

## Sufu的突变位点对Sonic Hedgehog信号通路调控机制的研究

王 美,程 雁\*

南京医科大学病理学与病理生理学系,江苏 南京 211166

**[摘要]** **目的:**研究髓母细胞瘤患者中发现的Suppressor of Fused(Sufu)的突变位点与Sonic Hedgehog(Shh)信号通路异常激活之间的联系,从而揭示其与肿瘤生长发展之间的关系。**方法:**构建Sufu突变位点的表达质粒,通过定量PCR、蛋白免疫印迹实验检测Sufu突变体对Sufu<sup>-/-</sup>细胞内源性Gli1表达水平的影响;通过免疫共沉淀检测Sufu突变体蛋白与Gli1的结合情况;通过MTT实验检测Sufu突变体对人髓母细胞瘤细胞(DAOY)生长增殖的影响。**结果:**定量PCR和蛋白免疫印迹实验发现,过表达Sufu的错义突变体(突变位点H87R)的Sufu<sup>-/-</sup>细胞中内源性Gli1表达水平接近于过表达野生型Sufu的Sufu<sup>-/-</sup>细胞,而过表达3个截短突变体(突变位点R146X、R299X、W430X)Sufu<sup>-/-</sup>细胞中内源性Gli1表达水平相比于野生型明显增高。正常情况下野生型Sufu可以和Gli1蛋白结合,免疫共沉淀实验发现Sufu的突变体都不同程度地破坏了与Gli1蛋白的结合;蛋白周转速率实验发现Sufu的突变体可以通过蛋白酶体途径降解;MTT实验发现Sufu突变体失去了抑制DAOY细胞生长增殖的能力。**结论:**髓母细胞瘤患者身上观测到的Sufu突变位点可以驱动肿瘤的形成和生长,并通过细胞功能实验证实了Sufu通过结合Gli蛋白从而抑制其功能。

**[关键词]** Sonic Hedgehog信号通路;髓母细胞瘤;suppressor of fused;Gli

**[中图分类号]** R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)04-429-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20180402

### Effect of Sufu mutations on regulation of Sonic Hedgehog signaling pathway

Wang Mei, Cheng Yan\*

Department of Pathology and Pathophysiology, NMU, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the mechanism of aberrant Sonic Hedgehog (Shh) signaling which found in medulloblastom patients' Suppressor of Fused (Sufu) mutations, and to reveal the relationship between Shh pathway and tumor growth or development. **Methods:** To create Sufu variants expression plasmids, the influence of Sufu mutants on the expression level of Sufu<sup>-/-</sup> cell endogenous Gli1 were detected by quantitative real-time PCR and Western blot. The combination of Sufu mutants and Gli were detected by CO-IP assay. MTT assay were used to evaluate the effects of Sufu variants on growth and proliferation of human medulloblastoma cells (DAOY). **Results:** Quantitative PCR and Western blot experiments found that Sufu missense mutant (H87R) expression level of endogenous Gli1 showed wild type inhibition level, three nonsense mutants (R146X, R299X, W430X) of endogenous Gli1 expression level increased obviously; Under normal conditions, WT-Sufu can be combined with Gli1 protein, The CO-IP experiment found that the mutants of Sufu had different degrees of damage to the combination of Gli1 protein. The protein turnover rate experiment showed that Sufu mutants could be degraded by proteasome pathway and MTT assay showed that Sufu mutants lost their ability to inhibit the growth and proliferation of human medulloblastom DAOY cells. **Conclusion:** Clinically observed mutations in Sufu can drive tumor growth and further elucidates Sufu's role in binding to and suppressing Gli function.

**[Key words]** Sonic Hedgehog signaling pathway; medulloblastom; suppressor of fused; Gli

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(04):429-434]

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展(973)计划(2009CB918403)

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

Sonic Hedgehog(Shh)信号通路最初在影响果蝇胚胎发育的因素中被发现<sup>[1]</sup>。它是脊椎动物胚胎发育的主要信号通路之一,可以定向调节细胞分化及组织形态的发生<sup>[2]</sup>,其异常激活可以导致胚胎生长

发育的畸形以及一系列通路相关癌症的产生,例如基底细胞癌、髓母细胞瘤(medulloblastoma, MB)、横纹肌肉瘤等<sup>[3-4]</sup>。

Shh 信号通路在进化上高度保守且包含多个组份,如 Ptch、Smo、Sufu、Gli 等。Ptch 和 Smo 是两个跨膜受体,主要负责细胞内信号的转导和靶基因的活性<sup>[5]</sup>。当 Shh 配体存在时,配体直接结合 Ptch 并导致 Smo 释放其活性从而激活信号通路。在通路的下游, Gli 蛋白家族调控通路的活性<sup>[6]</sup>, Suppressor of Fused(Sufu)可与 Gli 结合从而将其阻滞在细胞浆中以减弱 Hedgehog 靶基因的转录<sup>[7]</sup>。当通路被激活时, Sufu 不再能结合 Gli, 此时 Gli 被转运到核中发挥转录激活子的作用<sup>[8]</sup>。反之,当 Shh 配体不存在时, Ptch 抑制了 Smo 的活性, Gli 被水解剪切修饰形成转录抑制子<sup>[9]</sup>, Sufu 进一步将其绑定在细胞质中抑制了信号的转导。总之, Sufu 在负性调控哺乳动物 Shh 信号通路活性中起着非常重要的作用<sup>[10-11]</sup>, 同时 Sufu 也是人类肿瘤抑制子<sup>[12]</sup>。

MB 是小脑和脑干的恶性胚胎性肿瘤<sup>[13]</sup>, 也是儿童期最常见的恶性脑肿瘤。有文献报道多数 MB 患者都伴有 Shh 信号通路的异常激活, 且突变基因主要涉及 Ptch、Smo、Sufu<sup>[14-17]</sup>。Kool 等<sup>[18]</sup>进一步从 MB 瘤患者上发现了 Sufu 的突变位点。然而关于这些突变位点的作用很少有研究报道。

本研究选取了在 MB 患者中发现的 4 个 Sufu 突变位点。通过一系列分析研究, 揭示了 Sufu 的这些突变体对 MB 形成及生长发展的影响, 并进一步发现这些突变体都不同程度地破坏了与 Gli1 的正常结合, 同时导致 Shh 信号通路的异常激活, 从而为寻找肿瘤治疗靶点提供了有价值的信息, 且有助于为 Shh 信号通路引发的肿瘤定制个性化的精准治疗。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Sufu 基因敲除的永生化 MEF 细胞(Sufu<sup>-/-</sup>MEFs)由瑞典 Karolinska 学院 Rune Toftgard 博士馈赠。HEK293T 和人 MB 细胞 DAOY 均购于美国 ATCC 公司。HEK293T 细胞用于免疫共沉淀实验。DAOY 细胞用于细胞生长增殖实验。报告基因质粒 pTA-8 × GliBS-Luc 由美国 Scripps 研究所 Sheng Ding 博士馈赠, 表达海肾荧光素酶的报告基因质粒(pRL-TK)购买于美国 Promega 公司。DH5 $\alpha$ 感受态细胞购于北京天根公司。HA-Gli1、RK1F(RK5-1×Flag)质粒由本实验室自行构建。

DMEM、MEM 培养液、胎牛血清(Gibco, Invitrogen 公司, 美国); 转染试剂: GBfectene-Elite(北京神州基因公司); Lipofectamine Reagent 和 Plus Reagent (Invitrogen 公司, 美国); 总 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus、Primescript 反转录试剂盒(TaKaRa 公司, 日本); Fast Start Universal SYBR Green Master (Roche 公司, 美国); Quik Change Lighting 点突变试剂盒(Stratagene 公司, 美国); 荧光素酶双报告试剂盒: Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega 公司, 美国); anti-FLAG (Abcam 公司, 英国); Protein G 琼脂糖珠 (Millipore 公司, 美国); 蛋白酶抑制剂 MG132、蛋白合成抑制剂放线菌酮(cyclohexane, CHX, 罗氏公司, 美国); 一抗: 兔抗 HA IgG、兔抗 Gli1 IgG、小鼠抗  $\beta$ -actin IgG (Santa Cruz Biotech 公司, 美国), 小鼠抗 FLAG IgG (Sigma 公司, 美国); 二抗: 山羊抗小鼠 IgG HRP (Santa Cruz Biotech 公司, 美国); 抗兔 IgG HRP (Cell Signaling Technology 公司, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Sufu 突变体表达质粒的构建和鉴定

以人的基因组 DNA 为模板, 设计 hSufu 引物(F: 5'-GCACCTGCAACAGGAGAGAG-3', R: 5'-CTCC-TATCGGCCTCGTAGAC-3'), 利用 PCR 将模板扩增获得 Sufu 基因片段。接下来用 Quick Change Lighting 点突变试剂盒对目的基因片段进行点突变, 并分别突变成 H87R、R146X、R299X、W430X 4 种 Sufu 基因片段, 即将第 87 位(H87R)的组氨酸 CAC 突变成精氨酸 CGC, 第 146 位(R146X)的精氨酸 CGA 突变成终止密码子 UGA, 第 299 位(R299X)的精氨酸 CGA 突变成终止密码子 UGA, 第 430 位(W430X)的色氨酸 UGG 突变成终止密码子 UAG, 实验步骤严格按照说明书上进行操作, 之后将突变片段连接至空载 RK1F 质粒上, 构建成 pRK5-Flag-hSufu-H87R、pRK5-Flag-hSufu- $\Delta$ C146、pRK5-Flag-hSufu- $\Delta$ C299、pRK5-Flag-hSufu- $\Delta$ C430 质粒。然后进行转化, 筛选阳性克隆, 送思普金生物公司进行测序。

#### 1.2.2 总 RNA 的提取和 real-time PCR

Sufu<sup>-/-</sup> MEFs 细胞用含 10% 胎牛血清 FBS 的 DMEM 培养液培养, 待细胞密度为 70%, 用 Lipofectamine Reagent 和 Plus Reagent 联合转染 Sufu 及突变体质粒, 并设置转染空载(RK1F)的对照组(Ctrl)。6 h 后移去培养液并加入含 10% FBS 的新鲜培养液。继续培养 48 h 后用 PBS 洗涤细胞 2 遍, 加入适量 RNAiso Plus 裂解细胞, 提取 RNA。参照逆

转录试剂盒说明书逆转录生成 cDNA,进行 real-time PCR 反应,检测内源性 Gli1 的表达(引物 F:5'-TCCAGCTTGATGAAGGACCTTGT-3',R:5'-AGCA-TA TCTGGCACGGAGCATGTA-3')。实验严格按照 Fast Start Universal SYBR Green Master 说明书进行操作。

### 1.2.3 双荧光素酶报告基因检测

Sufu<sup>-/-</sup> MEFs 细胞 2×10<sup>4</sup> 个/孔接种于 24 孔板,待细胞密度 60% 时用 Lipofectamine Reagent 和 Plus reagent 将 Sufu 及突变体质粒分别和 HA-Gli1 及荧光双报告基因质粒 pTA-8×GliBS-Luc、pRL-TK 按适当的比例共转染到细胞中,并设置转染空载的对照组(Ctrl),每组设 6 个复孔。用 1×Passive Lysis Buffer 裂解细胞,收集蛋白,每孔 40 μL 加到 96 孔板上上机检测。加入预先制备的 Stop 和 Glo<sup>®</sup> 反应液(Promega 双荧光素酶报告基因检测试剂盒),分别检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性。

### 1.2.4 蛋白免疫共沉淀(immunoprecipitation, IP)

HEK293T 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养,待细胞密度 80%,用 GBfectene-Elite (GBI) 共转染 HA-Gli1、Sufu 及突变体质粒,并设置转染空载(RK1F)的对照组(Ctrl)。48 h 后裂解细胞提取蛋白,并用 BSA 法测定蛋白浓度,加入 anti-FLAG,放置 4 °C 转盘垂直旋转过夜。次日向蛋白液中每管加入 40 μL 预冷的 Protein G 琼脂糖珠,放置冰上充分混匀。接下来用适量 IP 洗涤液洗涤 3 遍并离心沉淀糖珠。每管加入 40 μL 2×SDS 轻轻混匀,在干热器上 95 °C 加热以分离抗原、抗体和琼脂糖珠,离心沉淀后用 Western blot 检测野生型 Sufu 及其突变体与 Gli1 的共结合情况。

### 1.2.5 Sufu 蛋白周转速率检测

将 Sufu<sup>-/-</sup> MEFs 细胞接种在 6 孔板,转染 Sufu 及其突变体质粒,并设置转染空载(RK1F)的对照组。待细胞长满后,加入 CHX 至终浓度为 20 μmol/L,分别在加入 CHX 后 0、4、8、12 h 收集蛋白并进行 Western blot 分析,β-actin 作为内参,最后通过 Image J 灰度扫描分析结果。观察 Sufu 表达量的动态变化,以反映 Sufu 蛋白周转速率。

### 1.2.6 MTT 实验

DAOY 细胞在 6 孔板中生长至密度 70% 时,用 Eugene HD 试剂转染 Sufu 及突变体质粒,并设置转染空载(RK1F)的对照组(Ctrl)。转染 24 h 后,用 0.25% 胰酶消化重悬细胞并计数,将细胞 4 000 个/孔接种于 96 孔板,并设置平行孔即不含细胞的空白对

照。待细胞贴壁后,每组取 6 孔加入 20% MTT 反应液(5 mg/mL) 100 μL/孔,继续培养 4 h 后,每孔加入 150 μL DMSO,室温摇晃 10 min。待结晶充分溶解后在酶标仪上进行比色,选择 490 nm 波长测定各孔吸光值,每隔 24 h 连续 6 d,绘制细胞生长曲线。

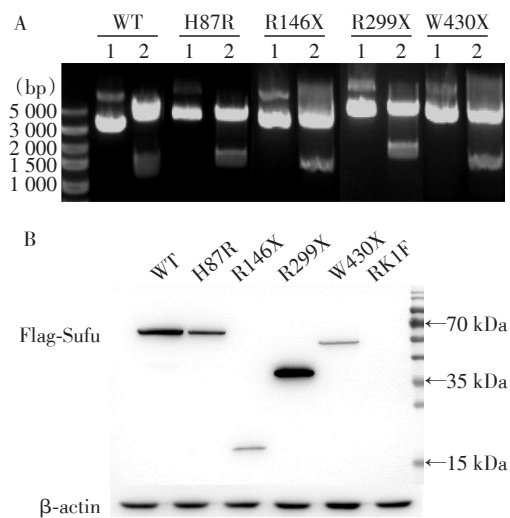
### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 进行统计学分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,并采用方差分析法比较组间差异。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Sufu 突变体质粒的构建和表达

为了研究 Sufu 的突变与 MB 形成及发展之间的关系,我们选取 Sufu 序列上 4 个突变位点进行研究,分别是 H87R、R146X、R299X、W430X(X 代表截短突变)。分别克隆出了野生型及突变体 Sufu 的表达质粒(图 1A),并在 HEK293T 细胞中检测了目的蛋白的表达(图 1B)。



A: WT-Sufu 及其突变体的电泳图,1:酶切前目的基因片段总大小;2:用 Cla I/Sal I 酶切后的基因条带;B: WT-Sufu 及其突变体质粒在 HEK293T 细胞中的表达情况。转染质粒依次为 pRK5-Flag-hSufu、pRK5-Flag-hSufu-H87R、pRK5-Flag-hSufu-ΔC146、pRK5-Flag-hSufu-ΔC299、pRK5-Flag-hSufu-ΔC430、RK1F。

图 1 Sufu 突变体质粒的构建和表达

Figure 1 The construction and expression of Sufu variants plasmids

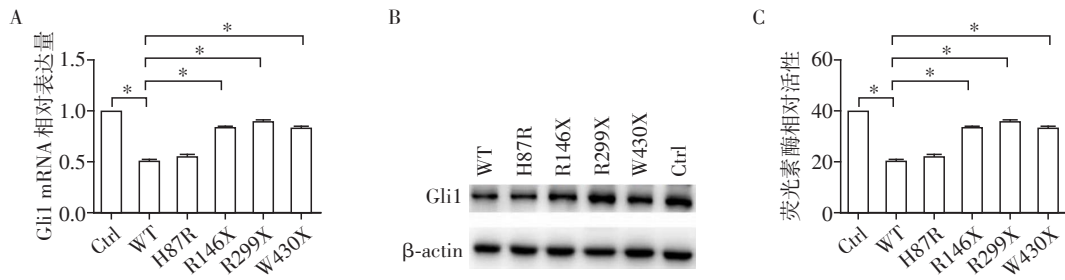
### 2.2 Sufu 的突变体发生了“乘客突变”和功能缺失性突变

为了研究 Sufu 突变体对内源性 Gli1 表达水平的影响,我们在 Sufu<sup>-/-</sup> MEFs 细胞中过表达 Sufu(图 2A),通过 real-time PCR 实验发现过表达野生型 Su-

fu 细胞的 Gli1 mRNA 表达水平比对照组减少了一半,这说明 Sufu 作为抑制因子对 Shh 信号通路起负性调控作用。同时 Sufu<sup>-/-</sup> MEFs 细胞为检测 Sufu 功能学测试提供了一个敏感而又方便的途径。

而过表达 Sufu 的 3 个截短突变体 (R146X、R299X、W430X) 的细胞所表达的 Gli1-mRNA 水平相比于野生型 Sufu 都有所增高,说明了它们对 Shh 信号通路的负性调控作用减弱。另外 1 个过表达 Sufu

错义突变体 H87R 的细胞 Gli1-mRNA 表达水平显示出了野生型水平抑制,我们称之为 passenger mutations (乘客突变)。Western blot 实验也得出了同样结果 (图 2B)。接下来我们用双荧光素酶报告系统来检测靶基因 Gli 的表达情况,结果显示 (图 2C) Sufu 的 3 个截短突变体相比于野生型 Sufu 对 Shh 信号通路活性的负向调控作用减弱,进一步验证了以上的结果。



A: 将 RK1F 和野生型 Sufu、Sufu 突变体质粒分别转染到 Sufu<sup>-/-</sup> MEFs 细胞中,观察 Gli1 mRNA 表达水平;B: 免疫印迹实验鉴定 Gli1 总蛋白表达情况的影响;C: 双荧光素酶报告基因检测不同的 Sufu 突变体对 Gli1 的抑制活性。两组比较,\*P < 0.01(n=6)。

图2 Sufu 突变体对 Shh 信号通路不同的抑制水平

Figure 2 Sufu variants show differential suppression of Shh signaling

### 2.3 Sufu 的突变体与 Gli1 的结合被破坏

免疫共沉淀实验结果发现,Sufu 突变体中 3 个截短突变 (R146X、R299X、W430X) 完全丧失了与 Gli1 的结合能力;另外 1 个错义突变 (H87R) 显现出仅有少量结合 (图 3),说明突变破坏了 Sufu 的正常激活,不能够显著抑制通路的激活。

### 2.4 Sufu 及其突变体经蛋白酶体途径降解

为了验证 Sufu 突变体是否可以通过蛋白酶体途径被降解。通过 Western blot 实验检测了野生型 Sufu 药物处理前后蛋白量的表达变化,结果发现加入蛋白酶体抑制剂 MG132 后野生型 Sufu 蛋白表达量高于对照组 (图 4A)。紧接着用同样方法检测了 Sufu 突变体,结果发现它们的蛋白表达量都出现了不同程度的积聚 (图 4B),这说明 Sufu 的突变体可以通过蛋白酶体途径被降解且突变后的 Sufu 蛋白异常不稳定。

接下来,重新观测了 Sufu 蛋白及其突变体的周转速率。结果发现 (图 4C) 突变体 H87R、R146X、W430X、CHX 处理 4 h 后的蛋白表达量已经低于可检测的阈值。R299X 蛋白表达量梯度减少说明 Sufu 的突变体更不稳定,更易经蛋白酶体途径降解。

### 2.5 Sufu 突变体失去了抑制 DAOY 生长增殖的能力

将 Sufu 突变体质粒转染进入人髓母细胞瘤

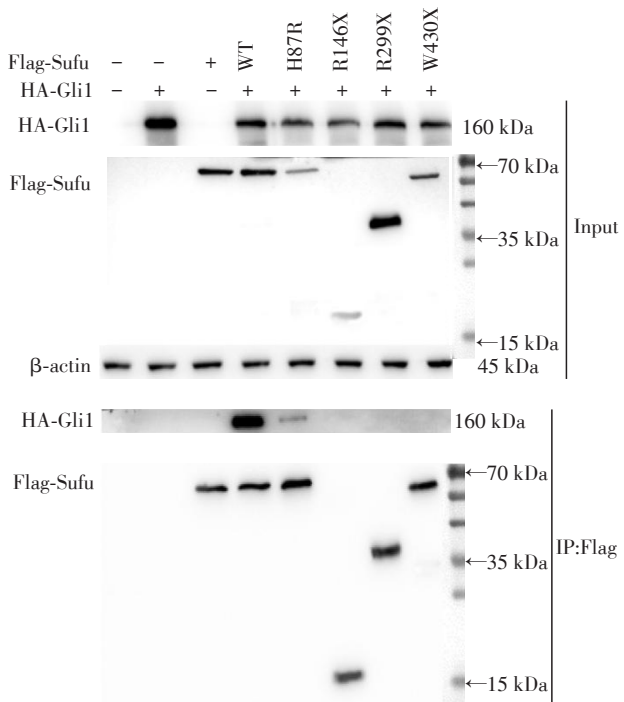
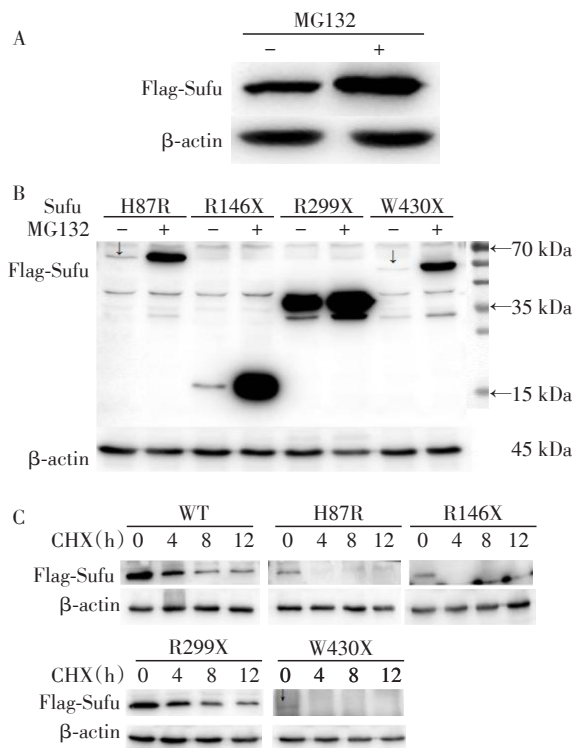


图3 CO-IP 实验显示 Sufu 的突变体破坏了和 Gli1 的结合  
Figure 3 CO-IP show that select Sufu variants disrupt binding to Gli1

DAOY 细胞系,并检测细胞的生长增殖情况 (图 5)。第 1 天,各组细胞间比较差异无统计学意义 (P >



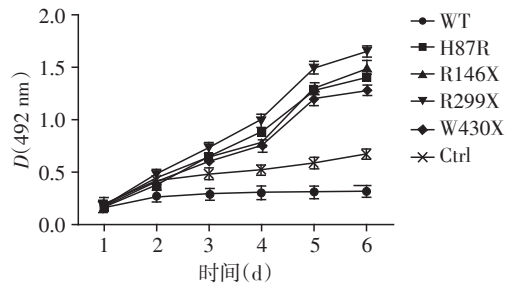
A: 野生型 Sufu 通过蛋白酶体途径降解; B: 用蛋白酶抑制剂 MG132 处理 Sufu 的突变体证实了它们也可以通过蛋白酶体途径降解; C: 蛋白免疫印迹实验分析 Sufu 及其突变体的蛋白周转速率, 用蛋白合成抑制剂 CHX (20  $\mu$ mol/L) 在 4、8、12 h 分别处理 Sufu 突变体转染的 Sufu<sup>-/-</sup> MEFs 细胞, 检测细胞内 Sufu 突变体的剩余蛋白水平。

图4 Sufu 突变体蛋白稳定性的检测  
Figure 4 Sufu variants test of stability

0.05); 第2天, WT组与Ctrl组细胞存活率的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 其他各组间比较差异无统计学意义; 从第3天起, 各组细胞与对照组间的生长差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。如同我们所预期的, 转染了野生型 Sufu 的细胞出现了抑制 DAOY 细胞生长的趋势, 与其作为肿瘤抑制剂的作用一致。而转染了 Sufu 突变体的细胞失去了抑制 DAOY 细胞生长增殖的能力, 进一步证实了 Sufu 需要结合并且抑制 Gli1 来抑制肿瘤细胞生长。

### 3 讨论

本研究结果显示在临床 MB 患者身上观察到 Sufu 突变体可以驱动肿瘤形成和生长, 并且通过功能方面的试验阐明了 Sufu 通过绑定 Gli 蛋白从而抑制其功能的作用。从之前文献中得知 Sufu 通过拮抗 Fu 激酶功能以调节 Gli 的亚细胞定位<sup>[7]</sup>, 即由 Sufu 的羧基末端结合 Gli1 的氨基末端, Sufu 的氨基末端结合 Gli1 的羧基末端尾部将 Gli 缚在细胞质中<sup>[19-22]</sup>, 促进了 Gli 的降解并与其他因素包括 SAP18/Sin3/



野生型 Sufu 抑制细胞的增殖, Sufu 的突变体失去抑制 DAOY 细胞生长增殖的能力。

图5 Sufu 及其突变体对髓母细胞瘤生长的影响  
Figure 5 The impact of WT-Sufu and Sufu variants and the growth of medulloblastoma

HDAC1 复合物共同形成转录共抑制子来参与转录作用<sup>[23]</sup>。然而, 有关 Gli 蛋白的精确分子相互作用却很少被研究报道。文章主要描述了 Sufu 和 Gli1 之间的相互作用, 并且指出了哪些残基在肿瘤生长的发病机制中是重要的。

有关 Sufu 和 Gli1 先前的结构研究显示 Sufu 的氨基和羧基端通过 Gli1 残基 120~125 区域的夹心形成了一个三明治结构, 允许结合和抑制 Gli1 蛋白。Sufu 氨基末端残基 147~160 和羧基末端残基 265~270 形成与 Gli1 相互作用的主要接触面。这为 Sufu 蛋白的其他功能研究提供了结构基础, 比如预测哪些突变位点将破坏 Sufu 的功能。通过本文研究结果, 突变位点 R146X、R299X、R430X 3 处的 Sufu 突变体破坏了和 Gli 的结合。有关 H87R 突变位点是通过何种方式激活 Shh 信号通路的, 有待我们进一步研究, 我们推测有可能是通过突变位点改变了蛋白构象从而重新调节了 Gli 结合和抑制界面区域的程度。为深入了解 Sufu 结构的改变影响其功能提供了条件。

本研究结果显示, Sufu 突变体和野生型 Sufu 一样受蛋白酶体途径调控。然而我们发现了一个有趣现象, 在位点 R299X 处 Sufu 突变体蛋白的表达量表现出了和野生型相当的稳定性, 我们猜测这可能和该位点处 Sufu 基因序列密切相关。所以深入对 Sufu 序列的研究为了解 Sufu 蛋白结构提供了基础, 在肿瘤发生发展中的作用机制研究提供了非常有价值的信息和切入点。

总之, 通过这项工作增加了我们对 Sufu 和 Gli 蛋白结构和功能的理解, 扩展了对 MB 驱动有关位点突变的知识, 并且强化了高度突变肿瘤包含许多没有已知功能相关性突变的作用。随着这种知识的持续增长, 越来越多的机会出现在遗传预筛选

中,以确定对Shh信号通路依赖性肿瘤患者的最佳个性化治疗。

[参考文献]

- [1] Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*[J]. *Nature*, 1980, 287(5785):795-801
- [2] Jing J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer[J]. *Dev Cell*, 2008, 15(6):801-812
- [3] Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signaling in cancer formation and maintenance [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(12):903-911
- [4] Lum L, Beachy PA. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers[J]. *Science*, 2004, 304(5678):1755-1759
- [5] Ryan KE, Chiang C. Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(22):17905-17913
- [6] Huangfu D, Anderson KV. Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(32):11325-11330
- [7] Stone DM, Murone M, Luoh S, et al. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli [J]. *J Cell Sci*, 1999, 112(Pt 23):4437-4448
- [8] Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer [J]. *Nature*, 2001, 411(6835):349-354
- [9] Ruiz i Altaba A. Catching a Gli-mpse of Hedgehog [J]. *Cell*, 1997, 90(2):193-196
- [10] Svard J, Heby-Henricson K, Persson-Lek M, et al. Genetic elimination of suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway [J]. *Dev Cell*, 2006, 10(2):187-197
- [11] Varjosalo M, Li SP, Taipale J. Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between *Drosophila* and mammals [J]. *Dev Cell*, 2006, 10(2):177-186
- [12] Simon-Chazottes D, Paces-Fessy M, Lamour-Isnard C, et al. Genomic organization, chromosomal assignment, and expression analysis of the mouse suppressor of fused gene (Sufu) coding a Gli protein partner [J]. *Mamm Genome*, 2000, 11(8):614-621
- [13] Eberhart CG, Kepner JL, Goldthwaite PT, et al. Histopathologic grading of medulloblastomas - A pediatric oncology group study [J]. *Cancer*, 2002, 94(2):552-560
- [14] Jones DT, Jaeger N, Kool M, et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma [J]. *Nature*, 2012, 488(749):100-105
- [15] Northcott PA, Korshunov A, Witt H, et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(11):1408-1414
- [16] Pugh TJ, Weeraratne SD, Archer TC, et al. Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations [J]. *Nature*, 2012, 488(749):106-110
- [17] Robinson G, Parker M, Kranenburg TA, et al. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma [J]. *Nature*, 2012, 488(749):43-48
- [18] Kool M, Jones DT, Jäger N, et al. Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothed inhibition [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(3):393-405
- [19] Taylor MD, Liu L, Raffel C, et al. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma [J]. *Nat Genet*, 2002, 31(3):306-310
- [20] Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(D1):D805-D811
- [21] Zhang Y, Fu L, Qi X, et al. Structural insight into the mutual recognition and regulation between suppressor of fused and Gli/Ci [J]. *Nat Commun*, 2013, 4:2608-2611
- [22] Merchant M, Vajdos FF, Ultsch M, et al. Suppressor of fused regulates Gli activity through a dual binding mechanism [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(19):8627-8641
- [23] Dunaeva M, Michelson P, Kogerman P, et al. Characterization of the physical interaction of Gli proteins with SUFU proteins [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(7):5116-5122

[收稿日期] 2017-04-19