

DOI: 10.13376/j.cblls/2015112

文章编号: 1004-0374(2015)07-0807-06

· 专题: 纪念杰出青年科学基金20周年 ·



李林, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所研究员, 中国科学院院士。1983年本科毕业于南京大学生物系, 1989年在中国科学院上海生物化学研究所研究生毕业获博士学位, 1990至1992年在美国纽约州立大学石溪分校生理与生物物理系做博士后。1992年5月至今, 在中国科学院上海生物化学研究所和上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所工作。现任中国科学院上海生命科学研究院院长、分子生物学国家重点实验室主任、生化与细胞所学术委员会主任、中国生物化学与分子生物学会理事长等职务。主要从事细胞信号转导的分子机制研究。

Wnt信号膜质转导的机制

贾莹莹, 李林*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要: Wnt 信号通路是一条高度保守的信号转导通路, 在生物体多个发育过程以及一系列疾病发生中发挥重要作用。Wnt 信号通路重要的生物学功能和复杂的信号转导调控网络引起了人们广泛和持续的研究兴趣。介绍了经典 Wnt 信号通路信号转导的分子框架, 结合自身实验室新的研究发现, 重点阐述 Wnt 信号由细胞膜上向细胞质内转导的机制。

关键词: Wnt 信号; 分子机制; 信号膜质传递

中图分类号: Q257 **文献标志码:** A

The mechanism of Wnt signal transferring from membrane to cytoplasm

JIA Ying-Ying, LI Lin*

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology,
Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: Wnt signaling pathway is a highly conserved signal transduction pathway, and plays important roles in multiple biological developmental processes and diseases. The biological function and complicated signal transduction network have aroused the widespread study interest. This review introduces the molecular framework of classical Wnt signaling pathway, combined with the findings from our own laboratory, focuses on the mechanism of Wnt signaling transferring from cell membrane to cytoplasm.

Key words: Wnt signal pathway; molecular mechanism; signal transferring from membrane to cytoplasm

Wnt 信号通路是一类在多细胞真核生物中高度保守的信号通路, 在多种生命活动中发挥重要功能。在动物体早期发育中, Wnt 信号决定了背腹轴的形成、胚层建立、体节分化、组织或器官形成等一系

收稿日期: 2015-01-05

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(39525005, 39928008); 国家自然科学基金重大项目(39990600); 国家自然科学基金重点项目(30930052, 31230044); 国家自然科学基金创新研究群体项目(30821065); 国家自然科学基金重大研究计划项目(90813024); 国家自然科学基金面上项目(30600305, 30900763, 31100532)

*通信作者: E-mail: lli@sibs.ac.cn

列重要事件,直接调节了细胞增殖、分化、迁移、极化、凋亡与抗凋亡等细胞的命运,Wnt信号紊乱会导致生物体出现不同程度上的发育缺陷表型;而成体组织中的Wnt信号紊乱则会引发多种疾病,其中包括肿瘤发生。

我们实验室从1997年开始,在国家杰出青年基金的资助下,开启了针对经典Wnt信号转导通路的研究。经过10多年的研究,揭示了Wnt信号转导的一些新机制,完善了Wnt信号转导的分子框架,为认识Wnt信号转导通路的调控机制提供了众多线索。本文将结合我们实验室的一些研究发现,重点阐述Wnt信号由细胞膜上向细胞质内转导的机制。

1 经典Wnt信号转导的分子框架

经典Wnt信号转导的大体分子框架如下:Wnt信号分子结合细胞膜上受体Frizzled以及共受体LRP5/6(low density lipoprotein receptor-related protein 5/6),激活下游的Dvl(dishevelled)等蛋白,将信号转导至细胞质内。细胞质中的 β -catenin是一个关键的信号转导中枢分子。细胞中 β -catenin主要定位于细胞膜,参与细胞黏附等过程,只有游离的 β -catenin

参与Wnt信号的转导。没有Wnt信号或者Wnt蛋白受到抑制因子如sFRP等抑制时,游离在细胞质中的 β -catenin在一个由脚手架蛋白Axin、肿瘤抑制子APC(adenomatous polyposis coli)、蛋白激酶CK1 α (casein kinase 1 α)、GSK3 β (glycogen synthase kinase 3)和泛素连接酶E3 β -TrCP等蛋白质分子组成的“降解复合物”的作用下,被磷酸化标记,进而被 β -TrCP泛素化修饰,最终经由蛋白酶体通路降解。Wnt信号存在时,“降解复合物”功能性失活, β -catenin得以在细胞质中积累并进入细胞核,结合下游的转录因子TCF/LEF1家族。TCF/LEF1转录因子家族本身没有转录活性,在没有Wnt信号情况下,TCF/LEF1转录因子可以结合转录抑制子Groucho等,抑制下游基因转录。Wnt激活促进 β -catenin积累入核, β -catenin带有转录激活能力,竞争结合TCF/LEF1后形成有转录活性的 β -catenin/TCF转录复合物,开放Wnt信号下游的靶基因,实现特定的生物学功能。具体过程参见图1。

2 Wnt信号从细胞外转导至细胞内的过程

Wnt信号从细胞膜向细胞质内的转导过程十分

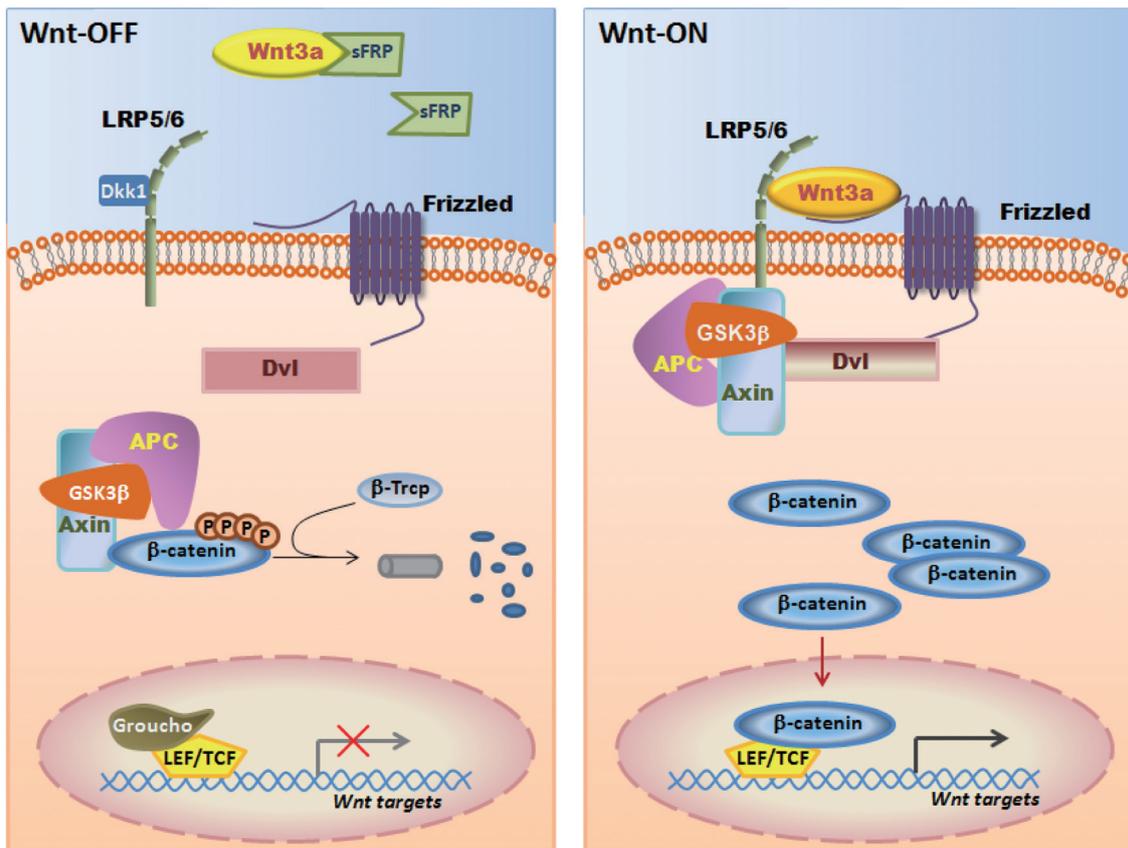


图1 经典Wnt信号转导通路的分子框架

复杂,除了受体 Frizzled 和 LRP5/6 外,还涉及到许多其他的分子,包括 Dvl、Axin、CK1、GSK3 等。人们在研究 Wnt 信号的膜质转导时先后发现了两个分支:一方面,Wnt 结合 Frizzled,通过 Frizzled 激活下游的 Dvl 蛋白来转导信号,形成了 Wnt-Frizzled-Dvl 支路;另一方面,共受体 LRP5/6 在 Wnt 信号激活时发生磷酸化修饰,募集细胞质中的 Axin 上膜,抑制 β -catenin 降解复合物的功能,形成了 Wnt-LRP5/6-Axin 支路。但随着人们研究的深入,这两条支路被证明并非各自独立,而是借由一系列依序进行的事件相互联系,共同形成巨大的“信号转导体”(signalosome),完成 Wnt 信号的膜质转导。我们实验室在 Wnt 信号膜质转导方面获得了一系列的发现,有助于人们对这一环节信号转导机制的认识。

2.1 Dvl 蛋白参与 Wnt 信号膜质转导的机制

Dvl 蛋白是经典与非经典 Wnt 信号转导过程中都不可缺少的重要成员。在经典 Wnt 信号通路中 Dvl 更是在信号上游和下游发挥着双重功能^[1-2]。一直以来,Dvl 被公认为一种多功能蛋白质,包括我们早期发现其介导 JNK 激活通路^[3]和近期发现其调控 NF κ B 转录活性^[4]。Dvl 含有 DIX、PDZ、DEP 3 个重要的保守结构域,通过这些结构域来发挥特定功能。在经典 Wnt 信号通路中,Dvl-Frizzled 的结合是 Wnt 信号膜质转导过程中的重要事件。关于 Dvl-Frizzled 结合的具体机制,最初认为 Dvl 的 PDZ 结构域是负责与 Frizzled 结合的主要位点,但体外实验又表明 PDZ 结构域与 Frizzled 的亲和力很弱^[5]。我们实验室在过表达系统中发现,3 个结构域中只有 DEP 结构域与全长 Dvl 有类似现象,可以和 Frizzled7 共定位于细胞膜^[6]。后面他人的发现也证实了结合 Frizzled 的位置更有可能是 Dvl 的 DEP 结构域及 C 端序列^[7]。

对于 Wnt-Frizzled 是怎样激活 Dvl 的,具体机制到现在为止尚不完全清楚,但是对于 Dvl 不同修饰发挥何种作用及修饰调控机制的揭示,可以了解这一过程提供更多线索。人们发现,Dvl 的磷酸化修饰是其发挥活性所必需。目前已发现 3 个激酶可以磷酸化修饰 Dvl,分别是 CK1 ϵ (casein kinase 1 ϵ)、CK2 (casein kinase 2) 和 PAR-1,它们都被发现能够作为正向调控因子参与经典 Wnt 信号通路^[8-11]。另外,近年来发现的一些 Wnt 负调控因子(TAZ、NRX、LKB1)也正是通过抑制 Dvl 的磷酸化水平来发挥其抑制经典 Wnt 信号的功能^[12-14]。这些说明,

Dvl 的磷酸化修饰在经典 Wnt 信号的转导过程中起着重要作用。需要指出的是,非经典 Wnt 信号也能够使 Dvl 发生高度磷酸化,但是却不会引起后续胞浆中 β -catenin 的稳定与积累,说明 Dvl 磷酸化这个单一事件并不足以激活经典 Wnt 信号通路,它还需要协同 Wnt 蛋白引发的其他事件共同作用才能够激活 Wnt 信号通路。除了磷酸化修饰,Dvl 的泛素化修饰对于其在经典 Wnt 信号中的活性也很重要。去泛素化酶 CYLD 能够特异去除 Dvl 分子 K63 连接的泛素化修饰,在不影响 Dvl 稳定性的同时抑制 Dvl 对经典 Wnt 信号通路的激活^[15]。另外,Dvl 发生泛素化修饰,已发现 4 个以 Dvl 蛋白作为底物的 E3 泛素连接酶,它们分别是:在早期胚胎发育过程调节 Wnt 信号的 KLHL12-Cullin-3^[16],在神经系统中特异性表达的 NEDL1^[17],在由饥饿引起的细胞自噬过程中参与调节经典 Wnt 信号的 pVHL^[18],以及在拉福拉疾病 (lafora disease) 患者中发生高度突变的 Malin^[19]。此外,我们实验室最近也发现了一个新的 Dvl 蛋白的 E3 泛素连接酶 ITCH,它的作用方式不同于以前发现的 E3 泛素连接酶,作用对象特异性针对磷酸化形式 Dvl 蛋白,从而实现了对经典 Wnt 信号通路的精确调控^[20]。在特定生理过程中,Dvl 的稳定性是一个可用来调控经典 Wnt 信号通路的重要靶点。

2.2 共受体 LRP5/6 的磷酸化修饰

在 Wnt 蛋白刺激诱导下,受体 LRP5/6 会发生磷酸化,这是经典 Wnt 信号上游激活的一个标志性事件。2001 年,我们实验室与耶鲁大学吴殿青实验室合作发现 Axin 与 LRP5 胞内段的结合是经典 Wnt 信号转导所必需的,从而建立了第一条 Wnt 信号膜质转导的链接^[21]。后来贺熹实验室与其他实验室又先后证明,Axin 是与磷酸化的 LRP5/6 结合来转导信号的^[22-23]。因此,LRP5/6 的磷酸化修饰在 Wnt 信号转导的上游就显得尤为重要。

经典 Wnt 信号所引起的 LRP5/6 磷酸化主要发生在 LRP5/6 胞内段的 5 个 PPSPXS (PPS/TXS/T) 重复基序上,每个基序中都有两个磷酸化位点 PPSPXS (位点 I 和位点 II),并且这些位点在不同物种间都是高度保守的。人们对这些基序在经典 Wnt 信号通路中的功能进行了研究,发现 PPSPXS 基序所介导的 LRP5/6 磷酸化对于 Wnt 信号转导至关重要,并提示位点 I 的磷酸化是信号转导所必需,位点 II 的磷酸化则起到进一步放大信号的作用^[22,24]。随后,人们认识到负责磷酸化这两个位点

的激酶并不相同。2005年,贺熹实验室提出了LRP5/6磷酸化的双激酶机制:GSK3和CK1分别负责磷酸化位点I和位点II。由于突变位点I,位点II的磷酸化也无法发生,所以GSK3对位点I的磷酸化被认为是位点II磷酸化的先决条件^[25]。后来人们又发现,还有其他激酶也参与对位点I的磷酸化,如GRK5/6(G protein-coupled receptor kinases 5 and 6)在体外能够直接磷酸化LRP6的PPSP基序,在细胞中敲低GRK5/6的蛋白质水平也会明显降低Wnt3a所引起的LRP6位点I的磷酸化水平^[26]。在细胞周期过程中,激酶PFTK及其激活因子Cyclin Y在G₂/M期的蛋白表达水平达到峰值,并同时磷酸化LRP6的位点I,使其磷酸化水平也达到峰值^[27]。另外,CK1家族的成员CK1 γ 和CK1 ϵ 还被发现能够磷酸化LRP6蛋白上除PPSPXS重复序列以外的位点:CK1 γ 通过促进LRP6蛋白上S/T富集区内的T1479位磷酸化,从而正调控经典Wnt信号通路^[23];CK1 ϵ 则可能通过磷酸化LRP6蛋白上的S1420和S1430位点,负调控经典Wnt信号通路^[28]。由此可见,LRP5/6的多位点磷酸化使经典Wnt信号通路的调控更为精细。

2.3 LRP5/6信号转导体

前文提到,Wnt信号膜质转导的两条支路Frizzled-Dvl以及LRP5/6-Axin并不是相互独立的,实际上在信号转导的多个层面,它们都紧密地联系在一起。首先,Wnt蛋白可以同时结合细胞膜表面的受体Frizzled和共受体LRP5/6,并促使它们之间发生相互作用,三者是通过形成相互依赖的受体复合物来转导信号的^[29]。再者,LRP5/6信号转导体这一概念被提出。Niehrs实验室利用实时活体显微技术,在HeLa细胞中观测了Wnt蛋白刺激前后膜附近各种Wnt信号成员的动态变化。他们发现,Wnt蛋白刺激后的很短时间在膜上就开始形成LRP6聚集体,聚集体中的LRP6已经被磷酸化,同时Frizzled、Dvl、Axin、GSK3等分子也都存在于这个聚集体中,共同组成了所谓的信号转导体^[30]。在后续的研究中,还发现了这两个分支之间越来越多的联系。Dvl被Wnt-Frizzled募集上膜后在DIX结构域的介导下会以头对尾的形式发生多聚^[31];同时,另一个也含有DIX结构域的蛋白质Axin通过结合Dvl的DIX结构域而被募集到细胞膜附近^[32]。Dvl聚集可以促进多个蛋白质发生聚集,一方面可以经由它与Frizzled的结合,带动Wnt信号的受体复合物发生聚集,LRP5/6也会随之聚集;另一方面,

通过我们早期发现的Dvl-Axin的相互作用^[33],带动Axin以及与Axin紧密结合的GSK3到膜上发生聚集^[30,34-35]。这样会在膜附近产生局部高浓度受体LRP5/6以及高浓度激酶GSK3的环境,为LRP5/6磷酸化的发生以及经典Wnt信号的高效率激活提供可能。而Dvl的聚集本身也受到调节,Ccd1蛋白的DIX结构域能够与Dvl的DIX结构域形成头对尾形式的异元聚集,从而使Dvl自身的同元聚集解聚,这样在聚集与解聚间达到平衡,将Dvl的聚集程度维持在适当的水平^[36]。

2.4 Wnt信号膜质转导机制的新发现

在研究信号转导体以及LRP5/6磷酸化的过程中,我们实验室的研究以及和其他实验室的合作工作,揭示了一系列参与这一过程的重要分子和作用机制。2008年,通过与吴殿青实验室合作研究发现,脂类分子PtdIns(4,5)P₂在Wnt信号诱导的LRP6磷酸化过程中发挥重要作用^[37]。结合进一步的机制研究发现,Wnt信号通过Frizzled和Dvl,首先激活了PIP5K β 和PIP4KII α ,然后,在这两个激酶的作用下,其产物PtdIns(4,5)P₂在膜附近大量产生,进一步诱导LRP6发生多聚以及磷酸化修饰,有利于Wnt信号转导^[37-38]。这一发现不仅第一次将脂类分子引入了经典Wnt信号转导的分子框架中,同时进一步将Wnt-Frizzled-Dvl与Wnt-LRP5/6-Axin两个分支联系起来,揭示了Dvl参与LRP5/6磷酸化过程新的分子机制。随后,Amer1(也称为WTX)被发现能够与PtdIns(4,5)P₂结合并被募集上膜,同时,借由Amer1与GSK3 β 、CK1 γ 、Axin的相互作用,将这些分子也带入信号转导体中,以帮助LRP6进行磷酸化^[39],提出了信号转导体中Dvl-PtdIns(4,5)P₂-Amer1-LRP5/6磷酸化的分子模型。此外,我们实验室和吴畏实验室还分别发现了另两个参与这个过程的分子——Caprin-2和跨膜蛋白TMEM198,它们都能够与LRP5/6受体直接结合并在信号转导过程中促进GSK3 β 、CK1等激酶对LRP5/6的磷酸化水平,并以此促进经典Wnt信号通路的激活^[40-41]。

前期我们发现Axin可以结合LRP5胞内段,这是经典Wnt信号转导所必需的,建立了第一条Wnt信号膜质转导的链接^[21]。近期我们实验室发现了Axin的一种新泛素化修饰,泛素化连接酶Smurf1能够对Axin进行K29位多聚泛素化修饰,这种修饰并不导致Axin蛋白的降解,而是影响了Axin和LRP5/6的相互作用,进而抑制经典Wnt信

号^[42]。接下来的工作进一步发现, Smurf1 对 Axin 的结合以及泛素化修饰发生在细胞膜附近, 并且 Smurf1 对 Axin 的泛素化修饰受到细胞周期的调控, 在细胞的 G₂/M 期, Smurf1 和 Axin 的结合降低, 这导致在该时期 Axin 的泛素化修饰受到抑制, Axin 和 LRP6 的结合升高, 从而有利于 LRP6 磷酸化水平在 G₂/M 期达到峰值, 进而使得细胞在该时期能更好地响应 Wnt 信号^[43]。

Axin 和 LRP6 的结合对于 Wnt 信号转导非常重要, 但是 Axin 在这一环节中的具体作用机制尚不清楚。我们近期发现了一个可以正向促进 Wnt 信号转导的小分子 HLY78, 而且重要的是, HLY78 结合的蛋白靶点正是 Axin 蛋白。进一步的机制研究发现, Axin 自身的 N 端和 C 端可以结合, 这种结合阻碍了 Axin 结合 LRP6, 我们称之为 Axin 的自抑制。小分子 HLY78 能够结合在 Axin 的 C 端, 解除这种自抑制, 增加 Axin 与 LRP6 结合, 促进 LRP6 的磷酸化, 最终导致 Wnt 信号通路的进一步激活。另外, 我们发现 HLY78 也能够协同 Wnt 信号通路促进斑马鱼造血干细胞标记基因的表达^[44]。在细胞内寻找何种分子可以发挥 HLY78 的作用, 也是一个有意思的问题。我们最新的工作利用荧光共振转移系统, 不仅进一步验证了 HLY78 能够改变 Axin 的构象, 打开 C 端和 N 端, 解除 Axin 的自抑制, 而且还发现一个非常有意思的现象, 即 PtdIns(4,5)P₂ 同样可以影响 Axin 的构象(未发表)。这个发现提示了 PtdIns(4,5)P₂ 潜在的调控 LRP5/6 活化, 促进 Wnt 信号的新机制。

在上述这些发现的基础上, 我们提出一个经典 Wnt 信号由胞外转导到胞内的简单模式图(图 2): 在信号起始初期, Wnt 蛋白同时结合受体 Frizzled 和 LRP5/6, Dvl 蛋白被首先激活并通过 Frizzled

上膜。随后, Dvl 通过激活蛋白激酶 PIP5K β 和 PIP4KII α , 产生 PtdIns(4,5)P₂, 促进 Axin 构象打开并结合 LRP5/6, 进而促进 LRP5/6 磷酸化修饰。磷酸化的 LRP5/6 进而募集更多胞浆中的 Axin 上膜, 形成巨大的多分子之间相互作用的信号转导体, 从而稳定胞浆中的中心分子 β -catenin, 将 Wnt 信号转导下去。

3 结束语

对 Wnt 信号通路的研究至今已经有 30 多年了, 但仍然遗留很多问题有待回答。就本文介绍的经典 Wnt 信号通路而言, 尽管基本的信号转导分子框架已经成型, 但其中一些重要的问题仍然悬而未决, 如对于这条信号通路, β -catenin 入核及其调控的机制是一个显而易见且非常重要的问题, 但到目前为止, 对此尚无清楚认识。这也是我们实验室正在努力攻克的目标之一。相信假以时日, 人们对 Wnt 信号通路的生物学功能及其机理的认识必将更加深入与丰富。

[参 考 文 献]

- [1] Gan XQ, Wang JY, Xi Y, et al. Nuclear Dvl, c-Jun, β -catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of β catenin-TCF interaction. *J Cell Biol*, 2008, 180(6): 1087-100
- [2] Gao C, Chen YG. Dishevelled: the hub of Wnt signaling. *Cell Signal*, 2010, 22(5): 717-27
- [3] Li L, Yuan H, Xie W, et al. Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *J Biol Chem*, 1999, 274(1): 129-34
- [4] Deng N, Ye Y, Wang W, et al. Dishevelled interacts with p65 and acts as a repressor of NF- κ B-mediated transcription. *Cell Res*, 2010, 20(10): 1117-27
- [5] Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, et al. Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell*, 2003, 12(5): 1251-60
- [6] Pan WJ, Pang SZ, Huang T, et al. Characterization of function of three domains in dishevelled-1: DEP domain is responsible for membrane translocation of dishevelled-1. *Cell Res*, 2004, 14(4): 324-30
- [7] Tauriello DV, Jordens I, Kirchner K, et al. Wnt/ β -catenin signaling requires interaction of the Dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(14): E812-20
- [8] Song DH, Sussman DJ, Seldin DC. Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells. *J Biol Chem*, 2000, 275(31): 23790-7
- [9] Sun TQ, Lu B, Feng JJ, et al. PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling.

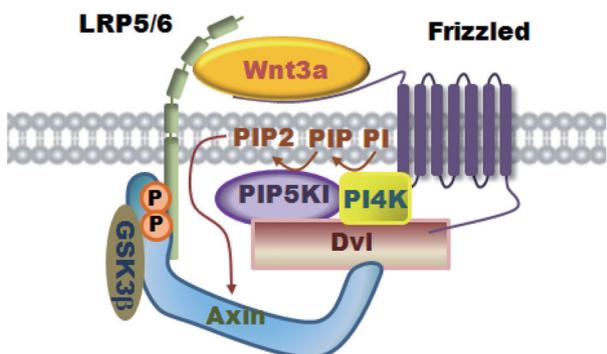


图2 Wnt信号膜质转导的简单模式图

- Nat Cell Biol, 2001, 3(7): 628-36
- [10] Cong F, Schweizer L, Varmus H. Casein kinase I ϵ modulates the signaling specificities of dishevelled. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(5): 2000-11
- [11] Klimowski LK, Garcia BA, Shabanowitz J, et al. Site-specific casein kinase I ϵ -dependent phosphorylation of Dishevelled modulates β -catenin signaling. *FEBS J*, 2006, 273(20): 4594-602
- [12] Funato Y, Michiue T, Asashima M, et al. The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt- β -catenin signalling through dishevelled. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(5): 501-8
- [13] Varelas X, Miller BW, Sopko R, et al. The Hippo pathway regulates Wnt/ β -catenin signaling. *Dev Cell*, 2010, 18(4): 579-91
- [14] Jacob LS, Wu X, Dodge ME, et al. Genome-wide RNAi screen reveals disease-associated genes that are common to Hedgehog and Wnt signaling. *Sci Signal*, 2011, 4(157): ra4
- [15] Tauriello DV, Haegebarth A, Kuper I, et al. Loss of the tumor suppressor CYLD enhances Wnt/ β -catenin signaling through K63-linked ubiquitination of Dvl. *Mol Cell*, 2010, 37(5): 607-19
- [16] Angers S, Thorpe CJ, Biechele TL, et al. The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt- β -catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(4): 348-57
- [17] Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, et al. NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J Biol Chem*, 2004, 279(12): 11327-35
- [18] Gao C, Cao W, Bao L, et al. Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(8): 781-90
- [19] Sharma J, Mulherkar S, Mukherjee D, et al. Malin regulates Wnt signaling pathway through degradation of dishevelled-2. *J Biol Chem*, 2012, 287(9): 6830-9
- [20] Wei W, Li M, Wang J, et al. The E3 ubiquitin ligase ITCH negatively regulates canonical Wnt signaling by targeting dishevelled protein. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(19): 3903-12
- [21] Mao J, Wang J, Liu B, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell*, 2001, 7(4): 801-9
- [22] Tamai K, Zeng X, Liu C, et al. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell*, 2004, 13(1): 149-56
- [23] Davidson G, Wu W, Shen J, et al. Casein kinase 1 γ couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*, 2005, 438(7069): 867-72
- [24] Brennan K, Gonzalez-Sancho JM, Castelo-Soccio LA, et al. Truncated mutants of the putative Wnt receptor LRP6/Arrow can stabilize β -catenin independently of Frizzled proteins. *Oncogene*, 2004, 23(28): 4873-84
- [25] Zeng X, Tamai K, Doble B, et al. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*, 2005, 438(7069): 873-7
- [26] Chen M, Philipp M, Wang J, et al. G protein-coupled receptor kinases phosphorylate LRP6 in the Wnt pathway. *J Biol Chem*, 2009, 284(50): 35040-8
- [27] Davidson G, Shen J, Huang YL, et al. Cell cycle control of wnt receptor activation. *Dev Cell*, 2009, 17(6): 788-99
- [28] Swiatek W, Kang H, Garcia BA, et al. Negative regulation of LRP6 function by casein kinase I ϵ phosphorylation. *J Biol Chem*, 2006, 281(18): 12233-41
- [29] Tamai K, Semenov M, Kato Y, et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 2000, 407(6803): 530-5
- [30] Bilic J, Huang YL, Davidson G, et al. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*, 2007, 316(5831): 1619-22
- [31] Schwarz-Romond T, Fiedler M, Shibata N, et al. The DIX domain of dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(6): 484-92
- [32] Schwarz-Romond T, Metcalfe C, Bienz M. Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 14): 2402-12
- [33] Li L, Yuan H, Weaver CD, et al. Axin and Frat1 interact with Dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J*, 1999, 18(15): 4233-40
- [34] Zeng X, Huang H, Tamai K, et al. Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development*, 2008, 135(2): 367-75
- [35] Metcalfe C, Mendoza-Topaz C, Mieszczynek J, et al. Stability elements in the LRP6 cytoplasmic tail confer efficient signalling upon DIX-dependent polymerization. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 9): 1588-99
- [36] Liu YT, Dan QJ, Wang J, et al. Molecular basis of Wnt activation via the DIX domain protein Ccd1. *J Biol Chem*, 2011, 286(10): 8597-608
- [37] Pan W, Choi SC, Wang H, et al. Wnt3a-mediated formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates LRP6 phosphorylation. *Science*, 2008, 321(5894): 1350-3
- [38] Qin Y, Li L, Pan W, et al. Regulation of phosphatidylinositol kinases and metabolism by Wnt3a and Dvl. *J Biol Chem*, 2009, 284(34): 22544-8
- [39] Tanneberger K, Pfister AS, Brauburger K, et al. Amer1/WTX couples Wnt-induced formation of PtdIns(4,5)P₂ to LRP6 phosphorylation. *EMBO J*, 2011, 30(8): 1433-43
- [40] Ding Y, Xi Y, Chen T, et al. Caprin-2 enhances canonical Wnt signaling through regulating LRP5/6 phosphorylation. *J Cell Biol*, 2008, 182(5): 865-72
- [41] Liang J, Fu Y, Cruciat CM, et al. Transmembrane protein 198 promotes LRP6 phosphorylation and Wnt signaling activation. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(13): 2577-90
- [42] Fei C, Li Z, Li C, et al. Smurf1-mediated Lys29-linked nonproteolytic polyubiquitination of axin negatively regulates Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(20): 4095-105
- [43] Fei C, He X, Xie S, et al. Smurf1-mediated axin ubiquitination requires Smurf1 C2 domain and is cell cycle-dependent. *J Biol Chem*, 2014, 289(20): 14170-7
- [44] Wang S, Yin J, Chen D, et al. Small-molecule modulation of Wnt signaling via modulating the Axin-LRP5/6 interaction. *Nat Chem Biol*, 2013, 9(9): 579-85