

GRK2和GPR161协同调控Hedgehog(Hh)通路下游信号转导的研究

张宏宇,辛玉叶,王敏,赵仲华*

(山西大学 生物医学研究院 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 医学分子细胞生物学山西省重点实验室,山西 太原 030006)

摘要: G蛋白偶联受体激酶2(GRK2)和G蛋白偶联受体161(GPR161)分别为脊椎动物Hedgehog(Hh)信号通路下游的正向和负向调控因子。然而,两者在调控Hh信号转导中是否具有协同机制尚不清楚。本研究通过构建斑马鱼*gpr161*缺失突变体发现,Gpr161功能缺失导致斑马鱼Hh通路活性出现轻微上调,进一步证实了GPR161在脊椎动物Hh通路中保守的负调控作用。同时,通过对Gpr161亚细胞定位的研究发现,在*grk2*突变体中,Gpr161仅在初级纤毛中驻留,表明Grk2对Gpr161向初级纤毛外转运具有重要调控作用。蛋白质相互作用研究显示,Grk2通过其G蛋白信号转导调节分子(Regulator of G protein Signaling,RGS)结构域特异性结合Gpr161的C端结构域,提示Grk2可能通过调控Gpr161介导Hh通路下游的信号转导过程。这些结果为进一步深入探究Hh通路下游信号转导机制提供了新的科学证据和线索。

关键词: Hh信号通路;蛋白质相互作用;纤毛转位;GRK2-GPR161

中图分类号: Q28;Q291 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2395(2025)05-1037-13

GRK2 Probably Regulates Vertebrate Hedgehog (Hh) Signal Transduction Through GPR161

ZHANG Hongyu, XIN Yuye, WANG Min, ZHAO Zhonghua*

(Institutes of Biomedical Sciences, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Key Laboratory of Medical Molecular Cell Biology of Shanxi Province, Taiyuan 030006, China)

Abstract: G protein coupled receptor kinase 2 (GRK2) and G protein coupled receptor 161 (GPR161) are important positive and negative regulators, respectively, in the vertebrate Hedgehog (Hh) signaling pathway downstream of Smoothed (SMO). However, potential functional coordination between these two regulators remains unexplored. Here, we generated newly zebrafish *gpr161* null mutants and observed mild upregulation of Hh pathway, confirming its evolutionarily conserved inhibitory role. Subcellular localization analysis revealed that Grk2 deficiency caused exclusive primary cilium (PC) retention of Gpr161, suggesting that the PC-cytoplasm translocation of the Gpr161 is specifically regulated by Grk2. Furtherly, the physical interaction of Gpr161 and Grk2 has been confirmed by yeast two hybrid and immuno-precipitation, showing that Grk2 specifically recognizing the C-terminal domain of Gpr161. These results provided scientific evidence and new clues for unveiling the Grk2-Gpr161 axis in regulating the vertebrate Hh pathway.

Key words: Hh signaling pathway; protein interaction; PC-cytoplasm translocation; GRK2-GPR161

收稿日期:2022-06-09;接受日期:2025-05-06

基金项目:国家自然科学基金(31970738;U21A20389);山西省中央引导地方科技发展资金项目(YDZJSX2024D009)

作者简介:张宏宇(1994-),女,山西太原人,博士研究生,研究方向为Hh信号通路转导。E-mail:13020070644@163.com

*通信作者:赵仲华(ZHAO Zhonghua),E-mail:zhzhao@sxu.edu.cn

引文格式:张宏宇,辛玉叶,王敏,等.GRK2和GPR161协同调控Hedgehog(Hh)通路下游信号转导的研究[J].山西大学学报(自然科学版),2025,48(5):1037-1049. DOI:10.13451/j.sxu.ns.2025071.

0 引言

Hedgehog (Hh) 信号转导通路作为进化保守的发育调控系统,通过协调细胞分化、增殖和迁移等多种细胞活动,在大多数动物胚胎器官建成和成体组织稳态维持中发挥重要调控作用^[1]。该通路活性异常会导致先天性畸形和发育缺陷。此外,其活性异常激活与多种恶性肿瘤的发生密切相关^[2-4],因此揭示其信号转导分子机制具有重要科学意义。目前对于该通路信号转导机制认识如下:特定细胞通过旁分泌的方式合成并分泌配体分子(Hh 蛋白)到细胞间质中,应答细胞膜上的 Hh 受体 Patched (PTCH) 与 Hh 配体结合并启动细胞信号应答。Hh 蛋白与 PTCH 的结合解除了对通路中关键枢纽蛋白 Smoothed (SMO) 的抑制,进而引发下游级联信号传导反应,促使转录因子 GLIs (Glioma-Associated Oncogene Homologs) 被激活并进入细胞核,最终启动通路靶基因的表达,实现细胞对 Hh 配体的应答^[5-7]。在脊椎动物中,Hh 通路信号转导需要细胞内一个高度特化的细胞器——初级纤毛 (Primary Cilia, PC) 的参与^[8-9]。PC 是脊椎动物细胞膜表面天线样凸起的膜包被结构。Hh 通路中许多关键蛋白在信号激活时均呈现 PC 中的特异性转运^[10-11]。然而,这些蛋白感知 Hh 通路激活信号并调控其纤毛转位的机制尚不明确。

GPR161 属于 A 类 G 蛋白偶联受体 (G Protein Coupled Receptor, GPCR),基于小鼠模型研究发现该蛋白是小鼠 Hh 通路中重要的负调控因子^[12-14]。GPR161 是一个典型的 PC 定位 GPCR,功能研究认为 GPR161 主要通过偶联小 G 蛋白 G_{α_s} ,维持细胞 PC 中较高水平的 cAMP 浓度,使得 cAMP 依赖的蛋白质激酶 A (Protein Kinase A, PKA) 呈现高度激活状态,从而抑制 Hh 通路的激活^[14-16]。细胞学研究显示,GPR161 的 PC 亚细胞定位具有 Hh 通路信号依赖的动态特征:当通路处于静息时,大多数 GPR161 驻留在 PC 中,而当通路被激活后,该蛋白则从纤毛向细胞质中转运,这一 PC 转运特征与其在 Hh 通路中的功能高度相关^[17-19]。但是,GPR161 是如何感应上游信号并驱动其 PC 转运的机制尚不清楚。

G 蛋白偶联受体激酶 (G-Protein Coupled Receptor Kinase, GRK) 是一类可以特异性磷酸化修饰 GPCR 的激酶,其经典的功能是促进激活的 GPCR 信号脱敏。GRK 通过磷酸化 GPCR 胞内 C 末端以促进 β -arrestin 介导的受体内吞从而关闭已经激活的 GPCR 信号通路。GRK 有五个家族,目前研究显示,GRK2 是脊椎动物 Hh 通路重要的正调控因子^[20-22]。尽管有研究提示 GRK2 可能通过磷酸化 SMO 激活通路^[23-24],但 *grk2* 与 *smo* 突变体的表型并不完全一致,暗示 GRK2 存在其他的作用机制。课题组前期研究认为 GRK2 可能通过调控其他的 GPCR 参与调控 Hh 通路的信号转导。结合 GPR161 的相关研究,我们认为 GPR161 作为 Hh 通路中典型的负调控 GPCR,其可能是 GRK2 调控的靶点,二者在调控 Hh 通路信号转导中具有协同机制。

因此,本研究以斑马鱼为模型,建立了 *gpr161* 缺失突变体,证实其在 Hh 通路中具有保守的调控作用,进而围绕 GRK2-GPR161 的相互关系分别从亚细胞定位、蛋白互作及遗传表型等方面探究了两者在调控 Hh 通路分子机制的相关性,证实了 GRK2 参与调控 GPR161 在 Hh 通路激活时从初级纤毛向细胞质的转运过程。同时,我们揭示了二者蛋白关键结构域的互作关系,在一定程度上证实了二者在 Hh 通路调控中的协调关系。这些研究结果为进一步揭示 GRK2-GPR161 协同调控 Hh 信号转导提供了新的线索和科学证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

AB 野生型斑马鱼 (*Danio rerio*) 品系引进于国家斑马鱼资源中心,*grk2* 突变体和 *yot* 斑马鱼突变体引进于新加坡南洋理工大学 Philip Ingham 实验室^[21]。实验动物饲养于山西大学生物医学研究院斑马鱼动物中心,培养条件为恒温 (28 ± 1) °C,光照周期为光照/黑暗 (14 h/10 h) 交替循环^[25]。斑马鱼胚胎通过自然交配产卵,胚胎收集后培养于 E3 培养液中,胚胎发育时期的认定参考相关文献进行^[26]。

1.2 载体的构建

本研究中用到的载体有: *pCS2*+*-gpr161a*-

Flag、*pCS2+gpr161b-Flag*、*pCS2+gpr161a-eGFP*、*pCS2+gpr161b-eGFP*、*pCS2+grk2-eGFP*、*pCS2+pkar1ab-eGFP*、*pMetYC-DEST-gpr161a*、*pMetYC-DEST-gpr161b*、*pNX35-DEST-grk2*、*pNX35-DEST-pkar1ab*、*pMetYC-DEST-gpr161a6thTM*、*pMetYC-DEST-gpr161b6thTM*、*pNX35-DEST-grk2RGS*、*pMetExg2-DEST-grk2RGS*、*pNX35-DEST-gpr161a6thTM*、*pNX35-*

DEST-gpr161b6thTM。所有载体采用HiFi Assembly Kit (NEB)同源重组试剂盒进行构建。构建载体使用的引物见表1。*pCS2+eGFP*和*pCS2+Flag*原始载体由新加坡南洋理工大学Philip Ingham实验室馈赠。酵母双杂交原始载体*pMetYC-DEST*、*pNX35-DEST*、*pMetExg2-DEST*由山西大学生命科学学院张犇课题组馈赠。

表1 载体构建引物列表

Table 1 List of primers for vectors construction

引物名称	引物序列
<i>pCS2-eGFPF</i>	GGTGGAGGTGGATCTGTGAGCAA
<i>pCS2ATGR</i>	GGTGGCTGGATCCTGCAAAAA
<i>pCS2-FlagF</i>	GCAGCTGCAAGTGACTIONACAAA
<i>pCS2-gpr161aF</i>	CTTTTTGCAGGATCCAGCCACCATGAACGGCTCTAAGAATG
<i>pCS2-eGFPgpr161aR</i>	GCTCACAGATCCACCTCCACCCATTTTTTCCTCGCGCTCC
<i>pCS2-flaggpr161aR</i>	ACTATAGTTCTAGAATTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTA
<i>pCS2-gpr161bF</i>	TGCAGGATCCAGCCACCATGAACACCAGCAGCAATGAAACC
<i>pCS2-eGFPgpr161bR</i>	GCTCACAGATCCACCTCCACCTGCGCATATTTCTCGATATC
<i>pCS2-flagGpr161bR</i>	TGTAGTCACTTGCAGCTGCTGCGCATATTTCTCGATATCGT
<i>pCS2-grk2F</i>	CTTTTTGCAGGATCCAGCCACCATGGCGGACCTCGAAGCAG
<i>pCS2-eGFPgrk2R</i>	ACGCCTCCGCCTCCTCCCCGGGACGGCCGTTGCTGTTGC
<i>V019CubF</i>	ATTGGTGGTGGCGGATCCGGT
<i>V019met25R</i>	GATTGTATGGATGGGGGTAATA
<i>V175linkF</i>	GGCGCGCCACTTCTAAATAAGC
<i>V1752HAR</i>	TGCATAGTCCGGGACGTCATAGG
<i>V409linkF</i>	ATTGGTGGTGGCGGATCCGGT
<i>V409Exg2GPIR</i>	TCTAGACGCAAGCTTCAGGG
<i>pCS2gpr161aF</i>	TTTTTGCAGGATCCAGCCACCATGAACGGCTCTAAGAATG
<i>pCS2-Flaggpr161aR</i>	TGTAGTCACTTGCAGCTGCCATTTTTTCCTCGCGCTCCATT
<i>pCS2-Flaggpr161bR</i>	TTTGTAGTCACTTGCAGCTGCTGCGCATATTTCTCGATATCGTC
<i>V019met25gpr161aF</i>	TACCCCATCCATACAATCCCACCATGAACGGCTCTAAGAATG
<i>V019Cubgpr161aR</i>	CCACCGGATCCGCCACCACCAATCATTTTTTCCTCGCGCTCCA
<i>V019met25gpr161bF</i>	ATTACCCCATCCATACAATCCCACCATGAACACCAGCAGCAA
<i>V019Cubgpr161bR</i>	CACCGGATCCGCCACCACCAATTGCGCATATTTCTCGATATC
<i>V1752HAGrk2F</i>	GACGTCCCGACTATGCAGGATCCATGGCGGACCTCGAAGCAG
<i>V175grk2R</i>	ATTTAGAAGTGGCGCGCCCTACAGGCCGTTGCTGTTGCGGTGT
<i>V1752HAprkr1abF</i>	GACGTCCCGACTATGCAGGATCCATGGCATCAGGCAGTGTGAG
<i>V175linkpkar1abR</i>	TTATTTAGAAGTGGCGCGCCCTCAGACGGAGAGCGACACGAAGCT
<i>V019gpr161a6thTMF</i>	TTACCCCATCCATACAATCCCACCATGGCCTTCATCACCAT
<i>V019gpr161b6thTMF</i>	TACCCCATCCATACAATCCCACCATGGCATTTGGTTACTATT
<i>V175grk2RGSR</i>	GCTTATTTAGAAGTGGCGCGCCCTACAAATGGATGTTGAGCT
<i>V019met25grk2F</i>	CCATCCATACAATCCCACCATGGCGGACCTCGAAGCAGT
<i>V019grk2RGSR</i>	CCGGATCCGCCACCACCAATCAAATGGATGTTGAGCTCT
<i>V175gpr161a6thTMF</i>	CGTCCCGACTATGCAGGATCCATGGCCTTCATCACCAT
<i>V175linkgpr161aR</i>	TTTAGAAGTGGCGCGCCCTACATTTTTTCCTCGCGCTCCA
<i>V175gpr161b6thTMF</i>	CGTCCCGACTATGCAGGATCCATGGCATTTGGTTACTAT

续表1 载体构建引物列表

Continued Table 1 List of primers for vectors construction

引物名称	引物序列
V175linkgpr161bR	TTTAGAAGTGCGCGCCCTATGCGCATATTTCTCGATATCG
V409Exg2GPIgrk2F	CCCTGAAGCTTGCGTCTAGAATGGCGGACCTCGAAGCAGT
V409linkgrk2R	ACCGGATCCGCCACCACCAATCAGGCCGTTGCTGTTGCGG
Gpr161aT1	TGGCCAACCTCCACTAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
gRNAampR	AAAAGCACCGACTCGGTAAC
gpr161aCRT4IDF	AGATGAGCTGACAAGTAGATGGA
gpr161aCRT4IDR	AGATGAGCTGACAAGTAGATGGA
Gpr161bT4	CTCCCAACGTGAGCATGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
gpr161bCRT4IDF	TGGGACTTATTTGATGACATGG
gpr161bCRT4IDR	ATTCGGTTGGAGATGCTAAAA

1.3 细胞培养与转染

HEK293T 细胞系采购于中国科学院细胞库,细胞使用 DMEM 高糖完全培养基,在体积分数 5% CO₂, 37 °C 条件下培养。培养基配方如下:DMEM 高糖培养基(Sangon Biotech),体积分数 10% 胎牛血清(Gibco)和 100 μg/mL 青霉素(Sangon Biotech),100 μg/mL 链霉素(Sangon Biotech)。细胞生长至密度体积分数 70%~80% 进行胰酶消化传代,取对数生长期的细胞进行实验。细胞转染使用 PEI(Protein Tech)转染试剂,按照相应说明书进行质粒转染。

1.4 体外转录 RNA

利用限制性内切酶 Bam HI (NEB) 酶切 *pSP64-Shh*, Not I (NEB) 酶切 *pCS2+gpr161a-eGFP* 和 *pCS2+gpr161b-eGFP* 线性化过表达载体,线性化的载体片段经凝胶 DNA 回收试剂盒(Zymo Research)进行纯化。纯化后的载体片段使用体外转录试剂盒 mMESSAGE mMACHINE Kit (Invitrogen) 合成 mRNA,经纯化和质控后置于 -80 °C 保存备用。

1.5 显微注射斑马鱼胚胎

斑马鱼胚胎显微注射实验参照相关文献进行^[27]。简单步骤如下:提前一天将性成熟的 AB 野生型斑马鱼按照雌雄比例为 1:1 或 1:2 放入配鱼缸中,挡板隔开。第二天抽掉挡板使鱼自然交配产卵,然后收集受精卵,在胚胎为 1 细胞时期完成注射, *gpr161a/b-eGFP* mRNA 注射量为 100 pg, *Shh* 的注射量 100 pg,注射后的胚胎在 E3 培养基中置于 28 °C 恒温培养。

1.6 斑马鱼全胚免疫荧光染色

全胚免疫荧光染色实验参照相关文献进

行^[28]。本研究使用的抗体及对应的稀释比例如下:chicken anti-GFP (Abcam, 1:1 000), mouse anti-acetylated α -tubulin (Sigma, 1:1 000), Rat anti-Prox1 (Abcam, 1:3 000), mouse anti-Engrailed (DSHB, 1:50), Alexa FluorTM 546 donkey anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, 1:2 000), Alexa FluorTM 488 goat anti-chicken IgG (H+L) (Invitrogen, 1:2 000), Alexa FluorTM 546 donkey anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen, 1:2 000), Alexa FluorTM 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, 1:2 000)。免疫荧光的结果使用 LSM710 激光共聚焦显微镜进行观察和图像采集。

1.7 蛋白提取、Pull-down 和 Western blot

蛋白提取、Pull-down 和免疫印迹实验按照常规方法进行^[29]。蛋白提取 RIPA 裂解液配方如下:25 mmol/L Tris-HCl pH 7.4、150 mmol/L NaCl、质量分数 1% NP-40、质量分数 1% 去氧脱酸钠、体积分数 0.5% Triton X-100、质量分数 0.1% CHAPSO、1X 蛋白酶抑制剂 (Roche) 和 1X 磷酸酶抑制剂 (Roche)。Pull-down 实验用使用的亲和磁珠分别为 FLAG M2 磁珠 (Sigma) 和 eGFP Trap 琼脂糖珠 (Chem Teck)。Western blot 使用抗体及工作浓度如下:mouse anti-Flag M2 (Sigma, 1:3 000), mouse anti-eGFP (Abclone, 1:3 000), mouse anti-GRK3 (Santa Cruz, 1:5 000), Rat anti-Gpr161b (Absea, 1:2 000), mouse anti-Tubulin (Sigma, 1:2 000), Rabbit anti-VP16 (Roche, 1:10 000), Rat anti-HA (Abcam, 1:10 000), HRP conjugated donkey anti-mouse IgG (Invitrogen, 1:20 000), HRP conjugat-

ed donkey anti-Rabbit IgG (Invitrogen, 1:20 000) 和 HRP conjugated goat anti-Rat IgG (Invitrogen, 1:20 000)。Western blot 显色使用超敏 ECL 化学发光液 (Thermo Fisher), 用 GE Amersham Imager 600 记录检测结果。

1.8 分裂泛素化酵母双杂交 (Mating Based Split-ubiquitin Assay, mbSUS)

酵母双杂交菌株 THY.AP4 和 THY.AP5 酵母由山西大学生命科学学院张霖课题组提供。酵母双杂交实验按照文献方案进行^[30]。简单步骤如下: 将 THY.AP4 和 THY.AP5 酵母在 YPD 培养基中活化, 随后采用 PEG/LiAc 化学转化法分别将预先构建的诱饵蛋白 (Bait) 和靶蛋白载体 (Prey) 导入 THY.AP4 和 THY.AP5 酵母细胞。转化后的菌液分别涂布于选择培养基上 (CSM_{-LM} 和 CSM_{-TUM}), 28 °C 培养 48 h~72 h 筛选获得阳性转化子。待单菌落形成后, 通过报告基因检测验证诱饵蛋白和靶蛋白的自激活活性。排除自激活效应的转化子后, 各挑取约 10 个阳性克隆扩大培养至对数期, 随后进行杂交实验。将诱饵菌株和靶蛋白菌株混合后, 点斑于 CSM_{-LTUM} 和 CSM_{-LTUMAH} 营养缺陷型固体培养基上, 28 °C 暗培养 2 d~3 d, 记录观察结果。

1.9 斑马鱼突变体的构建及鉴定

斑马鱼 *gpr161* 突变体构建采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术。靶点的筛选使用 Chop-Chop 在线服务器分析设计。分别针对两个基因的第二个外显子设计并合成^[31]。通过显微注射方法在斑马鱼胚胎一细胞期共注射 1 μg gRNA 和 5 pmol Cas9 蛋白 (NEB), 利用基因特异性引物结合 Sanger 测序 (Sangon Biotech), 筛选并鉴定稳定的突变体品系, 本实验所使用的引物参见表 1。母源合子突变体 *grk2* (MZ*grk2*) 构建与鉴定的详细步骤参见文献^[21]。

2 结果

2.1 斑马鱼 Gpr161 在 Hh 通路中发挥负向调控作用

课题组前期针对斑马鱼的 *gpr161* 基因研究发现斑马鱼基因组中存在两个 *gpr161* 同源基因, 其中位于 9 号染色体的 *gpr161* 因其遗传座

位与小鼠和人 GRR161 基因遗传座位具有高度相似性, 被初步认定为斑马鱼 *gpr161* 直系同源基因。位于 6 号染色体的基因 *si: ch211-237c6.4* 则是通过蛋白同源序列比对鉴定并克隆。基于两个基因的染色体定位, 最终将位于 6 号染色体上的 *gpr161* 命名为 *gpr161a*, 而位于 9 号染色体的 *gpr161* 命名为 *gpr161b*。为进一步探究 GPR161 在脊椎动物早期发育及 Hh 信号通路中的调控功能, 我们利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术针对这两个基因进行了斑马鱼突变体的构建。突变设计的靶点均位于两个基因的二号外显子 (图 1(a))。经显微注射和后续的筛选, 我们分别获得了 2 个 *gpr161a* 和 2 个 *gpr161b* 稳定遗传突变体, 对其分别命名为 *gpr161a^{sxm01}*、*gpr161a^{sxm02}*、*gpr161b^{sxm03}* 和 *gpr161b^{sxm04}*, 以下简称 *sxm01*、*sxm02*、*sxm03* 和 *sxm04*。上述所有突变体均造成基因的移码突变, 导致编码区的移码, 造成蛋白翻译的提前终止, 但每个突变体的特征不尽相同, 具体如下: *sxm01* 在第二个外显子上存在 1 个碱基缺失合并 2 个碱基插入, 导致第 109 个氨基酸后移码并延伸 9 个氨基酸后终止; *sxm02* 在第二个外显子上存在 4 个碱基的缺失, 导致第 110 个氨基酸移码并延伸 40 个氨基酸后终止; *sxm03* 在第二个外显子上存在 26 个碱基的缺失, 导致第 10 个氨基酸后翻译终止; *sxm04* 在第二个外显子上存在 9 个碱基缺失合并 1 个碱基的插入, 导致第 14 个氨基酸后翻译终止 (图 1(b))。上述 4 个品系的单基因突变体均未表现出显著的发育异常且后代可育。通过将上述突变体组合杂交及逐代筛选, 最终获得了 *sxm01* 和 *sxm03* 杂交后代 *gpr161a^{-/-}*; *gpr161b^{-/-}* 双纯合子突变体。扩大培养后经初步表型观察显示, 双纯合子突变体能够正常发育, 且未表现出明显的发育缺陷。

在斑马鱼中, Prox1a 和 Engrailed2a (En2a) 是 Hh 信号通路依赖的肌细胞分化的分子标记, 用于表征斑马鱼 Hh 通路活性。我们利用免疫荧光染色技术对 *gpr161a^{-/-}*; *gpr161b^{-/-}* 双纯合子突变体的 Prox1a 和 En2a 表达水平进行了分析 (图 1(c)), 结果显示, 与野生型相比, 双纯合子突变体中 Prox1a 和 En2a 阳性细胞的数量均略有增多 (图 1(d) 和 (e)), 表明突变体中 Hh 信号

通路的活性出现了轻微的上调,提示 GPR161 在 Hh 信号通路中发挥保守的负调控作用。

2.2 GPR161 纤毛转位受 GRK2 的调控

GPR161 参与 Hh 通路活性调控的一个典型

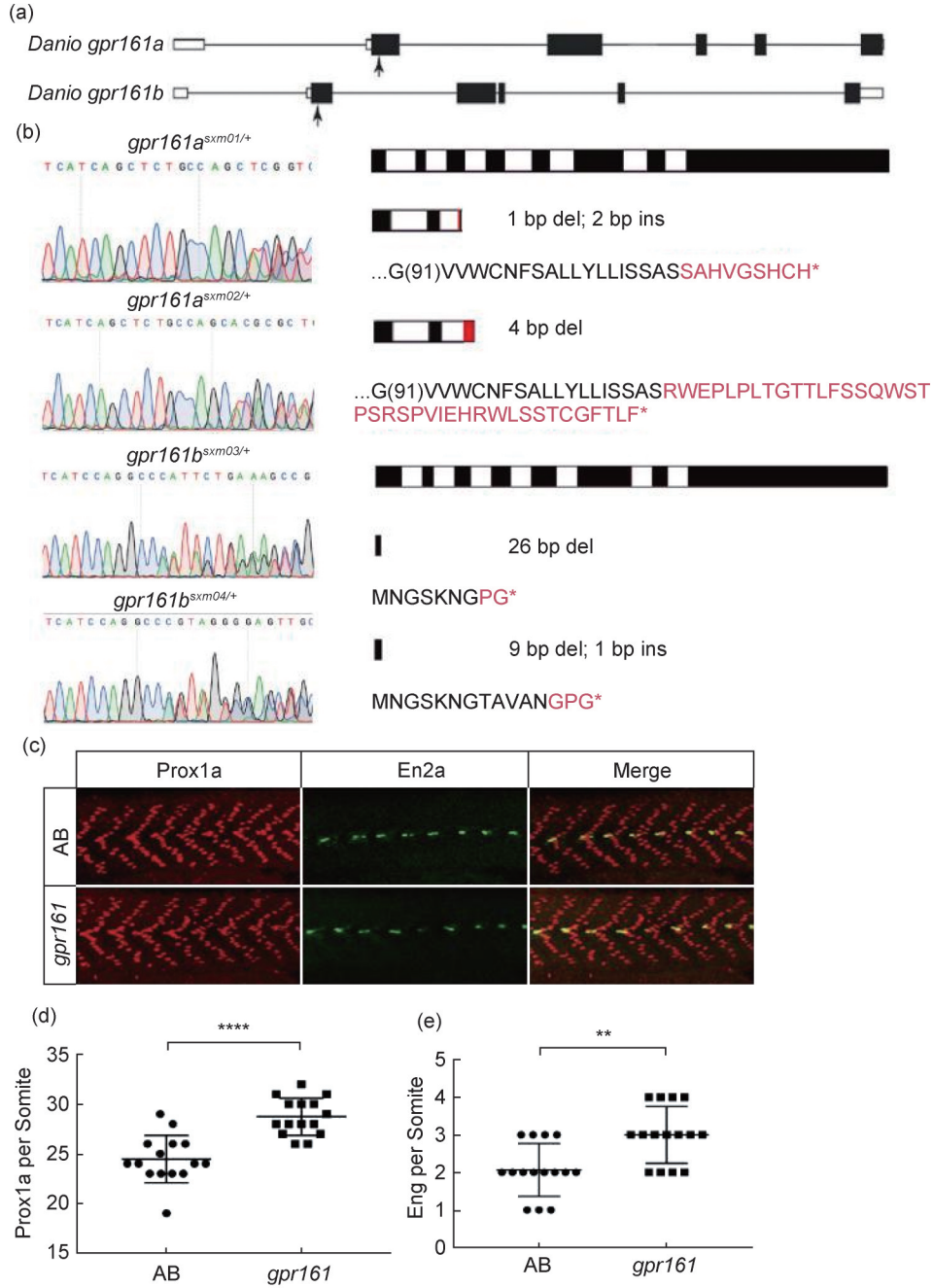


图1 斑马鱼 *gpr161* 突变体的构建与其 Hh 通路活性的初步分析

(a) 斑马鱼 *gpr161a* 基因和 *gpr161b* 基因突变靶位点示意图。(b) 测序验证 *gpr161a*^{-/-} 和 *gpr161b*^{-/-} 斑马鱼品系示意图。(c) 免疫荧光染色检测 *gpr161a*^{-/-}; *gpr161b*^{-/-} 双纯合子品系中 Prox1a(红色荧光)和 En2a(绿色荧光)的表达。(d) — (e) *gpr161* 突变体中单个体节中 Prox1a⁺ 和 En2a⁺ 细胞数量的统计分析。 *n* = 15 (3 个胚胎中的 5 个体节), “****”表示 *P*<0.001, “**”表示 *P*<0.01。

Fig. 1 Construction of zebrafish mutants of *gpr161/a/b* double-null allele and analysis of the Hh pathway activity

(a) Schematic diagram of the target sites of the zebrafish *gpr161a* and *gpr161b* gene. (b) Sequencing results of the heterozygous *gpr161* mutants and the schematic diagram of truncation of the Gpr161 proteins in *gpr161* mutants. (c) The expression of Prox1a (in red) and En2a (in green) analyses by immunofluorescence staining in the *gpr161a*^{-/-}; *gpr161b*^{-/-} double-null allele mutant.

(d)-(e) Quantification of Prox1a⁺ and En2a⁺ cells in *gpr161* mutant. *n* = 15 (5 somites in 3 embryos),

**** indicates significant with *P*<0.001, ** indicates significant with *P*<0.01.)

细胞学特征是其纤毛中定位,且其纤毛定位模式与Hh通路活性密切相关。为解析斑马鱼两个Gpr161蛋白的亚细胞分布特征,我们首先通过同源重组方法分别构建了 $pCS2+-gpr161a-eGFP$ 和 $pCS2+-gpr161b-eGFP$ 过表达载体并通过体外转录获得相应mRNA,利用显微注射在胚胎早期过表达Gpr161a/b-eGFP融合蛋白,观察其亚细胞定位。结果显示,Gpr161a/b-eGFP融合蛋白可以在胚胎中有效表达。斑马鱼耳囊原基(Otic Vessicle)中的纤毛丰富,易于观察,且其发育依赖于Hh通路,是研究蛋白在PC亚细胞定位的良好材料,因此我们主要选取该位置对上述蛋白亚细胞定位进行检测。免疫荧光结果显示,与哺乳动物的GPR161同源蛋白一致,斑马鱼Gpr161a和Gpr161b均可以定位在细胞的PC中(图2(a)和图2(d))。但是,除了纤毛轴中有融合蛋白信号外,在纤毛基部附近的细胞质中也可以观察到显著的散在绿色荧光信号,表明Gpr161-eGFP融合蛋白具有两种典型的亚细胞定位,即PC定位和PC附近的细胞质定位,提示Gpr161在细胞中可能存在PC-胞质的动态穿梭行为。此外,观察发现并不是所有的纤毛中都呈现有Gpr161蛋白的富集,我们认为这一现象可能与细胞的Hh通路活性的状态有关。为了进一步探究Gpr161的亚细胞定位与Hh通路活性的关系,我们在斑马鱼 $gli2$ 截断型突变体 yot 中过表达Gpr161a/b的同时,共注射 shh mRNA上调胚胎中Hh通路的活性。斑马鱼 yot 突变体是Hh通路完全抑制型突变体,其主要原因是Gli2a转录因子全部只能以Gli2a-R抑制子的形式发挥作用,但其Hh通路上游激活的过程并不受影响。因此,在 yot 中过表达Shh的研究设计一方面可以观察上调Hh通路活性对Gpr161亚细胞分布的影响,另一方面可以排除Gli及其下游通路对Gpr161定位的间接影响。结果显示,在 yot 突变体中过表达Shh导致Gpr161a/b-eGFP融合蛋白驻留的PC比例出现一定程度的降低,表明斑马鱼Gpr161在Hh通路活性上调时会被移出PC(图2(b)和图2(e))。但有趣的是,当Hh通路上调时,并非全部的Gpr161蛋白都被外排,部分纤毛中仍保留融合蛋白信

号,提示存在通路活性梯度响应或受其他信号分子的调控。

课题组前期通过构建斑马鱼 $grk2$ 缺失突变体证实了Grk2是Hh通路的关键正调控因子。但是,不同于其他研究提出的Grk2主要功能是磷酸化修饰Smo而使其激活的观点,我们发现Smo蛋白上Grk2磷酸化位点的突变体并不能挽救 $grk2$ 缺失的表型,因此,我们认为GRK2调控Hh通路可能并不是通过SMO来实现的^[21]。而在小鼠中的研究显示GPR161是Hh通路的负调控因子,GRK2和GPR161均在SMO下游发挥作用,所以我们假设GRK2通过经典GPCR信号通路脱敏的方式,修饰GPR161来调控Hh信号通路。为了验证该假设,我们首先检测了Gpr161蛋白在斑马鱼 $grk2$ 突变体中的亚细胞定位情况。在 $grk2$ 突变体中过表达Gpr161a/b-eGFP时,不同于野生型胚胎和上调Hh通路胚胎中的观察结果,我们发现几乎全部的PC均有Gpr161a/b-eGFP融合蛋白的信号,而之前在PC附近细胞质中的信号强度显著降低(图2(c)和图2(f))。这一结果表明在缺失Grk2蛋白时,Gpr161蛋白失去了其PC-胞质的动态穿梭特征,而仅驻留在初级纤毛中,提示Gpr161的外排可能依赖于Grk2,即Grk2对于Gpr161蛋白向PC外转运是必需的。这些结果有力地说明GRK2-GPR161可能协同调控Hh通路的信号传递。

2.3 Gpr161a与Grk2存在相互作用

阐明Grk2-Gpr161协同调控机制的关键在于探究二者是否存在直接相互作用关系。为了回答该问题,我们首先使用STRING软件分别预测了小鼠Gpr161蛋白和斑马鱼Gpr161蛋白互作蛋白网络。已有研究结果证实Gpr161能作为PKA的底物^[32-33],互作网络预测结果进一步支持了这一发现,显示Gpr161蛋白可以与PKA有相互作用。此外,预测结果表明Gpr161与小鼠GRK2/3同源蛋白ADRBK1存在相互作用(图3(a));类似地,斑马鱼Gpr161a和Gpr161b均预测到能与PKA发生相互作用,以及和斑马鱼Grk2/3同源蛋白Adrbk2的相互作用。值得注意的是,斑马鱼Gpr161蛋白的预测互作蛋白中有较为重要的一簇是Hh通路相关

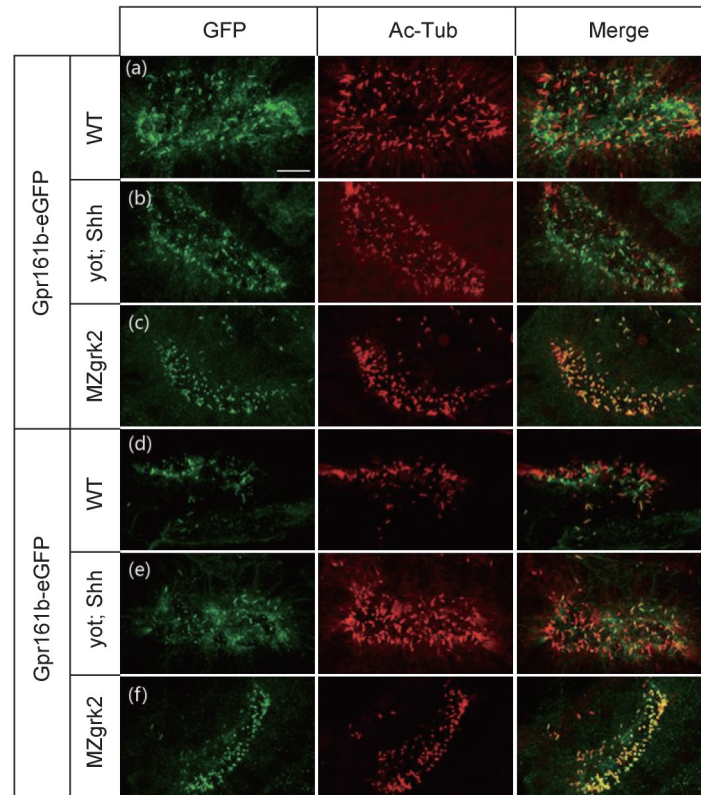


图2 Gpr161a和Gpr161b的亚细胞定位分析

((a)和(d)瞬时表达Gpr161a/b-eGFP融合蛋白(绿色)在野生型斑马鱼胚胎耳囊中的亚细胞定位。(b)和(e)斑马鱼*yot*突变体中瞬时表达Gpr161a/b-eGFP融合蛋白(绿色)在*shh*配体激活状态下的亚细胞定位。(c)和(f)瞬时表达Gpr161a/b-eGFP融合蛋白(绿色)在*MZgrk2*斑马鱼胚胎耳囊中的亚细胞定位。Ac-Tub用于标记初级纤毛(红色),比例尺为5 μm 。)

Fig. 2 Subcellular localization analysis of Gpr161a and Gpr161b

((a), (d) Subcellular localization of transiently expressed Gpr161a/b-eGFP fusion proteins (green) in the otic vesicle of wild-type zebrafish embryos. (b), (e) Subcellular localization of transiently expressed Gpr161a/b-eGFP fusion proteins (green) in the otic vesicle of *yot* mutant embryos injected with *shh* mRNA. (c), (f) Subcellular localization of transiently expressed Gpr161a/b-eGFP fusion proteins (green) in the otic vesicle of zebrafish embryos of the maternal zygotic mutant *MZgrk2*. Ac-Tub was used to label the PC (red), scale bar, 5 μm .)

蛋白,如效应蛋白Gli、通路的受体Ptch等。

蛋白质的结构特征与其互作网络密切相关。为进一步解析Gpr161的结构特征,我们利用AlphaFold2软件分别对人类GPR161、小鼠Gpr161、斑马鱼Gpr161a和Gpr161b蛋白结构进行了预测分析(图3(b))。结果显示,这四个Gpr161结构上均包含N端、C端和七个跨膜域。然而,斑马鱼Gpr161a的N端的 α 螺旋结构与人类GPR161和小鼠Gpr161更为相似;相较而言,斑马鱼Gpr161b的N端 α 螺旋偏短,且有一个不明确的卷曲结构。在细胞内结构域方面,人类和小鼠的第三个胞内环及C端结构在大小和构象上高度相似;相比之下,斑马鱼Gpr161a和Gpr161b的第三个胞内环与C端更加接近,且与

哺乳动物GPR161存在较大差异,但值得注意的是,Gpr161a的C端 α 螺旋与哺乳动物GPR161的C端第一个 α 螺旋在长度上更加接近,提示Gpr161a在结构上更加同源于哺乳动物的Gpr161。

为验证STRING数据库预测的蛋白互作关系,我们采用免疫共沉淀(Co-IP)的方法检测了Grk2和Gpr161的直接相互作用。首先我们在HEK293T细胞中验证了Gpr161与PKA的相互作用关系。通过共转染瞬时表达载体

CS2+*-pka-eGFP*和

CS2+*-gpr161a/b-Flag*载体,收集细胞并用FLAG磁珠进行免疫沉淀。结果显示,尽管在总蛋白样本中未能检测到Gpr161a/b-Flag融合蛋白的表达,但经FLAG磁

珠富集后,Gpr161a/b-Flag条带清晰可见,表明Gpr161a/b-Flag融合蛋白在转染细胞中正常表达。进一步分析证实,Gpr161a/b均与PKA全长蛋白具有特异性相互作用(图3(c)),这一结果支持Gpr161可能通过PKA发挥其调控Hh通路的功能。进而,我们通过HEK293T细胞中共转染了 $pCS2+grk2-eGFP$ 和 $pCS2+gpr161a/b-Flag$ 载体,并进行FLAG磁珠免疫沉淀实验。结果显示,Grk2-eGFP能够与Gpr161a-Flag特异性结合(图3(d)),但未检测到Gpr161b-Flag与Grk2的相互作用信号(图3(e)),提示Gpr161a可能是Grk2调控Hh通路的主要作用蛋白。

为了进一步验证Grk2、PKA和Gpr161之间的相互作用,我们采用了分裂泛素化膜酵母双杂交系统,该方法特别适用于检测有膜蛋白参与的蛋白互作关系。通过同源重组方法分别构建了Bait和Prey载体,首先检测了Gpr161a/b和Grk2全长的互作关系,与生化检测结果一致的是我们未检测到Gpr161b与Grk2存在互作关系。值得注意的是,Gpr161a与PKA的相互作用也未能在该系统中检测到。对于Gpr161a,结果显示其作为Bait本身会导致明显的自激活效应,但在分别加入Grk2和PKA后,尽管未观察到阳性克隆的生长,Gpr161a的自激活效应却被显著抑制(图3(g))。这一结果提示,Gpr161a可能与Grk2和PKA均存在相互作用,且其相互作用可能会影响酵母的生长。已有研究表明,Grk2主要通过其G蛋白信号转导调节分子(Regulator of G protein Signaling, RGS)结构域与GPCR的C端结构域结合^[34]。为避免上述自激活效应以及过表达上述基因对酵母生长的干扰,我们进一步构建了以Gpr161a/b的C末端结构域为Bait的载体进行检测。与生化结果一致,Gpr161a而非Gpr161b的C端与Grk2具有直接相互作用。此外,Gpr161a和Gpr161b的C端与PKA调节亚基均表现出相互作用活性(图3(h))。为了验证Grk2与Gpr161的相互作用是否通过经典的RGS结构域介导,我们利用膜体系酵母双杂交系统将Grk2的RGS结构域固定在细胞膜上,进一步检测其与蛋白Gpr161a/b的C末端的相互作用。与上述结果一致,Grk2的

RGS结构域与Gpr161a的C末端存在相互作用,而与Gpr161b的C末端无结合活性。当交换Bait和Prey后,实验结果保持一致(图3(i)和图3(j))。

3 讨论

GPCR是细胞内外信号转导的关键受体超家族,人类基因组中编码约800多个GPCR成员,广泛参与多种细胞信号的转导。GPCR的调控机制高度精细,其中GRK通过磷酸化修饰GPCR细胞内C末端,进而招募 β -arrestin,介导活化的GPCR被内吞脱敏^[35-36]。GRK家族包含5种类型,其中GRK2/3是Hh通路的正向调控因子,但其具体的作用机制尚不明确。GPR161是一个受体未知的孤儿GPCR,研究显示其是脊椎动物Hh通路的负调控因子,位于Hh通路关键蛋白SMO下游,通过调控细胞内的cAMP水平和PKA的活性参与Hh通路的调控^[13-14]。在本研究中,我们发现Gpr161存在初级纤毛-胞质的动态穿梭行为且这一转运过程受到Hh活性调控。特别是当缺失Grk2蛋白时,Gpr161-eGFP融合蛋白几乎全部驻留在PC轴突中,表明Gpr161向PC外转运依赖于Grk2,提示Gpr161可能为Grk2的底物。进一步地,通过蛋白互作网络预测和蛋白质互作研究,证实了Grk2和Gpr161之间存在直接相互作用。结合 $gpr161$ 双纯合子突变体中Prox1a和En2a阳性细胞数量略有增加的结果,表明Gpr161的缺失会导致Hh靶基因表达呈现低水平而非最高水平的组成性激活。上述结果均为深入探究GRK2-GPR161协同调控Hh通路信号转导提供了新的科学证据,同时为进一步研究Hh信号通路的精细调控网络奠定了重要基础。

GPR161在脊椎动物胚胎发育过程中发挥关键作用,包括左右轴向模式化、肢芽形成和神经祖细胞域的分化^[13,37],这些功能主要依赖于其对Hh信号通路的负调控作用。在Hh信号缺失时,GPR161通过TULP3和IFTA复合体转运至纤毛膜^[38],并在无配体结合下通过Gas偶联信号通路维持持续活化状态。Gas刺激cAMP生成激活PKA催化亚基(PKA-C),进而通过PKA-C介导的磷酸化、泛素化和有限蛋白

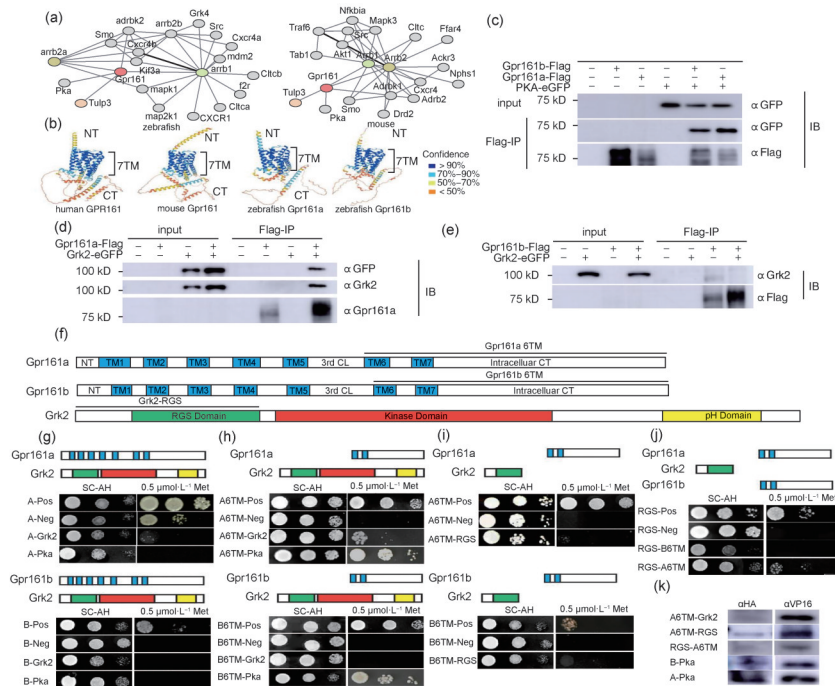


图3 Gpr161和Grk2蛋白质相互作用的检测

((a) 使用 STRING 软件分析斑马鱼和小鼠 Gpr161 蛋白互作网络。左侧为斑马鱼 Gpr161 蛋白互作网络预测,右侧为小鼠 Gpr161 蛋白互作网络预测。连线提示直接相互作用,黑色粗线表示蛋白质有强的相互作用,细线表示蛋白质有弱相互作用。(b) 利用 AlphaFold2 软件对人类 GPR161、小鼠 GPR161、斑马鱼 Gpr161a 和 Gpr161b 蛋白高级结构的预测,不同颜色显示结构的 pLDDT 可信度。(c)–(e) 在 HEK293T 细胞系中通过 CoIP 检测 Grk2 和 Gpr161 的相互作用关系。c, PKA 的调节亚基分别与 Gpr161a 和 Gpr161b 存在直接相互作用;d, Gpr161a 与 Grk2 存在直接相互作用;e, Gpr161b 与 Grk2 未检测到直接相互作用。“+”表示细胞中转染了对应载体,“-”表示细胞中未加对应载体;input 表示总蛋白提取样品,Flag-IP 为经 Flag 抗体磁珠 IP 后的样品;IB 表示做 Western Blot 所用到的检测抗体。(f) Gpr161a, Gpr161b 和 Grk2 蛋白的功能结构域示意图。(g)–(j) 利用分裂泛素化酵母双杂交系统检测 Grk2 和 Gpr161 的相互作用关系。g, 以 PKA 为正对照未检测到 Gpr161b 与 Grk2 具有相互作用,而 Gpr161a 与 Grk2 存在相互作用;h, 以 PKA 为正对照未检测到 Gpr161b 的 C 末端与 Grk2 具有相互作用,而 Gpr161a 的 C 末端与 Grk2 存在相互作用;i-j, Grk2 RGS 结构域与 Gpr161 C 末端的相互作用检测及其反向验证。Pos 为阳性对照, Neg 为阴性对照, SC-AH 为 CSM-LTUM 培养基, $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Met 为含有 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Met 的 CSM_{LTUMAH} 筛选培养基,每个样品进行 3 个重复,梯度稀释酵母悬液分别为 10 倍和 100 倍。(k) 存在相互作用的蛋白在对应的酵母中均正常表达。)

Fig. 3 Detection of Gpr161 and Grk2 protein interactions

((a) Zebrafish and mouse Gpr161 protein interaction networks were analyzed using STRING software. The left is the predicted Gpr161 protein interaction network in zebrafish, and the right is the predicted mouse Gpr161 protein interaction network. The connecting lines indicate direct interactions, black thick lines indicate proteins with strong interactions, thin lines indicate proteins with weak interactions. (b) Prediction of high-level structures of human GPR161, mouse GPR161, zebrafish Gpr161a and Gpr161b proteins using AlphaFold2 software, with pLDDT confidence of the structures shown in different colors. (c)–(e) Interaction between Grk2 and Gpr161 was detected by CoIP in HEK293T cell line. c, Regulatory subunit of PKA has direct interaction with Gpr161a and Gpr161b. d, Gpr161a has direct interaction with Grk2. e, no direct interaction between Gpr161b and Grk2 was detected. "+" indicates that the vector expressing the relevant fusion protein was transfected in the cell, "-" indicates that the expression vector of the relevant fusion protein was not transfected in the cell; input indicates the total protein extraction sample before IP, and Flag-IP is the magnetic bead with Flag antibody. Samples after IP; IB indicates the detection antibody used for western blot. (f) Schematic diagram of the functional domains of Gpr161a, Gpr161b and Grk2 proteins. (g)–(j) Detection of the interaction between Grk2 and Gpr161 in the split-ubiquitinated yeast two-hybrid system. g, Gpr161a, but not Gpr161b, was detected to interact with Grk2 using PKA as a positive control. h, The C-terminus of Gpr161a interacted with Grk2 using PKA as a positive control. i-j, Detection of Grk2 RGS domain interaction with Gpr161a C-terminus and its reverse validation. 'Pos' is positive control, 'Neg' is negative control; SC-AH is CSM-LTUM medium, $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Met is CSM_{LTUMAH} screening medium containing $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Met, three replicates for each test sample, and the dilution gradient is yeast suspension solution, diluted 10-fold and 100-fold. (k) The interacting proteins were expressed normally in the corresponding yeast.)

水解作用将GLI3转化为其抑制形式GLI3R。Hh通路激活后,GPR161水平在纤毛中显著降低,研究表明其通过 β -arrestin介导的内吞作用从初级纤毛中移除,从而阻断与纤毛下游效应分子相互作用,最终导致信号减弱^[13,39]。尽管在GRK2敲除的HEK293细胞系中,GPR161的潜在磷酸化位点突变体(GPR161^{S376/T>A-401})与 β -arrestin2的相互作用显著降低,但尚未获得GPR161作为GRK2底物的直接证据。鉴于斑马鱼*grk2*敲除导致胚胎致死的现象,本研究通过细胞移植技术构建了母源合子突变体*grk2*,发现Gpr161a/b在MZ*grk2*中仅滞留在初级纤毛内,表明Gpr161蛋白向初级纤毛外转运依赖于Grk2的功能。此外,蛋白质互作网络预测显示,小鼠Gpr161及斑马鱼Gpr161a/b均预测到与Grk2同源蛋白及 β -arrestin的相互作用。然而,与预期不符的是,在验证Gpr161和Grk2之间互作关系时,无论是生化的方法还是基于分裂泛素酵母双杂交系统,均只检测到Gpr161a与Grk2具有互作关系,并没有检测到Gpr161b与Grk2的结合。这一结果虽未排除Gpr161b与Grk2的潜在互作,但表明在当前的检测体系下,Gpr161a与Grk2的相互作用更为显著。已有研究指出,GPCR与GRK2相互作用不仅依赖于其胞内的C末端,对其功能最为重要的第三个胞内环也会参与其中,且其中的(V/I)KARK基序对于GPR161的纤毛定位至关重要^[13,40]。因此,进一步检测Gpr161a和Gpr161b的第三个胞内环和C末端在内的结构域与Grk2的相互作用,或采用更为灵敏的分子互作检测技术将有助于更全面地揭示两者之间的相互作用关系。此外,GRK2对GPCR的调控主要通过对其C末端的磷酸化实现,因此,鉴定GPR161第三个胞内环和C末端的GRK2磷酸化位点,对于阐明GRK2对GPR161功能的调控机制具有重要意义。

尽管早期研究表明,从染色体同源区域位置分析,*gpr161b*可能在进化关系上与哺乳动物的*gpr161*更为接近^[41],但通过蛋白质结构分析发现,Gpr161a在结构上更类似于小鼠和人类的GPR161,尤其是在N端胞外结构域上表现出更高的保守性。基于单突变体*gpr161a*^{-/-}和*gpr161b*^{-/-}均未表现出肌细胞分化的异常表型,

我们推测这两个基因在功能上可能存在冗余性。值得注意的是,尽管Gpr161的缺失会导致体节肌细胞中Hh信号靶基因表达区域的扩张,但其上调程度显著低于Philipp等人报道的*gpr161a*^{ml200}; *gpr161b*^{ml201}突变体,且也没有展示出显著的早期发育异常,如眼睛畸形和颌骨缺失^[14]。这一差异可能由以下原因导致:①虽然突变位点的设计均在基因的第二个外显子上,但导致基因组的缺失变化并不一致,进而造成蛋白翻译提前终止的位置不同,从而影响基因功能的评价;②CRISPR/Cas9技术可能引发背景基因的补偿效应,而两个突变品系通过杂交或自交等多步骤筛选可能导致其基因组背景更加复杂,进而影响表型的表现。因此,建立不同*gpr161a*; *gpr161b*双突变体品系以及特定潜在磷酸化位点突变品系对于阐释GRK2-GPR161协同调控Hh通路分子机制将提供新的科学线索。

4 结论

本研究应用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建斑马鱼*gpr161a*^{-/-}; *gpr161b*^{-/-}双纯合子突变体发现,Gpr161功能缺失后导致Hh靶基因表达呈现低水平而非最高水平的组成性激活,表明GPR161在脊椎动物中具有保守的Hh通路负调控功能。同时,免疫荧光分析揭示Gpr161a/b的纤毛定位受Hh通路活性动态调控且其从初级纤毛外排过程严格依赖于Grk2激酶活性;进而,利用多种蛋白互作检测技术证实了Grk2与Gpr161a之间的直接相互作用关系,且Grk2通过其N端RGS结构域特异性识别Gpr161a的C末端,为Grk2通过经典GPCR调控模式磷酸化Gpr161的假设提供了直接证据。总之,本研究首次在脊椎动物中建立了GRK2-GPR161协同调控Hh通路的工作模型,为深入理解GPCR-激酶调控发育信号转导的分子机制提供了重要理论基础。

参考文献:

- [1] INGHAM P W, PLACZEK M. Orchestrating Ontogenesis: Variations on a Theme by Sonic Hedgehog[J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(11): 841-850. DOI: 10.1038/nrg1969.
- [2] INGHAM P W, NAKANO Y, SEGER C. Mechanisms and

- Functions of Hedgehog Signalling across the Metazoa[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, **12**(6): 393–406. DOI: 10.1038/nrg2984.
- [3] INGHAM P, KALLAKURI S. Role of Hedgehog Signaling in Developmental Vascular Integrity[J]. *Mech Dev*, 2017, **145**: S53. DOI: 10.1016/j.mod.2017.04.101.
- [4] BRISCOE J, THÉRON P P. The Mechanisms of Hedgehog Signalling and Its Roles in Development and Disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, **14**(7): 416–429. DOI: 10.1038/nrm3598.
- [5] KHALIULLINA H, PANÁKOVÁ D, EUGSTER C, *et al.* Patched Regulates Smoothed Trafficking Using Lipoprotein-derived Lipids[J]. *Development*, 2009, **136**(24): 4111–4121. DOI: 10.1242/dev.041392.
- [6] ROHATGI R, MILENKOVIC L, SCOTT M P. Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium[J]. *Science*, 2007, **317**(5836): 372–376. DOI: 10.1126/science.1139740.
- [7] ZHAO Y, TONG C, JIANG J. Hedgehog Regulates Smoothed Activity by Inducing a Conformational Switch[J]. *Nature*, 2007, **450**(7167): 252–258. DOI: 10.1038/nature06225.
- [8] BANGS F, ANDERSON K V. Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, **9**(5): a028175. DOI: 10.1101/cshperspect.a028175.
- [9] SINGLA V, REITER J F. The Primary Cilium as the Cell's Antenna: Signaling at a Sensory Organelle[J]. *Science*, 2006, **313**(5787): 629–633. DOI: 10.1126/science.1124534.
- [10] ANVARIAN Z, MYKYTYN K, MUKHOPADHYAY S, *et al.* Cellular Signalling by Primary Cilia in Development, Organ Function and Disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, **15**(4): 199–219. DOI: 10.1038/s41581-019-0116-9.
- [11] KOPINKE D, NORRIS A M, MUKHOPADHYAY S. Developmental and Regenerative Paradigms of Cilia Regulated Hedgehog Signaling[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2021, **110**: 89–103. DOI: 10.1016/j.semcdb.2020.05.029.
- [12] HWANG S H, WHITE K A, SOMATILAKA B N, *et al.* The G Protein-coupled Receptor Gpr161 Regulates Forelimb Formation, Limb Patterning and Skeletal Morphogenesis in a Primary Cilium-dependent Manner[J]. *Development*, 2018, **145**(1): dev154054. DOI: 10.1242/dev.154054.
- [13] MUKHOPADHYAY S, WEN X H, RATTI N, *et al.* The Ciliary G-protein-coupled Receptor Gpr161 Negatively Regulates the Sonic Hedgehog Pathway via cAMP Signaling[J]. *Cell*, 2013, **152**(1/2): 210–223. DOI: 10.1016/j.cell.2012.12.026.
- [14] TSCHAIKNER P M, REGELE D, RÖCK R, *et al.* Feedback Control of the Gpr161-G_{as}-PKA Axis Contributes to Basal Hedgehog Repression in Zebrafish[J]. *Development*, 2021, **148**(4): dev192443. DOI: 10.1242/dev.192443.
- [15] KATOH Y, KATOH M. Integrative Genomic Analyses on GLI1: Positive Regulation of GLI1 by Hedgehog-GLI, TGFbeta-smads, and RTK-PI3K-AKT Signals, and Negative Regulation of GLI1 by Notch-CSL-HES/HEY, and GPCR-gs-PKA Signals[J]. *Int J Oncol*, 2009, **35**(1): 187–192. DOI: 10.3892/ijo_00000328.
- [16] HOPPE N, HARRISON S, HWANG S H, *et al.* GPR161 Structure Uncovers the Redundant Role of Sterol-regulated Ciliary cAMP Signaling in the Hedgehog Pathway[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2024, **31**(4): 667–677. DOI: 10.1038/s41594-024-01223-8.
- [17] ARENSDORF A M, MARADA S, OGDEN S K. Smoothed Regulation: a Tale of Two Signals[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2016, **37**(1): 62–72. DOI: 10.1016/j.tips.2015.09.001.
- [18] PHILIPP M, FRALISH G B, MELONI A R, *et al.* Smoothed Signaling in Vertebrates Is Facilitated by a G Protein-coupled Receptor Kinase[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, **19**(12): 5478–5489. DOI: 10.1091/mbc.e08-05-0448.
- [19] ARVESETH C D, HAPP J T, HEDEEN D S, *et al.* Smoothed Transduces Hedgehog Signals via Activity-dependent Sequestration of PKA Catalytic Subunits[J]. *PLoS Biol*, 2021, **19**(4): e3001191. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001191.
- [20] MAIER D, CHENG S F, HIPFNER D R. The Complexities of G-protein-coupled Receptor Kinase Function in Hedgehog Signaling[J]. *Fly*, 2012, **6**(3): 135–141. DOI: 10.4161/fly.20245.
- [21] ZHAO Z H, LEE R T H, PUSAPATI G V, *et al.* An Essential Role for Grk2 in Hedgehog Signaling Downstream of Smoothed[J]. *EMBO Rep*, 2016, **17**(5): 739–752. DOI: 10.15252/embr.201541532.
- [22] EVRON T, DAIGLE T L, CARON M G. GRK2: Multiple Roles beyond G Protein-coupled Receptor Desensitization[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2012, **33**(3): 154–164. DOI: 10.1016/j.tips.2011.12.003.
- [23] MELONI A R, FRALISH G B, KELLY P, *et al.* Smoothed Signal Transduction Is Promoted by G Protein-coupled Receptor Kinase 2[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, **26**(20): 7550–7560. DOI: 10.1128/MCB.00546-06.
- [24] OGDEN S K, CASSO D J, ASCANO M, *et al.* Smooth-

- ened Regulates Activator and Repressor Functions of Hedgehog Signaling via Two Distinct Mechanisms[J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**(11): 7237–7243. DOI: 10.1074/jbc.M510169200.
- [25] NUSSLEIN V, CHRISTIANE, RALF D, eds. Zebrafish [M]. Oxford: Oxford University Press, 2002.
- [26] WESTERFIELD M. The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. Eugene: Univ. of Oregon Press Eugene, 2000.
- [27] XU Q L. Microinjection into Zebrafish Embryos[M]// Molecular Methods in Developmental Biology. New Jersey: Humana Press, 2003: 125–132. DOI: 10.1385/1-59259-678-9:125.
- [28] ZHANG H Y, HUANG Z Y, LV L L, *et al.* A Transgenic Zebrafish for *in vivo* visualization of Cilia[J]. *Open Biol*, 2022, **12**(8): 220104. DOI: 10.1098/rsob.220104.
- [29] MAURYA A K, BEN J, ZHAO Z H, *et al.* Positive and Negative Regulation of Gli Activity by Kif7 in the Zebrafish Embryo[J]. *PLoS Genet*, 2013, **9**(12): e1003955. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003955.
- [30] HORARUANG W, ZHANG B. Mating Based Split-ubiquitin Assay for Detection of Protein Interactions[J]. *Bio Protoc*, 2017, **7**(9): e2258. DOI: 10.21769/BioProtoc.2258.
- [31] MONTAGUE T G, CRUZ J M, GAGNON J A, *et al.* CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN Web Tool for Genome Editing[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(Web Server issue): W401–W407. DOI: 10.1093/nar/gku410.
- [32] BACHMANN V A, MAYRHOFER J E, ILOUZ R, *et al.* Gpr161 Anchoring of PKA Consolidates GPCR and cAMP Signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(28): 7786–7791. DOI: 10.1073/pnas.1608061113.
- [33] TSCHAIKNER P, ENZLER F, TORRES-QUESADA O, *et al.* Hedgehog and Gpr161: Regulating cAMP Signaling in the Primary Cilium[J]. *Cells*, 2020, **9**(1): 118. DOI: 10.3390/cells9010118.
- [34] PITCHER J A, FREEDMAN N J, LEFKOWITZ R J. G Protein-coupled Receptor Kinases[J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 653–692. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.653.
- [35] ASHER W B, TERRY D S, GREGORIO G G A, *et al.* GPCR-mediated β -arrestin Activation Deconvoluted with Single-molecule Precision[J]. *Cell*, 2022, **185**(10): 1661–1675.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2022.03.042.
- [36] XIAO K H, SHENOY S K, NOBLES K, *et al.* Activation-dependent Conformational Changes in β -arrestin 2[J]. *J Biol Chem*, 2004, **279**(53): 55744–55753. DOI: 10.1074/jbc.M409785200.
- [37] HWANG S H, MUKHOPADHYAY S. G-protein-coupled Receptors and Localized Signaling in the Primary Cilium during Ventral Neural Tube Patterning[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2015, **103**(1): 12–19. DOI: 10.1002/bdra.23267.
- [38] MUKHOPADHYAY S, WEN X H, CHIH B, *et al.* TULP3 Bridges the IFT-a Complex and Membrane Phosphoinositides to Promote Trafficking of G Protein-coupled Receptors into Primary Cilia[J]. *Genes Dev*, 2010, **24**(19): 2180–2193. DOI: 10.1101/gad.1966210.
- [39] PAL K, HWANG S H, SOMATILAKA B, *et al.* Smoothed Determines β -arrestin-mediated Removal of the G Protein-coupled Receptor Gpr161 from the Primary Cilium[J]. *J Cell Biol*, 2016, **212**(7): 861–875. DOI: 10.1083/jcb.201506132.
- [40] BERBARI N F, JOHNSON A D, LEWIS J S, *et al.* Identification of Ciliary Localization Sequences within the Third Intracellular Loop of G Protein-coupled Receptors[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, **19**(4): 1540–1547. DOI: 10.1091/mbc.e07-09-0942.
- [41] WANG M, LI P, WANG H, *et al.* Identification and Spatiotemporal Expression of Gpr161 Genes in Zebrafish[J]. *Gene*, 2020, **730**: 144303. DOI: 10.1016/j.gene.2019.144303.