

Eph 受体家族及其配体的信号转导途径及功能*

张晓光** 药立波 苏成芝

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032)

摘要 Eph 受体是已知最大的酪氨酸蛋白激酶受体家族, Eph 受体和其膜附着型配体 (ephrin) 在发育过程中呈现不同的表达模式, 近来研究证明, Eph 受体和其配体在包括神经网络形成, 神经管和轴旁中胚层的成型 (patterning), 细胞迁移导向和轴突路径引导, 血管形成等许多的发育过程中起重要作用. Eph 受体及其配体也与肿瘤发生有关, 因此深入分析这些分子尤其在肿瘤细胞生长中的功能而应用于治疗具有重要的临床意义.

关键词 Eph 受体, ephrin 配体, 酪氨酸蛋白激酶受体

学科分类号 Q78

酪氨酸蛋白激酶受体 (receptor tyrosine kinase, RTK) 在细胞生长、分化和胚胎发育中起重要作用. 1987 年, Hirai 等克隆得到了 RTK 类 Eph 基因家族的第一个成员 EphA1 (其命名^[1]来自于基因获取的来源, 即 erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma cell line)^[2], 至今 Eph 基因家族已有 14 个成员, 成为最大的 RTK 亚族. 该亚族的大多数成员主要在神经系统以独特的重叠模式表达. 在正常组织及肿瘤细胞中均有广泛地分布. 最近, Eph 受体的配体家族 (命名为 ephrins) 已克隆有 8 个成员. Eph 受体和其配体间的相互作用参与了胚胎发育模式的许多过程, 在神经轴突导向, 血管发生, 肿瘤形成等方面具有重要功能.

1 结构与信号传导

1.1 Eph 受体

根据 Eph 受体家族的同源性, 表达, 分布及与配体的结合特性的不同而将其分为 EphA 受体和 EphB 受体亚家族.

Eph 受体亚族的胞外区包括一个 N 端球状结构域 (Glb), 一个半胱氨酸富含区 (有 20 个半胱氨酸残基, Cys), 两个纤维粘连蛋白 III 型重复区 (FN III), 其胞外球状结构域的 X 射线晶体结构分析表明, 该区可折叠形成紧密的蛋卷 (jellyroll) β 三明治的空间构型, 是与配体结合的关键结构域, 决定了受体与配体的结合特性及亚族特异性^[3].

Eph 受体的胞内区包括具酪氨酸激酶活性的结构域 (TK), SAM 结构域 (sterile alpha motif)^[4]

和 C 端的 PDZ (post-synaptic density protein, discs large, zona occludens) - 结构域结合基序 (motif)^[4]. 在 40 多个 Eph 受体的胞内 C 端发现有高度保守的 SAM 结构域, 其保守 Tyr932 (磷酸化后与 SH2 结合) 在疏水核 (hydrophobic core) 埋藏形成 SAM 四聚物, 为启动下游反应及为结合小分子质量磷酸酶提供适宜的接触部位^[5] (图 1).

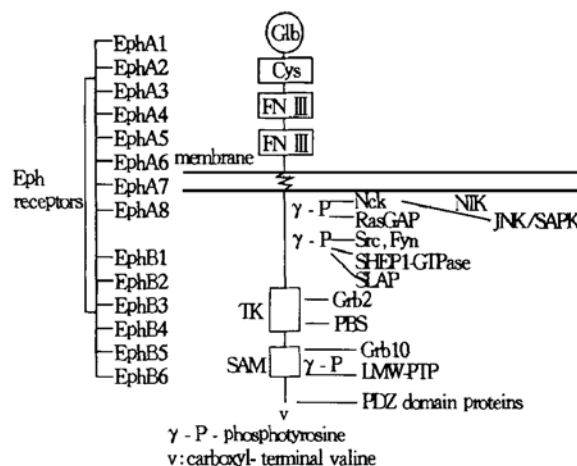


Fig 1 The structure and signal pathway of the Eph receptors

图 1 Eph 受体的结构与信号转导

类似其他的 RTKS, Eph 受体的胞内区与信号转导相关. 几乎所有已知与活化的 Eph 受体作用的效应分子都是含 SH2 结构域的信号蛋白, 包括

* 国家自然科学基金资助项目 (39800027).

** 通讯联系人.

Tel: 029-3374516-11, E-mail: xgzhang@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2000-07-19, 接受日期: 2000-08-23

胞浆酪氨酸激酶 Src 家族; 接头 Grb2, Grb10, Nck, Ras GTPase 活化蛋白, PI3K 的 p85 亚单位^[6].

在高度保守的近跨膜区有两个酪氨酸残基是主要的自身磷酸化位点. 已证明了 SLAP (一个新的 SH3-SH2 接头蛋白, 与 src 同源但缺少催化结构域) 结合这些酪氨酸残基^[7]. SAM 结构域与含 SH2 基序的蛋白 Grb10 和低分子量磷酸酶的结合是通过一个保守不变的酪氨酸残基介导的^[4].

在 P19 胚胎细胞株中, EphB1 (ELK) 与胞内接头蛋白 Nck 的 SH2 结构域结合可激活 c-Jun 激酶 (JNK/SAPK), 从而证明了 Nck 是介导 EphB1 到 JNK 信号通路的重要连接分子^[8]. Vincent 等^[9]应用酵母双杂交系统以磷酸化的胞内结构域为诱饵, 从 VP16 鼠胚 cDNA 文库中筛选到一个新的信号中介分子 SHEP1, 可与 EphB2 受体跨膜区的磷酸化酪氨酸保守基序结合. SHEP1 也有 Ras 鸟核苷酸交换因子的类似结构域, 并可结合 GTPases R-Ras 和 Rap1A, 这样 SHEP1 直接把激活的酪氨酸磷酸化的 Eph 受体和小 G-蛋白超家族 GTPases 联系起来. EphB2 可以通过 R-Ras 而控制整合素. R-Ras 结构域的一个酪氨酸残基的磷酸化与 Eph 被激活的细胞丧失附着是相关的. 这是第一次在 ras 蛋白超家族中发现通过酪氨酸磷酸化方式调节 R-Ras 活性, 并可以解释一些 Eph 受体特性的分子机理^[6].

用质谱测量系统发现磷酸化位点存在于 EphB2 和 EphB5 的跨膜区, 激酶区和 C 端尾, 尤其在 EphB 间保守, 并且 EphB2 和 EphB5 在体内广泛发生丝氨酸和苏氨酸磷酸化, 提示了自身磷酸化及被其他激酶的磷酸化对其功能的复杂调节^[10].

目前, Eph 受体的信号转导途径中涉及的分子组分还未完全阐明.

1.2 ephrins 配体

目前已获取的 8 种 Eph 受体家族的配体, 依据与膜附着方式分为 ephrin-A 和 ephrin-B 两个亚组. ephrin-A (a1-a5) 类配体靠糖基磷脂酰肌醇链 (GPI-linkage) 锚定在细胞膜上, ephrin-B (b1-b3) 类配体是单次跨膜蛋白 (图 2). 结合研究表明 ephrin-A 类配体作用主要与 EphA 受体作用, 而主要与跨膜配体 ephrin-B 结合的为 EphB 受体. 在每亚族内一个配体可与多个受体以不同亲和力交叉结合且发挥不同作用, 有的结合跨越了亚族的界限, 如 EphA4, 除与 ephrin-A 类配体结合外还与 ephrin-B2 和 ephrin-B3 结合^[11].

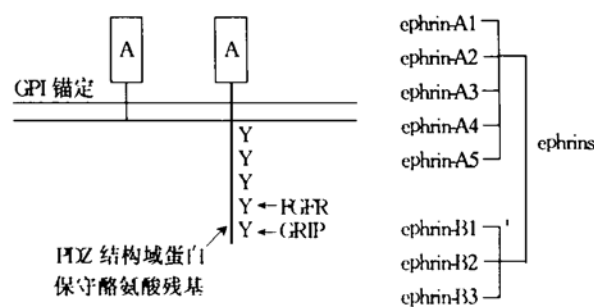


Fig. 2 The structure of the ephrins

图 2 ephrins 配体的结构

Eph 家族配体只有膜附着形式具有活性, 可溶形式不仅无活性实际还起拮抗剂作用. ephrin-B (b1-b3) 类配体的显著特征是其高度保守的 C 端尾. 在该区有 5 个潜在的酪氨酸磷酸化位点和一个 C 端 PDZ-结构域结合基序. 有趣的是 EphB 受体和 ephrin-B 配体间的相互作用会导致受体和配体两者均发生酪氨酸磷酸化而介导双向的信号传递. 即 ephrin-B 配体兼具受体样信号分子功能, 接受 EphB2 受体刺激后发生“反向” (‘reverse’) 信号传递调节细胞反应^[12], 然而 ephrins 磷酸化的诱导和功能意义还不清楚 (图 3), Chong^[13]报告了活化的 FGF 受体诱导 ephrin B1 酪氨酸磷酸化, ephrin B1 的胞浆 C 端发现了与 FGF 受体结合的关键区, 也在神经组织发现 FGF 受体诱导 ephrin B1 酪氨酸磷酸化, 这首次证明了 FGF 受体家族与 Eph 配体家族存在信号通讯的串话 (cross talk).

目前, 该家族的信号转导通路和生理作用不断揭示, 为最终阐明其功能奠定了基础.

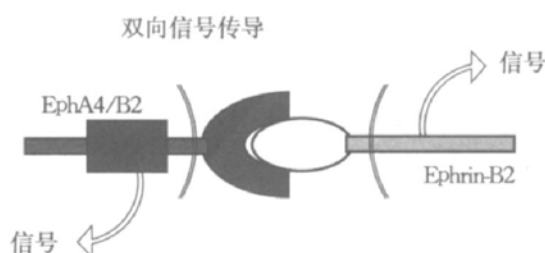


Fig. 3 The interaction between EphB receptors and its ligands

图 3 EphB 受体和其配体间的相互作用

2 生物功能

Eph 受体和 ephrin 配体家族中, 不同成员间具有剂量互补和功能重叠, 但各自参与特定的组织和器官的许多的发育进程, 包括神经网络形成, 神经管和轴旁中胚层的成型 (patterning), 细胞迁移导向和血管形成等.

2.1 神经系统

2.1.1 轴突路径导向: 神经纤维的正确连接是神经系统的信号传递的必要先决条件. 多数区域, 神经纤维主要是轴突, 轴突必须沿着正确的路径到达靶区域, 在靶区域每个轴突必须找到并识别正确靶细胞而形成特异的连接. 对鸡和鼠的研究表明缺失 EphB3 和 EphB2 的小鼠表现出视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 的轴突到视神经盘的路径导向错误频率增加, 且出现在背侧^[14]. 通过 Eph/R-Ras 通路导致的粘附性降低可以解释 Eph 受体在轴突路径导向的排斥效应, 引起神经轴突的回撤, 从而引导轴突离开不正确的靶位点; 并使肿瘤细胞易于侵袭和血管生成^[6].

由于 Eph 受体和其配体在轴突导向中起着关键作用, 探讨这些基因与影响神经正确连接的先天性疾病 (如胼胝体发育不全) 间的联系有重要临床意义.

2.1.2 发育拓扑图的靶目标选择: 现在认为在伸展的神经细胞与其靶细胞间存在分子标签, 这些位置标签以互补性的浓度梯度, 指导神经细胞迁移到靶区域的方向, 从而形成精确的发育拓扑图 (topographic map).

最近的研究表明 Eph 受体和 ephrin 配体在视顶盖系统充当位置标签. ephrinA2 和 ephrinA5 配体在鸡的顶盖形成后部高表达, 前部低表达的浓度梯度, 相应的 ephA3 受体在视网膜形成颞部高表达, 鼻部低表达的浓度梯度, ephrinA2 体内外均显示对视网膜的轴突特异的排斥性导向作用^[15].

2.2 血管发生中的作用

爪蟾胚胎血管发育中 EphB 受体和其配体的研究, 表明 EphB4 是爪蟾早期胚胎微管表达的主要 EphB 受体; 与胚芽间静脉迁移路径邻接的体节 (somites) 的 ephrinB 配体与 EphB4 的表达是互补性的. RNA 注射实验研究表明, 在爪蟾胚胎用显性负突变 EphB4 受体或异位表达的 ephrinB 配体来阻断 EphB4 的信号转导, 导致胚芽间静脉反常地生长进邻接体节组织, 证明了 EphB4 和 B 族配体通过介导排斥性导向而对迁移的内皮细胞起血管发生调节器作用^[16].

Adams 的研究表明 EphB2 的跨膜配体 ephrinB1 体外对毛细管的诱导与 angiopoietin 1 (Ang1) 和血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 的能效类似, 且内皮细胞与周围间充质细胞的相互作用需 ephrinB2 配体和 EphB2 受体间的信号转导^[17].

2.3 肿瘤方面

许多 Eph 受体在肿瘤中高表达. 在几种人肿瘤中 (肺癌、乳腺癌、结肠癌、肝癌、结肠癌), EphA1 表达高于相应正常组织, 但无基因扩增, 体外 EphA1 在 NIH3T3 细胞的高表达使 NIH3T3 诱发裸鼠致瘤及能在软琼脂上形成克隆, 提示 eph 高表达也许与肿瘤发生有关^[18]. Ephb2 在各种肿瘤组织中的表达均高于相应正常组织几倍, 其中胃癌组织中最显著, 约 75% 呈高表达, 故认为也许其在胃胚胎及肿瘤的发生中起一定作用^[18].

2.4 胚胎发育

Eph 家族涉及空间界限形成而有助于使发育机体的发育进程井然有序. EphB 受体和其配体间的双向信号传递可限制相邻细胞群的混合, 并维持各自特征, 对精确决定细胞命运有重要作用^[19].

Eph 受体和 ephrins 配体成为细胞排斥和粘附的关键调节分子, 而这又是建立、维持及重塑细胞组织形态的基础. EphA3、ephrinA5 干涉斑马鱼胚胎发生的早期事件, 两种蛋白质的外源表达导致剂量依赖的体节发育缺陷和中脑-后脑边界和后脑组织的缺陷^[20]. Eph 受体和其配体在发育中所起的关键作用提示了未来进行研究的重要临床价值, 为探讨应用前景提供了思想和物质基础.

参 考 文 献

- 1 Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee. Cell, 1997, **90** (3): 403~404
- 2 Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, *et al.* A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. Science, 1987, **238** (4834): 1717~1720
- 3 Himanen J P, Henkemeyer M, Nikoiov D B. Crystal structure of the ligand-binding domain of the receptor tyrosine kinase EphB2. Nature, 1998, **396** (6710): 486
- 4 Hock B, Bohme B, Karn T, *et al.* PDZ-domain-mediated interaction of the Eph-related receptor tyrosine kinase EphB3 and the ras-binding protein AF6 depends on the kinase activity of the receptor. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **95** (17): 9779~9784
- 5 Smalla M, Schmieder P, Kelly M, *et al.* Solution structure of the receptor tyrosine kinase EphB2 EphB2 SAM domain and identification of two distinct homotypic interaction sites. Protein Sci, 1999, **8** (10): 1954~1961
- 6 Zou J X, Wang B C, Matthew S. An Eph receptor regulates integrin activity through R-Ras PNAs, 1999, **96** (24): 13813~13818
- 7 Pandey A, Duan H, Dixit V M. Characterization of a novel Src-like adapter protein that associates with the Eck receptor tyrosine kinase. J Biol Chem, 1995, **270** (33): 19201~19204
- 8 Stein E, Huynh Do U, Lane A A. Nck recruitment to Eph receptor, EphB1/ELK, couples ligand activation to c-Jun kinase. J Biol Chem, 1998, **273** (3): 1303~1305

- 9 Vincent C D, Claudia P, Andreas H, *et al.* Novel signaling intermediate, SHEP1, directly couples Eph receptors to R-Ras and Rap1A. *J Biol Chem*, 1999, **274** (45): 31941~ 31946
- 10 Kalo M S, Pasquale E B. Multiple *in vivo* tyrosine phosphorylation sites in EphB receptors. *Biochemistry*, 1999, **38** (43): 14396~ 14408
- 11 Gale N W, Holland S J, Valen Zuela D M, *et al.* Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses, and are reciprocally compartmentalised during embryogenesis. *Neuron*, 1996, **17** (1): 9~ 19
- 12 Brückner K, Pasquale E B, Klein R. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science*, 1997, **275** (5306): 1640~ 1643
- 13 Chong L D, Park E K, Latimer E. Fibroblast growth factor receptor-mediated rescue of x-Ephrin B1-induced cell dissociation in xenopus embryos. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (2): 724~ 734
- 14 Birgbauer E, Cowan C A, Sretavan D W, *et al.* Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development*, 2000, **127** (6): 1231~ 1241
- 15 Dutting D, Handwerker C, Drescher U. Topographic targeting and pathfinding errors of retinal axons following overexpression of ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Dev Biol*, 1999, **216** (1): 297~ 311
- 16 Helbling P M, Saulnier D M, Brandli A W. The receptor tyrosine kinase EphB4 and ephrinB ligands restrict angiogenic growth of embryonic veins in *Xenopus laevis*. *Development*, 2000, **127** (2): 269~ 278
- 17 Adams R H, Wilkinson G A, Weiss C, *et al.* Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev*, 1999, **13** (3): 295~ 306
- 18 Kiyokawa E, Takai S, Tanaka M. Overexpression of ERK, an EPH family receptor protein tyrosine kinase, in various human tumors. *Cancer Research*, 1994, **54** (14): 3645~ 3650
- 19 Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson D G, *et al.* Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature*, 1999, **400** (6739): 77~ 81
- 20 Oates A C, Lackmann M, Power M A, *et al.* An early developmental role for eph-ephrin interaction during vertebrate gastrulation. *Mech Dev*, 1999, **83** (11~ 2): 77~ 94

The Signal Transduction Pathway and Function of Eph Receptors and Its Ligands*

ZHANG Xiao-Guang^{**}, YAO Li-Bo, SU Cheng-Zhi

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract Eph receptors are the largest known family of receptor tyrosine kinases. The Eph receptors and their membrane-attached ligands, the ephrins, show diverse expression patterns during development. Functional studies have demonstrated that Eph receptors and ephrins play important roles in many developmental processes including formation of neuronal network, patterning of neural tube and paraxial mesoderm, guidance of cell migration and axon pathfinding, and vascular formation. Recent studies have also suggested that Eph receptors and ephrins may be involved in carcinogenesis. It is therefore of clinical importance to further analyze the function of these molecules, particularly their function in tumor cell growth, since manipulation of the activities of these molecules may have therapeutic applications.

Key words Eph receptors, the ephrins, receptor tyrosine kinases

* This work was supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China (39800027).

** Corresponding author. Tel: 86-29-3374516-11, E-mail: xgzhang@fmmu.edu.cn

Received: July 19, 2000 Accepted: August 23, 2000