

筛选调控 Sonic Hedgehog 信号转导的泛素连接酶

汤颖,乐坤,程雁*

(南京医科大学发育遗传学系,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**发现调控 Sonic Hedgehog(Shh)信号转导的泛素连接酶。**方法:**第一轮筛选,利用荧光素酶报告基因(8 × GliBS-Luc)检测系统,检测相应 HECT 家族 E3 泛素连接酶的 siRNA 对 Shh 信号通路活性的影响;第二轮筛选,利用细胞免疫荧光激光共聚焦检测系统,检测上述 siRNA 对 Shh 的受体 Ptc1 蛋白原纤毛定位的影响。综合 2 轮筛选结果,初步发现影响 Shh 信号通路活性的 HECT 家族 E3 泛素连接酶。**结果:**通过 2 轮筛选,发现 Smurf1、Smurf2、Ube3c、Wwp1、Wwp2 共 5 个泛素连接酶,不仅能调节 Ptc1 蛋白的原纤毛定位,也可以增加通路下游转录因子 Gli 的活性。**结论:**建立了筛选调控 Shh 信号通路的泛素连接酶的平台。在初步筛选的 27 个 HECT E3 泛素连接酶中,有 5 个成员参与调控 Shh 信号通路。

[关键词] Sonic Hedgehog 信号通路;HECT E3 泛素连接酶;Patched1;原纤毛

[中图分类号] Q78

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)06-715-07

doi:10.7655/NYDXBNS20130601

Identification of E3 ligases that regulate Sonic Hedgehog signaling transduction

Tang Ying, Yue Shen, Cheng Y Steven*

(Department of Developmental Genetics, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** Screening for HECT E3 ligases that can regulate Sonic Hedgehog (Shh) signaling pathway. **Methods:** In the first round of screening, siRNAs of the HECT E3 ligases were tested for Shh pathway transduction by GliBS-luciferase assay. And in the second round, these siRNAs were tested for the localization of Patched1-GFP in primary cilia by immunofluorescence staining. **Results:** After two rounds of screening, 5 HECT E3 ligases were identified to regulate Shh pathway, which are Smurf1, Smurf2, Ube3c, Wwp1 and Wwp2. **Conclusion:** A screening system of new regulators of Shh signaling was setup, and 5 HECT E3 ligases were found from our preliminary screening.

[Key words] Sonic Hedgehog signaling; HECT E3 ligases; Patched1; primary cilia

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(6): 715-721]

Sonic Hedgehog(Shh)是脊椎动物中调控组织形态发生和细胞定向分化的主要形态发生因子(morphogen)^[1]之一,从昆虫到哺乳动物高度进化保守。在哺乳动物发育过程中,Shh 的功能与神经管、肢体等组织器官的形成^[2]、细胞增殖和迁移、干细胞/祖细胞自我更新、组织的再生修复等^[3]都密切相关。Shh 通路的阻断或者异常激活是造成先天性发育畸变及

多种肿瘤的原因之一^[1]。从 1998 年起,许多生物公司通过有机化学合成与高通量化合物筛选等手段找到了多种治疗皮肤基底细胞癌和小脑髓母细胞癌的小分子药物,并已取得了明显的治疗效果。但目前的药物研发仅针对单一靶点,临床上存在该基因变异产生抗药性的风险^[4]。因此,深入阐明 Shh 信号转导机制不仅是当今发育遗传学与分子细胞生物学的核心课题之一,同时在癌症治疗的生物医学领域也有重要的意义。

Shh 信号通路^[5]由 Shh 蛋白、12 次跨膜受体 Patched(Ptc)和 7 次跨膜受体 Smoothed(Smo)以及下游转录因子 Gli 家族(含 Gli1、Gli2、Gli3 3 种转录因子)等组成。同时,哺乳动物的原纤毛(primary

[基金项目] 教育部博士学科点基金(20103234110003);国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(81261120386);国家自然科学基金青年基金项目(81101497)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:sycheng@njmu.edu.cn

ilia)在 Shh 通路的信号转导过程中也必不可少^[6-7]。原纤毛是定位在细胞膜表面的由微管构成的非摆动型特殊细胞器,Shh 通路的许多成员都定位在原纤毛中,如 Ptch、Smo、Suppressor of fused(Sufu)和转录因子 Gli1-3^[8-11]。原纤毛结构和通路成员在原纤毛内的转运异常,同样会导致 Shh 通路的失调,产生相关的病理表型^[12-14]。研究表明,当 Shh 配基不表达时,一部分 Ptch1 受体富集到原纤毛表面,将 Smo 阻挡在原纤毛外,抑制下游信号的活化。当配基 Shh 表达并与 Ptch1 结合后,Ptch1 将迁移出原纤毛,此时 Smo 开始进入原纤毛,并激活下游通路。下游转录因子 Gli2 和 Gli3 在没有 Shh 信号的情况下,经蛋白酶体剪切加工生成截短的转录抑制子形式(GliR),抑制 Shh 靶基因的表达。当 Shh 信号出现时,这一酶切加工步骤被阻断,Gli2 和 Gli3 以全长形式(GliA)转录激活靶基因表达。Gli1 不受蛋白酶加工处理,始终发挥转录激活作用。处于 Smo 和 Gli 转录蛋白之间的 Shh 信号转导机制非常复杂,到目前为止尚无确切的认识。

蛋白质的泛素化修饰(ubiquitination)是一种可逆的蛋白质的翻译后修饰方式,它调控了绝大多数的细胞事件,包括细胞分化、DNA 修复、蛋白稳定性、蛋白质转运等过程^[15]。根据其修饰方式可分为单泛素化修饰、多位点单泛素化修饰和多泛素链修饰 3 种。其中经 Lys48 形成的多泛素链修饰后经蛋白酶体途径降解的过程被研究得最为透彻^[16],且也多次被证实;而单泛素化修饰在受体蛋白的内化过程中发挥的重要作用也已经被证实,受体蛋白泛素化内吞进入细胞后有两种去向,一种可能为进入细胞内小泡形成多泡小体(multivesicular body, MVB),然后经溶酶体途径降解^[17],另一种可能则是循环“回收”到细胞膜上^[18]。研究证实,许多受体蛋白在内吞小体中可以转导与其在细胞膜上时不同的信号^[19],从而在信号通路转导过程中发挥重要作用。

在 Shh 信号通路的转导过程中,泛素化修饰是否同样也扮演了这样一个重要角色这一问题还不清楚。为了能系统地寻找特异性调控 Shh 信号转导的泛素连接酶,本研究首先对 HECT 家族的 E3 泛素连接酶进行了筛选。通过荧光素酶报告基因系统和细胞免疫荧光图像系统的 2 轮检测,筛选到了 5 个 HECT E3 泛素连接酶不仅能调节 Ptch1 蛋白的原纤毛定位,也可以增加通路下游转录因子 Gli1 的活性。由此,为研究 Shh 信号通路的调控机制提供了新的重要线索。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pTA-8 × GliBS-Luc 由美国 Scripps 研究所 Sheng Ding 博士馈赠。细胞系 GBS-Luc 3T3 购买于美国 StemRD 公司(此细胞系是稳定表达 8 × GliBS-Luc 报告基因的 NIH3T3 细胞)。GBfectene-Elite 转染试剂(苏州神州基因有限公司),Fugene HD (Roche 公司,美国),Lipofectamine Reagent,Plus reagent、Lipofectamine 2000 和 Oligofectamine (Life technologies 公司,美国)。Ctrl TARGET plus SMART pool siRNA, Gli1 TARGET plus SMART pool siRNA 和 CyclophilinB plus SMART pool siRNA (Dharmacon 公司,美国),mouse HECT E3 Ligases siRNAs (QIAGEN 公司,德国)。DMEM 高糖细胞培养液、胎牛血清、小牛血清(GBS-luc 3T3 细胞专用)(Gibco, Invitrogen 公司,美国),Smo 激动剂 purmorphamine (Calbiochem 公司,美国)。Qiagen Plasmid Midi Kit (QIAGEN 公司,德国),RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂盒,Primescript 反转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本),PCR 扩增引物由上海 Invitrogen 公司合成,2 × Taq DNA polymerase mix (博尔迪,中国),GoTaq qPCR Master Mix (Promega 公司,美国),Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega 公司,美国)。一抗:mouse anti-beta-actin IgG (Santa Cruz Biotech 公司,美国),mouse anti-GAPDH (Santa Cruz 公司,美国),mouse anti-acetylated alpha-tubulin (Sigma 公司,美国),Rabbit anti-Cyclophilin B (Abcam 公司,美国)。二抗:goat anti-mouse IgG HRP (Santa Cruz Biotech 公司,美国),goat anti-rabbit IgG HRP (Cell Signaling 公司,美国),donkey anti-goat AlexaFluor 594 (Invitrogen 公司,美国),donkey anti-mouse AlexaFluor 488 (Invitrogen 公司,美国)。其余化学试剂均为国产分析纯。real-time PCR 扩增仪 (Life technologies 公司,美国),激光共聚焦显微镜 LSM710 (Carl Zeiss 公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 制备含 Shh 配基的条件性培养基(ShhN-CM)

在 P100 细胞培养皿中种 293T 细胞,种板 18~24 h 后,当细胞密度达到 70%,将 5 μg 待转染质粒(pRK5-ShhN-CDS 或 pRK5 质粒)导入细胞。转染后 24 h 换入新鲜培养液,继续培养 24 h,收集细胞培养液,-80℃保存。

1.2.2 体外培养细胞质粒转染

用 Qiagen Plasmid Midi Kit 提取各质粒,用于细胞转染。293T 用 Eugene HD 转染,NIH3T3 细胞用 Lipofectamine 与 Plus 联合使用转染,GBS-luc 3T3 细胞用 Lipofectamine 2000 转染。具体转染步骤按照各转染试剂说明书进行。

1.2.3 Western blot 分析 siRNA 敲低效率与不同转染试剂的转染效率

将已转染 siRNA 的细胞裂解提取总蛋白后,在 10%SDS-PAGE 胶进行蛋白质电泳,转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h。用 Cyclophilin B 和 GAPDH 一抗 4℃孵育过夜。次日,用 goat anti-mouse IgG HRP 和 goat anti-rabbit IgG HRP 二抗室温孵育 1~2 h。ECL 液反应,Kodak X 线胶片压片,放入自动洗片机中显影、定影。

1.2.4 荧光素酶报告基因检测

在 96 孔板中,每孔种约 8 000 个 GBS-luc 3T3 细胞。次日,将相应的 siRNA 转染到细胞中,每条 siRNA 2 个复孔(测定 ShhN-CM 工作梯度时跳过此步骤)。转染 24 h 后,换用 1:16 稀释的 ShhN-CM 培养基培养细胞。培养 48 h 后,冰 PBS 洗细胞 1 次,按试剂盒说明,裂解细胞行荧光素酶活性的检测。

1.2.5 细胞免疫荧光和激光共聚焦显微镜观测

将 NIH3T3 细胞种在 4 孔 Lab-TEK 腔室盖玻片上。种板 24 h 后,用相应 siRNA 和质粒(Ptch1-GFP)共转染细胞。待细胞长满后,换用含 0.5% FBS 的培养液饥饿刺激细胞 24 h,再加入 1:16 稀释的 ShhN-CM 培养 24 h 后,行细胞免疫荧光染色。先用 4%多聚甲醛 4℃固定细胞 10 min,3%BSA/PBS/0.3% NP-40 溶液室温封闭透化细胞 30 min,加入封闭液稀释的一抗 mouse anti-acetylated tubulin(1:2 000)4℃孵育过夜。次日,PBS 洗细胞 3 次,加入 1:400 稀释的荧光二抗 donkey anti-mouse AlexaFluor 594 室温避光孵育 1 h,备激光共聚焦显微镜观察。观察时,在视野下选取 Ptch1-GFP 转染阳性的细胞,首先在 anti-acetylated tubulin 的荧光通道中找到原纤毛,再在 Ptch1-GFP 的荧光通道中观察相应蛋白在原纤毛中的定位,并拍照记录。

1.2.6 RT-PCR 和 real-time PCR

常规细胞培养,转染和药物处理之后,PBS 洗细胞 1 次,加 1 ml RNAiso Plus 裂解细胞提取 RNA。按逆转录试剂盒说明书逆转录生成 cDNA。以此为模板进行 RT-PCR 反应,将 PCR 产物在 1.5 mm,8% SDS-PAGE 胶上进行电泳,以 50 bp DNA Ladder 作为电泳标记,上样 8 μ l,140 V 电泳 35 min。溴化乙

锭溶液中染色 20 min 后,紫外灯下进行拍照分析。或用此模板进行 real-time PCR 反应,具体步骤参照 GoTaq qPCR Master Mix 试剂说明书。

2 结果

2.1 荧光素酶报告基因系统的建立

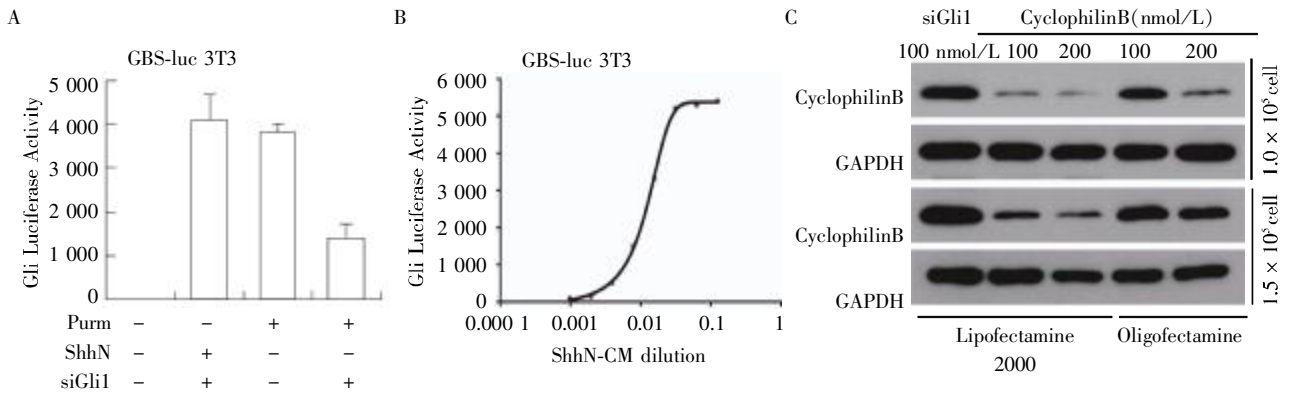
Shh 信号通路的激活,依赖于 Shh 配基的刺激或者信号通路激活剂的作用。首先,以 Shh 信号通路激动剂 purmorphamine (Purm)为阳性对照,检测了 GBS-luc 3T3 细胞系能否对其进行有效地应答,并验证了自制的含 Shh 配基的条件性培养基(ShhN-CM)对信号通路的激活作用;同时,也验证了 Gli1 的 siRNA 的抑制信号通路活性作用(图 1A)。其次,检测了自制 ShhN-CM 的有效浓度,用含梯度稀释的 ShhN-CM 的培养基培养细胞 48 h 后,用报告基因检测的方法检测信号通路的活性,发现当 1:16 稀释 ShhN-CM 时,能够最大程度地激活信号通路,当 1:64 稀释 ShhN-CM 时,能够中低程度地激活信号通路,而当 1:512 稀释 ShhN-CM 时,基本无法激活信号通路(图 1B)。此外,为了优化筛选的条件,以 Ctrl siRNA 为阴性对照,Cyclophilin B 为阳性对照,分别测试了不同密度的 GBS-luc 3T3 细胞、不同种类的转染试剂及不同终浓度的 siRNA 的沉默效率,发现在 6 孔板中,当细胞密度为 1.0×10^5 个/孔,用 Lipofectamine 2000 转染终浓度为 100 nmol/L 的 siRNA 时,基因的沉默效率更高(图 1C)。

2.2 荧光素酶报告基因系统筛选

HECT E3 泛素连接酶是 E3 泛素连接酶中一个较小的家族,小鼠基因组中已知共有 27 个成员,但该家族在调控蛋白质降解、内化、分选转运等方面发挥了重要作用。首先对此家族泛素连接酶相应的 54 条 siRNA 的作用进行了检测,希望找出能够调控信号通路活性的泛素连接酶。在这个对 ShhN 敏感的荧光素酶报告基因检测系统中,荧光素酶的读值能够反映信号通路的活性,从而间接反映 siRNA 的作用。重复进行 2 轮筛选(图 2)后,以 Gli1 的 siRNA 为阳性对照,以其第一轮筛选的读值 750.7 ± 106.0 为标准,筛选出对 Shh 信号通路有正向调控作用的 HECT E3 泛素连接酶有 10 个:Hectd1、Hecw1、Huwe1、Kiaa0317、Smurf1、Smurf2、Trip12、Ube3c、Wwp1 和 Wwp2(表 1),其 2 轮筛选读值均低于标准的上限。

2.3 mRNA 水平检测 Shh 信号通路激活水平

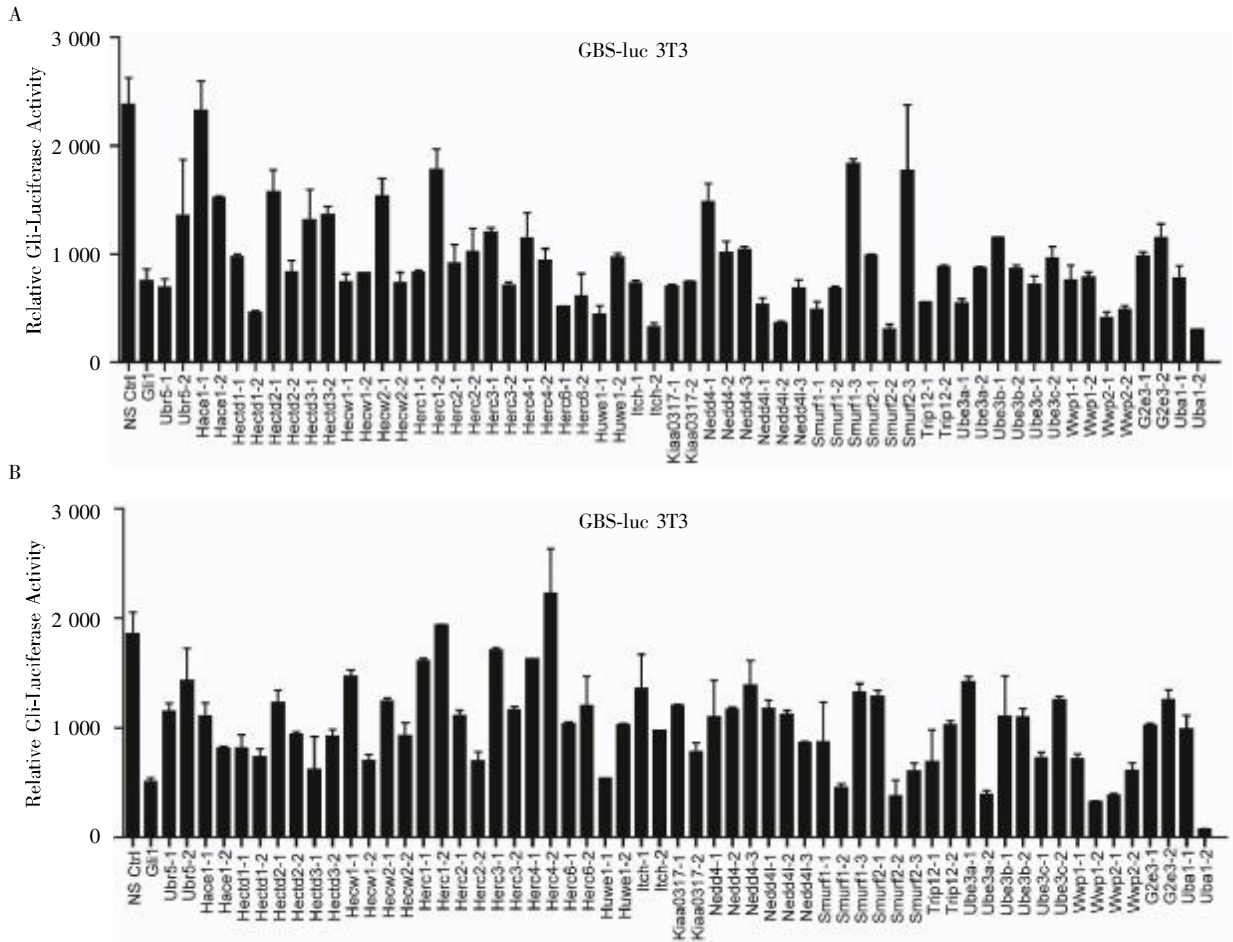
荧光素酶报告基因检测系统从蛋白水平检测了 Shh 信号通路的激活程度,还采用 real-time PCR 的



A: GBS-luc3T3 细胞系反应性验证; B: ShhN-CM 的有效工作浓度; C: 细胞密度、转染试剂、siRNA 工作浓度的优化。

图 1 荧光素酶报告基因系统的建立

Figure 1 Setting up the Gli-luciferase assay system



A: 第一轮荧光素酶报告基因活性筛选; B: 第二轮荧光素酶报告基因活性筛选。

图 2 荧光素酶报告基因系统 2 轮筛选

Figure 2 Two rounds of Gli-luciferase assay

方法,从 mRNA 水平检测了相应泛素连接酶的 siRNA 对信号通路的影响。在此系统中,检测了信号通路靶基因 Gli1 的表达水平来反映 Shh 通路的激活程度。结果显示,这些 siRNA 对应的泛素连接酶被沉默后,均能有效地下调信号通路的活性(图 3)。

2.4 细胞免疫荧光图像筛选系统

在哺乳动物中,大部分细胞表面存在一个非摆动的细胞器——原纤毛。Shh 信号通路中的多数蛋白在信号转导过程中都可以定位到原纤毛中。其中,受体 Ptch1 在原纤毛中的富集将抑制 Smo 的功能及

表 1 荧光素酶报告基因系统 2 轮筛选结果。

Table 1 Results of two rounds of Gli-luciferase assay
($\bar{x} \pm s$)

siRNA	round1	round2
NS Ctrl	2 380 ± 246	1 858 ± 195
Gli1	456 ± 19	506 ± 37
Hectd1-1	821 ± 3	734 ± 75
Hecw1-2	441 ± 81	699 ± 54
Huwe1-1	746 ± 4	540 ± 1
Kiaa0317-2	680 ± 22	781 ± 84
Smurf1-2	306 ± 42	452 ± 33
Smurf2-2	306 ± 42	373 ± 147
Trip12-1	557 ± 3	670 ± 292
Ube3c-1	718 ± 80	724 ± 52
Wwp1-1	759 ± 133	714 ± 48
Wwp1-2	788 ± 44	326 ± 8
Wwp2-1	408 ± 54	380 ± 15
Wwp2-12	485 ± 37	611 ± 64

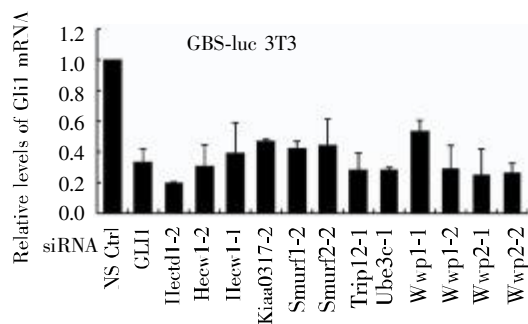


图 3 siRNA 对信号通路下游靶基因 Gli1 的 mRNA 水平的影响

Figure 3 The effect of siRNAs on the mRNA level of the target gene Gli1

下游信号的活化,但其中的机制尚不清楚。多项研究表明,E3 泛素连接酶在膜受体的内化、转运中发挥了重要作用。HECT 家族的 E3 泛素连接酶能特异地结合底物上 PPXY 基团,促进底物的泛素化。在 Shh 通路中,本研究发现 Ptch1 受体的胞内域含有 2 个 PPXY 的基团。因此,在本轮筛选中,检测了 siRNA 对 Ptch1 受体在原纤毛内富集程度的影响。为了减少 siRNA 的 off-target 作用,将靶向同一基因的 2 条 siRNA 混合在一起,与质粒 Ptch1-GFP 一同导入 NIH 3T3 细胞,然后观察 Ptch1-GFP 在原纤毛中定位情况的变化,来反映信号通路的活性状态。结果可见共 6 个 E3 连接酶(Hace1、Smurf1、Smurf2、Ube3c、Wwp1、Wwp2)的 siRNAs 可以明显促进 Ptch1-GFP 在原纤毛蓄积,与 non-silencing control (Ctrl) 相比,Ptch1-GFP 阳性的原纤毛数目增加到 2 倍以上(图 4)。

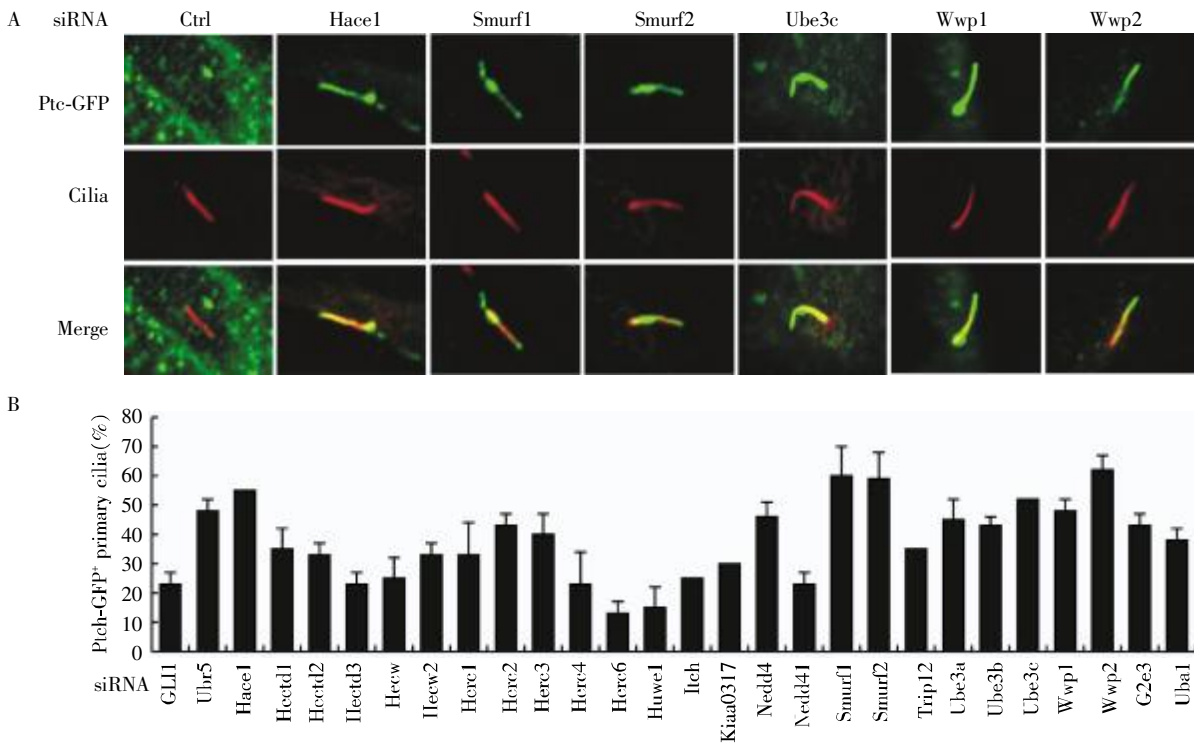
2.5 验证 siRNA 的沉默效率

综合荧光素酶报告基因筛选系统和细胞免疫荧光图像系统筛选的结果,发现 Smurf1、Smurf2、Ube3c、Wwp1、Wwp2 这 5 个 HECT E3 泛素连接酶在 Shh 信号转导过程中发挥了明显调控作用。由于 siRNA 的作用存在效率的问题,为了排除实验误差,对这 5 个 siRNA 采用 RT-PCR 的方法,从转录水平验证了其相应基因的表达水平。结果可见 Smurf1、Smurf2、Ube3c、Wwp1、Wwp2 等的 siRNA 沉默效率都较好(图 5)。

3 讨论

本文从蛋白质的翻译后修饰的一个重要环节——泛素化修饰入手,首先对泛素连接酶中较小的一个家族 HECT 家族进行筛选,以发现能在 Shh 信号转导过程发挥调节作用的泛素连接酶。一方面利用荧光素酶报告基因监测系统(8 × GliBS-Luc)检测其相应 siRNA 对 Shh 通路的影响,另一方面利用细胞免疫荧光的图像筛选系统,检测 siRNA 对 Ptch1 原纤毛内定位的影响。并通过 RT-PCR 验证了筛选中 siRNA 的敲低效率。综合荧光素酶报告基因和细胞免疫荧光的结果,本文发现 Smurf1、Smurf2、Ube3c、Wwp1、Wwp2 这 5 个 HECT E3 泛素连接酶不仅能抑制信号通路受体 Ptch1 蛋白的原纤毛定位,也可以增加通路下游转录因子 Gli1 的活性。

Shh 信号通路在胚胎发育和肿瘤发生过程中都发挥了至关重要的作用,通路分子的功能异常可导致生长发育畸形和肿瘤的发生。但关于信号通路具体的调控机制,如膜受体 Ptch 如何发挥其对 Smo 的抑制作用,Smo 如何激活 Gli 的转录活性,而 Sufu 又在这过程中扮演了什么样的角色等等,至今都未得到解答。蛋白质的泛素化修饰是调控蛋白稳定性、蛋白活性和细胞内转运的关键机制之一。在多个细胞事件中蛋白质泛素化修饰都发挥着重要的作用,包括细胞信号转导、细胞周期进程和细胞代谢通路等。多项研究表明,Shh 信号转导过程中,蛋白质的泛素化修饰也不可或缺。例如在没有 Shh 配基时,Gli3 蛋白磷酸化后可被 SCF E3 连接酶复合物所识别,随后经蛋白酶解加工生成截短的 Gli3R,发挥转录抑制子的功能^[20-21]。Gli1 蛋白也有类似的泛素化加工过程,但其结果是导致整个 Gli1 蛋白的降解^[22]。Gli2 的加工可以遵循上述两条途径,但以降解为主。此外抑制性蛋白 Sufu 可在 Shh 信号作用下泛素化经蛋白酶体降解^[23]等。



A; Ptc1-GFP 在 NIH 3T3 细胞中的原纤毛定位情况; B; Ptc1-GFP 在 NIH 3T3 细胞中的原纤毛定位统计图。

图4 细胞免疫荧光图像系统筛选

Figure 4 Image screen after cell immunofluorescence staining

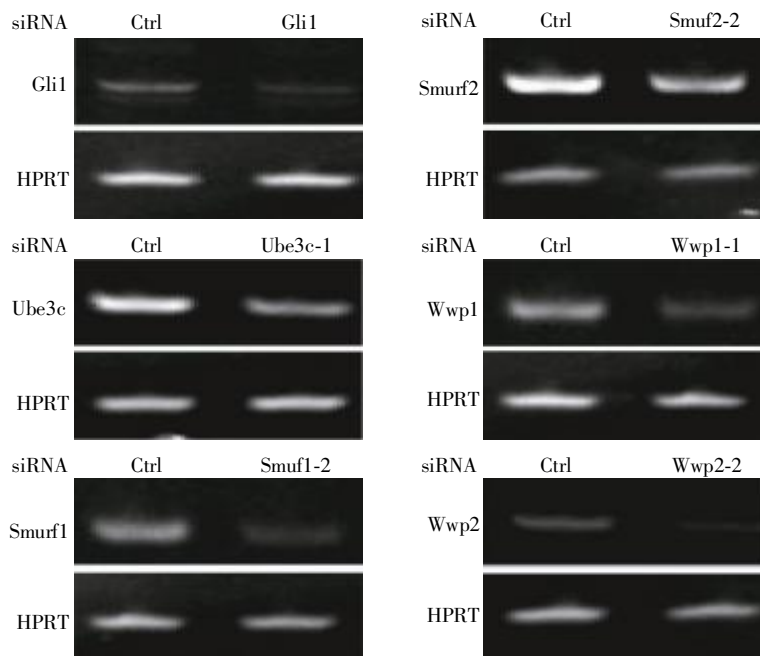


图5 siRNA 敲低效率的验证

Figure 5 Knockdown efficiency of siRNAs

本文从这一角度入手,建立了两套检测系统,即建立了一个新的检测平台,来筛选在 Shh 信号通路中具有调控作用的泛素连接酶。荧光素酶报告基因系统是从蛋白水平,通过检测信号通路最下游靶基

因 Gli1 的表达水平来反映信号通路的激活情况,从而筛选能调控信号通路活性的泛素连接酶;而细胞免疫荧光图像系统则是从信号通路上游成员的原纤毛定位情况来反映信号通路的激活情况,这一系统

能检测影响信号通路成员原纤毛定位的泛素连接酶,并可以在一定程度上确定目标泛素连接酶的底物的范围,如在本文中筛选到的 5 个泛素连接酶的底物有很大可能为 Ptch1。当这一平台建立完善后,其检测的泛素连接酶的范围也可以扩展到其他家族,如哺乳动物基因组中,拥有 616 个成员的 RING 家族的泛素连接酶。由此,也可以筛选到更多参与调控 Shh 信号通路的分子,进而能对 Shh 通路的调控机制有更详尽的理解,为最终阐明 Shh 信号通路的调控机制作出重要贡献。

[参考文献]

- [1] Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer[J]. *Dev Cell*, 2008, 15(6): 801-812
- [2] Hooper JE and Scott MP. Communicating with Hedgehogs [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(4): 306-317
- [3] Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 324-331
- [4] Tao H, Jin Q, Koo DL, et al. Small molecule antagonists in distinct binding modes inhibit drug-resistant mutant of smoothened[J]. *Chem Biol*, 2011, 18(4): 432-437
- [5] Huangfu D, Anderson KV. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates [J]. *Development*, 2006, 133(1): 3-14
- [6] Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development[J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(5): 331-344
- [7] Gerdes JM, Davis EE, Katsanis N. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease[J]. *Cell*, 2009, 137(1): 32-45
- [8] Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium[J]. *Science*, 2007, 317(5836): 372-376
- [9] Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son Y, et al. Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function [J]. *PLoS Genet*, 2005, 1(4): e53
- [10] Corbit KC, Aanstad P, Singla V, et al. Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium [J]. *Nature*, 2005, 437(7061): 1018-1021
- [11] Chen Y, Yue S, Xie L, et al. Dual Phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3beta regulates its stability and localization in the primary cilium [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15): 13502-13511
- [12] Huangfu D, Anderson KV. Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(32): 11325-11330
- [13] Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, et al. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins[J]. *Nature*, 2003, 426(6962): 83-87
- [14] May SR, Ashique AM, Karlen M, et al. Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli [J]. *Dev Biol*, 2005, 287(2): 378-389
- [15] Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling [J]. *Science*, 2007, 315(5809): 201-205
- [16] Hicke L, Schubert HL, Hill CP. Ubiquitin-binding domains [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(8): 610-621
- [17] Hicke L, Dunn R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19: 141-172
- [18] Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, et al. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(23): 3663-3674
- [19] Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M. Not just a sink: endosomes in control of signal transduction [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(4): 400-406
- [20] Tempe D, Casas M, Karaz S, et al. Multisite protein kinase A and glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation leads to Gli3 ubiquitination by SCFbetaTrCP[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(11): 4316-4326
- [21] Wang B, Li Y. Evidence for the direct involvement of betaTrCP in Gli3 protein processing [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(1): 33-38
- [22] Huntzicker EG, Estay IS, Zhen H, et al. Dual degradation signals control Gli protein stability and tumor formation [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(3): 276-281
- [23] Yue S, Chen Y, Cheng SY. Hedgehog signaling promotes the degradation of tumor suppressor Sufu through the ubiquitin-proteasome pathway[J]. *Oncogene*, 2009, 28(4): 492-499

[收稿日期] 2013-03-03