

# 纤毛蛋白 TMEM138 的保守性及拓扑结构\*

王冬新, 刘春巧

眼科学国家重点实验室 / 中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510623

**摘要:** TMEM138 是一种纤毛蛋白, 其缺失会导致系统发育性纤毛病-Joubert 综合征。为解析其致病的分子机制, 本文对 TMEM138 进行了保守性分析和拓扑结构研究。选取 8 个代表性物种分析 TMEM138 蛋白一级、二级和三级结构的保守性, 确定了 TMEM138 的跨膜结构域最为保守, 是实现其功能的重要结构基础。通过构建 TMEM138 体外过表达载体并结合活细胞染色技术, 首次验证了 TMEM138 的膜定位和其拓扑学结构, 该结论可为 TMEM138 的研究提供进一步的帮助。

**关键词:** TMEM138; 保守性分析; 膜拓扑结构

**中图分类号:** Q7 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137 (2024) 02-0131-08

## The conservation and topological structure of ciliary protein TMEM138

WANG Dongxin, LIU Chunqiao

State Key Laboratory of Ophthalmology / Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510623, China

**Abstract:** TMEM138 is a ciliary protein. Absence of TMEM138 can cause phylogenetic ciliopathy-Joubert syndrome. In order to analyze the molecular mechanism of TMEM138, the conservative analysis and topological structure of TMEM138 were studied. Eight representative species were selected to analyze the conserved primary, secondary and tertiary structure of TMEM138 protein, and determined that the transmembrane domain of TMEM138 is the most conserved, which is an important structural basis for realizing its function. By constructing the *in vitro* overexpression vector of TMEM138 and combining with the live cell staining technique, we verified the membrane localization and topological structure of TMEM138 for the first time. This conclusion can provide further help for the study of TMEM138.

**Key words:** TMEM138; conservation analysis; membrane topology

纤毛是一种以微管为基础结构的细胞器, 并被富含特定信号受体和离子通道的双层脂膜所包裹, 其具有运动、感知(光、压力等)等功能并且参与激素调节和各种信号级联的启动(Schnakenburg et al., 2007), 调节细胞稳态和发育。大多数单细胞和多细胞真核生物都有纤毛, 在脊椎动物中, 纤毛存在于许多类型细胞的表面(Scholey, 2003;

Fuchs et al., 2004; Davenport et al., 2005)。基于纤毛功能的重要性和分布的广泛性, 某些重要的纤毛基因缺失甚至会导致生物体死亡, 例如在小鼠中全敲除 DYNC2H1(编码动力蛋白 2 重链 1), 可致小鼠在胚胎发育期死亡, 死亡原因不明确, 但可以观察到神经管缺损、大脑开放、脊柱裂和骨缩短(Nonaka et al., 1998)。不考虑致死的极端情

\* 收稿日期: 2023-04-19

录用日期: 2023-11-02

网络首发日期: 2023-12-04

基金项目: 广州市科技计划重点专项(201707020009)

作者简介: 王冬新(1996年生), 女; 研究方向: 膜蛋白拓扑及蛋白互作网络; E-mail: wangdx25@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 刘春巧(1970年生), 男; 研究方向: 发育生物学; E-mail: liuchunq3@mail.sysu.edu.cn

况, 纤毛对人类健康影响最大的是被称为纤毛病的疾病, 它是由纤毛结构、成分的畸变或功能障碍导致的一大类异质性疾病。

TMEM138 在体内外的实验中已被证实定位于纤毛, 是一种纤毛蛋白(Li et al., 2016)。在人类中的研究表明, TMEM138 的缺失可导致名为 Joubert 综合征的纤毛病, 该种 Joubert 综合征可影响人的大脑、视网膜和生殖系统(Ben-Salem et al., 2014; Brancati et al., 2010)。在小鼠中的研究表明, Tmem138 的缺失可使小鼠出现早发快速的视网膜光感受器退化、脑积水引起的脑室扩张, 以及精子缺陷等表型(Guo et al., 2022); 在斑马鱼中敲除 Tmem138 也可以导致其脑室扩张(Lee et al., 2012)。上述已发表的证据表明, TMEM138 的缺失在多物种中可引发相似的表型, 这暗示着 TMEM138 可能具有极为保守的蛋白结构和功能。因此, 我们构建了 TMEM138 系统发育树, 并对几种代表物种 TMEM138 蛋白结构上的保守性进行了生物信息学比对分析。

另外 Joubert 综合征有一定的基因和表型相关性, 患有视网膜营养不良的 Joubert 综合征与 *AH11*、*CEP290*、*TMEM216*、*TMEM138*、*INPP5E* 和 *CEP41* 的突变有关, 而患有肝病的 Joubert 综合征与 *TMEM67*、*CC2D2A*、*rpgr11*、*CEP290* 和 *INPP5E* 的突变有关(Keeny et al., 2014), 即 *TMEM138* 是一种可以特定引起视网膜营养不良的人类纤毛基因。有新的研究表明, Tmem138 定位于小鼠视网膜光感受器的连接纤毛, 并且 Tmem138 敲除的小鼠会发生视网膜光感受器退化(Guo et al., 2022)。所以, 我们对 TMEM138 蛋白的特定研究可能对揭示纤毛病相关的人类视觉疾病的机制具有重要意义。

跨膜(TM, transmembrane)蛋白质是一个古老的蛋白质超家族, 从线虫到哺乳动物都有保存。TMEM138 即属于该蛋白家族, 是一种跨膜蛋白。膜蛋白作为细胞间信号机制的关键组成部分在细胞中发挥重要作用, 它们可以启动信号级联, 介导多种离子和溶质的跨膜运输, 并参与生物体对自我的识别, 许多膜结合受体和通道已被反复证明是富有成效的疾病治疗靶点(van Geest et al., 2000)。每种跨膜蛋白都有特定的拓扑结构, 这对于其蛋白功能的正确执行至关重要。膜拓扑是指膜蛋白的二维结构信息, 指示跨膜结构域(TMD, transmembrane domain)的数量和可溶性结构域相对于膜平面的方向(Lee et al., 2014)。本研究通过构

建带有特定标签的 TMEM138 表达载体, 并结合 4 °C 条件下的活细胞染色技术, 确定了 TMEM138 的拓扑结构, 以期揭示 TMEM138 突变引发疾病的分子机理提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞 293T 细胞(中山大学中山眼科中心汝佳丽博士赠予)。

1.1.2 主要试剂 PBS 粉末(武汉博士德公司), PFA、Triton X-100(美国 Sigma 公司), 驴血清、氨苄青霉素(大连美仑公司), 琼脂糖(德国 Biofroxx 公司), EB(美国 Gibco 公司), 胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒(北京天根公司), Trans5 $\alpha$  感受态细胞、PBS 溶液(北京全式金公司), 限制性内切酶(大连 Takara 公司), LB 液体培养基、LB Agar 固体培养基(北京 coolaber 公司), DMEM 高糖培养基、Opti-MEM 培养基和 Lipofectamine<sup>®</sup> 3000(美国 Thermo 公司)。

1.1.3 主要抗体 Frizzled5(美国国家眼科研究所 Tiansen Li 博士惠赠), FLAG(F1804)购自美国 Sigma 公司, FLAG(Ab1162)购自英国 abcam 公司, HA(C29F4)购自美国 Cell Signaling 公司, HA(6E2)购自美国 Cell Signaling 公司。以上所有抗体的稀释比例均为 1:1 000。

1.1.4 仪器设备 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司), 核酸凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司), 紫外可见光分光光度计(美国 Thermo 公司), 离心机(德国 Eppendorf 公司), 体式显微镜(日本 Olympus 公司), 倒置荧光显微镜(德国 Zeiss 公司), 激光共聚焦显微镜 880(德国 Zeiss 公司)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 TMEM138 系统发育树构建 从 NCBI 数据库获取 13 个代表物种的 TMEM138 基因参考序列, 以下为种属名和对应物种 TMEM138 基因参考序列号:

*Homo sapiens*(NM\_016464.5),  
*Mus musculus*(NM\_028411.4),  
*Danio rerio*(XM\_002666770.5),  
*Bos taurus*(XM\_027532662.1),  
*Sus scrofa*(XM\_005660823.3),  
*Gallus gallus*(NM\_001277894.2),  
*Caenorhabditis elegans*(NM\_001026903.3),  
*Trachemys scripta elegans*(XM\_034767658.1),

*Xenopus tropicalis*(NM\_001008081.1),  
*Loxodonta africana*(XM\_010599131.2),  
*Anolis carolinensis*(XM\_003224131.3),  
*Drosophila simulans*(XM\_002078255.4),  
*Drosophila melanogaster*(NM\_135128.3)。

使用MEGA11构建了TMEM138的Neighbor-joining进化树, 进化距离使用最大复合似然法计算。

**1.2.2 TMEM138蛋白多序列比对分析** 从UniProt数据库下载8个代表物种的TMEM138蛋白序列, 包括:

TMEM138\_HUMAN(Q9NPI0),  
 Tmem138\_MOUSE(Q9D6G5),  
 Tmem138\_BOVIN(A5PJY4),  
 Tmem138\_DANRE(E7FDE0),  
 Tmem138\_XENTR(Q66JC0),  
 Tmem138\_CHICK(A0A1D5PE71),  
 Tmem138\_DROME(Q9VMK8),  
 Tmem138\_CAEEL(Q7YX41)。

使用UniProt数据库的Align功能得到TMEM138蛋白ClustalW比对分析结果。

**1.2.3 TMEM138蛋白Motif分析** 使用在线Motif分析工具MEME(<http://meme-suite.org/tools/meme>), 对8个代表物种TMEM138进行Motif分析。并使用Tomtom工具将获得的Motif与已知的Motif数据库进行比对。

**1.2.4 TMEM138蛋白三级结构预测** CHICK(*Gallus gallus*)的Tmem138三级结构模型的预测由QUARK(<http://zhanglab.dcmf.med.umich.edu/QUARK/>)提供支持。其余7个物种TMEM138三级结构预测模型来自AlphaFold蛋白质结构数据库。

**1.2.5 TMEM138蛋白跨膜螺旋预测** 使用TMHMM-2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)对8个代表物种TMEM138蛋白的跨膜螺旋位置进行预测。

**1.2.6 构建TMEM138表达载体** 设计同源臂引物并以cDNA为模板扩增TMEM138目的片段, 待插入的分子标签经由引物合成, 再通过DNA同源重组酶将目的片段与线性化的PRK5质粒载体相连, 连接产物转化至trans5 $\alpha$ 感受态细胞后再进行抗生素筛选, 最后留存测序正确的质粒。

**1.2.7 细胞培养与转染** 将293T细胞接种至铺有细胞爬片的24孔板中, 待其汇合度为70%~90%时开始转染, 步骤参考Lipofectamine $\text{\textcircled{R}}$ 3000试剂使

用说明, 转染前1h给细胞换液, 转染结束12h后再次更换培养基, 24h后更换为减血清培养基对细胞进行血清饥饿或常规培养基持续培养。

**1.2.8 活细胞染色** 转染的细胞持续培养48h后, 弃去旧的培养基, 加入预冷的DMEM稀释的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h。孵育结束后用预冷的DMEM在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下洗去一抗, 每次5min, 洗3次。预冷的PBS洗去残留的DMEM后, 加入w=4% PFA室温固定细胞10min。PBS洗3遍, 每次5min, 去除残留的固定液, 加入w=10%驴血清300 $\mu\text{L}$ 室温封闭30min。封闭结束后加入w=10%驴血清稀释的二抗, 室温避光孵育2h。用 $\varphi=0.1\%$  PBST洗去二抗, 共洗3次, 每次至少15min。最后封片, 待晾干后观察拍照。

## 2 结果

### 2.1 TMEM138系统发育进化树构建

为从生物进化的角度整体评估TMEM138的保守性, 本研究广泛地选取了包括脊椎动物和无脊椎动物在内的13个代表物种, 并使用MEGA11软件构建TMEM138基因Neighbor Joining系统发育进化树(Saitou et al., 1987), 进化距离用最大似然法计算(Tamura et al., 2004), 并按比例绘制了辐射树(图1), 比例绘制的分支长度的单位与用来推断系统发育树的进化距离的单位相同, 图1中的分支节点表示发生生物进化事件的节点。结果显示, 人类TMEM138基因独立进化的时间相对较短, 与其

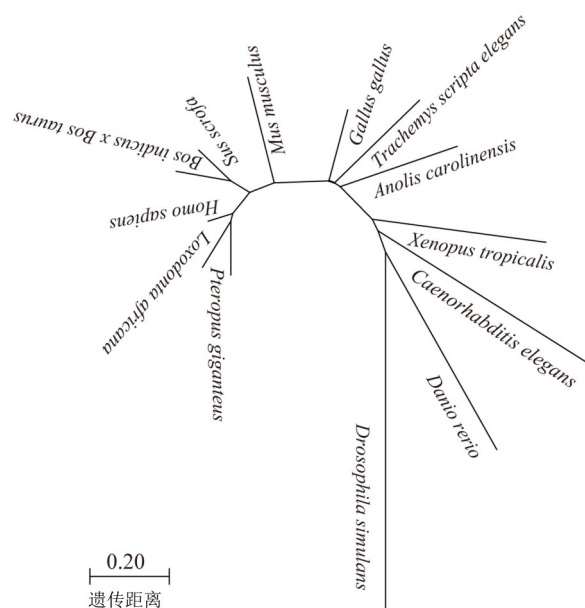


图1 TMEM138系统发育进化树

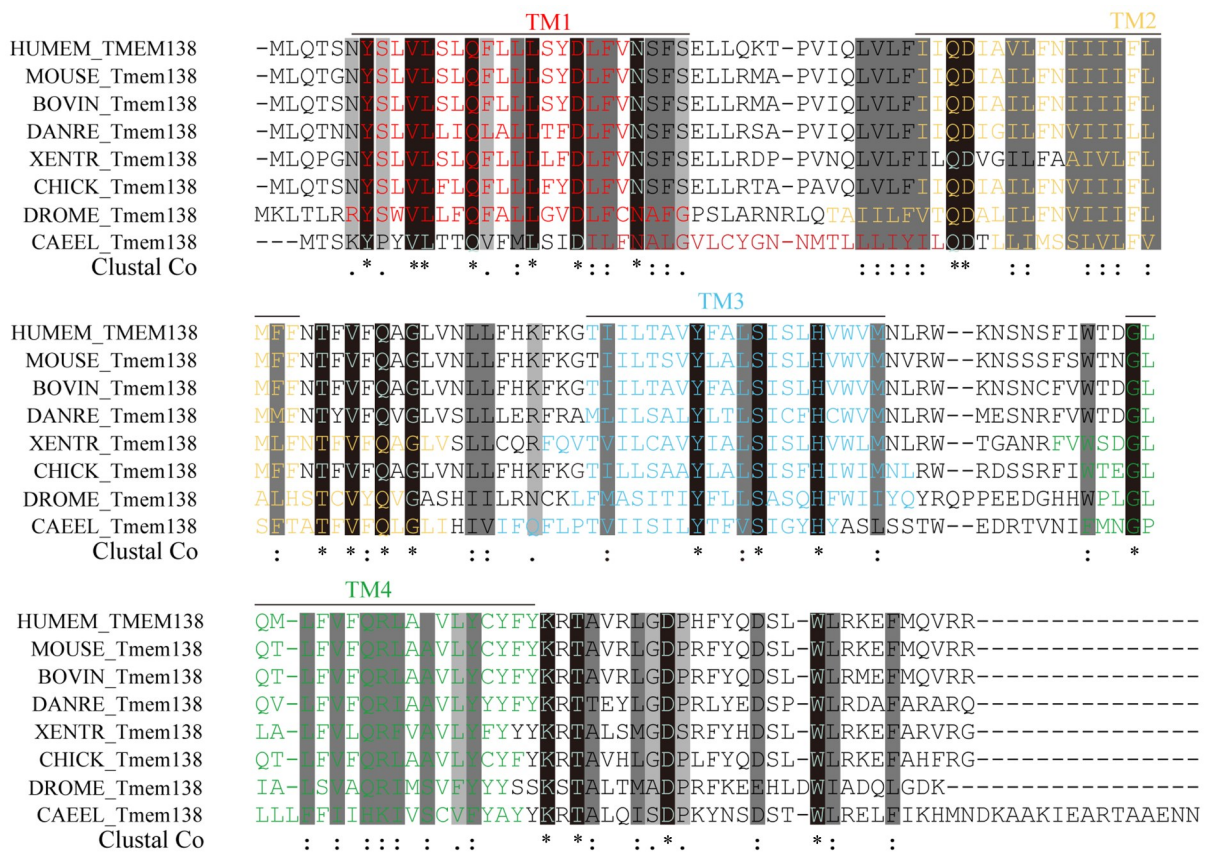
Fig. 1 TMEM138 phylogenetic evolution tree

他哺乳类生物发生进化事件的时间接近, 与卵生的脊椎动物如禽类、爬行类、两栖类等生物发生进化事件的时间则相距渐远。秀丽隐线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 和果蝇 (*Drosophila simulans*) *Tmem138* 基因独立进化的时间最长, 与人类亲缘关系最远。

### 2.2 TMEM138 多序列比对分析

为分析 TMEM138 蛋白一级结构的保守性, 本研究选取了包括了哺乳动物、脊椎动物和无脊椎动物在内的 8 个代表物种, 对其 TMEM138 蛋白进行了多序列比对分析, 以期从这些进化地位和物种分类截然不同的生物中归纳总结 TMEM138 的序列保守特征, 结果见图 2。图 2 显示, 人、小鼠、牛、斑马鱼、非洲爪蟾、鸡的 TMEM138 有 162 个氨基酸, 而果蝇和线虫 TMEM138 的氨基酸数量则

分别为 165 和 176 个。与人类 TMEM138 相比, 这些种属中牛的同源性最高 (94.4%)、小鼠为 91.9%、鸡为 84.6%、非洲爪蟾为 69.7%、斑马鱼为 68.5%、果蝇和线虫的同源性较低分别为 30.3% 和 27.8%。总体上, 上述几个物种 TMEM138 共同保守的氨基酸数量为 21 个, 加上有同类替代和性质相似相对保守的氨基酸数量为 65 个。为进一步了解这些保守氨基酸在 TMEM138 中的位置信息, 我们对上述物种的 TMEM138 蛋白进行了跨膜结构域的预测。结果显示, 这些物种的 TMEM138 蛋白皆为四次跨膜蛋白, 跨膜结构域的位置已在多序列比对结果中标注。值得关注的是, 各物种 TMEM138 高度保守的氨基酸集中在其跨膜结构域所在的序列中。



“\*” 代表性质完全一致的残基; “:” 代表性质特别相近的残基; “.” 代表性质微弱相近的残基。

图 2 几种代表物种 TMEM138 多序列比对分析

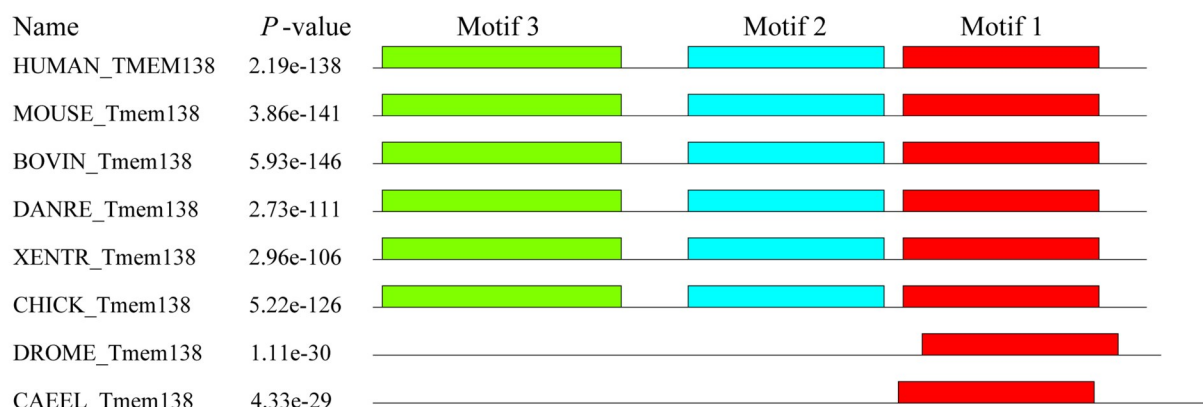
Fig. 2 TMEM138 multiple sequence alignment analysis of several representative species

### 2.3 TMEM138 蛋白 Motif 分析

蛋白 Motif 的预测和识别是研究蛋白质结构和功能的重要环节。本研究使用 MEME 分析不同物种的 TMEM138 蛋白序列, 共获得了 3 个 Motifs (图 3),

按从高到低的置信度顺序排序 (Bailey et al., 1994)。Motif 1 序列长度为 41 个氨基酸残基, 是所有物种中 TMEM138 蛋白最保守的区域, 在这些物种中都存在。Motif 2 序列长度为 41 个氨基酸残基, Motif 3

(a) MEME输出的3种Motifs在不同物种TMEM138蛋白序列中的位置信息



(b) 3种Motifs的Logo及其在小鼠Tmem138中对应的序列和位置信息



相同颜色的字母代表相同性质的氨基酸, 字母的相对大小代表该氨基酸在序列中出现的频率, 字母越大, 频率越高, 且代表该氨基酸的保守性越高。

图3 几种代表物种 TMEM138 的 Motif 分析

Fig. 3 Motif analysis of several representative species TMEM138

序列长度为 50 个氨基酸残基, 它们在脊椎动物中是保守的。将预测的跨膜结构域位置在 Motif 分析结果中标注, 结果显示每个 Motif 均包含一个跨膜区域, Motif 3 除包含第 1 个跨膜区还包含部分第 2 个跨膜区。上述结果提示 TMEM138 蛋白功能相对保守, 并且保守结构和跨膜结构域相关。

#### 2.4 TMEM138 三级结构预测

蛋白质的生物学活性依赖于其三级结构。本研究使用 AlphaFold 对不同物种 TMEM138 的三级结构进行预测, 预测的跨膜结构域的位置已标示(图4)。其中 HUMAN 三级结构的平均建模置信度

为 86.40、MOUSE 为 87.39、BOVIN 为 87.90、DANRE 为 89.57、XENTR 为 86.43、DROME 82.13、CAEEL 为 88.34, 这些蛋白的平均建模置信度都接近 90, 代表建模结果可信。从预测结果来看, 不同物种 TMEM138 的空间构象相似, 在预测的 4 个跨膜结构域都具有 alpha 螺旋, 该结果提示 TMEM138 的三级结构具有保守性。

#### 2.5 Tmem138 拓扑结构验证

本研究构建了 6 种不同的 Tmem138 表达载体, cDNA 来自小鼠, 分别标记了 Tmem138 蛋白 N 末端、C 末端以及各跨膜区之间的结构域。将这些质

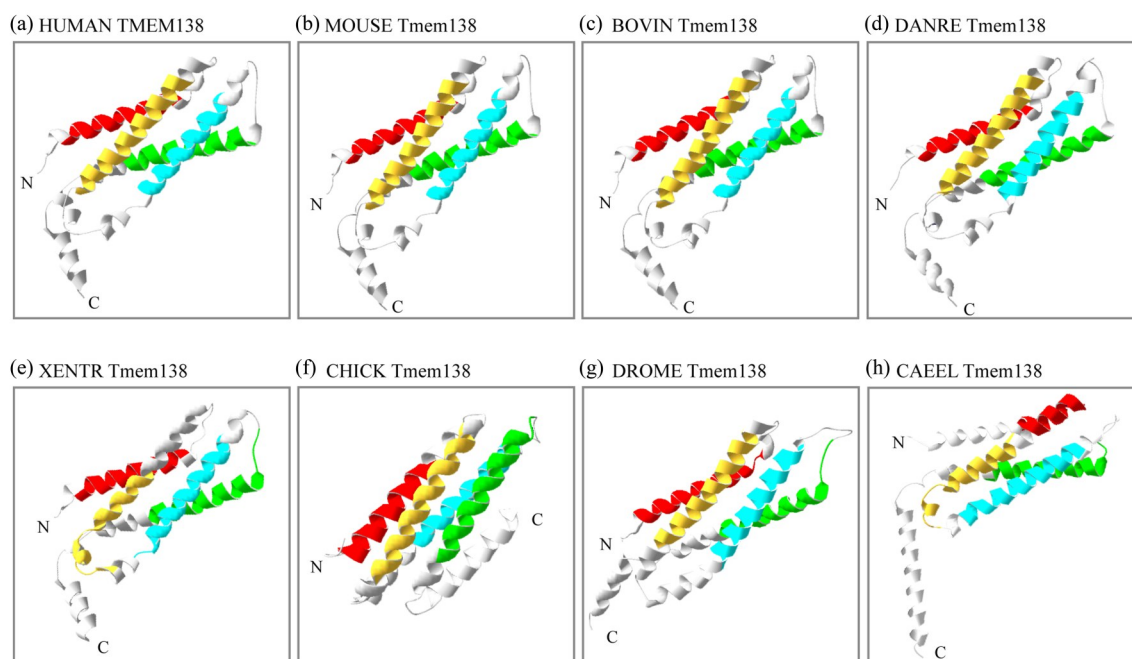


图4 几种代表物种 TMEM138 三级结构预测

Fig. 4 Tertiary structure prediction of several representative species TMEM138

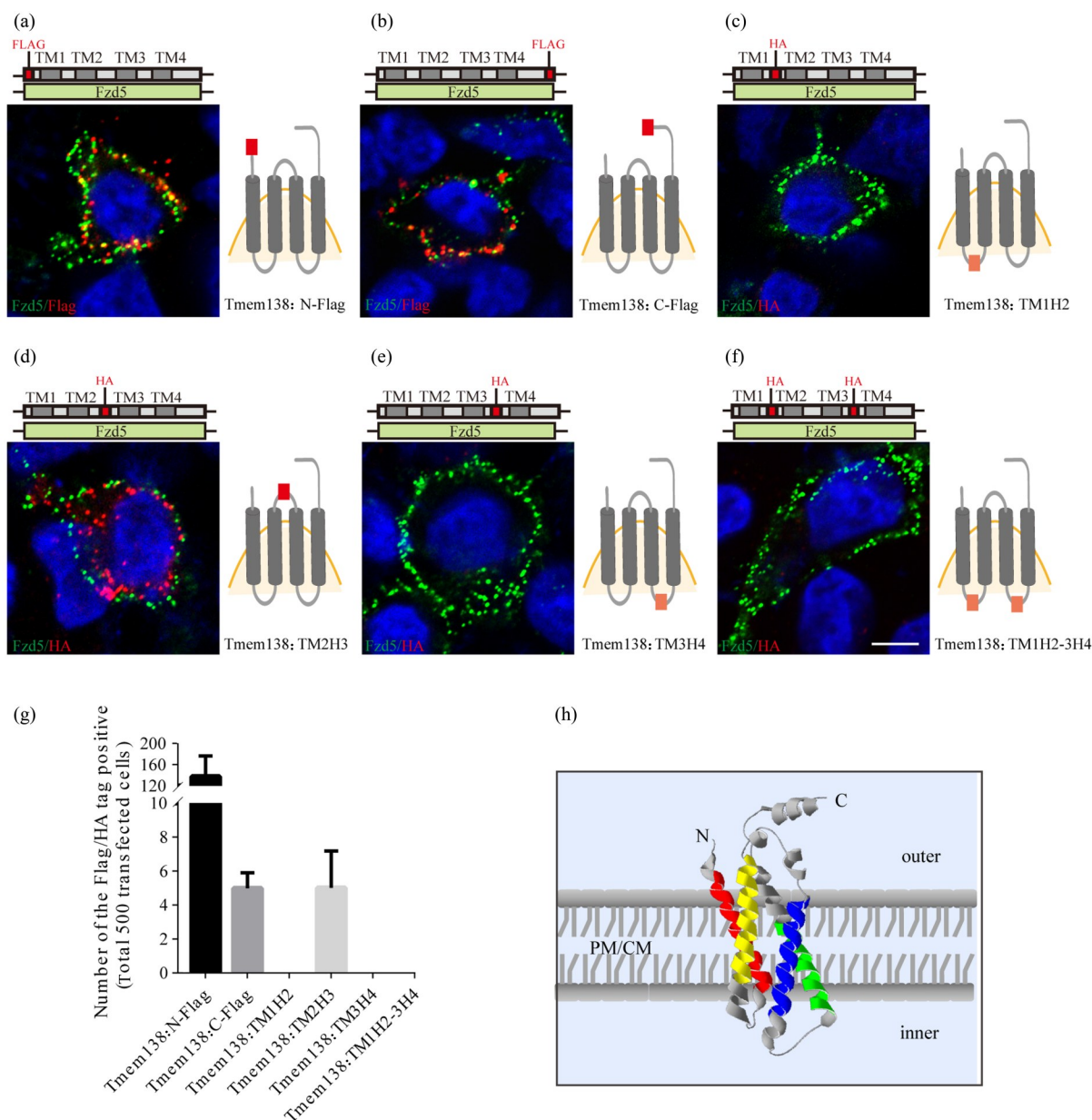
粒分别与 Fzd5(G 蛋白偶联受体, 标记细胞膜) 质粒共转至 293T 细胞, 进行活细胞染色实验, 暴露于细胞膜表面的抗原将被染色。结果显示, Tmem138: N-Flag、Tmem138: C-Flag 和 Tmem138: TM2H3 过表达的细胞中均显示 Flag 或 HA 在细胞膜的阳性染色, 这些结果表明, Tmem138 的 N-末端和 C-末端暴露于细胞膜外侧, 跨膜拓扑方向为“W”型; 与此相一致, Tmem138: TM1H2、Tmem138: TM3H4 和 Tmem138: TM1H2-3H4 过表达的细胞中均未显示出阳性染色(图 5a~f)。进一步的量化统计分析显示, N-末端的标记的细胞数比 C-末端多(图 5g), 这可能是由于载体表达效率或 HA 抗体效价不同导致。我们证明了 Tmem138 的膜定位, 并且验证了其 N-末端和 C-末端及 TM2 和 TM3 之间延展区位于细胞膜外侧的拓扑结构(图 5h)。

### 3 讨论

纤毛作为一种普遍存在的结构, 在生物体的发育和生存中起着核心作用。因此, 纤毛结构、成份的畸变或功能障碍都会导致广泛系统性的人类疾病。纤毛虽然是一个微小的结构, 但是其蛋白组成却十分丰富, 目前已鉴定出大约 800 种纤毛蛋白(Gherman et al., 2006; Ishikawa et al., 2012)。对于另外一些高度修饰的纤毛来说, 其蛋白组成更加丰富, 例如对小鼠视网膜光感受器外段和连

接纤毛蛋白组学的综合研究, 共鉴定出约 2 000 种蛋白, 其中大部分蛋白用于支持其独特的光转导功能而存在(Liu et al., 2007)。尽管纤毛蛋白的数量十分丰富, 但某一种蛋白的缺失就可以破坏其功能并引发疾病, TMEM138 及其同家族的基因 TMEM237、TMEM67、TMEM231、TMEM216 等已被证实突变后可引起 Joubert 综合征(Keeny et al., 2014)。由此可见, 这些跨膜蛋白对于纤毛功能的正确执行发挥着重要作用, 理解 TMEM138 的结构和功能可能是解析 Joubert 综合征分子机制的重要一步。

TMEM138 突变引发的 Joubert 综合征可影响人的大脑、视网膜和生殖系统(Brancati et al., 2010), 在小鼠中敲除 Tmem138 也能产生与人类几近相同的表型(Guo et al., 2022), 在斑马鱼里敲低该基因可以引起脑室扩张(Lee et al., 2012)。这些证据表明, 在不同物种间 TMEM138 的功能可能是高度保守的, 故我们从进化和结构上对 TMEM138 的保守性进行了生物信息学分析。从构建的 TMEM138 系统发育树的结果来看, TMEM138 的进化与生物进化的趋势一致, 斑马鱼 Tmem138 与人类 TMEM138 如同两物种的进化地位一样, 进化距离相当远, 但却在缺失后引发相似性状, 由此可见 TMEM138 功能的保守。在进一步对 TMEM138 结构的保守性分析中, 我们发现在不同物种 TMEM138 的一、二、三级结构中分别存在着高度



(a) Tmem138:N-Flag 与 Fzd5 共转后的活细胞染色; (b) Tmem138:C-Flag 与 Fzd5 共转后的活细胞染色; (c) Tmem138:TM1H2 与 Fzd5 共转后的活细胞染色; (d) Tmem138:TM2H3 与 Fzd5 共转后的活细胞染色; (e) Tmem138:TM3H4 与 Fzd5 共转后的活细胞染色; (f) Tmem138:TM1H2-3H4 与 Fzd5 共转后的活细胞染色, 标尺: 5  $\mu$ m; (g) Flag、HA 阳性细胞的量化统计结果; (h) Tmem138 膜拓扑示意图。

图 5 Tmem138 质粒在 293T 细胞中的活细胞染色  
Fig. 5 Live cell staining of Tmem138 plasmid in 293T cells

保守的氨基酸、高度保守的 Motif 和相似的空间构象。这些在不同物种 TMEM138 中都保留着的保守结构, 很可能是为 TMEM138 实现其特定保守的蛋白功能而存在。

本研究通过对 TMEM138 的跨膜结构域进行预测, 发现不同物种 TMEM138 都具有 4 个跨膜结构域, 且在不同物种间对应跨膜结构域的位置和长度相似, 这些结果也从另外的角度证明 TMEM138

在结构上具有保守性。通过对 TMEM138 跨膜结构域和保守结构综合分析, 我们还发现 TMEM138 的保守氨基酸位点、Motif 和 alpha 螺旋都集中分布在其跨膜区域, 这表明 TMEM138 的跨膜结构域可能是其功能保守的关键, 因此我们对其作为跨膜蛋白的重要性质——膜拓扑结构进行了验证。首先我们证明了 TMEM138 的膜定位, 并且基于此进一步确定其拓扑结构为“W”型, 即 N-末端和 C-末端

均暴露于膜外侧, TM2 和 TM3 之间延展区位于细胞膜外侧, TM1 和 TM2 以及 TM3 和 TM4 之间延展区位于细胞膜内侧。TMEM138 的拓扑结构是其作为膜蛋白正确执行蛋白功能的关键, 也是实现其保守功能的基础。

关于 TMEM138 保守性和拓扑结构的研究, 可能为一些相关研究提供帮助。TMEM138 在体外培养的细胞水平被证实参与关联性囊泡运输(Lee et al., 2012), 在对小鼠的研究中, 发现 Tmem138 与

光感受器纤毛胞质蛋白 AHI1 和视紫红质蛋白(Rho, Rhodopsin)等膜蛋白都有相互作用, 可能参与这些膜蛋白在光感受器内的运输, 这些是 Tmem138 敲除小鼠视网膜病变的重要原因(Guo et al., 2022)。我们对 Tmem138 膜拓扑结构的研究可能对于揭示这些蛋白互作模式和小鼠视网膜病变的分子机制提供帮助, 从而为解决相关的人类疾病奠定基础。

### 参考文献:

- BAILEY T L, ELKAN C, 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers [J]. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 2: 28–36.
- BRANCATI F, DALLAPICCOLA B, VALENTE E M, 2010. Joubert Syndrome and related disorders [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 5: 20.
- BEN-SALEM S, AL-SHAMSI A M, GLEESON J G, et al, 2014. Mutation spectrum of Joubert syndrome and related disorders among Arabs [J]. *Hum Genome Var*, 1: 14020.
- DAVENPORT J R, YODER B K, 2005. An incredible decade for the primary cilium: A look at a once-forgotten organelle [J]. *Am J Physiol Ren Physiol*, 289 (6): F1159–F1169.
- FUCHS J L, SCHWARK H D, 2004. Neuronal primary cilia: A review [J]. *Cell Biol Int*, 28(2): 111–118.
- GHERMAN A, DAVIS E E, KATSANIS N, 2006. The ciliary proteome database: An integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia [J]. *Nat Genet*, 38(9): 961–962.
- GUO D, RU J, XIE L, et al, 2022. Tmem138 is localized to the connecting cilium essential for rhodopsin localization and outer segment biogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 119(15): e2109934119.
- ISHIKAWA H, THOMPSON J, YATES J, et al, 2012. Proteomic analysis of mammalian primary Cilia [J]. *Curr Biol*, 22(5): 414–419.
- KEENY T D, BEALES P L, 2014. Ciliopathies [M]. Oxford: Oxford University Press.
- LIU Q, TAN G, LEVENKOVA N, et al, 2007. The proteome of the mouse photoreceptor sensory cilium complex [J]. *Mol Cell Proteomics*, 6(8): 1299–1317.
- LEE J H, SILHAVY J L, LEE J E, et al, 2012. Evolutionarily assembled cis-regulatory module at a human ciliopathy locus [J]. *Science*, 335(6071): 966–969.
- LEE H, KIM H, 2014. Membrane topology of transmembrane proteins: Determinants and experimental tools [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 453(2): 268–276.
- LI C, JENSEN V L, PARK K, et al, 2016. MKS5 and CEP290 dependent assembly pathway of the ciliary transition zone [J]. *PLoS Biol*, 14(3): e1002416.
- NONAKA S, TANAKA Y, OKADA Y, et al, 1998. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal Cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein [J]. *Cell*, 95 (6): 829–837.
- SCHOLEY J M, 2003. Intraflagellar transport [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19: 423–443.
- von SCHNAKENBURG C, FLIEGAUF M, OMRAN H, 2007. Nephrocystin and ciliary defects not only in the kidney? [J]. *Pediatr Nephrol*, 22(6): 765–769.
- SAITOU N, NEI M, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 4(4): 406–425.
- TAMURA K, NEI M, KUMAR S, 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(30): 11030–11035.
- van GEEST M, LOLKEMA J S, 2000. Membrane topology and insertion of membrane proteins: Search for topogenic signals [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(1): 13–33.

(责任编辑 张冰)