

分类号: Q78

密 级:

单位代码: 10422

学 号: 201620248



山东大学  
SHANDONG UNIVERSITY

# 博士学位论文

Dissertation for Doctoral Degree

论文题目: 蜕皮激素通过 G 蛋白偶联受体调控昆虫变态  
发育和易化扩散进入细胞的研究

*Ecdysone regulates insect metamorphosis and facilitates  
diffusion into cells via G protein-coupled receptors*

作 者 姓 名

康新乐

培 养 单 位

山东大学

专 业 名 称

生物化学与分子生物学

指 导 教 师

赵小凡 教授

合 作 导 师

2020年 6 月 3 日

分类号: Q78  
密级:

单位代码: 10422  
学号: 201620248



山东大学  
SHANDONG UNIVERSITY

# 博士学位论文

Dissertation for Doctoral Degree

论文题目: 蜕皮激素通过G蛋白偶联受体调控  
昆虫变态发育和易化扩散进入细胞的研究

*Ecdysone regulates insect metamorphosis and facilitates  
diffusion into cells via G protein-coupled receptors*

作者姓名 康新乐  
培养单位 山东大学  
专业名称 生物化学与分子生物学  
指导教师 赵小凡教授  
合作导师 \_\_\_\_\_

2020年6月3日

## 原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名：康新乐 日期：2020.6.6

## 关于学位论文使用授权的声明

本人同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的印刷件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权山东大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

(保密论文在解密后应遵守此规定)

论文作者签名：康新乐 导师签名：张凡 日期：2020.6.6

## 目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	IV
符号说明.....	VII
第一章 前言.....	1
1 激素调控昆虫变态发育.....	1
2 20E 作用的分子机制.....	3
2.1 蜕皮激素及其对蜕皮变态的调控.....	3
2.2 20E 基因组信号途径.....	4
2.3 20E 非基因组信号途径.....	8
2.4 20E 的运输方式.....	14
3 存在的科学问题, 研究方案和意义.....	16
第二章 蜕皮激素竞争结合多巴胺/蜕皮激素受体抑制鳞翅目昆虫取食并促进化蛹的研究.....	17
1 引言.....	17
2 实验材料与方法.....	18
2.1 实验材料.....	18
2.2 实验方法.....	20
3 实验结果.....	30
3.1 在 20E 调节下, DopEcR 在大脑中高表达.....	30
3.2 20E 抑制幼虫取食, DA 参与幼虫取食.....	31
3.3 干扰 DopEcR 可以减少幼虫进食并延迟化蛹.....	31
3.4 20E 拮抗多巴胺功能.....	36
3.5 DopEcR 参与 20E 信号途径.....	36
3.5 DopEcR 与 Gαq 和 Gas 相互作用以调节蛋白质的磷酸化.....	40
3.6 DopEcR 结合 20E 的结构模拟.....	42
3.6 DopEcR 结合 20E.....	43
4 讨论.....	48
4.1 20E 与 DopEcR 结合导致幼虫停止进食并传导化蛹信号.....	48
4.2 GPCR 结合 20E.....	49
4.3 20E 上调 DopEcR 表达.....	50
4.4 多个 GPCR 传输 20E 信号.....	51
5 结论.....	52
第三章 蜕皮激素诱导 G 蛋白偶联受体 3 形成同源四聚体传递信号并通过该受体易化扩散进入细胞.....	53
1 引言.....	53
2 实验材料与方法.....	54
2.1 实验材料.....	54
2.2 实验方法.....	55
3 实验结果.....	58

3.1 GPCR-3 参与 20E 信号途径.....	58
3.2 GPCR-3 变态过程中表达上调.....	60
3.3 GPCR-3 干扰抑制 20E 诱导的化蛹、组织重塑和基因表达.....	62
3.4 GPCR-3 参与了 20E 诱导的快速细胞反应和蛋白质磷酸化.....	64
3.5 20E 诱导 GPCR-3 的磷酸化和内化.....	66
3.6 GPCR-3 结合 20E.....	70
3.7 GPCR-3 以同源二聚体存在，并通过 20E 诱导为同源四聚体.....	71
3.7 GPCR-3 促进 20E 进入细胞.....	74
4 讨论.....	78
4.1 20E 通过 GPCR-3 传输信号和终止信号.....	78
4.2 多个 GPCR 结合 20E 的细胞膜受体.....	79
4.3 20E 促进 GPCR-3 形成同源四聚体易化 20E 进入细胞.....	79
5 结论.....	80
第四章 论文创新点总结及意义.....	82
4.1 论文创新点总结及意义.....	82
4.2 后期工作展望.....	82
参考文献.....	84
致谢.....	100
在读期间发表论文.....	101

# 蜕皮激素通过 G 蛋白偶联受体调控昆虫变态发育和易化扩散进入细胞的研究

## 摘要

### 研究背景、存在的科学问题及研究意义

昆虫的生长发育由多种激素共同调控,包括 20-羟基蜕皮酮(20E)、保幼激素(JH)和胰岛素,20E 与 JH 和胰岛素相互作用调控昆虫生长发育和蜕皮变态。昆虫变态期间体内发生着剧烈的变化,如幼虫中肠的凋亡、成虫中肠的形成、脂肪体的解体和重构、成虫盘的生长和脑结构的重塑等,20E 在其中起着非常重要的作用。通常,蜕皮激素通过结合蜕皮激素的核受体(EcR)来发挥作用,起始 20E 早晚期基因的表达,启动变态程序,即 20E 基因组信号途径。

近年来,越来越多的研究证明在经典的 20E 基因组信号途径之外,存在 20E 非基因组途径,即 20E 通过激活细胞膜上的受体引发胞内钙离子和 cAMP 水平的快速变化,进而引起一系列蛋白质的翻译后修饰,调控基因转录和变态发育。G 蛋白偶联受体(GPCR)是一类七次跨膜的蛋白家族,在传递各种信号中起到重要的作用,是各种药物的作用靶标。研究发现 GPCR 作为固醇类激素的受体,在 20E 调控昆虫的变态发育中发挥作用。果蝇多巴胺蜕皮激素受体 DmDopEcR 可以结合 20E 类似物,被认为是 20E 的膜受体,但 DopEcR 在 20E 信号途径中的功能并不清楚,并且棉铃虫中还报道了另外两个传递 20E 信号的 GPCR,但没有检测到它们结合 20E。前期研究还发现 20E 进入细胞的量是受到控制的,但机制和生物学效应并不清楚。这些研究打破了 20E 是通过自由扩散进入细胞与核受体结合启动相关基因转录的经典理论,其尚待阐明的科学问题对于确立类固醇激素的细胞膜受体及其信号途径的新理论具有重要的支撑意义。本论文用重大农业害虫棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)为模型,研究 DopEcR 在 20E 信号途径中的功能并证明 GPCR 可以结合 20E,GPCR 控制 20E 进入细胞的机制和生物学效应,丰富和完善 20E 非基因组信号途径及调控昆虫变态发育的分子机制。

### 研究结果

完全变态昆虫在末龄幼虫的最后阶段停止取食,然后发生变态。但是,幼虫停止取食的机制尚不清楚。使用农业害虫棉铃虫作为模型,揭示了 20E 与多巴胺受体

(DopEcR) (一种 G 蛋白偶联受体) 结合, 以停止幼虫取食并促进化蛹。DopEcR 在各种组织中均有表达, 并在 20E 调节下的蜕皮变态过程中表达水平升高。幼虫取食阶段的 20E 滴度较低, 而游走阶段的 20E 滴度较高。相比之下, 多巴胺 (DA) 滴度在幼虫取食阶段较高, 而在游走阶段较低。使用多巴胺受体抑制剂 flupentixol 阻断多巴胺受体或 20E 注射均可以减少幼虫的食物消耗和体重。敲降 *DopEcR* 可以抑制幼虫的取食、生长和化蛹。20E 通过 DopEcR 促进细胞凋亡, DA 通过 DopEcR 诱导细胞增殖。20E 通过抑制 DA 诱导的细胞增殖和 AKT 的磷酸化来对抗 DA 功能。20E 通过 DopEcR 诱导基因表达, 并使细胞内钙离子和 cAMP 水平快速增加。20E 诱导 DopEcR 与 Gas 和 Gαq 相互作用。20E 通过 DopEcR 诱导 20E 信号途径关键蛋白磷酸化和 EcRB1-USP1 转录复合物与蜕皮激素响应元件 EcRE 的结合。DopEcR 可以在细胞膜或从细胞膜分离后结合 20E。DopEcR 结合 20E 位点的突变降低了 20E 结合水平和相关的细胞快速反应。研究结果表明 20E 通过与 DA 竞争结合 DopEcR, 抑制幼虫进食并促进化蛹。

在棉铃虫中阐明了一种 GPCR (命名为 GPCR-3) 通过触发 G 蛋白介导的信号级联并形成四聚体促进 20E 进入细胞传递类固醇激素 20E 信号。通过虫体 RNA 干扰从棉铃虫转录组数据库中筛选出 GPCR-3 参与 20E 信号途径。虫体干扰 *GPCR-3* 导致延迟化蛹或形成嵌合蛹, 抑制幼虫中肠和脂肪体的降解, 并抑制 20E 诱导的基因表达。20E 诱导 GPCR-3 与 Gαq 和 Gas 相互作用, 并使细胞内钙离子、cAMP 和蛋白磷酸化迅速增加。GPCR-3 定位于细胞质膜中, 20E 诱导下被 GPCR 激酶 2 (GRK2) 磷酸化后内化降解脱敏 20E 信号, β-arrestin-1 和网格蛋白介导 GPCR-3 的内化。GPCR-3 可在细胞膜中和分离后在体外结合 20E。20E 与 GPCR-3 的结合诱导 GPCR-3 的同源二聚体形成同源四聚体, GPCR-3 的同源四聚体促进 20E 进入细胞并传递 20E 信号。GPCR-3 同源四聚体作为 20E 细胞膜受体并促进 20E 扩散进入细胞, 控制不同组织中 20E 的滴度, 进而调节变态发育中不同组织的发育命运—调亡或增殖生长。

## 结论及科学意义

1. 本论文研究了 DopEcR 在昆虫取食和化蛹中的双重功能, DA 通过 DopEcR 促进幼虫的进食和生长, 20E 与 DA 竞争结合 DopEcR, 并通过 DopEcR 作为细胞膜受体之一来传递 20E 信号, 从而促进昆虫变态, 揭示了类固醇激素与多巴胺系统的互作, 阐明了 20E 抑制鳞翅目昆虫取食并促进变态发育的分子机制, 为类固醇激素信

号途径及其与神经系统互动提供了新的理论，为害虫控制提供了新的生长调节剂的研制靶点。

2. 证明了 ErGPCR-2 可以结合 20E，支持了前面的研究结论—ErGPCR-2 是 20E 的细胞膜受体。

3. 证明了 GPCR-3 是 20E 的细胞膜受体，20E 结合并诱导 GPCR-3 形成同源四聚体传导 20E 信号，并作为转运蛋白易化 20E 扩散进入细胞。首次发现 GPCR 可以通过形成同源四聚体促进 20E 的细胞导入。

**关键词：**棉铃虫；20E；多巴胺受体；G 蛋白偶联受体；易化扩散；多聚体；进食；变态

# **Ecdysone regulates insect metamorphosis and facilitates diffusion into cells via G protein-coupled receptors**

## **ABSTRACT**

### **Background, scientific questions, and significance**

Insect growth and development are jointly regulated by a variety of hormones, including 20-hydroxyecdysone (20E), juvenile hormone (JH) and insulin. 20E interacts with JH and insulin to regulate insect growth, molting, and metamorphosis. During the metamorphosis of insects, violent changes occur in the body, such as the apoptosis of the larval midgut, the formation of the imaginal midgut, the disintegration and reconstruction of the fat body, the growth of the adult discs, and the remodeling of the brain structure. In general, ecdysone acts by binding to the ecdysone nuclear receptor (EcR) to initiate the expression of early and late 20E genes and initiate the metamorphosis process, which is the 20E genome signaling pathway.

In recent years, the 20E non-genomic pathway has been proved in addition to the classic 20E genomic signaling pathway. 20E triggers rapid changes in intracellular calcium and cAMP levels by activating cell membrane receptors, which causes post-translational modification of a series of proteins, regulating gene transcription and metamorphosis. G protein-coupled receptors (GPCRs) are a family of seven transmembrane proteins that play an important role in transmitting various signals and are the targets of various drugs. Studies have found that GPCRs, as receptors for steroids, play a role in the regulation of insect metamorphosis by 20E. The dopamine ecdysone receptor (DmDopEcR) in *Drosophila* can bind to the 20E analog, which is considered to be the membrane receptor of 20E, but the function of DopEcR in 20E signaling pathway is unclear. Two other GPCRs transmitting 20E signal were reported in *Helicoverpa armigera*, but they were not detected to bind 20E. Previous studies also found that the amount of 20E entering the cell was controlled, but the mechanism and biological effects were not clear. These studies have broken the classic theory that 20E initiates the transcription of related genes by free diffusion into cells and binding to nuclear receptors. The scientific issues yet to be clarified are of great significance for establishing new theories of steroid cell membrane receptors and their signaling pathways. In this paper, the major agricultural pest *H. armigera* is used as a model to study

the function of DopEcR in the 20E signaling pathway and prove that GPCR can bind 20E. To study the mechanism and biological effects of GPCR controlling the entry of 20E into cells. These studies can enrich and improve the non-genomic signaling pathways of 20E and the molecular mechanisms regulating insect metamorphosis.

## Results

Holometabolous insects stop feeding at the final larval instar stage, and then metamorphosis occurs. However, the mechanism by which the larvae stop feeding is unclear. Using the agricultural pest *H. armigera* as a model, we revealed that 20E binds to dopamine receptor (DopEcR), a G protein-coupled receptor, to stop larval feeding and promote pupation. DopEcR was expressed in various tissues, and its level increased during metamorphosis under 20E regulation. The 20E titer was low during larval feeding stages and high during wandering stages. In contrast, dopamine (DA) titers were higher during the larval feeding stage and lower during the wandering stages. Injection of 20E or blocking dopamine receptors using the inhibitor flupentixol decreased larval food consumption and body weight. Knockdown of *DopEcR* repressed larval feeding, growth, and pupation. 20E, via DopEcR, promoted apoptosis; and DA, via DopEcR, induced cell proliferation. 20E opposed DA function by repressing DA-induced cell proliferation and AKT phosphorylation. 20E, via DopEcR, induced gene expression and a rapid increase in intracellular calcium ions and cAMP. 20E induced the interaction of DopEcR with G proteins  $\alpha$ s and  $\alpha$ q. 20E, via DopEcR, induced protein phosphorylation and binding of the EcRB1-USP1 transcription complex to the ecdysone response element. DopEcR could bind 20E in the cell membrane or after being isolated from the cell membrane. Mutation of DopEcR decreased 20E binding levels and related cellular responses. The results suggested that 20E competes with DA to bind DopEcR, arresting larval feeding and promotes pupation.

We revealed that a GPCR, named GPCR-3, transmits the steroid hormone 20-hydroxyecdysone (20E) signal by triggering a G protein-mediated signal cascade and forming a tetramer to promote 20E into the cell in *H. armigera*. GPCR-3 was screened as being involved in the 20E pathway by RNA interference. Knockdown of *GPCR-3* via RNA interference caused delayed and abnormal pupation, inhibited remodeling of the larval midgut and fat body, and repressed 20E-induced gene expression. 20E induced GPCR-3 interacting with G proteins  $\alpha$ q and  $\alpha$ s and a rapid increase in intracellular calcium, cAMP, and protein phosphorylation. GPCR-3 was located in the plasma membrane and was internalized after being phosphorylated by GPCR kinase 2 and was degraded under 20E induction to desensitize 20E signaling.  $\beta$ -arrestin-1 and clathrin mediated the

internalization of GPCR-3. GPCR-3 can bind 20E in the cell membrane and in vitro after being isolated. The binding of 20E to GPCR-3 induced the homo-dimer of GPCR-3 to form a homo-tetramer. The homo-tetramer of GPCR-3 facilitated 20E entry and transmitted 20E signaling. The homo-tetrameric GPCR-3 acts as a cell membrane receptor and transporter of 20E, controls the amount of 20E in different tissues, and regulates the developmental fate of different tissues during metamorphosis-apoptosis or proliferation.

#### **Conclusions and scientific significances**

1. This paper studies the dual function of DopEcR in insect feeding and pupation. DA promotes the feeding and growth of larvae through DopEcR. 20E competes with DA to bind DopEcR, transmits 20E signal through DopEcR, and promotes the metamorphosis of insects, revealing the interaction of steroid hormones and the dopamine system. It elucidated the mechanism of 20E inhibiting lepidopteran insects feeding and promoting metamorphosis, providing a new theory of steroid hormone signaling pathway and its interaction with the nervous system. It provides a new target of the growth regulators for pest control.

2. It is proved that ErGPCR-2 can bind 20E, which supports the previous research conclusion-ErGPCR-2 is a cell membrane receptor of 20E.

3. It is proved that GPCR-3 is a cell membrane receptor of 20E. 20E binding induced homo-tetramerization of GPCR-3. GPCR-3 homo-tetramer transmits 20E signaling, and functions as a transporter to facilitate diffusion of 20E. This is the first example of GPCR functions as 20E transporter by forming homo-tetramer.

**Keywords:** *Helicoverpa armigera*; 20-hydroxyecdysone; dopamine receptor; G protein-coupled receptor; facilitated diffusion; homo-tetramer; feeding; metamorphosis.

## 符号说明

缩略语	英文全称	中文全称
20E	20-hydroxyecdysone	20-羟基蜕皮酮
20E-EIA	20E Enzyme Immunoassay	20E 酶联免疫检测
AC	adenylyl cyclase	腺苷酸环化酶
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
BLAST	Basic local alignment search tool	序列比对工具
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indoly-phosphate	5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐
bp	base pair	碱基对
CaMKII	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II	钙离子/钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	环腺苷酸
CDK10	cyclin-dependent kinase 10	周期蛋白依赖的激酶 10
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
Ch-IP	Chromatin Immunoprecipitation	染色质免疫共沉淀
Co-IP	Co-Immunoprecipitation	免疫共沉淀
CRE	cAMP response element	环腺苷酸响应元件
CREB	cAMP response element-binding protein	环腺苷酸响应元件结合蛋白
DA	dopamine	多巴胺
DARs	dopamine receptors	多巴胺受体
DAG	diacylglycerol	二酰基甘油
DAPI	4,6-diamidion-2-phenylindole dihydrochloride	4,6-二脒基-2-苯基吲哚
DEPC	diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMSO	dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
DMF	N,N-dimethylformamide	N,N-二甲基甲酰胺
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DopEcR	Dopamine/Ecdysteroid receptor	多巴胺/蜕皮激素受体
DPBS	dulbecco's phosphate buffered saline	杜氏磷酸盐缓冲液

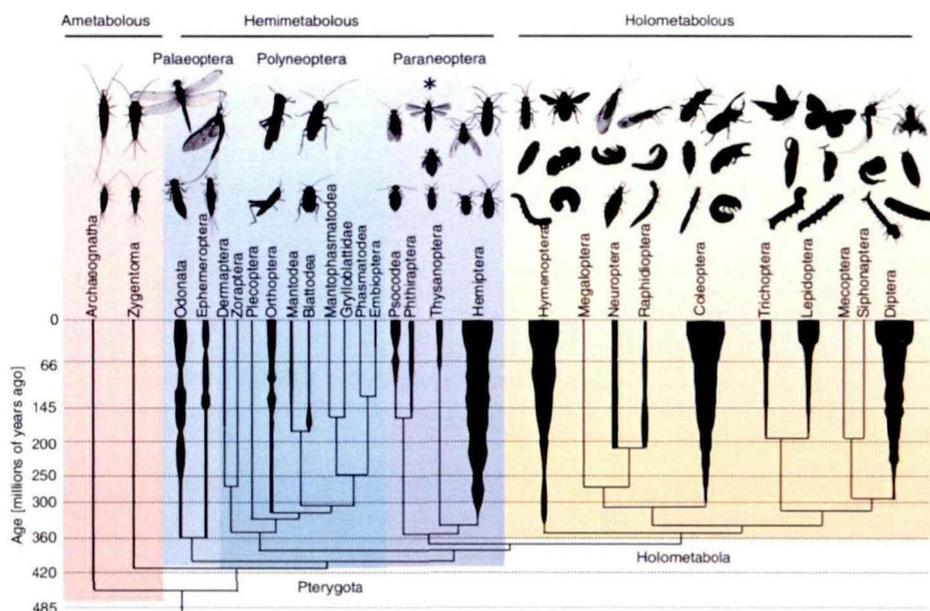
dsRNA	double-stranded RNA	双链 RNA
EcR	ecdysone receptor	蜕皮激素受体
EcRE	ecdysone response element	蜕皮激素应答元件
E75	Ecdysone inducible transcription factor 75	蜕皮激素诱导的转录因子 75
E74	Ecdysone inducible transcription factor 74	蜕皮激素诱导的转录因子 74
EDTA	ethylene diaminetetra-acetic acid	乙二胺四乙酸
EGTA	ethylenebis tetra-acetic acid	乙二醇双四乙酸
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
ExPASy	Expert Protein Analysis System	专业蛋白质分析系统
ErGPCR	ecdysone-responsive GPCR	蜕皮激素响应的 GPCR
FBS	fatal bovine serum	胎牛血清
GFP	green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GPCR	G-protein-coupled receptor	G 蛋白偶联受体
GRK	G-protein-coupled receptor kinase	G 蛋白偶联受体激酶
h	hour	小时
HaEpi	epidermal cell line from <i>Helicoverpa armigera</i>	棉铃虫表皮细胞系
Hsc70	heat shock protein 70	热激蛋白 70
Hsp90	heat shock protein 90	热休克蛋白 90
HR3	hormone receptor 3	激素接受子 3
IPTG	isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside	异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷
JH	juvenile hormone	保幼激素
Kana	Kanamycin	卡那霉素
kDa	kilodalton	千道尔顿
LB	Luria-Bertani medium	Luria-Bertani 培养基
$\lambda$ PPase	lambda phosphatase	$\lambda$ 磷酸酶
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
min	minute	分钟
mRNA	messenger RNA	信使 RNA

NBT	Nitro Blue Tetrazolium Chloride	氯化硝基四氮唑兰
ORF	open reading frame	开放阅读框
PBS	phosphate-buffer saline	磷酸缓冲盐溶液
PCD	programmed cell death	细胞程序性死亡
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PKAC1	protein kinase A catalytic subunit 1	PKA 催化亚基 1
PKC	protein kinase C	蛋白激酶 C
PLC	phospholipase C	磷脂酶 C
PLCG1	phospholipase C Gamma 1	磷脂酶 C 伽马 1
PTTH	prothoracicotropic hormone	促前胸腺激素
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PI	propidium iodide	溴化丙啶
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	磷酸肌醇 3-激酶
qRT-PCR	quantitative real time PCR	实时定量 PCR
RFP	red fluorescent protein	红色荧光蛋白
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
rmp	revolutions per minute	转每分钟
RT-PCR	reverse transcription PCR	反转录 PCR
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
s	second	秒
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool	简单分子结构分析工具
Taq	Thermus aquaticus DNA polymerase	栖热水生菌 DNA 聚合酶
TBS	Tris-buffered saline	Tris 缓冲盐溶液
Tris-HCl	Tris-hydrochloride	Tris 盐酸盐
USP	Ultraspiracle	超气门蛋白
Vg	Vitellogenin	卵黄蛋白
WGA	wheat germ agglutinin	麦胚凝集素
[ <sup>3</sup> H]PonA	[ <sup>3</sup> H] ponasterone A	氚 3 标记的 25-脱氧-20-羟基蜕皮酮

# 第一章 前言

## 1 激素调控昆虫变态发育

昆虫变态的进化是动物进化史上最重要的事件之一，禁锢在土壤中的节肢动物逐渐成为陆地上占主导地位的种群，昆虫成为了地球上种类最多，数量最大，分布最广泛的动物类群，昆虫变态的进化历程深刻影响了地球生命的演化。由于昆虫相对坚硬的外骨骼会限制其生长和形态变化，因此昆虫通过蜕皮使个体长大，在蜕皮过程中会形成新的角质层，而旧的角质层会脱落，这一过程称为蜕皮。幼虫的生长取食生长和蜕皮之间交替变化，从上一次蜕皮到下一次蜕皮的跨度称为一个龄期。昆虫对粮食和各种经济作物及其对人类和动物健康的影响，促使人们对昆虫的生长发育，尤其是变态发育机制进行了广泛深入的研究。



**图 1.1. 昆虫主要目的系统发育树。**该图显示了昆虫发育的三种主要类型，即不变态，半变态和全变态。对于主要目，线条框的宽度显示物种的数量。系统发育树来自 (Wipfler et al. 2019)，其物种分布基于 (Yang 2001)。

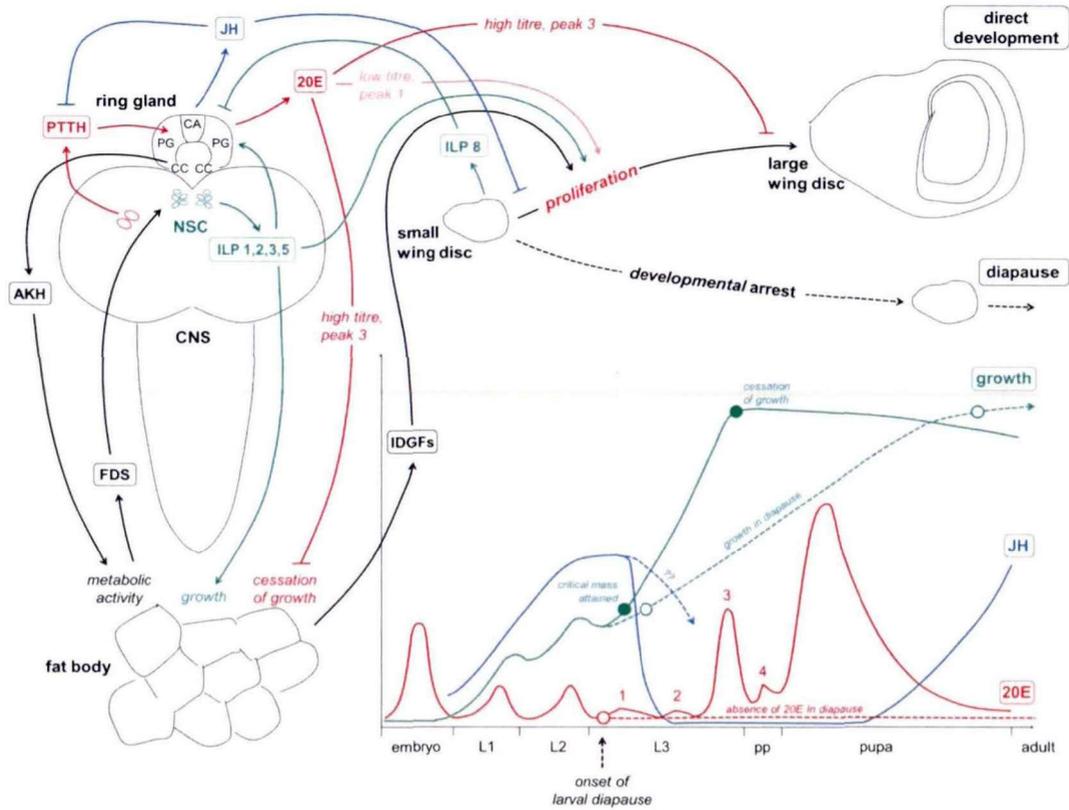
**Figure 1.1. Phylogeny of insects showing the major types of development.** The figure shows how the three major types of insect development, ametabolous, hemimetabolous and holometabolous. For the major orders the width of the boxes show the number of families through time. Phylogeny from (Wipfler et al. 2019) with family distributions adapted from (Yang 2001).

在昆虫的进化过程中，演化出了许多生命史策略 (Misof et al. 2014) (图 1.1)。比较原始的无翅亚纲衣鱼幼虫成年后形态几乎没有变化，原始无翅，体柔弱，变态不明显。随着翅和飞行能力的进化和发展，成虫转变为不再蜕皮的终末期，形似成虫但缺乏翅和生殖器的不成熟阶段，被称为若虫，这种发育模式称为不完全变态。

蓟马和一些半翅目昆虫独立地进化出了一个幼虫和成虫之间的静止阶段，称为“新变态”。完全变态昆虫的生命周期包括与成虫没有相似之处的幼虫阶段，不进食的蛹阶段以及成虫阶段，这种生活史策略早在石炭纪早期（约 350 Ma）便已出现，进而导致昆虫惊人的多样性（Truman 2019）。全变态昆虫包括 11 个目，其中四个与我们生活生产最为密切：鞘翅目（甲虫等）、膜翅目（蚂蚁，黄蜂和叶蜂等）、鳞翅目（蝴蝶和蛾类等）和双翅目（蝇和蚊子等）。

昆虫变态发育受激素控制，多种激素共同参与调节昆虫的生长发育（Kostal et al. 2017; Truman and Riddiford 2019）。蜕皮激素 20E 驱动果蝇 *Drosophila melanogaster* 幼虫蜕皮，而高滴度的保幼激素 JH 维持幼虫的性状。在果蝇三龄幼虫（L3）早期，第一个 20E 小脉冲（峰 1）触发幼虫到蛹的变态，同时也会刺激成虫盘细胞的快速增殖（Koyama et al. 2004）。三个连续的 20E 脉冲驱动幼虫进入蛹期：游走期（峰 2）、预蛹期（峰 3）和蛹期（峰 4）。预蛹期（峰 3）期间高滴度的 20E 抑制了成虫盘的增殖，并导致幼虫进食停止以及外周组织生长停滞（Edgar 2006）。果蝇幼虫神经分泌细胞分泌的促前胸腺激素（PTTH）调控前胸腺（PG）产生蜕皮激素（Zitnan et al. 1993; Harvie et al. 1998），咽侧体（CA）产生 JH（Richard et al. 1989），心侧体（CC）分泌刺激脂肪体代谢活动的脂肪代谢激素（AKH）（Lee and Park 2004）。三个腺体（PG、CA 和 CC）整合到果蝇幼虫单个环状腺中（Harvie et al. 1998）。胰岛素样肽（ILP）在幼虫大脑的一组神经分泌细胞（NSC）中产生（Ikeya et al. 2002）。ILP 通过胰岛素和营养信号 TOR（target of rapamycin）途径激活外周组织（例如脂肪体）和成虫盘（例如翼状盘）的增殖和生长（Koyama et al. 2013; Das and Dobens 2015）。此外，胰岛素信号促进 PG 中 20E 的合成（Colombani et al. 2005; Layalle et al. 2008）。胰岛素样肽 ILP8 从尚未成熟的小成虫盘分泌并抑制蜕皮激素的产生和化蛹，从而控制组织生长（Colombani et al. 2012; Garelli et al. 2012; Andersen et al. 2013）。不断生长的脂肪体会产生反馈信号（FDS）作用于大脑 NSC 以控制 ILP 的分泌（Andersen et al. 2013）。脂肪体还产生成虫盘生长因子（IDGF）与胰岛素协同刺激成虫盘中的细胞增殖（Bryant 2001）。虽然 IS（Insulin）和 20E 途径在功能上相互作用，但是这种相互影响的作用机制尚不清楚，例如果蝇 PG 中蜕皮激素的合成受到胰岛素的正调控（Colombani et al. 2005; Layalle et al. 2008），将营养物质的利用（TOR 途径）与蜕皮激素调控的生长发育联系起来（Teleman 2009）。同样，果蝇的 CA 腺体中也存在胰岛素受体，它可以调节 JH 的合成（Belgacem and Martin 2007）。此外，胰岛素信号的抑制与低滴度 JH 产生相关（Tu et al. 2005）。总的来说，黑腹果蝇幼虫的生

长受到 20E、JH、IS 和 TOR 信号途径之间的相互影响，共同调控组织的生长，直至达到个体合适的大小，并启动变态程序（图 1.2）（Edgar 2006）。



**图 1.2. 多种激素通路参与调节黑腹果蝇的生长发育 (Kostal et al. 2017)。** 黑腹果蝇生长发育阶段(实心绿线)与血淋巴激素滴度(JH, 实心蓝线; 20E, 实心红线)的关系(Edgar 2006)。  
**Figure 1.2. Hormonal pathways involved in the regulation of growth and development in *D. melanogaster* (Kostal et al. 2017).** The graph in lower right corner represents growth (solid green line) and the developmental hormone fluxes (JH, solid blue line; and 20E, solid red line) in the hemolymph of *D. melanogaster* (Edgar 2006).

## 2 20E 作用的分子机制

### 2.1 蜕皮激素及其对蜕皮变态的调控

蜕皮激素是由食物中胆固醇或植物中固醇物质合成的多羟基类固醇转化而来 (Gilbert et al. 1980) (图 1.3A)。在昆虫中，蜕皮激素通常来自前胸腺，尽管在某些物种中，其他组织如表皮、絳色细胞和成虫性腺也可以分泌。前胸腺分泌蜕皮激素，然后在周围组织中被蜕皮激素 20-单加氧酶在蜕皮激素的第 20 位碳原子上加羟基成为 20-羟基蜕皮酮 (20E) (Smith et al. 1983)，通常认为 20E 是蜕皮激素的活性形式 (Champlin and Truman 1998)。前胸腺中蜕皮激素分泌的调控机制很复杂，其中两个主要的作用因子是脑神经分泌细胞分泌的肽激素：促前胸腺激素和胰岛素样肽 (Yamanaka et al. 2013)。蜕皮激素在控制昆虫变态中的功能与甲状腺激素在引发两

栖动物变态中的功能相似 (Tata 2000; Brown and Cai 2007)。如图 1.3A 所示, 蜕皮激素水平较低, 但在每次蜕皮过程中都会出现一个较高的峰值。

无论是在胚胎期还是胚后期, 新角质层的沉积都需要蜕皮激素的脉冲驱动。蝗虫胚胎发生过程中产生的三个胚表皮中每一个都与蜕皮激素产生的脉冲有关 (Lagueux et al. 1979)。在果蝇中, 缺乏蜕皮激素生物合成酶的胚胎会经历胚胎发生, 但不会产生幼虫的表皮 (Rewitz et al. 2007)。昆虫从孵化到末龄幼虫早期, 幼虫组织和成虫原基都以营养依赖的方式生长, JH 的存在很大程度上维持了这种蜕变前的状态, 并将蜕皮激素的作用控制在蜕皮范围内。当幼虫或若虫的生长超过其变态的临界大小时 (Nijhout et al. 2014), 下一个蜕皮将是最后一个龄期。在全变态幼虫的最后一个龄期, 幼虫组织 (Lepesant et al. 1982)、成虫盘和原基会转变为蛹期组织的形态 (Mirth et al. 2009)。

## 2.2 20E 基因组信号途径

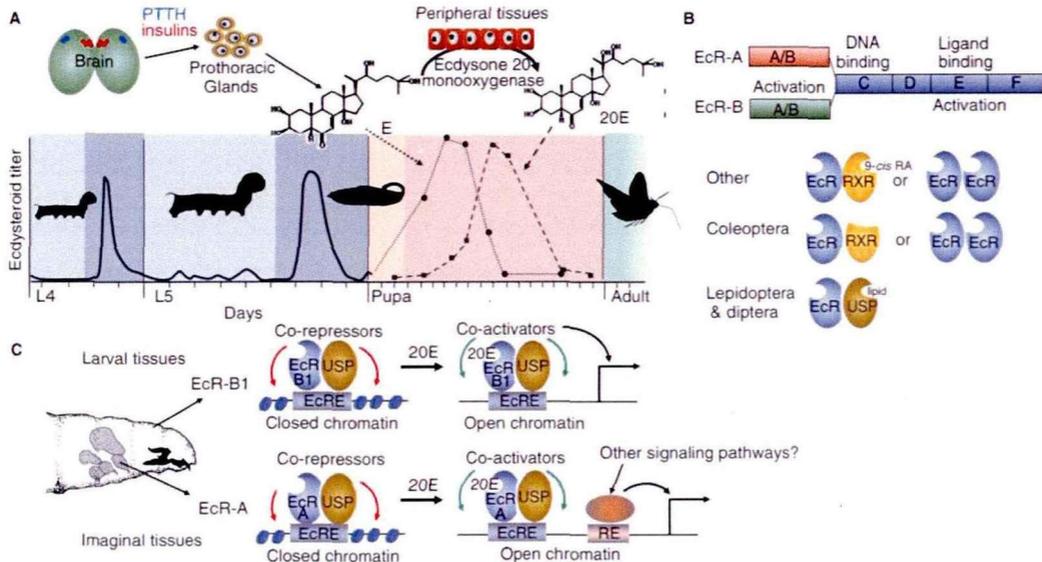
20E 通过其受体 (Koelle et al. 1991) 起作用, 其功能性受体为两个核受体: 蜕皮激素受体 (EcR) 和超气门蛋白 (USP) (Yao et al. 1992; Thomas et al. 1993)。EcR 和 USP 分别是脊椎动物类法尼醇 X 受体和类维生素 A X 受体的直系同源物 (King-Jones and Thummel 2005), 具有核受体超家族成员保守的结构特征 (Billas et al. 2003; Hill et al. 2013)。20E 以高亲和力结合 EcR, 未结合配体的 USP 与 EcR 相互作用 (图 1.2)。在大多数昆虫中, 已鉴定出两种 EcR 亚型 (EcRA, EcRB) 和一种或两种 USP 亚型 (USPA 和 USPB) (Hill et al. 2013)。然而, 在果蝇中, 已检测到三种 EcR 亚型, 它们在发育和繁殖中具有不同的作用 (Talbot et al. 1993)。与 20E 结合的 EcR-USP 异二聚体与蜕皮激素响应元件 (EcRE) 相互作用 (图 1.3C), EcRE 由可变数量的核苷酸将两个 AGGTCA 隔开, 形成反向或正向的回文序列 (King-Jones and Thummel 2005)。与 EcRE 结合的 20E-EcR-USP 复合物激活了早期基因 *Broad complex* (*BrC*)、*E74* 和 *E75*, 其蛋白质产物调节靶基因的表达。*BrC* 编码一个 C2H2 型锌指 DNA 结合转录因子家族, 对 20E 级联和其他早期基因 *E74* 和 *E75* 的表达至关重要 (Karim et al. 1993)。*E74* 基因由两个转录单元 *E74A* 和 *E74B* 组成 (Fletcher et al. 1995), 属于 ETS 转录因子家族, 它们以阶段和组织特异性的方式参与调控几个下游基因的转录 (Fletcher and Thummel 1995)。*E75* 是脊椎动物 Rev-erb 的昆虫直系同源物, 有多种亚型, 在 20E 介导的发育和生殖调控中具有重要作用 (Segraves and Hogness 1990; Cruz et al. 2012)。HR3 会激活核受体因子  $\beta$ FTZ-F1, 对随后的 20E 脉冲阶段特异性响应所必需 (Broadus et al. 1999)。

### 2.2.1 20E 核受体

EcR 和 USP 蛋白均为核受体家族成员 (图 1.3B), 具有 N 末端 A/B 结构域 (转录激活区)、C 结构域 (DNA 结合区, 非常保守)、D 结构域 (铰链区, 包含核定位信号)、E 结构域 (配体结合区, 相对保守), 在某些情况下还包含一个独特的 F 结构域 (Moras and Gronemeyer 1998), 根据 N 末端的差异, 编码不同的异构体。果蝇编码 3 个 EcR 异构体 EcRA、EcRB1 和 EcRB2 (Talbot et al. 1993), 其功能不尽相同。EcRB1 在整个幼虫阶段均有表达, 而 EcRA 在末龄幼虫进入变态时表达 (Talbot et al. 1993; Sullivan and Thummel 2003), 后来它们被分为不同的细胞类型, 其中幼虫细胞表达 EcRB1 而成虫细胞仅表达 EcRA (Talbot et al. 1993), EcRA 的作用可能导致 EcR-USP 结合的局部染色质重塑, 从而引发其他发育调控途径, 驱动变态发生时的变化 (Uyehara and McKay 2019)。对于成虫组织, 蜕皮激素主要促进成虫组织细胞的生长, 缺乏蜕皮激素或 EcR 会抑制成虫盘的变态发生 (Schubiger et al. 2005)。果蝇 EcR 的功能异常均会导致幼虫化蛹失败和死亡 (Lam and Thummel 2000)。家蚕有 3 种异构体 EcRA、EcRB1 和 EcRB2 (Kamimura et al. 1997), EcRB1 参与 20E 诱导的丝腺细胞程序性死亡 (Goncu and Parlak 2009)。在德国小蠨中, EcRA 对于成虫组织发育至关重要 (Cruz et al. 2006)。棉铃虫 EcRB1 在 20E 诱导下与 USP1 形成异源二聚体并结合到棉铃虫 HR3 启动子区域的 EcRE 启动基因的转录 (Liu et al. 2014a)。20E 通过 PKC $\delta$  直接磷酸化 EcRB1 的 Thr468, 促使 EcRB1/USP1 转录复合体的形成并结合 EcRE 起始基因转录 (Chen et al. 2017)。

昆虫 USP 序列近似哺乳动物类维生素 A X 受体 (RXR) 序列, 并高度保留了 RXR 中与配体相互作用的残基, 这些 USP 可以被 RXR 配体 (例如 9-顺式视黄酸) 结合并激活 (Bonneton et al. 2003)。USP 与 EcR 结构基本相同, 只是没有 F 结构域 (Billas et al. 2001)。EcR-USP 异二聚体通常位于细胞核中并与 DNA 结合 (图 1.3C) (Riddiford et al. 2001), 在没有配体结合时, EcR-USP 会募集核小体重塑蛋白以压紧染色质并引起局部抑制, 结合 20E 时, 组蛋白乙酰化酶会“打开”染色质结构并促进基因转录。配体结合域基于是否存在配体结合来介导核心区域的抑制或激活。EcR 和 USP 形成异源二聚体介导昆虫蜕皮激素的信号传导 (Yao et al. 1992)。USP 突变抑制 EcR 与配体的亲和力。在昆虫发育过程中, USP 参与 20E 诱导的蜕皮变态 (Hegstrom et al. 1998), 20E 诱导 USP Ser35 磷酸化促进 20E 信号途径基因的转录 (Wang et al. 2012)。果蝇 USP 突变后, 幼虫蜕皮受到抑制 (Oro et al. 1992), 抑制 20E 调控的基因转录, 幼虫中肠和唾液腺不发生凋亡, 成虫盘无法生长分化 (Hall and

Thummel 1998)。棉铃虫 USP1 参与 20E 信号途径，与 EcRB1 和磷酸化的周期蛋白依赖性激酶 CDK10 形成转录复合体，起始 20E 信号途径中的基因转录 (Liu et al. 2014a)。



**图 1.3. 昆虫蜕皮激素及其核受体 (Truman 2019)。(A)** 蜕皮激素的产生与滴度变化，蜕皮激素的滴度基于 *Manduca sexta* (Bollenbacher et al. 1981; Warren and Gilbert 1986)。(B) 蜕皮激素受体 (EcR) 的结构。(C) 在果蝇变态之前，幼虫和成虫组织表达不同的 EcR 亚型。EcRE，蜕皮激素受体结合元件；RE，其他转录因子的反应元件。

**Figure 1.3. The ecdysteroid system of insects (Truman 2019).** (A) Production and titers of ecdysone (E). The ecdysteroid titer is based on *Manduca sexta* (Bollenbacher et al. 1981; Warren and Gilbert 1986). (B) The structure of the ecdysone receptor (EcR). (C) Prior to metamorphosis in *Drosophila*, larval and imaginal tissues express different EcR isoforms. EcRE, ecdysone response element; RE, response element for other transcription factors.

### 2.2.2 蜕皮激素信号途径的级联反应

E74 和 E75 是 20E 激活的早期转录因子。在果蝇中，20E 能诱导 E74A 和 E75B 的表达，参与 20E 介导的变态发育 (Thummel 1996)。埃及伊蚊 E74B 与 EcR-USP 协同作用激活卵黄蛋白 Vg 基因表达，而 E74A 对 Vg 表达没有影响 (Sun et al. 2004; Sun et al. 2005)。在埃及伊蚊中发现了三种血液激活的 E75 亚型 E75A, E75B 和 E75C (Pierceall et al. 1999)。E75A 的 RNAi 导致 Vg 表达降低，而 E75C 的沉默导致 Vg 水平持续升高，20E 和血红素的结合导致 Vg 高表达 (Cruz et al. 2012)。在烟草天蛾中，存在 4 个 E75 的异构体 E75A, E75B, E75C 和 E75D。在幼虫表皮中，20E 能诱导 E75A mRNA 表达，E75B 和 E75D 不能结合 DNA，在蜕皮期高表达，在化蛹期翅的发育中，E75A 和 E75C 在组织分化时高表达；而 E75B 和 E75D 在表皮重建中高表达 (Zhou et al. 1998; Keshan et al. 2006)。

HR3 是核受体超家族中的一员,与脊椎动物的类视黄醇孤儿受体(retinoid orphan receptor, ROR)同源 (Palli et al. 1992)。HR3 参与 20E 信号通路基因的转录调控,诱导 20E 晚期基因的转录 (Mane-Padros et al. 2012)。20E 通过 EcR1/USP 转录复合体启动 HR3 的基因转录,进而产生 20E 信号级联反应,调控蜕皮变态 (Riddiford et al. 2003)。果蝇 DHR3 的表达模式与 20E 的滴度相关,20E 促进 HR3 的表达 (Lam et al. 1997)。在德国小蠨幼虫中,20E 直接调控 HR3 的表达,HR3 干扰后抑制蜕皮变态 (Cruz et al. 2007)。在埃及伊蚊中,AHR3 参与 20E 介导的卵黄蛋白的形成和生殖过程 (Mane-Padros et al. 2012)。埃及伊蚊脂肪体中,HR3 对于关闭 TOR 信号靶标并启动程序性自噬至关重要 (Bryant and Raikhel 2011; Mane-Padros et al. 2012)。本实验室克隆得到棉铃虫 *HHR3* 5 个异构体,不同的异构体在幼虫发育阶段表达不同,起着不同的功能 (Zhao et al. 2004)。在 20E 的诱导之下,EcRB1/USP1 转录复合体结合 *HR3* 基因的 5'前导序列 EcRE,启动 *HR3* 基因的转录 (Liu et al. 2014a)。

Broad 是具有多个同工型的锌指结构转录因子,携带一对不同的 C 端 C2H2 锌指,它们控制其 DNA 结合的特异性 (Moussian 2010)。果蝇有四个亚型 (Moussian 2010),鳞翅目昆虫有四个亚型 (Riddiford 1976),赤拟谷盗有五个亚型 (White and Ewer 2014),蜚蠊有六个亚型 (Dhadialla et al. 1998)。果蝇中 Broad 具有两种功能:

(i) 激活蛹阶段特有的基因;(ii) 抑制幼虫和成虫程序的发生 (Champlin and Truman 1998; Moussian 2010)。果蝇 Broad 的突变体会经历幼虫阶段,但抑制变态的发生 (Clever and Karlson 1960)。在双翅目和鳞翅目昆虫变态化蛹期间,Broad 的 mRNA 和蛋白质水平均显著升高。20E 诱导烟草天蛾表皮中 Broad 的表达 (Qu et al. 2015)。在赤拟谷盗中敲除 *Broad* 导致化蛹失败形成幼虫-成虫嵌合体 (White and Ewer 2014)。Broad 的表达受到 20E 诱导形成的 EcR/USP 异源二聚体直接调控 (Kucharova-Mahmood et al. 2002)。另外 Broad 在组织凋亡与重建等变态过程中起到重要作用 (Zhou and Riddiford 2002)。BrC 对雌性成年蚊子的繁殖至关重要 (Chen et al. 2004; Zhu et al. 2007)。在埃及伊蚊中鉴定到四种 BrC 异构体,BrC-Z1, BrC-Z2, BrC-Z3 和 BrC-Z4 在卵黄发生中起着不同的作用 (Chen et al. 2004),取食血液后和体外 20E 刺激可以诱导 BrC-Z1, BrC-Z2 和 BrC-Z4 的表达。细胞转染和 RNAi 分析表明,BrC-Z2 结合 Vg 启动子促进 Vg 基因的表达,而 BrC-Z1 和 BrC-Z4 抑制 Vg 的表达 (Chen et al. 2004; Zhu et al. 2007)。在埃及伊蚊中 BrC 异构体调节 E75 异构体的表达,从而促进细胞凋亡并阻止卵黄发生 (Terashima and Bownes 2006)。在正常喂食期间,20E 诱导 BrC-Z1 表达,进而激活 E75B, E75B 负责卵巢卵泡的成熟。相反,在饥饿的条

件下, 20E 诱导 BrC-Z2 和 BrC-Z3。这些 BrC 异构体抑制 E75B 表达, 同时诱导 E75A 表达, 导致细胞凋亡 (Terashima and Bownes 2006)。在棉铃虫中 BrZ7 参与 20E 信号途径, 生长期 JH 诱导其磷酸化并参与 JH 途径基因转录, 变态期 20E 促进其表达并维持其非磷酸化状态, 促进变态发育 (Cai et al. 2014c)。此外, 热休克蛋白 Hsp 90 与 BrZ7 相互作用调控 BrZ7 的稳定性及其在 JH 和 20E 信号途径中基因转录中的功能 (Cai et al. 2014b)。

### 2.3 20E 非基因组信号途径

类固醇激素 20E 可以通过细胞的脂质双分子层进入到细胞内并与核受体 EcR 结合, 进而与 USP 形成转录复合物, 与核受体结合元件 EcRE 结合, 起始下游基因的转录 (Riddiford et al. 2003)。然而研究发现除了这种核受体基因组途径外, 20E 可以结合细胞膜上的受体, 引起细胞内第二信使快速变化, 蛋白质翻译后修饰等一系列快速生理变化, 起始非基因组信号途径 (Srivastava et al. 2005; Kang et al. 2019)。

在哺乳动物中, 雌激素的细胞膜受体 GPER/GPR30 是 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor) (Prossnitz and Barton 2014), 雌激素能够通过 GPER 诱导细胞快速响应, 如细胞内  $Ca^{2+}$  水平快速增加, 激活 PKC 途径 (Pietras and Szego 1975), 细胞内 cAMP 的快速升高, 激活 PKA 途径 (Szego and Davis 1967)。雌激素通过 GPR30 激活 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 信号通路, 调节血管快速舒张 (Haas et al. 2009)。在大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞中, 雌激素可以激活蛋白激酶 B PKB, 引起 cAMP 响应蛋白 CREB 的磷酸化, 进而诱导抗凋亡基因 Bcl-2 的表达 (Pugazhenthii et al. 2000)。

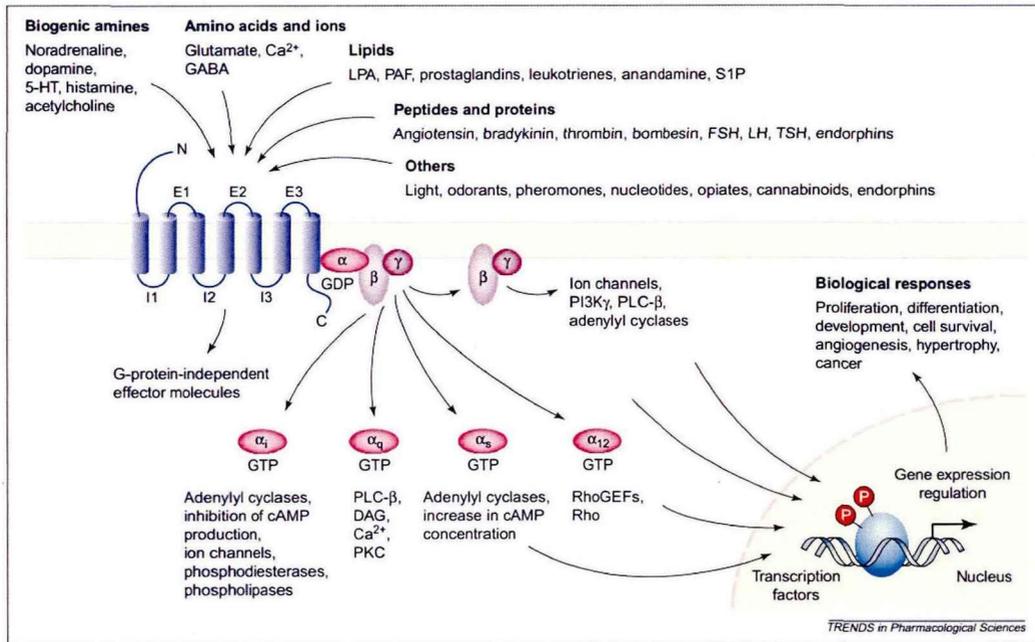
果蝇中鉴定到了一种 GPCR (dopamine/ecdysteroid receptor, DmDopEcR) 既能结合多巴胺 (DA), 也能与 20E 结合, 快速诱导 ERK1/2 磷酸化, 抑制多巴胺诱导的 cAMP 升高与 AKT 的磷酸化 (Srivastava et al. 2005)。敲降 *DmDopEcR* 后, 雄性果蝇求偶行为受到显著抑制。多巴胺信号可以调控果蝇对糖感受的能力 (Inagaki et al. 2012)。20E 通过 DmDopEcR 调控果蝇、求爱、学习和记忆等行为 (Ishimoto and Kitamoto 2010)。在鳞翅目昆虫家蚕中, 20E 通过 GPCR 激活磷脂酶 C PLC, 进而引起胞内  $Ca^{2+}$  水平的快速增加, 调控丝腺细胞的细胞程序性死亡 PCD (Manaboon et al. 2009)。在棉铃虫中, 发现 20E 能够诱导 Calponin 快速磷酸化并入核 (Liu et al. 2011)。20E 能够通过 ErGPCR1、ErGPCR2、Gαq、PLC、CaMKII 和  $Ca^{2+}$  诱导 CDK10 和 USP1 蛋白的磷酸化、乙酰化, 诱导 EcR1/USP1 转录复合体的形成, 起始 20E 信号途径基因的转录 (Liu et al. 2014a; Liu et al. 2014b; Jing et al. 2015)。尽管 ErGPCR1 和 ErGPCR2

均在细胞膜上传导 20E 的非基因组信号，但是 ErGPCR1 和 ErGPCR2 均未检测到与 20E 类似物<sup>[3H]</sup>PonA 的结合 (Cai et al. 2014a; Wang et al. 2015)。此外，20E 诱导  $\beta$ -arrestin-1 的磷酸化上膜，与 ErGPCR1 相互作用抑制 20E 信号 (Zhang et al. 2015)，20E 诱导 GRK2 的表达和磷酸化并上膜，使 ErGPCR2 磷酸化内吞脱敏 20E 信号 (Wang et al. 2015; Zhao et al. 2016)。20E 通过 GPCR 诱导 Stim1 磷酸化并与 Orail1 相互作用，维持胞内  $Ca^{2+}$  较高水平，促进 20E 信号相关基因的转录 (Chen et al. 2019)。这些实验结果证明 20E 通过 GPCR 诱导非基因组途径，进一步调节基因组途径中的基因转录，精确调控昆虫的蜕皮变态。

### 2.3.1 膜受体 GPCR

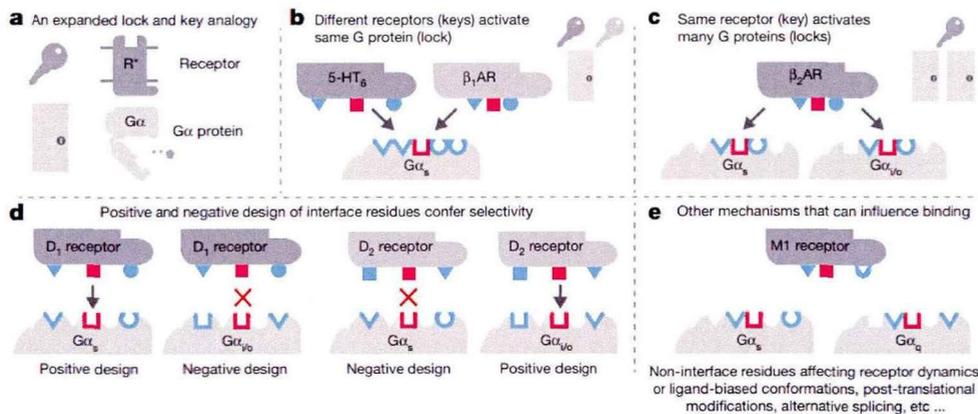
G 蛋白偶联受体 (GPCR) 是参与信号传递的最大的膜受体家族之一。这些受体被多种配体激活，包括肽和非肽的神经递质、生物胺、激素、生长因子、气味分子和光 (Bjarnadottir et al. 2006)。人类基因组中约有 1% 的基因编码超过 1000 种具有七次跨膜螺旋结构的蛋白质 (Flower 1999)。GPCR 基因敲除 (Rohrer and Kobilka 1998) 的研究及其与遗传性疾病的联系 (Stadel et al. 1997) 表明 GPCR 具有重要的生理作用，从而为研制新的药物治疗靶点提供重要的理论依据。尽管 GPCR 能够结合大量天然配体 (~1,000)，但它们仅与  $G\alpha$  家族的 16 个基因编码的 G 蛋白偶合 (Isberg et al. 2015; Southan et al. 2016)。四个  $G\alpha$  家族的每个基因均调节关键效应分子 (例如腺苷酸环化酶和磷脂酶 C 等) 和次级信使的生成 (例如 cAMP、 $Ca^{2+}$  和 IP3 等)，这些信使依次触发不同的信号级联 (Marinissen and Gutkind 2001; Neves et al. 2002) (图 1.4)。因此，配体激活的 GPCR 与  $G\alpha$  蛋白的选择性结合对于信号转导至关重要 (Neves et al. 2002)。

通常，配体与受体的结合会导致异源三聚体 G 蛋白 ( $G\alpha\beta\gamma$ ) 的募集， $G\alpha$  蛋白的核苷酸交换和 G 蛋白亚基的解离 (Oldham and Hamm 2008)。GPCR 受体类似于钥匙，G 蛋白类似于门上的锁 (图 1.5a)。几种不同的受体可以偶联至同一  $G\alpha$  蛋白 (图 1.5b;  $\beta_1$  肾上腺素能受体 (Frielle et al. 1987) 和 5-羟色胺 (5-HT<sub>6</sub>) 受体 (Ruat et al. 1993) 都可以激活  $G_{\alpha s}$  蛋白，分别导致心肌收缩和兴奋性神经传递 (Southan et al. 2016))。一种受体也可以与一种以上的  $G\alpha$  蛋白偶联 (图 1.5c;  $\beta_2$  肾上腺素能受体 ( $\beta_2AR$ ) 主要与  $G_{\alpha s}$  蛋白偶联，导致平滑肌松弛，但也可以与  $G_{\alpha i}$  偶联以抑制这种反应 (Li et al. 2004))。在进化过程中，相对于 GPCR，G 蛋白更为保守。受体界面残基的突变会引起 GPCR-G 蛋白结合的特异性 (图 1.5d)。一些其他因素可以改变 GPCR-G 蛋白的界面进而影响结合的选择性 (图 1.5e)。



**图 1.4. G 蛋白偶联受体的多样性 (Marinissen and Gutkind 2001)。**DAG, 二酰基甘油; FSH, 促卵泡激素; GEF, 鸟嘌呤核苷酸交换因子; LH, 促黄体激素; LPA, 溶血磷脂酸; PAF, 血小板激活因子; PI3K, 磷酸肌醇 3-激酶; PKC, 蛋白激酶 C; PLC, 磷脂酶 C; S1P, 1-磷酸鞘氨醇; TSH, 促甲状腺激素。

**Figure 1.4. Diversity of G-protein-coupled receptors (Marinissen and Gutkind 2001).** DAG, diacylglycerol; FSH, follicle-stimulating hormone; GEF, guanine nucleotide exchange factor; LH, leuteinizing hormone; LPA, lysophosphatidic acid; PAF, plateletactivating factor; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; S1P, sphingosine-1-phosphate; TSH, thyroid-stimulating hormone.



**图 1.5. GPCR-G 蛋白选择性的锁钥类比 (Flock et al. 2017)。**

**Figure 1.5. Lock and key analogy for GPCR-G protein selectivity (Flock et al. 2017).**

作为质膜受体，GPCR 被认为定位于细胞表面并被激活。起初，人们认为 GPCR 的内化可以使受体脱敏并终止信号传导。但是，越来越多的研究表明，某些 GPCR 可以在细胞内部被激活并触发特定的下游生物学效应，这表明 GPCR 不仅在细胞表面激活，也可能由细胞内信号激活 (Rohrer and Kobilka 1998; Schiaffino et al. 1999)。

GPCR 可以在内化后与其激动剂一起继续激发传递信号。此外，位于胞内不同细胞器的 GPCR 可以在胞内被激活。

对于 A 类 GPCR， $\beta$ -arrestin 易位至质膜并在 GPCR 激活后与 GPCR 相互作用。受体- $\beta$ -arrestin 复合物内化，然后在膜附近激活 ERK1/2。 $\beta$ -arrestin 与 A 类受体之间的相互作用是瞬时的，并且在内化后迅速解离，然后，受体迅速循环回到质膜。与 A 类受体相反，B 类受体与  $\beta$ -arrestin 强烈相互作用，直到靶向内体以进行随后的 GPCR 降解和 ERK1/2 激活 (Luttrell 2005; Eichel et al. 2016)。此外，激活的信号由细胞质中的 G 蛋白介导，受体内化后，某些 GPCR (例如  $\beta_2$ -AR) 靶向内体，而某些 GPCR (例如促甲状腺激素受体; THSR) 则靶向高尔基体。内体或高尔基体中的受体随后募集 Gas 蛋白，导致 cAMP 积累，诱导 ERK1/2 激活 (Irannejad et al. 2013; Godbole et al. 2017)。

某些 GPCR 的亚细胞定位也发生着内化依赖的细胞内激活，它们可能激活不同的信号系统。例如，已经在线粒体 (Benard et al. 2012)，黑素体 (Schiaffino et al. 1999)，内质网膜 (Revankar et al. 2005)，溶酶体 (Rozenfeld and Devi 2008) 和核膜 (Sergin et al. 2017) 上发现了 GPCR。 $\beta_1$ -AR 可以稳定地定位在高尔基体上，并从高尔基体中引发内部 Gas-cAMP 信号，而该信号与质膜受体的内化无关 (Irannejad et al. 2017)。通过与高尔基体中的 G 蛋白偶联，GPCR 能够调节高尔基体的转运活性并诱导高尔基体结构组织的变化。此外，代谢型谷氨酸受体 5 (mGluR5) 通过与染色质相互作用而位于内核膜上，在那里它被激活并通过与 G $\alpha$ q/11 偶联介导核质中的  $Ca^{2+}$  变化 (Sergin et al. 2017)。GPCR 的核定位可能有利于与染色质的原位相互作用，从而调节基因转录，染色体重塑和基因组的完整性。

GPCR 激活后被 G 蛋白偶联受体激酶 (GRK) 磷酸化 C 末端或胞内环丝氨酸/苏氨酸位点。磷酸化的受体募集  $\beta$ -arrestin，在空间上阻碍受体与 G 蛋白偶联，导致受体脱敏 (Ostermaier et al. 2014)。受体结合  $\beta$ -arrestin 后通过网格蛋白包被促进受体内吞 (Gurevich and Gurevich 2006)。此外， $\beta$ -arrestin 还能够将信号传导给酪氨酸激酶 c-Src (Luttrell et al. 1999)，Akt (Beaulieu et al. 2005) 和胞外信号调节激酶 ERK (McDonald et al. 2000) 等信号分子，以启动非 G 蛋白依赖的信号传导。

### 2.3.2 GPCR 多聚体

GPCR 曾被认为仅作为单体在细胞膜上起作用，但随着新的生物技术的发展，GPCR 二聚化的报道越来越多。起初，通过光亲和标记法，目标蛋白大小分析或蛋

白交联实验显示某些 GPCR 可能形成二聚体, 例如  $\beta_2$ -ARs 的同源二聚体以及胆囊收缩素 8 (CCK-8) 与多巴胺受体之间的异源二聚体 (Fraser and Venter 1982; Agnati et al. 1983; Avissar et al. 1983)。但是, 当时没有直接证据证实存在 GPCR 二聚体。当差异表位标记和免疫沉淀用于 GPCR 的研究时, 提供了 GPCR 二聚体和寡聚体存在的可靠生化证据 (Kaupmann et al. 1998; Gines et al. 2000)。后来使用荧光或生物发光共振能量转移 (FRET 或 BRET) 方法的研究进一步证实了 GPCR 二聚体的存在 (Angers et al. 2000; Albizu et al. 2010)。最近, 单分子显微镜技术的强大进步促进了 GPCR 二聚化动态过程的实时测量 (Calebiro et al. 2013)。与单体相比, 二聚体显示出不同的激动剂亲和力, 功效和运输特性, 以及不同信号和生物学功能的介导作用 (Gomes et al. 2001)。

二聚化激活的 GPCR 可分为三类。首先, 某些 GPCR 仅在二聚化条件下才能介导信号传导。例如,  $\beta$ -氨基丁酸 B 型受体 ( $GABA_B R$ ) 包含  $GABA_{B1}$  和  $GABA_{B2}$ 。因为结合位点仅位于  $GABA_{B1}$  中, 所以配体只能与  $GABA_{B1}$  结合, 但是,  $GABA_{B1}$  没有转导后续信号的能力,  $GABA_{B2}$  起着信号转导的作用。因此,  $GABA_{B1}$  和  $GABA_{B2}$  均不能单独激活 GIRK 型钾通道, 只有当  $GABA_{B1}$  和  $GABA_{B2}$  复合为  $GABA_B R$  二聚体时, 才能激活通道活性 (Kaupmann et al. 1998; Kuner et al. 1999)。此外, 与单体 GPCR 相比, 二聚 GPCR 与不同的 G 蛋白和下游信号通路耦合。例如, 多巴胺 D1 单体通过  $G_{\alpha s}$  传导信号, 而多巴胺 D2 单体通过  $G_{\alpha i}$  传导信号。但是, 多巴胺 D1/D2 异二聚体通过  $G_{\alpha q}$  传导信号 (Lee et al. 2004)。第三, 二聚 GPCR 诱导“G 蛋白/ $\beta$ -arrestin 偶联开关”(从 G 蛋白到  $\beta$ -arrestin)。例如, 当  $\mu$ -阿片受体作为单体存在时, 它通过 G 蛋白介导信号传导。但是, 当  $\mu$ -阿片受体与  $\delta$ -阿片受体异源二聚时, 信号会通过  $\beta$ -arrestin 传导 (Rozenfeld and Devi 2007)。

GPCR 二聚化具有重要的生物学和药理学意义。大脑中腺苷  $A_1$  受体 ( $A_1 R$ ) 与多巴胺  $D_1$  受体 ( $D_1 R$ ) 之间的功能拮抗作用。 $A_1 R$  激动剂可促进  $A_1 R/D_1 R$  异源化, 从而诱导  $D_1 R$  与  $G_{\alpha s}$  蛋白解偶联并减少  $D_1 R$  介导的 cAMP 增加。因此, 与单独的  $D_1 R$  激活相比,  $A_1 R$  和  $D_1 R$  的共激活增加了  $A_1 R/D_1 R$  异构化的水平, 并显著降低了 cAMP 的积累。这种拮抗机制为开发新型药物治疗涉及  $D_1 R$  的疾病 (如帕金森病) 提供了基础 (Salamone and Correa 2009)。

GPCRA, B 和 C 三类家族均被证明存在同源多聚, 并且相同结构类别的成员间存在异源多聚。在许多情况下, 受体的特定寡聚状态尚不清楚, 通常被认为是二聚

体,但是也存在受体高阶多聚的证据 (Bouvier 2001; Fotiadis et al. 2003; Ferre et al. 2009; Fung et al. 2009)。 $\mu$ -阿片受体与  $\delta$ -阿片受体可以形成异源二聚体,且  $\mu$ -阿片受体与  $\delta$ -阿片受体形成的四聚体是在形成二聚体的基础上完成的 (Golebiewska et al. 2011)。配体对受体低聚的影响可以分为无影响 (Harikumar et al. 2006),配体诱导的受体低聚 (Patel et al. 2002) 和配体诱导受体低聚的解离 (Cheng and Miller 2001)。受体间的跨膜螺旋结构域 (Harikumar et al. 2007),细胞外 (Kunishima et al. 2000) 或细胞内结构域 (White et al. 1998) 影响受体的寡聚。其中对 C 类  $\gamma$ -氨基丁酸 B 受体 (White et al. 1998) 以及甜味和鲜味味觉受体 (Chandrashekar et al. 2006) 的异二聚体研究较为深入。此外, A 类白三烯 B<sub>4</sub> 受体 (Baneres and Parello 2003) 和多巴胺 D<sub>2</sub> 受体 (Han et al. 2009) 以二聚体的形式与 G 蛋白偶联。这些研究表明, GPCR 二聚体和单个 G 蛋白异源三聚体形成的五聚体复合物可能是最小的功能信号单元。虽然  $\beta_2$ -肾上腺素受体的低聚化已被证明 (Fotiadis et al. 2003; Fung et al. 2009), 但  $\beta_2$ -肾上腺素受体 (Whorton et al. 2007) 和视紫红质受体 (Ernst et al. 2007) 均可以作为单体与 G 蛋白偶联。

GPCR 二聚体的胆固醇分子调节的机制尚不清楚 (Paila and Chattopadhyay 2009), 一般认为是由于胆固醇的存在而导致脂质微结构的变化。膜上的胆固醇与受体相互作用有助于形成胆固醇介导的二聚体, 胆固醇可能在受体间直接与 GPCR 结合 (Yeagle 2014) (图 1.6a)。GPCR 二聚体形成也可能是由于疏水性错配而引起不利的膜扰动导致的, 膜内胆固醇的局部浓度变化引起受体胆固醇跨膜区域“D”疏水部分厚度与脂膜疏水厚度“d”之间的疏水性错配 (Oates and Watts 2011) (图 1.6b)。

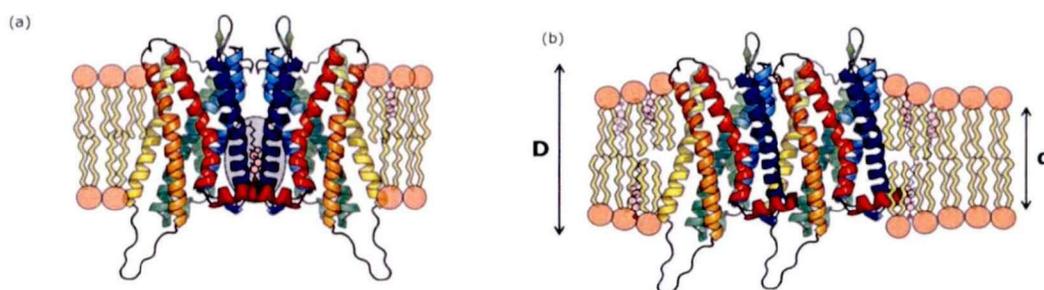


图 1.6. 胆固醇介导的 GPCR 二聚化的调节机制 (Oates and Watts 2011; Yeagle 2014).  
Figure 1.6. Cholesterol-mediated mechanisms of modulation of GPCR dimerization (Oates and Watts 2011; Yeagle 2014).

### 2.3.3 多巴胺及其受体

多巴胺由多巴胺能神经元合成释放并作用于整个中枢神经系统, 参与奖励、情感、学习和食欲等重要功能 (Missale et al. 1998; Beaulieu and Gainetdinov 2011;

Yamagata et al. 2016)。在脊椎动物中，根据结构、药理和生化特性，多巴胺受体可分为两大类：D1 类多巴胺受体（D1（Sunahara et al. 1990）和 D5（Sunahara et al. 1991），也可能称为 D1A 和 D1B），通过与  $G_{\alpha s}$  偶联从而增加细胞内 cAMP 水平；D2 类多巴胺受体（D2, D3 和 D4）通过与  $G_{\alpha i}$  相互作用降低细胞内 cAMP 水平（Beaulieu and Gainetdinov 2011）。

无脊椎动物具有四种类型的多巴胺受体。无脊椎动物多巴胺受体的 Dop1 和 Dop2 与脊椎动物 D1 样受体相似，可增加细胞内 cAMP 水平（Hill et al. 2016）。此外，Dop2 受体还可以通过偶联  $G_{\alpha q}$  在较低的多巴胺浓度下增加细胞内钙水平（Himmelreich et al. 2017）。Dop3 与脊椎动物 D2 样受体相似，激动剂结合时 cAMP 水平降低（Mustard et al. 2005）。在赤拟谷盗中，Dop3 受体被 JH 激活，导致 cAMP 水平降低（Bai and Palli 2016）。第四类多巴胺受体，Dop/Ecd 受体，果蝇中 DopEcR 受体既可以被多巴胺激活导致细胞内 cAMP 水平升高并激活磷酸肌醇 3 激酶 PI3K 途径；也可以被蜕皮激素和 20E 结合，从而抑制多巴胺诱导的作用并导致丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 途径的快速激活（图 1.7）（Srivastava et al. 2005）。与多巴胺相比，该受体与蜕皮激素的亲和力更高。在昆虫中，DA 参与调控昆虫的食欲（Inagaki et al. 2012）、学习与记忆（Agarwal et al. 2011）、角质层硬化和黑化（Andersen 2010）、运动（Draper et al. 2007）以及飞蝗从散居型到群居型的型变（Ma et al. 2011）等过程。

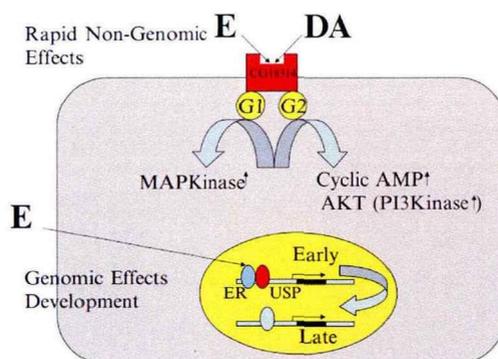


图 1.7. 果蝇 *DmDopEcR* 参与蜕皮激素和儿茶酚胺多巴胺非基因组信号途径（Evans et al. 2014）。

Figure 1.7. *Drosophila* *DmDopEcR* participates in nongenomic signaling pathways of ecdysteroids and catecholamine dopamine (Evans et al. 2014).

## 2.4 20E 的运输方式

亲脂性类固醇激素可以通过跨脂质双分子层的简单扩散而自由进出细胞。先前对几种哺乳动物类固醇激素的研究支持这种观点（Plagemann and Erbe 1976; Giorgi

and Stein 1981)。有趣的是，许多研究还表明膜转运蛋白可能参与类固醇激素进入细胞 (Milgrom et al. 1973; Pietras and Szego 1977)。

在果蝇中，蜕皮激素从内分泌腺释放是通过囊泡介导的，而不是通过简单的扩散释放 (Yamanaka et al. 2015)。高浓度的蜕皮激素进入囊泡，通过钙调节的胞吐作用释放到胞外，这种蜕皮激素的转运是通过 ATP 结合盒 (ABC) 转运蛋白逆浓度梯度发生的。然而，果蝇中存在一种溶质载体 (SLC) 转运蛋白—蜕皮激素导入体 (EcI)，参与细胞对蜕皮激素的吸收 (Okamoto et al. 2018) (图 1.8)。EcI 编码有机阴离子转运蛋白 (OATP) Oatp74D，它是溶质载体有机阴离子 (SLCO) 超家族的成员。EcI 突变体显示出与蜕皮激素或 EcR 突变体一样的表型，且不能通过 20E 补偿将其挽救，但可以通过非甾体蜕皮激素激动剂挽救。EcI 在细胞从血淋巴中摄取蜕皮激素至关重要。总的来说，这些结果打破了蜕皮激素跨细胞膜运输的简单扩散模型，提出了一种转运蛋白介导的易化扩散新机制。之前的研究认为甾体激素通过“简单扩散”跨膜运输，从而认为类固醇激素可以通过血脑屏障自由扩散进入大脑 (Banks 2012) (图 1.8)。然而，最近的研究发现 EcI 在血脑屏障的表面神经胶质细胞中高表达，抑制 EcI 可抑制中枢神经系统中的蜕皮激素信号传导，并在发育过程中阻断蜕皮激素介导的神经元发育 (Okamoto and Yamanaka 2020)，说明 EcI 介导类固醇激素进入中枢神经系统，改变血脑屏障类固醇激素的通透性，进而控制大脑的发育和行为。

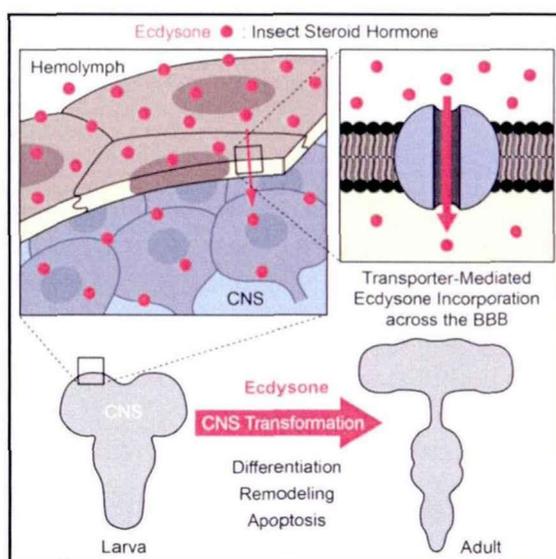


图 1.8 膜转运蛋白介导果蝇类固醇激素通过血脑屏障进入大脑 (Okamoto and Yamanaka 2020)。

Figure 1.8 Steroid hormone entry into the brain through blood-brain barrier requires a membrane transporter in *Drosophila* (Okamoto and Yamanaka 2020).

### 3 存在的科学问题, 研究方案和意义

全变态昆虫在变态发育期间, 幼虫停止进食, 经历游走期、静止期和蛹期, 最后羽化为成虫。昆虫蜕皮激素上调 20E 途径基因的表达 (Riddiford et al. 2003) 以及拮抗保幼激素和胰岛素的作用促进变态发育。然而, 幼虫停止取食的调节机制尚不清楚。20E 属于类固醇激素, 经典理论认为 20E 可以自由扩散进出细胞, 与核受体结合形成转录复合体, 调控基因表达, 促进变态发育。但新的研究表明 20E 可以通过细胞膜上的 GPCR 传递信号, 调控核受体的功能, 从而调控基因表达和昆虫变态发育。有报道认为多巴胺受体 DopEcR 是果蝇的 20E 受体 (Srivastava et al. 2005), 但多种参与 20E 信号的 GPCRs 是否是类固醇激素的细胞膜受体尚不确定。多巴胺与其受体结合调节重要的奖励动机行为, 包括进食 (Coccorello and Maccarrone 2018) 和奖励诱导的人类饮食行为 (Rebello and Greenway 2016), 多巴胺受体结合 20E 导致何种下游效应知之甚少。

动物类固醇激素是脂类激素, 它们通过细胞膜的自由扩散进出细胞 (Gorski and Gannon 1976; Plagemann and Erbe 1976)。但是最近研究表明类固醇激素需要转运蛋白才能进出细胞 (Yamanaka et al. 2015; Okamoto et al. 2018)。GPCR 最初认为是以单体形式发挥功能, 但是越来越多的研究表明 GPCR 可以以同源或异源多聚体的形式发挥着不同的作用。目前这两部分研究存在着很大的争议, 亟需进一步的研究阐明其中的作用机制。

本研究以重要农业害虫棉铃虫作为研究对象, 结合本实验室建立的棉铃虫表皮细胞系 HaEpi 以及 Sf9 细胞系, 利用各种分子生物学和细胞生物学技术, 通过体内和体外实验, 激素刺激与 RNA 干扰, 从基因、蛋白和翻译后修饰水平探究 20E 通过 DopEcR 抑制幼虫取食的分子机制, 建立 20E-EIA 检测 GPCR 结合 20E 的方法, 揭示 20E 与 DA 竞争结合 DopEcR 以抑制取食, 并使 DopEcR 作为其膜受体之一传递 20E 信号, 促进昆虫变态。丰富类固醇激素信号途径及其与神经系统互作的新理论, 为害虫控制提供新的生长调节剂的研制靶点。此外, 探究 20E 调控 GPCR 多聚化现象的机制以及探索类固醇激素进出细胞的新途径, 可以更好地解释多种 GPCRs 共同参与 20E 信号途径的转导, 20E 以及 GPCRs 在虫体时空组织上的差异, 为不同 20E 浓度导致不同的组织细胞命运提供新的理论支持, 并且提供新的证据来支持类固醇激素的易化扩散机制。

## 第二章 蜕皮激素竞争结合多巴胺/蜕皮激素受体抑制鳞翅目 昆虫取食并促进化蛹的研究

### 1 引言

完全变态昆虫的胚后发育涉及幼虫、蛹和成虫阶段。从最后一龄幼虫到成虫的转变称为变态。在变态期间，幼虫停止进食，经历游走期，静止期和蛹期，最后羽化为成虫。昆虫蜕皮激素 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E) 通过上调 20E 途径基因表达 (Riddiford et al. 2003) 以及拮抗保幼激素 (Dubrovsky 2005) 和胰岛素 (Lin and Smaghe 2018) 的作用促进变态发育。然而，幼虫停止进食的调节机制尚不清楚。

20E 通过与其核受体蜕皮激素受体 B1 (EcRB1) 结合而启动下游基因表达，EcRB1 与超气门蛋白 (USP1) 形成转录复合体并与蜕皮激素响应元件 (EcRE) 结合 (Lan et al. 1999)。哺乳动物雌激素可以通过核受体 (EcR) 传递信号 (Gruber et al. 2002)，20E 可以通过 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 诱导信号转导。在家蚕中，20E 通过未知的 GPCR 增加了前丝腺中细胞内  $Ca^{2+}$  的水平 (Manaboon et al. 2009)，并激活蛋白激酶 C (PKC) 途径 (Elmogly et al. 2004)。在棉铃虫中，ErGPCR-1 (Cai et al. 2014a) 和 ErGPCR-2 (Wang et al. 2015) 在细胞膜上传递 20E 信号。20E 通过 GPCR，磷脂酶 C (PLC) 和钙信号通路调节蛋白磷酸化，包括 USP1 (Liu et al. 2014b)，细胞周期蛋白依赖性激酶 10 (CDK10) (Liu et al. 2014a) 和 PKAC1 的催化结构域 (Jing et al. 2016)，进而形成 20E 转录复合体 EcRB1/USP1，并在昆虫变态过程中起始 20E 途径基因的表达 (Liu et al. 2014b; Jing et al. 2015)。

GPCRs 在细胞膜上传递各种信号，包括离子，光，胺，气味，脂质，肽，氨基酸和核苷酸等 (Preininger et al. 2013)。但是，因为缺乏 GPCR 与类固醇激素结合的直接证据，GPCR 是否为 20E 或其他类固醇激素的细胞膜受体仍存在争议。例如，使用过表达 GPR30 的 COS7 细胞分析了人 GPER (GPR30) (Maggiolini and Picard 2010) 与 Alexa 633 标记的雌激素的结合 (Revankar et al. 2005)。使用过表达 DmDopEcR 的 Sf9 细胞的细胞膜分析了果蝇多巴胺受体 (DmDopEcR) 与 20E 类似物  $^3H$  标记的 Ponasterone A ( $[^3H]$  Pon A) 的结合 (Srivastava et al. 2005)。迄今为止，尚无直接证据表明分离的 GPCR 可在体外结合类固醇激素。

多巴胺受体是典型的 GPCR，定位于细胞膜 (Neve et al. 2004)。在脊椎动物中，多巴胺受体主要在中枢神经系统 (CNS) 中表达，并分布在非 CNS 组织中，例如心

脏的心外膜(Cavallotti et al. 2010)和肾脏中的肾单位(Hussain and Lokhandwala 2003)。多巴胺受体参与许多神经系统过程,包括动机,愉悦,认知,记忆,学习,奖励和精细运动控制,以及神经内分泌信号的调节(Girault and Greengard 2004)。多巴胺与其受体结合调节重要的奖励动机行为,包括进食(Coccurello and Maccarrone 2018)和奖励诱导的人类饮食行为(Rebello and Greenway 2016)。多巴胺神经元的丧失会导致帕金森病,而过度活跃的多巴胺能信号可能是精神分裂症阳性症状的主要因素(Boyd and Mailman 2012)。但是,多巴胺受体的诱导调控机制尚未完全了解。

在昆虫中,注射多巴胺会引发东亚飞蝗的群居行为(Ma et al. 2011)。多巴胺受体调节东亚飞蝗脑的型变,其中多巴胺受体 1 诱导形成群居型,多巴胺受体 2 诱导形成散居型(Guo et al. 2015)。DmDopEcR 介导左旋多巴引起的糖敏感性的升高(Inagaki et al. 2012)。果蝇蘑菇体(MB)中 DopEcR 功能的降低导致运动活性降低(Lark et al. 2017)。DmDopEcR 需要蜕皮激素和多巴胺作为配体来调节性信息素的感知(Ishimoto et al. 2013; Abrieux et al. 2014)。Sf9 细胞过表达的 DmDopEcR 会结合多巴胺(DA)或 $[^3\text{H}]$  PonA。20E 可以与 $[^3\text{H}]$  Pon A 竞争结合 DmDopEcR; 因此, DmDopEcR 被认为是 20E 的细胞膜受体(Srivastava et al. 2005)。然而,昆虫中多巴胺受体的功能知之甚少。

本章中,研究表明 DopEcR 在昆虫取食和化蛹中起双重作用。DA 通过 DopEcR 促进细胞增殖来调节幼虫的进食和生长。20E 与 DA 竞争结合 DopEcR,并通过 DopEcR 作为细胞膜受体之一来传递 20E 信号,从而促进昆虫变态。DopEcR 可以在细胞膜中和体外结合 20E。阐明了 20E 抑制鳞翅目昆虫取食并促进变态发育的分子机制;证明了 GPCR 是 20E 的细胞膜受体;揭示了类固醇激素与多巴胺系统的互作。本研究为类固醇激素信号途径及其与神经系统互作提供了新的理论,为害虫控制提供了新的生长调节剂的研制靶点。

## 2 实验材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 实验动物

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 来自河南农业大学,以人工饲料在实验室进行饲养,光照周期 14 h 光照/10 h 黑暗,温度  $26\pm 1^\circ\text{C}$ ,湿度  $50\%\pm 10\%$ 。

#### 2.1.2 实验细胞

棉铃虫表皮细胞系(HaEpi)(Shao et al. 2008)在含有 10%胎牛血清(FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, 美国)的昆虫细胞培养基中进行静置培养。培养箱温度

为 27°C。Sf9 细胞系 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, 美国) 在无血清的 ESF921 培养基 (Expression Systems LLC, 美国加利福尼亚州戴维斯) 中于 27°C 培养。

### 2.1.3 实验试剂

20-羟基蜕皮酮 (20E) (Caymanchem, 密歇根州, 美国), 多巴胺 DA、氨苄青霉素、硫酸卡那霉素 (生工生物, 上海, 中国), DMSO (索莱宝, 北京, 中国), 昆虫细胞培养基 (Gibico, 纽约, 美国),  $\text{Ca}^{2+}$  指示剂 acetoxymethyl (AM) ester calcium crimson dye (Invitrogen, 卡尔斯巴德, 美国),  $\text{Ni}^{2+}$  柱 (GE Healthcare, 匹兹堡, 宾夕法尼亚, 美国), Alexa Fluor 594 标记的小麦胚芽凝集素 (WGA) (Invitrogen, 卡尔斯巴德, 美国), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)、弗氏佐剂、Flupentixol 均购自美国西格玛公司, 其他常用试剂均是购自国药的分析纯试剂。TRIzol RNA 提取试剂 (全式金, 北京, 中国), 荧光定量 2×SYBR real-time PCR pre-mixture (全式金, 北京, 中国), RIPA 裂解液 (碧云天, 北京, 中国), DNA 聚合酶 (全式金, 北京, 中国), T7 RNA 聚合酶、RNA 酶抑制剂、NTPs (Thermo Fisher Scientific, 德克萨斯, 美国), 质粒和 dsRNA 转染试剂 QuickShuttle-enhanced (博奥龙, 北京, 中国),  $\lambda$ -磷酸酶和 T4 DNA 连接酶 (New England Biolabs, 英国)。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠和羊抗兔 IgG, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔或抗鼠 IgG (中杉, 北京, 中国), 羊抗兔荧光二抗 ALEX488 (Invitrogen, 卡尔斯巴德, 美国),  $\beta$ -actin 多克隆抗体 (Cat. AC026, ABclonal, 武汉, 中国), His/GFP/RFP 单克隆抗体 (Cat. AE003/AE012/AE020, ABclonal, 武汉, 中国)。NucView™ Caspase-3 assay kit (Biotium, Hayward, 美国), 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) kit (Ribobio, 广州, 中国), 染色质免疫共沉淀试剂盒 ChIP assay kit (碧云天, 北京, 中国), 20-Hydroxycdysone Enzyme Immunoassay kit (20E-EIA kit, 20E 酶联免疫分析试剂盒) (贝尔坦制药, 法国), TUNEL 亮红细胞凋亡检测试剂盒 (Vazyme Biotech Co., 南京, 中国), cAMP ELISA 试剂盒 (博奥龙, 北京, 中国)。引物合成 (生工生物, 上海, 中国)。

### 2.1.4 实验仪器

电泳仪 (六一仪器, 北京), 微量分光光度计 (凯奥, 北京), 蛋白电泳槽, PCR 仪, Gel Doc XR 凝胶成像仪与荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国), 高速冷冻离心机 (Eppendorf, 德国)。Infinite M200PRO NanoQuant 分光光度计 (Tecan, Grödig, 奥地利), Olympus BX51 荧光显微镜 (奥林巴斯, 日本), Nikon ECLIPSE E6000/TS100 倒置荧光显微镜 (尼康, 日本), Zeiss 700 倒置激光共聚焦显微镜 (蔡司, 德国)。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 基因克隆及生物信息学分析

从棉铃虫转录组库中获得 DopEcR 的全长序列,设计基因的上下游引物 DopEcR-F 和 DopEcR-R (表 2.1),通过 PCR 扩增 DopEcR 全长,测序验证。ExPASy-translate tool(<http://web.expasy.org/translate/>)确定 DopEcR 的开放阅读框(ORF)序列。SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白质的结构域。MEGA 7.0 软件进行蛋白质序列比对并构建系统进化树。

### 2.2.2 RNA 提取

体视显微镜下解剖分离出棉铃虫表皮,中肠,脂肪体和脑并用 1×PBS (140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 洗涤干净,分别取 50 mg,在含 1 mL TRIzol 的研磨器中冰上充分研磨,12,000 rpm 冷冻离心 10 min,收集上清至干净 EP 管中室温放置 5 min。细胞培养板用 1×PBS 洗涤细胞一次,每孔加入 1 mL TRIzol 反复吹打裂解细胞,转移至无 RNAase 的 EP 管中。然后加入 200 μL 的氯仿,剧烈震荡 10 s,室温静置 2 min,12,000 rpm,冷冻离心 15 min。上层水相转移至新的无 RNase 的 EP 管中,加入等体积的异丙醇混匀,-20°C 沉淀过夜。然后 12,000 rpm 冷冻离心 10 min,弃上清。用 1 mL DEPC 水配置的 75%乙醇洗 RNA 沉淀两次,离心后弃上清,风干后加入适量 DEPC 水 60°C 水浴 10 min 溶解 RNA, RNA 的浓度用 Infinite M200PRO NanoQuant 分光光度计检测, RNA 质量和纯度用 1%琼脂糖电泳检测。

### 2.2.3 反转录 cDNA 的合成

根据 Abm 公司生产的 5×All-In-One RT MasterMix 反转录试剂盒进行反转录 cDNA。反应体系如下:

RNA	2 μg
AccuRT Reaction Mix (4×)	2 μL
无 RNase 的水	加至 8 μL
AccuRT Reaction Stopper (5×)	2 μL
混合均匀 42°C 孵育 2 min	
5×All-In-One RT MasterMix	4 μL
无 RNase 的水	6 μL

25°C 孵育 10 min, 42°C 孵育 30 min, 85°C 孵育 5 min。-20°C 保存。

### 2.2.4 qRT-PCR (实时定量 PCR)

以反转录的 cDNA 为模板, RT 引物见表 2.1, 避光操作, 实时定量荧光 PCR 反应体系如下:

cDNA	2 $\mu$ L
F 引物 (1 $\mu$ M)	4 $\mu$ L
R 引物 (1 $\mu$ M)	4 $\mu$ L
2 $\times$ SYBR real-time PCR pre-mixture	10 $\mu$ L
总体积	20 $\mu$ L

qRT-PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 15 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 78 $^{\circ}$ C 读板 2 s, 循环 40 次; 65 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C 分析熔解曲线, 间隔 0.5 $^{\circ}$ C。获得 Ct 值, 相对 mRNA 的表达水平用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行计算。  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}})}$ ,  $\Delta Ct_{\text{实验组}}$  表示试验组中基因的 Ct 平均值-内参基因  $\beta$ -actin 的 Ct 平均值。  $\Delta Ct_{\text{对照组}}$  表示对照组中基因的 Ct 平均值-内参基因  $\beta$ -actin 的 Ct 平均值。

### 2.2.5 多克隆抗体的制备

*DopEcR* 的 cDNA 片段 (148 bp 至 1,020 bp 的核苷酸序列, 编码 290 个氨基酸) 与 pET-30a 连接构建重组质粒并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达。重组的 DopEcR 蛋白形成包涵体, 通过 12.5% SDS-PAGE 纯化。从凝胶上切下重组 DopEcR 蛋白, 充分研磨所切凝胶。将 500  $\mu$ g 纯化后的目的蛋白凝胶条与等体积的完全弗氏佐剂充分研磨成油包水状, 对健康的新西兰白兔进行皮下多点注射, 21 天后将 500  $\mu$ g 纯化后的目的蛋白凝胶条与等量的不完全弗氏佐剂充分研磨成油包水状, 对同一只白兔进行皮下多点注射, 两周后进行相同的操作, 一周后耳缘静脉注射 500  $\mu$ g 重组蛋白, 一周后取兔血制备兔多克隆抗血清。以前血清作对照, 免疫印迹进行抗体特异性检测。

### 2.2.6 过表达质粒的构建与细胞系过表达

将不同基因的 ORF 序列插入到带有 IE 启动子的过表达质粒 pIEx-4-GFP/RFP-His 中构建不同基因的过表达质粒。过表达引物见表 2.1。通过过表达或测序验证构建的质粒。待六孔板的细胞密度达到 80% 时进行转染。3-5  $\mu$ g 过表达质粒与 100  $\mu$ L 生理盐水混匀成 A, 8  $\mu$ L 转染试剂与 100  $\mu$ L 生理盐水混匀成 B, A 和 B 混匀在同一 EP 管中, 加入到六孔板中的昆虫细胞培养液中, 48 h 后荧光显微镜观察荧光检测过表达效率。

### 2.2.7 蛋白提取

解剖分离幼虫表皮, 中肠, 脂肪体和脑各 100 mg, 分别在 500  $\mu$ L Tris-HCl 缓冲液 (40 mM, pH 7.5, 含 1 mM 的 PMSF) 中冰上匀浆, 12,000 rpm 离心 10-15 min, 收集上清液即为组织总蛋白。细胞蛋白提取时先用 1 $\times$ PBS 洗涤细胞一次, 加入 1 mL 1 $\times$ PBS (含 1 mM 的 PMSF) 收集细胞至 EP 管中。然后 4,000 rpm 2 min 冷冻离心, 去上清获取细胞, 加入 100  $\mu$ L 的 RIPA 裂解液冰上裂解 10 min, 12,000 rpm, 15 min 冷冻离心, 上清即为细胞总蛋白。蛋白质浓度通过 Bradford 蛋白质测定法测量 (Bradford 1976)。

### 2.2.8 蛋白质免疫印记

获取的蛋白中加入蛋白质处理液煮沸 10 min, 每个样品取 20  $\mu$ g 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 将 SDS-PAGE 凝胶转移到硝酸纤维素膜上。转完后的硝酸纤维素膜用 2-5% 的脱脂奶粉室温下封闭 1 h。脱脂奶粉用 TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) 溶解。倒掉封闭液, 将膜在封闭液中与一抗在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。TBST (TBS 中加入 0.02% Tween) 洗涤 3 次, 每次 10 min 后, 用含有碱性磷酸酶标记的羊抗兔或抗鼠的二抗 IgG 1:5,000 稀释后的封闭液室温孵育 3 h。倒掉孵育液用 TBST 洗两次, TBS 洗一次, 每次 5 min, 最后用 45  $\mu$ L NBT 和 35  $\mu$ L BCIP 在 10 mL TBS 中黑暗条件下发色, 发色结束后用去离子水洗涤终止发色, 并通过 Photoshop 软件制作图像。膜上的条带通过 ImageJ 软件计算并通过 GraphPad Prism 7 软件分析获得的数据。

### 2.2.9 免疫共沉淀 Co-IP

待细胞密度达到 80% 时共转染相应的过表达质粒。48 h 后, 用 2  $\mu$ M 20E 或 DMSO 处理细胞。随后用 1 mL RIPA 裂解液裂解细胞蛋白, 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 取上清。500  $\mu$ L RIPA 裂解液清洗 Protein A resin 两次, 在裂解液上清中加入 Protein A resin 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇晃 1 h, 1,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min 去除非特异性结合的蛋白, 取 100  $\mu$ L 上清作为 Input。上清与 GFP/RFP/His 单克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 然后加入到 50  $\mu$ L Protein A resin 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇晃孵育 2 h。1,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 2 min, 去上清, 沉淀用 RIPA 裂解液洗 3 次, 12,000 rpm, 2 min 离心弃上清。非特异性小鼠 IgG 作为阴性对照。最后用 60  $\mu$ L 裂解液悬起沉淀, 加入 30  $\mu$ L 蛋白处理液混匀并煮沸 10 min。然后通过 SDS-PAGE 和蛋白质免疫印记检测目的蛋白。

### 2.2.10 染色质免疫共沉淀 ChIP

将 EcRB1 的 ORF (GenBank 登录号 EU526831) 插入 pIEx-4-RFP-His 质粒中。

将 pIEx-4-EcRB1-RFP-His 质粒转染到 HaEpi 细胞中 48 h, 然后 *dsDopEcR* 或 *dsGFP* 转染细胞 24 h, 最后用 20E 或 DMSO 处理细胞 3 h。细胞 37°C 下 1% 甲醛交联 10 min, 然后添加甘氨酸至终浓度 0.125 M 25°C 10 min 以终止交联。PBS 洗涤细胞两次, 然后 SDS 裂解缓冲液 (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.1) 悬浮收集细胞。超声处理获得 200–1,000 bp 的 DNA 片段。离心后, 上清添加到 Protein A resin 中 4°C 下缓慢摇晃孵育 1 h, 以除去非特异性结合。离心后, 取一部分上清液用作 qRT-PCR 的 Input。将其他上清液与 RFP 单克隆抗体或小鼠 IgG 作为阴性对照在 4°C 孵育过夜。将 Protein A resin 添加到免疫沉淀的蛋白-DNA 复合物中, 并在 4°C 下旋转孵育 2 h。用低盐洗涤缓冲液 (0.1% SDS, 1.0% Triton X-100, 2 mM EDTA, 200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl) 洗涤复合物一次, 高盐洗涤缓冲液 (0.1% SDS, 1.0% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl) 洗涤一次, LiCl 洗涤缓冲液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.1), 0.25 M LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% 脱氧胆酸盐) 和 TE 缓冲液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.1), 1 mM EDTA) 两次。然后用洗脱缓冲液 (1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>) 洗涤复合物。DNA-蛋白在 65°C 过夜进行反向交联, 然后 RNase A 和蛋白酶 K 处理。通过苯酚/氯仿抽提纯化 DNA, 并使用 ChIP F/ChIP R (表 2.1) 引物 (靶向 EcRE) 通过 qRT-PCR 进行分析。

### 2.2.11 虫体激素诱导

将 20E 溶解在 DMSO 中, 以制备 10 mg/mL 的储备溶液。用 PBS 以 1: 100 稀释 20E 储备溶液作为 20E 工作溶液。选择第六龄 6 h 幼虫并以每个幼虫 500 ng/5  $\mu$ L 的剂量注射 20E。将等量的 DMSO 注射到与对照相同阶段的幼虫中。注射 20E 或 DMSO 后, 幼虫分别在 1、3、6、12 和 24 h 提取总 mRNA 或蛋白质用于 qRT-PCR 或蛋白质印迹。用 GraphPad 软件分析 qRT-PCR 的数据。用 ImageJ 软件计算蛋白质印迹带, 并用 GraphPad 软件分析获得的数据。

### 2.2.12 HE 染色

中肠和脂肪体组织洗涤干净, 于 4% 的多聚甲醛黑暗下 4°C 固定过夜; 然后进行梯度脱水: 50%乙醇-70%乙醇-80%乙醇-95%乙醇-100%乙醇-100%乙醇, 各 30 min; 乙醇: 二甲苯 1: 1 混合液 2 h, 二甲苯 1.5 h 两次进行透明处理; 组织在石蜡: 二甲苯 1: 1 混合液中 52°C 浸泡 40 min, 52°C 石蜡 30 min 两次; 然后于 45-60°C 的烫板上把组织放入融化好的石蜡中进行组织包埋。使用切片机把蜡块切成 7  $\mu$ m 厚度的切片然后进行脱蜡处理: 二甲苯 20 min-二甲苯 20 min-无水乙醇 10 min-95%乙醇 10 min-85%乙醇 10 min-70%乙醇 10 min-50%乙醇 10 min-PBS 10 min。复水的组织

切片用苏木精（1 g 苏木精，10 mL 乙醇，20 g  $KAl(SO_4)_2$  和 200 mL  $H_2O$ ）染色 10 min；将切片用流水洗涤 1 min，然后用 Scott 的液体染色 1 min；将切片用盐酸乙醇分化液（70%的乙醇在 1%的盐酸中）洗涤 20 s，并用 Scott 液体染色 1 min；将切片与 0.5%水溶性伊红染料溶液孵育 30 s，然后用流水洗涤；80%的甘油封片，短期保存于 4°C，使用 Olympus BX51 荧光显微镜（Olympus Optical Co., 东京，日本）观察图像。

### 2.2.13 免疫细胞荧光化学

将 HaEpi 细胞用 500  $\mu$ L DPBS 洗涤 3 次，4%多聚甲醛黑暗下固定 10 min。固定的细胞 DPBS 洗涤六次，每次 3 min，0.2%Triton X-100 处理 15 min。DPBS 洗涤六次，每次 3 min，封闭液（含有 2%BSA 的 PBS）孵育 1 h。抗体和封闭液按 1: 1,000 稀释后，在 4°C 下孵育细胞过夜。DPBS 洗涤六次，每次 3 min，山羊抗兔 IgG Alexa Fluor 488（Introvigen, Carlsbad, CA, USA）和封闭液以 1: 1,000 的稀释比配置溶液在 37°C 下黑暗孵育细胞 1 h。DPBS 洗涤 3 次，每次 5 min。200  $\mu$ L Alexa Fluor 594 偶联的 WGA 溶液（WGA: PBS 为 1: 2, 000）室温黑暗中进行细胞质膜染色 10 min。DPBS 洗涤 3 次，每次 5 min，1  $\mu$ g/mL DAPI 溶液室温黑暗中进行细胞核染色。DPBS 洗涤 3 次，每次 5 min。80%的甘油封片，短期保存于 4°C，使用 Olympus BX51 荧光显微镜（Olympus Optical Co., 东京，日本）观察图像。

### 2.2.14 *dsRNA* 的合成

RNAi 被广泛应用于夜蛾科 10 个属 25 个物种中（Xu et al. 2016）。5'端带有 T7 启动子序列的引物从 cDNA 中扩增靶基因片段（表 2.1）。以带有 T7 启动子的靶基因片段为模板，合成 *dsRNA*。合成过程如下：将 1  $\mu$ g cDNA 模板与 20  $\mu$ L 5 $\times$ 转录缓冲液混合，该缓冲液包含 80 U T7 RNA 聚合酶（Fermentas），2.4  $\mu$ L 10 mM A/U/C/GTP（Fermentas）和 120 U RNasin（TaKaRa）。加入无 RNase 的水至 50  $\mu$ L，37°C 孵育过夜后，加入 10  $\mu$ L 40 U 无 RNase 的 DNase I，10  $\mu$ L DNAase I Buffer 和 30  $\mu$ L 无 RNase 的水，并将溶液在 37°C 孵育 60 min 降解 DNA 模板，用苯酚/氯仿萃取 RNA 并用乙醇沉淀后，用 50  $\mu$ L 无 RNase 水溶解 *dsRNA*。使用琼脂糖凝胶电泳检测 *dsRNA* 的纯度和完整性。用微量分光光度计对 *dsRNA* 进行浓度检测。

### 2.2.15 喂食大肠杆菌（HT115/DE3）对幼虫进行 RNA 干扰

根据之前的文章方法进行饲喂 RNAi（Dong et al. 2012）。干扰引物（HaDopEcR-swRNAiF/HaDopEcR-swRNAiR）（表 2.1）用于目标片段的 PCR 扩增。将目标片段插入由 Marek Jindra 博士（捷克共和国生物学中心 ASCR）提供的 pPD129.36(L4440)

载体中。将重组载体转化到 DH5 $\alpha$  中，并用氨苄青霉素 (Amp, 25 mg/mL) 筛选阳性克隆。重组质粒被转化到由 Marek Jindra 博士 (捷克共和国生物学中心 ASCR) 提供的 HT115 中。用 50  $\mu$ L Amp (25 mg/mL) 和 6.25  $\mu$ L 四环素 (Tet, 25 mg/mL) 筛选阳性克隆，然后接种到 5 mL LB 液体培养基 (酵母提取物 0.5 g, 胰蛋白 1 g, NaCl 1 g, ddH<sub>2</sub>O 100 mL, pH 7.4)，在 37°C 培养箱中振荡过夜。过夜菌株以 1: 100 的体积接种到 100 mL LB 液体培养基中，37°C 培养箱中摇动 3 h 左右，在培养基中加入异丙基  $\beta$ -D-1-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG, 0.5 mM)，37°C 培养箱中摇动培养 4 h。提取细菌 RNA，并通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 *dsRNA* 的表达。将剩余的细菌悬浮在 400  $\mu$ L PBS 中。选择两组棉铃虫，每组 30 只。棉铃虫食物切成 1 cm $\times$ 1 cm $\times$ 0.2 cm，将具有 *dsDopEcR* 的新鲜 HT115 涂抹到饲料表面。每天为幼虫喂食新鲜的 HT115 直到幼虫停止取食。对照组喂饲等量 *dsGFP* HT115 的饲料。从第 6 龄 72 h 的表皮，中肠，头部和脂肪体中提取总 RNA 和蛋白。通过 qRT-PCR 或蛋白质印迹检测干扰效率。

#### 2.2.16 虫体 RNA 干扰

用 PBS 将 *dsRNA* 稀释至 100 ng/ $\mu$ L。取 6 龄 6 h 幼虫置于冰上 15 min，将 500 ng *dsRNA* 用无菌微注射器从第 3 节腹足由后向前注入幼虫血腔中。*dsRNA* 每间隔 24 h 注射一次。在第三次注射中，将 500 ng 20E 和 500 ng *dsRNA* 一起注射到幼虫体内。自第一次 *dsRNA* 注射后，定期观察昆虫的形态和行为。

#### 2.2.17 细胞系 RNA 干扰

当 HaEpi 细胞密度达到 70% 至 80% 时，在昆虫细胞培养基中分别用 2-4  $\mu$ g *dsRNA* 和 5-8  $\mu$ L QuickShuttle-enhanced 转染试剂进行细胞转染。然后将细胞在 27°C 下培养 48 h。2  $\mu$ M 20E 孵育细胞 12 h，等体积的 DMSO 作为对照。

#### 2.2.18 幼虫摄食，体重和体长的测定

一龄幼虫 1-F 到蛹的第二天 P2 期间每天定时测量幼虫平均进食量，体重和体长，每个处理包含 30 只幼虫并进行 3 次重复。实际进食量通过每天称量饲料重量的差异来估算。使用相同的方法分析 20E 和 flupentixol 处理后幼虫的食物消耗和体重增加。

#### 2.2.19 检测 20E 和多巴胺滴度

收集三个以上处于不同发育阶段的幼虫，蛹和成虫并进行称重，冷冻干燥 16 h。4°C 下 80% 的甲醇充分研磨幼虫，蛹或成虫，1 mL 甲醇提取 1 g 组织中的 20E。4°C 10,000 $\times$ g 离心 10 min，收集上清液并冷冻干燥。沉淀溶解在 1 mL EIA 缓冲液中并稀释 1,000 倍。根据说明书和操作手册，使用 20E 酶联免疫分析 (20E-EIA) 试剂盒

(Bertin Pharma, 法国) 取 50  $\mu\text{L}$  样品用于检测 20E 含量。

取幼虫, 蛹或成虫的血淋巴立即分别转移到装有 0.1 mM 苯硫脲 (PTU) 的 1.5 mL EP 管中。4°C 20,000 g 离心 10 min。根据说明书和操作手册, 使用昆虫血淋巴多巴胺 ELISA 试剂盒 (MLBIO Biotechnology, 上海, 中国) 检测上清液中 DA 的浓度。

### 2.2.20 TUNEL 分析

根据试剂盒说明书, 使用 TUNEL BrightRed 细胞凋亡检测试剂盒 (Vazyme Biotech Co., 中国南京) 进行 TUNEL 分析。使用 Olympus BX51 荧光显微镜 (Olympus Optical Co., 东京, 日本) 观察图像。用 ImageJ 计数红色荧光强度 (Tunnel 信号), 并通过 GraphPad 软件分析获取的数据。

### 2.2.21 细胞内钙离子浓度的检测

细胞密度达到 70-80% 后, 2  $\mu\text{g}$  *dsRNA* 或质粒进行细胞转染, 并在 27°C 下培养 24 h。用新鲜的培养基 (包含  $\text{Ca}^{2+}$  指示剂 AM 酯钙深红色染料, 终浓度 3  $\mu\text{M}$ ) 27°C 培养箱中孵育细胞 30 min。然后用 1×DPBS (2.7 mM KCl, 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 138 mM NaCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 洗涤细胞 3 次, 并在含有 1  $\mu\text{M}$  20E 的 DPBS 中处理 2 min, 以检测细胞内钙的释放。接下来, 加入含  $\text{CaCl}_2$  (终浓度为 1 mM) 和 20E (终浓度为 1  $\mu\text{M}$ ) 的 DPBS 以诱导细胞外钙内流, 处理 4 min。使用激光扫描共聚焦显微镜 Carl Zeiss LSM 700, 每 6 秒检测一次 555 nm 处的荧光。最后, 通过 Image Pro-Plus 软件分析每张照片的荧光强度, 并进行统计分析。

### 2.2.22 细胞内 cAMP 测定

HaEpi 细胞在 6 孔板中培养至 80% 密度。按照方法 2.2.20 进行 RNAi。用 DopEcR-GFP, DopEcR-M-GFP, GPCR2-GFP 和 GPCR2-M-GFP 转染 HaEpi 细胞 36 h。0.5 mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (Sigma, St.Louis, MO USA) 的 DPBS 孵育细胞 30 min。2  $\mu\text{M}$  20E 处理细胞 0、5、10、15、30、60 和 120 min; DMSO 处理的细胞作对照。除去培养基, 0.1 M HCl 处理, 根据试剂盒说明书使用 cAMP ELISA 试剂盒 (Biodragon, 北京, 中国) 检测细胞中 cAMP 的浓度。

### 2.2.23 检测细胞增殖和凋亡

用 5  $\mu\text{M}$  20E 或 10  $\mu\text{M}$  多巴胺 (DA) 处理 HaEpi 细胞 72 h。使用 5-乙炔基 2'-脱氧尿苷 (EdU) 试剂盒检测细胞增殖。使用 NucView 488 caspase-3 检测试剂盒检测 HaEpi 细胞中 caspase-3 的活性。用 DAPI (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 在室温黑暗中孵育细胞 10 min 进行细胞核染色, 然后用 Laser Scan 激光共聚焦显微镜 Carl Zeiss 700 (LSM 700)

观察。

### 2.2.24 GPCR 结构建模和配体对接

使用 I-TASSER 在线服务器 (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) 预测 GPCR 结合类固醇的分子模型。使用 SYBYL X2.0 软件 (Tripos) 中的 Surflex-Dock (SFXC) 功能将配体 20E 对接至 GPCR 的活性位点。结构图片通过 PyMOL 软件出示 (Seeliger and de Groot 2010)。

### 2.2.25 GPCR 的位点突变

在 I-TASSER 在线服务器 <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> 上在线预测 GPCR 结合位点 (表 2.2)。GFP, GPCR (ErGPCR-1, ErGPCR-2 和 DopEcR) 及其突变体 [ErGPCR-2-M: S113A, C138A, G142A; DopEcR-M: Y68A, Y109A, T113A, W160A] 用点突变引物通过桥式 PCR 方法进行扩增。通过 DNA 序列检验突变位点。

### 2.2.26 20-羟基蜕皮酮酶联免疫测定

20-羟基蜕皮酮酶联免疫分析 (20E-EIA) 是基于未标记的 20E (游离 20E) 和乙酰胆碱酯酶 (AChE) 标记的 20E (Tracer) 对有限的特异性 20E 抗体竞争的原理进行 20E 检测。兔抗 20E 抗血清与鼠抗兔抗体包被的平板结合。然后使用试剂盒附带的洗涤缓冲液 (800 mL UltraPure 水稀释 2 mL 浓缩的洗涤缓冲液 # A17000; 添加 400  $\mu$ L Tween20 # A12000) 洗涤板, 以除去所有未结合的试剂。将 AChE 标记的 20E 和样品中的 20E 加入孔中, 并将板在 4°C 下孵育过夜。用洗涤缓冲液洗涤 3 次后, 将 Ellman 试剂 (AChE 和色原的酶促底物) 添加到孔中, 室温孵育 1.5 h。AChE 标记的 20E 作用在 Ellman 试剂中的底物上, 形成黄色化合物, 可强烈吸收 414 nm 的光。通过分光光度法 (Infinite M200PRO NanoQuant, Tecan, Grödigg, 奥地利) 在 414 nm 处检测颜色的强度, 光密度与结合到孔的示踪剂的量成正比, 与样品中 20E 的量成反比。使用相同方法生成的 20E 标准曲线和 GPCR 结合的 20E 的量。

### 2.2.27 HaEpi 细胞膜结合 20E 滴度的检测

DopEcR-GFP, ErGPCR-1-GFP, ErGPCR-2-GFP 及其突变体 ErGPCR-2-M-GFP 和 DopEcR-M-GFP 分别在 HaEpi 细胞中过表达。细胞用 DPBS 洗涤两次后, 用含有 1  $\mu$ M 20E 的昆虫细胞培养基中于 27°C 孵育 5 min。4°C 1,700 $\times$ g 离心 5 min 收集细胞, 并用 500  $\mu$ L EIA 缓冲液将沉淀重悬并超声处理 5 min。4°C 48,000 $\times$ g 下离心 1 h 后, 将沉淀的细胞膜碎片重悬于 100  $\mu$ L EIA 缓冲液中。取 50  $\mu$ g 膜蛋白溶解于 50  $\mu$ L EIA 缓冲液中, 使用 20E 酶免疫分析试剂盒 (20E-EIA 试剂盒) 检测与细胞膜结合

的 20E。

### 2.2.28 GPCR 的分离与结合 20E 的检测

使用 pIEx-4-GFP-His 质粒, 在 Sf9 细胞中过表达 GPCR。细胞跨膜蛋白提取试剂盒 (BestBio, 上海) 提取总的质膜蛋白。用 charge buffer (50 mM NiSO<sub>4</sub>) 洗 100 μL Ni<sup>2+</sup>柱料 3 次, 然后用结合缓冲液 (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 5 mM 咪唑) 洗 3 次。过表达的 GPCR 蛋白结合在洗过的 Ni<sup>2+</sup>柱上。100 μL Ni<sup>2+</sup>柱料和含有质膜蛋白的结合缓冲液在旋转混合器上 26°C 下旋转孵育 40 min。然后, 用结合缓冲液洗涤 Ni<sup>2+</sup>柱料 3 次, 洗涤缓冲液 (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9) 洗涤 3 次, 每次 5 min。4°C 下 500×g 离心 1 min, 结合 GPCR 的 Ni<sup>2+</sup>柱料与 1 μM 20E 在 1 mL 结合缓冲液中孵育 5 min, 洗涤缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min。50 μL 洗脱缓冲液 (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9) 75 mM 咪唑) 洗脱 GPCR 和结合的 20E, 然后用 PBS 通过 Amicon Ultra-15 浓缩透析, 以降低咪唑的浓度, 用于后续实验。使用 Bradford 方法检测分离 GPCR 的浓度。取 5 μg 纯化蛋白溶解于 50 μL EIA buffer, 使用 20E-EIA 试剂盒进行检测。

### 2.2.29 GPCR 结合 20E 的饱和曲线

GPCR 和 GFP 在 Sf9 细胞中过表达, 并进行蛋白分离纯化。20E-EIA 用于结合 20E 饱和曲线分析。结合在 Ni<sup>2+</sup>柱料上的 GPCR 与含有 1 至 60 nM 20E 在 250 μL 结合缓冲液 (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA 和 1 mM EGTA) 中 26°C 孵育 40 min。洗涤缓冲液洗涤 GPCR 和 20E 结合的柱料 3 次, 每次 5 min, 最后在 50 μL 洗脱缓冲液 (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 75 mM 咪唑) 中洗脱。Amicon Ultra-15 对洗脱的蛋白质进行渗滤 3 次。通过 BCA 法检测蛋白质浓度。将 10 μg GPCR 及其结合的 20E 加入 EIA 缓冲液至 50 μL, 并使用 20E-EIA 试剂盒进行检测。通过 GraphPad Prism 7 分析得到解离常数 (K<sub>d</sub>)。

### 2.2.30 DopEcR 结合 DA 的饱和曲线及 20E 竞争结合曲线

ELISA 板 (MLBIO Biotechnology, 上海, 中国) 中每个小孔与 10 μg 分离纯化的 DopEcR-GFP 在 200 μL 包被缓冲液 (0.015 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.035 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6) 中 4°C 孵育过夜。酶标板用洗涤缓冲液 (0.15 M PBS, pH 7.4) 洗涤 3 次, 然后在 37°C 下与 200 μL 1% BSA 孵育 1 h。洗涤缓冲液洗涤 3 次, 在 200 μL PBS 中添加不同浓度的 DA, 测定 DA 的饱和曲线。其余实验根据昆虫血淋巴多巴 ELISA 试剂盒的说明进行。将结合 DopEcR-GFP 的 ELISA 平板与 20 pmol DA 孵育, 然后将递增浓度的 20E 或 DA 与平板孵育, 以研究 20E 对 DA 的竞争。

**表 2.1. PCR 引物**  
**Table 2.1 The PCR primer sequences used in this experiment**

Primer name	(5'→3') nucleotide sequence
<b>RNAi primers</b>	
DopEcR-RNAiF	gcgtaatacgaactcactataggggtgggtgccgctgtccgtat
DopEcR-RNAiR	gcgtaatacgaactcactataggtccgtgtcgaaattagcttc
DopEcR-swRNAiF	tactcaagatctgggtgccgctgtccgtat
DopEcR-swRNAiR	tactcaggtacctccgtgtcgaaattagcttc
GFP-RNAiF	gcgtaatacgaactcactataggtgggtcccaattctcgtggaac
GFP-RNAiR	gcgtaatacgaactcactataggttgaagtgacctgatgcc
GFP-swRNAiF	tactcagcggccgctgggtcccaattctcgtggaac
GFP-swRNAiR	tactcactcgagctgaagtgacctgatgcc
<b>qRT-PCR primers</b>	
DopEcR-QF	actacgtatgcttacaggcca
DopEcR-QR	tgagccagaactgacagaccat
HHR3-QRTR1	gactttgtgtatgaccctccgc
HHR3-QRTF1	tcaagcacctcaacagcagcccta
EcRB1-QRTF1	aattgcccgtcagtacga
EcRB1-QRTR1	tgagcttctcattgagga
USP1-QRTF1	ggtcctgacagcaatgtt
USP1-QRTR1	ttccagctccagctgactgaag
BrZ7F	ggtgactgtccttactgcggc
BrZ7R	ttaattccttgacctgact
RpL27F	acaggtatccccgaaagtgc
RpL27R	gtccttggcgtgaactctc
β-actinF	cctgttattctgacctgatgc
β-actinR	ctgttgaaggtggagagggaa
CHIP F	atattcgaatcgttggcg
CHIP R	cagtgaattaagagaca
<b>Expression</b>	
HaDopECR-expF	tactcagaattacatcattgcctcgtttctca
HaDopECR-expR	tactcactcgaactcgggttgacaggttct
<b>Overexpression</b>	
OV ErGPCR2-F*	tactcagagctcatgattacattcataacagtgc
OV ErGPCR2-R	tactcactgcagagctgtttgatgtgagcgc
OV ErGPCR1-F	tactcactgcagatgattacattcataaca
OV ErGPCR1-R	tactcaggtaccaaaatcgccattagctgt
OV DopEcR-F	tactcagagctcatgcctgccaagatgatgagc
OV DopEcR-R	tactcaagatctggctgtgtgtccagccgat
OV Gas-F	tactcagagctcatggagtgtcgtcatgtcgg
OV Gas-R	tactcactgcagtgctagattaaattccttga
OV Gas-F	tactcagagctcatggatgcttcggctcg
OV Gas-R	tactcaagatctggagcagctcgtactgccg

\*ErGPCR-1 的信号肽序列添加到 ErGPCR-2 的 7TM (氨基酸 359-757) 的前面, 以实现 ErGPCR-2 的 7TM 定位在细胞膜上。

\* The signal peptide sequence of ErGPCR-1 is added in front of 7TM (amino acids 359-757) of ErGPCR-2 to achieve the localization of ErGPCR-2 7TM on the cell membrane.

### 2.2.31 统计分析

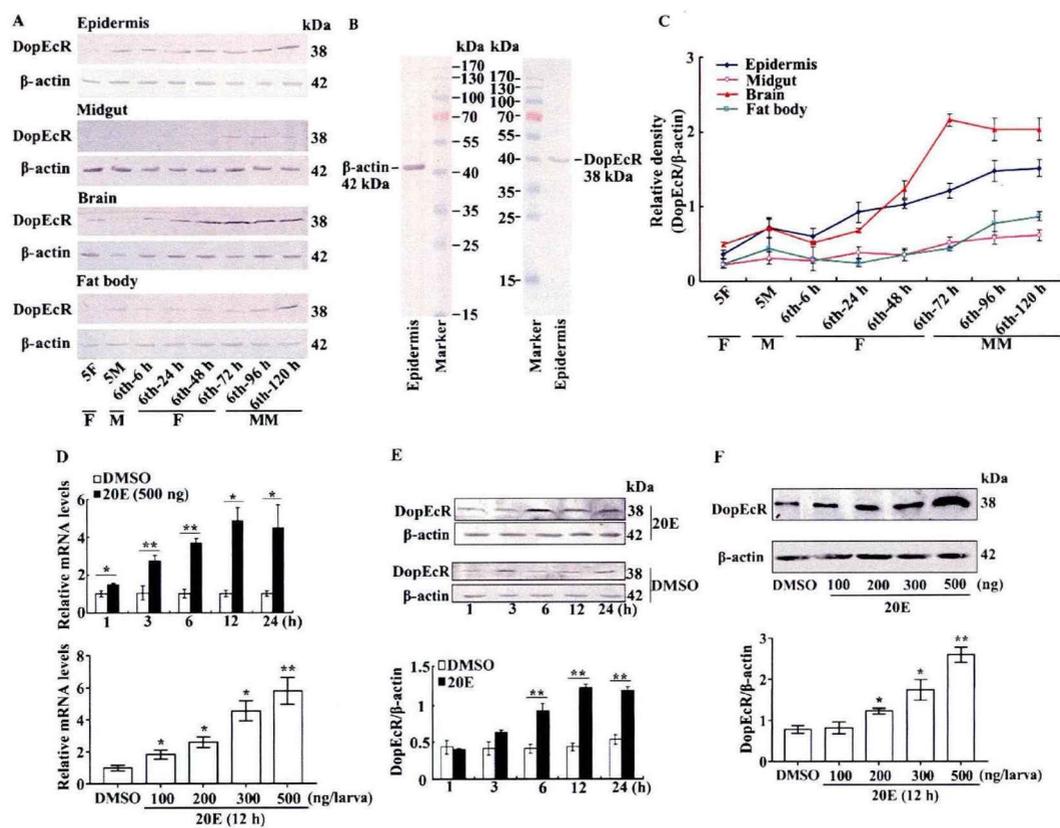
使用 SPSS 23.0 (SPSS Inc., 美国伊利诺伊州芝加哥) 进行数据分析。所有数据均来自至少三个生物学独立的实验。通过 *t* 检验分析了两组间的数据。单因素方差分析 (ANOVA) 用于分析三组或更多组之间的差异, 邓肯氏多重比较检验  $p = 0.05$ 。

\* $p < 0.05$  表示显著性差异, \*\* $p < 0.01$  表示极显著。

### 3 实验结果

#### 3.1 在 20E 调节下, DopEcR 在大脑中高表达

为了研究 DopEcR 在棉铃虫中的功能, 检测了 DopEcR 在各个组织中的发育表达模式。在大脑中检测到高水平的 DopEcR, DopEcR 的表达量从第六龄 (48 h 到 120 h) 的蜕皮变态阶段升高。此外, 在表皮, 中肠和脂肪体中也检测到 DopEcR, 并在蜕皮变态过程中高表达 (图 2.1A-C), 这表明 DopEcR 在棉铃虫大脑和其他组织中均起作用。



**图 2.1. 通过蛋白质印迹分析 DopEcR 的表达模式, 20E 上调了 DopEcR 的表达。(A)** DopEcR 抗体检测 DopEcR 的表达谱。β-actin 蛋白作对照。**(B)** Western 印迹检测 DopEcR 抗体和 β-actin 抗体的特异性。6th-72 h 幼虫的表皮蛋白为模板。Western blot 中的 SDS-PAGE 凝胶浓度为 12.5%。**(C)** 通过 ImageJ 量化分析 A 中的数据。误差线表示重复三次的平均值±标准偏差 (SD)。**(D)** qRT-PCR 分析 20E 以时间和剂量方式调节幼虫头部 *DopEcR* mRNA 水平。等体积的稀释 DMSO 为对照。通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算相对 mRNA 水平。**(E)** 和 **(F)** D 处理的蛋白质印迹分析, 20E 上调幼虫头部 DopEcR 的表达。SDS-PAGE 凝胶浓度为 12.5%。β-actin 蛋白作对照。通过 *t* 检验和 ImageJ 进行统计分析。误差线显示出三次重复的平均值±SD。*t* 检验显示出显著差异 (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )。

**Figure 2.1. Expression profiles of DopEcR by western blot analysis and 20E upregulates DopEcR expression. (A)** Expression profiles of DopEcR detected by anti-DopEcR antibody as the method description. β-actin as control. **(B)** Specificity analysis of the antibodies against DopEcR and β-actin by western blotting with epidermis protein of 6th-72 h larvae. SDS-PAGE gel in western 30

blot is 12.5%. (C) Quantification of the data in A by ImageJ. Error bars indicate the mean  $\pm$  standard deviations (SD) of three times repetition. (D) qRT-PCR analysis of 20E regulation on *DopEcR* mRNA in larval head by time and dose. Equal volume of diluted DMSO was injected as control. The relative mRNA level was counted by  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . (E) and (F) Western blot analysis of 20E regulation on *DopEcR* in larvae head as the treatment in D. SDS-PAGE gel in western blot is 12.5%.  $\beta$ -actin was detected as control. Statistical analysis by Student's *t* test and ImageJ. Error bars showed the mean  $\pm$  SD of three times repetition. Asterisks manifest significant differences by Student's *t* test (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

为了检查 20E 诱导对 *DopEcR* 表达的调节, 向六龄 6 h 的幼虫血腔中注射 20E。通过 qRT-PCR 分析表明, 20E 诱导是以时间和浓度依赖的方式上调了头部 *DopEcR* 的 mRNA 水平 (图 2.1D)。Western 印迹分析也得到了相似的结果 (图 2.1E 和 F)。这些结果表明 20E 上调 *DopEcR* 的表达。

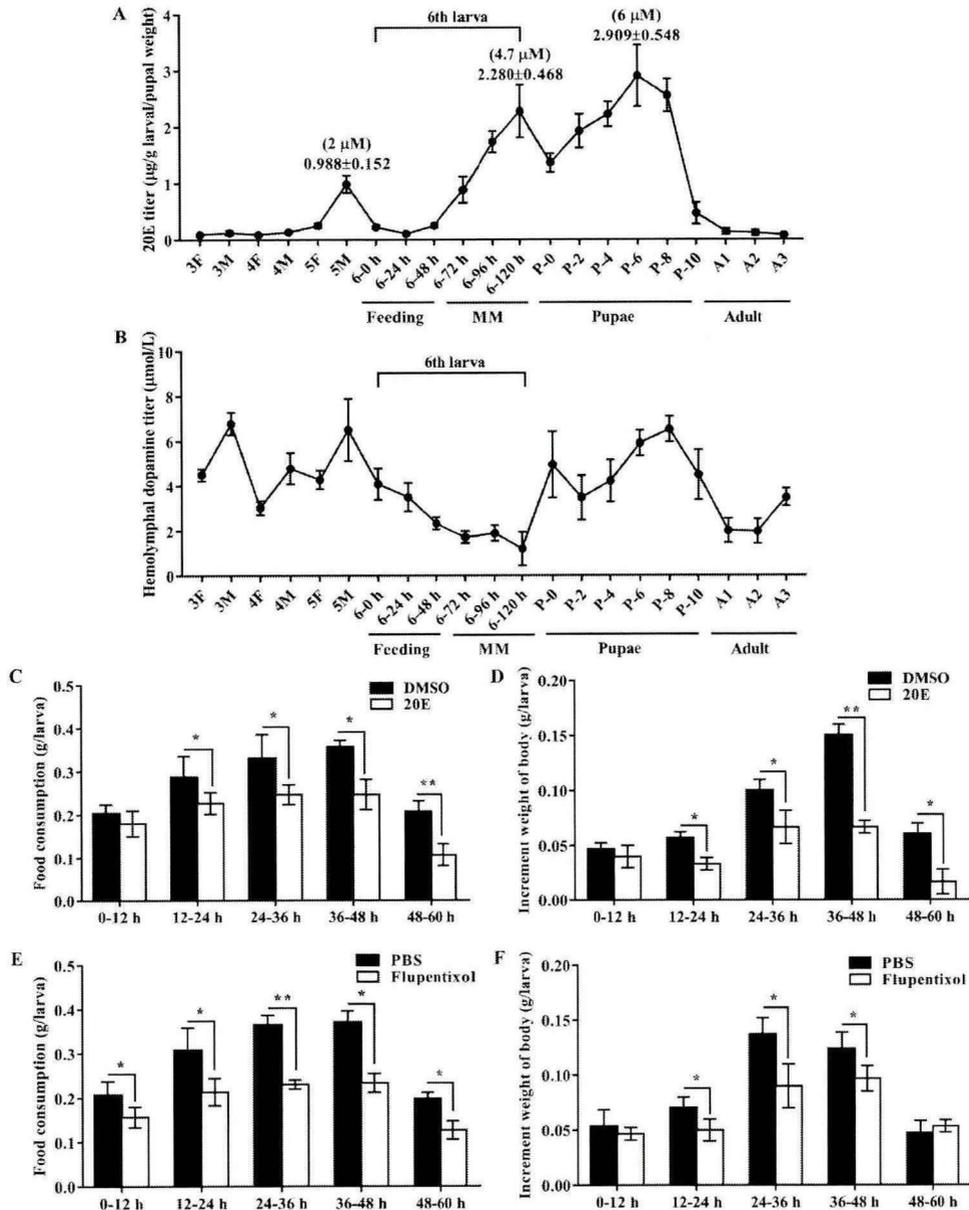
### 3.2 20E 抑制幼虫取食, DA 参与幼虫取食

为了明确 20E 和 DA 在幼虫发育中的作用, 分析了从三龄幼虫到成虫期间的整个虫体的 20E 滴度和血淋巴的 DA 滴度。结果表明, 早期幼虫的 20E 滴度较低, 然而, 从第 6 龄 72 h 到蛹后期, 20E 滴度明显增加。在蛹期检测到滴度峰值为  $6 \mu\text{M}$  ( $2.9 \mu\text{g/g}$  幼虫体重) (图 2.2A)。相比之下, 早期幼虫的 DA 滴度较高, 但是从 6 龄 0 h 到 120 h 逐渐下降 (图 2.2B), 表明 20E 和 DA 在变态, 摄食和生长中的功能相反。

为了研究 20E 对幼虫消耗食物的影响, 将  $500 \text{ ng}$  20E 注射到棉铃虫六龄 6 h 幼虫血腔中, 并定时监测食物的消耗和体重的增加。注射 20E 后 20 h 到 60 h 期间, 食物消耗量下降了 21% 到 30% (图 2.2C)。与 DMSO 处理的幼虫相比, 平均体重的增长速度明显降低 (图 2.2D)。这些数据表明 20E 抑制了幼虫的食物消耗, 从而减轻了体重。此外, 向六龄 6 h 幼虫中注射了多巴胺受体抑制剂 flupentixol (Srivastava et al. 2005) 至终浓度  $50 \mu\text{M}$ , 与 PBS 处理的对照组相比, 平均摄食量和体重增加均有所降低 (图 2.2E 和 F), 表明 *DopEcR* 影响幼虫的摄食和生长。

### 3.3 干扰 *DopEcR* 可以减少幼虫进食并延迟化蛹

为了确定 *DopEcR* 在幼虫发育中的作用, 对第一龄幼虫分别喂食表达 *dsGFP* 或 *dsDopEcR* 的大肠杆菌 (HT115) 来敲降 *DopEcR*。与喂食表达 *dsGFP* 的大肠杆菌相比, 喂食表达 *dsDopEcR* 的大肠杆菌时, 幼虫的表皮, 中肠, 脂肪体和头部 *DopEcR* 的表达明显被抑制 (图 2.3A)。喂食 *dsDopEcR* 组和 *dsGFP* 组的死亡率无明显差异, 然而, 幼虫进入预蛹期的时间却被延迟了 (图 2.3B)。蛋白质印迹表示 RNAi 的效率 (图 2.3C)。75% 的幼虫显示延迟化蛹约 44 h (图 2.3D)。此外, 幼虫的摄食受到抑



**图 2.2. 20E 抑制了幼虫的进食并促进化蛹。**(A) 三龄幼虫到成虫第 3 天 (A3) 整个虫体的 20E 滴度。(B) 三龄幼虫到成虫第 3 天 (A3) 血淋巴中多巴胺滴度。3F: 三龄取食期幼虫; 3M: 三龄蜕皮期幼虫; 4F: 四龄取食期幼虫; 4M: 四龄蜕皮期幼虫; 5F: 五龄取食期幼虫; 5M: 五龄蜕皮期幼虫; 6-0 h, 6-24 h, 6-48 h, 6-72 h, 6-96 h 和 6-120 h: 六龄幼虫从 0 h 到 120 h; P0, P2, P4, P6, P8, P10: 蛹期 0 至 10 天。A1-A3: 成虫第 1 天到第 3 天。MM: 变态蜕皮。(C) 注射 500 ng 20E 后 0-12、12-24、24-36、36-48 和 48-60 h 的食物消耗量。DMSO 作对照。进食量用食物消耗量计算。(D) 注射 500 ng 20E 后 0-12、12-24、24-36、36-48 和 48-60 h 体重的增加量。DMSO 用作对照。(E) 注射 flupentixol 后 0-12、12-24、24-36、36-48 和 48-60 h 食物消耗量。PBS 作对照。进食量用食物消耗量计算。(F) 注射 flupentixol 后 0-12、12-24、24-36、36-48 和 48-60 h 体重的增加。PBS 作对照。误差线显示三个生物学重复的平均值±SD。t 检验分析差异显著水平 (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )。

**Figure 2.2. The 20E titer and dopamine titer in *H. armigera* and 20E repressed larval feeding and promoted pupation.** (A) 20E titer of the whole body from 3rd instar larvae to adult 3 day (A3). (B) Hemolymphal dopamine titer from 3rd instar larvae to adult 3 day (A3). 3F: third instar feeding larvae; 3M: third instar molting larvae; 4F: fourth instar feeding larvae; 4M: fourth instar molting larvae. 5F: fifth instar feeding larvae; 5M: fifth instar molting larvae; 6-0 h, 6-24 h, 6-48 h, 6-72 h, 6-96 h and 6-120 h: 6th instar larvae from 0 h to 120 h; P0, P2, P4, P6, P8, P10: pupation 0 to 10 days. A1-A3: adult 1st day to 3rd day. MM: metamorphosis molting.

h, 6–96 h, and 6–120 h: sixth instar larvae from 0 h to 120 h; P0, P2, P4, P6, P8, P10: zero to 10-day-old pupae. A1–A3: adult day 1 to day 3 from female adult. MM: metamorphic molting. (C) The food consumption was quantitated as the amount of diet eaten at 0–12, 12–24, 24–36, 36–48 and 48–60 h after 500 ng 20E injection. DMSO was used as control. The amount of the food consumption was weighted for the quantity of feeding. (D) The increment weight of body was quantitated at 0–12, 12–24, 24–36, 36–48 and 48–60 h after 500 ng 20E injection. DMSO was used as control. (E) The food consumption was quantitated as the amount of diet eaten at 0–12, 12–24, 24–36, 36–48 and 48–60 h after flupentixol injection. PBS was used as control. The amount of the food consumption was weighted for the quantity of feeding. (F) The increment weight of body was quantitated at 0–12, 12–24, 24–36, 36–48 and 48–60 h after flupentixol injection. PBS was used as control. Error bars show the mean  $\pm$  SD of three biological repeats. Significant differences were calculated by Student's *t* test (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

制，食物消耗量峰值被推迟了 48 h（图 2.3E），平均体重和体长峰值也推迟了 48 h（图 2.3F 和 G）。*dsDopEcR* 处理的幼虫和 *dsGFP* 处理的幼虫的最终体重和体长没有显著差异。这些结果表明，DopEcR 对幼虫进食或化蛹是必需的。

为了确认 DopEcR 在 20E 促进幼虫变态化蛹中的功能，将靶向 *DopEcR* 的 *dsRNA* 注入第六龄 6 h 幼虫血腔中，以敲低 *DopEcR*，然后进行 20E 诱导。与 *dsGFP* 注射组相比，*dsDopEcR* 注射组中 *DopEcR* 在幼虫表皮，中肠，脂肪体和头部的表达量均显著降低（图 2.4A）。敲降 *DopEcR* 后，与 *dsGFP* 叠加 20E 的幼虫相比，即使在 20E 注射后，幼虫也表现出延迟化蛹的现象（图 2.4B）。统计分析表明，注射 20E 可使平均化蛹的起始时间缩短 29 h。但是，与 *dsGFP* 叠加 20E 注射相比，*dsDopEcR* 叠加 20E 注射后化蛹时间延迟了 43 h（图 2.4C）。敲降 *DopEcR* 并注射 20E 后，棉铃虫的存活率为 83%，正常化蛹率为 9%，延迟化蛹率为 74%，与 *dsGFP* 并注射 20E 的对照组相比有显著差异（ $p < 0.01$ ）（图 2.4D）。这些数据表明 DopEcR 在 20E 调节化蛹中起作用。

通过末端脱氧核苷酸转移酶缺口末端标记（TUNEL）染色和组织化学分析，以明确 DopEcR 参与 20E 诱导的幼虫中肠和脂肪体的凋亡。在 *dsGFP*+20E 处理的幼虫中，幼虫中肠观察到凋亡信号红色荧光，并与成虫中肠分离，而在 *dsDopEcR*+20E 处理的幼虫中未检测到红色荧光，也未形成成虫中肠。此外，*dsGFP*+20E 处理的幼虫中，脂肪体观察到凋亡信号并开始降解，而 *dsDopEcR*+20E 处理的幼虫的脂肪体仍然紧密排列，没有检测到明显的凋亡信号（图 2.4E 和 F）。这些数据表明 DopEcR 在 20E 诱导的细胞凋亡中起作用。

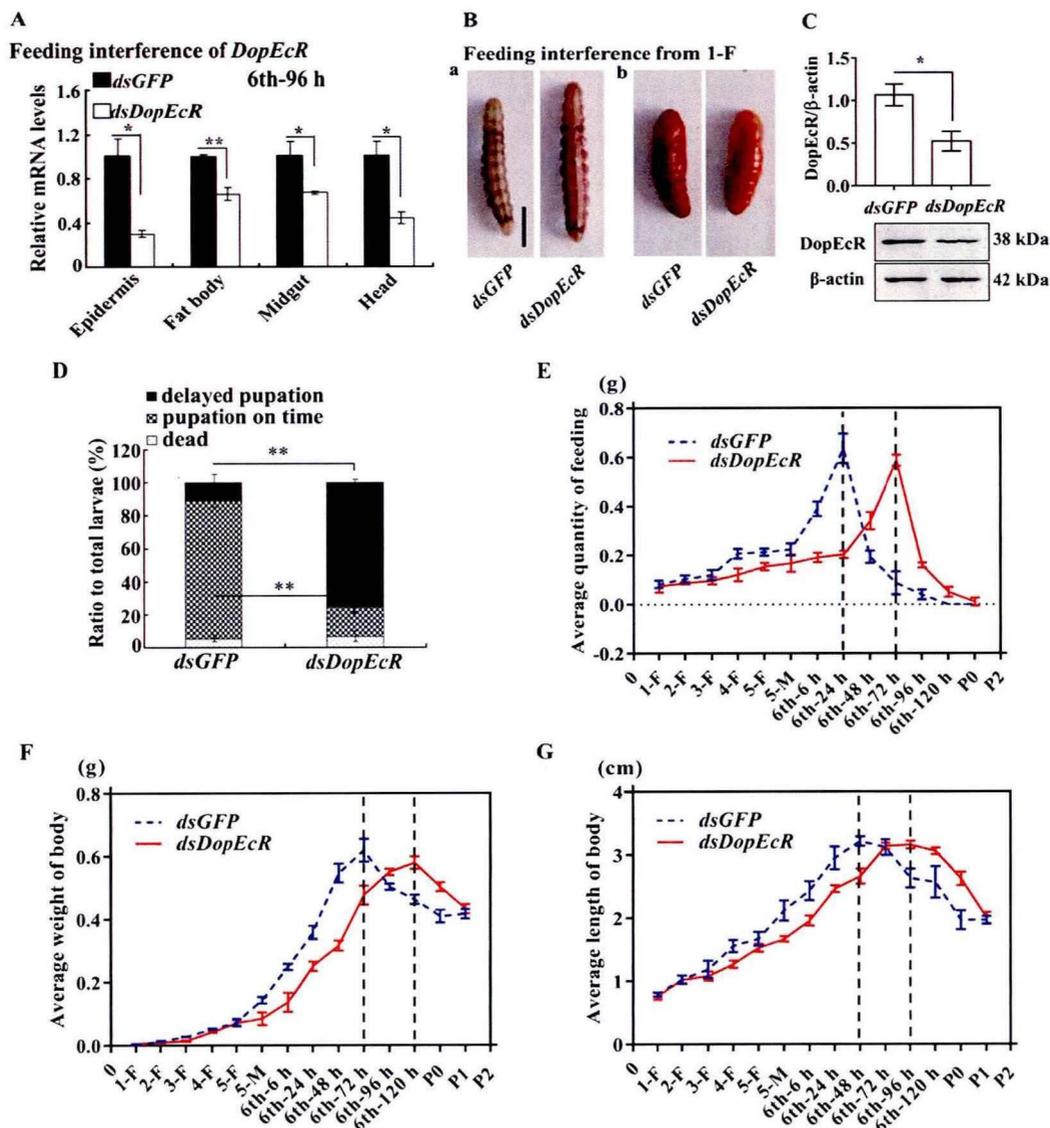
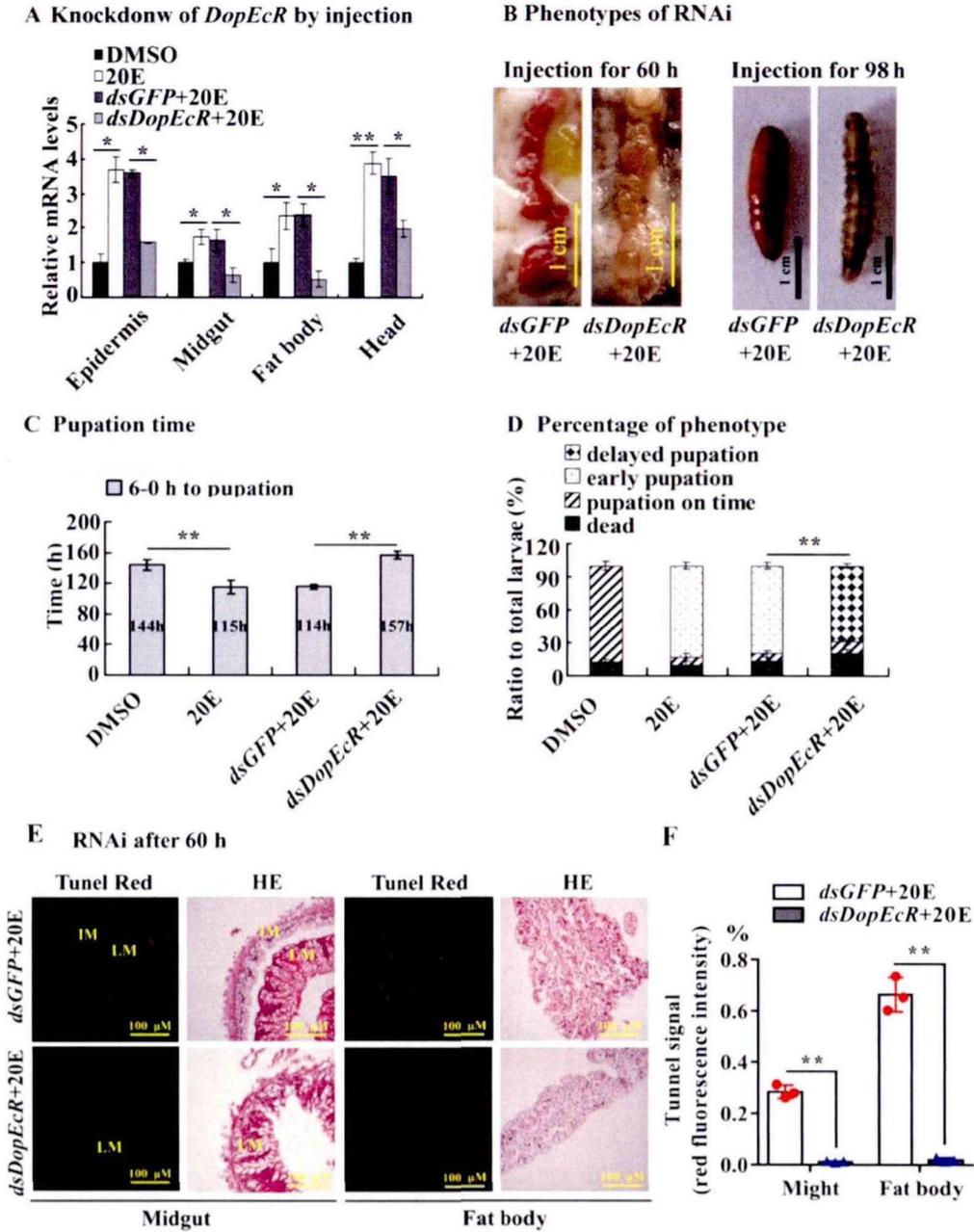


图 2.3. 通过从第一龄幼虫到第六龄幼虫喂食 dsRNA 敲降 *DopEcR*, 抑制幼虫生长, 进食和化蛹。(A) qRT-PCR 检测 6-96 h 幼虫组织中 *DopEcR* 敲低的效率。(B) 饲喂 dsRNA 后的表型。(a) 喂养 *dsDopEcR* 后幼虫的表型。(b) 蛹的表型。比例尺=1 厘米。(C) Western 印迹显示饲喂 dsRNA 的干扰效率。12.5% SDS 凝胶,  $\beta$ -actin 作参照。ImageJ 软件转换图像数据。

(D) 不同表型占比。数据来自 30 个幼虫 $\times$ 3 次实验。(E) (F) 和 (G) 第一龄幼虫 (1-F) 到蛹第二天 (P-2) 的 30 只幼虫的平均进食量, 体重和体长。所有数据均重复三次。误差线表示平均值 $\pm$ SD。t 检验分析差异显著水平 (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ )。

**Fig 2.3. Silencing *DopEcR* by feeding dsRNA from first instar to 6th instar larvae repressed growth, feeding and pupation.** (A) qRT-PCR detected the efficiency of *DopEcR* knockdown in tissues of 6th-96 h larvae. (B) Phenotypes after feeding dsRNA. (a) Phenotypes of larvae, with larger body size after feeding *dsDopEcR*. (b) Phenotypes of pupae. The bar represents 1 cm. (C) Western blotting showing the knockdown efficiency by dsRNA feeding (12.5% SDS gel with  $\beta$ -actin used as a control). ImageJ software was used to transform the image data. (D) Ratio of Phenotypes. The data were calculated from 30 larvae  $\times$  3 experiments. (E) (F) and (G) The average quantity of feeding, body weight and body length of insect from first instar larvae (1-F) to pupae (P-2), analyzed individually with 30 insects. All data were performed in triplicate. The bars indicate the mean  $\pm$  SD. Significant differences were calculated by Student's *t* test (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).



**图 2.4. dsRNA 注射敲降 *DopEcR* 延迟化蛹和组织重塑。**(A) qRT-PCR 测定 6th-72 h 幼虫的表皮, 中肠, 脂肪体和头的 *DopEcR* 的转录检测 *DopEcR* 的干扰效率。第一次在六龄 6 小时幼虫注射 dsRNA, 每隔 24 h 注射一次, 一共三次, 500 ng dsRNA/幼虫。20E (500 ng/幼虫), DMSO 是溶剂对照。(B) 如 A 中 *DopEcR* 敲降后的表型。表型是在首次 *dsDopEcR* 注射后 98 h 获得的。比例尺=1 厘米。(C) 和 (D) 六龄 6 h 幼虫发育到蛹的时间统计分析以及不同表型的百分比。(E) 中肠和脂肪体 TUNEL 和 HE 染色。首次注射 dsRNA 后 60 h 观察。LM: 幼虫中肠; IM: 成虫的中肠。TUNEL 红色荧光指示凋亡信号。HE 染色显示中肠和脂肪体的形态。比例尺=100  $\mu$ m。(F) ImageJ 统计红色荧光强度 (TUNEL 信号)。红色区域与组织的百分比计算凋亡信号。误差线显示三个生物学重复的平均值 $\pm$ SD。t 检验分析差异显著水平 (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ )。

**Figure 2.4. *DopEcR* silence by dsRNA injection delayed pupation and tissue remodeling.** (A) qRT-PCR showing the efficacy of *DopEcR* knockdown (sixth instar 6 h larvae for the first dsRNA injection, thrice at a 24 h interval, 500 ng dsRNA/larva) in larvae epidermis, midgut, fat body, and

head at 6th-72 h. 20E (500 ng/larva). DMSO was a solvent control. **(B)** Phenotypes after *DopEcR* knockdown as the experiments in A. Phenotypes were obtained at 98 h after first *dsDopEcR* injection. Scale bar = 1 cm. **(C)** and **(D)** Statistical analysis of pupation time from sixth instar 6 h larvae developing to pupae and the percentage of different phenotypes. **(E)** Tunel and HE-stained midgut and fat body after knockdown of *DopEcR*, observed at 60 h after the first dsRNA injection. LM: larval midgut; IM: imaginal midgut. Tunel Red fluorescence indicates apoptotic signal. HE staining showing the morphology of the midgut and fat body. The yellow bars represent 100  $\mu$ M. **(F)** The red fluorescence intensity (tunnel signal) were counted by ImageJ and represented with mean  $\pm$  SD. Tunnel signal was calculated with red area (% of the tissue). Error bars show the mean  $\pm$  SD of three biological repeats. Significant differences were calculated by Student's *t* test (\* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01).

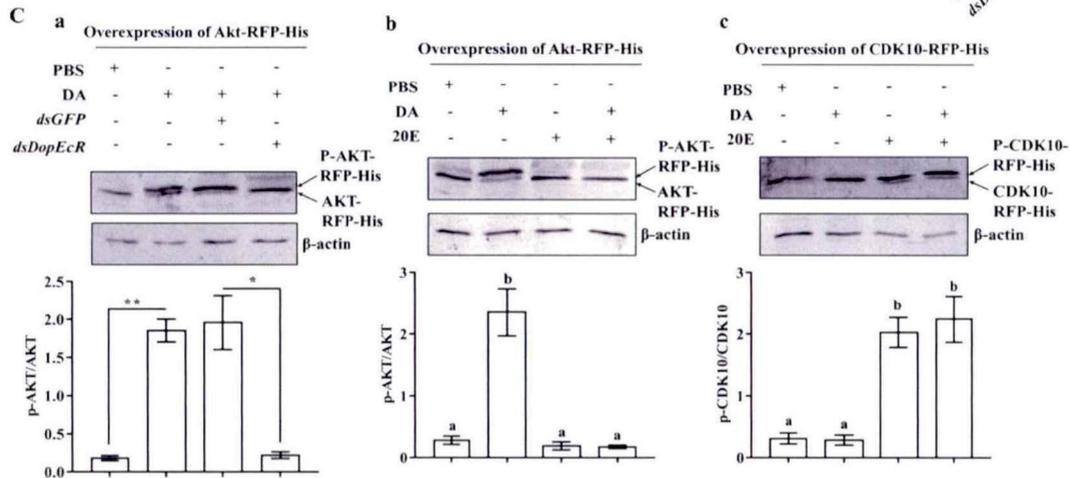
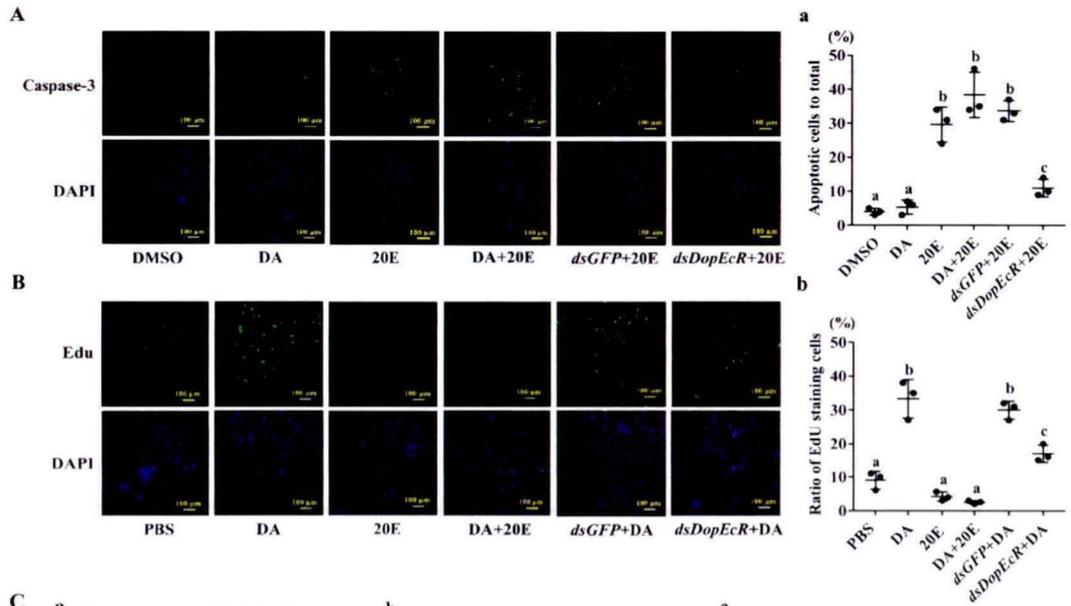
### 3.4 20E 拮抗多巴胺功能

20E 抑制幼虫的摄食行为并因此导致提前化蛹的现象促使我们通过细胞凋亡和细胞增殖来研究 20E 与 DA 之间的关系,以及 *DopEcR* 在 20E 和 DA 途径中的作用。与用 DMSO 和 DA 处理的细胞相比,添加 5  $\mu$ M 20E 72 h 后,有 31% 的 HaEpi 细胞中检测到 caspase-3 活性,表明 20E 诱导凋亡。但是,与 *dsGFP* 和 20E 处理的细胞相比,*dsDopEcR* 和 5  $\mu$ M 20E 处理的 HaEpi 细胞中的 caspase-3 活性显著降低(图 2.5A 和 a),表明 20E 通过 *DopEcR* 诱导凋亡。相反,与 PBS 处理的细胞相比,33% 的 DA (10  $\mu$ M) 处理的细胞中检测到 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 增殖信号,这表明 DA (10  $\mu$ M) 促进细胞增殖。但是,与 *dsGFP*+DA (10  $\mu$ M) 处理的细胞相比,*dsDopEcR*+DA (10  $\mu$ M) 处理的细胞中检测到低的 EdU 信号。20E 不会诱导增殖信号,但会抑制 DA 诱导的细胞增殖(图 2.5B 和 b)。这些结果表明 20E 通过 *DopEcR* 促进细胞凋亡,而 DA 通过 *DopEcR* 促进细胞增殖,20E 拮抗 DA 的功能。

检查蛋白激酶 B (AKT) 和 CDK10 的磷酸化,以进一步证实 20E 和 DA 功能的拮抗作用。蛋白质印迹显示 DA (10  $\mu$ M) 诱导 AKT 磷酸化,但 *DopEcR* 的敲降显著降低了 DA 诱导的 AKT 磷酸化(图 2.5C, a),表明 DA 通过 *DopEcR* 诱导了 AKT 磷酸化。20E (5  $\mu$ M) 抑制了 DA 诱导的 AKT 磷酸化,但是,DA 不能抑制 20E 诱导的 CDK10 磷酸化(图 2.5C, b 和 c)。这些结果进一步证实了 20E 拮抗 DA 的功能。

### 3.5 *DopEcR* 参与 20E 信号途径

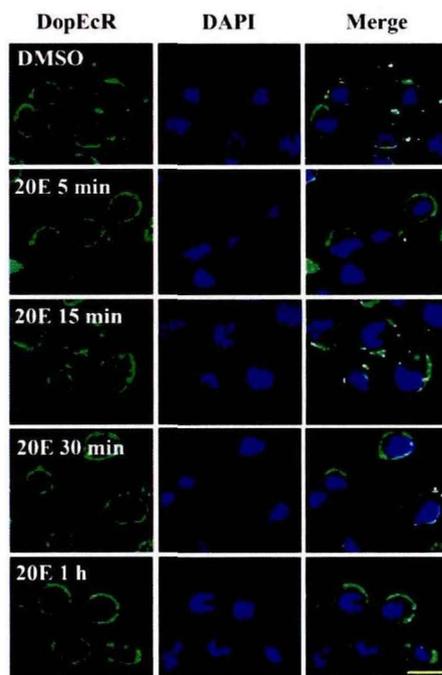
分析 *DopEcR* 的亚细胞定位,以确认它是一种细胞膜蛋白。使用抗棉铃虫 *DopEcR* 的多克隆抗体进行免疫细胞化学检测,发现 DMSO 对照处理的细胞中 *DopEcR* 定位在质膜中,20E 处理 5 min 至 1 h 内,*DopEcR* 并未内化到细胞质中(图 2.6 和图 2.7A)。这些结果表明 *DopEcR* 在细胞膜上发挥其作用,20E 不会导致 *DopEcR* 的内吞。



**图 2.5. 20E 拮抗多巴胺的功能。**(A)使用 NucView™ caspase-3 活性测定试剂盒检测 DMSO, 20E (5 μM), *dsGFP*+20E (5 μM), *dsDopEcR*+20E (5 μM) 和 DA (10 μM)+20E (5 μM) 处理后的 HaEpi 细胞中的凋亡信号。(a) 凋亡细胞 (绿色) 与总细胞 (蓝色) 的比率。(B) 使用 Edu 试剂盒检测 DMSO, 20E (5 μM), *dsGFP*+20E (5 μM), *dsDopEcR*+20E (5 μM) 和 DA (10 μM)+20E (5 μM) 处理后的 HaEpi 细胞中的增殖信号。(b) 增殖细胞 (绿色) 与总细胞 (蓝色) 的比率。DAPI 将细胞核染色 (蓝色)。数据来自 100×3 个细胞并进行统计分析。比例尺=100 μm。(C) 蛋白质印迹分析 20E (5 μM) 或 DA (10 μM) 30 分钟诱导的蛋白质磷酸化。(a) (b) 和 (c) AKT-RFP-His, AKT-RFP-His 和 CDK10-RFP-His。7.5%SDS-PAGE 凝胶。误差线表示三次生物重复的平均值±SD。使用 ImageJ 软件转换图像数据。通过 *t* 检验 (\* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01) 或单因素方差分析 (ANOVA, *p* < 0.05) 进行差异显著性分析。

**Figure 2.5. 20E antagonizes dopamine function.** (A) Apoptosis signal in HaEpi cells after DMSO, 20E (5 μM), *dsGFP*+20E (5 μM), *dsDopEcR*+20E (5 μM) and DA (10 μM)+20E (5 μM) treatment by using the NucView™ caspase-3 activity assay kit. (a) The ratio of apoptotic cells (green) to the total cells (blue) in the field view was obtained. (B) Proliferation signal in HaEpi cells after DMSO, 20E (5 μM), *dsGFP*+20E (5 μM), *dsDopEcR*+20E (5 μM) and DA (10 μM)+20E (5 μM) treatment by using the 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (Edu) kit (Ribobio, Guangzhou, China). (b) The ratio of proliferation cells (green) to the total cells (blue) in the field view was obtained. DAPI stained the nucleus (blue). Statistical analysis using the data from 100 × 3 cells. The yellow bars represent 100 μm. (C) Western blot analysis of 20E (5 μM) or DA (10 μM) induced proteins phosphorylation for

30 min. (a) (b) and (c) AKT-RFP-His, AKT -RFP-His, and CDK10-RFP-His. 7.5% SDS-PAGE gel. Error bars show the mean  $\pm$  SD of three times' biological repetition. ImageJ software was used to transform the image data. Significant differences were calculated by Student's *t* test ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ) or one-way analysis of variance (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

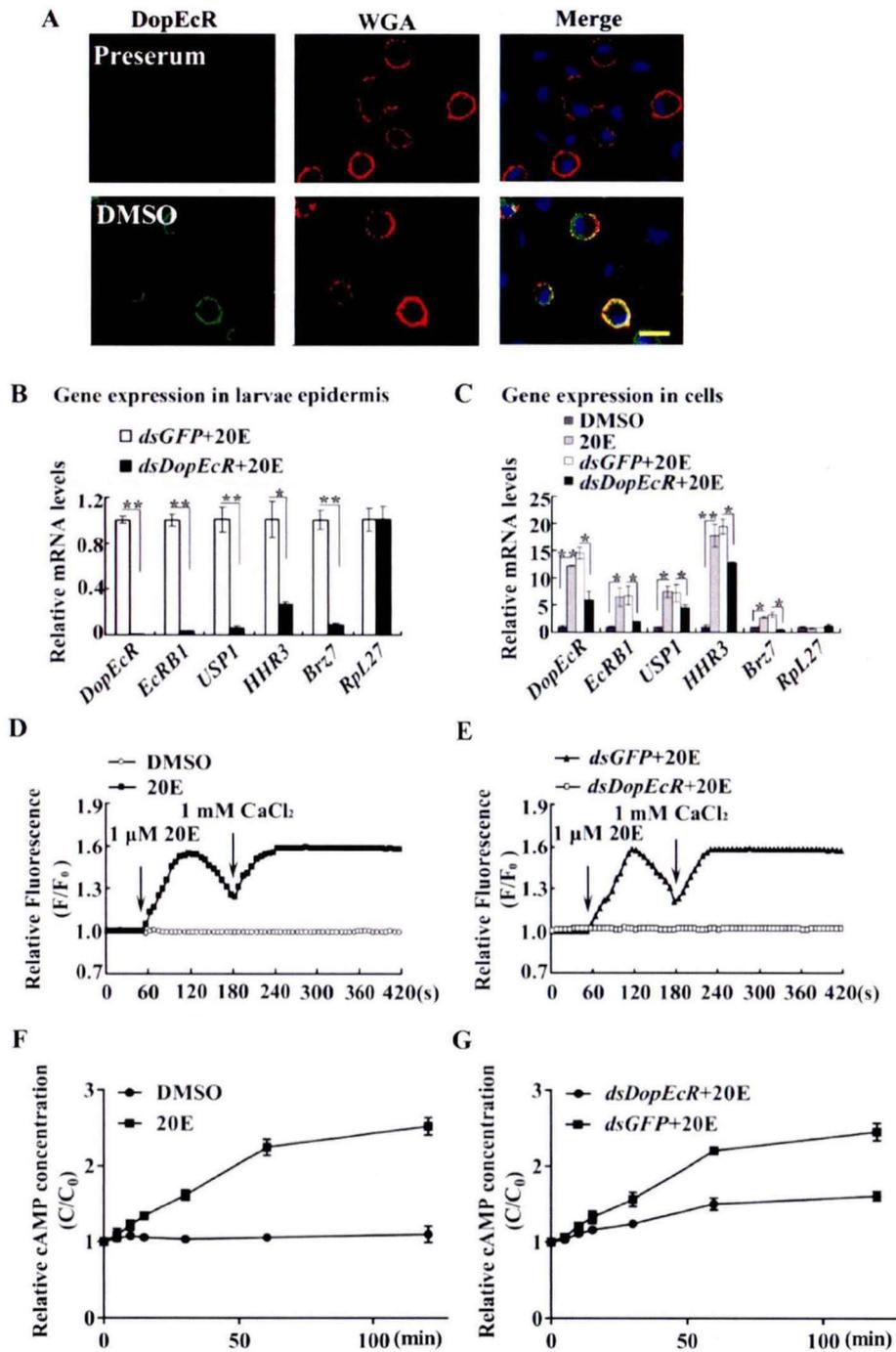


**图 2.6. DopEcR 定位于 HaEpi 细胞质膜，并且不会被 20E 诱导内吞。** 20E 处理 (1  $\mu$ M)。DMSO 作溶剂对照。绿色: DopEcR 多克隆抗体和 Alexa-488 标记的二抗染色 DopEcR 蛋白。蓝色: DAPI 标记细胞核。激光共聚焦显微镜观察。比例尺= 25  $\mu$ m。

**Figure 2.6. DopEcR located in plasma membrane without internalization by 20E induction in HaEpi cells.** 20E treatment (1  $\mu$ M). DMSO as solvent control. **Green:** DopEcR protein stained with an anti-DopEcR antibody and secondary antibody labeled with Alexa-488. **Blue:** nucleus stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). Observed by confocal microscope. Scale bar = 25  $\mu$ m.

为了明确 DopEcR 在 20E 促进化蛹中的机制，将 *dsDopEcR* 注入六龄 6h 幼虫血腔中敲降 *DopEcR* 后检查各种 20E 信号途径基因的转录水平。与 *dsGFP* 对照相比，敲降 *DopEcR* 后幼虫表皮中 20E 信号途径关键基因的转录水平，包括 *EcRB1*, *USP1*, *HHR3* 和 *BrZ7*, 均显著降低。核糖体蛋白基因 *RpL27* 作为内参基因 (图 2.7B)。*dsDopEcR* 转染 HaEpi 细胞同样会降低 20E 诱导的基因表达 (图 2.7C)。这些数据表明 20E 通过 DopEcR 诱导 20E 信号途径基因的表达。

20E 通过 GPCR 介导的细胞内  $Ca^{2+}$  浓度增加来调节基因表达，从而形成 *EcRB1/USP1* 转录复合物 (Liu et al. 2014b)。因此，检测了 DopEcR 是否参与 20E 诱导的  $Ca^{2+}$  水平的变化。结果发现 20E 诱导了快速的  $Ca^{2+}$  细胞内释放和细胞外  $Ca^{2+}$  的流入。但是，在 *DopEcR* 敲降后，20E 不能诱导  $Ca^{2+}$  的快速释放和流入 (图 2.7D 和 E)。这些数据表明 DopEcR 参与 20E 诱导的细胞内  $Ca^{2+}$  的增加。



**图 2.7. DopEcR 在 20E 信号途径中的作用。** (A) DopEcR 定位于质膜。红色：标记有小麦胚芽凝集素 (WGA) 的细胞膜。绿色：用 DopEcR 抗体和 Alexa-488 标记的二抗标记的 DopEcR 蛋白。蓝色：DAPI 标记的细胞核。用激光共聚焦显微镜观察。比例尺=25 μm。(B) 和 (C) qRT-PCR 检测在敲降 *DopEcR* 后 6-72 h 幼虫表皮 (500 ng dsRNA/幼虫) 和 HaEpi 细胞 (2 μg dsRNA/mL, 然后 1 μM 20E 孵育 12 h) 中 20E 效应基因的 mRNA 水平。以  $\beta$ -actin 为参照。(D) 和 (E) *DopEcR* 敲低后, 通过 Image Pro-Plus 分析得出 HaEpi 细胞中 Ca<sup>2+</sup> 水平。细胞分别 *dsGFP* (2 μM) 和 *dsDopEcR* (2 μM) 处理 48 h, AM 酯钙深红色染料 (3 μM) 处理 30 分钟, 然后分别用 20E (1 μM) 和 CaCl<sub>2</sub> (1 mM) 处理。F: 不同处理后 HaEpi 细胞的荧光

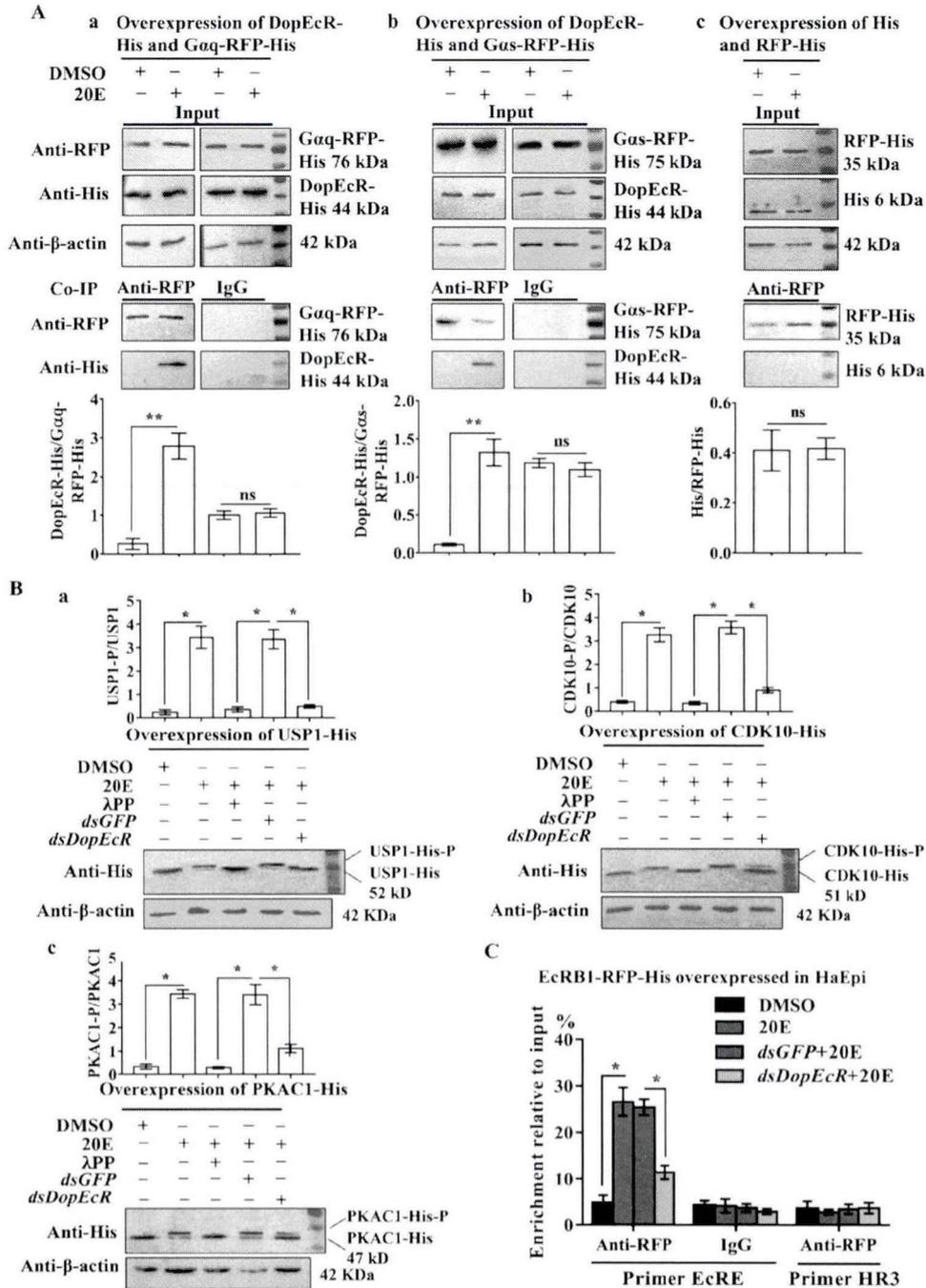
强度。F0: 不同处理前的荧光强度。通过共聚焦显微镜在 555 nm 波长的激光下每 6 s 记录一次荧光。(F) 和 (G) *DopEcR* 敲低抑制了 20E 触发的 cAMP 增加。HaEpi 细胞 *dsDopEcR* 或 *dsGFP* 转染 48 h, 然后与 2  $\mu$ M 20E 孵育。误差线显示出三次重复的平均值 $\pm$ SD。通过 Student's *t* 检验显著性差异, 星号表示显著差异 (\**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01)。

**Figure 2.7. Roles of DopEcR in 20E pathway.** (A) DopEcR was localized in plasma membrane. **Red:** The cell membrane was marked by wheat germ agglutinin (WGA). **Green:** DopEcR protein stained with an anti-DopEcR antibody and secondary antibody labeled with Alexa-488. **Blue:** nucleus stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). Observed by confocal microscope. Scale bar = 25  $\mu$ m. (B) and (C) qRT-PCR showing mRNA levels of 20E-response genes after *DopEcR* knockdown in 6th-72 h larval epidermis (500 ng dsRNA/larva) and in HaEpi cells (2  $\mu$ g dsRNA/mL, 48 h once, followed 1  $\mu$ M 20E for 12 h).  $\beta$ -actin was regard as control. (D) and (E)  $Ca^{2+}$  levels by Image Pro-Plus analysis after *DopEcR* knockdown in HaEpi cells, which representing three repeats. Cells were treated with *dsGFP* (2  $\mu$ M) and *dsDopEcR* (2  $\mu$ M) for 48 h and AM ester calcium crimson dye (3  $\mu$ M) in DPBS for 30 min, and then by 20E (1  $\mu$ M) and  $CaCl_2$  (1 mM), respectively. **F:** fluorescence intensity of HaEpi cells after different treatments. **F0:** fluorescence intensity before different treatments. Fluorescence was recorded per 6 s by confocal microscope photographs at 555 nm wavelength laser. (F) and (G) *DopEcR* knockdown repressed the 20E-triggered cAMP increase. HaEpi cells were transfected with *dsDopEcR* or *dsGFP* for 48 h followed by incubation with 2  $\mu$ M 20E. Error bars showed the mean  $\pm$  SD of three times repetition. Asterisks manifest significant differences by Student's *t* test (\**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01).

先前的研究表明 20E 通过 ErGPCR-2 触发细胞内 cAMP 水平的增加, 以增强 EcRB1/USP1 调控的基因转录(Jing et al. 2016)。因此, 在 HaEpi 细胞中检测了 DopEcR 在 20E 诱导细胞内 cAMP 水平升高中的作用。与 DMSO 处理的细胞相比, 20E 处理的细胞内 cAMP 的浓度增加(图 2.7F)。但是, 在 *DopEcR* 敲降后, 20E 诱导的细胞内 cAMP 浓度降低(图 2.7G)。这些结果表明 20E 通过 DopEcR 增加了细胞内 cAMP 的浓度。

### 3.6 DopEcR 与 Gαq 和 Gas 相互作用以调节蛋白质的磷酸化

鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 G (G) 亚基  $\alpha$  (Gas) 引起 cAMP 的产生, 而 G 蛋白亚基  $\alpha$ q (Gαq) 促进细胞内  $Ca^{2+}$  的增加(Vines 2012)。为了明确 20E 通过 DopEcR 增加细胞内  $Ca^{2+}$  和 cAMP 水平的机制, 通过在 HaEpi 细胞中共表达 DopEcR-His 和 Gαq-RFP-His 或 Gas-RFP-His 来检查 DopEcR 与 Gαq 或 Gas 之间的蛋白质相互作用。RFP-His 和 His 的过表达以排除 His 或 RFP-His 标签引起的蛋白质相互作用的可能性。Input 中 Gαq-RFP-His 和 DopEcR-His 均有表达, 在 20E 诱导下, RFP 抗体将 DopEcR-His 与 Gαq-RFP-His 一起沉淀下来, 但在 IgG 的阴性对照中则没有检测到 DopEcR-His(图 2.8A, a)。同样地, 在 20E 诱导下, RFP 抗体将 DopEcR-His 与 Gas-RFP-His 一起沉淀下来(图 2.8A, b)。标签对照中, 在 20E 诱导下, RFP 抗体未能将 His-tag 与 RFP-His 一起沉淀(图 2.8A, c)。这些数据表明, 在 20E 诱导下, DopEcR 与 Gαq 和 Gas 直接相互作用。



**图 2.8. 20E 促进 DopEcR 与 Gaq 和 Gas 偶联，并通过 DopEcR 促进蛋白质磷酸化。** (A) 免疫共沉淀 (Co-IP) 检测在 20E (2  $\mu$ M, 30 min) 诱导下 DopEcR 与 Gaq 和 Gas 的偶联。DMSO 作为对照。(a) (b) 和 (c) **Input**: RFP 或 His 抗体检测细胞中 Gaq-RFP-His, DopEcR-His, Gas-RFP-His 和 RFP-His 的水平。 $\beta$ -actin 做参照。**Co-IP**: RFP 抗体免疫共沉淀 Gaq-RFP-His 和 DopEcR-His, Gas-RFP-His 和 DopEcR-His 或 RFP-His 和 His。非特异性小鼠 IgG 做阴性对照。SDS-PAGE 凝胶浓度为 12.5%。(B) 蛋白质印迹分析 20E 诱导的蛋白质磷酸化 (2  $\mu$ M 20E 1 h)。(a) (b) 和 (c) USP1-His, CDK10-His 和 PKAC1-His。 $\lambda$ PP: 0.5  $\mu$ M  $\lambda$ PPase 在 30 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min。7.5% SDS-PAGE 凝胶。(C) ChIP 分析 DopEcR 参与的 20E 诱导 EcRB1 与 EcRE 的结合。EcRB1-RFP-His 在 HaEpi 细胞中过表达 48 h, 细胞转染 dsDopEcR (2  $\mu$ g/mL) 或 dsGFP (2  $\mu$ g/mL) 12 h, 然后 2  $\mu$ M 20E 或 DMSO 诱导 6 h。**Input**: 非免疫沉淀染色质。**IgG**: 非特异性小鼠 IgG。**引物 EcRE**: 靶向含 EcRE DNA 的引物。**HR3**

引物：靶向 *HR3* ORF 的引物。所有数据均基于的三个重复样本进行 *t* 检验 ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ )。

**Figure 2.8. 20E promotes DopEcR coupling with Gαq and Gαs and protein phosphorylation via DopEcR.** (A) Co-immunoprecipitation (Co-IP) to detect DopEcR coupling with Gαq and Gαs under 20E (2 μM for 30 min) induction. DMSO was solvent control. (a) (b) and (c) **Input:** the levels of Gαq-RFP-His, DopEcR-His, Gαs-RFP-His and RFP-His in the cells detected by antibodies against RFP or His. β-actin was a loading control. **Co-IP:** Anti-RFP antibody co-immunoprecipitated Gαq-RFP-His and DopEcR-His, Gαs-RFP-His and DopEcR-His, or RFP-His and His. Nonspecific mouse IgG was a negative control. SDS-PAGE gel was 12.5%. (B) Western blot analysis 20E-induced phosphorylation of proteins (2 μM 20E for 1 h). (a) (b) and (c) USP1-His, CDK10-His and PKAC1-His. λPP: 0.5 μM λPPase incubation for 30 min at 30 °C. 7.5% SDS-PAGE gel. (C) ChIP analyzing the involvement of DopEcR in 20E-induced EcRB1 binding to the EcRE. EcRB1-RFP-His was overexpressed in HaEpi cells for 48 h. The cells were incubated with *dsDopEcR* (2 μg/mL) or *dsGFP* (2 μg/mL) for 12 h, followed by inducing of 2 μM 20E or DMSO for 6 h. **Input:** non-immunoprecipitated chromatin. **IgG:** nonspecific mouse IgG. **Primer EcRE:** primers targeted to *EcRE*-containing DNA. **Primer HR3:** primers targeted to *HR3* ORF.  $*p$  value via Student's *t*-test based on three replicates in all figures ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ).

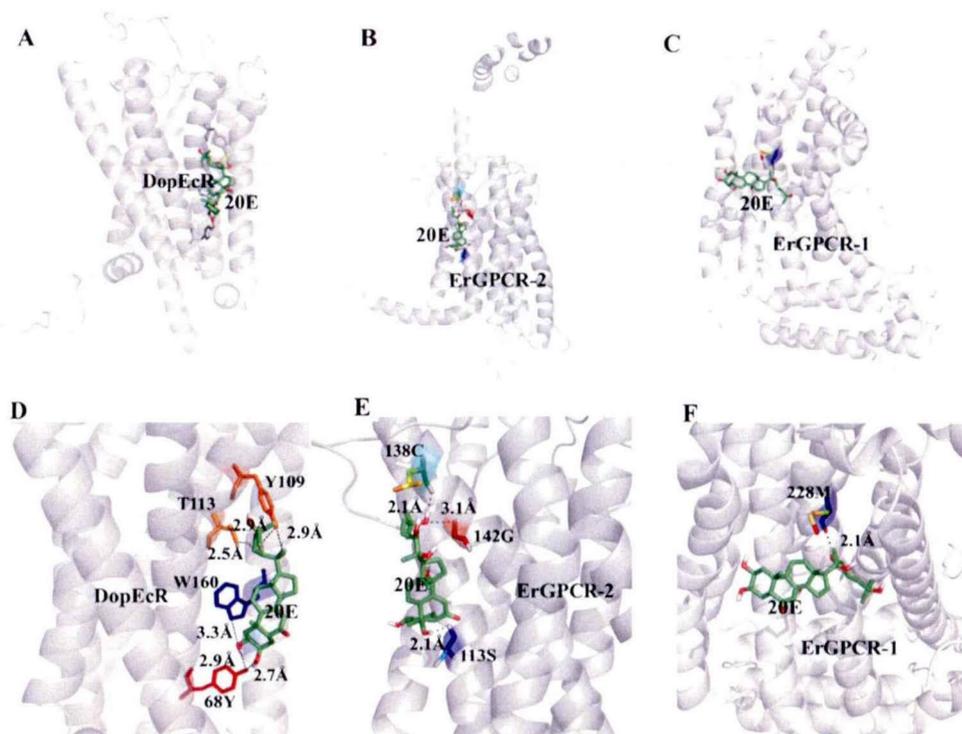
20E 通过 ErGPCR-1 介导的 PKC 途径诱导 USP1 和 CDK10 的磷酸化, 进而导致 ErRB1/USP1 转录复合物的形成和基因的转录 (Liu et al. 2014a; Liu et al. 2014b), 而 ErGPCR-2 介导的 PKA 途径诱导 PKAC1 的磷酸化以增强 20E 途径基因的转录 (Jing et al. 2016)。因此, 检查了这些蛋白质的磷酸化, 以进一步揭示 DopEcR 参与 20E 途径的机制。蛋白质印迹显示 20E 诱导 USP1 磷酸化。λ 蛋白磷酸酶 (λPPase) 处理降低了 USP1 的磷酸化。但是与 *dsGFP* 对照相比, *DopEcR* 敲低显著抑制了 20E 诱导的 USP1 磷酸化 (图 2.8B, a)。同样, *DopEcR* 敲低显著抑制了 20E 诱导的 CDK10 磷酸化 (图 2.8B, b) 和 PKAC1 磷酸化 (图 2.8B, c)。这些数据表明 20E 通过 DopEcR 诱导这些关键蛋白的磷酸化。

20E 通过 EcRB1/USP1 转录复合物与 EcREs 的结合调节基因转录 (Lan et al. 1999)。为了解决 DopEcR 在 20E 诱导的基因转录中的作用, 使用染色质免疫沉淀法 (ChIP) 检查了 EcRB1-RFP-His 与 EcRE (*Helicoverpa* *HR3* 5' 调节区中的 GGGGTCAATGAACTG 的结合。qRT-PCR 结果表明, 在 20E 处理下, EcRB1-RFP-His 与 DMSO 处理对照相比结合更多的 EcRE。但是, 与 *dsGFP* 处理的细胞相比, *dsDopEcR* 处理的 HaEpi 细胞中, EcRB1-RFP-His 结合较少的 EcRE。IgG 阴性对照和位于 *HR3* 的开放阅读框 (ORF) 中的 *HR3* 引物未产生相同结果 (图 2.8C)。这些结果表明 20E 通过 DopEcR 调节 EcRB1/USP1 转录复合物与 EcRE 的结合。

### 3.7 DopEcR 结合 20E 的结构模拟

使用 SYBYL X2.0 软件中的 Surflex-Dock (SFXC) 模块将 20E 与 ErGPCR-1 (Cai et al. 2014a), ErGPCR-2 (Wang et al. 2015) 和 DopEcR 进行对接, 以预测三种 GPCR 与 20E 结合的可能性。计算结果显示 DopEcR, ErGPCR-2 和 ErGPCR-1 跨膜螺旋附

近与 20E 结合的分最高 (图 2.9A-C)。20E 与 DopEcR 的 Tyr-68, Tyr-109, Thr-113 和 Trp-160 形成六个氢键; 与 ErGPCR-2 的 Cys-13, Ser-113 和 Gly-142 形成三个氢键; 与 ErGPCR-1 的 Met-228 形成一个氢键 (图 2.9D-F)。DopEcR, ErGPCR-2 和 ErGPCR-1 与 20E 结合的分分别为 2.6433、1.6124 和-0.5007, 其中分越高, 结合能力越强。这些结果表明, DopEcR 和 ErGPCR-2 比 ErGPCR-1 具有更高的对 20E 的结合能力。



**图 2.9. GPCR-20E 结合复合物模型。**(A) (B) 和 (C) SYBYL X2.0 软件的 Surflex-Dock (SFXC) 模块预测获得的 GPCR 模型。DopEcR, ErGPCR-2 和 ErGPCR-1 (灰色) 和 20E (绿色) 的整体结构。(D) (E) 和 (F) 虚线表示 GPCR 的氨基酸残基和 20E 之间预测的氢键。所有模型的取向相同。

**Figure 2.9. Modeling of the ligand-binding complex of the GPCRs.** (A) (B) and (C) Prediction of the Surflex-Dock (SFXC) program from the SYBYL X2.0 software. Overall structures of DopEcR, ErGPCR-2, and ErGPCR-1 (gray) and docked 20E (Green), respectively. (D) (E) and (F) A closer view of the pockets relative to docking models of DopEcR-, ErGPCR-2- and ErGPCR-1-20E complex and the amino acid residues mutated in this study. The dotted lines indicate the predicted hydrogen bonds between the amino acid residues of GPCRs and 20E. Orientation is the same in all models.

### 3.8 DopEcR 结合 20E

为了证明 DopEcR 结合 20E, DopEcR-GFP 及其突变体 DopEcR-M-GFP (根据 SYBYL X2.0 软件 Surflex-Dock (SFXC) 程序的预测和 I-TASSER 在线服务器 <http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/> 的预测, 将可能的类固醇结合位点进行点突变 (表 2.2)) 在 Sf9 细胞中进行了过表达, GFP 过表达为标签对照。ErGPCR-

1 (Cai et al. 2014a) 和 ErGPCR-2 (Wang et al. 2015) 过表达以比较不同 GPCR 结合 20E 的能力。过表达的 ErGPCR-1-GFP, ErGPCR-2-GFP, DopEcR-GFP 及其突变体 ErGPCR-2-M-GFP 和 DopEcR-M-GFP 位于细胞膜 (图 2.10A)。通过 20E-EIA 检测结合的 20E 分析表明, 与过表达 GFP 细胞相比, ErGPCR-2-GFP 和 DopEcR-GFP 过表达细胞的细胞膜结合更多的 20E。但是, 与过表达 GFP 的细胞相比, 来自 ErGPCR-1-GFP, ErGPCR-2-M-GFP 和 DopEcR-M-GFP 过表达细胞的细胞膜结合的 20E 量没有显著增加 (图 2.10B)。这些结果表明 DopEcR 和 ErGPCR-2 可以结合细胞膜上的 20E。

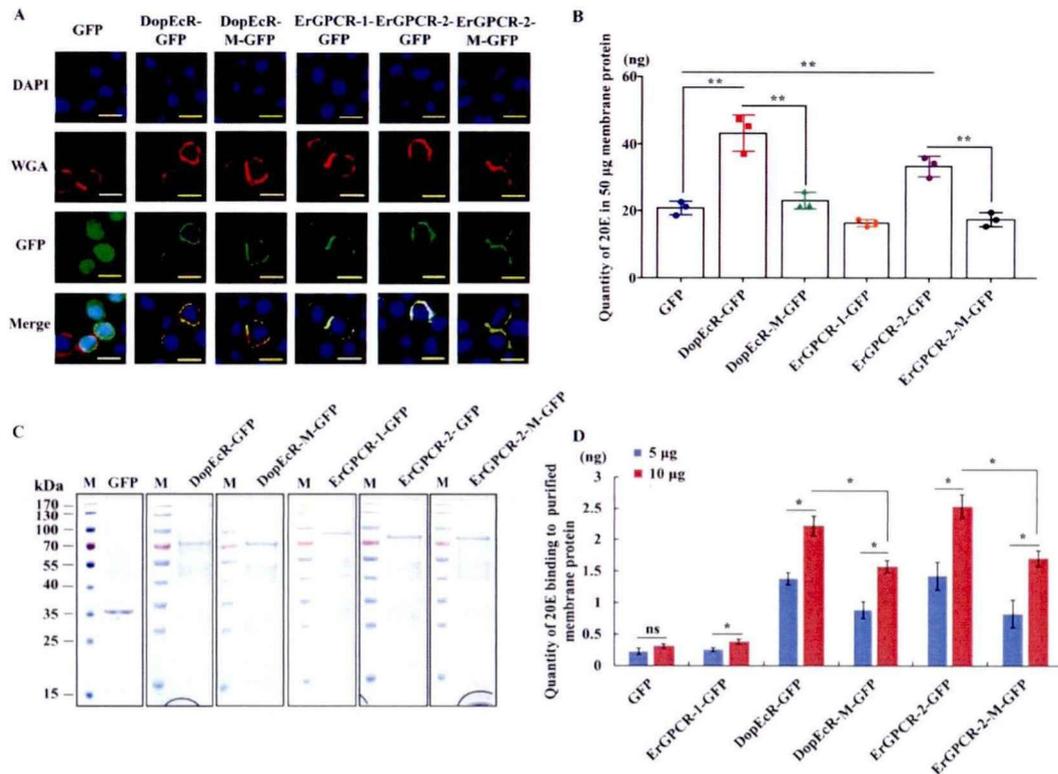
**表 2.2. GPCR 预测的结合位点和点突变位点**  
**Table 2.2. Predicted binding residues and point mutations.**

Proteins	C-score	Ligands	Binding sites	Mutation sites
ErGPCR-1	0.03	CLR	225M, 228M, 232L, 236V, 264I, 267F, 310A	
ErGPCR-2	0.05	CLR	106R, 109I, 110C, 113S, 138C, 142G, 85L, 188S, 192W	S113A, C138A, G142A
DopEcR	0.10	Y01	55F, 62S, 68Y, 71L, 75V, 109Y, 113T, 160W, 164A	Y68A, Y109A, T113A, W160A

GPCRs 的预测结合位点通过 <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> 在线预测。C 得分是预测结合位点的置信度得分。CLR, 胆固醇。Y01, 胆固醇氢琥珀酸酯。ErGPCR-2 中的位点按照过表达的 7TM 序列进行编号。

The predicted binding residues of GPCRs are predicted online at <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>. C-score is the confidence score of the predicted binding site. CLR, cholesterol, cholest-5-en-3beta-ol, cholesterin. Y01, chosterol hydrogen succinate. ErGPCR-2 was numbered from the overexpressed 7TM.

对 ErGPCR-1-GFP, ErGPCR-2-GFP, DopEcR-GFP 及其突变体 ErGPCR-2-M-GFP 和 DopEcR-M-GFP 进行蛋白纯化, 以确定纯化的 GPCR 与 20E 的结合能力。SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色显示 GPCR 的纯化程度 (图 2.10C)。使用 20E-EIA 的结合分析表明 GFP 和分离纯化的 ErGPCR-1-GFP 结合非常低水平的 20E, 但是, DopEcR-GFP 以剂量依赖的方式结合 20E, 其中 5  $\mu$ g DopEcR-GFP 结合 1.3 ng 的 20E, 10  $\mu$ g DopEcR-GFP 结合 2.3 ng 的 20E。与野生型 DopEcR-GFP 相比, DopEcR-M-GFP 突变体结合较少的 20E, 在 50  $\mu$ L EIA 缓冲液中, 每 5-10  $\mu$ g DopEcR-M-GFP 结合 0.8-1.6 ng 20E。同样, 在 50  $\mu$ L EIA 缓冲液中, 每 5-10  $\mu$ g ErGPCR-2-GFP 结合 1.4-2.5 ng 20E。但是, ErGPCR-2-M-GFP 突变体与 20E 的结合较少, 在 50  $\mu$ L EIA 缓冲液中, 每 5-10  $\mu$ g 蛋白质结合 0.7-1.7 ng 的 20E (图 2.10D)。这些数据表明, GPCR 从质膜上分离纯化后, DopEcR 和 ErGPCR-2 都可以结合 20E。



**图 2.10. 检测过表达 GPCR 的细胞膜蛋白和分离的 GPCR 结合的 20E。**(A) 过表达的 GFP 和 GPCR 的亚细胞定位。红色：小麦胚芽凝集素 (WGA) 标记的细胞膜。绿色：GFP 和与 GFP 融合的各种 GPCR 的绿色荧光。蓝色：DAPI 标记的细胞核。用共聚焦显微镜进行观察。比例尺=20 µm。(B) 50 µg 过表达 GFP, DopEcR-GFP, DopEcR-M-GFP, ErGPCR-1-GFP, ErGPCR-2-GFP 和 ErGPCR-2-M-GFP 的 HaEpi 细胞的膜蛋白结合的 20E。(C) SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色显示用于实验中 D 中部分纯化的 GPCR。(D) DopEcR-GFP, DopEcR-M-GFP, ErGPCR-2-GFP 和 ErGPCR-2-M-GFP 结合的 20E。误差线表示三个重复的 SD。星号表示根据 Student's *t* 检验存在显著差异 (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ )。

**Figure 2.10. Detection of 20E that was bound by the GPCRs-overexpressing cell membrane proteins and the isolated GPCRs.** (A) Cell membrane localization of overexpressed GFP and GPCRs. Red: the cell membrane was marked by wheat germ agglutinin (WGA). Green: green fluorescence from GFP and various GPCRs fused with GFP. Blue: nucleus stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). Observed by confocal microscope. Scale bar = 20 µm. (B) Quantity of 20E bound by 50 µg membrane proteins from HaEpi cells that was overexpressing GFP, DopEcR-GFP, DopEcR-M-GFP, ErGPCR-1-GFP, ErGPCR-2-GFP, and ErGPCR-2-M-GFP. (C) SDS-PAGE shows the partially purified GPCRs with Coomassie brilliant blue staining used in the experiments in D. (D) Quantity of 20E bound by DopEcR-GFP, DopEcR-M-GFP, ErGPCR-2-GFP, and ErGPCR-2-M-GFP. Error bars represent the SD of three replicates. Asterisks indicate significant differences according to Student's *t*-tests (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

使用纯化的 GPCR，通过 20E-EIA 构建饱和结合曲线，以进一步计算 DopEcR-GFP 和 ErGPCR-2-GFP 与 20E 结合的解离常数 (Kd)。DopEcR-GFP 与 20E 的 Bmax 为  $9.764 \pm 0.4953$  pmol/mg, Kd 为  $17.98 \pm 3.005$  nM。但是，DopEcR-GFP 突变体的 Bmax 为  $6.661 \pm 0.2764$  pmol/mg, Kd 为  $20.5 \pm 1.98$  nM (图 2.11A)。相比之下，ErGPCR-2-GFP 与 20E 的 Bmax 为  $10.42 \pm 0.6629$  pmol/mg, Kd 为  $23.32 \pm 3.304$  nM。ErGPCR-2-

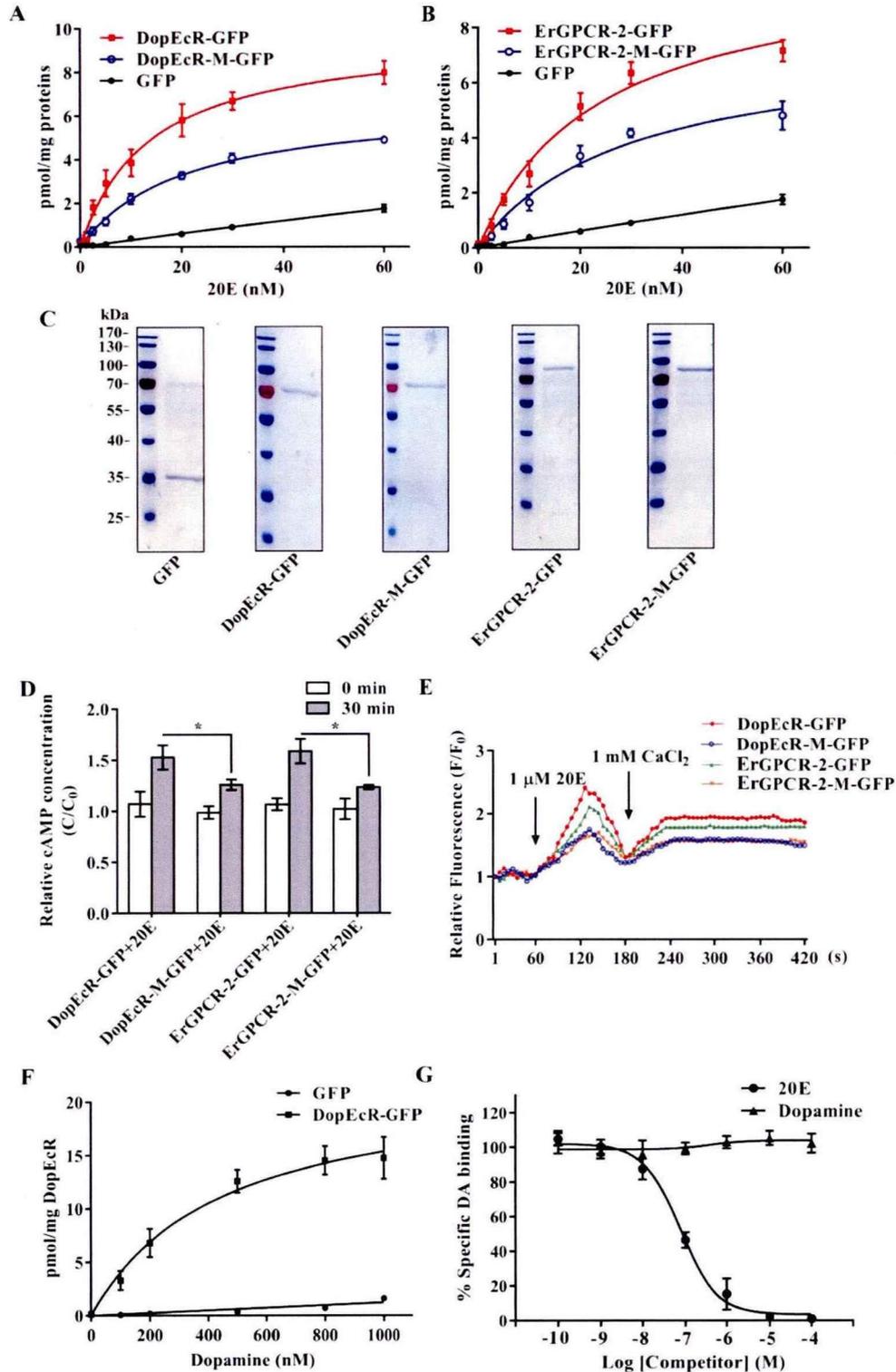


图 2.11. 分离的 DopEcR 和 GPCR-2 的配体结合研究以及 DopEcR 和 GPCR-2 介导的  $\text{Ca}^{2+}$  和 cAMP 水平的快速增加。(A) DopEcR-GFP 和 DopEcR-M-GFP 与 20E 的饱和结合曲线。(B) ErGPCR-2-GFP 和 ErGPCR-2-M-GFP 与 20E 的饱和结合曲线。用 GFP-His 标签分析非特异性结合。所有实验均使用含有 10  $\mu\text{g}$  分离蛋白的 50  $\mu\text{L}$  EIA 缓冲液中进行。(C) SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色显示验证 A, B, F 和 G 中高度纯化的 GPCRs。(D) 20E 处理下, 过表达 DopEcR-GFP, DopEcR-M-GFP, GPCR2-GFP 和 GPCR2-M-GFP 的 HaEpi 细胞中 cAMP

水平。用 DopEcR-GFP, DopEcR-M-GFP, GPCR2-GFP 和 GPCR2-M-GFP 转染 HaEpi 细胞 48 h, 然后 2  $\mu$ M 20E 孵育。(E) 过表达 DopEcR-GFP, DopEcR-M-GFP, GPCR2-GFP 和 GPCR2-M-GFP HaEpi 细胞中的  $Ca^{2+}$  水平。用 DopEcR-GFP, DopEcR-M-GFP, GPCR2-GFP 和 GPCR2-M-GFP 转染细胞 48 h, DPBS 中 AM 酯钙深红色染料 (3  $\mu$ M) 孵育 30 min, 然后孵育 20E (1  $\mu$ M) 和  $CaCl_2$  (1 mM)。F: 不同处理后 HaEpi 细胞的荧光强度。F0: 不同处理前的荧光强度。通过激光共聚焦显微镜在 555 nm 波长的激光下每 6 s 记录一次荧光, 然后使用 Image Pro-Plus 软件进行分析。(F) DopEcR-GFP 与 DA 的饱和结合曲线。用 GFP-His 标签分析非特异性结合。(G) DopEcR-GFP 对 20E 和多巴胺的竞争性结合曲线。DopEcR-GFP 包被的 ELISA 板与 20 pmol DA 孵育后, 不同配体 (20E 和 DA) 浓度递增下检测 DA 的滴度。误差线表示三个重复的 SD。星号表示根据 Student's *t* 检验存在显著差异 (\* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01)。

**Figure 2.11. Ligand-binding studies on isolated DopEcR and GPCR-2 and DopEcR and GPCR-2 mediates the rapid increase of  $Ca^{2+}$  and cAMP levels.** (A) Saturation binding curves of DopEcR-GFP and DopEcR-M-GFP to 20E. (B) Saturation binding curves of ErGPCR-2-GFP and ErGPCR-2-M-GFP to 20E. Nonspecific binding was analyzed with GFP-His tag. All the experiments were performed using 10  $\mu$ g of isolated protein in 50  $\mu$ L EIA buffer. (C) SDS-PAGE to show the highly purified GPCRs used in A, B, F and G. (D) The cAMP levels of HaEpi cells overexpressed with DopEcR-GFP, DopEcR-M-GFP, GPCR2-GFP, and GPCR2-M-GFP under 20E-triggered. HaEpi cells were transfected with DopEcR-GFP, DopEcR-M-GFP, GPCR2-GFP, and GPCR2-M-GFP for 48 h followed by incubation with 2  $\mu$ M 20E. (E)  $Ca^{2+}$  levels after DopEcR-GFP, DopEcR-M-GFP, GPCR2-GFP, and GPCR2-M-GFP overexpressed in HaEpi cells. Cells were transfected with DopEcR-GFP, DopEcR-M-GFP, GPCR2-GFP, and GPCR2-M-GFP for 48 h and AM ester calcium crimson dye (3  $\mu$ M) in DPBS for 30 min, and then by 20E (1  $\mu$ M) and  $CaCl_2$  (1 mM), respectively. F: fluorescence intensity of HaEpi cells after different treatments. F0: fluorescence intensity before different treatments. Fluorescence was recorded per 6 s by confocal microscope photographs at 555 nm wavelength laser and then analyzed using Image Pro-Plus software. (F) Saturation binding curves of DopEcR-GFP to DA. Nonspecific binding was analyzed with GFP-His tag. (G) The competition curves of DopEcR-GFP to 20E and Dopamine. The ELISA plate coated with DopEcR-GFP was incubated with 20 pmol of DA in the presence of increasing concentrations of the different ligands (20E and DA). Error bars represent the SD of three replicates. Asterisks indicate significant differences according to Student's *t*-tests (\* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01).

GFP 突变体将  $B_{max}$  降低至  $7.5 \pm 0.6592$  pmol/mg, 得到  $29.03 \pm 5.275$  nM 的  $K_d$  (图 2.11B)。SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色显示用于饱和结合曲线分析的 GPCR 已经得到纯化 (图 2.11C)。20E-EIA 分析基于未标记的 20E (与 GPCR 结合的 20E) 和 AChE 标记的 20E (Tracer) 之间对有限特异性 20E 抗血清的竞争。这些数据进一步证实了 DopEcR-GFP 和 ErGPCR-2-GFP 可以结合 20E。

进一步研究分别过表达 DopEcR-GFP, DopEcR-M-GFP, GPCR2-GFP 和 GPCR2-M-GFP 的 HaEpi 细胞对 20E 响应的 cAMP 和  $Ca^{2+}$  水平。与过表达 DopEcR-M-GFP 的 HaEpi 细胞相比, 过表达 DopEcR-GFP 的 HaEpi 细胞在 20E 刺激下胞内 cAMP 的浓度增加到更高的水平 (图 2.11D)。此外, 与过表达 DopEcR-M-GFP 的细胞相比, 过表达 DopEcR-GFP 的 HaEpi 细胞在 20E 诱导下  $Ca^{2+}$  出现了快速细胞内释放和胞外流入 (图 2.11E)。这些数据表明 DopEcR 参与了 20E 诱导的快速细胞反应。在过表达 GPCR2-GFP 和 GPCR2-M-GFP 的 HaEpi 细胞中也观察到了相似的结果。

进一步分析了 DA 和 20E 与 DopEcR 的结合, 以解决两个配体与相同受体的关

系。DopEcR 与 DA 的  $K_d$  为  $447.5 \pm 100.6$  nM (图 2.11F), 表明 DopEcR 可以与 DA 结合。此外, 通过设置与  $K_d$  (450 nM) 等效的配体 DA 浓度和不同浓度的 20E 处理构建竞争结合曲线。对于 20E, 计算的解离常数 ( $K_i$ ) 为  $42.5 \pm 8.6$  nM (图 2.11G)。20E 竞争实验表明 20E 可以取代 DopEcR 中的 DA。这些数据表明, DopEcR 对 20E 的亲合力比 DA 高。

#### 4 讨论

DopEcR 可以结合 DA 或 20E, 但是, 结合的机制和效应尚不清楚。由于缺乏 GPCR 结合类固醇激素的直接证据, 因此尚未确定 GPCR 是否为类固醇激素受体。本研究提供了证据表明 20E 与 DopEcR 结合导致幼虫停止摄食并传递昆虫化蛹的信号。分离的 GPCR 可以结合 20E。20E 上调 DopEcR 表达以传递 20E 信号并促进鳞翅目昆虫化蛹。

##### 4.1 20E 与 DopEcR 结合导致幼虫停止进食并传导化蛹信号

多巴胺受体在动物运动功能和奖励动机行为中起着重要作用, 包括人类进食 (Coccurello and Maccarrone 2018) 和奖励诱发的进食行为 (Rebello and Greenway 2016)。多巴胺神经元功能的丧失会导致帕金森氏病 (Boyd and Mailman 2012) 和阿尔茨海默氏病 (Martorana and Koch 2014)。在幼虫生长阶段敲低 *DopEcR* 可以抑制幼虫摄食, 这表明 DopEcR 在幼虫摄食中发挥作用, 并且从昆虫到哺乳动物 DA 受体在食物消耗中的功能都是保守的。多巴胺与果蝇的行为动机和奖励有关系 (Burke et al. 2012), 多巴胺受体信号通路在果蝇的嗅觉关联中发挥作用 (Handler et al. 2019)。DA 功能的抑制可能影响运动功能或奖励动机行为的降低, 从而减少进食。

20E 可以降低家蚕的食物消耗 (Wang et al. 2010), 并通过直接作用于大脑的中枢神经系统来引发飞蝗的游走行为 (Dominick and Truman 1986), 但是, 机制尚不清楚。20E 抑制幼虫摄食并促进提前化蛹, 20E 可以结合 DopEcR 来抑制 DA 途径。从棉铃虫幼虫取食期的六龄 48 h 到幼虫游走阶段的六龄 120 h, 其 20E 滴度从  $0.5 \mu\text{M}$  增加到  $4.7 \mu\text{M}$ 。与 DA 相比, 蜕皮激素对 DopEcR 的亲合力高得多, 并且蜕皮激素具有的较大的分子体积占据了 DA 与受体的结合空间, 并抑制了 DA 介导的 cAMP 水平的升高 (Srivastava et al. 2005)。DopEcR 与 20E 和 DA 之间的关系仅通过 CHO 细胞和 Sf9 细胞的验证。此外, DopEcR 通过 cAMP 信号快速调节成年果蝇行为, 例如求偶记忆 (Ishimoto et al. 2013)。本研究提出了 20E 通过竞争结合 DopEcR 来抑制幼虫摄食并传递 20E 信号。因此, 当第六龄幼虫变态阶段 DopEcR 表

达增加时, 幼虫停止进食并开始化蛹。化蛹之前 DA 滴度的降低可能是由于幼虫脑的退化所致。蛹期 DA 滴度的升高可能与蛹期成虫脑的重塑有关, 有待进一步研究。

果蝇 DopEcR 突变体可以正常成长到成虫阶段。蘑菇体神经元中的 DopEcR 作为非基因组蜕皮激素受体, 可控制经验依赖的求偶行为 (Ishimoto et al. 2013), 并且 DopEcR 突变不致死。在本研究中, 敲降 *DopEcR* 导致化蛹延迟, 抑制幼虫摄食, 生长, 体重增加以及低死亡率, 表明 DopEcR 在生长期的幼虫摄食中起作用, 并在变态过程中充当 20E 受体。

GPCR 与  $G\alpha s$  和  $G\alpha q$  相互作用, 分别增加细胞内 cAMP 和  $Ca^{2+}$  水平进而激活 PKA 和 PKC 途径 (Marinissen and Gutkind 2001)。GPCR-cAMP-PKA 和 GPCR- $Ca^{2+}$ -PKC 途径参与动物类固醇激素非基因组途径的信号传导 (Marino et al. 2006)。20E 通过 DopEcR 引起 MBs 中 cAMP 含量的快速增加, 而 DopEcR 通过 cAMP 信号调节成虫行为, 从而介导 20E 的非蜕皮变态行为, 例如行为控制 (Ishimoto et al. 2013)。20E 诱导的 cAMP 增加, PKAC1 磷酸化促进 cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB) 的磷酸化, 该蛋白与 cAMP 反应元件 (CRE) 结合以增强棉铃虫 20E 调控的基因表达并促进化蛹 (Jing et al. 2016)。在 20E 诱导下, DopEcR 与  $G\alpha s$  和  $G\alpha q$  直接相互作用。20E 通过 DopEcR 增加 cAMP 和  $Ca^{2+}$  水平, 诱导 USP1, CDK10 和 PKAC1 的蛋白磷酸化, 并增加 EcRB1 与 EcRE 的结合。GPCR 在棉铃虫的细胞膜中传递 20E 信号 (Cai et al. 2014a; Wang et al. 2015)。非基因组 GPCR,  $G\alpha q$ , PLC1,  $Ca^{2+}$  和蛋白激酶 C (PKC) 信号级联已在棉铃虫中得到鉴定, 表明 PKC 途径的激活对于 USP 磷酸化和发生在 20E 基因组途径中基因转录是必要的 (Liu et al. 2014b; Ren et al. 2014)。20E 通过激活 GPCR, PLC1,  $Ca^{2+}$  和 CaMKII 信号通路触发 USP1 赖氨酸乙酰化, 这对于 EcRB1-USP1 转录复合物的形成和基因转录至关重要 (Jing et al. 2015)。ErGPCR-2 敲低阻止了 20E 诱导的钙增加以及 USP1 和 CDK10 的磷酸化, 从而抑制 20E 转录复合物 EcRB1/USP1 的形成 (Wang et al. 2015)。20E 通过磷脂酶 C- $\gamma$ -1 (PLCG1) 调节 USP1 的磷酸化, 并将 GPCR 介导的非基因组途径与核受体 EcRB1 介导的基因组途径联系起来 (Liu et al. 2014b; Wang et al. 2015)。研究结果证实了 DopEcR 在 20E 信号通路中的作用, 因此, 在末龄幼虫期敲降 *DopEcR* 可抑制化蛹。本研究首次阐明了 DopEcR 的双重功能和机制, 其既参与幼虫摄食行为又参与昆虫化蛹的 20E 途径。

#### 4.2 GPCR 结合 20E

过表达 GPCR 的细胞或细胞膜能够在果蝇 (Srivastava et al. 2005) 和哺乳动物

(Maggiolini and Picard 2010) 中结合类固醇激素。类固醇膜受体结合的亲和力比核受体的亲和力低几个数量级 (Falkenstein et al. 2000)。此外, 20E 类似物 $^3\text{H}$  Pon A 与 EcR/USP 核受体复合物的结合亲和力比 20E 高 1-2 个数量级 (Minakuchi et al. 2003)。果蝇中体外表达的 EcR/USP 异二聚体对 Pon A 的  $K_d$  值为 0.9 nM (Yao et al. 1993), 家蚕中  $K_d$  值为 1.1 nM (Swevers et al. 1996)。家蚕前丝腺细胞膜含有可能的蜕皮激素膜受体 mEcR, 对 $^3\text{H}$  Pon A 具有结合力,  $K_d$  为 17.3 nM,  $B_{\max}$  为 0.82 pmol/mg 蛋白质 (Elmogly et al. 2004)。从过表达 DmDopEcR 的 Sf9 细胞分离的膜蛋白对 $^3\text{H}$  Pon A 具有特异性结合,  $K_d$  为  $10.4 \pm 0.38$  nM,  $B_{\max}$  为  $0.32 \pm 0.04$  pmol/mg 蛋白 (Srivastava et al. 2005)。

本研究使用 20E-EIA 方法直接检测分离的 GPCR 结合 20E。检测到分离的 DopEcR 对 20E 表现出可饱和的特异性结合,  $K_d$  为  $17.98 \pm 3.005$  nM,  $B_{\max}$  为  $9.764 \pm 0.4953$  pmol/mg 蛋白。ErGPCR-2 对 20E 表现出可饱和的特异性结合,  $K_d$  为  $23.32 \pm 3.304$  nM,  $B_{\max}$  为  $10.42 \pm 0.6629$  pmol/mg 蛋白。DopEcR 和 ErGPCR-2 的  $K_d$  值与从 Sf9 细胞膜检测到的  $K_d$  数量级相同, 但是 DopEcR 和 ErGPCR-2 的  $B_{\max}$  值高于从 Sf9 细胞膜检测到的  $K_d$ 。棉铃虫分离 DopEcR 结合 20E 的  $K_d$  值 (17.98 nM) 高于果蝇中 EcR/USP 异二聚体结合 Pon A 的  $K_d$  值 (0.9 nM) (Yao et al. 1993), 这表明 GPCR 对 20E 的结合亲和力比核受体低, 这可能是多个 GPCR (例如 DopEcR 和 ErGPCR-2) 参与细胞膜 20E 信号传导的原因之一。但是, 20E 对 DopEcR 的亲和力比 DA 高, 并且可以抑制 DA 的作用, 并诱导快速的信号传导作用, 例如增加的  $\text{Ca}^{2+}$  和 cAMP 水平触发 20E 信号途径。

先前的研究表明, ErGPCR-1 和 ErGPCR-2 在鳞翅目昆虫棉铃虫中传递 20E 信号, 但无法通过同位素方法检测 ErGPCR-1 和 ErGPCR-2 与 20E 类似物 $^3\text{H}$  Pon A 的结合 (Cai et al. 2014a; Wang et al. 2015)。在本研究中, 证实了 20E-EIA 方法可以检测 ErGPCR-2 结合 20E。但是, 在这项研究中未检测到 ErGPCR-1 与 20E 的结合。在另一项研究中观察到激动剂发挥作用但是没有测量到特异性结合 (Evans et al. 1995), 可能是因为 GPCR 松散地或动态地与配体结合导致 (Nygaard et al. 2013; Strasser et al. 2017)。

### 4.3 20E 上调 DopEcR 表达

在人类中, 多巴胺受体调节各种生理过程, 包括奖赏, 自发运动 and 高血压 (Kebabian 1978), 多巴胺能信号不足或过度活跃会导致各种疾病 (Boyd and Mailman 2012), 因此, 多巴胺受体是常见的神经类药物靶标 (Joyce 2001)。多巴胺

能神经递质已被用于治疗各种精神和神经疾病，例如精神分裂症，躁郁症，帕金森病，亨廷顿氏病和图雷特综合症 (Beaulieu and Gainetdinov 2011)。甾体激素雌激素可以调节人中枢神经系统的神经传递，包括情绪，奖励和动机 (Krolick et al. 2018)。本研究观察到 20E 上调 DopEcR 表达并与 DopEcR 结合以阻断其 DA 通路的活性。除昆虫外，各种植物也产生 20E，例如蓝藻。研究结果提供了探索使用 20E 或其他植物甾醇治疗多巴胺相关疾病的可能性。

#### 4.4 多个 GPCR 传输 20E 信号

棉铃虫 DopEcR 属于 GPCRA 类（视紫红质样）受体，与果蝇 DmDopEcR 具有 68% 的同源性。ErGPCR-1 和 ErGPCR-2 属于 B 类受体（分泌蛋白受体）(图 2.12)。然而，棉铃虫 DopEcR 在变态过程中高表达，这与 DmDopEcR 不同，DmDopEcR 在第三阶段的幼虫中很少表达，但在第一，第二阶段的幼虫和成虫头中高表达 (Srivastava et al. 2005)，可能是因为双翅目和鳞翅目昆虫之间存在差异。20E 诱导 MB 中 cAMP 含量迅速增加，并通过 DopEcR 触发 cAMP 信号传导，调节果蝇成虫求偶行为 (Ishimoto et al. 2013)。DopEcR 主要在大脑中表达，然而，ErGPCR-1 和 ErGPCR-2 在表皮，脂肪体和中肠中广泛表达 (Cai et al. 2014a; Wang et al. 2015)。DopEcR 位于质膜中并且不内吞，这一点类似于 ErGPCR-1 (Cai et al. 2014a)，但不同于 ErGPCR-2，后者可以被 GPCR 激酶 2 (GRK2) 磷酸化内吞使 20E 信号脱敏 (Wang et al. 2015)。组织中 GPCR 的差异表达以及不同的 GPCR 识别同一 G 蛋白的特定位置 (Flock et al. 2017) 可能也解释了为什么多种 GPCR 参与到 20E 信号传导途径。

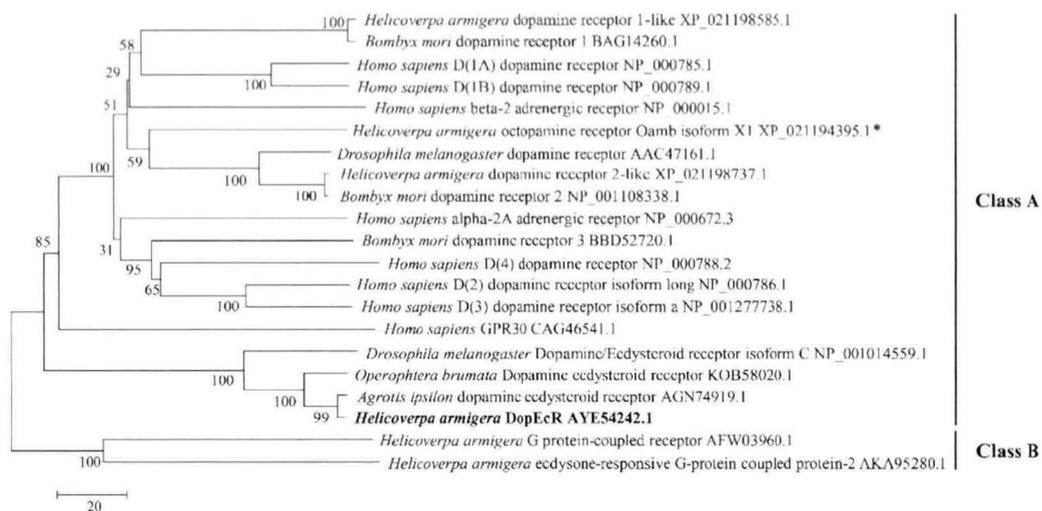
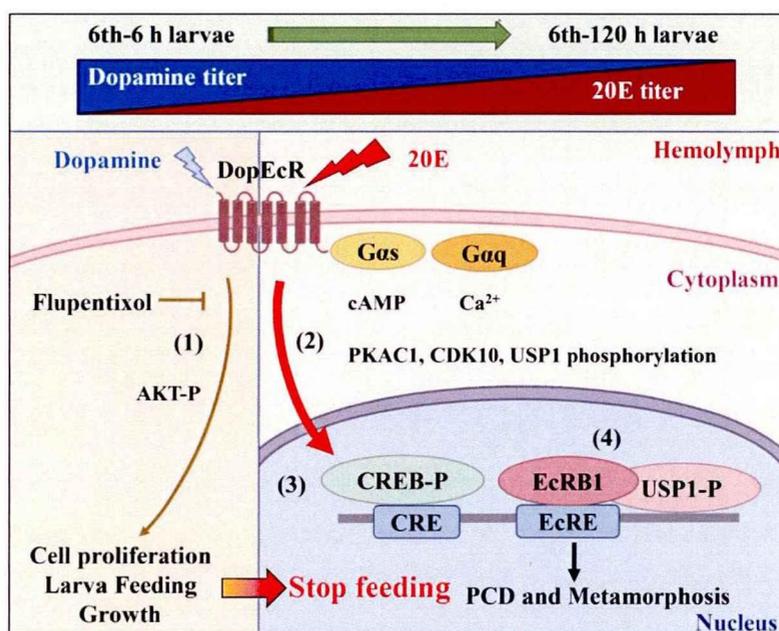


图 2.12. 不同物种中 DopEcR 的系统发生树。\*本文中章鱼胺受体 Oamb 亚型 X1 (XP\_021194395.1) 在先前的文章中被称为“DopEcR” (Liu et al. 2014b)。

**Figure 2.12. Phylogenetic tree of DopEcR in various species.** \*The octopamine receptor Oamb isoform X1 (XP\_021194395.1) in this article was named “DopEcR” in the previous article (Liu et al. 2014b).

### 5 结论

DopEcR 在幼虫进食阶段充当 DA 受体，促进 AKT 磷酸化，细胞增殖，幼虫进食和生长。20E 在变态过程中上调 DopEcR 的表达，并与 DopEcR 结合以阻断其在幼虫进食和细胞增殖中的功能。20E 触发 DopEcR 与 Gαq 和 Gαs 的相互作用，增加细胞内 Ca<sup>2+</sup>和 cAMP 的水平，并诱导蛋白质磷酸化，从而调节 20E 途径基因的表达以实现变态（图 2.13）。GPCR 可以结合 20E 并充当 20E 细胞膜受体的作用。



**图 2.13. DopEcR 控制幼虫进食和 20E 调控昆虫变态中的机制。**从六龄 6 h 增至六龄 120 h 幼虫血淋巴中的多巴胺滴度下降，整个幼虫的 20E 滴度上升。多巴胺通过 DopEcR 促进 AKT-P 水平以及幼虫进食和细胞增殖。多巴胺受体抑制剂氟戊醇抑制幼虫进食（1）。增加的 20E 与 DopEcR 结合以传递 20E 信号，包括 DopEcR 与 Gas 和 Gαq 的相互作用，cAMP 和 Ca<sup>2+</sup>水平的增加以及 PKAC1, CDK10 和 USP1 的蛋白质磷酸化（2）。磷酸化的 CREB（CREB-P）与 CRE 结合以促进 20E 调控的基因转录（Jing et al. 2016）（3）。磷酸化的 USP1 和 CDK10 导致 EcRB1/USP1 转录复合物的形成，并与蜕皮激素反应元件（EcRE）结合，以调节昆虫变态基因的表达（Liu et al. 2014a; Liu et al. 2014b）（4）。

**Figure 2.13. Diagram illustrating the roles of DopEcR in larval feeding and 20E-regulated metamorphosis.** Dopamine titer in hemolymph decreased and 20E titer in whole larvae increased from 6 instar 6 h to 6 instar 120 h larvae. Dopamine via DopEcR promotes the AKT-P levels and larval feeding and cell proliferation. The dopamine receptor inhibitor flupentixol represses larval feeding (1). The increased 20E binds to DopEcR for 20E signaling, including the interaction of DopEcR and Gas and Gαq, increase of cAMP and Ca<sup>2+</sup> levels, and protein phosphorylation of PKAC1, CDK10 and USP1 (2). The phosphorylated-CREB (CREB-P) binds to CRE to promote 20E-regulated gene transcription (Jing et al. 2016) (3). The phosphorylated-USP1 and CDK10 forms EcRB1/USP1 transcription complex and bind to ecdysone response element (EcRE) to regulate gene expression for insect metamorphosis (Liu et al. 2014a; Liu et al. 2014b) (4).

### 第三章 蜕皮激素诱导 G 蛋白偶联受体 3 形成同源四聚体传递信号并通过该受体易化扩散进入细胞

#### 1 引言

在哺乳动物中,雌激素与其核受体( $ER\alpha$  和  $ER\beta$ )结合以调节基因转录(Dahlman-Wright et al. 2006)。G 蛋白偶联受体(GPCR) GPR30/GPER 被确定为雌激素的细胞膜受体(Revankar et al. 2005)。动物类固醇激素可引起细胞钙离子和 cAMP 水平快速增加,并通过细胞膜受体使蛋白质磷酸化(Simoncini and Genazzani 2003)。在昆虫中,蜕皮激素与核受体(蜕皮激素受体, EcR)结合,与异二聚体伴侣超气门蛋白 USP 形成转录复合物,从而启动基因转录,例如激素受体 3(HR3)和 Broad-Complex (BR-C),以调节蜕皮和变态(Riddiford et al. 2001)。20E 还通过家蚕前丝腺中的 GPCR 触发细胞内  $Ca^{2+}$  的快速增加(Manaboon et al. 2009)。多巴胺/蜕皮激素受体(DmDopEcR)被认为是 20E 细胞膜受体,它与 20E 结合以调节黑腹果蝇蜕皮激素的非基因组途径(Srivastava et al. 2005)。越来越多的研究表明,GPCR 可以作为 20E 的细胞膜受体。在棉铃虫,20E 通过非基因组途径诱导细胞周期蛋白依赖性激酶 10(CDK10)的磷酸化(Liu et al. 2014a)。20E 通过 ErGPCR-1(Cai et al. 2014a)和 ErGPCR-2(Wang et al. 2015)传递信号,引发 20E 非基因组信号途径。20E 通过 ErGPCR-1 诱导磷脂酶 C- $\gamma$ -1(PLCG1)磷酸化并向细胞膜迁移以引发细胞  $Ca^{2+}$  增加,从而触发 PKC 介导的 USP1 磷酸化(Liu et al. 2014b)和乙酰化(Jing et al. 2015),促进 EcR/USP 转录复合物形成及基因表达。20E 通过 ErGPCR-2 增加 cAMP 水平,诱导 CREB(cAMP 响应元件结合)/PKA(蛋白激酶 A)磷酸化和 20E 响应基因表达(Jing et al. 2016)。棉铃虫的 ErGPCR-2 和 DopEcR 可以结合 20E(Kang et al. 2019)。因此,GPCR 是类固醇激素的膜受体。

GPCRs, 一类七次跨膜蛋白,构成了细胞膜受体最大的家族之一。GPCR 通过激活不同的异源三聚体 G 蛋白来传导光,有机气味剂,核苷酸,肽,脂质和蛋白等细胞外信号(Bockaert and Pin 1999)。Gas 和 G $\alpha_q$  亚基分别激活效应分子腺苷酸环化酶(AC)和磷脂酶 C(PLC),从而分别增加细胞内 cAMP 和  $Ca^{2+}$  的浓度(Marinissen and Gutkind 2001)。GPCR 可以形成同源多聚体或异源多聚体发挥其功能(Cheng and Miller 2001; Cheng et al. 2003)。胆囊收缩素受体(CCKR) A 型和 B 型的异源二聚化形成了一个更“强大”的信号传导单位,以增强信号传导并促进中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的生长(Cheng et al. 2003)。甲状旁腺激素受体(PTH1R)形成组成性二聚体,

通过配体结合而解离, 单体 PTH1R 能够激活 CHO 细胞中的 G 蛋白 (Pioszak et al. 2010)。GPCR 的寡聚化可以是组成型或配体激活型 (Ding et al. 2002; Kroeger et al. 2001; Pflieger and Eidne 2005)。GPCR B 家族原型分泌素受体 (prototypic secretin receptor) (Ishihara et al. 1991) 以组成型同源二聚体的形式存在于胰腺癌细胞系的质膜中 (Ding et al. 2002)。目前 GPCR 在类固醇激素信号转导中是否存在多聚体行使功能, 以及形成多聚体的分子机制尚不清楚。

动物类固醇激素是亲脂性激素, 它们通过细胞膜的被动扩散进入细胞 (Gorski and Gannon 1976; Plagemann and Erbe 1976)。但是, 一些研究表明, 类固醇激素需要转运蛋白才能进入细胞 (Milgrom et al. 1973; Pietras and Szego 1977)。在果蝇中, 蜕皮激素通过囊泡介导的过程从细胞中释放出来, 并通过转运蛋白而不是被动扩散进入细胞 (Yamanaka et al. 2015; Okamoto et al. 2018)。蜕皮激素进入果蝇细胞需要 Eci (Ecdysone Importer) (Okamoto et al. 2018)。ErGPCR-2 控制 20E 进入细胞 (Wang et al. 2015), 但是其机制尚不清楚。

在本研究中, 一种名为 GPCR-3 的 GPCR 被鉴定为 20E 的细胞膜受体。GPCR-3 在分离后可以结合细胞膜中的 20E。20E 结合并诱导 GPCR-3 的同源四聚化。GPCR-3 同源四聚体传输 20E 信号, 并作为转运蛋白促进 20E 的扩散进入细胞。这是 GPCR 通过形成同源四聚体充当 20E 转运蛋白和 20E 膜受体的第一个例子, 它证明了 20E 通过 GPCR 传递信号, 并提供了新的证据来支持类固醇激素的易化扩散机制。

## 2 实验材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 实验动物

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的实验室饲养见第二章。

#### 2.1.2 实验细胞

棉铃虫表皮细胞系的传代培养见第二章。

#### 2.1.3 实验试剂

辛酸双钠盐 (3-磺基-N-羟基琥珀酰亚胺酯, 双 (磺基琥珀酰亚胺基) 硫酸氢盐, BS3; Sigma Aldrich); Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (GK3603, Genview, Houston, TX, USA); 其它试剂见第二章。引物 (表 3.1) 由上海生工合成。

#### 2.1.4 实验仪器

流式细胞仪 (Amnis, 美国华盛顿州西雅图); 其他仪器见第二章。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 GPCR 筛选鉴定及生物信息学分析

在 2  $\mu$ M 20E 处理 12 h 的 HaEpi 细胞的转录组中筛选鉴定 GPCR, DMSO 处理作对照。使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测获得的 GPCR 的功能结构域。使用 ExPASy ProtParam 工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质的基本信息。使用 ClustalX 进行蛋白质氨基酸序列多重比对。MEGA 7.0 中的 Neighbor-Joining (NJ) 方法构建系统进化树。I-TASSER COACH (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COACH/>) 模拟预测 GPCR-3 的配体结合位点, PyMOL-v1.7 可视化三维结构并标记重要的结构特征。

### 2.2.2 虫体激素诱导

见第二章方法。

### 2.2.3 虫体和细胞 RNA 干扰

见第二章方法。

### 2.2.4 ChIP 分析

见第二章方法。

### 2.2.5 抗 GPCR-3 抗血清制备

见第二章方法。

### 2.2.6 蛋白质免疫印迹

见第二章方法。

### 2.2.7 HE 染色

见第二章方法。

### 2.2.8 钙离子检测

见第二章方法。

### 2.2.9 cAMP 检测

见第二章方法。

### 2.2.10 HaEpi 细胞蛋白质过表达和 Co-IP

见第二章方法。

### 2.2.11 蛋白质的磷酸化检测

cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB; GenBank 登录号 KT207931), 超气门蛋白 1 (USP1; GenBank 登录号 EU526832), 细胞周期蛋白依赖性激酶 10 (CDK10; GenBank 登录号 KC188798) 和蛋白激酶 A 催化亚基 1 (PKAC1; GenBank 登录号

KT207930) 的 ORF 分别插入到载体 pIEx-4-His。重组质粒在 HaEpi 细胞中转染 36 h, 然后用 *dsGPCR-3* 或 *dsGFP* 转染细胞 24 h, 然后与 2  $\mu$ M 20E 孵育 30 min。DMSO 作对照。40  $\mu$ L 蛋白 (2  $\mu$ g/ $\mu$ L), 0.5  $\mu$ L  $\lambda$ PP, 5  $\mu$ L 缓冲液, 5  $\mu$ L MnCl<sub>2</sub> (共 50  $\mu$ L) 30  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。加入 SDS-PAGE 蛋白处理液, 煮沸 10 min, 然后通过蛋白质印迹法检测。Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和柱纯化 CREB-RFP-His, 然后用 P-(Ser/Thr) PKA 底物抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 通过蛋白质印迹法检测。

使用细胞膜和细胞质蛋白提取试剂盒 (Beyotime, 中国上海) 与蛋白酶和磷酸酶抑制剂 (Roche Diagnostics, 曼海姆, 德国) 分离膜和细胞质蛋白。40  $\mu$ L 蛋白 (2  $\mu$ g/ $\mu$ L), 0.5  $\mu$ L  $\lambda$ PP, 5  $\mu$ L 缓冲液, 5  $\mu$ L MnCl<sub>2</sub> (共 50  $\mu$ L) 30  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。基于蛋白分子量的变化检查蛋白质的磷酸化。 $\beta$ -actin 和考马斯亮蓝染色分别用作细胞质和细胞膜蛋白校正。为了检测 GPCR-3 磷酸化的水平, GPCR-3-GFP-His, 突变体 (GPCR-3- $\Delta$ C-terminal-GFP-His), *dsGRK2* (KT364485.1) 和 *ds $\beta$ -arrestin-1* (KP027422.1) 转染 HaEpi 细胞 48 h, 然后 1  $\mu$ M 20E 孵育 15 min。HaEpi 细胞用氯丙嗪 (CPZ, 50  $\mu$ M) 处理 2 h, 然后用 1  $\mu$ M 20E 处理 15 min。*dsGFP* 作阴性对照。随后, 细胞与 2  $\mu$ M 20E 或 DMSO 孵育 30 min。使用 25  $\mu$ M 氯喹 CQ 处理细胞检测 GPCR-3 内化后的命运。

### 2.2.12 免疫细胞化学

见第二章方法。

### 2.2.13 GPCR-3 的结构模拟和与配体的分子对接

见第二章方法。

### 2.2.14 检测 HaEpi 细胞的细胞膜结合的 20E 和 GPCR 与 20E 的饱和结合曲线

见第二章方法。

### 2.2.15 检测组织和细胞内 20E 滴度

取 5 只六龄 96 h 幼虫并分离出 10 mg 的中肠和翅, 冷冻干燥过夜。将粉末溶解在 200  $\mu$ L 的 80% 甲醇中, 并在预冷研钵中充分研磨。10,000 $\times$ g 离心 10 min 后, 上清液在室温下风干。用 100  $\mu$ L EIA 缓冲液充分溶解沉淀。检测 20E 浓度时, 每个样品用 EIA 缓冲液稀释 1,000 倍。使用 20E 酶联免疫分析 (20E-EIA) 试剂盒检测样品中的 20E。*dsGRK2* 和 *dsGPCR-3* 分别转染 HaEpi 细胞 48 h。*dsGFP* 作对照。GPCR-3-GFP-His 和 *dsGRK2* 共转染 HaEpi 细胞中 48 h。使用 GPCR-3-GFP-His 和 *dsRFP* 作对照。然后在 2  $\mu$ M 20E 的培养基中孵育 30 min。使用 20E-EIA 试剂盒检测细胞内的 20E 含量。

### 2.2.16 多聚化测定

辛二酸双钠盐（3-磺基-N-羧基琥珀酰亚胺酯，双（磺基琥珀酰亚胺基）硫酸氢盐，BS3）具有一个带电基团，可用于交联细胞表面蛋白（Friedrichson and Kurzchalia 1998; Angers et al. 2000），根据说明进行蛋白交联。收集 HaEpi 细胞和组织，DPBS 洗涤 3 次，然后与含有 1  $\mu\text{M}$  20E 或等浓度的 DMSO 的 DPBS 孵育。重悬的 HaEpi 细胞和组织匀浆在 5 mM BS3 的 DPBS 中室温下孵育 1 h。添加 Tris-HCl (pH 7.5) 至终浓度为 20 mM 以终止交联反应。将经交联处理的 HaEpi 细胞和组织匀浆进行充分匀浆，然后进行蛋白质印迹分析。

### 2.2.17 检测细胞增殖和凋亡

用 0.5–5  $\mu\text{M}$  20E 处理 HaEpi 细胞 48 或 72 h。DMSO 作对照。使用了 Phospho-Histone H3 (Ser10) 抗体（兔多克隆抗体，Cat. 9701, Cell signaling technology, Boston, MA, USA）检测细胞增殖。细胞用 DAPI (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 室温黑暗中孵育 10 min 进行细胞核染色，并使用激光扫描共聚焦显微镜进行观察。Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (GK3603, Genview, Houston, TX, USA) 和流式细胞仪 (Amnis, Seattle, WA, USA) 检测细胞凋亡。Annexin V-FITC 通过与膜磷脂酰丝氨酸结合来染色较早的凋亡细胞，而 Propidium Iodide (PI) 通过进入细胞指示较晚的凋亡细胞和死细胞。

### 2.2.18 细胞膜通透性检测

将 GPCR-3-GFP-His, GPCR-3-M-GFP-His 和 GPCR-3- $\Delta\text{C-terminal}$ -GFP-His 分别转染到 HaEpi 细胞中。通过离心收集细胞，并重悬于 PBS 中，与 5  $\mu\text{M}$  PI 在 25 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 10 min。使用流式细胞仪 (Amnis, Seattle, WA, USA) 检测荧光。

### 2.2.19 数据分析

见第二章方法。

表 3.1. 本研究中使用的 PCR 引物序列  
Table 3.1. The PCR primer sequences used in this study

Primer name	(5'→3') nucleotide sequence
<b>RNAi primers</b>	
GPCR-3-RNAiF	gcgtaatacagactcactataggggtggtgccgctgtccgtat
GPCR-3-RNAiR	gcgtaatacagactcactataggtccgtgtcgaaattagcttc
GPCR-3-swRNAiF	tactcaagatctggtggtgccgctgtccgtat
GPCR-3-swRNAiR	tactcaggtaccttccgtgtcgaaattagcttc
GFP-RNAiF	gcgtaatacagactcactataggtggtcccaattctctggaac
GFP-RNAiR	gcgtaatacagactcactataggttgaagtgacctgatgcc
GFP-swRNAiF	tactcagcggccgctggtcccaattctctggaac
GFP-swRNAiR	tactcactcgagcttgaagtgacctgatgcc
<b>qRT-PCR primers</b>	
GPCR-3-QF	actacgtatgcttacacggcca
GPCR-3-QR	tgagccagaacgtgcagaccat
HHR3-QRTR1	gactttgctgatgtcaccctccgc
HHR3-QRTF1	tcaagcacctcaacagcagcccta
EcRB1-QRTF1	aattgcccgctcagtacga
EcRB1-QRTR1	tgagcttctcattgagga
USP1-QRTF1	ggtcctgacagcaatgtt
USP1-QRTR1	ttccagctccagctgactgaag
BrZ7F	ggtgactgtccttactgcggc
BrZ7R	ttaattcctttgacctgact
β-actinF	cctggattctgaccgtatgc
β-actinR	ctgttggaagggtgagaggaa
CHIP F	taacgccttcagtaccgattt
CHIP R	gtcaggtcaccgctaaca
<b>Expression</b>	
HaGPCR-3-expF	tactcagaattacatcattgcctctttctca
HaGPCR-3-expR	tactcactcgagctcgggttgacaggttct
<b>Overexpression</b>	
OV ErGPCR-2-F	tactcagagctcatgattacattcataacagt
OV ErGPCR-2-R	tactcactgcagaggctgtttgatgttgagcgac
OV ErGPCR-1-F	tactcactgcagatgattacattcataaca
OV ErGPCR-1-R	tactcaggtaccaaattcgcattagtctgt
OV GPCR-3-F	tactcagagctcatgcctccaagatgatgagc
OV GPCR-3-R	tactcaagatctggtcgtcgttccaggccgat
OV Gaq-F	tactcagagctcatggagtgtcgtcatgtcgg
OV Gaq-R	tactcactgcagtgctagattaattccttga
OV Gas-F	tactcagagctcatggatgcttcggctcg
OV Gas-R	tactcaagatctggagcagctcgtactgccg

### 3 实验结果

#### 3.1 GPCR-3 参与 20E 信号途径

为了鉴定参与 20E 信号途径中的 GPCR，2 μM 20E 诱导 HaEpi 12 h，以 DMSO 作对照，进行转录组测序。检测到 13 个 GPCR 发生了两倍以上差异表达，其中六个被上调，七个被下调（图 3.1）。为了证实 GPCRs 参与 20E 途径，向棉铃虫第六龄 6 h 幼虫中注入 dsRNA 来敲低 20E 上调表达的 *GPCR*，检查 20E 诱导后的 20E 途径基因的转录，包括蜕皮激素核受体 *EcRB1*，异二聚体伴侣 *USP1* 和转录因子 *HHR3* 和 *BrZ7*。*GPCR-5*、*3*、*24*、*49*、*55* 和 *56* 被 20E 诱导上调；然而，仅发现 *GPCR-3* 与

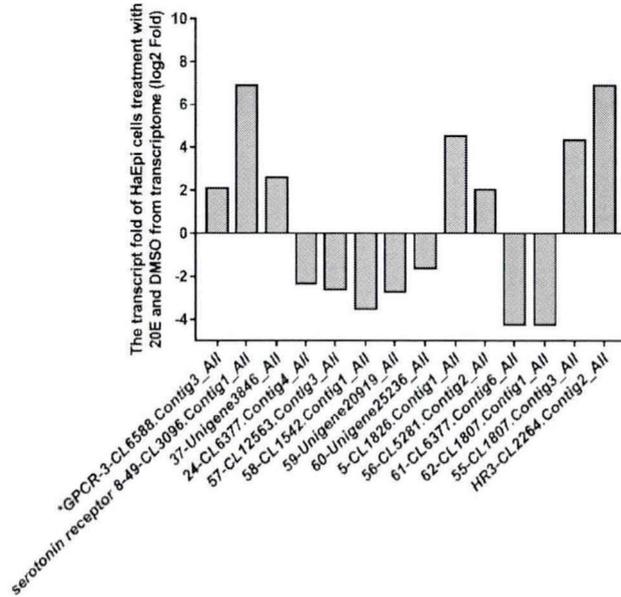


图 3.1. 与 DMSO 相比,用 20E 处理的 HaEpi 细胞的转录组中两倍以上差异表达的 GPCR。纵坐标表示  $\log_2$  (20E 处理/DMSO 处理)。\*表示 GPCR-3。

Figure 3.1. The fold of GPCR transcripts from the transcriptome of HaEpi cells treated with 20E, compared with DMSO. The ordinate indicates  $\log_2$ (20E treatment/DMSO treatment). \* indicates GPCR-3.

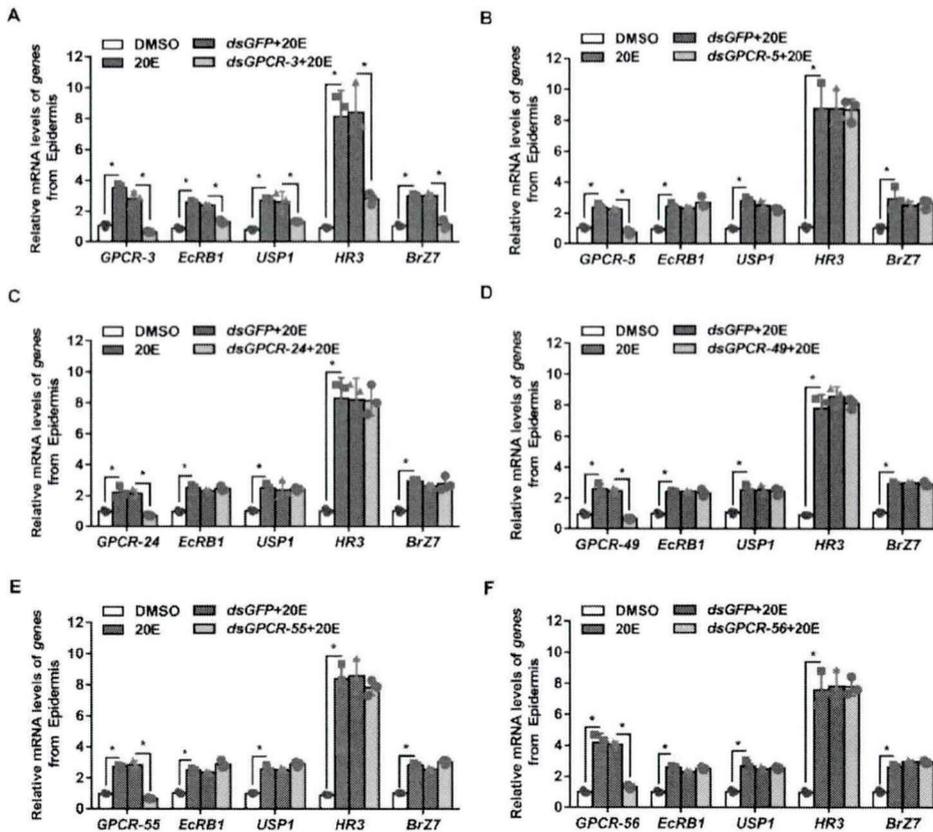
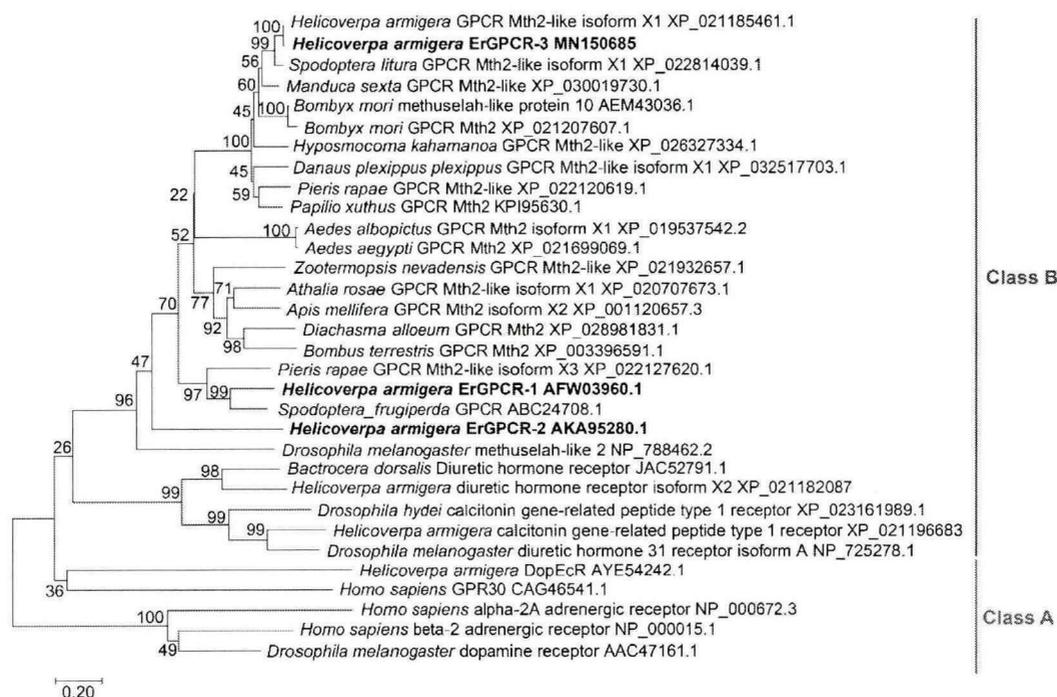


图 3.2. qRT-PCR 筛选参与 20E 诱导基因表达的 GPCR。(A-F)敲降不同 GPCR 后的 HR3, EcRB1, USP1 和 BrZ7 的表达。2  $\mu$ g/mL dsGPCR 孵育细胞 24 h, 然后 1  $\mu$ M 20E 孵育细胞 6

h. 误差线表示三个重复的平均值±SD。星号表示根据 *t* 检验存在显著差异 (\**p* < 0.05)。  
**Figure 3.2. Screen of the target GPCRs involved in 20E-induced genes expression by qRT-PCR.** Panels are the expression of *HHR3*, *EcRBI*, *USP1*, and *BrZ7* after knockdown of the GPCRs, individually. The cells were incubated with *dsGPCR* at 2 μg/mL for 24 h, and then cultured with 20E at 1 μM for 6 h. Error bars represent the mean ± SD of three replicates. Asterisks indicate significant differences according to Student's *t*-tests (\**p* < 0.05).

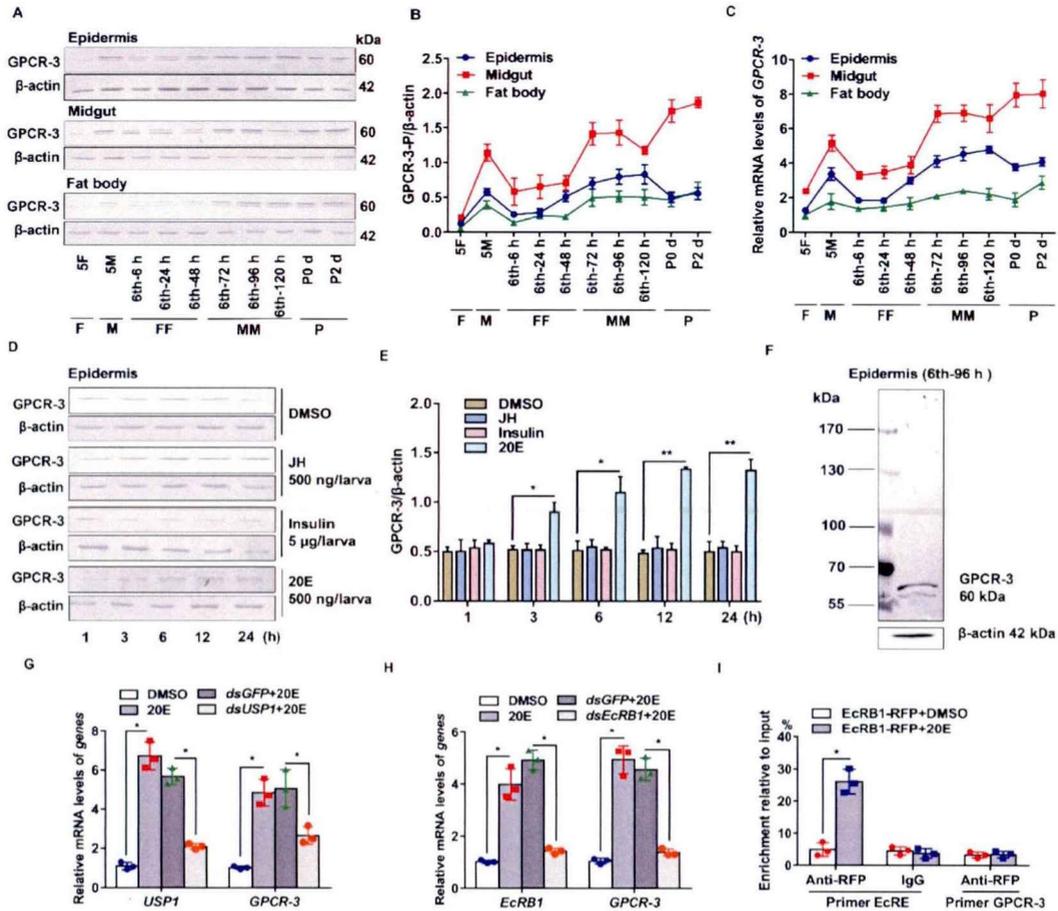
20E 诱导的基因表达相关 (图 3.2)。棉铃虫 GPCR-3 (MN150685) 属于 GPCR B 类受体 (Secretin 受体 Mth2-like), 与 *D. melanogaster methuselah-like 2* (NP\_788462.2) 具有 28.33% 的同源一致性, 与家蚕 Mth2 (XP\_021207607) 具有 62.17% 的同源一致性, 与棉铃虫 ErGPCR-1 (AFW03960.1) 的同源一致性为 33.03%, 与棉铃虫 ErGPCR-2 (AKA95280.1) 的同源一致性为 32.22% (图 3.3)。因此, 选择 GPCR-3 来确定其在 20E 信号传导中的功能和作用机制。



**图 3.3. 基于氨基酸序列 (NJ 方法) 构建棉铃虫 GPCR-3 与其他 GPCR 的系统发育树。** GenBank 登录号位于拉丁文名称的后面。加粗字体为棉铃虫 ErGPCR-1, 2 和 3。  
**Figure 3.3. Phylogenetic tree of GPCR-3 from *H. armigera* and the GPCRs based on the amino acid sequence (NJ method).** Numbers above branches support values (%) based on 1,000 replicates are indicated, the scale bar represents 0.1% amino acid substitutions per site, and the GenBank accession numbers are behind the Latin names. Bold font indicates *H. armigera* ErGPCR-1, 2 and 3.

### 3.2 GPCR-3 变态过程中表达上调

为了研究 GPCR-3 在棉铃虫发育中的功能, 检查了 GPCR-3 的发育表达模式。GPCR-3 在表皮、中肠和脂肪体内均有表达。GPCR-3 蛋白质和 mRNA 水平在五龄蜕皮 (5M) 和变态阶段 (六龄 72 h 至 120 h) 增加 (图 3.4A, B 和 C)。使用 Western



**图 3.4. 20E 通过 EcR-USP1 上调 GPCR-3 表达。** (A) 蛋白质印迹检测的 GPCR-3 的表达模式。β-actin 作为参照。5F: 5 龄取食幼虫, 5M: 5 龄蜕皮幼虫; 6th-0 h: 6 龄 0 h 幼虫; 6th-24 h 至 6th-120 h: 六龄 24 h 幼虫至六龄 120 h 幼虫; P-0 d 至 P-2 d: 蛹的第 0 天至第 2 天。F: 取食阶段, M: 蜕皮阶段, MM: 变态蜕皮阶段, P: 蛹期。Western blot 中的 SDS-PAGE 凝胶浓度为 7.5%。(B) 使用 ImageJ 软件根据三个独立重复的实验对 A 进行统计。(C) qRT-PCR 分析 GPCR-3 mRNA 水平。(D) 虫体激素刺激检测幼虫表皮中 GPCR-3 蛋白含量。将 JH III (500 ng/幼虫), 胰岛素 (5 μg/幼虫) 或 20E (500 ng/幼虫) 注射到六龄 6 h 幼虫中。注入等体积的 DMSO 作对照。(E) 通过 ImageJ 软件根据三个独立重复的实验对 D 进行统计分析。(F) GPCR-3 的抗体在 6th-96 h 幼虫的表皮蛋白中进行抗体特异性分析。(G) 和 (H) *dsEcR1* 和 *dsUSP1* (1 μg/mL 处理 48 h) 敲低 *EcR1* 和 *USP1* 后, HaEpi 细胞中 2 μM 20E 诱导 6 h 后, 检测 GPCR-3 的 mRNA 水平。*dsGFP* (1 μg/mL, 48 h) 为阴性对照。DMSO 是 20E 的对照。(I) 使用引物 (表 3.1) 对 *EcR1* 结合到 GPCR-3 的上游区域进行 ChIP 分析。*EcR1*-RFP-His 在 HaEpi 细胞中过表达 72 h。用 2 μM 20E 处理细胞 3 h。DMSO 处理作对照。所有实验均进行三次生物学重复, 并使用 Student *t* 检验进行差异性分析 (\* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01)。误差线表示重复三次的平均值 ± 标准偏差 (SD)。

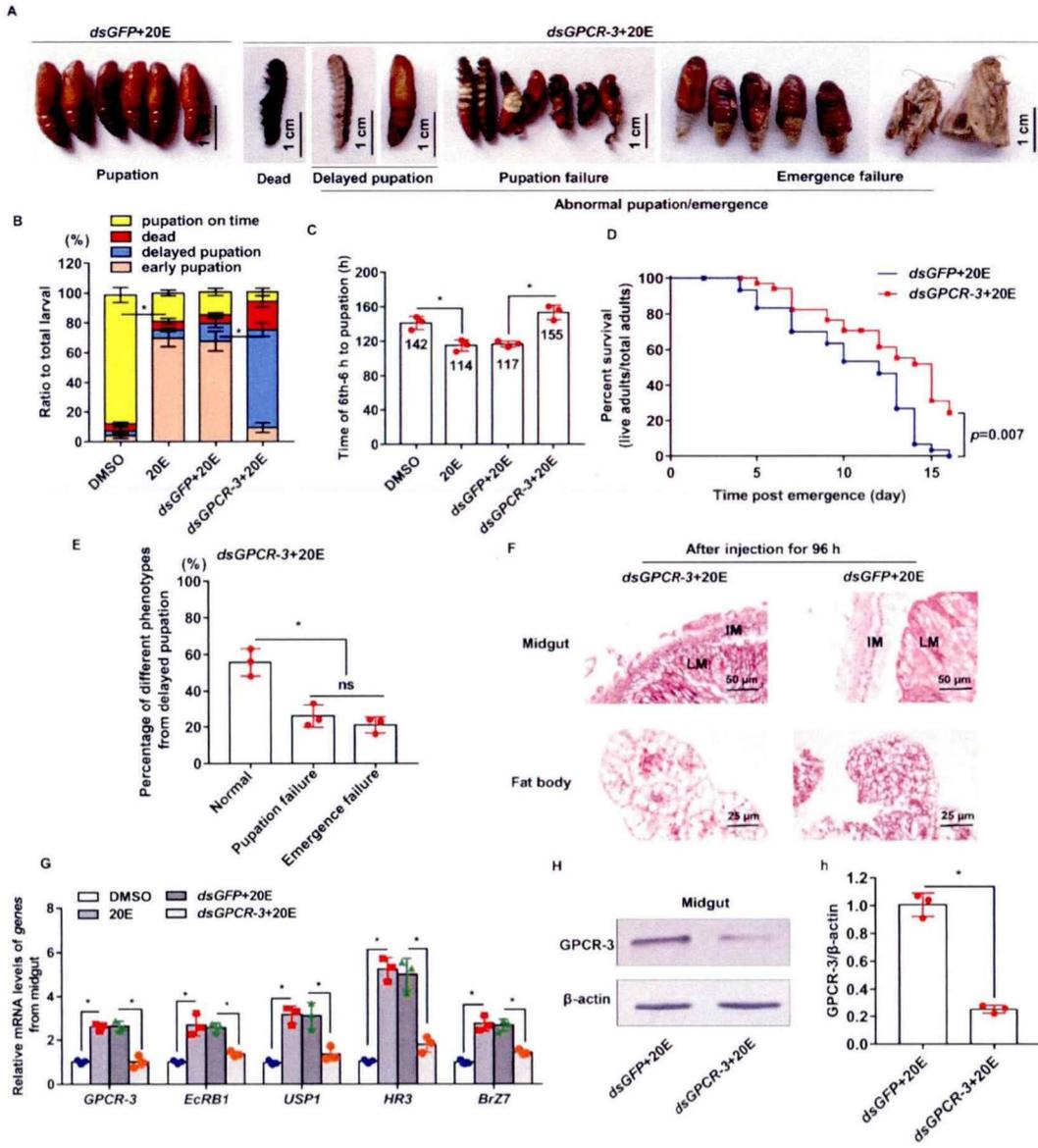
**Figure 3.4. 20E upregulates GPCR-3 expression.** (A) Expression profiles of GPCR-3 detected by anti-GPCR-3 polyclonal antibodies by western blotting. β-actin was detected by the antibodies as the protein quality control. 5F: 5th instar feeding larvae, 5M: 5th instar molting larvae; 6th-0 h: 6th instar at 0 h larvae; 6th-24 h to 6th-120 h: 6th instar 24 h larvae to 6th instar 120 h larvae; P-0 d to P-2 d: pupal stage at 0 day to pupal stage at 2 day. F: feeding stage, M: molting stage, MM: metamorphic molting stage, P: pupae. SDS-PAGE gel in western blot is 7.5%. (B) Calculation of A according to three independent replicates using ImageJ software. (C) mRNA levels of GPCR-3 using qRT-PCR analysis. (D) Western blot of hormonal regulation on GPCR-3 in larval epidermis. JH III (500 ng/larva), insulin (5 μg/larva) or 20E (500 ng/larva) was injected into the 6th instar 6 h larvae. Equal volume of DMSO was injected as a control. (E) Statistical analysis of D according to

three independent replicates by ImageJ software. (F) Specificity analysis of the antibodies against GPCR-3 by western blotting with epidermis protein of the 6th-96 h larvae. (G) and (H) The mRNA levels of *GPCR-3* after knockdown of *EcRBI* and *USP1* by *dsEcRBI* and *dsUSP1* (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 48 h) followed 20E (2  $\mu\text{M}$  for 6 h) induction in HaEpi cell. *dsGFP* (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 48 h) was the negative control. DMSO was the solvent control for 20E. (I) ChIP assay of EcRBI binding to the upstream region of *GPCR-3* using primers (Table S1). EcRBI-RFP-His was overexpressed in HaEpi cells for 72 h. The cells were treated with 2  $\mu\text{M}$  20E for 3 h. DMSO treatment was used as a control. All experiments were performed in triplicate, and statistical analysis was conducted using Student's *t*-test ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ). Error bars indicate the mean  $\pm$  standard deviations (SD) of three times repetition.

印迹发现 20E 注射到六龄 6h 幼虫中, *GPCR-3* 的表达增加 (图 3.4D 和 E)。同时检测了抗体对 *GPCR-3* 的特异性 (图 3.4F)。敲低 *EcRBI* 和 *USP1* 后, *GPCR-3* mRNA 水平下降 (图 3.4G 和 H)。使用启动子结合位点预测软件 ([http://jaspar.binf.ku.dk/cgi-bin/jaspar\\_db.pl](http://jaspar.binf.ku.dk/cgi-bin/jaspar_db.pl)) 在 *GPCR-3* 的基因组 DNA 5'-上游区域中预测到含有蜕皮激素受体结合元件 (EcRE) 的序列 (5'-56-GCGTTCATAGA AACTT-42-3')。核心区域 5'-TCAATG-3' 与 *HHR3* 中的 EcRE 保守 (Liu et al. 2014b)。染色质免疫沉淀 (ChIP) 实验证实 EcRBI-RFP-His 结合至该 DNA 片段 (图 3.4I)。这些结果表明在蜕皮和变态期间, *GPCR-3* 表达被 20E 上调。

### 3.3 *GPCR-3* 干扰抑制 20E 诱导的化蛹、组织重塑和基因表达

为了检查 *GPCR-3* 在 20E 调控变态中的功能, 通过将 *dsGPCR-3* 注入六龄 6h 幼虫中敲低 *GPCR-3*。20E 导致幼虫提前化蛹; 然而, 与注射 *dsGFP*+20E 的幼虫相比, *dsGPCR-3*+20E 不能促进化蛹, 会引起化蛹延迟、化蛹失败和羽化失败 (图 3.5A 和 B)。注射 20E 的幼虫使化蛹的起始时间平均提前 28 h; 然而, 与注射 *dsGFP*+20E 的幼虫相比, 注射 *dsGPCR-3*+20E 的幼虫化蛹时间延迟 38 h (图 3.5C)。此外, *dsGPCR-3*+20E 处理缩短了成虫期寿命 (图 3.5D)。*dsGPCR-3*+20E 处理延迟化蛹的棉铃虫中, 正常化蛹、化蛹失败和羽化失败的发生率分别为 43%、26% 和 21% (图 3.5E)。苏木精和曙红染色表明, *dsGPCR-3*+20E 抑制了中肠和脂肪体的重塑 (图 3.5F)。*GPCR-3* 显著敲低后, 中肠 20E 通路中的关键基因, 包括 *EcRBI*, *USP1*, *BR-Z7* 和 *HHR3* 的表达均被抑制 (图 3.5G)。蛋白质印迹证实了 RNA 的干扰效率 (图 3.5H 和 h)。免疫组织化学显示, *GPCR-3* 主要定位在六龄 96 h 幼虫的幼虫中肠 (图 3.6), 表明 *GPCR-3* 在变态过程中的幼虫中肠中起作用。这些结果表明, *GPCR-3* 参与了 20E 调控的变态及中肠调亡。



**图 3.5. dsRNA 注射敲降 *GPCR-3* 延迟化蛹。** (A) *GPCR-3* 敲降后的表型 (六龄 6 h 注射 500 ng *dsRNA*/幼虫, 间隔 18 h 一次, 一共三次), 第三次注射 (500 ng 20E/幼虫)。根据 DMSO 对照组在六龄幼虫 120 h, 蛹期第 2 天和成虫期第 2 天进行虫体图像收集。(B) A 图表型百分比。(C) 六龄 0 h 幼虫到化蛹的时间统计分析。数据来自 30 个幼虫×3 个实验。(D) 成虫的生存曲线。每半天对成虫进行监测。使用 GraphPad Prism 5.0 软件计算 *p* 值。(E) 延迟化蛹中不同表型的百分比。(F) 敲低 *GPCR-3* 后, 中肠和脂肪体的 HE 染色。*dsGFP* 作对照。LM: 幼虫中肠; IM: 成虫中肠。(G) qRT-PCR 显示 *GPCR-3* 敲低后六龄 72 h 幼虫 20E 响应基因的 mRNA 水平。(H) 和 (h) Western blot 检测 *GPCR-3* 的干扰效率。 $\beta$ -actin 蛋白作对照。所有实验均重复三次。误差线表示平均值±SD。星号表示基于三个重复样本的 *t* 检验差异显著性分析 (\**p* < 0.05), ns 表示没有显著性差异。

**Figure 3.5. *GPCR-3* silence by dsRNA injection delayed pupation.** (A) Phenotypes after *GPCR-3* knockdown (500 ng/larva at sixth instar 6 h, thrice at an 18 h interval) and 20E treatment (500 ng/larva) at the third injection. Images were obtained at six instar larvae 120 h, pupal stage at 2 day and adult stage at 2 day according to the DMSO control group. (B) Percentages of the phenotype in A. (C) Statistical analysis of pupation time from 6th instar 0 h larvae to pupae. The data were calculated from 30 larvae × 3 experiments. (D) The survival rate of adult. Dead adults were monitored every half-day. *p* value was calculated using the GraphPad Prism 5.0 software. (E)

Percentage of different phenotypes from delayed-pupation. (F) HE-stained midgut and fat body after knockdown of *GPCR-3*. *dsGFP* was used as a control. LM: larval midgut; IM: imaginal midgut. (G) qRT-PCR showing the mRNA levels of 20E-response genes after *GPCR-3* knockdown in larvae at 6th 72 h. (H) and (h) Western blot showing the efficiency of *GPCR-3* knockdown, analyzed by ImageJ software.  $\beta$ -actin was used as control. All experiments were performed in triplicate. The bars indicate the mean  $\pm$  SD. Asterisks indicate significant differences using Student's *t*-test based on three replicates ( $*p < 0.05$ ). ns denotes no significant difference.

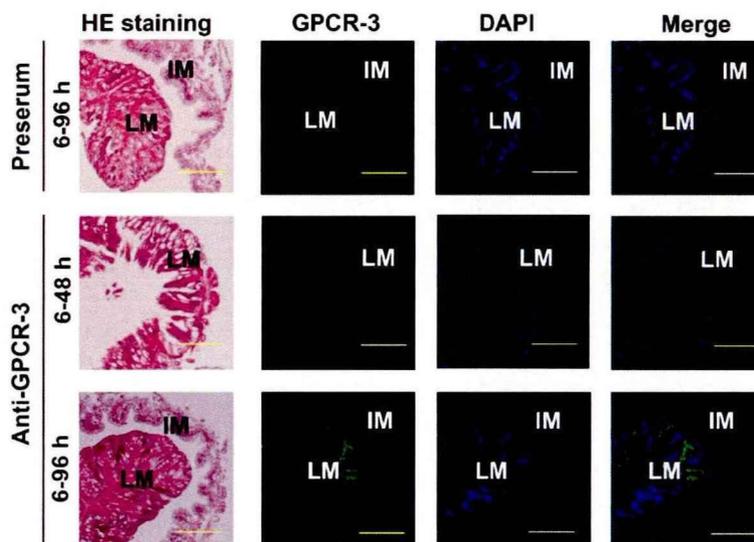


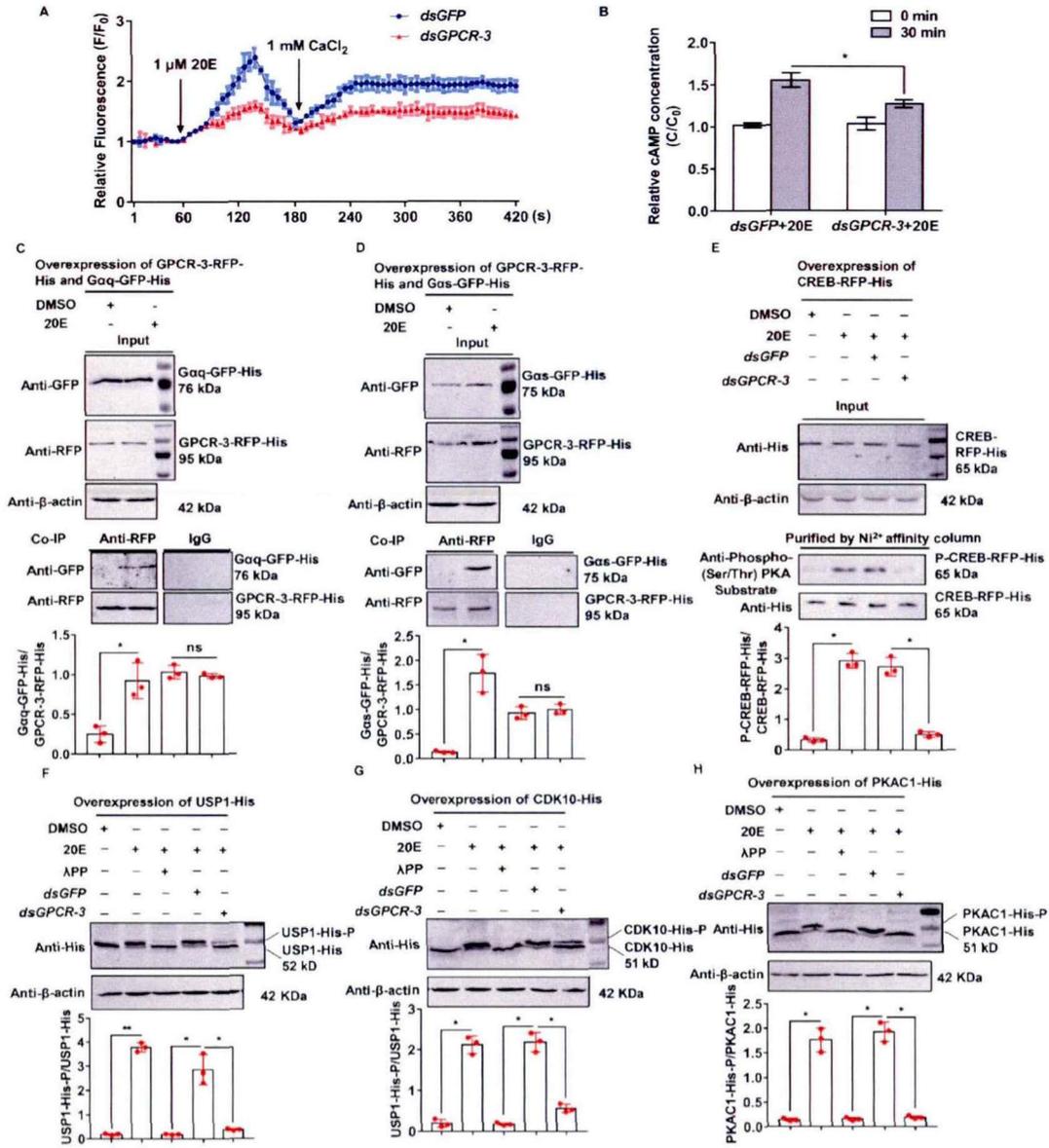
图 3.6. 免疫组织化学分析显示 *GPCR-3* 主要定位在变态期间幼虫中肠。抗 *GPCR-3* 的兔多克隆抗体作一抗，山羊抗兔 Alexa Fluor 488 抗体作二抗。前血清作阴性对照。苏木精和曙红（HE）染色显示中肠形态，绿色荧光表示 *GPCR-3*，细胞核用 DAPI（蓝色）染色。LM：幼虫中肠；IM：成虫中肠。比例尺指示 100  $\mu$ m。

**Figure 3.6. *GPCR-3* localization in the larval midgut during metamorphosis by immunohistochemical analysis.** Rabbit polyclonal antibodies against *GPCR-3* were used as the primary antibody and goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 antibodies were used as the secondary antibody. The pre-serum was used as the negative control. Hematoxylin and eosin (HE) staining showing the morphology of the midgut; Green fluorescence indicates *GPCR-3*; Nuclei were stained with DAPI (blue). LM: larval midgut; IM: imaginal midgut. Scale bar indicates 100  $\mu$ m.

### 3.4 *GPCR-3* 参与了 20E 诱导的快速细胞反应和蛋白质磷酸化

在 HaEpi 细胞中检测 *GPCR-3* 参与 20E 诱导的  $Ca^{2+}$  和细胞内 cAMP 水平，以明确其在 20E 信号传导中的作用。20E 诱导了  $Ca^{2+}$  细胞内快速释放和细胞外  $Ca^{2+}$  的流入。但是，敲低 *GPCR-3* 减少了 20E 诱导的  $Ca^{2+}$  释放和流入（图 3.7A）。同样，*GPCR-3* 敲低后，20E 诱导的 cAMP 水平升高也受到抑制（图 3.7B）。这些数据表明 *GPCR-3* 参与了 20E 诱导的快速细胞反应。

*GPCR* 通过 *Gaq* 促进细胞内  $Ca^{2+}$  增加，并通过 *Gas* 刺激 cAMP 增加 (Vines 2012; Kang et al. 2019)；因此，分别通过在 HaEpi 细胞中共过表达 *GPCR-3*-RFP-His 与 *Gaq*-GFP-His 或 *Gas*-GFP-His 来检查 *GPCR-3* 与 *Gas*/*Gaq* 之间的相互作用。Input 显示了 *Gaq*-GFP-His, *Gas*-GFP-His 和 *GPCR-3*-RFP-His 相等的表达水平。免疫共沉淀



**图 3.7. GPCR-3 参与 20E 诱导的快速反应和蛋白质磷酸化。** (A) *GPCR-3* 敲低后 HaEpi 细胞中的  $Ca^{2+}$  水平。 *dsGFP* 或 *dsGPCR-3* (在培养基中终浓度为  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 孵育细胞 48 h。 AM 酯深红色钙染料 ( $3 \mu\text{M}$ ) 孵育 30 min。 F0: 不同处理前 HaEpi 细胞的荧光强度。 (B) *GPCR-3* 敲低后 HaEpi 细胞中的 cAMP 水平。 *dsGPCR-3* 或 *dsGFP* ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理 48 h。 20E ( $2 \mu\text{M}$ )。 (C) 和 (D) 在 20E 诱导下 ( $2 \mu\text{M}$ , 30 min) *GPCR-3* 与 *Gaq* 和 *Gas* 偶联。 DMSO 作溶剂对照。 Input: GFP 或 RFP 抗体检测细胞中 *Gaq-GFP-His*, *GPCR-3-RFP-His* 和 *Gas-GFP-His* 的水平。  $\beta$ -actin 蛋白作参照。 Co-IP: RFP 抗体免疫沉淀 *GPCR-3-RFP-His*。 非特异性小鼠 IgG 是阴性对照。 SDS-PAGE 凝胶浓度为 12.5%。 (E) 分离 CREB-RFP-His 之后, 通过 PKA 底物 Ser/Thr 位点磷酸化抗体进行蛋白质印迹显示 *GPCR-3* 介导 20E 诱导的 CREB 磷酸化 (P-CREB-RFP)。 *dsGPCR-3* 或 *dsGFP* ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  转染 12 h), 20E ( $2 \mu\text{M}$ ) 或 DMSO 孵育 0.5 h。 Input, His 标签抗体检测 HaEpi 细胞中 CREB-RFP-His 的表达水平。 (F) (G) 和 (H) 蛋白质印迹显示 *GPCR-3* 介导 20E 诱导的 USP1-His, CDK10-His 和 PKAC1-His 的磷酸化。  $\lambda\text{PP}$ :  $0.5 \mu\text{M}$   $\lambda\text{PPase}$  在  $30^\circ\text{C}$  下孵育 30 min。 7.5% 浓度的 SDS-PAGE 凝胶。 通过 ImageJ 软件根据三个独立的重复实验进行统计分析。 误差线表示平均值  $\pm$  SD。 星号表示基于三个重复样本使用 *t* 检验 ( $* p < 0.05$ ) 存在显著差异, ns 表示没有显著性差异。

**Figure 3.7. GPCR-3 participates in 20E-induced rapid reaction and protein phosphorylation.** (A)  $Ca^{2+}$  levels after *GPCR-3* knockdown in HaEpi cells. *dsGFP* or *dsGPCR-3* (1  $\mu$ g/mL in the medium) for 48 h. AM ester calcium crimson dye (3  $\mu$ M) in DPBS for 30 min. F: fluorescence intensity of HaEpi cells after different treatments.  $F_0$ : fluorescence intensity before different treatments. (B) cAMP levels after *GPCR-3* knockdown in HaEpi cells. *dsGPCR-3* or *dsGFP* (1  $\mu$ g/mL) for 48 h. 20E (2  $\mu$ M). (C) and (D) *GPCR-3* coupling with  $G_{\alpha q}$  and  $G_{\alpha s}$  under 20E induction (2  $\mu$ M for 30 min). DMSO was solvent control. Input: the levels of  $G_{\alpha q}$ -GFP-His, *GPCR-3*-RFP-His and  $G_{\alpha s}$ -GFP-His in the cells detected by antibody against GFP or RFP.  $\beta$ -actin was a loading control. Co-IP: Anti-RFP antibody co-immunoprecipitated *GPCR-3*-RFP-His. Nonspecific mouse IgG was a negative control. 12.5% gel in SDS-PAGE. (E) Western blot showing 20E via *GPCR-3* induced CREB phosphorylation (P-CREB-RFP) by the phospho-(Ser/Thr) PKA substrate antibody after CREB-RFP-His was affinity isolated. *dsGPCR-3* or *dsGFP* (1  $\mu$ g/mL for 12 h), 20E (2  $\mu$ M) or DMSO for 0.5 h. Input, the expression levels of CREB-RFP-His in HaEpi cells detected by an antibody against the His tag. (F) (G) and (H) Western blot showing 20E via *GPCR-3* induced phosphorylation of USP1-His, CDK10-His and PKAC1-His (2  $\mu$ M 20E for 1 h) using the Anti-His antibody.  $\lambda$ PP: 0.5  $\mu$ M  $\lambda$ PPase incubation for 30 min at 30 °C. 7.5% SDS-PAGE gel. Statistical analysis according to three independent replicate experiments by ImageJ software. All experiments were performed in triplicate. The bars indicate the mean  $\pm$  SD. Asterisks indicate significant differences using Student's *t*-test based on three replicates ( $*p < 0.05$ ). ns denotes no significant difference.

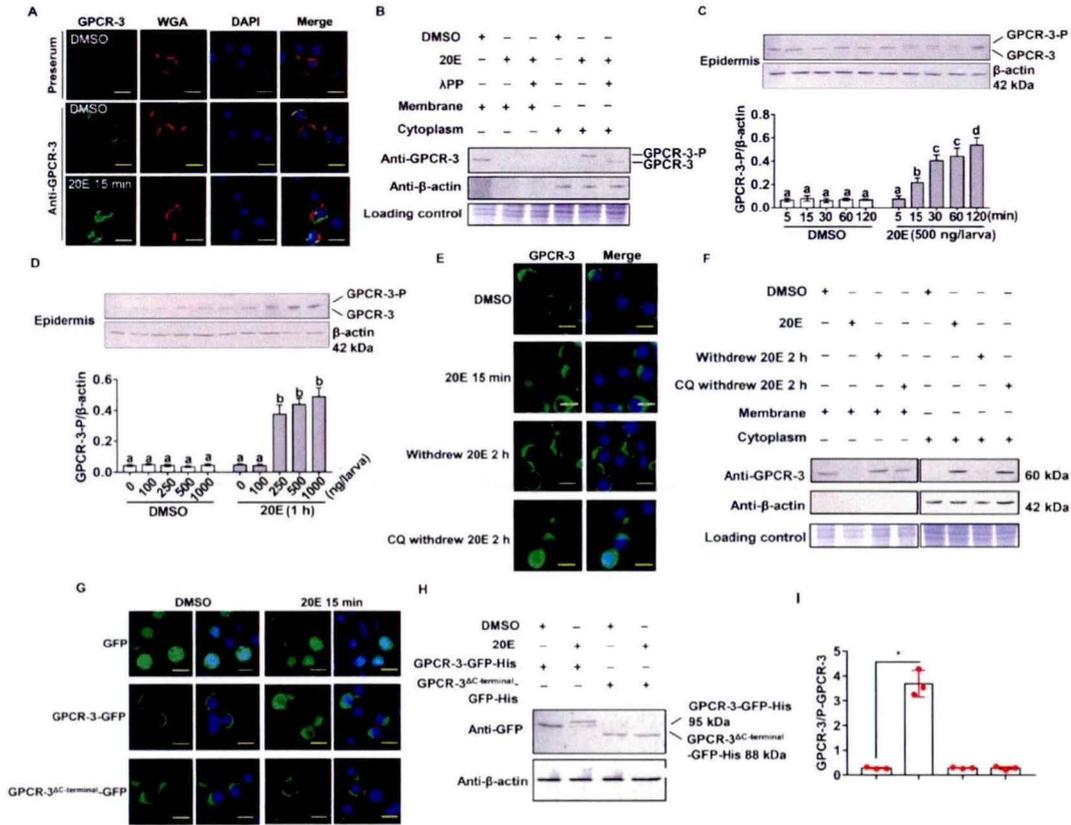
(Co-IP) 结果表明, 与阴性 IgG 对照相比, 在 20E 诱导的细胞中, 使用 RFP 抗体沉淀到了  $G_{\alpha q}$ -GFP-His 与 *GPCR-3*-RFP-His (图 3.7C)。同样, 在 20E 诱导的细胞中, RFP 抗体将  $G_{\alpha s}$ -GFP-His 与 *GPCR-3*-RFP-His 共沉淀 (图 3.7D)。这些数据表明, 20E 诱导下, *GPCR-3* 与  $G_{\alpha q}$  和  $G_{\alpha s}$  相互作用以传输 20E 信号。

20E 通过  $Ca^{2+}$  信号促使 CDK10 (Liu et al. 2014a) 和 USP1 (Liu et al. 2014b) 的磷酸化, 20E 通过 cAMP 促使 PKAC1 的磷酸化和 CREB 的磷酸化 (Jing et al. 2016)。因此, 检查了 *GPCR-3* 在 20E 诱导的这些蛋白质的磷酸化中的作用。与 *dsGFP* 对照相比, 敲低 *GPCR-3* 抑制了 20E 诱导的这四种蛋白的磷酸化 (图 3.7E, F, G 和 H)。这些结果表明, *GPCR-3* 与 20E 诱导的蛋白磷酸化有关。

### 3.5 20E 诱导 *GPCR-3* 的磷酸化和内化

观察 *GPCR-3* 的亚细胞定位以研究其对 20E 的快速反应。*GPCR-3* 主要位于 DMSO 对照的细胞膜中。但是, 20E 处理 15 min 后, *GPCR-3* 被内化到细胞质中 (图 3.8A)。Western 印迹分析证实了 20E 诱导的 *GPCR-3* 的内化。然而, 内化的蛋白质分子量高于细胞膜中的蛋白质。Lambda 蛋白磷酸酶 ( $\lambda$ PPase) 处理降低了分子量, 表明细胞质中的 *GPCR-3* 被磷酸化了 (图 3.8B)。与 DMSO 对照相比, 表皮中 *GPCR-3* 的磷酸化以 20E 时间和剂量依赖的方式增加, 表明 20E 调节 *GPCR-3* 的磷酸化和内化 (图 3.8C 和 D)。

为了明确 *GPCR-3* 内化后的命运, 使用溶酶体抑制剂氯喹 (CQ, Sangon Biotech, 中国上海) (Gonzalez-Noriega et al. 1980) 来分析细胞中 *GPCR-3* 的命运。*GPCR-3* 位于 DMSO 对照中的细胞膜中, 但在 20E 诱导后位于细胞质中。去掉 20E 后, 细胞



**图 3.8. 20E 调节 HaEpi 细胞中 GPCR-3 的磷酸化和内化。** (A) GPCR-3 在 HaEpi 细胞中的定位。绿色: GPCR-3 抗体和 Alexa Fluor 488 标记的二抗标记的 GPCR-3 蛋白。红色: Alexa Fluor 594 偶联的小麦胚芽凝集素 (WGA) 标记的细胞膜。蓝色: DAPI 标记的细胞核。用激光共聚焦显微镜进行观察。比例尺=25  $\mu$ m。 (B) 蛋白质印迹显示 GPCR-3 的亚细胞分布和磷酸化。SDS-PAGE 的凝胶浓度为 7.5%。 $\beta$ -actin 蛋白和考马斯亮蓝染色用作细胞质或细胞膜蛋白含量的参照。 $\lambda$ PP:  $\lambda$  蛋白磷酸酶。 (C) 和 (D) 蛋白质印迹显示 20E 在时间和剂量上诱导 GPCR-3 磷酸化。SDS-PAGE 的凝胶浓度为 7.5%。误差线表示三个独立生物学实验的平均值 $\pm$ SD。通过单因素方差分析差异, 不同字母间表示显著差异 (ANOVA,  $p < 0.05$ )。

(E) 细胞质中 GPCR-3 的降解。DMSO: 溶剂对照处理 15 min; 20E: 2  $\mu$ M 20E 处理 15 min; 去除 20E 2 h: 无 20E 的培养基培养 2 h; 去除 20E 并添加 CQ 2 h: 去除 20E, 并在氯喹 (25  $\mu$ M) 中培养 2 h。绿色和蓝色与 A 中的标记相同。比例尺=25  $\mu$ m。 (F) E 处理后细胞膜和细胞质中 GPCR-3 的相对水平。 (G) HaEpi 细胞中 GPCR-3-GFP 及其突变体 GPCR-3 <sup>$\Delta$ C-terminal</sup>-GFP 的过表达。绿色和蓝色与 A 中标记相同。比例尺=25  $\mu$ m。 (H) 和 (I) Western 印迹显示 GPCR-3 和 GPCR-3 <sup>$\Delta$ C-terminal</sup>-GFP 的磷酸化变化。SDS-PAGE 的凝胶浓度为 7.5%。星号表示由  $t$  检验确定的显著差异: \*,  $p < 0.05$ 。误差线表示三个独立生物学实验的平均值 $\pm$ SD。

**Figure 3.8. 20E regulates GPCR-3 phosphorylation and internalization in HaEpi cells.** (A) Localization of GPCR-3 in HaEpi cells. Green: GPCR-3 protein stained with an anti-GPCR-3 and secondary antibody labeled with Alexa Fluor 488. Red: plasma membrane stained with Alexa Fluor 594-conjugated wheat germ agglutinin (WGA). Blue: nucleus stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). Observed by confocal microscope. Scale bar = 25  $\mu$ m. (B) Western blot showing the subcellular distribution and phosphorylation of GPCR-3. Gel concentration of SDS-PAGE is 7.5%.  $\beta$ -actin and Coomassie Brilliant Blue staining were used as loading control for cytoplasm or membrane protein quantity and quality.  $\lambda$ PP:  $\lambda$  protein phosphates. (C) and (D) Western blot showing the GPCR-3 phosphorylation induced by 20E on time and dose. Gel concentration of SDS-PAGE is 7.5%. The bars indicate the means  $\pm$  SD of three independent biological experiments. Different letters denote significant differences as determined by analysis of

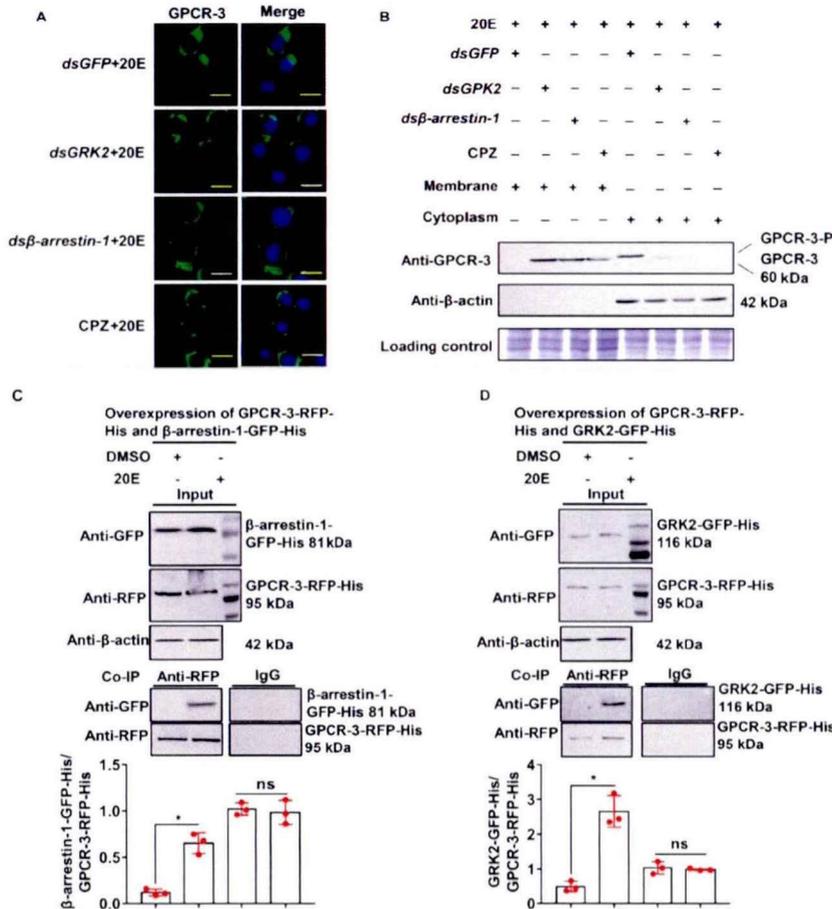
variance (ANOVA,  $p < 0.05$ ). (E) Degradation of GPCR-3 in cytoplasm. DMSO: solvent control for 15 min; 20E: 20E 2  $\mu\text{M}$  for 15 min; withdrew 20E 2 h: withdrew 20E and cultured 2 h; CQ withdrew 20E 2 h: withdrew 20E and cultured with chloroquine (25  $\mu\text{M}$ ) for 2 h. Green and blue are the same as those in A. Scale bar = 25  $\mu\text{m}$ . (F) Western blot showing the relative levels of GPCR-3 in membrane and cytoplasm after the treatments in E. (G) Overexpression of GPCR-3-GFP and its mutant GPCR-3 <sup>$\Delta\text{C-terminal}$</sup> -GFP in HaEpi cells. Green and blue are the same as those in A. Scale bar = 25  $\mu\text{m}$ . (H) and (I) Western blot showing the variation of the phosphorylation of GPCR-3 and GPCR-3 <sup>$\Delta\text{C-terminal}$</sup> -GFP. Gel concentration of SDS-PAGE is 7.5%. The asterisks denote significant differences as determined by Student's *t*-test: \*,  $p < 0.05$ . The bars indicate the means  $\pm$  SD of three independent biological experiments.

质中的 GPCR-3 水平降低; 但是, 添加 CQ 后, GPCR-3 累积在细胞质中没有明显降解 (图 3.8E)。Western 印迹证实, GPCR-3 位于 DMSO 对照中的细胞膜中, 并在 20E 诱导下内化到细胞质中。在无 CQ 的培养基中去除 20E 2 h 后, 细胞质中 GPCR-3 的量减少。但是, 在有 CQ 的培养基中除去 20E 后, 细胞质中的 GPCR-3 量得以维持 (图 3.8F)。这些结果表明, 内化后的 GPCR-3 在溶酶体中降解。

G 蛋白偶联受体激酶 (GRK) 通过使受体的 C 末端磷酸化来使 GPCR 信号失活 (Wang et al. 2015; He et al. 2017)。为了鉴定 GPCR-3 的磷酸化和内化之间的关系, 在 HaEpi 细胞中过表达 GPCR-3-GFP 和 C 末端缺失(aa 479–534)的 GPCR-3(GPCR-3 <sup>$\Delta\text{C-terminal}$</sup> -GFP), GFP 过表达作对照。20E 诱导 GPCR-3-GFP 内化, 然而, GPCR-3 <sup>$\Delta\text{C-terminal}$</sup> -GFP 在 20E 诱导下仍位于细胞膜中 (图 3.8G)。Western 印迹显示 20E 诱导后, GPCR-3-GFP 被磷酸化, 然而, GPCR-3 <sup>$\Delta\text{C-terminal}$</sup> -GFP 在 20E 诱导后没有发生磷酸化 (图 3.8H 和 I)。这些结果表明 20E 诱导的 GPCR-3 的 C 末端的磷酸化决定了 GPCR-3 的内化。

GPCR 的内化受 GRK 磷酸化的调节, 该磷酸化可促进其与  $\beta$ -arrestin 的相互作用 (Benovic et al. 1989; Lohse et al. 1990)。网格蛋白参与 GPCR 的内吞作用 (Chen et al. 2014), 氯丙嗪 (CPZ) 抑制网格蛋白向质膜的再循环, 从而抑制网格蛋白介导的内吞作用 (Bhattacharyya et al. 2010)。通过敲低这些基因或抑制网格蛋白来研究 GPCR-3 的内化, 以明确 GPCR-3 内化的机制。免疫细胞化学分析表明, 在 *dsGFP* 对照细胞中 20E 诱导 15 min 后, GPCR-3 内化, 但是, GPCR-3 在 *dsGRK2*, *ds $\beta$ -arrestin-1* 和 CPZ 处理的细胞中未发生内化 (图 3.9A)。Western 印迹分析证实, 在 *dsGFP* 对照细胞中, 20E 诱导 GPCR-3 磷酸化并内化到细胞质中, 但是, 敲降 *GRK2*,  *$\beta$ -arrestin-1* 或 CPZ 处理后, GPCR-3 不会被 20E 诱导磷酸化和内化 (图 3.9B)。通过蛋白质印迹证实了 20E 诱导 GPCR-3 和  $\beta$ -arrestin-1 的相互作用。Input 显示  $\beta$ -arrestin-1-GFP-His 和 GPCR-3-RFP-His 的表达水平相当。RFP 抗体 Co-IP 显示了 20E 诱导下  $\beta$ -arrestin-1-GFP-His 与 GPCR-3-RFP-His 发生免疫共沉淀 (图 3.9C)。同样,

20E 诱导下 GRK2-GFP-His 与 GPCR-3-RFP-His 免疫共沉淀 (图 3.9D)。这些结果表明 20E 通过 GRK2,  $\beta$ -arrestin-1 和网格蛋白诱导 GPCR-3 的内化。



**图 3.9. GRK2,  $\beta$ -arrestin-1 和网格蛋白参与了 20E 诱导的 GPCR-3 内化。** (A) HaEpi 细胞分别用 *dsGFP*, *dsGRK2*, *ds $\beta$ -arrestin-1* 处理 48 h, 用 CPZ (50  $\mu$ M) 处理 2 h, 然后分别用 1  $\mu$ M 20E 处理 15 min。绿色: GPCR-3 抗体和 Alexa Fluor 488 标记的二抗标记的 GPCR-3 蛋白。蓝色: DAPI 标记的细胞核。比例尺= 25  $\mu$ m。 (B) A 中蛋白质印迹分析。 $\beta$ -actin 蛋白和考马斯亮蓝染色用作细胞质和细胞膜蛋白含量的上样对照。 (C) 和 (D) GPCR-3 在 20E (2  $\mu$ M, 30 min) 诱导下与  $\beta$ -arrestin-1 和 GRK2 偶联。DMSO 是溶剂对照。Input: GFP 或 RFP 抗体检测到的细胞中  $\beta$ -arrestin-1-GFP-His, GPCR-3-RFP-His 和 GRK2-GFP-His 的蛋白水平。 $\beta$ -actin 蛋白作参照。Co-IP: RFP 抗体免疫沉淀 GPCR-3-RFP-His 和  $\beta$ -arrestin-1-GFP-His 或 GRK2-GFP-His。非特异性小鼠 IgG 作阴性对照。SDS-PAGE 凝胶浓度为 12.5%。通过 ImageJ 软件根据三个独立的重复实验进行统计分析。通过 *t* 检验得出的 *p* 值基于三个重复实验。误差线表示三个独立生物学实验的平均值 $\pm$ SD, ns 表示没有显著性差异。

**Figure 3.9. GRK2,  $\beta$ -arrestin-1 and clathrin participated in 20E-induced GPCR-3 internalization.** (A) HaEpi Cells were treated with *dsGFP*, *dsGRK2*, *ds $\beta$ -arrestin-1* for 48 h, and CPZ (50  $\mu$ M) for 2 h, followed 1  $\mu$ M 20E for 15 min, respectively. Green: GPCR-3 protein stained with an anti-GPCR-3 and secondary antibody labeled with Alexa Fluor 488. Blue: nucleus stained with DAPI. Scale bar = 25  $\mu$ m. (B) Western blot of the samples in A.  $\beta$ -actin and Coomassie Brilliant Blue staining were used as loading control for cytoplasm and membrane protein quantity and quality, respectively. (C) and (D) GPCR-3 coupling with  $\beta$ -arrestin-1 and GRK2 under 20E induction (2  $\mu$ M for 30 min). DMSO was solvent control. Input: the levels of  $\beta$ -arrestin-1-GFP-His, GPCR-3-RFP-His and GRK2-GFP-His in the cells detected by antibody against GFP or RFP.  $\beta$ -actin was a loading control. Co-IP: Anti-RFP antibody co-immunoprecipitated GPCR-3-RFP-His and  $\beta$ -

arrestin-1-GFP-His or GRK2-GFP-His. Nonspecific mouse IgG was a negative control. 12.5% gel in SDS-PAGE. Statistical analysis according to three independent replicate experiments by ImageJ software. \**p* value via Student's *t*-test based on three replicates in all figures. The bars indicate the means ± SD of three independent biological experiments. ns denotes no significant difference.

### 3.6 GPCR-3 结合 20E

进行结合实验验证 GPCR-3 是否为 20E 的膜受体。SYBYL X 2.0 软件中的 Surflex-Dock (SFXC) 用于计算 20E 与 GPCR-3 的对接。模型显示 GPCR-3 跨膜螺旋附近与 20E 结合的得分最高。20E 与 GPCR-3 的残基 M240 和 L331 形成两个氢键(图 3.10A)。GPCR-3 结合 20E 的得分约为 2.1。为了证明 GPCR-3 结合 20E, 在 Sf9 细胞中过表达 GPCR-3-GFP 及其突变体 GPCR-3-M-GFP (GPCR-3-GFP 20E 结合位点的突变, 表 3.2) 并纯化蛋白质。GFP 过表达作为对照 (图 3.10B)。使用 20E 酶免疫分析 (20E-EIA) 检测结合分析表明, GPCR-3-GFP 过表达的细胞中细胞膜结合的 20E 量显著高于 GPCR-3-M-GFP 和 GFP 过表达的对照细胞 (图 3.10C)。这些结果表明 GPCR-3 可以结合细胞膜中的 20E。

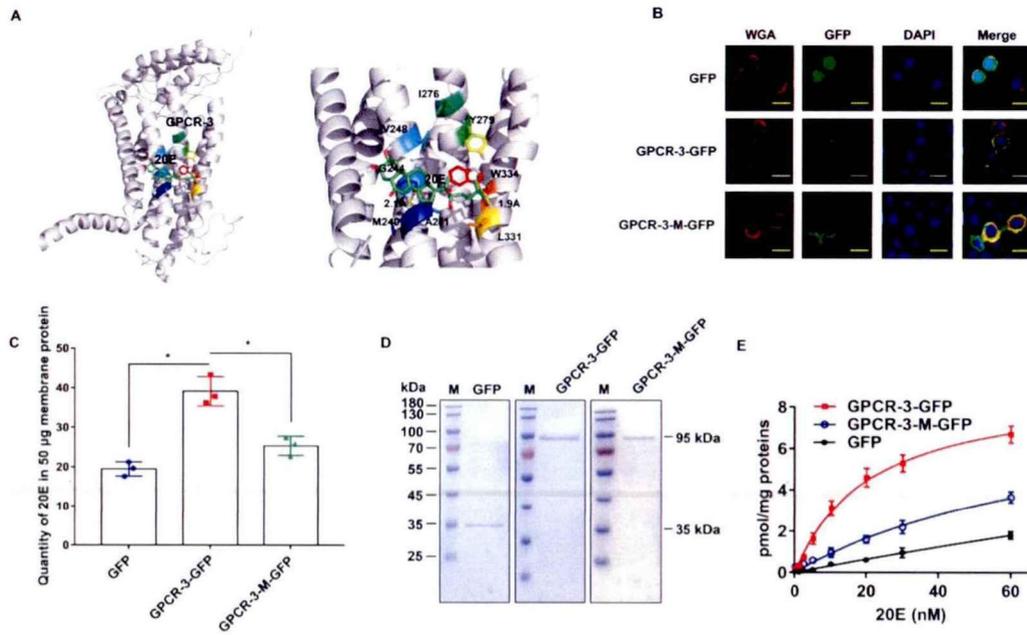
表 3.2. 预测结合 20E 的 GPCR 位点和点突变  
Table 3.2. Predicted binding residues and point mutations.

Proteins	C-score	Ligands	Binding sites	Mutation sites
GPCR-3	0.04	CLR	240M, 241A, 244G, 248V, 276I, 279Y, 331L, 334W	M240A, G244A, L331A, W334A
	0.02	CLR	237M, 240M, 241A, 244G, 327L, 330G, 334W	
	0.02	CLR	222F, 240M, 244G, 247I, 248V, 252F	

GPCR-3 的预测结合位点通过 <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> 在线预测。C 分数是预测结合位点的置信度得分。CLR, cholest-5-en-3beta-ol, 胆固醇。

The predicted binding residues of GPCR-3 are predicted online at <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>. C-score is the confidence score of the predicted binding site. CLR, cholesterol, cholest-5-en-3beta-ol, cholesterolin.

使用分离纯化的 GPCR-3 通过 20E-EIA 方法检测的饱和结合曲线进一步确定 GPCR-3 结合 20E 的解离常数 ( $K_d$ )。使用 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色检查分离的 GFP, GPCR-3-GFP 和 GPCR-3-M-GFP 的纯度 (图 3.10D)。GPCR-3-GFP 与 20E 的饱和和特异性结合的  $B_{max} = 9.06 \pm 0.43$  pmol/mg 蛋白,  $K_d = 20.84 \pm 2.28$  nM。但是, GPCR-3-M-GFP 降低了对 20E 的结合能力,  $B_{max} = 8.69 \pm 1.47$  pmol/mg 蛋白,  $K_d = 84.68 \pm 21.23$  nM。GFP 显示出对 20E 的较低结合 (图 3.10E)。这些数据证实 GPCR-3 可以结合 20E。



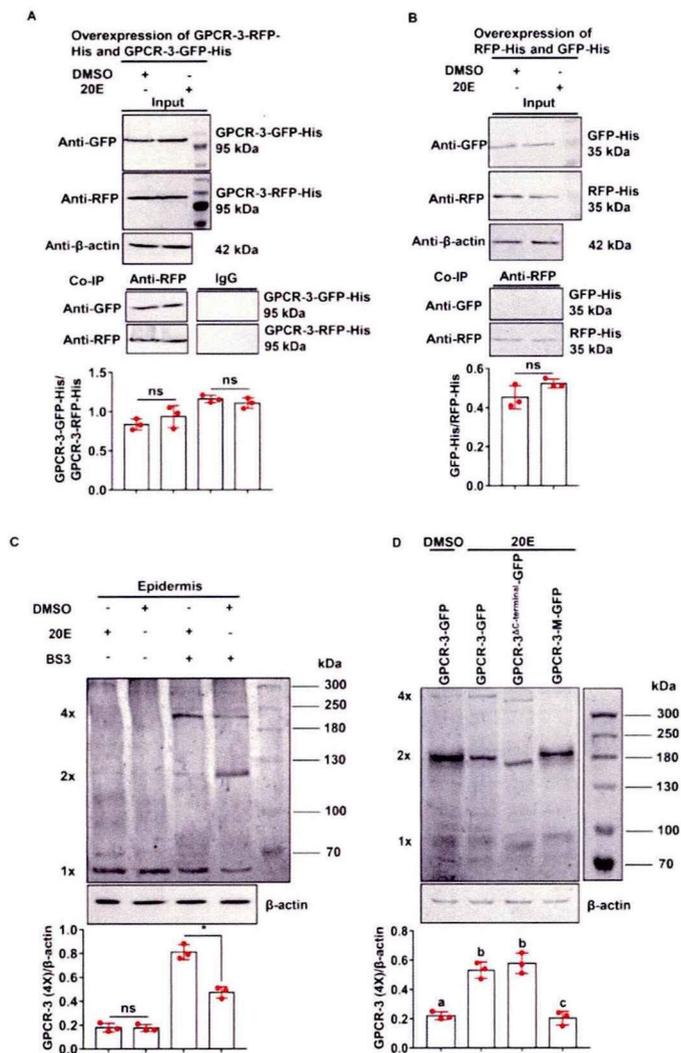
**图 3.10. GPCR-3 与 20E 结合。** (A) GPCR-3 与配体结合的复合物模拟。灰色代表 GPCR-3，绿色代表 20E。虚线表示蛋白氨基酸残基与 20E 之间的氢键。不同颜色的线条表示与 20E 相互作用的蛋白残基。(B) 过表达的 GFP，GPCR-3-GFP 和 GPCR-3-M-GFP 的细胞膜定位。WGA：小麦胚芽凝集素 (WGA) 标记的细胞膜。GFP：GFP，GPCR-3-GFP 和 GPCR-3-M-GFP 的绿色荧光。DAPI：DAPI 标记的细胞核。激光共聚焦显微镜观察。比例尺 = 20  $\mu\text{m}$ 。(C) 50  $\mu\text{g}$  过表达 GFP-His，GPCR-3-GFP-His 和 GPCR-3-M-GFP-His 的 HaEpi 细胞膜蛋白结合 20E 的量。误差线代表三个重复的平均值  $\pm$  SD。星号表示根据 *t* 检验存在显著差异 (\**p* < 0.05)。(D) SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色显示分离的 GFP，GPCRs-GFP 和 GPCR-3-M-GFP 的纯度。(E) GPCR-3-GFP 和 GPCR-3-M-GFP 对 20E 的饱和结合曲线。GFP 为非特异性结合对照。所有实验均使用 10  $\mu\text{g}$  分离蛋白在 50  $\mu\text{L}$  EIA 缓冲液中进行。误差线代表三个重复的平均值  $\pm$  SD。

**Figure 3.10. GPCR-3 binding 20E.** (A) Modeling of the ligand-binding complex of the GPCR-3 predicted by Surflex-Dock (SFXC) program from the SYBYL X 2.0 software. GPCR-3 represented by gray and 20E represented by Green. The dotted lines indicate the predicted hydrogen bonds between the amino acid residues and 20E. The residues that interact with the 20E are represented as sticks with different colors. (B) Cell membrane localization of the overexpressed GFP, GPCR-3-GFP and GPCR-3-M-GFP. WGA: The cell membrane was marked by wheat germ agglutinin (WGA). GFP: Green fluorescence from GFPs, GPCR-3-GFP and GPCR-3-M-GFP. DAPI: nucleus stained with DAPI. Observed by confocal microscope. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ . (C) Quantity of 20E bound by 50  $\mu\text{g}$  membrane protein from HaEpi that overexpressed GFP-His, GPCR-3-GFP-His and GPCR-3-M-GFP-His. Error bars represent the means  $\pm$  SD of three replicates. Asterisks indicate significant differences according to Student's *t*-tests (\**p* < 0.05). (D) SDS-PAGE showing the purity of the isolated GFP, GPCRs-GFP and GPCR-3-M-GFP with Coomassie brilliant blue staining. (E) Saturation binding curves of GPCR-3-GFP and GPCR-3-M-GFP to 20E. GFP was nonspecific binding control. All of experiments were performed using 10  $\mu\text{g}$  isolated protein in 50  $\mu\text{L}$  EIA buffer. Error bars represent the means  $\pm$  SD of three replicates.

### 3.7 GPCR-3 以同源二聚体存在，并通过 20E 诱导为同源四聚体

为了明确 GPCR-3 是作为单体还是形成寡聚体起作用，在 HaEpi 细胞中以多种组合进行共过表达，包括 GPCR-3-RFP-His 和 GPCR-3-GFP-His，GPCR-3-RFP-His 和 ErGPCR-1-GFP-His，GPCR-3-RFP-His 和 ErGPCR-2-GFP-His，GPCR-3-RFP-His

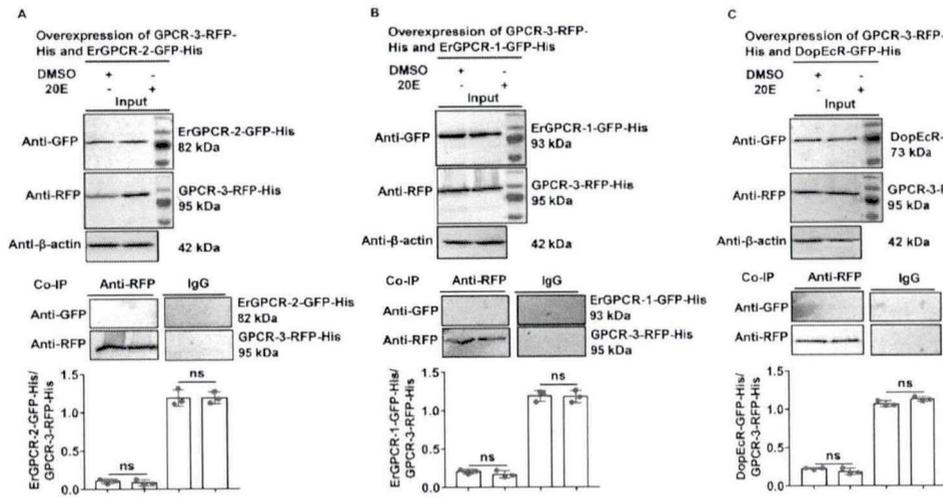
和 DopEcR-GFP-His。Input 显示 GPCR-3-RFP-His 和 GPCR-3-GFP-His 相等的表达。RFP 抗体 Co-IP 在 DMSO 处理的细胞和 20E 诱导的细胞中均免疫共沉淀到了 GPCR-3-GFP-His 和 GPCR-3-RFP-His。IgG 作抗体的阴性对照 (图 3.11A)。在标签对照中, RFP-His 和 GFP-His 没有被免疫共沉淀 (图 3.11B)。此外, ErGPCR-1-GFP-His, ErGPCR2-GFP-His 和 DopEcR-GFP-His 与 GPCR-3-RFP-His 均没有被共同免疫沉淀 (图 3.12), 表明 GPCR-3 是组成型同源二聚体。



**图 3.11. 20E 诱导 GPCR-3 形成同源四聚体。** (A) 免疫共沉淀 (Co-IP) 检测 HaEpi 细胞中过表达的 GPCR-3 寡聚体。DMSO 是溶剂对照。2 μM 20E 孵育 30 min。Input: GFP 或 RFP 抗体检测 GPCR-3-GFP-His, GPCR-3-RFP-His 的水平。β-actin 蛋白作参照。Co-IP: RFP 抗体免疫沉淀 GPCR-3-RFP-His 和 GPCR3-GFP-His。非特异性小鼠 IgG 是阴性对照。SDS-PAGE 凝胶为 12.5%。(B) GFP-His 和 RFP-His 作为 A. C. 的标签对照。(C) 蛋白质印迹法检测与 BS3 交联的表皮中 GPCR-3 的寡聚体。SDS-PAGE 凝胶浓度为 7.5%。将 500 ng 20E 注入六龄 6h 幼虫。DMSO 作对照。(D) Western 印迹检测与 BS3 交联的 HaEpi 细胞中 GPCR-3-GFP, GPCR-3<sup>ΔC-terminal</sup>-GFP 和 GPCR-3-M-GFP 的寡聚体。SDS-PAGE 凝胶浓度为 7.5%。HaEpi 细胞与 2 μM 20E 孵育 15 min, 然后用 BS3 处理。通过 ImageJ 软件根据三个独立的

重复实验进行统计分析。使用  $t$  检验 ( $*p < 0.05$ ) 和 ANOVA 计算显著差异 (不同字母间代表差异显著,  $p < 0.05$ )。误差线表示三个独立生物学实验的平均值  $\pm$  SD, ns 表示没有显著性差异。

**Figure 3.11. 20E induces GPCR-3 to form homo-tetramer.** (A) Co-immunoprecipitation (Co-IP) to detect the oligomer of the overexpressed GPCR-3 in HaEpi cells. DMSO was solvent control. 20E (2  $\mu$ M for 30 min). Input: the levels of GPCR-3-GFP-His, GPCR-3-RFP-His, detected by antibody against GFP or RFP.  $\beta$ -actin was a loading control. Co-IP: Anti-RFP antibody co-immunoprecipitated GPCR-3-RFP-His and GPCR3-GFP-His. Nonspecific mouse IgG was a negative control. SDS-PAGE gel was 12.5%. (B) GFP-His and RFP-His as negative tag control for A. (C) Crosslink with BS3 to detect the oligomer of GPCR-3 in the epidermis using western blot. SDS-PAGE gel was 7.5%. 500 ng 20E was injected into a larva at the sixth instar 6 h. DMSO was control. (D) Crosslink with BS3 to detect the variation of the oligomer of GPCR-3-GFP, GPCR-3 $\Delta$ C-terminal-GFP, and GPCR-3-M-GFP in HaEpi cells using western blot. SDS-PAGE gel was 7.5%. HaEpi cells were incubated with 2  $\mu$ M 20E for 15 min and then treated with BS3. Statistical analysis according to three independent replicate experiments by ImageJ software. Significant differences were calculated using Student's  $t$ -test ( $*p < 0.05$ ) and ANOVA (different letters represent significant differences,  $p < 0.05$ ). The bars indicate the means  $\pm$  SD of three independent biological experiments. ns denotes no significant difference.



**图 3.12. 20E 不能诱导 GPCR-3 与其他 GPCR 之间的相互作用。** (A) (B) 和 (C) 在 20E (2  $\mu$ M, 30 min) 诱导下检测 GPCR-3 与其他 GPCR 的偶联。DMSO 作溶剂对照。Input: RFP 或 GFP 抗体检测细胞中 GPCR-3-RFP-His, GPCR-3-GFP-His, ErGPCR-2-RFP-His, ErGPCR-1-RFP-His 和 DopEcR-RFP-His 的蛋白水平。 $\beta$ -actin 蛋白作参照。Co-IP: RFP 抗体免疫沉淀 GPCR-3-RFP-His 和 GPCRs-GFP-His。非特异性小鼠 IgG 作阴性对照。SDS-PAGE 凝胶浓度为 12.5%。通过 ImageJ 软件根据三个独立的重复实验进行统计分析。误差线表示平均值  $\pm$  SD。星号表示使用  $t$  检验基于三个重复样本存在显著差异 ( $*p < 0.05$ ), ns 表示没有显著性差异。

**Figure 3.12. GPCR-3 does not interact with other GPCRs by 20E induction.** (A) (B) and (C) Co-IP to detect GPCR-3 coupling with other GPCRs under 20E (2  $\mu$ M for 30 min) induction. DMSO was solvent control. Input: the levels of GPCR-3-RFP-His, GPCR-3-GFP-His, ErGPCR-2-RFP-His, ErGPCR-1-RFP-His and DopEcR-RFP-His in the cells detected by antibody against RFP or GFP.  $\beta$ -actin was a loading control. Co-IP: Anti-RFP antibody co-immunoprecipitated GPCR-3-RFP-His and GPCRs-GFP-His. Nonspecific mouse IgG was a negative control. SDS-PAGE gel was 12.5%. Statistical analysis according to three independent replicate experiments by ImageJ software. The bars indicate the mean  $\pm$  SD. Asterisks indicate significant differences using Student's  $t$ -test based on three replicates ( $*p < 0.05$ ). ns denotes no significant difference.

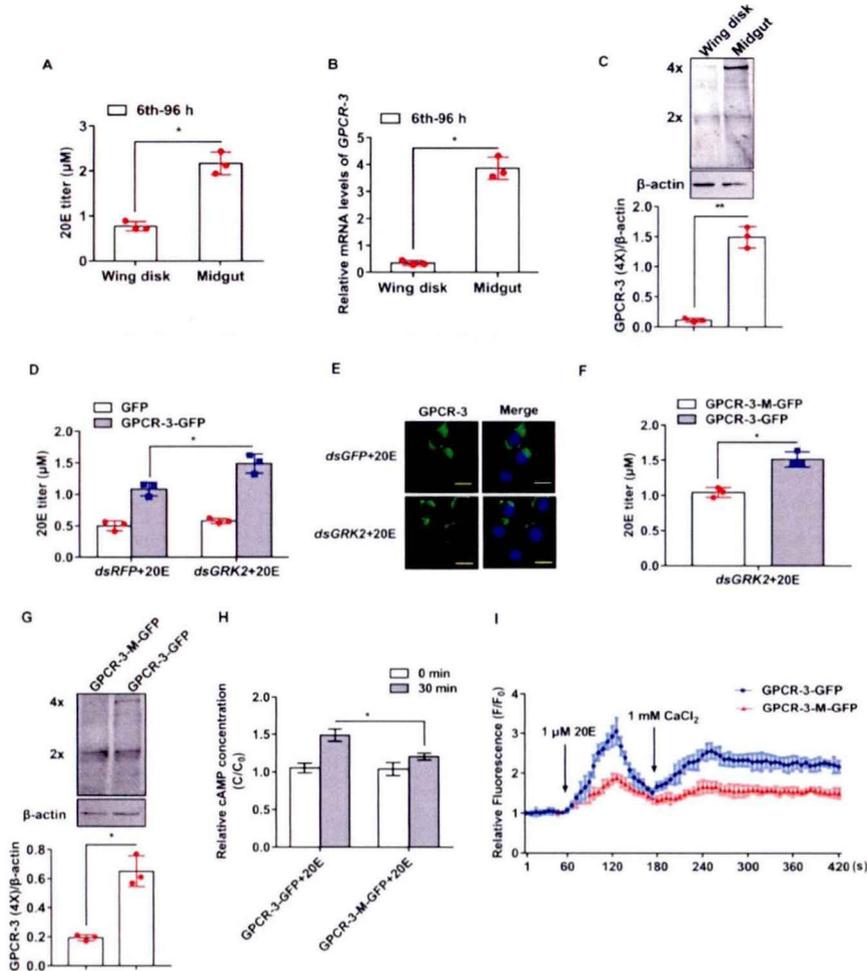
为了确认 GPCR-3 在体内的同源二聚体的性质, 使用 BS3 交联根据蛋白的分子量检测表皮中 GPCR-3 的寡聚化形式。BS3 可以使相同的蛋白质分子进行交联, 以防止它们在 SDS-PAGE 样品处理过程中解离 (Sargiacomo et al. 1995)。未经 BS3 处理的情况下, DMSO 和 20E 处理的表皮中均检测到了 GPCR-3 的单体 (60 kDa), 但在 BS3 处理后, DMSO 处理对照中大量检测到 GPCR-3 的同源二聚体 (120 kDa), 而在 20E 处理样品中大量检测到了 GPCR-3 的同源四聚体 (240 kDa) (图 3.11C)。这些数据不仅证明了 GPCR-3 以同源二聚体存在, 而且还证明了 20E 诱导 GPCR-3 从同源二聚体变为同源四聚体。

为了阐明同源四聚体形成的机制, 过表达 GPCR-3-GFP, GPCR-3<sup>ΔC-terminal</sup>-GFP (C 末端磷酸化区域的截短突变) 和 GPCR-3-M-GFP (GPCR-3-GFP 与 20E 结合位点的多位点突变) 来检查同源四聚体的变化。BS3 处理后, 用 GFP 单克隆抗体来检测寡聚变化。DMSO 处理下的 GPCR-3-GFP 中检测到大量同源二聚体 (190 kDa), 20E 处理下的 GPCR-3-GFP 中诱导形成同源四聚体 (380 kDa)。20E 处理下, GPCR-3<sup>ΔC-terminal</sup>-GFP 仍形成同源四聚体, 但是, GPCR-3-M-GFP 无法形成同源四聚体 (图 3.11D)。这些结果表明与 20E 的结合触发了 GPCR-3 同源四聚体的形成。

### 3.8 GPCR-3 促进 20E 进入细胞

在幼虫组织中进一步检查了 GPCR-3 在 20E 进入细胞中的作用。在六龄 96 h (游走阶段) 的幼虫中, 翅中的 20E 水平低于中肠 (图 3.13A), 相应地, GPCR-3 在翅中的转录水平也低于中肠 (图 3.13B)。在中肠中检测到的同源四聚体 (240 kDa) 的量也比在翅中高, 表明中肠中更多的 GPCR-3 同源四聚体比在翅中导致更多的 20E 进入 (图 3.13C)。这些数据暗示中肠中高水平的 GPCR-3 与高水平 20E 之间的关系。为了检验该假设, 在 HaEpi 细胞中过表达了 GPCR-3-GFP, 过表达 GFP 作为对照。在 *dsRFP* 对照中, 与过表达 GFP 的细胞相比, 过表达 GPCR-3-GFP 细胞中的 20E 滴度更高。此外, 与 *dsRFP* 对照相比, 当敲低 *GRK2* 使 GPCR-3 定位在细胞膜中时, 细胞中的 20E 滴度更高 (图 3.13D 和 E)。这些结果表明, 当 GPCR-3 位于细胞膜中时, 促进了 20E 的进入。此外, 过表达 GPCR-3-GFP HaEpi 细胞中的 20E 水平高于过表达 GPCR-3-M-GFP HaEpi 细胞中的 20E 水平 (图 3.13F)。在 *dsGRK2* 和 20E 处理中, 在过表达 GPCR-3-GFP 细胞中检测到的同源四聚体 (380 kDa) 高于过表达 GPCR-3-M-GFP 的细胞中, 表明位于细胞膜中的 GPCR-3 同源四聚体转运了更多的 20E 进入细胞 (图 3.13G)。流式细胞仪用于检查细胞膜的完整性, 以验证 20E 的进入是否是由于 GPCR-3 的过表达改变了细胞膜的通透性。在过表达的 GPCR-

3-M-GFP/GPCR-3-GFP 与未过表达的 HaEpi 细胞之间未检测到明显的荧光信号差异, 表明过表达 GPCR-3-M-GFP/GPCR-3-GFP 的 HaEpi 细胞并不会增加其膜通透性(图 3.14A 和 B)。这些结果表明 20E 需要 GPCR-3 同源四聚体才能导入靶细胞。



**图 3.13. 细胞膜上的 GPCR-3 促进 20E 进入细胞。** (A) 6th-96 h 幼虫翅和中肠中的 20E 滴度。(B) 6th-96 h 幼虫翅和中肠中 *GPCR-3* 的相对 mRNA 水平。(C) 蛋白质印迹检测与 BS3 交联的 6th-96 h 幼虫中肠和翅中的 *GPCR-3* 寡聚体。SDS-PAGE 凝胶浓度为 7.5%。(D) 通过敲低 *GRK2* 使 *GPCR-3-GFP* 停留在细胞膜中, HaEpi 细胞中过表达 *GFP-His*, *GPCR-3-GFP* 检测细胞中 20E 水平。*dsRFP* 或 *dsGRK2* 转染细胞两次 (2 μg/mL, 12 h), 然后进行 2 μM 20E 孵育 1 h。(E) HaEpi 细胞分别用 *dsGFP*, *dsGRK2* 转染 48 h, 然后分别用 2 μM 20E 孵育 15 min。绿色: *GPCR-3* 抗体和 Alexa Fluor 488 标记的二抗标记 *GPCR-3* 蛋白。蓝色: DAPI 标记细胞核。比例尺= 25 μm。(F) 敲降 *GRK2* 使 *GPCR-3-M-GFP* 或 *GPCR-3-GFP* 在细胞膜中, 检测 HaEpi 细胞中的 20E 滴度。2 μg/mL *dsGRK2* 转染 12 h, 转染两次, 然后 2 μM 20E 孵育 1 h。(G) 蛋白质印迹检测与 BS3 交联的 HaEpi 细胞中 *GPCR-3-GFP* 和 *GPCR-3-M-GFP* 的寡聚物变化。SDS-PAGE 凝胶浓度为 7.5%。HaEpi 细胞与 *dsGRK2* 和 20E 孵育。(H) 20E 诱导下, 过表达 *GPCR-3-GFP* 或 *GPCR-3-M-GFP* 的 HaEpi 细胞中 cAMP 水平。2 μg/mL *GPCR-3-GFP*, *GPCR-3-M-GFP* 和 *dsGRK2* 分别转染 HaEpi 细胞 48 h, 然后分别与 2 μM 20E 孵育。(I) HaEpi 细胞中过表达 *GPCR-3-GFP* 或 *GPCR-3-M-GFP* 后的  $Ca^{2+}$  水平。细胞分别转染 *GPCR-3-GFP*, *GPCR-3-M-GFP* 和 *dsGRK2* 48 h, AM 酯钙深红色染料 (3 μM) 孵育染色 30 min。F: 不同处理后 HaEpi 细胞的荧光强度。F<sub>0</sub>: 不同处理前 HaEpi

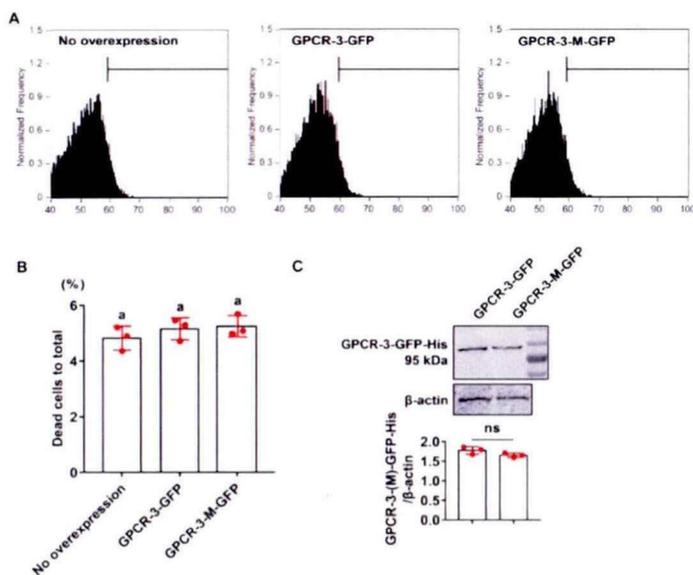
细胞的荧光强度。每个误差线代表三个重复的平均值 $\pm$ SD。使用  $t$  检验计算出显著差异 ( $*p < 0.05$ )，ns 表示没有显著性差异。

**Figure 3.13. GPCR-3 increases the amount of 20E entering cells on the cell membrane. (A)** 20E titers in wing disk and midgut at 6th-96 h larvae. **(B)** Relative mRNA levels of *GPCR-3* in fore wing disk and midgut of 6th-96 h larvae. **(C)** Crosslink with BS3 to detect the oligomer of GPCR-3 in the midguts and wing disks from 6th-96 h larvae using western blot. SDS-PAGE gel was 7.5%. **(D)** 20E levels in the whole HaEpi cells that overexpressing GFP-His, GPCR-3-GFP by arresting the GPCR-3-GFP in the cell membrane by knockdown of *GRK2*. *dsRFP* or *dsGRK2* (2  $\mu$ g/mL for 12 h) twice, followed 20E incubation (2  $\mu$ M for 1 h). **(E)** HaEpi Cells were treated with *dsGFP*, *dsGRK2* for 48 h, followed 2  $\mu$ M 20E for 15 min, respectively. Green: GPCR-3 protein stained with an anti-GPCR-3 and secondary antibody labeled with Alexa Fluor 488. Blue: nucleus stained with DAPI. Scale bar = 25  $\mu$ m. **(F)** GPCR-3-M-GFP reduces 20E into cells. *dsGRK2* (2  $\mu$ g/mL for 12 h) twice, followed 20E incubation (2  $\mu$ M for 1 h). **(G)** Crosslink with BS3 to detect the variation of the oligomer of GPCR-3-GFP and GPCR-3-M-GFP in HaEpi cells using western blot. SDS-PAGE gel was 7.5%. HaEpi cells were incubated with *dsGRK2* and 20E. **(H)** cAMP levels of HaEpi cells overexpressed with GPCR-3-GFP and GPCR-3-M-GFP under 20E induction. HaEpi cells were transfected with GPCR-3-GFP, GPCR-3-M-GFP and *dsGRK2* (2  $\mu$ g/mL) for 48 h followed by incubation with 2  $\mu$ M 20E, respectively. **(I)**  $Ca^{2+}$  levels after GPCR-3-GFP or GPCR-3-M-GFP overexpressed in HaEpi cells. Cells were transfected with GPCR-3-GFP, GPCR-3-M-GFP and *dsGRK2* (2  $\mu$ g/mL for 12 h twice) for 48 h and AM ester calcium crimson dye (3  $\mu$ M) in DPBS for 30 min, respectively. F: fluorescence intensity of HaEpi cells after different treatments. F<sub>0</sub>: fluorescence intensity before different treatments. Each bar represents the mean  $\pm$  SD of three replicates. Significant differences were calculated using Student's  $t$ -test ( $*p < 0.05$ ).

通过敲低 *GRK2* 将 GPCR-3-GFP 或 GPCR-3-M-GFP 定位在细胞膜上，以明确 GPCR-3 同源四聚体对细胞中  $Ca^{2+}$  和 cAMP 水平的影响。20E 处理后，过表达 GPCR-3-M-GFP 的 HaEpi 细胞的细胞内 cAMP 水平低于过表达 GPCR-3-GFP 的细胞（图 3.13H）。与过表达 GPCR-3-M-GFP 的细胞相比，过表达 GPCR-3-GFP 的 HaEpi 细胞中 20E 诱导更多的  $Ca^{2+}$  细胞内释放和细胞外  $Ca^{2+}$  流入（图 3.13I）。这些结果表明，GPCR-3 同源四聚体在 20E 信号传导中起作用。

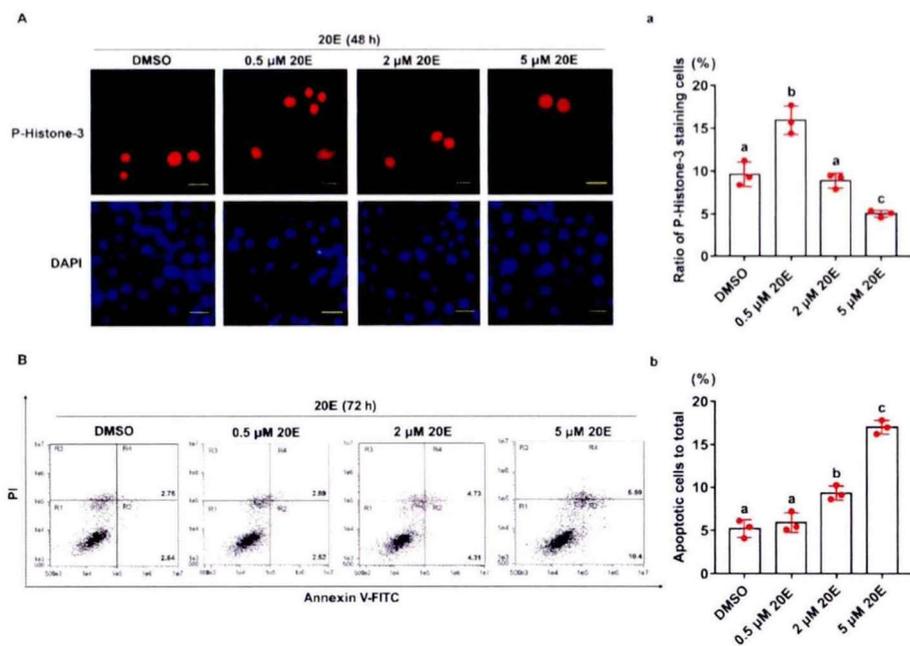
另外，检测细胞质中 GPCR-3-GFP 和 GPCR-3-M-GFP 的量以明确结合位点突变对 GPCR-3 内化的影响。结果显示，用 20E 处理 30 min 后，GPCR-3-GFP 和 GPCR-3-M-GFP 的内化没有显著差异（图 3.14C）。这些结果表明，GPCR-3 同源四聚体的形成对 GPCR-3 内化没有影响。

为了明确不同 20E 浓度对细胞命运的影响，使用不同 20E 浓度检测细胞增殖和凋亡。与 DMSO 处理的细胞相比，使用终浓度为 0.5  $\mu$ M 的 20E 处理的细胞中有 16% 的细胞检测到增殖信号 p-Histone-3。相反，与 DMSO 处理的细胞相比，20E (5  $\mu$ M) 处理的细胞中 p-Histone-3 增殖信号显著降低（图 3.15A 和 a）。流式细胞分析显示，与 DMSO 相比，高浓度 20E (5  $\mu$ M) 处理诱导了约 17% 的细胞凋亡，并且凋亡细胞的数量以 20E 浓度依赖的方式增加（图 3.15B 和 b）。这些数据表明低浓度的 20E 促进细胞增殖，高浓度的 20E 促进细胞凋亡。



**图 3.14. 膜通透性检测和 GPCR 的内吞。** (A) 和 (B) 碘化丙啶 (PI) 染色进行流式细胞分析。水平线标记为死细胞占总细胞的百分比。(C) 蛋白质印迹分析 2  $\mu$ M 20E 诱导 30 min 内化进入 HaEpi 细胞的 GPCR-3-GFP 或 GPCR-3-M-GFP 的量。通过 ImageJ 软件根据三个独立的重复实验进行统计分析。误差线表示平均值 $\pm$ SD。ANOVA (不同字母间代表显著差异,  $p < 0.05$ ), ns 表示没有显著性差异。

**Figure 3.14. Membrane permeability detection and GPCR endocytosis.** (A) and (B) Flow cytometry analysis by propidium iodide (PI) staining. The horizontal line was labeled as the percentage of dead cells to total cells. (C) Quantity of GPCR-3-GFP or GPCR-3-M-GFP internalized into the HaEpi cells induced with 2  $\mu$ M 20E for 30 min by western blot. Statistical analysis according to three independent replicate experiments by ImageJ software. The bars indicate the mean  $\pm$  SD. ANOVA (different letters represent significant differences,  $p < 0.05$ ). ns denotes no significant difference.



**图 3.15. 低浓度 20E 促进 HaEpi 细胞增殖, 高浓度 20E 促进 HaEpi 细胞凋亡。** (A) 检测细胞增殖。红色荧光表示由磷酸组蛋白 3 抗体和羊抗鼠 IgG Alexa-Fluor 568 (红色) 检测到

的磷酸组蛋白 3。蓝色荧光表示细胞核被 DAPI 染色。比例尺=20 μm。(a) A 中磷酸组蛋白 3 染色的细胞与总细胞的比率(蓝色)。(B) 通过 Annexin-V 和碘化丙啶 (PI) 染色进行流式细胞分析。R1, 正常细胞; R2, 早期凋亡细胞; R3, 坏死细胞; R4, 晚期凋亡细胞。%: 凋亡细胞 (R2+R4) 占总细胞的百分比。(b) B 的统计分析。误差线表示三个重复实验的平均值±SD。ANOVA 计算显著差异(不同字母间表示显著差异,  $p < 0.05$ )。

**Figure 3.15. Low concentration of 20E promotes HaEpi cell proliferation and high concentration of 20E promotes HaEpi cell apoptosis.** (A) Detection of cell proliferation. Red fluorescence indicates the phospho-histone 3 detected by the phospho-histone 3 antibody and goat anti-mouse IgG Alexa-Fluor 568 (red). Blue indicates nucleus stained by DAPI. Bar indicates 20 μm. (a) Ratio of P-histone 3 staining cells to the total cells (blue) in A. (B) Flow cytometry analysis by Annexin-V and propidium iodide (PI) staining. R1, normal cells; R2, apoptotic cells; R3, detection error within the permitted range; R4, dead cells. %: the percentage of apoptotic cells (R2 + R4) to total cells. (b) The statistical analysis of F. Each bar represents the mean ± SD of three replicates. Significant differences were calculated using ANOVA (different letters represent significant differences,  $p < 0.05$ ).

## 4 讨论

GPCR 作为细胞膜受体在哺乳动物和昆虫中传递类固醇激素信号。但是, 仍有许多问题尚待确定, 包括多种 GPCR 参与 20E 信号传导、GPCR 寡聚化的机制和效应、以及控制 20E 进入细胞的机制。本研究发现 GPCR-3 可以结合 20E 传递 20E 信号, 激活 PKA 和 PKC 信号途径, 20E 通过 GRK2 调控 GPCR-3 的磷酸化使其内吞终止 20E 信号。GPCR-3 以二聚体形式存在, 20E 结合诱导 GPCR-3 形成四聚体, 促进 20E 进入细胞, 促进细胞凋亡。

### 4.1 20E 通过 GPCR-3 传输信号和终止信号

通过与配体的结合, GPCR 与  $G_{\alpha s}$  和  $G_{\alpha q}$  相互作用以增加细胞内 cAMP 和  $Ca^{2+}$  水平进而分别激活 PKA 途径和 PKC 途径 (Marinissen and Gutkind 2001)。GPCR-cAMP-PKA 和 GPCR- $Ca^{2+}$ -PKC 途径参与动物类固醇激素非基因组途径的信号传导 (Marino et al. 2006)。ErGPCR-1 诱导  $Ca^{2+}$ -PKC 途径 (Liu et al. 2014b), 而 ErGPCR-2 诱导 GPCR-cAMP-PKA 和 GPCR- $Ca^{2+}$ -PKC 途径 (Jing et al. 2016)。20E 通过 GPCR-3 调节 USP1, CDK10, PKAC1 和 CREB 的磷酸化, 这些蛋白质的磷酸化对于形成 20E 通路基因转录的 EcRB1-USP1 转录复合物至关重要 (Liu et al. 2014b; Jing et al. 2016)。棉铃虫的 DopEcR 在 20E 诱导下直接与  $G_{\alpha s}$  和  $G_{\alpha q}$  相互作用, 以增加 cAMP 和  $Ca^{2+}$  的水平 (Kang et al. 2019)。20E 通过 GPCR-3 触发了类似于 DopEcR 调节 20E 途径基因转录的信号级联反应。这些数据表明, GPCRs 传递 20E 信号, 促进基因表达进而发生变态。

传递信号后, 一些 GPCR 内化 (Weinberg and Puthenveedu 2019)。GRK 和  $\beta$ -arrestin 在 GPCR 内化中起重要作用 (Gurevich and Gurevich 2019)。大多数 GPCR 被 GRK 磷酸化并通过与  $\beta$ -arrestin (Ritter and Hall 2009) 和网格蛋白 (Oakley et al.

1999; Kang et al. 2014) 相互作用而被内化, 抑制 GPCR 与 G 蛋白的进一步相互作用, 这一过程被称为脱敏 (Murga et al. 2019)。GPCR-3 脱敏也依赖于类似的机制, 20E 诱导下 GPCR-3 的 C 端被 GRK2 磷酸化, 并在  $\beta$ -arrestin-1 和网格蛋白的介导下内吞。GPCR-3 在溶酶体中降解以终止 20E 信号转导。

#### 4.2 多个 GPCR 结合 20E 的细胞膜受体

有多个 GPCR 传递 20E 信号, 包括黑腹果蝇 (Srivastava et al. 2005) 和棉铃虫中的 DopEcR (Kang et al. 2019), 棉铃虫中的 ErGPCR-1 和 ErGPCR-2 (Cai et al. 2014a; Wang et al. 2015)。本研究揭示了 GPCR-3 也可以传递 20E 信号, DopEcR 和雌激素的膜受体 GPER 属于 GPCR A 家族 (视紫红质样), 而 ErGPCR-1, ErGPCR-2 和 GPCR-3 属于 B 家族 (分泌素受体 methuselah-2 家族, Mth)。ErGPCR-1 传递 20E 信号而不结合 20E, 而 ErGPCR-2 和 DopEcR 以高亲和力 ( $K_d$  为 18-23 nM) 结合 20E 来传递 20E 信号 (Kang et al. 2019)。这些结果表明多个 GPCR 可以作 20E 的细胞膜受体。

多个 GPCR 传递 20E 信号并作为 20E 细胞膜受体的原因可能是由于 Mth 起源于同一个基因, 随后在昆虫中被大量复制 (Li et al. 2013)。另一个原因可能是因为 G 蛋白中普遍保守的序列允许受体以类似方式结合并激活 G 蛋白。不同的受体通过不同的残基识别 G 蛋白序列的特殊位置, 例如使用不同的切割方式打开同一把锁 (G 蛋白) 的多个钥匙 (受体) (Flock et al. 2017)。此外, 不同的 GPCR 可以通过不同的 G 蛋白起始信号传导。例如, ErGPCR-2 和 GPCR-3 可以通过与  $G_{\alpha q}$  和  $G_{\alpha s}$  相互作用来增加细胞中钙和 cAMP 水平, 而 ErGPCR-1 仅通过  $G_{\alpha q}$  来增加细胞中钙的水平 (Jing et al. 2015; Kang et al. 2019)。一种配体使用多种受体在生物中很常见, 如人类肾上腺素有多种 GPCR 受体 ( $\alpha_1$ -肾上腺素受体,  $\alpha_2$ -肾上腺素受体和  $\beta$ -肾上腺素受体) 作为其受体 (Goldie et al. 1984; Alberts 1993; Ruffolo et al. 1995)。

#### 4.3 20E 促进 GPCR-3 形成同源四聚体易化 20E 进入细胞

A 类和 B 类 GPCR 可以作为单个分子传输信号, 或者以同源二聚体或寡聚体形式存在, 但是其生物学功能尚不清楚 (Gurevich and Gurevich 2018)。GPCR 通过二聚体和多聚物之间的变构整合细胞外信号 (Xue et al. 2019)。人  $\beta_2$ AR (肾上腺素能受体  $\beta_2$ ) 主要是以同源四聚体存在, 在 Sf9 细胞中能够形成复杂的寡聚体 (Fung et al. 2009)。配体的结合可以诱导 A 类 GPCR 形成二聚体或寡聚体 (Milligan et al. 2019)。本研究发现 GPCR-3 形成组成型同源二聚体, 并通过 20E 结合诱导形成同源四聚体, GPCR-3 的 20E 结合位点的突变抑制了同源四聚体的形成, 说明 20E 结

合位点对 GPCR-3 形成四聚体具有重要作用。GPCR-3 同源四聚体不仅增加了细胞  $\text{Ca}^{2+}$  和 cAMP 的水平以传递 20E 信号, 而且还促进了 20E 易化扩散进入细胞, 与核受体 EcRB1 结合进行基因转录。这是首次发现 GPCR 四聚体传递类固醇激素信号并且促进类固醇激素易化扩散进入细胞。

研究发现 ErGPCR-2 可以促进 20E 进入细胞 (Wang et al. 2015)。在果蝇中, 蜕皮激素不是通过膜的自由扩散作用, 而是通过囊泡介导作用从内分泌组织分泌到胞外 (Yamanaka et al. 2015)。此外, 果蝇中还发现 20E 从血淋巴进入靶细胞需要一个膜转运蛋白 Ecdysone Importer (EcI), 说明类固醇激素进入细胞不是通过简单扩散, 而是受到一种转运蛋白控制 (Okamoto et al. 2018)。EcI 作为一种 12 次跨膜的蛋白, 被认为可以通过一个带正电的孔道转运蜕皮激素 (Kalliokoski and Niemi 2009)。蜕皮激素进入细胞需要 EcI 介导, 但下游蜕皮激素的信号传导则不需要 EcI。本研究证明了 20E 结合 GPCR-3, 使其形成同源四聚体 (具有  $7 \times 4 = 28$  个跨膜结构域的复合物), 促进 20E 进入细胞。这项研究证明了类固醇激素进入细胞是被 GPCR 控制的, 但是 GPCR-3 四聚体增加 20E 进入细胞的机制尚需深入研究。

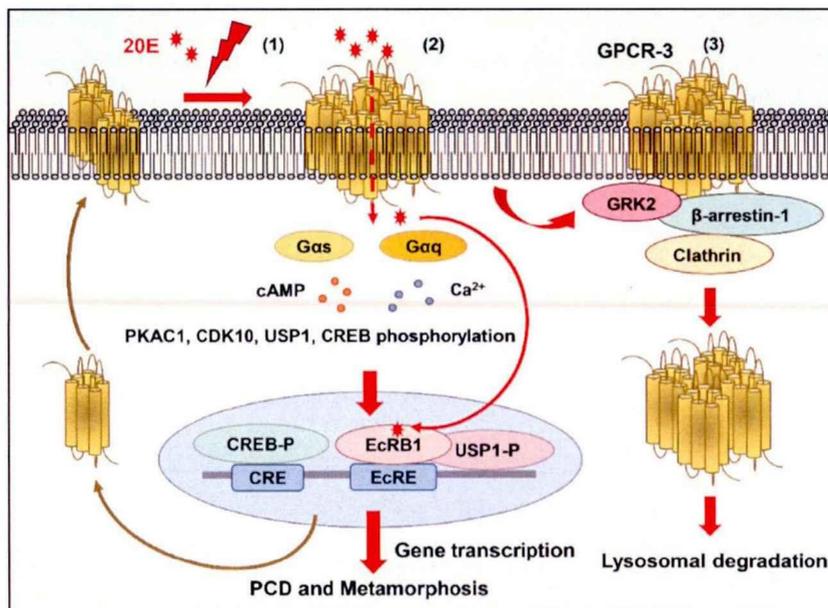
#### 4.4 GPCR-3 四聚体增加组织中 20E 滴度进而促进细胞凋亡

低浓度的 20E 刺激家蚕翅芽中的细胞快速增殖 (Koyama et al. 2004), 而高浓度的 20E 会抑制翅芽的增殖, 并导致周围组织的生长停止 (Edgar 2006), 说明 20E 在不同浓度下发挥不同功能。棉铃虫幼虫生长期间 20E 滴度约为  $0.5 \mu\text{M}$ , 但在变态过程中 20E 滴度增至  $5 \mu\text{M}$  (Kang et al. 2019)。在变态过程中, 相同血淋巴 20E 浓度下翅芽在生长, 而中肠在凋亡, 说明 20E 进入不同组织的量是受到控制的。高浓度的 20E ( $5 \mu\text{M}$ ) 通过增加钙水平和自噬相关基因 5 (ATG5) 的裂解来触发 caspase-3 的活化, 进而启动细胞凋亡 (Li et al. 2016)。本研究发现六龄 96 h 幼虫中肠 GPCR-3 的表达显著高于翅芽, 并且中肠中四聚体含量高于翅芽。20E 滴度检测发现中肠中的 20E 浓度显著高于翅芽, 说明位于细胞膜中的 GPCR-3 同源四聚体转运了更多的 20E 进入细胞, 并且 GPCR-3 的内吞不会影响 20E 的进入。这些结果表明 GPCR-3 同源四聚体促进 20E 易化扩散进入靶细胞。

## 5 结论

GPCR-3 是 20E 的细胞膜受体, 以同源二聚体形式存在于细胞膜中, 20E 结合促进 GPCR-3 形成同源四聚体。20E 诱导 GPCR-3 与 *Gaq* 和 *Gas* 相互作用, 增加细胞内钙离子和 cAMP 的浓度以及一系列蛋白质的磷酸化, 从而促进细胞核中基因的表达和昆虫变态。此外, GPCR-3 同源四聚体促进 20E 扩散进入细胞, 增加了细胞中

20E 浓度, 20E 通过 EcRB1-USP1 转录复合体上调 20E 途径基因及 GPCR-3 的表达, 以正反馈的方式增加 20E 信号传导和细胞凋亡。GPCR-3 通过 GRK2 介导的磷酸化以及与  $\beta$ -arrestin-1 和网格蛋白的相互作用而内吞, 终止 20E 信号转导 (图 3.16)。



**图 3.16. GPCR-3 促进 20E 进入细胞并传递 20E 信号。** 20E 结合促进 GPCR-3 形成同源四聚体。GPCR-3 同源四聚体促进 20E 进入细胞与核受体 EcRB1 结合, 从而在变态过程中促进基因表达和细胞凋亡 (1)。20E 诱导 GPCR-3 与 Gαq 和 Gαs 的相互作用, 迅速增加胞质钙和 cAMP 水平, 从而导致 PKAC1, CDK10, USP1 和 CREB 的磷酸化。磷酸化的 CREB (CREB-P) 与 CRE 结合以促进 20E 调控的基因转录 (Jing et al. 2016)。磷酸化的 USP1 和 CDK10 促使 EcRB1/USP1 转录复合物形成并与蜕皮激素响应元件 (EcRE) 结合以起始昆虫变态的基因表达 (Liu et al. 2014a; Liu et al. 2014b) (2)。GPCR-3 同源四聚体通过 GRK2 介导的磷酸化和  $\beta$ -arrestin-1 和网格蛋白的参与而内化, 以使 GPCR 脱敏并终止 20E 信号 (3)。

**Figure 3.16. Diagram illustrating the GPCR-3 promotes 20E into cells and transmits 20E signals.** GPCR-3 oligomerizes to a homo-tetramer from a constitutive homo-dimer by 20E binding. GPCR-3 homo-tetramer facilitates 20E entering the cells to bind to the nuclear receptor EcRB1 to promote gene expression and apoptosis during metamorphosis (1). 20E induces the interaction between GPCR-3 and Gαq and Gαs to increase cytosolic calcium and cAMP rapidly, which leads to phosphorylation of PKAC1, CDK10, USP1 and CREB. The phosphorylated-CREB (CREB-P) binds to CRE to promote 20E-regulated gene transcription (Jing et al. 2016). The phosphorylated-USP1 and CDK10 forms EcRB1/USP1 transcription complex and bind to ecdysone response element (EcRE) to regulate gene expression for insect metamorphosis (Liu et al. 2014a; Liu et al. 2014b) (2). GPCR-3 homo-tetramer is internalized by GRK2-mediated phosphorylation and participation of  $\beta$ -arrestin-1 and clathrin, and degraded to desensitize GPCR and terminate the 20E signal (3).

## 第四章 论文创新点总结及意义

本文研究了棉铃虫多巴胺蜕皮激素受体 DopEcR 在 20E 调控昆虫变态和进食中的分子机制,并用 20E-EIA 方法证明了多个 GPCRs 结合 20E,阐明了 20E 抑制鳞翅目昆虫取食并促进变态发育的分子机制,揭示了类固醇激素与多巴胺系统的互作;探究了 20E 调控 GPCR 多聚化现象以及 GPCR 在调控类固醇激素进入细胞的分子机制,为类固醇激素通过转运蛋白的易化扩散机制提供了新的理论支持。

### 4.1 论文创新点总结及意义

#### 一、20E 竞争结合 DopEcR 抑制鳞翅目昆虫取食并促进化蛹的研究

1. 幼虫生长取食期多巴胺滴度较高而 20E 滴度较低,蜕皮变态期多巴胺滴度较低而 20E 滴度较高。为研究昆虫多巴胺及蜕皮激素在虫体中的功能提供了理论支持。
2. DopEcR 在幼虫进食阶段充当 DA 受体,DA 与 DopEcR 结合促进 AKT 磷酸化,细胞增殖,幼虫进食和生长。阐明了 DA 在幼虫进食和细胞增殖中的功能,为昆虫多巴胺及其受体功能的深入研究提供了新的依据。
3. 20E 在变态过程中上调 DopEcR 的表达,并与 DopEcR 结合以阻断其在幼虫进食和细胞增殖中的功能,使昆虫从取食生长转变到变态发育。证明了 20E 竞争结合 DopEcR,为类固醇激素信号途径及其与神经系统的互作提供了新的理论。
4. 20E 触发 DopEcR 与 Gαq 和 Gαs 的相互作用,增加细胞内 Ca<sup>2+</sup>和 cAMP 的水平,并诱导蛋白质磷酸化,从而调节 20E 途径基因的表达以实现变态。丰富了 20E 非基因组和基因组信号通路的分子机制。

#### 二、20E 诱导 GPCR-3 形成同源四聚体传递信号和易化扩散进入细胞

1. 发现了 20E 促进 GPCR-3 形成同源四聚体,促进 20E 扩散进入细胞并传输 20E 信号。为 GPCR 多聚体的形成机制及功能提供了理论支持。
2. GPCR-3 结合 20E 并触发细胞膜上的 20E 信号传导,GPCR-3 与 Gαq 和 Gαs 相互作用,诱导细胞内钙和 cAMP 的增加,以及蛋白质磷酸化,从而调节细胞核中基因的表达和昆虫变态。进一步阐明丰富了 20E 非基因组信号途径。
3. GPCR-3 通过 GRK2 介导的磷酸化以及与 β-arrestin-1 和网格蛋白的相互作用而内吞,以终止 20E 信号转导。揭示了 GPCR 在 20E 信号传导中的脱敏机制。
4. GPCR-3 介导的易化扩散很好地增加了细胞内 20E 滴度,组织中高浓度的 20E 促进细胞凋亡。丰富发展了在昆虫变态期间幼虫组织与成虫组织差异分化的分子机制。

### 4.2 后期工作展望

1. 尽管明确了 GPCR-3 四聚体在转运 20E 进入细胞的功能,但是还缺少更多的证

据。例如，是否存在 GPCR-3 影响其他的转运蛋白，进而间接影响转运功能，其他 GPCR 是否影响 GPCR-3 在充当转运蛋白中的功能，是否协同转运。此外，无论是蛋白过表达还是荧光共振能量转移（FRET, fluorescence resonance energy transfer）和生物发光共振能量转移（BRET, bioluminescence resonance energy transfer）技术评估 GPCR 二聚化的方法均具有一定局限性，采用更为先进的技术如全内反射荧光显微镜（total internal reflection fluorescent microscope, TIRFM）等工具，可以准确，动态地观察活细胞中 GPCR 二聚体的形成和解离。

2. 由于 20E 与细胞膜上的 GPCR 结合，所以检测进入细胞 20E 滴度时有可能检测到膜结合的 20E，而非进入细胞内的 20E。需要对细胞膜和细胞质中的 20E 进行分别检测，以明确 20E 进入细胞的主要途径。

3. 虽然鳞翅目昆虫的 RNAi 已经得到了充分的报道和验证，但是目前越来越多的研究使用基因编辑对靶标基因进行敲除研究其功能。在 RNAi 的基础上应用基因编辑技术能更好地证明靶标基因的功能。

## 参考文献

- Abrieux, A, Duportets, L, Debernard, S, Gadenne, C and Anton, S (2014) The GPCR membrane receptor, DopEcR, mediates the actions of both dopamine and ecdysone to control sex pheromone perception in an insect. *Front Behav Neurosci* **8**: 312, 10.3389/fnbeh.2014.00312 .
- Agarwal, M, Giannoni Guzman, M, Morales-Matos, C, Del Valle Diaz, RA, Abramson, CI and Giray, T (2011) Dopamine and octopamine influence avoidance learning of honey bees in a place preference assay. *PLoS One* **6**: e25371.
- Agnati, LF, Fuxe, K, Benfenati, F, Celani, MF, Battistini, N, Mutt, V, Cavicchioli, L, Galli, G and Hokfelt, T (1983) Differential modulation by CCK-8 and CCK-4 of [3H]spiperone binding sites linked to dopamine and 5-hydroxytryptamine receptors in the brain of the rat. *Neurosci Lett* **35**: 179-83.
- Alberts, P (1993) Subtype classification of presynaptic alpha 2-adrenoceptors. *Gen Pharmacol* **24**: 1-8.
- Albizu, L, Cottet, M, Kralikova, M, Stoev, S, Seyer, R, Brabet, I, Roux, T, Bazin, H, Bourrier, E, Lamarque, L, Breton, C, Rives, ML, Newman, A, Javitch, J, Trinquet, E, Manning, M, Pin, JP, Mouillac, B and Durroux, T (2010) Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat Chem Biol* **6**: 587-94.
- Andersen, DS, Colombani, J and Leopold, P (2013) Coordination of organ growth: principles and outstanding questions from the world of insects. *Trends Cell Biol* **23**: 336-44.
- Andersen, SO (2010) Insect cuticular sclerotization: A review. *Insect Biochem Mol Biol* **40**: 166-178.
- Angers, S, Salahpour, A, Joly, E, Hilairat, S, Chelsky, D, Dennis, M and Bouvier, M (2000) Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3684-9.
- Avissar, S, Amitai, G and Sokolovsky, M (1983) Oligomeric structure of muscarinic receptors is shown by photoaffinity labeling: subunit assembly may explain high- and low-affinity agonist states. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 156-9.
- Bai, H and Palli, SR (2016) Identification of G protein-coupled receptors required for vitellogenin uptake into the oocytes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Sci Rep* **6**, 27648.
- Baneres, JL and Parello, J (2003) Structure-based analysis of GPCR function: Evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B-4 receptor BLT1 and the G-protein. *J Mol Biol* **329**: 815-829.
- Banks, WA (2012) Brain Meets Body: The blood-brain barrier as an endocrine interface. *Endocrinology* **153**: 4111-4119.
- Beaulieu, JM and Gainetdinov, RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* **63**: 182-217.
- Beaulieu, JM, Sotnikova, TD, Marion, S, Lefkowitz, RJ, Gainetdinov, RR and Caron, MG (2005) An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* **122**: 261-273.
- Belgacem, YH and Martin, JR (2007) Hmgcr in the corpus allatum controls sexual dimorphism of locomotor activity and body size via the insulin pathway in *Drosophila*. *PLoS One* **2**: e187.
- Benard, G, Massa, F, Puente, N, Lourenco, J, Bellocchio, L, Soria-Gomez, E, Matias, I, Delamarre, A, Metna-Laurent, M, Cannich, A, Hebert-Chatelain, E, Mulle, C, Ortega-Gutierrez, S, Martin-Fontecha, M, Klugmann, M, Guggenhuber, S, Lutz, B, Gertsch, J, Chaouloff, F, Lopez-Rodriguez, ML, Grandes, P, Rossignol, R and Marsicano, G (2012) Mitochondrial CB1

- receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat Neurosci* **15**: 558-564.
- Benovic, JL, DeBlasi, A, Stone, WC, Caron, MG and Lefkowitz, RJ (1989) Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science* **246**: 235-40.
- Bhattacharyya, S, Warfield, KL, Ruthel, G, Bavari, S, Aman, MJ and Hope, TJ (2010) Ebola virus uses clathrin-mediated endocytosis as an entry pathway. *Virology* **401**: 18-28.
- Billas, IM, Iwema, T, Garnier, JM, Mitschler, A, Rochel, N and Moras, D (2003) Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor. *Nature* **426**: 91-6.
- Billas, IML, Moulinier, L, Rochel, N and Moras, D (2001) Crystal structure of the ligand-binding domain of the ultraspiracle protein USP, the ortholog of retinoid X receptors in insects. *J Biol Chem* **276**: 7465-7474.
- Bjarnadottir, TK, Gloriam, DE, Hellstrand, SH, Kristiansson, H, Fredriksson, R and Schioth, HB (2006) Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* **88**: 263-273.
- Bockaert, J and Pin, JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* **18**: 1723-1729.
- Bollenbacher, WE, Smith, SL, Goodman, W and Gilbert, LI (1981) Ecdysteroid titer during larval-pupal-adult development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen Comp Endocrinol* **44**: 302-6.
- Bonneton, F, Zelus, D, Iwema, T, Robinson-Rechavi, M and Laudet, V (2003) Rapid divergence of the ecdysone receptor in Diptera and Lepidoptera suggests coevolution between ECR and USP-RXR. *Mol Biol Evol* **20**: 541-553.
- Bouvier, M (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**: 274-86.
- Boyd, KN and Mailman, RB (2012) Dopamine receptor signaling and current and future antipsychotic drugs. *Handb Exp Pharmacol*: 53-86.
- Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Broadus, J, McCabe, JR, Endrizzi, B, Thummel, CS and Woodard, CT (1999) The *Drosophila* beta FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Mol Cell* **3**: 143-149.
- Brown, DD and Cai, L (2007) Amphibian metamorphosis. *Dev Biol* **306**: 20-33.
- Bryant, B and Raikhel, AS (2011) Programmed autophagy in the fat body of *Aedes aegypti* is required to maintain egg maturation cycles. *PLoS One* **6**, e25502.
- Bryant, PJ (2001) Growth factors controlling imaginal disc growth in *Drosophila*. *Novartis Found Symp* **237**: 182-94; discussion 194-202.
- Burke, CJ, Huetteroth, W, Oswald, D, Perisse, E, Krashes, MJ, Das, G, Gohl, D, Silies, M, Certel, S and Waddell, S (2012) Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila*. *Nature* **492**: 433-437.
- Cai, MJ, Dong, DJ, Wang, Y, Liu, PC, Liu, W, Wang, JX and Zhao, XF (2014a) G-protein-coupled receptor participates in 20-hydroxyecdysone signaling on the plasma membrane. *Cell Commun Signal* **12**: 9, 10.1186/1478-811X-12-9.
- Cai, MJ, Li, XR, Pei, XY, Liu, W, Wang, JX and Zhao, XF (2014b) Heat shock protein 90 maintains the stability and function of transcription factor Broad Z7 by interacting with its Broad-Complex-Tramtrack-Bric-a-brac domain. *Insect Mol Biol* **23**: 720-32.

- Cai, MJ, Liu, W, Pei, XY, Li, XR, He, HJ, Wang, JX and Zhao, XF (2014c) Juvenile hormone prevents 20-hydroxyecdysone-induced metamorphosis by regulating the phosphorylation of a newly identified broad protein. *J Biol Chem* **289**: 26630-41.
- Calebiro, D, Rieken, F, Wagner, J, Sungkaworn, T, Zabel, U, Borzi, A, Cocucci, E, Zurn, A and Lohse, MJ (2013) Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 743-8.
- Cavallotti, C, Mancone, M, Bruzzone, P, Sabbatini, M and Mignini, F (2010) Dopamine receptor subtypes in the native human heart. *Heart Vessels* **25**: 432-7.
- Champlin, DT and Truman, JW (1998) Ecdysteroids govern two phases of eye development during metamorphosis of the moth, *Manduca sexta*. *Development* **125**: 2009-18.
- Chandrashekar, J, Hoon, MA, Ryba, NJP and Zuker, CS (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* **444**: 288-294.
- Chen, CH, Di, YQ, Shen, QY, Wang, JX and Zhao, XF (2019) The steroid hormone 20-hydroxyecdysone induces phosphorylation and aggregation of stromal interacting molecule 1 for store-operated calcium entry. *J Biol Chem* **294**: 14922-14936.
- Chen, CH, Pan, J, Di, YQ, Liu, W, Hou, L, Wang, JX and Zhao, XF (2017) Protein kinase C delta phosphorylates ecdysone receptor B1 to promote gene expression and apoptosis under 20-hydroxyecdysone regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**: E7121-E7130.
- Chen, L, Zhu, J, Sun, G and Raikhel, AS (2004) The early gene Broad is involved in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. *J Mol Endocrinol* **33**: 743-761.
- Chen, X, Zheng, C, Qian, J, Sutton, SW, Wang, Z, Lv, J, Liu, C and Zhou, N (2014) Involvement of beta-arrestin-2 and clathrin in agonist-mediated internalization of the human cannabinoid CB2 receptor. *Curr Mol Pharmacol* **7**: 67-80.
- Cheng, ZJ, Harikumar, KG, Holicky, EL and Miller, LJ (2003) Heterodimerization of type A and B cholecystokinin receptors enhance signaling and promote cell growth. *J Biol Chem* **278**: 52972-9.
- Cheng, ZJ and Miller, LJ (2001) Agonist-dependent dissociation of oligomeric complexes of G protein-coupled cholecystokinin receptors demonstrated in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **276**: 48040-7.
- Clever, U and Karlson, P (1960) Induktion von puff-veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von *Chironomus tentans* durch Ecdyson. *Exp Cell Res* **20**: 623-626.
- Coccorello, R and Maccarrone, M (2018) Hedonic eating and the "Delicious Circle": from lipid-derived mediators to brain dopamine and back. *Front Neurosci* **12**: 271.
- Colombani, J, Andersen, DS and Leopold, P (2012) Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* **336**: 582-5.
- Colombani, J, Bianchini, L, Layalle, S, Pondeville, E, Dauphin-Villemant, C, Antoniewski, C, Carre, C, Noselli, S and Leopold, P (2005) Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* **310**: 667-70.
- Cruz, J, Mane-Padros, D, Belles, X and Martin, D (2006) Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi in vivo. *Dev Biol* **297**: 158-171.
- Cruz, J, Mane-Padros, D, Zou, Z and Raikhel, AS (2012) Distinct roles of isoforms of the heme-liganded

- nuclear receptor E75, an insect ortholog of the vertebrate Rev-erb, in mosquito reproduction. *Mol Cell Endocrinol* **349**: 262-271.
- Cruz, J, Martin, D and Belles, X (2007) Redundant ecdysis regulatory functions of three nuclear receptor HR3 isoforms in the direct-developing insect *Blattella germanica*. *Mech Dev* **124**: 180-9.
- Dahlman-Wright, K, Cavailles, V, Fuqua, SA, Jordan, VC, Katzenellenbogen, JA, Korach, KS, Maggi, A, Muramatsu, M, Parker, MG and Gustafsson, JA (2006) International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* **58**: 773-81.
- Das, R and Dobens, LL (2015) Conservation of gene and tissue networks regulating insulin signalling in flies and vertebrates. *Biochem Soc Trans* **43**: 1057-62.
- Dhadialla, TS, Carlson, GR and Le, DP (1998) New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu Rev Entomol* **43**: 545-69.
- Ding, WQ, Cheng, ZJ, McElhiney, J, Kuntz, SM and Miller, LJ (2002) Silencing of secretin receptor function by dimerization with a misspliced variant secretin receptor in ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **62**: 5223-9.
- Dominick, OS and Truman, JW (1986) The physiology of wandering behaviour in *Manduca sexta*. IV. Hormonal induction of wandering behaviour from the isolated nervous system. *J Exp Biol* **121**: 133-51.
- Dong, DJ, Liu, PC, Wang, JX and Zhao, XF (2012) The knockdown of Ha-GRIM-19 by RNA interference induced programmed cell death. *Amino Acids* **42**: 1297-307.
- Draper, I, Kurshan, PT, McBride, E, Jackson, FR and Kopin, AS (2007) Locomotor activity is regulated by D2-like receptors in *Drosophila*: an anatomic and functional analysis. *Dev Neurobiol* **67**: 378-93.
- Dubrovsky, EB (2005) Hormonal cross talk in insect development. *Trends Endocrinol Metab* **16**: 6-11.
- Edgar, BA (2006) How flies get their size: genetics meets physiology. *Nat Rev Genet* **7**: 907-916.
- Eichel, K, Jullie, D and von Zastrow, M (2016) beta-Arrestin drives MAP kinase signalling from clathrin-coated structures after GPCR dissociation. *Nat Cell Biol* **18**: 303-10.
- Elmogly, M, Iwami, M and Sakurai, S (2004) Presence of membrane ecdysone receptor in the anterior silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *Eur J Biochem* **271**: 3171-9.
- Ernst, OP, Gramse, V, Kolbe, M, Hofmann, KP and Heck, M (2007) Monomeric G protein-coupled receptor rhodopsin in solution activates its G protein transducin at the diffusion limit. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 10859-10864.
- Evans, PD, Bayliss, A and Reale, V (2014) GPCR-mediated rapid, non-genomic actions of steroids: Comparisons between DmDopEcR and GPER1 (GPR30). *Gen Comp Endocrinol* **195**: 157-163.
- Evans, PD, Robb, S, Cheek, TR, Reale, V, Hannan, FL, Swales, LS, Hall, LM and Midgley, JM (1995) Agonist-specific coupling of G-protein-coupled receptors to second-messenger systems. *Prog Brain Res* **106**: 259-68.
- Falkenstein, E, Tillmann, HC, Christ, M, Feuring, M and Wehling, M (2000) Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* **52**: 513-56.
- Ferre, S, Baler, R, Bouvier, M, Caron, MG, Devi, LA, Durroux, T, Fuxe, K, George, SR, Javitch, JA, Lohse, MJ, Mackie, K, Milligan, G, Pflieger, KD, Pin, JP, Volkow, ND, Waldhoer, M, Woods, AS and Franco, R (2009) Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol* **5**: 131-4.
- Fletcher, JC, Burtis, KC, Hogness, DS and Thummel, CS (1995) The *Drosophila* E74 gene is required for metamorphosis and plays a role in the polytene chromosome puffing response to ecdysone.

- Development* **121**: 1455-1465.
- Fletcher, JC and Thummel, CS (1995) The *Drosophila* E74 gene is required for the proper stage-specific and tissue-specific transcription of ecdysone-regulated genes at the onset of metamorphosis. *Development* **121**: 1411-1421.
- Flock, T, Hauser, AS, Lund, N, Gloriam, DE, Balaji, S and Babu, MM (2017) Selectivity determinants of GPCR-G-protein binding. *Nature* **545**: 317-322.
- Flower, DR (1999) Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* **1422**: 207-34.
- Fotiadis, D, Liang, Y, Filipek, S, Saperstein, DA, Engel, A and Palczewski, K (2003) Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* **421**: 127-128.
- Fraser, CM and Venter, JC (1982) The size of the mammalian lung beta 2-adrenergic receptor as determined by target size analysis and immunoaffinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* **109**: 21-9.
- Friedrichson, T and Kurzchalia, TV (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* **394**: 802-5.
- Frielle, T, Collins, S, Daniel, KW, Caron, MG, Lefkowitz, RJ and Kobilka, BK (1987) Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7920-4.
- Fung, JJ, Deupi, X, Pardo, L, Yao, XJ, Velez-Ruiz, GA, Devree, BT, Sunahara, RK and Kobilka, BK (2009) Ligand-regulated oligomerization of beta(2)-adrenoceptors in a model lipid bilayer. *EMBO J* **28**: 3315-28.
- Garelli, A, Gontijo, AM, Miguela, V, Caparros, E and Dominguez, M (2012) Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science* **336**: 579-82.
- Gilbert, LI, Bollenbacher, WE and Granger, NA (1980) Insect endocrinology: regulation of endocrine glands, hormone titer, and hormone metabolism. *Annu Rev Physiol* **42**: 493-510.
- Gines, S, Hillion, J, Torvinen, M, Le Crom, S, Casado, V, Canela, EI, Rondin, S, Lew, JY, Watson, S, Zoli, M, Agnati, LF, Verniera, P, Lluis, C, Ferre, S, Fuxe, K and Franco, R (2000) Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8606-11.
- Giorgi, EP and Stein, WD (1981) The transport of steroids into animal cells in culture. *Endocrinology* **108**: 688-697.
- Girault, JA and Greengard, P (2004) The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol* **61**: 641-4.
- Godbole, A, Lyga, S, Lohse, MJ and Calebiro, D (2017) Internalized TSH receptors en route to the TGN induce local Gs-protein signaling and gene transcription. *Nat Commun* **8**: 443.
- Goldie, RG, Paterson, JW, Spina, D and Wale, JL (1984) Classification of beta-adrenoceptors in human isolated bronchus. *Br J Pharmacol* **81**: 611-5.
- Golebiewska, U, Johnston, JM, Devi, L, Filizola, M and Scarlata, S (2011) Differential response to morphine of the oligomeric state of mu-opioid in the presence of delta-opioid receptors. *Biochemistry* **50**: 2829-37.
- Gomes, I, Jordan, BA, Gupta, A, Rios, C, Trapaidze, N and Devi, LA (2001) G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J Mol Med (Berl)* **79**: 226-42.
- Goncu, E and Parlak, O (2009) Morphological changes and patterns of ecdysone receptor B1 immunolocalization in the anterior silk gland undergoing programmed cell death in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Histochemica* **111**: 25-34.
- Gonzalez-Noriega, A, Grubb, JH, Talkad, V and Sly, WS (1980) Chloroquine inhibits lysosomal enzyme

- pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *J Cell Biol* **85**: 839-52.
- Gorski, J and Gannon, F (1976) Current models of steroid hormone action: a critique. *Annu Rev Physiol* **38**: 425-50.
- Gruber, CJ, Tschugguel, W, Schneeberger, C and Huber, JC (2002) Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* **346**: 340-52.
- Guo, X, Ma, Z and Kang, L (2015) Two dopamine receptors play different roles in phase change of the migratory locust. *Front Behav Neurosci* **9**: 80.
- Gurevich, VV and Gurevich, EV (2006) The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **110**: 465-502.
- Gurevich, VV and Gurevich, EV (2018) GPCRs and signal transducers: interaction stoichiometry. *Trends Pharmacol Sci* **39**: 672-684.
- Gurevich, VV and Gurevich, EV (2019) GPCR signaling regulation: the role of GRKs and arrestins. *Front Pharmacol* **10**: 125.
- Haas, E, Bhattacharya, I, Brailoiu, E, Damjanovic, M, Brailoiu, GC, Gao, X, Mueller-Guerre, L, Marjon, NA, Gut, A, Minotti, R, Meyer, MR, Amann, K, Ammann, E, Perez-Dominguez, A, Genoni, M, Clegg, DJ, Dun, NJ, Resta, TC, Prossnitz, ER and Barton, M (2009) Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. *Circ Res* **104**: 288-91.
- Hall, BL and Thummel, CS (1998) The RXR homolog Ultraspiracle is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor. *Development* **125**: 4709-4717.
- Han, Y, Moreira, IS, Urizar, E, Weinstein, H and Javitch, JA (2009) Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat Chem Biol* **5**: 688-695.
- Handler, A, Graham, TGW, Cohn, R, Morante, I, Siliciano, AF, Zeng, J, Li, Y and Ruta, V (2019) Distinct dopamine receptor pathways underlie the temporal sensitivity of associative learning. *Cell* **178**: 60-75 e19.
- Harikumar, KG, Morfis, MM, Lisenbee, CS, Sexton, PM and Miller, LJ (2006) Constitutive formation of oligomeric complexes between family B G protein-coupled vasoactive intestinal polypeptide and secretin receptors. *Mol Pharmacol* **69**: 363-373.
- Harikumar, KG, Pinon, DI and Miller, LJ (2007) Transmembrane segment IV contributes a functionally important interface for oligomerization of the class II G protein-coupled secretin receptor. *J Biol Chem* **282**: 30363-30372.
- Harvie, PD, Filippova, M and Bryant, PJ (1998) Genes expressed in the ring gland, the major endocrine organ of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **149**: 217-31.
- He, Y, Gao, X, Goswami, D, Hou, L, Pal, K, Yin, Y, Zhao, G, Ernst, OP, Griffin, P, Melcher, K and Xu, HE (2017) Molecular assembly of rhodopsin with G protein-coupled receptor kinases. *Cell Res* **27**: 728-747.
- Hegstrom, CD, Riddiford, LM and Truman, JW (1998) Steroid and neuronal regulation of ecdysone receptor expression during metamorphosis of muscle in the moth, *Manduca sexta*. *J Neurosci* **18**: 1786-1794.
- Hill, CA, Doyle, T, Nuss, AB, Ejendal, KFK, Meyer, JM and Watts, VJ (2016) Comparative pharmacological characterization of D-1-like dopamine receptors from *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* suggests pleiotropic signaling in mosquito vector lineages. *Parasites Vectors* **9**, 10.1186/S13071-016-1477-6.
- Hill, RJ, Billas, IM, Bonneton, F, Graham, LD and Lawrence, MC (2013) Ecdysone receptors: from the

- Ashburner model to structural biology. *Annu Rev Entomol* **58**: 251-71.
- Himmelreich, S, Masuho, I, Berry, JA, MacMullen, C, Skamangas, NK, Martemyanov, KA and Davis, RL (2017) Dopamine receptor DAMB signals via Gq to mediate forgetting in *Drosophila*. *Cell Rep* **21**: 2074-2081.
- Hussain, T and Lokhandwala, MF (2003) Renal dopamine receptors and hypertension. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**: 134-42.
- Ikeya, T, Galic, M, Belawat, P, Nairz, K and Hafen, E (2002) Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Curr Biol* **12**: 1293-300.
- Inagaki, HK, Ben-Tabou de-Leon, S, Wong, AM, Jagadish, S, Ishimoto, H, Barnea, G, Kitamoto, T, Axel, R and Anderson, DJ (2012) Visualizing neuromodulation in vivo: TANGO-mapping of dopamine signaling reveals appetite control of sugar sensing. *Cell* **148**: 583-95.
- Irannejad, R, Pessino, V, Mika, D, Huang, B, Wedegaertner, PB, Conti, M and von Zastrow, M (2017) Functional selectivity of GPCR-directed drug action through location bias. *Nat Chem Biol* **13**: 799-806.
- Irannejad, R, Tomshine, JC, Tomshine, JR, Chevalier, M, Mahoney, JP, Steyaert, J, Rasmussen, SG, Sunahara, RK, El-Samad, H, Huang, B and von Zastrow, M (2013) Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature* **495**: 534-8.
- Isberg, V, de Graaf, C, Bortolato, A, Cherezov, V, Katritch, V, Marshal, FH, Mordalski, S, Pin, JP, Stevens, RC, Vriend, G and Gloriam, DE (2015) Generic GPCR residue numbers-aligning topology maps while minding the gaps. *Trends Pharmacol Sci* **36**: 22-31.
- Ishihara, T, Nakamura, S, Kaziro, Y, Takahashi, T, Takahashi, K and Nagata, S (1991) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. *EMBO J* **10**: 1635-41.
- Ishimoto, H and Kitamoto, T (2010) The steroid molting hormone Ecdysone regulates sleep in adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **185**: 269-81.
- Ishimoto, H, Wang, Z, Rao, Y, Wu, CF and Kitamoto, T (2013) A novel role for ecdysone in *Drosophila* conditioned behavior: linking GPCR-mediated non-canonical steroid action to cAMP signaling in the adult brain. *PLoS Genet* **9**: e1003843.
- Jing, YP, Liu, W, Wang, JX and Zhao, XF (2015) The steroid hormone 20-hydroxyecdysone via nongenomic pathway activates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II to regulate gene expression. *J Biol Chem* **290**: 8469-81.
- Jing, YP, Wang, D, Han, XL, Dong, DJ, Wang, JX and Zhao, XF (2016) The steroid hormone 20-hydroxyecdysone enhances gene transcription through the cAMP response element-binding protein (CREB) signaling pathway. *J Biol Chem* **291**: 12771-85.
- Joyce, JN (2001) Dopamine D3 receptor as a therapeutic target for antipsychotic and antiparkinsonian drugs. *Pharmacol Ther* **90**: 231-59.
- Kalliokoski, A and Niemi, M (2009) Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* **158**: 693-705.
- Kamimura, M, Tomita, S, Kiuchi, M and Fujiwara, H (1997) Tissue-specific and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms - Ecdysteroid-dependent transcription in cultured anterior silk glands. *Eur J Biochem* **248**: 786-793.
- Kang, DS, Tian, X and Benovic, JL (2014) Role of beta-arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking. *Curr Opin Cell Biol* **27**: 63-71.
- Kang, XL, Zhang, JY, Wang, D, Zhao, YM, Han, XL, Wang, JX and Zhao, XF (2019) The steroid

- hormone 20-hydroxyecdysone binds to dopamine receptor to repress lepidopteran insect feeding and promote pupation. *PLoS Genet* **15**: e1008331.
- Karim, FD, Guild, GM and Thummel, CS (1993) The *Drosophila* broad-complex plays a key role in controlling ecdysone-regulated gene-expression at the onset of metamorphosis. *Development* **118**: 977-988.
- Kaupmann, K, Malitschek, B, Schuler, V, Heid, J, Froestl, W, Beck, P, Mosbacher, J, Bischoff, S, Kulik, A, Shigemoto, R, Karschin, A and Bettler, B (1998) GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* **396**: 683-7.
- Kebabian, JW (1978) Multiple classes of dopamine receptors in mammalian central nervous system: the involvement of dopamine-sensitive adenylyl cyclase. *Life Sci* **23**: 479-83.
- Keshan, B, Hiruma, K and Riddiford, LA (2006) Developmental expression and hormonal regulation of different isoforms of the transcription factor E75 in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev Biol* **295**: 623-632.
- King-Jones, K and Thummel, CS (2005) Nuclear receptors-a perspective from *Drosophila*. *Nat Rev Genet* **6**: 311-23.
- Koelle, MR, Talbot, WS, SeGRAves, WA, Bender, MT, Cherbas, P and Hogness, DS (1991) The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **67**: 59-77.
- Kostal, V, Stetina, T, Poupardin, R, Korbelova, J and Bruce, AW (2017) Conceptual framework of the eco-physiological phases of insect diapause development justified by transcriptomic profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**: 8532-8537.
- Koyama, T, Iwami, M and Sakurai, S (2004) Ecdysteroid control of cell cycle and cellular commitment in insect wing imaginal discs. *Mol Cell Endocrinol* **213**: 155-66.
- Koyama, T, Mendes, C and Mirth, CK (2013) Mechanisms regulating nutrition-dependent developmental plasticity through organ-specific effects in insects. *Front Physiol* **4**: 263, 10.3389/fphys.2013.00263.
- Kroeger, KM, Hanyaloglu, AC, Seeber, RM, Miles, LE and Eidne, KA (2001) Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **276**: 12736-43.
- Krolick, KN, Zhu, Q and Shi, H (2018) Effects of estrogens on central nervous system neurotransmission: implications for sex differences in mental disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci* **160**: 105-171.
- Kucharova-Mahmood, S, Raska, I, Mechler, BM and Farkas, R (2002) Temporal regulation of *Drosophila* salivary gland degeneration by the Broad-Complex transcription factors. *J Struct Biol* **140**: 67-78.
- Kuner, R, Kohr, G, Grunewald, S, Eisenhardt, G, Bach, A and Kornau, HC (1999) Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* **283**: 74-7.
- Kunishima, N, Shimada, Y, Tsuji, Y, Sato, T, Yamamoto, M, Kumasaka, T, Nakanishi, S, Jingami, H and Morikawa, K (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **407**: 971-977.
- Lagueux, M, Hetru, C, Goltzene, F, Kappler, C and Hoffmann, JA (1979) Ecdysone titer and metabolism in relation to cuticulogenesis in embryos of *Locusta Migratoria*. *J Insect Physiol* **25**: 709-723.
- Lam, G and Thummel, CS (2000) Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*. *Curr Biol* **10**: 957-963.
- Lam, GT, Jiang, CA and Thummel, CS (1997) Coordination of larval and prepupal gene expression by

- the DHR3 orphan receptor during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **124**: 1757-1769.
- Lan, Q, Hiruma, K, Hu, X, Jindra, M and Riddiford, LM (1999) Activation of a delayed-early gene encoding MHR3 by the ecdysone receptor heterodimer EcR-B1-USP-1 but not by EcR-B1-USP-2. *Mol Cell Biol* **19**: 4897-906.
- Lark, A, Kitamoto, T and Martin, JR (2017) Modulation of neuronal activity in the *Drosophila* mushroom body by DopEcR, a unique dual receptor for ecdysone and dopamine. *Biochim Biophys Acta* **1864**: 1578-1588.
- Layalle, S, Arquier, N and Leopold, P (2008) The TOR pathway couples nutrition and developmental timing in *Drosophila*. *Dev Cell* **15**: 568-77.
- Lee, G and Park, JH (2004) Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **167**: 311-23.
- Lee, SP, So, CH, Rashid, AJ, Varghese, G, Cheng, R, Lanca, AJ, O'Dowd, BF and George, SR (2004) Dopamine D1 and D2 receptor co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* **279**: 35671-8.
- Lepesant, JA, Levine, M, Garen, A, Lepesant-Kejzlarova, J, Rat, L and Somme-Martin, G (1982) Developmentally regulated gene expression in *Drosophila* larval fat bodies. *J Mol Appl Genet* **1**: 371-83.
- Li, C, Chen, M, Sang, M, Liu, X, Wu, W and Li, B (2013) Comparative genomic analysis and evolution of family-B G protein-coupled receptors from six model insect species. *Gene* **519**: 1-12.
- Li, F, De Godoy, M and Rattan, S (2004) Role of adenylate and guanylate cyclases in beta1-, beta2-, and beta3-adrenoceptor-mediated relaxation of internal anal sphincter smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **308**: 1111-20.
- Li, YB, Li, XR, Yang, T, Wang, JX and Zhao, XF (2016) The steroid hormone 20-hydroxyecdysone promotes switching from autophagy to apoptosis by increasing intracellular calcium levels. *Insect Biochem Mol Biol* **79**: 73-86.
- Lin, X and Smagghe, G (2018) Roles of the insulin signaling pathway in insect development and organ growth. *Peptides* **122**, 169923.
- Liu, PC, Wang, JX, Song, QS and Zhao, XF (2011) The participation of calponin in the cross talk between 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone signaling pathways by phosphorylation variation. *PLoS One* **6**, e19776.
- Liu, W, Cai, MJ, Wang, JX and Zhao, XF (2014a) In a nongenomic action, steroid hormone 20-hydroxyecdysone induces phosphorylation of cyclin-dependent kinase 10 to promote gene transcription. *Endocrinology* **155**: 1738-50.
- Liu, W, Cai, MJ, Zheng, CC, Wang, JX and Zhao, XF (2014b) Phospholipase Cgamma1 connects the cell membrane pathway to the nuclear receptor pathway in insect steroid hormone signaling. *J Biol Chem* **289**: 13026-41.
- Lohse, MJ, Benovic, JL, Codina, J, Caron, MG and Lefkowitz, RJ (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**: 1547-50.
- Luttrell, LM (2005) Composition and function of G protein-coupled receptor signaling complexes controlling mitogen-activated protein kinase activity. *J Mol Neurosci* **26**: 253-64.
- Luttrell, LM, Ferguson, SSG, Daaka, Y, Miller, WE, Maudsley, S, Della Rocca, GJ, Lin, FT, Kawakatsu, H, Owada, K, Luttrell, DK, Caron, MG and Lefkowitz, RJ (1999) beta-arrestin-dependent formation of beta(2) adrenergic receptor Src protein kinase complexes. *Science* **283**: 655-661.

- Ma, Z, Guo, W, Guo, X, Wang, X and Kang, L (2011) Modulation of behavioral phase changes of the migratory locust by the catecholamine metabolic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 3882-7.
- Maggiolini, M and Picard, D (2010) The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J Endocrinol* **204**: 105-14.
- Manaboon, M, Iga, M, Iwami, M and Sakurai, S (2009) Intracellular mobilization of Ca<sup>2+</sup> by the insect steroid hormone 20-hydroxyecdysone during programmed cell death in silkworm anterior silk glands. *J Insect Physiol* **55**: 122-8.
- Mane-Padros, D, Cruz, J, Cheng, A and Raikhel, AS (2012) A critical role of the nuclear receptor HR3 in regulation of gonadotrophic cycles of the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS One* **7**, e45019.
- Marinissen, MJ and Gutkind, JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* **22**: 368-76.
- Marino, M, Galluzzo, P and Ascenzi, P (2006) Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* **7**: 497-508.
- Martorana, A and Koch, G (2014) "Is dopamine involved in Alzheimer's disease?". *Front Aging Neurosci* **6**: 252.
- McDonald, PH, Chow, CW, Miller, WE, Laporte, SA, Field, ME, Lin, FT, Davis, RJ and Lefkowitz, RJ (2000) beta-Arrestin 2: A receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **290**: 1574-1577.
- Milgrom, E, Atger, M and Baulieu, EE (1973) Studies on estrogen entry into uterine cells and on estradiol-receptor complex attachment to the nucleus-is the entry of estrogen into uterine cells a protein-mediated process? *Biochim Biophys Acta* **320**: 267-83.
- Milligan, G, Ward, RJ and Marsango, S (2019) GPCR homo-oligomerization. *Curr Opin Cell Biol* **57**: 40-47.
- Minakuchi, C, Nakagawa, Y, Kamimura, M and Miyagawa, H (2003) Binding affinity of nonsteroidal ecdysone agonists against the ecdysone receptor complex determines the strength of their molting hormonal activity. *Eur J Biochem* **270**: 4095-104.
- Mirth, CK, Truman, JW and Riddiford, LM (2009) The Ecdysone receptor controls the post-critical weight switch to nutrition-independent differentiation in *Drosophila* wing imaginal discs. *Development* **136**: 2345-2353.
- Misof, B, Liu, S, Meusemann, K, Peters, R, Donath, A, Mayer, C, Frandsen, P, Ware, J, Flouri, T, Beutel, R, Niehuis, O, Petersen, M, Zwickler, C, Carrasco, F, Wappler, T, Rust, J, ABERER, A, Aspöck, U, Bartel, H, Blanke, A, Berger, S, Böhm, A, Buckley, T, Calcott, B, Chen, J, Friedrich, F, Fukui, M, Fujita, M, Greve, C, Grobe, P, Gu, S, Huang, Y, Jermin, L, Kawahara, A, Krogmann, L, Kubiak, M, Lanfear, R, Letsch, H, Li, Y, Li, Z, Lu, J, Machida, R, Mashimo, Y, Kapli, P, McKenna, D, Meng, G, Nakagaki, Y, Navarrete-Heredia, J, Ott, M, Ou, Y, Pass, G, Podsiadlowski, L, Pohl, H, von Reumont, B, Schütte, K, Sekiya, K, Shimizu, S, Slipinski, A, Stamatakis, A, Song, W, Su, X, Szucsich, N, Tan, M, Tan, X, Tang, M, Tang, J, Timelthaler, G, Tomizuka, S, Trautwein, M, Tong, X, Uchifune, T, Walz, M, Wiegmann, B, Wilbrandt, J, Wipfler, B, Wong, T, Wu, Q, Wu, G, Xie, Y, Yang, S, Yang, Q, Yeates, D, Yoshizawa, K, Zhang, Q, Zhang, R, Zhang, W, Zhang, Y, Zhao, J, Zhou, C, Zhou, L, Ziesmann, T, Zou, S, Li, Y, Xu, X, Zhang, Y, Yang, H, Wang, J, Wang, J, Ker, J, M and Zhou, X (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* **346**: 763-7.
- Missale, C, Nash, SR, Robinson, SW, Jaber, M and Caron, MG (1998) Dopamine receptors: From structure to function. *Physiol Rev* **78**: 189-225.

- Moras, D and Gronemeyer, H (1998) The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 384-391.
- Moussian, B (2010) Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Biochem Mol Biol* **40**: 363-75.
- Murga, C, Arcones, AC, Cruces-Sande, M, Briones, AM, Salices, M and Mayor, F, Jr. (2019) G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) as a potential therapeutic target in cardiovascular and metabolic diseases. *Front Pharmacol* **10**: 112 doi: 10.3389/fphar.2019.00112.
- Mustard, JA, Beggs, KT and Mercer, AR (2005) Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. *Arch Insect Biochem Physiol* **59**: 103-17.
- Neve, KA, Seamans, JK and Trantham-Davidson, H (2004) Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* **24**: 165-205.
- Neves, SR, Ram, PT and Iyengar, R (2002) G protein pathways. *Science* **296**: 1636-9.
- Nijhout, HF, Riddiford, LM, Mirth, C, Shingleton, AW, Suzuki, Y and Callier, V (2014) The developmental control of size in insects. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **3**: 113-34.
- Nygaard, R, Zou, Y, Dror, RO, Mildorf, TJ, Arlow, DH, Manglik, A, Pan, AC, Liu, CW, Fung, JJ, Bokoch, MP, Thian, FS, Kobilka, TS, Shaw, DE, Mueller, L, Prosser, RS and Kobilka, BK (2013) The dynamic process of beta(2)-adrenergic receptor activation. *Cell* **152**: 532-42.
- Oakley, RH, Laporte, SA, Holt, JA, Barak, LS and Caron, MG (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* **274**: 32248-57.
- Oates, J and Watts, A (2011) Uncovering the intimate relationship between lipids, cholesterol and GPCR activation. *Curr Opin Struct Biol* **21**: 802-807.
- Okamoto, N, Viswanatha, R, Bittar, R, Li, Z, Haga-Yamanaka, S, Perrimon, N and Yamanaka, N (2018) A membrane transporter is required for steroid hormone uptake in *Drosophila*. *Dev Cell* **47**: 294-305 e7.
- Okamoto, N and Yamanaka, N (2020) Steroid hormone entry into the brain requires a membrane transporter in *Drosophila*. *Curr Biol* **30**: 1-8, 10.1016/j.cub.2019.11.085.
- Oldham, WM and Hamm, HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 60-71.
- Oro, AE, Mckeown, M and Evans, RM (1992) The *Drosophila* retinoid-X receptor homolog ultraspiracle functions in both female reproduction and eye morphogenesis. *Development* **115**: 449-462.
- Ostermaier, MK, Peterhans, C, Jaussi, R, Deupi, X and Standfuss, J (2014) Functional map of arrestin-1 at single amino acid resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 1825-1830.
- Paila, YD and Chattopadhyay, A (2009) The function of G-protein coupled receptors and membrane cholesterol: specific or general interaction? *Glycoconj J* **26**: 711-20.
- Palli, SR, Hiruma, K and Riddiford, LM (1992) An ecdysteroid-inducible *Manduca* gene similar to the *Drosophila* Dhr3 gene, a member of the steroid-hormone receptor superfamily. *Dev Biol* **150**: 306-318.
- Patel, RC, Kumar, U, Lamb, DC, Eid, JS, Rocheville, M, Grant, M, Rani, A, Hazlett, T, Patel, SC, Gratton, E and Patel, YC (2002) Ligand binding to somatostatin receptors induces receptor-specific oligomer formation in live cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 3294-3299.
- Pfleger, KD and Eidne, KA (2005) Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem J* **385**: 625-37.
- Pierceall, WE, Li, C, Biran, A, Miura, K, Raikhel, AS and Segraves, WA (1999) E75 expression in

- mosquito ovary and fat body suggests reiterative use of ecdysone-regulated hierarchies in development and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* **150**: 73-89.
- Pietras, RJ and Szego, CM (1975) Endometrial cell calcium and estrogen action. *Nature* **253**: 357-359.
- Pietras, RJ and Szego, CM (1977) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* **265**: 69-72.
- Pioszak, AA, Harikumar, KG, Parker, NR, Miller, LJ and Xu, HE (2010) Dimeric arrangement of the parathyroid hormone receptor and a structural mechanism for ligand-induced dissociation. *J Biol Chem* **285**: 12435-44.
- Plagemann, PG and Erbe, J (1976) Glucocorticoids-uptake by simple diffusion by cultured Reuber and Novikoff rat hepatoma cells. *Biochem Pharmacol* **25**: 1489-94.
- Preininger, AM, Meiler, J and Hamm, HE (2013) Conformational flexibility and structural dynamics in GPCR-mediated G protein activation: a perspective. *J Mol Biol* **425**: 2288-98.
- Prossnitz, ER and Barton, M (2014) Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities. *Mol Cell Endocrinol* **389**: 71-83.
- Pugazhenthii, S, Nesterova, A, Sable, C, Heidenreich, KA, Boxer, LM, Heasley, LE and Reusch, JEB (2000) Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* **275**: 10761-10766.
- Qu, Z, Kenny, NJ, Lam, HM, Chan, TF, Chu, KH, Bendena, WG, Tobe, SS and Hui, JH (2015) How did arthropod sesquiterpenoids and ecdysteroids arise? Comparison of hormonal pathway genes in noninsect arthropod genomes. *Genome Biol Evol* **7**: 1951-9.
- Rebello, CJ and Greenway, FL (2016) Reward-induced eating: therapeutic approaches to addressing food cravings. *Advances In Therapy* **33**: 1853-1866.
- Ren, J, Li, XR, Liu, PC, Cai, MJ, Liu, W, Wang, JX and Zhao, XF (2014) G-protein alphaq participates in the steroid hormone 20-hydroxyecdysone nongenomic signal transduction. *J Steroid Biochem Mol Biol* **144 Pt B**: 313-23.
- Revankar, CM, Cimino, DF, Sklar, LA, Arterburn, JB and Prossnitz, ER (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* **307**: 1625-30.
- Rewitz, KF, O'Connor, MB and Gilbert, LI (2007) Molecular evolution of the insect Halloween family of cytochrome P450s: phylogeny, gene organization and functional conservation. *Insect Biochem Mol Biol* **37**: 741-53.
- Richard, DS, Applebaum, SW, Sliter, TJ, Baker, FC, Schooley, DA, Reuter, CC, Henrich, VC and Gilbert, LI (1989) Juvenile hormone bisepoxide biosynthesis in vitro by the ring gland of *Drosophila melanogaster*: a putative juvenile hormone in the higher Diptera. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 1421-5.
- Riddiford, LM (1976) Hormonal control of insect epidermal cell commitment in vitro. *Nature* **259**: 115-7.
- Riddiford, LM, Cherbas, P and Truman, JW (2001) Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam Horm*, **60**: 1-73.
- Riddiford, LM, Hiruma, K, Zhou, X and Nelson, CA (2003) Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* **33**: 1327-38.
- Ritter, SL and Hall, RA (2009) Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 819-30.
- Rohrer, DK and Kobilka, BK (1998) G protein-coupled receptors: Functional and mechanistic insights

- through altered gene expression. *Physiol Rev* **78**: 35-52.
- Rozenfeld, R and Devi, LA (2007) Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *FASEB J* **21**: 2455-65.
- Rozenfeld, R and Devi, LA (2008) Regulation of CB1 cannabinoid receptor trafficking by the adaptor protein AP-3. *FASEB J* **22**: 2311-22.
- Ruat, M, Traiffort, E, Arrang, JM, Tardivel-Lacombe, J, Diaz, J, Leurs, R and Schwartz, JC (1993) A novel rat serotonin (5-HT<sub>6</sub>) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem Biophys Res Commun* **193**: 268-76.
- Ruffolo, RR, Jr., Bondinell, W, Ku, T, Naselsky, DP and Hieble, JP (1995) Alpha 1-adrenoceptors: pharmacological classification and newer therapeutic applications. *Proc West Pharmacol Soc* **38**: 121-6.
- Salamone, JD and Correa, M (2009) Dopamine/adenosine interactions involved in effort-related aspects of food motivation. *Appetite* **53**: 422-5.
- Sargiacomo, M, Scherer, PE, Tang, Z, Kubler, E, Song, KS, Sanders, MC and Lisanti, MP (1995) Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9407-11.
- Schiaffino, MV, d'Addio, M, Alloni, A, Baschiroto, C, Valetti, C, Cortese, K, Puri, C, Bassi, MT, Colla, C, De Luca, M, Tacchetti, C and Ballabio, A (1999) Ocular albinism: evidence for a defect in an intracellular signal transduction system. *Nat Genet* **23**: 108-12.
- Schubiger, M, Carre, C, Antoniewski, C and Truman, JW (2005) Ligand-dependent de-repression via EcR/USP acts as a gate to coordinate the differentiation of sensory neurons in the *Drosophila* wing. *Development* **132**: 5239-5248.
- Seeliger, D and de Groot, BL (2010) Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J Comput Aided Mol Des* **24**: 417-22.
- Segraves, WA and Hogness, DS (1990) The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev* **4**: 204-19.
- Sergin, I, Jong, YI, Harmon, SK, Kumar, V and O'Malley, KL (2017) Sequences within the C terminus of the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) are responsible for inner nuclear membrane localization. *J Biol Chem* **292**: 3637-3655.
- Shao, HL, Zheng, WW, Liu, PC, Wang, Q, Wang, JX and Zhao, XF (2008) Establishment of a new cell line from lepidopteran epidermis and hormonal regulation on the genes. *PLoS One* **3**: e3127.
- Simoncini, T and Genazzani, AR (2003) Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* **148**: 281-92.
- Smith, SL, Bollenbacher, WE and Gilbert, LI (1983) Ecdysone 20-monooxygenase activity during larval-pupal development of *Manduca sexta*. *Mol Cell Endocrinol* **31**: 227-51.
- Southan, C, Sharman, JL, Benson, HE, Faccenda, E, Pawson, AJ, Alexander, SP, Buneman, OP, Davenport, AP, McGrath, JC, Peters, JA, Spedding, M, Catterall, WA, Fabbro, D, Davies, JA and Nc, I (2016) The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2016: towards curated quantitative interactions between 1300 protein targets and 6000 ligands. *Nucleic Acids Res* **44**: D1054-68.
- Srivastava, DP, Yu, EJ, Kennedy, K, Chatwin, H, Reale, V, Hamon, M, Smith, T and Evans, PD (2005) Rapid, nongenomic responses to ecdysteroids and catecholamines mediated by a novel

- Drosophila* G-protein-coupled receptor. *J Neurosci* **25**: 6145-55.
- Stadel, JM, Wilson, S and Bergsma, DJ (1997) Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* **18**: 430-7.
- Strasser, A, Wittmann, HJ and Seifert, R (2017) Binding kinetics and pathways of ligands to GPCRs. *Trends Pharmacol Sci* **38**: 717-732.
- Sullivan, AA and Thummel, CS (2003) Temporal profiles of nuclear receptor gene expression reveal coordinate transcriptional responses during *Drosophila* development. *Mol Endocrinol* **17**: 2125-2137.
- Sun, GQ, Zhu, JS, Chen, L and Raikhel, AS (2005) Synergistic action of E74B and ecdysteroid receptor in activating a 20-hydroxyecdysone effector gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 15506-15511.
- Sun, GQ, Zhu, JS and Raikhel, AS (2004) The early gene E74B isoform is a transcriptional activator of the ecdysteroid regulatory hierarchy in mosquito vitellogenesis. *Mol Cell Endocrinol* **218**: 95-105.
- Sunahara, RK, Guan, HC, O'Dowd, BF, Seeman, P, Laurier, LG, Ng, G, George, SR, Torchia, J, Van Tol, HH and Niznik, HB (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* **350**: 614-9.
- Sunahara, RK, Niznik, HB, Weiner, DM, Stormann, TM, Brann, MR, Kennedy, JL, Gelernter, JE, Rozmahel, R, Yang, YL, Israel, Y and et al. (1990) Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* **347**: 80-3.
- Swevers, L, Cherbas, L, Cherbas, P and Iatrou, K (1996) *Bombyx* EcR (BmEcR) and *Bombyx* USP (BmCF1) combine to form a functional ecdysone receptor. *Insect Biochem Mol Biol* **26**: 217-21.
- Szego, CM and Davis, JS (1967) Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci USA* **58**: 1711-8.
- Talbot, WS, Swyryd, EA and Hogness, DS (1993) *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* **73**: 1323-37.
- Tata, JR (2000) Autoinduction of nuclear hormone receptors during metamorphosis and its significance. *Insect Biochem Mol Biol* **30**: 645-51.
- Teleman, AA (2009) Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochem J* **425**: 13-26.
- Terashima, J and Bownes, M (2006) E75A and E75B have opposite effects on the apoptosis/development choice of the *Drosophila* egg chamber. *Cell Death Differ* **13**: 454-464.
- Thomas, HE, Stunnenberg, HG and Stewart, AF (1993) Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature* **362**: 471-5.
- Thummel, CS (1996) Flies on steroids - *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends Genet* **12**: 306-310.
- Truman, JW (2019) The evolution of insect metamorphosis. *Curr Biol* **29**: R1252-R1268.
- Truman, JW and Riddiford, LM (2019) The evolution of insect metamorphosis: a developmental and endocrine view. *Philos Trans R Soc, B* **374**: 20190070.
- Tu, MP, Yin, CM and Tatar, M (2005) Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Gen Comp Endocrinol* **142**: 347-56.
- Uyehara, CM and McKay, DJ (2019) Direct and widespread role for the nuclear receptor EcR in mediating the response to ecdysone in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**: 9893-9902.
- Vines, CM (2012) Phospholipase C. *Adv Exp Med Biol* **740**: 235-54.

- Wang, D, Zhao, WL, Cai, MJ, Wang, JX and Zhao, XF (2015) G-protein-coupled receptor controls steroid hormone signaling in cell membrane. *Sci Rep* **5**: 8675.
- Wang, S, Liu, S, Liu, H, Wang, J, Zhou, S, Jiang, RJ, Bendena, WG and Li, S (2010) 20-hydroxyecdysone reduces insect food consumption resulting in fat body lipolysis during molting and pupation. *J Mol Cell Biol* **2**: 128-38.
- Wang, S, Wang, JW, Sun, YN, Song, QS and Li, S (2012) PKC-mediated USP phosphorylation at Ser35 modulates 20-hydroxyecdysone signaling in *Drosophila*. *J Proteome Res* **11**: 6187-6196.
- Warren, JT and Gilbert, LI (1986) Ecdysone metabolism and distribution during the pupal adult development of *Manduca Sexta*. *Insect Biochem* **16**: 65-82.
- Weinberg, ZY and Puthenveedu, MA (2019) Regulation of G protein-coupled receptor signaling by plasma membrane organization and endocytosis. *Traffic* **20**: 121-129.
- White, BH and Ewer, J (2014) Neural and hormonal control of postecdysial behaviors in insects. *Annu Rev Entomol* **59**: 363-81.
- White, JH, Wise, A, Main, MJ, Green, A, Fraser, NJ, Disney, GH, Barnes, AA, Emson, P, Foord, SM and Marshall, FH (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* **396**: 679-682.
- Whorton, MR, Bokoch, MP, Rasmussen, SGF, Huang, B, Zare, RN, Kobilka, B and Sunahara, RK (2007) A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 7682-7687.
- Wipfler, B, Letsch, H, Frandsen, PB, Kapli, P, Mayer, C, Bartel, D, Buckley, TR, Donath, A, Edgerly-Rooks, JS, Fujita, M, Liu, SL, Machida, R, Mashimo, Y, Misof, B, Niehuis, O, Peters, RS, Petersen, M, Podsiadlowski, L, Schutte, K, Shimizu, S, Uchifune, T, Wilbrandt, J, Yan, E, Zhou, X and Simon, S (2019) Evolutionary history of Polyneoptera and its implications for our understanding of early winged insects. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**: 3024-3029.
- Xu, J, Wang, XF, Chen, P, Liu, FT, Zheng, SC, Ye, H and Mo, MH (2016) RNA interference in moths: mechanisms, applications, and progress. *Genes (Basel)* **7**, 10.3390/genes7100088.
- Xue, L, Sun, Q, Zhao, H, Rovira, X, Gai, S, He, Q, Pin, JP, Liu, J and Rondard, P (2019) Rearrangement of the transmembrane domain interfaces associated with the activation of a GPCR hetero-oligomer. *Nat Commun* **10**: 2765.
- Yamagata, N, Hiroi, M, Kondo, S, Abe, A and Tanimoto, H (2016) Suppression of dopamine neurons mediates reward. *PLoS Biol* **14**, 10.1371/journal.pbio.1002586.
- Yamanaka, N, Marques, G and O'Connor, MB (2015) Vesicle-mediated steroid hormone secretion in *Drosophila melanogaster*. *Cell* **163**: 907-19.
- Yamanaka, N, Rewitz, KF and O'Connor, MB (2013) Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. *Annu Rev Entomol* **58**: 497-516.
- Yang, AS (2001) Modularity, evolvability, and adaptive radiations: a comparison of the hemi- and holometabolous insects. *Evol Dev* **3**: 59-72.
- Yao, TP, Forman, BM, Jiang, Z, Cherbas, L, Chen, JD, McKeown, M, Cherbas, P and Evans, RM (1993) Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* **366**: 476-9.
- Yao, TP, Segraves, WA, Oro, AE, McKeown, M and Evans, RM (1992) *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* **71**: 63-72.
- Yeagle, PL (2014) Non-covalent binding of membrane lipids to membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1838**: 1548-59.

- Zhang, XQ, Li, XR, Ren, J, Li, YB, Cai, MJ, Wang, JX and Zhao, XF (2015) beta-Arrestin1 interacts with G protein-coupled receptor to desensitize signaling of the steroid hormone 20-hydroxyecdysone in the lepidopteran insect *Helicoverpa armigera*. *Cell Signal* **27**: 878-86.
- Zhao, WL, Wang, D, Liu, CY and Zhao, XF (2016) G-protein-coupled receptor kinase 2 terminates G-protein-coupled receptor function in steroid hormone 20-hydroxyecdysone signaling. *Sci Rep* **6**: 29205.
- Zhao, XF, Wang, JX, Xu, XL, Li, ZM and Kang, CJ (2004) Molecular cloning and expression patterns of the molt-regulating transcription factor HHR3 from *Helicoverpa armigera*. *Insect Mol Biol* **13**: 407-12.
- Zhou, BH, Hiruma, K, Jindra, M, Shinoda, T, Se Graves, WA, Malone, F and Riddiford, LM (1998) Regulation of the transcription factor E75 by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, during larval molting and metamorphosis. *Dev Biol* **193**: 127-138.
- Zhou, XF and Riddiford, LM (2002) Broad specifies pupal development and mediates the 'status quo' action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. *Development* **129**: 2259-2269.
- Zhu, J, Chen, L and Raikhel, AS (2007) Distinct roles of Broad isoforms in regulation of the 20-hydroxyecdysone effector gene, Vitellogenin, in the mosquito *Aedes aegypti*. *Mol Cell Endocrinol* **267**: 97-105.
- Zitnan, D, Sehna, F and Bryant, PJ (1993) Neurons producing specific neuropeptides in the central nervous system of normal and pupariation-delayed *Drosophila*. *Dev Biol* **156**: 117-35.

## 致谢

时光荏苒，攻读博士的四年生活承载了太多酸甜苦辣，充满了希望与快乐，也记录着艰辛与痛苦，这些经历凝结成我弥足珍贵的财富，一同陪伴我踏上新的征程。值此毕业之际，我谨向所有指导和帮助我的老师、同学们表示衷心的感谢！

首先由衷的感谢我的导师赵小凡教授和王金星教授。感谢赵老师给我提供了一个非常好的科研平台和科研学习环境，使我能够安心顺利的完成博士学业。赵老师在论文选题，实验设计和论文发表期间倾注了大量的心血。感谢王金星老师在实验中的悉心指导和鼓励，得以使论文更加完善。两位导师在科学研究中一丝不苟、求真务实的治学精神深深鼓舞着我，兢兢业业，精益求精的工作作风深深影响着我，两位老师是我人生的榜样，不仅教会我如何做好学问，更在为人之道上影响着我。在此对两位老师致以最诚挚的祝福！

感谢康翠洁老师，王显伟老师和石秀贞老师在实验和生活上的帮助和支持。感谢董杜鹃老师一直以来对我实验进展的关心和指导，在我迷茫的时候给予的热情鼓励。论文的顺利完成离不开各位老师的辛勤付出和悉心指导，衷心感谢各位老师！

感谢已经毕业的杨明冲师兄，王迪师姐，李永波师兄，陈才华师兄，徐计东师兄，牛国娟，姚友香师妹，韩晓林师弟，杨济远师弟，潘静师妹，张俊英师妹，陈敬师妹，何中华师弟，霍利杰师弟，刁梦奇师妹，郭宁宁师妹给予的帮助和支持，祝你们工作顺利，前程似锦！感谢实验室李艳丽，李艳雪，邸宇琴，王晓培，李雨，袁雯杰，孙雪君，司伟烨，金科谚，闫俏师妹们和高杰，赵宝瑞，李苍，刘晨飞，张宇轩，邵斌岩师弟们的陪伴和帮助，祝你们学业顺利，收获美好的未来！

最后感谢我亲爱的爸爸妈妈对我付出的一切，感谢亲爱的姐姐一直以来的陪伴和支持，是你们无私关怀和殷切期望一直鞭策和激励我不断前行。谢谢你们，我将带着你们的和我的梦想一直努力下去，祝你们身体健康，万事如意！

再次向所有关心、支持和帮助过我的老师、同学、朋友和家人们表示诚挚的祝福和衷心的感谢！谢谢大家！

本论文受国家自然科学基金面上项目（31572328）和国家自然科学基金重点项目（31730083）在经费上的支持，在此表示感谢。

康新乐

2020年6月于青岛

## 在读期间发表论文

1. **Xin-Le Kang**, Jun-Ying Zhang, Di Wang, Yu-Meng Zhao, Xiao-Lin Han, Jin-Xing Wang, Xiao-Fan Zhao\*; The steroid hormone 20-hydroxyecdysone binds to dopamine receptor to repress lepidopteran insect feeding and promote pupation, *PLoS Genetics*. 2019, Aug 14;15(8): e1008331. **Recommended by F1000Prime**
2. Yu-Qin Di, Xiao-Lin Han, **Xin-Le Kang**, Di Wang, Cai-Hua Chen, Jin-Xing Wang, Xiao-Fan Zhao\*; Autophagy triggers CTSD (cathepsin D) maturation and localization inside cells to promote apoptosis, *Autophagy*, 2020, Apr 23; 1-23. 10.1080/15548627.2020.1752497
3. **Xin-Le Kang**, Yan-Xue Li, Yan-Li Li, Jin-Xing Wang, Xiao-Fan Zhao\*; A G protein-coupled receptor functions as a homo-tetramer to transmit 20-hydroxyecdysone signaling. (Under review)
4. **Xin-Le Kang**, Yan-Xue Li, Xiao-Pei Wang, Yan-Li Li, Jin-Xing Wang, Xiao-Fan Zhao\*; 20-hydroxyecdysone suppresses glycolysis by inhibiting the activation of phosphoglycerate kinase 1. (In preparing)

学位论文评阅及答辩情况表

		姓名	专业技术 职 务	是否博导 (硕导)	所 在 单 位	总体评价 ※
论 文 评 阅 人		匿名评阅				A
		匿名评阅				A
		匿名评阅				A
		姓名	专业技术 职 务	是否博导 (硕导)	所 在 单 位	
答 辩 委 员 会 成 员	主席	宋微波	教授	博导	中国海洋大学	
	委 员	张士瑾	教授	博导	中国海洋大学	
		杨桂文	教授	博导	山东师范大学	
		王显伟	教授	博导	山东大学	
		康翠洁	教授	硕导	山东大学	
答辩委员会对论文的 总体评价※		A	答辩秘书	董杜韵	答辩日期	2020.6.3
备注						

※优秀为“A”；良好为“B”；合格为“C”；不合格为“D”。