

小GTP酶Arl6调控原纤毛生成和Shh信号转导

沈秋红,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:研究小GTP酶Arl6对sonic hedgehog(Shh)信号通路的调控作用。方法:构建Arl6敲低稳转细胞株,检测Shh通路靶基因Gli1及Ptch1的mRNA表达水平;激光共聚焦显微镜下观察Arl6在原纤毛的定位,并且检测Arl6敲低细胞中原纤毛的生成情况。结果:Arl6的敲低抑制Shh信号通路的完全激活,在高浓度Shh条件性培养基或Smo激动剂Purm刺激下,靶基因Gli1 mRNA表达水平明显低于对照shControl组($P < 0.01$),Ptch1 mRNA的表达水平也明显降低($P < 0.05$);Arl6定位于原纤毛的基部小体,Arl6的缺失会影响原纤毛的生成;同时,Shh信号会刺激Arl6的表达($P < 0.05$)。结论:小GTP酶Arl6的敲低抑制Shh通路的完全活化,与其抑制原纤毛生成有关。

[关键词] Sonic Hedgehog;Arl6;原纤毛生成

[中图分类号] Q257

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)07-853-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140701

Small GTPase Arl6 regulates ciliogenesis and sonic hedgehog signal transduction

Shen Qihong, Tang Ying, Yue Shen*, Cheng Y Steven*

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism that small GTPase Arl6 regulates sonic hedgehog (Shh) signal transduction. **Methods:** The mRNA expression level of Gli1 and Ptch1, two Shh pathway target genes, were detected in Arl6 knockdown stable cell lines. The localization of Arl6 in the primary cilia was observed under confocal microscope. Ciliogenesis of Arl6 knockdown cells was quantified by counting the percentage of ciliated cells. **Results:** Knockdown of Arl6 inhibited full activation of the Shh pathway. After treatment with high-concentration Shh medium or Smo agonist Purm, Gli1 mRNA expression was significantly lower in the shArl6 group than in the control group ($P < 0.01$), and Ptch1 mRNA expression was also decreased ($P < 0.05$). Arl6 was located in the basal body of the primary cilia, and its absence resulted in defective ciliogenesis. Meanwhile, Shh signaling stimulated the expression of Arl6 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Knockdown of small GTPase Arl6 inhibits full activation of Shh signaling, which is related to defective ciliogenesis.

[Key words] sonic hedgehog; Arl6; ciliogenesis

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(07): 853-857]

Sonic hedgehog(Shh)信号调控脊椎动物组织形态发生和细胞定向分化,与胚胎发育、器官再生和肿瘤发生密切相关^[1]。Shh信号通路的异常活化或失活会导致神经管闭合异常、多指等先天发育异常^[2]。

在Shh通路中,当不存在Shh信号时,细胞膜上的12次跨膜受体Patched(Ptch)抑制7次跨膜蛋白Smoothed(Smo)定位于细胞膜上,Shh信号通路处

于抑制状态;当Shh配基与受体Ptch结合后,Ptch对Smo的抑制作用解除,Shh通路激活^[3]。在Smo的下游,转录因子Gli1-3调控靶基因Gli1、Ptch1等的表达^[4]。原纤毛(primary cilium)是脊椎动物细胞表面普遍存在的细胞器,原纤毛能够感受细胞外环境中的信号变化并协助信号转导至细胞内^[5]。近年来研究表明,原纤毛是Shh信号转导的关键场所。通路成员在原纤毛内的正常转运是决定Shh通路正常活化的关键因素之一^[6-7]。

近年来研究表明,Ras超家族小GTP酶(small GTPases)参与Shh通路成员原纤毛内运动和Gli蛋白的修饰,如Rab23、Arl13b^[8]等,但机制尚不清楚。

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81101497);
国家重点基础研究发展计划(973计划)(2012CB945003)

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

Ras 超家族主要包括 Ras、Rab、Arf、Arl 和 Rho 等亚家族的小 GTP 酶, 通过有活性的 GTP 结合状态和无活性的 GDP 结合状态之间的转换, 发挥“分子开关”的作用。Arl6 是 Arf 亚家族的一员, 因其点突变会导致人类 3 型 Bardet-Biedl 综合征(BBS), 又称为 BBS3^[9]。Arl6 能够与 BBSome 复合物互相作用, 可能参与调控原纤毛内物质转运^[10-13]。本研究发现, 小 GTP 酶 Arl6 参与 Shh 信号转导。Arl6 的敲低可以抑制 Shh 通路活化, 可能与其抑制原纤毛生成有关。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM 高糖细胞培养液、胎牛血清 (Gibco, 美国), Lipofectamine Reagent, Plus reagent, Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司, 美国)。shArl6 (上海吉凯基因), Smo 激动剂 Purmorphamine (Purm, Calbiochem 公司, 美国)。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, FastStart Universal SYBR Green Master (Roche 公司, 美国)。一抗: Arl6、小鼠抗乙酰化 tubulin 抗体 (Sigma 公司, 美国), 小鼠抗 β -actin IgG (Santa Cruz Biotech 公司, 美国), 兔抗 Gli3 (R&D 公司, 美国); 二抗: 山羊抗小鼠 IgG HRP (Santa Cruz Biotech 公司, 美国), 山羊抗兔 IgG HRP (Cell Signaling 公司, 美国), 驴抗山羊 AlexaFluor 594、驴抗小鼠 AlexaFluor 488 (Invitrogen 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 Arl6 基因敲低稳转细胞株的构建

药敏实验确定最优 puromycin 浓度。在野生型小鼠成纤维 MEF 细胞中转染 shArl6, 以 shControl 作为对照, 具体转染步骤按照转染试剂说明书进行。转染后 24 h, 换用含最优浓度 puromycin 的培养基培养细胞, 以后每 2 d 更换 1 次含 puromycin 的培养基, 并且每天观察 shArl6 载体带有的绿色荧光, 直到不发荧光的细胞全部死亡, 挑单克隆并鉴定。收获细胞, 将细胞稀释至浓度 10 个/ml, 种入 96 孔板, 继续加 puromycin 处理, 每天观察细胞荧光, 挑选荧光较强的单克隆细胞株, 待细胞数目增加, 将挑选的孔板中的细胞转移至 24 孔板, 进行扩大培养后, 提取蛋白, Western blot 检测 Arl6 蛋白表达水平。

1.2.2 RNA 提取和 real-time PCR

药物处理细胞 48 h 之后, 吸去培养基, PBS 洗细胞 1 次, 每孔加入 1ml RNAiso Plus 裂解细胞, 并

按照提取步骤提取细胞总 RNA。逆转录试剂盒逆转录生成 cDNA, 进行 real-time PCR 反应, 具体步骤参照 FastStart Universal SYBR Green Master 试剂说明书。

1.2.3 细胞免疫荧光和激光共聚焦显微镜观察

将细胞种在 Lab-TEK 腔室盖玻片上, 待细胞长满后, 换用含 0.5% FBS 的低血清培养基稀释药物, 处理细胞 48 h。4% 多聚甲醛固定细胞 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 4℃ 孵育过夜。次日, PBS 洗细胞 3 次, 加入封闭液稀释的相应荧光二抗室温避光孵育 1 h, PBS 洗细胞 3 次, 加入 PBS 稀释的含 DAPI 的防淬灭剂备检。在激光共聚焦显微镜下, 观察原纤毛。

1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS18.0 进行分析。数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方差分析 (两两比较采用 Bonferroni 法) 和 *t* 检验。P \leq 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

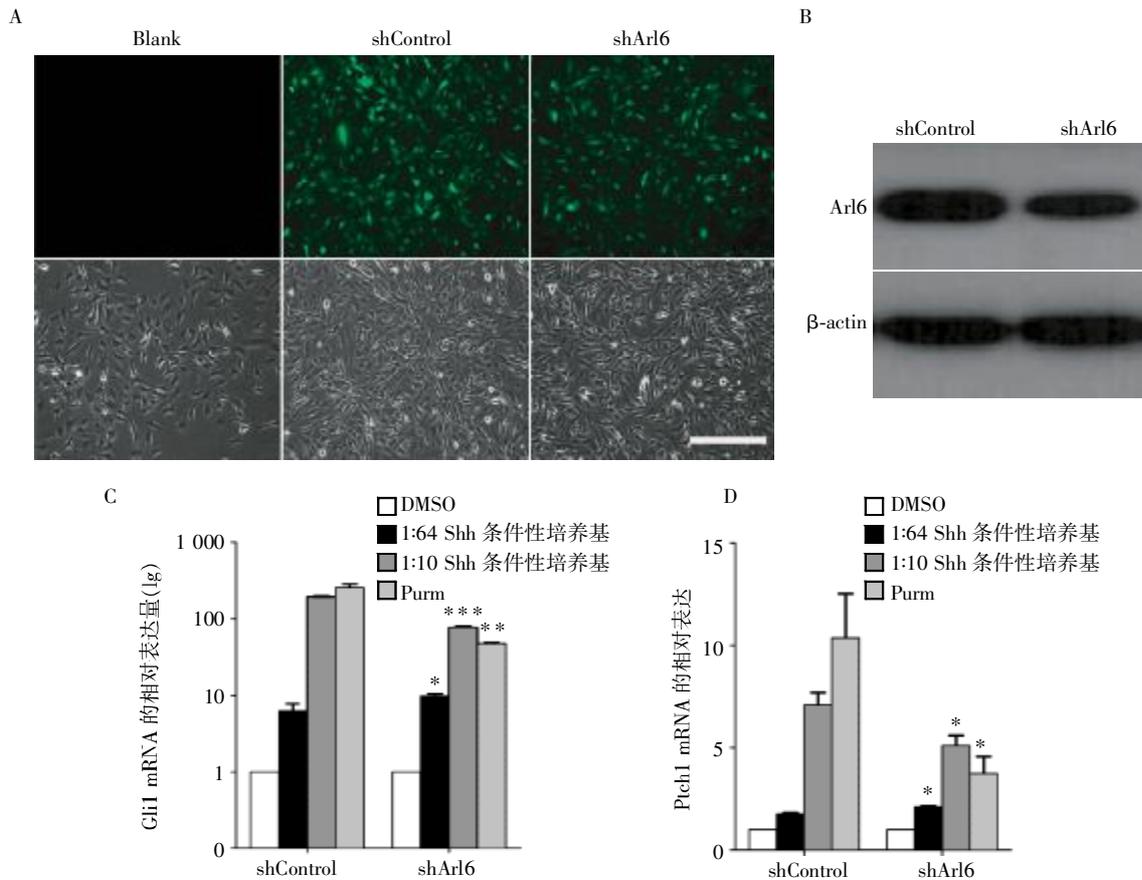
2.1 Arl6 的敲低抑制 Shh 信号通路的完全激活

在前期的小 GTP 酶 siRNA 文库筛选中, 我们发现 Arl6 敲低能够影响 Shh 信号通路的活性。为了验证这一结果, 我们首先在野生型小鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs) 内导入带 EGFP 标签的 shArl6, 构建 Arl6 敲低的稳转细胞株 (图 1A、B), 并检测 Shh 信号通路下游靶基因 Gli1 和 Ptch1 的 mRNA 表达水平。Real-time PCR 结果发现, 用高浓度的 Shh 条件性培养基 (1:10 稀释组) 或 Smo 激动剂 Purm 刺激细胞, shArl6 稳转细胞株中 Gli1 和 Ptch1 mRNA 的表达都明显低于 shControl 稳转细胞株 (图 1C、D), 表明 Arl6 的敲低阻碍了 Shh 信号通路的完全激活。但是, 低浓度的 Shh 条件性培养基 (1:64 稀释组) 刺激下, Arl6 的敲低使 Shh 信号通路下游靶基因 Gli1 和 Ptch1 的 mRNA 表达水平略有上升。

2.2 Arl6 定位于原纤毛的基部小体

为了探究 Arl6 调节 Shh 信号转导的可能机制, 我们进而观察了 Arl6 蛋白在细胞内的分布。我们在 MEF 细胞内过表达带有红色荧光蛋白标签的 Arl6 蛋白 (Arl6-RFP), 发现 Arl6 蛋白主要分布在细胞质。但有意思的是, 我们观察到, Arl6 在间期细胞的原纤毛基部有明显的聚集 (图 2), 提示 Arl6 可能参与原纤毛的装配或纤毛内信号分子的转运。

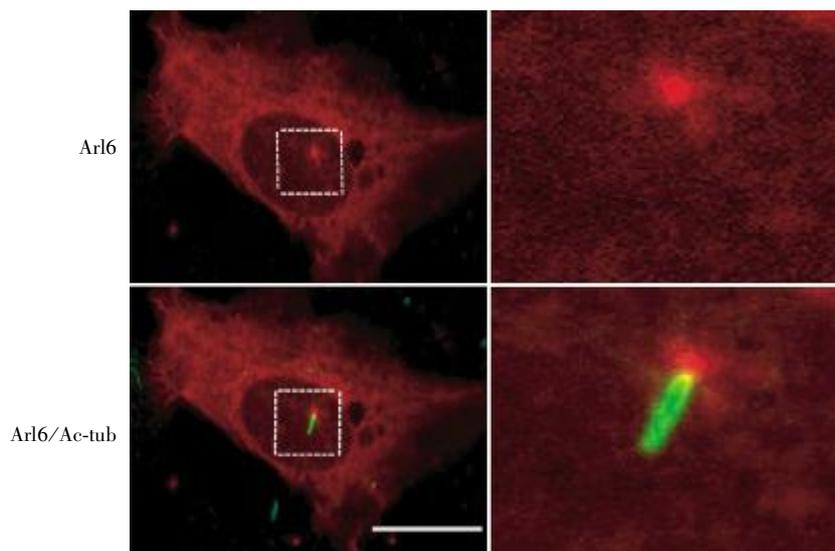
2.3 Arl6 的缺失会影响原纤毛的生成



A: Arl6 敲低稳转细胞株 shRNA 表达的荧光强度, 比例尺为 50 μm ; B: Western blot 检测 Arl6 敲低稳转细胞株中 Arl6 蛋白表达水平; C: Real-time PCR 检测 Gli1 mRNA 的表达水平; D: Real-time PCR 检测 Ptch1 mRNA 的表达水平。与 shControl 对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 Arl6 的敲低抑制 Shh 信号通路的完全激活

Figure 1 Knocking down of Arl6 inhibits full activation of Shh pathway



免疫荧光染色观察 Arl6 在原纤毛的定位。右图为左图白色方框内的放大图像。红色荧光代表 Arl6-RFP, 绿色荧光代表 Anti-ac-tubulin 标记的原纤毛, 比例尺为 5 μm 。

图 2 Arl6 定位于原纤毛的基部小体

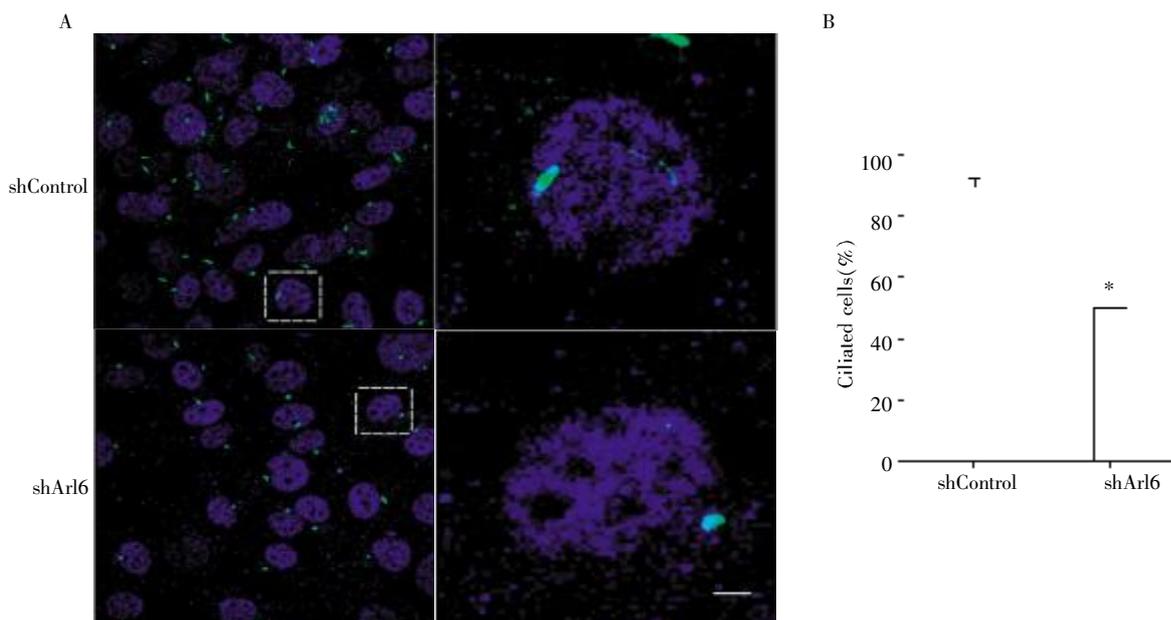
Figure 2 Arl6 locates in the basal body of the primary cilia

进一步地,我们在激光共聚焦显微镜下比较观察 Arl6 敲低细胞和对照细胞的原纤毛生长情况。结果发现, Arl6 敲低细胞内原纤毛生成严重受阻,仅有 50% 的细胞存在原纤毛结构(图 3)。而且,原纤毛结构也明显异常,与正常原纤毛相比,非常短小。这一结果表明, Arl6 的敲低会影响原纤毛的生成。原纤毛结构和纤毛内的正常转运是决定 Shh 通路正常活化的关键因素之一,因此,我们推断, Arl6 敲低对 Shh 通路的抑

制作用可能与原纤毛的生成异常有关。

2.4 Shh 信号通路的激活能够导致 Arl6 的活化

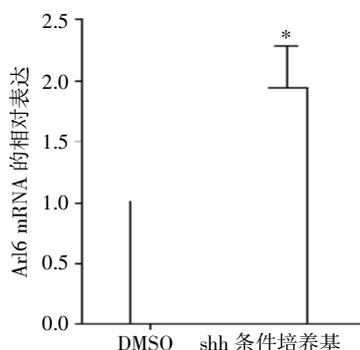
小鼠胚胎成纤维细胞对 Shh 信号刺激非常敏感。在利用 Shh 条件性培养基处理细胞 24 h 后,我们发现, Arl6 mRNA 表达水平与 DMSO 对照组相比有明显增高,说明 Shh 信号会刺激 Arl6 的表达(图 4),提示 Shh 信号能够正反馈性地调节 Arl6 基因的表达,从而保证信号通路的完全活化。



A:激光共聚焦显微镜下原纤毛生成情况比较,右图为左图中白色方框内单个细胞放大图,比例尺为 1 μm;B:形成原纤毛的细胞比例统计,与 shControl 对照组比较, *P < 0.01。

图 3 Arl6 的缺失会导致原纤毛生成障碍

Figure 3 Absence of Arl6 results in ciliary anomalies



与 DMSO 对照组比较, *P < 0.05。

图 4 Shh 信号通路的活化会刺激 Arl6 的表达

Figure 4 Shh signaling can promote the expression of Arl6

3 讨论

本文探讨了 Ras 超家族小 GTP 酶 Arl6 对 Shh

信号通路的调控机制。在构建了 Arl6 敲低稳转细胞株的基础上,我们检测了 Shh 通路靶基因 Gli1 及 Ptch1 的 mRNA 表达水平,发现高浓度的 Shh 条件性培养基或 Smo 激动剂 Purm 刺激下, Arl6 的敲低阻碍了 Shh 通路的完全激活。激光共聚焦检测发现, Arl6 可聚集在原纤毛的基部小体。有研究发现, Arl6 可以和 BBSome 复合体相互作用,调控原纤毛内蛋白的转运^[14-15]。因此,我们检测了 Arl6 敲低稳转细胞株中原纤毛生成情况,发现 Arl6 敲低细胞内原纤毛生成严重受阻,并且原纤毛的形状异常短小。由此,我们推断, Arl6 敲低对 Shh 通路完全激活的抑制作用与原纤毛的生成异常有关。在实验中,我们还发现 Shh 配基活化细胞内 Shh 通路的同时, Arl6 的表达也会提高,说明 Shh 信号能够正反馈性地调节 Arl6 基因的表达,从而保证信号通路的完全活化。

但Arl6是否是Shh通路直接的靶基因,目前尚不清楚。

研究中我们发现,低浓度Shh条件培养基刺激时,Arl6的敲低使Shh下游靶基因Gli1和Ptch1的表达水平和shControl组相比略有上升;但高浓度Shh条件性培养基刺激时,却使Gli1和Ptch1的表达水平明显下降。我们推断这可能与Shh信号通路成员进出原纤毛异常有关。有报道称Arl6可能和其他BBS蛋白及IFT蛋白在原纤毛的基部小体形成“门控开关”,调控原纤毛内的分子转运^[14,16-17]。我们也发现,Arl6敲低导致的原纤毛结构异常与纤毛内逆行性转运蛋白失活表型非常类似。因此,Arl6敲低可能导致Shh部分激活因子滞留在原纤毛内,使信号通路活性略有上升;但抑制因子的滞留,则最终导致通路无法完全激活。

在真核细胞,原纤毛是Shh通路成员富集的场所,原纤毛就如同Shh信号通路的心脏,Shh信号转导必须依赖原纤毛结构的存在以及纤毛内信号分子的正常转运。但是,调节原纤毛生成和物质转运的复杂机制目前尚不清楚。本研究发现定位于原纤毛基部小体的小GTP酶Arl6的缺失可以影响原纤毛的生成并抑制Shh通路的完全活化,进一步证实了正常原纤毛结构是Shh通路信号转导所必需的。同时,本研究也为小GTP酶调控原纤毛内信号转导的机制探讨提供了新的理论依据。

[参考文献]

- [1] Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer[J]. *Dev Cell*, 2008, 15(6):801-812
- [2] Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(12):1026-1033
- [3] 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
- [4] Wang B, Fallon JF, Beachy PA. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb [J]. *Cell*, 2000, 100(4):423-434
- [5] Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development[J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(5):331-344
- [6] Chen Y, Yue S, Xie L, et al. Dual Phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3 beta regulates its stability and localization in the primary cilium [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15):13502-13511
- [7] Gerdes JM, Davis EE, Katsanis N. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease [J]. *Cell*, 2009, 137(1):32-45
- [8] Oro AE. The primary cilia, a 'Rab-id' transit system for hedgehog signaling [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(6):691-696
- [9] Fan Y, Esmail MA, Leroux MR, et al. Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(9):989-993
- [10] Zhang Q, Nishimura D, Sheffield VC, et al. Bardet-Biedl syndrome 3 (Bbs3) knockout mouse model reveals common BBS-associated phenotypes and Bbs3 unique phenotypes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(51):20678-20683
- [11] Jin H, White SR, Nachury MV, et al. The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia [J]. *Cell*, 2010, 141(7):1208-1219
- [12] M'hamdi O, Ouertani I, Chaabouni-Bouhamed H, et al. Prevalence of Bardet - Biedl syndrome in Tunisia [J]. *J Community Genet*, 2011, 2(2):97-99
- [13] Price HP, Hodgkinson MR, Smith DF, et al. A role for the vesicle-associated tubulin binding protein ARL6 (BBS3) in flagellum extension in *Trypanosoma brucei* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(7):1178-1191
- [14] Wiens CJ, Tong Y, Leroux MR, et al. Bardet-Biedl syndrome-associated small GTPase ARL6 (BBS3), functions at or near the ciliary gate and modulates Wnt signaling [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(21):16218-16230
- [15] Zhang Q, Hu J, Ling K. Molecular views of Arf-like small GTPases in cilia and ciliopathies [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(15):2316-2322
- [16] Iomini C, Li L, Esparza JM, et al. Retrograde intraflagellar transport mutants identify complex A proteins with multiple genetic interactions in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Genetics*, 2009, 183(3):885-896
- [17] Tran PV, Haycraft CJ, Besschetnova TY, et al. THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(4):403-410

[收稿日期] 2014-03-25