的GPCRs信号转导机制仍然不是十分清楚,对于趋化因子受体的偏好性信号通路的研究也并不丰富。

趋化因子受体CCR3属于A族GPCRs的一种,可被Eotaxin/CCL11、Eotaxin-2/CCL24、Eotaxin-3/CCL26以及RANTES/CCL5、MCP-2/CCL8、MCP-3/CCL7、MCP-4/CCL13等多种趋化因子选择性激

* 国家自然科学基金(21373271, 21673294)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0532-86981135, E-mail: gebaosheng@upc.edu.cn

收稿日期: 2020-07-07, 接受日期: 2020-08-04

活^[10-11]. 当CCR3激活后可有选择性地促进嗜酸粒细胞募集炎症部位, 并释放脂质、产生细胞毒性蛋白、氧代谢产物及细胞因子等物质. CCR3参与哮喘、关节炎以及特异性皮肤炎等过敏性炎症的发生发展过程, 是HIV-1病毒感染细胞的辅助受体^[12]及老年性黄斑病变的有效药物靶点^[13]. 但CCR3与 β -arrestin相互作用尚不明确, 目前也尚未有关于CCR3偏好性配体的研究报道, 因而有必要对CCR3与 β -arrestin相互作用过程系统研究. 因此, 本文选择CCR3作为对象, 研究 β -arrestin与CCR3相互作用及其偏好性激活过程中的调控. 这对于进一步阐明CCR3与 β -arrestin的相互作用及其介导的偏向性信号转导机制, 为相关药物设计和疾病治疗提供重要实验依据.

1 材料与方法

1.1 材料

HEK293细胞系、T-REx-293-CCR3稳转细胞系、pcDNA4.0-CCR3-EYFP质粒、CCR3蛋白均由本实验室保存; Anti-HA-Tag抗体(C29F4)购自

Proteintech公司; Alex-488偶联的山羊抗兔二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司; *Bgl* II, *Sal* I, *Hind* III, *Eco*R I等限制性内切酶购自NEB公司; 聚乙烯亚胺PEI购自Polyscience公司; 趋化因子CCL11、CCL24和CCL5购自美国Protech公司; Transwell趋化小室购自Conring公司; A1激光共聚焦显微镜购自尼康公司; 倒置荧光显微镜, 型号为DMI3000 B, 购自Leica公司; 耗散型石英晶体微天平(QCM-D), 型号为QSX-340.

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建及 β -arrestin siRNA的合成

利用表1中的引物, 通过PCR扩增及双酶切方式, 分别构建pDisplay-HA-CCR3、pmCherry-N1- β -arrestin和pECFP-N1- β -arrestin重组质粒. 经测序验证后, 转化后平板过夜培养, 挑取单克隆, 扩大培养. 根据文献报道, 合成 β -arrestin-siRNA序列. β -arrestin-siRNA双链干扰正义链序列: AAGGACCGCAAAGUGUUUGUG; 反义链序列: CACA-AACACUUUGCGGUCCUU. NC(无意义干扰序列)正义链序列: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT; 反义链序列: ACGUGACACGUUCGGAGAATT.

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence
pdisplay-HA-CCR3-Fwd	5'-ggaAGATCTATGACTACTTCTCTCGATACCGTGG-3'
pdisplay-HA-CCR3-Rev	5'-aaaGTCGACTCATTAGAAGACGATGCTCAGCTC-3'
β -arrestin-ECFP(mCherry)-Fwd	5'-tcAAGCTTccATGGGCGACAAAGGCACCCG-3'
β -arrestin-ECFP(mCherry)-Rev	5'-caGAATTCCTTAACGATTGTTTCAGTTGCG-3'

1.2.2 β -arrestin蛋白与CCR3的免疫荧光成像

利用lipo2000(Invitrogen, USA)将测序成功的 β -arrestin-pmCherry-N1和pDisplay-HA-CCR3共转染于24孔板培养的HEK293细胞中, 每孔约转染0.8 μ g重组质粒(质量比为1:1). 转染24 h后更换无血清培养基. 血清饥饿4 h后加入200 nmol/L趋化因子CCL11, 于37°C细胞培养箱继续培养1 h. 弃去培养基后, 用4%多聚甲醛固定并用0.1% Triton-X-100室温处理15 min, 通透细胞膜, 再用含有1% BSA的PBS溶液封闭1 h. 经PBS漂洗后, 加HA-tag抗体(用含1% BSA的PBS溶液按照1:100稀释), 室温孵育1 h. 经PBS漂洗细胞后用Alex-488山羊抗兔二抗(用PBS按照1:1000稀释)室温孵育45 min; PBS漂洗后, 再用DAPI(5 mg/L)37°C孵育20 min, PBS漂洗后用50%甘

油封片, 置于激光共聚焦荧光显微镜下观察成像.

1.2.3 荧光共振能量转移检测(FRET)

用PEI(1 g/L)将pECFP-N1- β -arrestin以及pcDNA4.0-CCR3-EYFP按质量转染比为1:1、1:3、1:5和1:7共转染至HEK293细胞中, 每孔细胞转染4 μ g重组质粒, 转染共表达48 h后, 加入200 nmol/L CCL11与细胞共孵育30 min, 用PBS清洗后收集细胞悬液, 经420 nm激发, 检测细胞悬液荧光光谱的变化, FRET效率用 I_{525}/I_{470} 表示, 其中每组均扣除对照组(单独转染EYFP及ECFP)在525 nm处产生的荧光强度.

1.2.4 β -arrestin定位分析

将生长状态良好的CCR3稳转细胞接种于多聚赖氨酸包被的24孔板中, 接种细胞密度为 10^4 个/孔, 然后置于37°C、5% CO₂的细胞培养箱中

过夜培养. 每孔转染 pECFP-N1- β -arrestin 质粒 1 μ g, 转染 4 h 后将培养基更换为含有 1 mg/L 四环素诱导剂的完全培养基, 继续培养 48 h. 血清饥饿 2 h 后, 加入终浓度为 200 nmol/L 的 CCL11 分别孵育 0 min、5 min、30 min, 经多聚甲醛固定后在激光共聚焦显微镜下成像观察.

1.2.5 β -arrestin siRNA 干扰效率及其对 CCR3 蛋白表达的影响

利用上述设计的 siRNA 干扰引物, 对 CCR3 稳转细胞中 β -arrestin 进行基因沉默. 设置实验组、对照组, 其中实验组转染 β -arrestin-siRNA, 对照组转染 NC-RNA, 转染 48 h 后进行免疫荧光染色及 Western-blot 检测 β -arrestin-siRNA 抑制效率. 将生长状态良好的 CCR3 稳转细胞均匀接种至 24 孔板 (八孔池) 中, 待细胞的汇合度达到 80% 时, 每孔转染 20 pmol β -arrestin-siRNA 及 NC-RNA 表达 48 h, 在此期间加入 0.2 mg/L 四环素分别诱导 CCR3 稳转细胞表达 2 h、4 h、8 h、12 h 及 24 h. 将不同表达时间的 CCR3 稳转细胞进行 dot-blot 分析 (裂解), 并进行 TIRFM 单分子成像, 考察 β -arrestin 干扰效率及其对 CCR3 蛋白表达的影响.

1.2.6 β -arrestin 沉默对 CCR3 受体趋化作用的影响

在 24 孔板中接种生长状态良好的 CCR3 稳转细胞, 接种密度约为 10^4 个/孔, 24 h 后按 25 pmol/孔的比例分别转染 siRNA- β -arrestin 及 NC-RNA, 培养 48 h 后加入终浓度为 0.2 mg/L 的四环素, 37°C 继续培养 4 h. 收集 siRNA- β -arrestin 及 NC-RNA 转染后的细胞, 并重悬于 0.5% 血清 DMEM 培养基中, 调整终浓度为 10^6 个/ml, 分别各取 100 μ l 细胞悬浊液于 Transwell chambers 的上层小室, 对应下层小室分别添加 500 μ l 含有终浓度为 50 nmol/L 的 CCL11、CCL24、CCL5 及含 0.5% 血清的 DMEM 培养基中. 于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中继续孵育 5 h. 多聚甲醛室温固定 15 min, 上室膜晾干后加入终浓度为 0.1% 的结晶紫溶液, 室温染色 20 min, 纯净水漂洗 3 次, 用棉签小心将上室顶层细胞擦掉, 在显微镜下进行细胞计数分析, 每组实验设 3 次平行试验.

1.2.7 β -arrestin 与 CCR3 的体外结合试验

将本实验室构建成功的 pET32- β -arrestin (R169E) 质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3) pLys 感受态细胞中进行表达, 利用 Ni²⁺ 亲和色谱进行纯化, 获得纯度为 90% 以上的重组 β -arrestin (R169E) 蛋白. 重组 CCR3-10 $\times$ his 蛋白根据本实验

室前期发表的方法制备^[14]. 将 NTA 芯片处理后, 用含 0.05% (v/v) FC-14 的 Hepes buffer 平衡芯片, 至基线平稳后, 将 1 μ mol/L 的 CCR3 溶液以 50 μ l/min 流速流经芯片, 直至完全饱和. 用 Hepes Buffer 冲洗芯片, 将未结合的 CCR3 蛋白除去, 直至基线平稳后用 0.125 g/L BSA 进行封闭, 再用 Hepes Buffer 恒速冲洗芯片至当基线完全平稳后, 将基线归零; 加入 1 μ mol/L β -arrestin (R169E) 以 50 μ l/min 的流速流过芯片 20 min, 继续用 Hepes Buffer 恒速冲洗芯片, 直至基线平稳, 收集实验数据.

2 结 果

2.1 β -arrestin 与 CCR3 共表达免疫荧光成像

为了检测 β -arrestin 蛋白与 CCR3 的相互作用, 采用激光共聚焦显微镜结合免疫共定位检测趋化因子 CCL11 作用时 β -arrestin 与 CCR3 在细胞内的分布变化. 如图 1 所示, 绿色代表免疫荧光染色后的 HA-CCR3, 红色代表 β -arrestin-mCherry, 蓝色为 DAPI 染色的细胞核. 从图中可以看出: CCL11 作用前, CCR3 主要分布于细胞膜及细胞质中; 加入 CCL11 刺激细胞后, CCR3 蛋白可能由于内化作用主要聚集于胞质内.

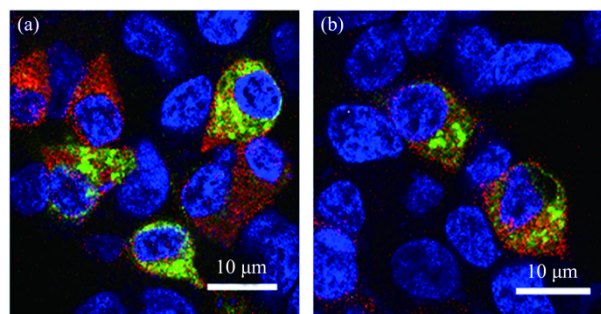


Fig. 1 Confocal imaging of cotransfection of CCR3 with β -arrestin before and after CCL11 stimulation

(a) Imaging of CCR3 and β -arrestin-mCherry without stimulation of CCL11. (b) Imaging of CCR3 and β -arrestin-mCherry stimulated with CCL11 for 30 min.

2.2 β -arrestin 转位实验

研究表明, β -arrestin 在介导受体内吞的过程中, 会从细胞质转移至细胞膜, 随后再与 GPCRs 形成复合物内化进入核内体中. 因此可以通过实时观测 β -arrestin-ECFP 在细胞中荧光位置的变化来反

映受体在趋化因子刺激后的内吞过程以及趋化因子调控下 β -arrestin蛋白与受体的相互作用过程. 结果如图2所示, 未加入CCL11刺激时, β -arrestin蛋白都分布在细胞质中, CCL11作用15 min后, β -arrestin分布没有太大变化, CCL11作用30 min

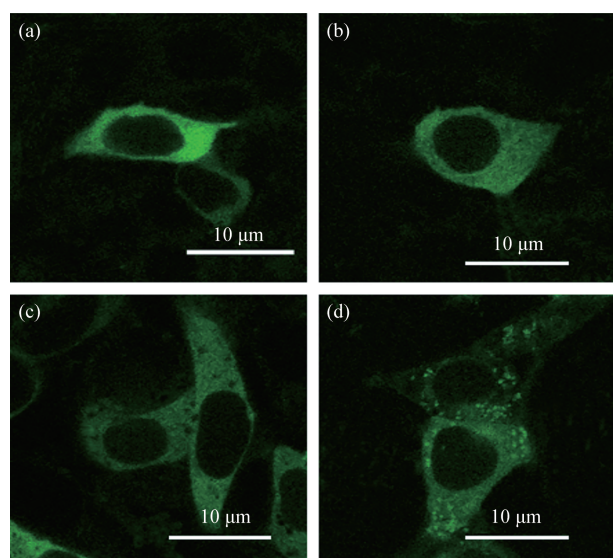


Fig. 2 Translocation of β -arrestin in CCR3 transfected HEK293 cells upon CCL11 stimulation

Confocal imaging of β -arrestin location in CCR3 transfected cells for CCL11 stimulation of 0 min (a), 5 min (b), 15 min (c), 30 min (d).

后, 发现 β -arrestin蛋白分布变得不均一并有部分募集到细胞膜处.

2.3 荧光共振能量转移技术检测 β -arrestin与CCR3相互作用

如图3所示, 当没有CCL11作用时, 不同转染比例条件下, β -arrestin-ECFP与CCR3-EYFP均存在荧光能量转移现象, 能量转移效率随着 β -arrestin-ECFP与CCR3-EYFP之间转染比例的增加而逐渐增加. 如图4所示, 加入CCL11分别作用0 min至30 min后, 不同转染比例组的FRET效率均有所降低, 说明加入CCL11后, β -arrestin-ECFP与CCR3-EYFP在胞内的距离发生变化. 该结果表明CCL11可以显著调节CCR3及 β -arrestin之间的相互作用.

2.4 siRNA干扰对CCR3蛋白表达量的影响

根据文献报道, HEK293细胞天然表达低浓度的 β -arrestin蛋白, 为研究 β -arrestin对CCR3受体趋化作用的影响, 需要去除T-REx-293细胞内源表达的 β -arrestin蛋白. 本实验采用转染 β -arrestin-siRNA的方法将内源表达的 β -arrestin敲低, 并检测siRNA- β -arrestin的干扰效率. 将siRNA- β -arrestin及NC-RNA干扰序列分别转染T-REx-293稳转细胞,

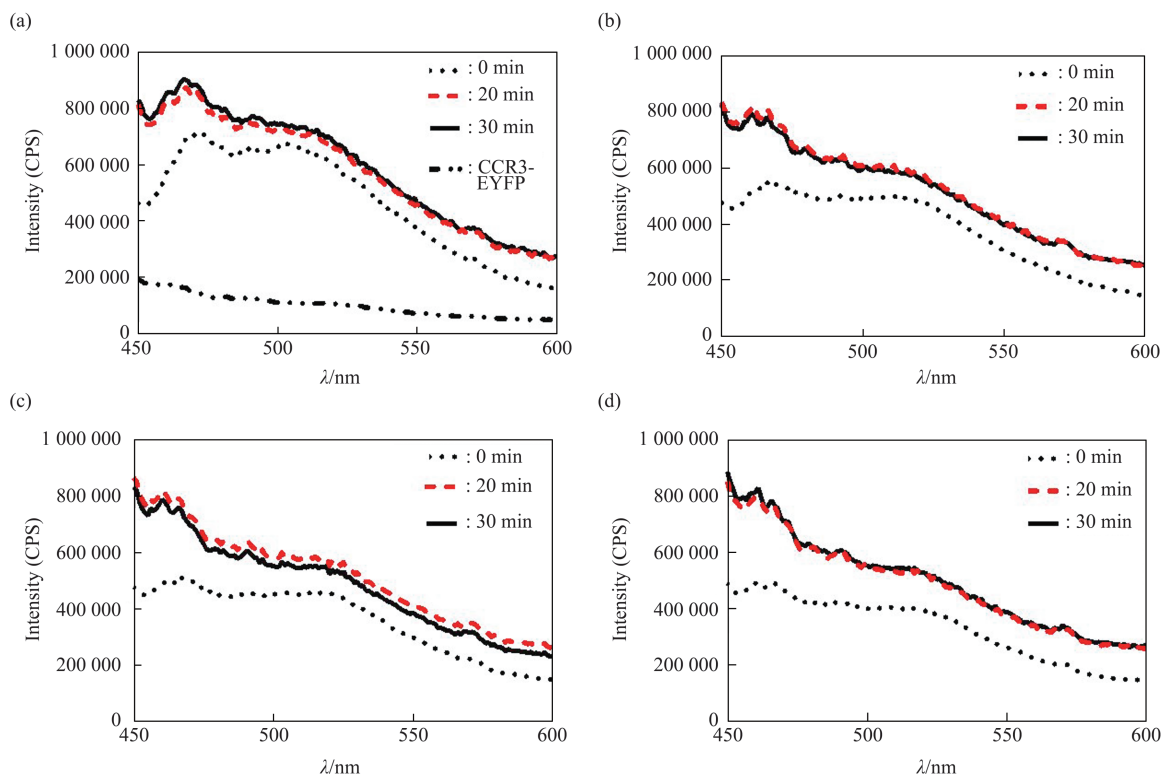


Fig. 3 The effect of CCL11 stimulation on FRET of β -arrestin-ECFP and CCR3-EYFP at different transfection ratio

The transfection ratio of pECFP-N1- β -arrestin and pcDNA4.0-CCR3-EYFP is 1 : 1 (a), 1 : 3 (b), 1 : 5 (c), 1 : 7 (d) respectively.

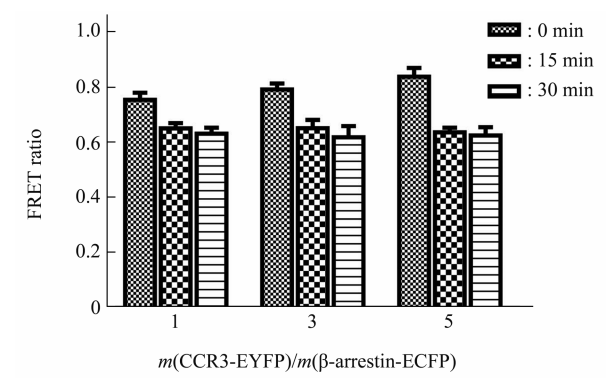


Fig. 4 The changes of FRET efficiency between CCR3-EYFP and β-arrestin-ECFP at different transfection ratio

表达 48 h 后进行免疫荧光染色及 Western-blot 检测, 发现与对照组相比大部分 β-arrestin 蛋白的表达被抑制.

同时, 检测了 β-arrestin-siRNA 转染 48 h 对 CCR3 表达量的影响. 结果如图 5 所示: β-arrestin-siRNA 及 NC-RNA 干扰组的 CCR3 蛋白表达水平随诱导时间的延长逐渐增加. 通过 ImageJ 软件对各组间灰度值进行 *t*-test 检测, 两组间各诱导时间对应的灰度值并无显著性差异 ($P>0.05$), 表明 β-arrestin-siRNA 干扰后对稳转细胞中 CCR3 的表达量并无显著影响.

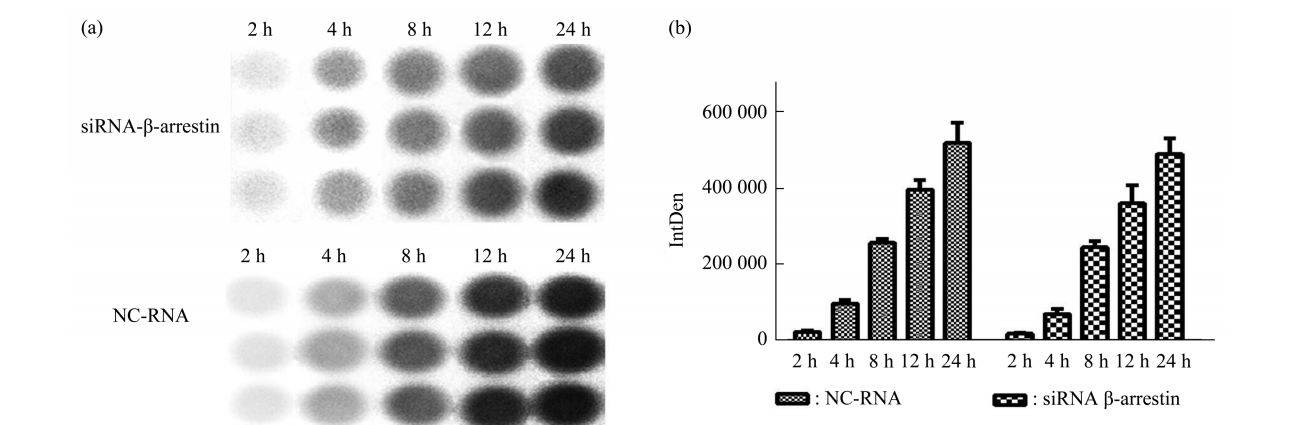


Fig. 5 The impact of RNAi targeting β-arrestin on CCR3 expression level
(a) Dot-blot assay. (b) Grayscale analysis of dot-blot.

2.5 CCR3稳转细胞趋化实验

证实 β-arrestin-siRNA 的有效干扰效率及对 CCR3 的表达没有影响后, 进行 CCR3 稳转细胞趋化实验. 图 6 为倒置荧光显微镜 20 倍物镜观察的

CCR3 稳转细胞趋化结果, 图 7 为趋化结果统计图. 如图 6, 7 所示, 与转染 NC-RNA 组相比, β-arrestin-siRNA 转染组在 CCL11 诱导细胞迁移数

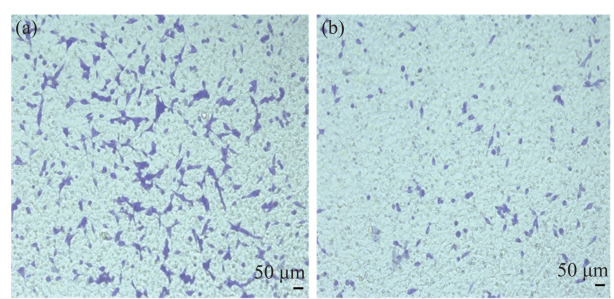


Fig. 6 Chemotaxis of CCR3 stably transfected HEK293 cells triggered by CCL11 for 5 h
(a) Cells transfected with NC-RNA. (b) Cells transfected with β-arrestin siRNA.

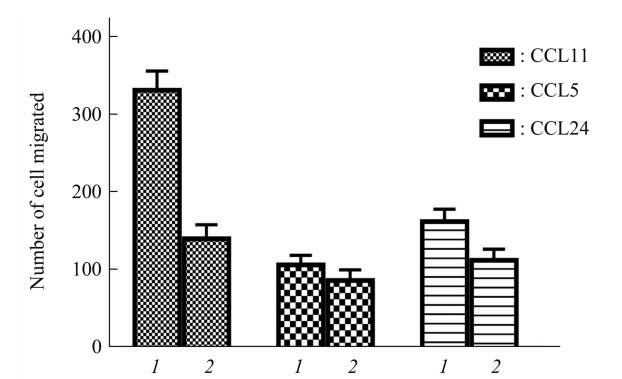


Fig. 7 Chemotaxis of CCR3 stably transfected HEK293 cells triggered by different ligands for 5 h
1: NC-RNA; 2: siRNA β-arrestin.

方面明显降低, 约 58% ($P<0.01$), 这表明将 β -arrestin 沉默后 CCL11 诱导的细胞趋化作用受到显著抑制, 同时也证明 β -arrestin 参与了 CCL11 诱导 CCR3 稳转细胞的趋化过程, 是 CCL11 诱导 CCR3 稳转细胞发生趋化作用所必需的. 同样转染 β -arrestin-siRNA 沉默 β -arrestin 后, 趋化因子 CCL24 诱导 CCR3 稳转细胞的趋化作用也明显降低, 约 29% ($P<0.05$). 而在 50 nmol/L 的 CCL5 作用下, β -arrestin 沉默前后细胞迁移数只有轻微的降低, 与 NC-RNA 转染组的细胞迁移数相比并无明显差异 ($P>0.05$). 这表明, 不同趋化因子对于 β -arrestin 与 CCR3 相互作用的影响不同, 也进一步证明 β -arrestin 可能参与了 CCR3 介导的偏好性激活过程.

2.6 β -arrestin 与 CCR3 体外相互作用表征

据报道, β -arrestin 结构中的 R169E 定点突变后, β -arrestin 能够转变成“预先激活”的状态. 与野生型 β -arrestin 不同, β -arrestin (R169E) 并不需要结合配体激活且磷酸化的受体, 而能够直接结合未磷酸化的受体. 因此, 本研究采用 β -arrestin

(R169E) 来研究 β -arrestin 与 CCR3 的体外相互作用. 该体外结合实验采用耗散型石英晶体微天平 (QCM-D) 进行分析. 结合芯片采用 Q-Sense His-tag Capturing Sensor (Qsx 340), 该芯片表面由 PEG 包被并螯合有 Cu^{2+} , 能够特异地结合 N 端或 C 端带有 His-tag 的目的蛋白. 实验结果如图 8 所示, 扣除空白组中 BSA 与 β -arrestin (R169E) 的非特异性结合作用后, CCR3 与 β -arrestin (R169E) 的结合过程可以分别根据解离段和结合段的方程进行分段拟合, 拟合方程如下:

$$\text{解离段: } y = a_1 \cdot \exp(kd_1 \cdot x) + a_2 \cdot \exp(kd_2 \cdot x)$$

$$\text{结合段: } y = R_1 \cdot A_1 \cdot (1 - 1 / (\exp((ka_1 \cdot A_1 + kd_1) \cdot x))) / (kd_1 / ka_1 + A_1) + R_2 \cdot A_2 \cdot (1 - 1 / (\exp((ka_2 \cdot A_2 + kd_2) \cdot x))) / (kd_2 / ka_2 + A_2)$$

通过拟合计算, 可以得到 CCR3 与 β -arrestin (R169E) 的动力学结合常数 $ka/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ 为 5 812.63, 动力学解离常数 kd/s^{-1} 为 7.84×10^{-4} , 由此可以得出, CCR3 与 β -arrestin (R169E) 的热力学结合常数 $K_D/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$ 值为 1.35×10^{-7} .

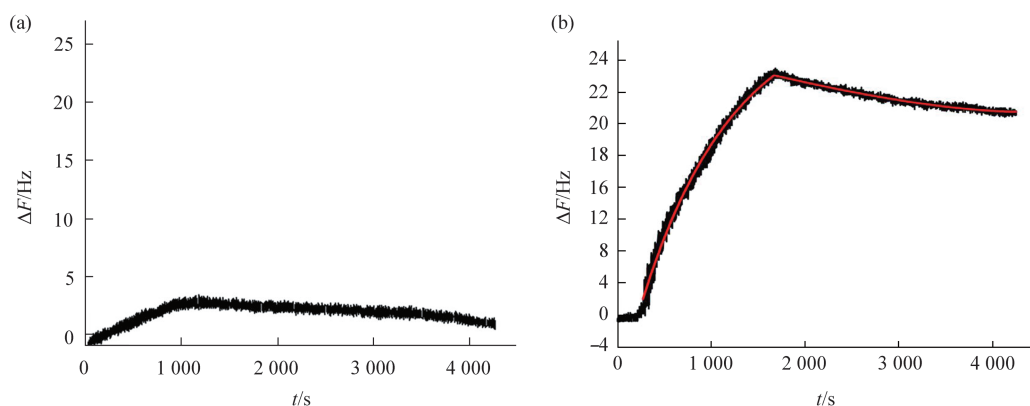


Fig. 8 QCM sensorgrams of β -arrestin (R169E) binding with BSA (a) and CCR3 (b)

3 讨论

GPCRs 是哺乳动物中最大和研究最多的膜蛋白超家族之一, 是细胞膜上最重要的信号识别及传递单元^[15-16], 约 40% ~ 50% 的药物设计均针对 GPCRs 作为作用靶点, 因此, GPCRs 具有重要的医学研究价值^[17-19]. β -arrestin 是 GPCRs 多功能调节蛋白质, 其介导的偏好性信号转导过程是 GPCRs 研究的新领域, 陆续发现 β -arrestin 与 β_2 肾上腺素受体^[20]、AT1 血管紧张素受体^[21]、血清素 5-HT2B

受体^[22]、D2 多巴胺受体^[23] 等偏向性激活密切相关, 并发现了多种具有临床应用价值的偏好性激活配体. 研究表明, 针对 β -arrestin 蛋白偏向性配体的药物设计, 将不仅能提高药物的特异性疗效, 而且会很大程度减少药物的不良反应. 目前, GPCRs/ β -arrestins 复合物作为潜在的药物治疗靶点已经在不同的动物模型中进行研究^[24-26]. CCR3 不仅是炎症反应相关趋化因子受体^[27], 同时还是 HIV 病毒入侵的辅助靶点. 因此深入研究 β -arrestin 与 CCR3 相互作用, 有助于全面理解 CCR3 介导的信号转导

过程及相关的药理学功能。

本文利用激光共聚焦荧光成像技术直观检测了趋化因子刺激下 β -arrestin在CCR3稳转细胞中的转位作用, 结果发现CCL11作用能够诱导 β -arrestin发生胞内迁移, 说明CCL11能够调节 β -arrestin与CCR3之间的相互作用。但是, 由于该稳转细胞中CCR3在细胞质和细胞膜中均有表达, 且主要表达在细胞质中, 因此根据 β -arrestin-EGFP转位实验尚无法区分 β -arrestin与细胞膜上的CCR3还是细胞质中的CCR3发生相互作用。FRET实验结果表明, 当加入CCL11刺激细胞后, CCR3与 β -arrestin两者FRET效率明显降低, 该结果与其他配体诱导的 β -arrestin与GPCRs相互作用的BRET信号升高现象是相矛盾的^[28]。这可能是由于异源表达的受体蛋白大多表达在细胞膜上, 当配体激活受体后, β -arrestin募集至细胞膜, 与受体形成复合物。而本实验中CCR3主要表达在细胞质中, 因此FRET结果中的EYFP信号主要来自于胞质中的CCR3, 因此CCL11作用后细胞内的 β -arrestin发生迁移与细胞质中CCR3之间的作用距离逐渐增大, 募集至细胞膜CCR3处, 但表现出的宏观效应仍是FRET效率降低。

根据 β -arrestin介导受体内吞途径的不同, 可以将受体分为A、B两类。A类GPCRs与 β -arrestin结合后, 二者被同时运输到胞内网格蛋白包被小窝, 内化后快速重新回到细胞膜; 相反, B类GPCRs与 β -arrestin复合物内化后, 首先在内吞囊泡中聚集, 两者的相互作用力更强, 作用时间更长, 受体重新返回细胞膜需要较长时间。 β -arrestin-ECFP转位实验与FRET实验结果表明, CCL11作用20 min, 可以显著引起胞内 β -arrestin的分布变化, 作用30 min后FRET效率基本稳定不变。CCR3属于A类GPCRs, 以上结果表明CCL11诱导的 β -arrestin与CCR3的相互作用较快, 符合A类GPCRs的作用特点。

CCR3主要表达在嗜酸性粒细胞^[29]、嗜碱性粒细胞^[30]以及Th2细胞^[31]、肥大细胞^[32]等多种细胞表面, 其在淋巴细胞表面的分布类型与炎症反应疾病相关。大量文献证明, β -arrestin能够参与调控多种趋化因子受体的趋化作用, 是炎症反应发生的重要调控因子。本文中趋化研究发现CCR3稳转细胞系的趋化作用同样与 β -arrestin密切相关。 β -arrestin基因沉默后, CCL11、CCL24诱导CCR3稳转细胞的趋化作用明显减弱, 而对CCL5诱导的

趋化作用影响不明显。这表明, 在HEK293细胞中, β -arrestin蛋白并不是所有CCR3配体诱导CCR3趋化作用所必需的, 在此并不能排除G蛋白在这一过程中的调控作用。不同的趋化因子可能通过不同的作用机制介导CCR3稳转细胞的趋化作用, 同时在天然免疫细胞中(如嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞) β -arrestin是否参与调控CCR3表达免疫细胞趋化迁移的过程以及具体的作用机制都需要进一步的深入研究。

近年来, 在GPCRs结构研究领域已经取得重大进展^[33-35]。研究表明, 突变体 β -arrestin(R169E)可以直接与未磷酸化的受体结合^[36-37]。这种非经典的GPCRs- β -arrestin相互作用有利于更深入研究 β -arrestin在GPCRs信号转导中的生物学功能。Kang等^[38]研究表明 β -arrestin与GPCRs能够以1:1的结合比例相互作用, 而Sinha等^[39]研究发现, arrestin-rhodopsin两种蛋白质能够通过多种模式相互作用, arrestin蛋白能够与单体或二聚体rodopsin结合。尽管如此, β -arrestin与GPCRs相互作用的结合比例仍然存在争议。本文中, 首次利用QCM技术检测 β -arrestin(R169E)蛋白与CCR3的体外相互作用。采用1:1结合模型对两者的相互作用进行分析, 结果表明, 纯化的 β -arrestin(R169E)蛋白具有一定的生物学活性, 能够与CCR3蛋白发生体外相互作用, 但在此并不能排除 β -arrestin(R169E)与二聚体CCR3结合的可能性, 两者结合的化学计量学问题仍然需要进一步研究。本文通过体外结合实验证明了 β -arrestin突变体能够特异结合CCR3, 表明 β -arrestin很可能参与调控CCR3的信号转导过程, 并测定了CCR3与 β -arrestin的体外结合常数, 这为将来系统研究 β -arrestin及其突变体在CCR3信号转导中的生物学功能提供了一定的实验基础。

参 考 文 献

- [1] Cahill T J, Thomsen A RB, Tarrasch J T, *et al.* Distinct conformations of GPCR-beta-arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(10): 2562-2567
- [2] Shenoy S K, Lefkowitz R J. β -arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2011, **32**(9): 521-533
- [3] Zidar DA, Violin J D, Whalen E J, *et al.* Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009,

- 106**(24): 9649-9654
- [4] Kohout T A, Nicholas S L, Perry S J, *et al.* Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**(22): 23214-23222
 - [5] Byers M A, Calloway P A, Shannon L, *et al.* Arrestin 3 mediates endocytosis of CCR7 following ligation of CCL19 but not CCL21. *Journal of Immunology*, 2008, **181**(7): 4723-4732
 - [6] Jorgensen A S, Larsen O, Uetz-Von Allmen E, *et al.* Biased signaling of CCL21 and CCL19 does not rely on N-terminal differences, but markedly on the chemokine core domains and extracellular loop 2 of CCR7. *Front Immunol*, 2019, **10**: 2156
 - [7] Comerford I, Milasta S, Morrow V, *et al.* The chemokine receptor CCX-CKR mediates effective scavenging of CCL19 *in vitro*. *European Journal of Immunology*, 2006, **36**(7): 1904-1916
 - [8] Rajagopal S, Bassoni D L, Campbell J J, *et al.* Biased agonism as a mechanism for differential signaling by chemokine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**(49): 35039-35048
 - [9] Ajram L, Begg M, Slack R, *et al.* Internalization of the chemokine receptor CCR4 can be evoked by orthosteric and allosteric receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*, 2014, **729**(100): 75-85
 - [10] Pease J E, Horuk R. Recent progress in the development of antagonists to the chemokine receptors CCR3 and CCR4. *Expert Opin Drug Discov*, 2014, **9**(5): 467-483
 - [11] Struyf S, Proost P, Vandercappellen J, *et al.* Synergistic up-regulation of MCP-2/CCL8 activity is counteracted by chemokine cleavage, limiting its inflammatory and anti-tumoral effects. *European Journal of Immunology*, 2009, **39**(3): 843-857
 - [12] Agrawal L, Maxwell C R, Peters P J, *et al.* Complexity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) co-receptor usage: roles of CCR3 and CCR5 in HIV-1 infection of monocyte-derived macrophages and brain microglia. *J Gen Virol*, 2009, **90**(3): 710-722
 - [13] Takeda A, Baffi J Z, Kleinman M E, *et al.* CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy. *Nature*, 2009, **460**(7252): 225-230
 - [14] Wang M, Ge B, Li R, *et al.* Milligram production and biological activity characterization of the human chemokine receptor CCR3. *Plos One*, 2013, **8**(6): e65500
 - [15] 杨照, 肖鹏, 于晓, 等. G蛋白偶联受体的信号通路多样性及药物开发. *中国科学: 生命科学*, 2018, **48**(11): 108-114
Yang Z, Xiao P, Yu X, *et al.* *Sci Sin Vitae*, 2018, **48**(11): 108-114
 - [16] 程建昕, 唐赟. G蛋白偶联受体的结构与功能研究进展. *生命科学*, 2015, **27**(4): 445-452
Cheng J X, Tang B. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2015, **27**(4): 445-452
 - [17] Jones K L, Maguire J J, Davenport A P. Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis. *British Journal of Pharmacology*, 2011, **162**(7): 1453-14569
 - [18] 陈香, 柳树群, 孙之荣. 应用进化踪迹及分子动力学模拟研究 β 2肾上腺素受体突变活性. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33**(9): 861-868
 - [19] 王迪, 杨曙明, 刘潇威. G蛋白偶联受体在不同表达系统中高水平表达的研究进展. *生命科学研究*, 2012, **16**(6): 79-84
Wang D, Yang S M, Liu X W. *Life Science Research*, 2012, **16**(6): 79-84
 - [20] Wisler J W, Dewire S M, Whalen E J, *et al.* A unique mechanism of beta-blocker action: carvedilol stimulates beta-arrestin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(42): 16657-16662
 - [21] Boerrigter G, Soergel D G, Violin J D, *et al.* TRV120027, a novel beta-arrestin biased ligand at the angiotensin II type I receptor, unloads the heart and maintains renal function when added to furosemide in experimental heart failure. *Circ Heart Fail*, 2012, **5**(5): 627-634
 - [22] Wacker D, Wang C, Katritch V, *et al.* Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science*, 2013, **340**(6132): 615-619
 - [23] Park S M, Chen M, Schmerberg C M, *et al.* Effects of beta-arrestin-biased dopamine D2 receptor ligands on schizophrenia-like behavior in hypoglutamatergic mice. *Neuropsychopharmacology*, 2016, **41**(3): 704-715
 - [24] Shu J, Zhang F, Zhang L, *et al.* G protein coupled receptors signaling pathways implicate in inflammatory and immune response of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res*, 2017, **66**(5): 379-387
 - [25] Lymperopoulos A, Wertz S L, Pollard C M, *et al.* Not all arrestins are created equal: therapeutic implications of the functional diversity of the beta-arrestins in the heart. *World J Cardiol*, 2019, **11**(2): 47-56
 - [26] Gurevich V V, Song X, Vishnivetskiy S A, *et al.* Enhanced phosphorylation-independent arrestins and gene therapy. *Handb Exp Pharmacol*, 2014, **219**: 133-152
 - [27] Toyoda H, Honda Y, Tanaka S, *et al.* Narcolepsy susceptibility gene CCR3 modulates sleep-wake patterns in mice. *Plos One*, 2017, **12**(11): e0187888
 - [28] Charest P G, Terrillon S, Bouvier M. Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Reports*, 2005, **6**(4): 334-340
 - [29] Gerber B O, Zanni M P, Ugucioni M, *et al.* Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Current Biology*, 1997, **7**: 836-843
 - [30] Ugucioni M, Mackay C R, Ochensberger B, *et al.* High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest*, 1997, **100**(5), 1137-1143
 - [31] Sallusto F, Mackay C R, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science*, 1997, **277**(6): 2005-2007
 - [32] Romagnani P, Paulis A D, Beltrame C, *et al.* Tryptase-chymase double-positive human mast cells express the eotaxin receptor CCR3 and are attracted by CCR3-binding chemokines. *American*

- Journal of Pathology, 1999, **155**(4): 1195-204
- [33] Sommer M E, Hofmann K P, Heck M. Distinct loops in arrestin differentially regulate ligand binding within the GPCR opsin. Nature Communications, 2012, **3**: 995
- [34] Miyeon Kim, Sergey A. Vishnivetskiy, Ned Van Eps, *et al.* Conformation of receptor-bound visual arrestin. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, **109**(45): 18407-18412
- [35] Szczepek M, Beyrière F, Hofmann K P, *et al.* Crystal structure of a common GPCR-binding interface for G protein and arrestin. Nature Communications, 2014, **5**(5): 4801
- [36] Gurevich V V, Pals-Rylaarsdam R, Benovic J L, *et al.* Agonist-receptor-arrestin, an alternative ternary complex with high agonist affinity. Journal of Biological Chemistry, 1997, **272**(46): 28849-28852
- [37] Potter R M, Key T A, Gurevich V V, *et al.* Arrestin variants display differential binding characteristics for the phosphorylated N-formyl peptide receptor carboxyl terminus. Journal of Biological Chemistry, 2002, **277**(11): 8970-8978
- [38] Kang Y, Zhou X E, Gao X, *et al.* Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. Nature, 2015, **523**(7562): 561-567
- [39] Sinha A, Jones Brunette A M, Fay J F, *et al.* Rhodopsin TM6 can interact with two separate and distinct sites on arrestin: evidence for structural plasticity and multiple docking modes in arrestin-rhodopsin binding. Biochemistry, 2014, **53**(20): 3294-3307

Study on Interaction of Human Chemokine Receptor CCR3 and β -Arrestin*

LIU Heng-Heng, SONG Yan-Zhuo, LI Ji-Qiang, DING Yan-Zhi, GE Bao-Sheng**

(State Key Laboratory of Heavy Oil Processing, Center for Bioengineering and Biotechnology,

China University of Petroleum (Huadong), Qingdao 266580, China)

Abstract G protein-coupled receptors (GPCRs) mediate different cell transmembrane signal transduction, and are important drug targets. The β -arrestin mediated pathway is one of the important ways for GPCRs to play their function, which owns important significance for regulation of the function of GPCRs. However, until now it is still not clear how β -arrestin interacts with GPCRs and mediates their trans-membraned signal transduction pathway. To address this issue, the CC chemokine receptor 3 (CCR3) was selected to study the interaction between β -arrestin and GPCRs. Firstly, a co-expression system of β -arrestin and CCR3 was constructed, and the interaction between β -arrestin and CCR3 in living cells was analyzed using laser confocal fluorescence microscopy and fluorescence resonance energy transfer techniques. And the regulation effect of β -arrestin on the chemotaxis of CCR3 stably transfected cells was also studied by RNAi and chemotaxis experiments. In addition, the interaction between β -arrestin mutant (R169E) and CCR3 was further confirmed using QCM technology *in vitro*, and their binding constant was also determined. As a result, upon the stimulation of CCL11 (chemokine C-C motif ligand 11), the intracellular distance between β -arrestin and CCR3 was significantly changed, and β -arrestin protein was recruited to the cell membrane, which suggests that β -arrestin could interact with CCR3 and involve in the CCR3-mediated signal transduction process. After silencing β -arrestin by transfection with β -arrestin-siRNA, the migration of CCR3 stably transfected cells induced by CCL11 and CCL24 was significantly decreased, while the migration rate induced by CCL5 was not obviously changed. These results indicated that different chemokines shows different regulatory effects on the interaction between CCR3 and β -arrestin. *In vitro* binding experiments further confirmed the interaction between β -arrestin and CCR3, and the binding constant K_D between β -arrestin mutant and CCR3 was determined as 1.35×10^{-7} . In conclusion, β -arrestin can interact with CCR3 in living cells, and plays an important role in CCR3-mediated cell transmembrane signal transduction.

Key words β -arrestin, CCR3, chemotaxis, GPCRs

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0049

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (21373271, 21673294).

** Corresponding author.

Tel: 86-532-86981135, E-mail: gebaosheng@upc.edu.cn

Received: July 7, 2020 Accepted: August 4, 2020