

EGFR 配体生物学效应的多样性

谷少伟, 米立志*

(天津大学生命科学学院结构与分子生物学研究所, 天津 300072)

摘要 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的配体作为一类重要的信号分子参与了细胞功能的调节,并且和机体发育、器官形成、组织修复与稳态维持,以及疾病的发生密切相关。虽然这些信号分子具有序列和结构上的相似性,但由于这些信号分子结构上的细微差异以及它们受体信号传导上的复杂性,造成了这些信号分子(配体)生物学效应的多样性。目前,从结构和机制上,对于单个信号分子的生物学效应已有较为深入的研究,但这些信号分子之间以及信号分子与受体之间的调控网络较为复杂,并且这种调控网络对信号的精细、有序和多样化转导至关重要。本文对EGFR配体的结构及配体生物学效应多样性的分子机制进行回顾,并对未来的研究方向提出展望。

关键词 表皮生长因子受体; 配体; 功能多样性

中图分类号 Q51

Diversified Biological Effects of EGFR Ligands

GU Shao-Wei, MI Li-Zhi*

(Institute of Structural and Molecular Biology, School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract The ligands of epidermal growth factor receptor (EGFR), a class of secreted or membrane-bound signaling molecules, are involved in the regulation of various cellular functions. As such, they play important roles in development, organogenesis, tissue repair and homeostasis, and development of human diseases. These signaling molecules share sequence and structural similarity, but the subtle differences in their structures and the complexity in their receptor signaling collectively make their functions to be overlapped and diversified. Currently, the structure and the function of each single ligand of the EGFR had been characterized. However, these ligands could interactively regulate the signaling of each other through feedback loops and downstream signaling networks. With the complexity of these regulations, the diversified signaling through the EGFR could be precisely controlled in an ordered, spatiotemporal manner by various ligands. Herein, we reviewed the progress in the studies of EGFR ligands, especially the structures and mechanisms that give them the abilities to generate diversified biological effects. Moreover, we provided our perspectives for the future research directions in this field.

Key words epidermal growth factor receptor(EGFR); ligand; functional diversity

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是I型受体酪氨酸激酶,它调节细胞的增殖、分化、迁移与存活等多种生物学过程,其激活突变或过表达也与非小细胞肺癌等癌症的发生及患者的不良预后密切相关^[1]。EGFR 激酶的激活由配体结合所触发,将EGFR 从自抑制的单体转变为激活的二聚化受体/配体复合物,最终通过受体自磷酸化触发下游信号级联反应^[2]。EGFR 配体可以分为两类:一类是高亲和力配体,包括表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、转化生长因子 α

(transforming growth factor- α , TGF- α)、 β 细胞素

收稿日期: 2019-04-03; 修回日期: 2019-06-04; 接受日期: 2019-06-06
国家自然科学基金项目(No.31470730)
* 通讯作者 Tel: 022-27403902; E-mail: lizhi.mi@tju.edu.cn
Received: April 3, 2019; Revised: June 4, 2019; Accepted: June 6, 2019
Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 31470730)
* Corresponding author Tel: 022-27403902; E-mail: lizhi.mi@tju.edu.cn

(betacellulin, BTC)、肝素结合的 EGF 样生长因子 (heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF); 另一类为低亲和力配体, 包括双调蛋白 (amphiregulin, AREG)、表皮调节蛋白 (epiregulin, EREG)、EPGN (epigen)^[3, 4]。EGFR 配体与受体的识别和信号传导具有多重特异性和功能多样性的特点, 这体现在两 2 个方面: (1) 同 1 个配体可以结合 EGFR 家族 1 种或多种受体, 形成不同类型的二聚体, 产生不同的生物学效应; (2) 不同的配体也可以结合同一受体, 产生不同的生物学效应^[4]。如在细胞 MCF10 A 中, 双调蛋白比 EGF 具有更强的肿瘤侵袭性^[5]。目前, 已经报道了多种影响 EGFR 配体生物学效应多样性的因素, 包括受体-配体亲和力的配体的表达、定位及受体的不同信号传导模式。本文对上述影响配体生物学效应多样性的关键因素进行了系统总结, 以期今后能对不同配体生物效应多样性的分子机制有更深入地理解。

1 EGFR 配体的结构和配体/受体亲和力的差异

1.1 EGFR 配体的结构

EGFR 配体以 I 型跨膜蛋白的前体形式合成, 包括胞外域、跨膜域和小的胞内域。当前体形式的配体经表达并定位到质膜表面后, 胞外域在细胞外去整合素金属蛋白酶 (a disintegrin and metalloproteinase, ADAM) 家族的作用下, 被切割释放出具有生物学活性的生长因子。游离的生长因子通过与 EGFR 结合, 激活相应的细胞内信号通路, 从而调控细胞的生长、增殖与分化^[6-9]。在这一过程中, 配体胞外域对维持、调节配体的生物学活性发挥重要作用, 而胞内域则控制着配体的运输与定

位^[10]。EGFR 的 7 个配体的胞外域具有序列上的相似性和结构上的保守性, 都包含由 41 个核心氨基酸构成的 EGF 基序 (见 Fig.1 A)。其中, 6 个间隔的半胱氨酸 (C6、C14、C20、C31、C33、C42), 2 个甘氨酸 (G18、G39), 1 个酪氨酸 (Y37) 和 1 个赖氨酸 (R41) 是保守的, 序列同源性的为 24%^[3]。相较于序列上相对较低的同源性, 它们三维结构上具有较高的保守性, 均形成 1 个由 3 对二硫键环绕的 β 折叠发卡核心结构 (Fig.2A)^[6]。

1.2 EGFR 配体/受体亲和力差异的结构基础

EGFR 的 7 种配体在与 EGFR 结合时, 它们的平衡态解离常数可跨越 3 个数量级。虽然如此, 这些配体仍可以类似的方式诱导受体活化 (Fig.3), 但产生的生物学效应却存在多样性。EGFR 胞外域的 2 个亚结构域参与了配体的识别。在无配体时, EGFR 胞外的第 II 和第 IV 亚结构域相互作用后形成分子内“铰链”, 将受体胞外锁定在弯折的自抑制状态^[12]。而当配体存在时, 它结合于受体胞外第 I 和第 III 亚结构域之间的空隙, 从而打破分子内“铰链”, 使 EGFR 胞外从弯折构象转变为伸展构象。与此同时, 受体胞外第 II 和第 IV 亚结构域新暴露出来的界面介导了 EGFR 二聚体的形成^[13]。在这一识别过程中, 由 EGF 的 M21、I23、L26、N32 构成的位点 1 参与了 EGFR 胞外第 I 亚结构域的识别; 而由 EGF 的 Y13、L15、R41 组成的位点 2 和由 EGF 的 Q43、R45、L47 组成的位点 3, 参与了 EGFR 胞外第 III 亚结构域的识别 (Fig.2B, C, D, E)。比较 EGFR 结合不同配体的晶体结构发现, 构成受体结合位点的氨基酸在空间结构上是保守的 (Fig.1, 2)。但由于其中若干氨基酸化学性质的差异 (如与 EGF 的

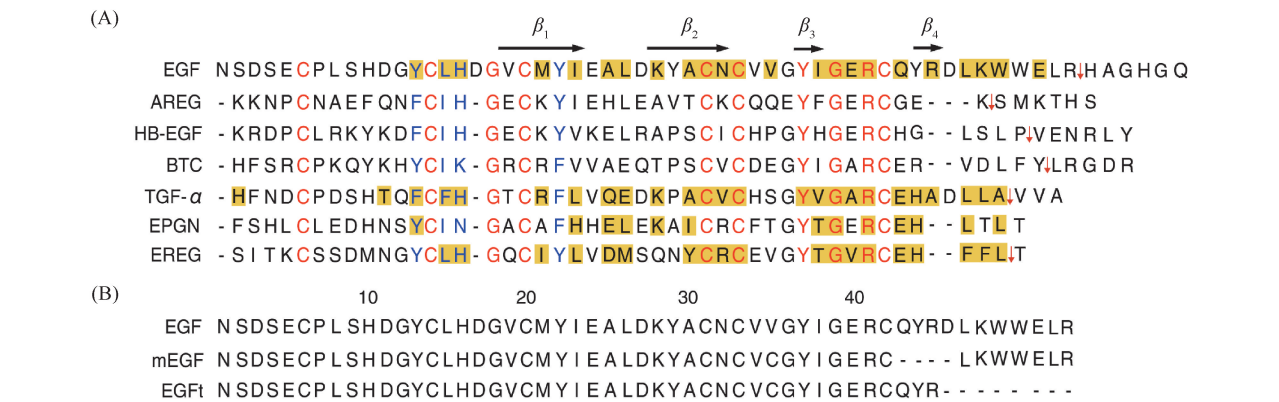


Fig.1 The sequence alignment of EGFR ligands and mEGF/EGFt (A) The sequence alignment of EGFR ligands. Identical amino acids were colored in red; similar amino acids were in blue; the residues involved in receptor binding were shadowed in yellow (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html); and the ADAM cleavage sites were indicated by red arrows. (B) The sequence alignment of EGF, mEGF and EGFt

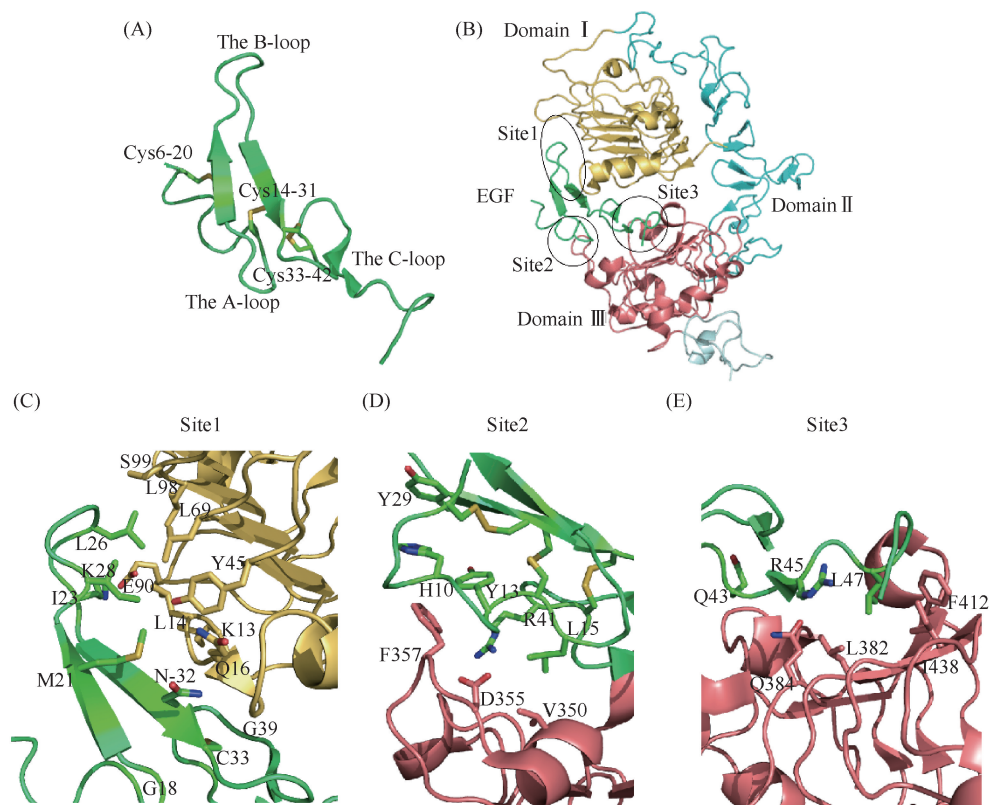


Fig.2 The recognition of EGF by its receptor EGFR extracellular domain (A) The EGF structure is stabilized by three disulfide bonds formed by Cys6-Cys20, Cys14-Cys31 and Cys33-Cys42; (B) The structure of EGF-bound EGFR extracellular domain. The interface is composed of three binding sites; The details of the binding site 1 (C), site 2 (D), and site 3 (E). The EGF and the EGFR ectodomain were represented in cartoon, while key residues involved in disulfide bonding and receptor-ligand recognition were shown in sticks (PDB ID 1IVO)^[11]. EGF, green; EGFR domain I, yellow; EGFR domain II, cyan; EGFR domain III, light pink; EGFR domain IV, light blue; disulfide bond, golden stick

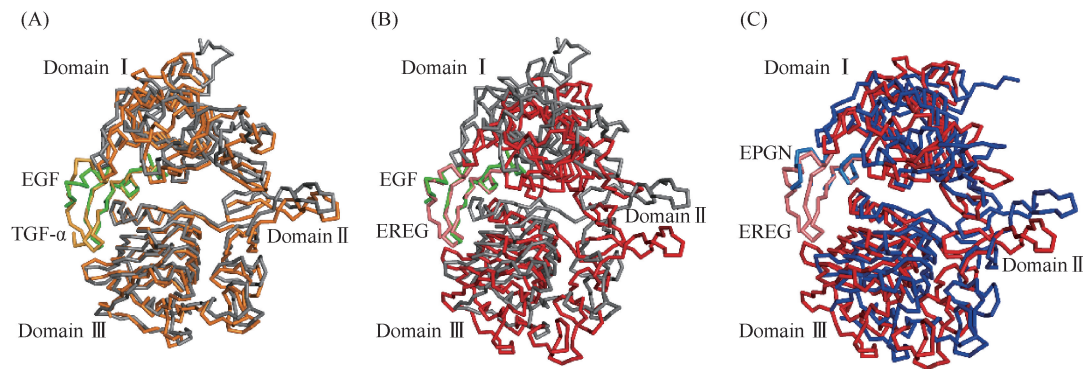


Fig.3 Comparison of the structures of EGFR ectodomain bound to different ligands (A) Comparison of the structures of EGFR ectodomain bound to EGF and TGF-α (PDB ID 1IVO^[11] and 1MOX^[14]). The two structures were superimposed on the ligands, and were presented in ribbons. (B) Comparison of the structures of EGFR ectodomain bound to EGF and EREG (PDB ID 1IVO and 5WB7^[4]); (C) Comparison of the structures of EGFR ectodomain bound to EPGN and EREG (PDB ID 5WB7 and 5WB8^[4]). EGF, green; EGF-bound EGFR, gray; TGF-α, yellow; TGF-α-bound EGFR, orange; EREG, pink; EREG-bound EGFR, red; EPGN, light-blue; EPGN-bound EGFR, blue

M21、A25、L26、K48、W49 等对应的残基), 以及 EGFR 胞外第 II 亚结构域的结构弹性造成了受体与不同配体结合后在结构上存在差别。将这些结构按配体进行重叠时, 发现 EGFR 结合高亲和力配体 EGF 和 TGF-α 的结构比较相似 (Fig.3 A)。但相较于 EGF, 低亲和力配体 EREG 使受体胞外第 I 和第 III 亚结构域发生了较显著的位移 (Fig.3B)。不同的低亲和力配体 (如 EREG 和 EPGN) 所结合的受体胞

外域也同样存在显著差别 (Fig. 3C)。因此,不同配体的作用差异更多地体现在对受体结构的调节上。

从配体序列上显示,参与受体识别的重要氨基酸多不保守。在 EGF 参与受体识别的众多氨基酸中,只有 4 个具有序列相同性 (C31、C33、G39 和 R41),3 个具有序列相似性 (Y13、L15 和 H16)。其中,R41 的突变会使亲和力降低到野生型配体的 1% 以下^[15];Y13 被苯氨酸或亮氨酸取代后,与受体亲和力下降 25%,被其他氨基酸取代则下降超过 90%^[3]。虽然这些保守的或相似的氨基酸在决定配体与受体亲和力方面发挥重要作用,但那些参与受体结合而不保守的氨基酸也会影响其配体与受体的亲和力^[3]。例如,EGF 的 A30 被精氨酸、组氨酸、苯丙氨酸取代,或 EGF 的 N32 被天冬氨酸取代,均导致了与受体亲和力的大幅度降低^[16]。构成位点 3 的不保守氨基酸同样对配体/受体的结合有着重要的影响 (Fig. 1B),通过蛋白质工程改造的 EGF 突变体 mEGF (43~46 位缺失) 和 EGFt (46~53 位缺失) 在与受体结合时,亲和力相较于野生型配体,分别下降约 11.5 倍和 46 倍,并且这 2 个突变配体在诱导受体二聚化和激活受体激酶方面也表现出较弱的活性^[17, 18],具有潜在的阻断 EGF/EGFR 信号的功能。

上述研究表明,配体与受体亲和力的差异不仅影响配体的作用浓度或“阈值”,而且会产生不同的生物学效应或功能,这也得到了更多实验证据的支持。

2 EGFR 配体和受体相互作用的差异

在分子层面上,EGFR 配体的生物学效应的多样性由两方面的因素造成。一方面,EGFR 和它同源家族受体人表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2)、人表皮生长因子受体-3 (human epidermal growth factor receptor-3, HER3)、人表皮生长因子受体-4 (human epidermal growth factor receptor-4, HER4) 在结合不同配体后会形成同源或异源二聚体,这些不同的二聚化受体会引发不同的下游信号。另一方面,不同的配体即使只结合同 1 种二聚化受体 (同源或异源),也会由于受体在跨膜信号传导方面的复杂性而诱发不同的下游信号,特别是产生动态响应上的差异。

2.1 不同配体形成不同类型的受体二聚体组合产生不同的生物学效应

不同配体在诱导和结合 EGFR 二聚体上存在差

异,这不仅体现在诱导产生的二聚体数量,而且体现在结合的二聚体类型上^[19]。例如,利用荧光素酶蛋白互补技术,Macdonald-Obermann 等^[20]发现,双调蛋白诱导产生的受体二聚体数量只相当于 EGF、TGF- α 或 BTC 的 50%。同时,双调蛋白在诱导受体二聚化过程中显示出双相动力学特征。由此推测,它不仅结合 EGFR 单体,同时也结合预形成的 EGFR 二聚体。而 EGF、TGF- α 或 BTC 主要通过结合 EGFR 单体来诱导受体的二聚化。在二聚体结合类型上,EGF 和 TGF- α 对 EGFR/HER2 的亲和力要高于二者对 EGFR/EGFR 的亲和力,而 BTC 和双调蛋白则表现出对 EGFR/EGFR 和 EGFR/HER2 相似的亲和力。此外,相较于 EGF, BTC 更易促进 EGFR/HER3 异源二聚体形成^[21]。

EGFR 家族受体通过自磷酸化来招募下游信号分子。这 4 个受体的 C-末端均含有多个酪氨酸磷酸化位点,这些位点因其序列上的差异可以被不同的下游适配分子识别,从而触发不同的下游信号传导途径。例如,EGFR、HER2 和 HER4 含多个生长因子受体结合蛋白 2 (growth factor receptor-bound protein 2, Grb2) 或 SHC 结合位点,可以激活 Ras (rat sarcoma)/细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 信号通路^[22]。HER3 含多个磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 的 p85 亚基结合位点,可以激活 PI3K/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路^[23];HER4 还含有 Abl 的结合位点,可以激活 Abl 信号通路 (Fig. 4)。当不同配体诱导形成不同类型二聚化受体时,会造成这些受体分子自磷酸化位点的组合及各位点磷酸化程度、磷酸化时序等方面的差异。这种差异不仅受到胞内磷酸酶的去磷酸化调节,还会经众多适配分子识别和区分后,触发不同的下游信号产生不同的生物学效应。而目前对于这一动态交错信号网络及其动态调控尚有很多细节不甚明了。

2.2 不同配体结合同一受体产生不同的生物学效应

除不同配体在诱导受体异源二聚化上表现出的差异以外,最新的研究还表明,不同配体在与同一受体结合后,会将受体稳定在不同的结构,从而调控受体二聚化的结合强度及信号的动力学特性,进而产生不同的生物学功能^[24]。

2.2.1 配体导致的受体结构多样性 Lemmon 课题组解析了 EGFR 胞外域与其弱亲和力配体 EREG 和 EPGN 的晶体结构^[4],并比较了与 EGF、TGF- α 结

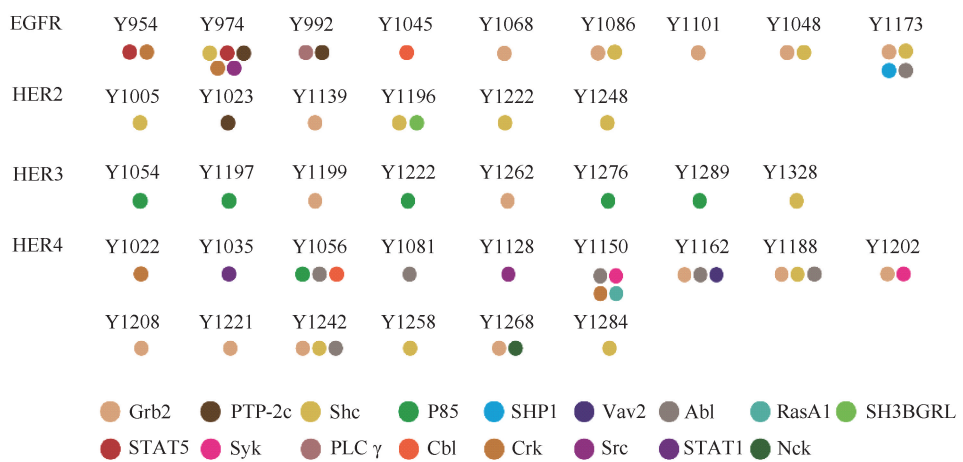


Fig.4 Phosphoproteomics of EGFR family receptors The EGFR family members contain multiple phosphorylation sites at their C-termini and different receptors select different signalling proteins in activating downstream signalling pathways

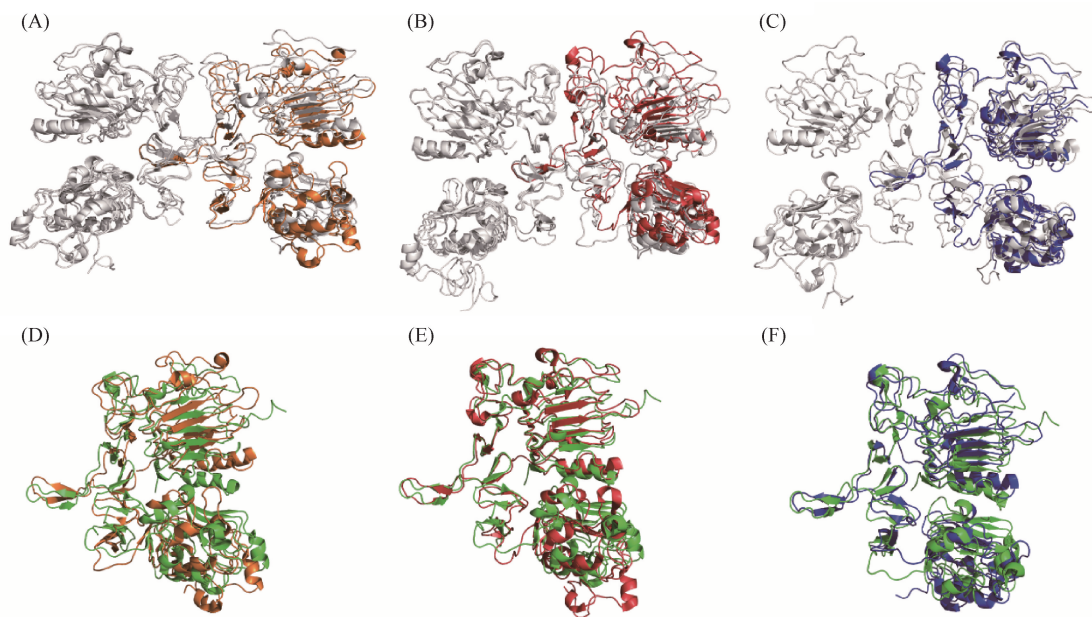


Fig.5 The differences in EGFR extracellular domain conformations induced by different ligands (A) Comparison of the structures of the dimeric EGFR ectodomains bound to EGF and TGF- α (PDB ID 1IVO and 1MOX)^[11,14]. The two structures were superimposed on the left EGFR ectodomain (for clarity, the left, superimposed TGF- α -bound EGFR ectodomain was not shown). EGF-bound EGFR, gray; TGF- α -bound EGFR, orange. (B) Comparison of the structures of the dimeric EGFR ectodomains bound to EGF and EREG (PDB ID 1IVO and 5WB7^[4]). EREG-bound EGFR, red. (C) Comparison of the structures of the dimeric EGFR ectodomains bound to EGF and EPGN (PDB ID 1IVO and 5WB8^[4]). EPGN-bound EGFR, blue. (D,E,F) Comparison of the ectodomain structures of HER2 with TGF- α -bound EGFR (D), EREG-bound EGFR (E), or EPGN-bound EGFR (F). HER2 was colored in green(PDB ID 2A91)^[25]

合后的受体在结构上的差异(Fig.5)。当 EGFR 胞外域结合其高亲和力配体 EGF 或 TGF- α 时,其胞外域形成由第 II 亚结构域介导的对称结构(Fig.5 A)^[11, 14]。与无配体的 HER2 相比,结合 EGF 的 2 个 EGFR 胞外第 II 亚结构域会各自向内“弯曲”,以形成较大的接触面积和较强的相互作用。但当 EGFR 胞外域结合 EREG 时,2 个 EGFR 胞外域会形

成非对称结构,其中 1 个单体类似于结合 EGF 后“内弯曲”的 EGFR 胞外域,另 1 个单体则类似于伸直的 HER2 胞外域(Fig.5B,D)。这 2 个单体在靠近亚结构域 I 的上部形成较大的作用界面,但却在总体上减弱了 2 个 EGFR 胞外单体之间的作用强度。而 EGFR 与 EPGN 的晶体结构与伸直的 HER2 胞外域相似,并且在晶体中以单体的形式存在(Fig.

5F)^[4]。进一步结合单分子荧光和细胞实验发现, EPGN 和 EREG 在结合 EGFR 以及促进 EGFR 二聚化的能力上较弱,但它们可以诱导 EGFR 的持续性激活,促进乳腺癌细胞的分化^[4]。反之, EGF 和 TGF- α 结合的 EGFR 二聚体更加稳定,但二者却只能触发瞬态的 EGFR 激活信号,促进乳腺癌细胞的增殖。

不同配体不仅对 EGFR 胞外域结构有不同的影响,而且也会引起受体胞内域结构的改变 (Fig.6)^[26, 27]。当 EGFR 结合 EGF 或 HB-EGF 时,其

胞内近膜域的 N-端片段 (juxtamembrane-A, JM-A) 会形成亮氨酸拉链式的反平行螺旋结构。而当 EGFR 结合 TGF- α 、双调蛋白、EREG 和 EPGN 等配体时, JM-A 的反平行螺旋会沿各自螺旋轴反向旋转 150°, 疏水亮氨酸外移,形成由亲水残基相互作用的极性界面。BTC 结合的 EGFR 胞内近膜域处于上述两种结构的中间态。这些研究表明,不同配体结合的同一体具有结构上的多样性。这种结构多样性与配体介导的生物学效应多样性之间存在一定的关联,但这种相关性的内在物理与化学本质还有待阐明。

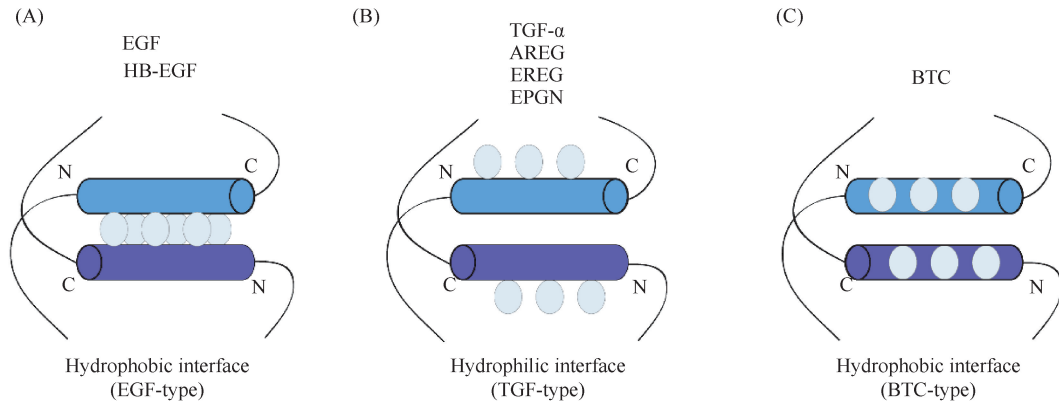


Fig.6 Different ligands might induce different conformational associations at the EGFR juxtamembrane domains (A) In EGF-type association, leucine residues at the EGFR JM-A domain interact with each other through hydrophobic interactions; (B) In TGF-type association, the leucine residues project away from the interface of the two JM-A helices, leaving hydrophilic residues to dominate the interaction; (C) In BTC-type association, the leucine residues project sideways, forming an intermediate state

2.2.2 激活信号与下游响应动力学差异 结合不同配体的受体不仅在结构上具有多样性,而且在酶与信号动力学性质上也存在差异^[4, 28]。这种动态特性差异体现在:(1)激酶活性的动态变化;(2)自磷酸化位点的磷酸化水平与位点选择性;(3)下游适配分子的动态响应。

如前所述,当配体结合使受体形成弱相互作用的二聚体时,将引发较持续的激酶增强活性;而当配体结合的受体形成强相互作用的二聚体时,则引发瞬时的激酶激活信号。瞬时激活信号相较于持续的信号会使得受体自磷酸化位点的磷酸化水平与位点的选择性发生变化。例如,在 SkHep-1 细胞中, EGF、HB-EGF、TGF- α 和 BTC 比双调蛋白和 EREG 能更有效地刺激 EGFR 在 Y845、Y998、Y1045、Y1086、Y1148 和 Y1173 等位点的磷酸化^[29]。在 32D 细胞中,双调蛋白相较于 EGF 刺激 EGFR Y992、Y1045 磷酸化的活性弱^[5];且在 CHO 细胞中,双调蛋白同样比 EGF、TGF- α 和 BTC 刺激 EGFR 磷酸化的活性弱^[20]。磷酸化位点的选择性与磷酸

化水平的差异,导致了不同配体激活的受体在招募下游适配分子的能力及时间响应上存在差别^[19]。例如,在招募 Grb2 的数量上,HB-EGF 约比 EPGN 和 EREG 低 2 倍;在时间响应上,Grb2 对于 EGFR 的 7 种配体的刺激都具有最快的响应时间,胱硫醚- β 裂解酶 (cystathionine beta lysase, Cbl)、CrkL 都具有最慢的响应时间,而 PI3K 对于不同配体刺激的响应时间则存在较大的差异。不同剂量下,不同配体在促进受体募集下游信号分子上也存在差别。这些激活信号与下游响应的动力学差异可能在信号传导中发挥校验的功能,这也是造成不同配体生物学效应多样性的重要因素。

3 EGFR 配体剪切及信号传导模式的差异

EGFR 配体以前体形式合成并转移到质膜表面。这些配体前体的胞外域经 ADAM 家族蛋白酶切割释放具有生物学活性的成熟的生长因子,这个剪切过程称为配体胞外域脱落^[30]。配体胞外域脱落控制着生长因子的定位及生物可利用度,并且

也控制着配体以何种细胞间信号传导模式参与细胞功能的调控。因此,配体胞外域脱落在维持配体生物学功能的多样性上发挥重要作用。

ADAM 家族蛋白酶参与了受精、发育和血管形成等生物过程,并与癌症、类风湿关节炎和阿尔茨海默症等疾病相关^[31]。这一家族中,ADAM10 和 ADAM17 主要参与了 EGFR 配体胞外域的脱落,二者在多种组织中都有较高的表达(Fig.7),但它们的切割活性受到严格的调控,一旦失调则会引发疾病^[32, 33]。目前,已知调控 ADAM 切割活性的机制包括:控制蛋白质的表达、酶的成熟、细胞表面的运输、ADAM 胞外域或 C-末端的翻译后修饰以及与其他蛋白质的相互作用等^[34, 35]。除此之外,ADAM 对底物的识别和选择也是决定 ADAM 活性的重要因素^[36, 37]。最新研究表明,ADAM 对底物的识别与底物 C-末端修饰有关,并且底物 C-末端的修饰受到胞内信号的调节^[33, 38]。但 ADAM 对不同底物的识别、选择与切割的分子机制仍有待进一步阐明。

配体胞外域的剪切对配体在细胞间的信号传导模式发挥重要的调节功能。脱落的配体胞外域以游离的形式,通过旁分泌或自分泌的方式进行细胞间的信号传导;而未脱落(剪切)的配体呈递在细胞表面,通过邻分泌的方式进行细胞间的信号传导。不同的细胞间信号传导模式影响着配体的生物学功能。例如,不同剪切态的 EGF 会对 T 细胞扩增产生不同的影响^[39]。其中,剪切的 EGF 可促进人骨髓基质细胞(bone marrow stromal cell, MSC)的增殖,同时,维持 MSC 中早期的祖细胞不被诱导分化;而未脱落的 pro-EGF 则会促进 MSC 成骨分化。由配体剪切异常导致的细胞间传导模式的紊乱,与模式动物的病理异常以及人类疾病的发生密切相关。例如,Adam17 敲除的小鼠在发育过程中表现出肺的分支形态缺陷、心瓣膜扩大、畸形以及乳腺分支形态缺陷^[40];在 *Rhbd2^{cub/cub}* 小鼠皮肤中,条件性敲除 Adam17 影响了双调蛋白介导的毛发、皮脂腺和伤口愈合表型^[41];法洛四联症(tetralogy of fallot, TOF)中的心肌细胞肥大可能是 Adam17 突变影响了 HB-EGF/ErbB 信号传导的结果^[42]。

4 EGFR 配体表达与定位的差异

EGFR 的不同配体在不同组织与器官中的表达谱具有差异性,这种组织差异性决定了不同配体的作用部位、以及在机体发育和组织稳态等过程中的不同作用。而且不同配体在极化上皮细胞表面的定

位也存在差异,这影响着配体的生物学功能和病理条件下的作用。

4.1 EGFR 配体的表达

EGFR 表达于极化上皮细胞的基底外侧表面^[17],但其配体并非都与 EGFR 共同表达,而是呈现出各自特异的组织分布(Fig.7)。如 EGF 在肾组织中,双调蛋白在胎盘中,EREG 在骨髓中,EPCN 在食管中都具有特异性的高表达。而 TGF- α 、BTC、HB-EGF 在多种组织中呈现广泛分布(Fig.7)。配体的过表达、错误运输和外泌体信号传导与上皮细胞转化和各种癌症的发生密切相关,并且影响着治疗策略的选择和预后^[43, 44]。例如,在子宫内膜腺癌和肝细胞癌中观察到 BTC 的过表达^[45];HB-EGF 是预测胃癌对曲妥珠单抗敏感性的有效标志物^[46];过表达双调蛋白和 EREG 的结直肠癌患者,比低表达的患者更能从西妥昔单抗或帕尼单抗治疗中获益^[47, 48]。此外,利用 TaqMan 探针对 363 个肿瘤样本的 EGFR 配体进行 RT-PCR 分析表明,TGF- α 和 HB-EGF 的高表达与大肿瘤直径及高的组织遗传学分级相关,而 EGF 和双调蛋白则与小肿瘤直径及低的组织遗传学分级相关^[49]。

4.2 EGFR 配体的细胞定位

配体在极化上皮细胞的定位同样调控着受体与配体的相互作用,因为并不是所有配体都与 EGFR 一样定位于基底外侧。例如,pro-EGF 在稳态条件下主要定位在细胞顶端表面,其向基底外侧表面的运输会损害远曲肾小管中的 EGFR 活性^[50]。不同的配体存在不同的定位调控机制,且与配体发挥正常的生物学功能直接相关。例如,pro-EREG 胞内域保守的酪氨酸分选基序(YXX Φ : Y156ERV)可以调节其基底外侧运输,但 Y156 A 和 V159G 的突变会使 pro-EREG 从基底外侧向细胞顶端错误运输并驱动转化,导致 EGFR 磷酸化延长和产生增殖性、侵袭性肿瘤^[51]。pro-BTC 基底外侧运输依赖于胞内域的 EEXXXL 基序,但 E156 K 的突变会导致 pro-BTC 错误运输,诱导 MDCK 细胞中 EGFR 依赖性的肝极性表型^[52]。在极化的上皮细胞中,NKD2(naked cuticle drosophila-2)可以引导 pro-TGF- α 至基底外侧,但 NKD2 的 G2A 突变使 pro-TGF- α 被困在细胞质中;与 pro-TGF- α 不同,pro-AREG 和 pro-EREG 的基底外侧运输在表达 NKD2-G2A 突变的 MDCK 细胞中不受影响^[52]。

上述结果表明,配体的组织特异性分布与不同的细胞空间定位,对配体的生物学效应有着重要的



Fig.7 The RNA expression profiles of the EGFR, its ligands and ADAM10/17 in different tissues Global transcriptomic analysis of EGFR, its ligands and ADAM10/17 in human tissues and organs. The y-coordinate represents the TPM value. This figure was re-plotted based on the data from <https://www.proteinatlas.org/>

调控作用。

5 问题与展望

EGFR 配体在序列上的保守性是其发挥生物学功能所必须的。但不同配体诱导的 EGFR 信号会引起不同的生物学效应,且配体关键位点的差异改变了配体/受体的亲和力和配体的生物学活性。ADAM 介导的配体胞外域脱落对配体发挥功能至关重要,它调控着配体如何以自分泌、邻分泌或旁分泌的方式激活 EGFR 受体。然而,调控其脱落和信号传导的机制尚不清楚。EGFR 通过配体诱导的受体二聚化方式激活激酶和募集下游信号分子。不同配体导致的 EGFR 胞外域构象的差异可能是其生物学效应多样性的潜在基础,而且配体的性质也决定了其募集下游信号分子的能力、程度以及动力学特性。

但 EGFR 配体的差异如何通过信号网络转化为不同生物学效应仍有待研究。其次,EGFR 的表达限于极化上皮细胞的基底外侧,但配体和受体并非都在同一细胞内表达。配体在不同组织及不同细胞之间的表达和定位差异,对组织、器官等发育过程发挥重要的调控作用。目前,对于 EGFR 如何响应多种配体的信号仍有待研究。希望今后通过对 EGFR 及相关受体信号网络的分析与整合,从系统的角度全面理解不同配体产生不同生物学效应的机制。

此外,EGFR 的异常表达或其激活突变是导致多种癌症的驱动因素之一。因此,靶向 EGFR 及相关受体活性的抗体药物与激酶抑制剂在临床上取得了显著疗效。但由于肿瘤异质性以及肿瘤基因组的不稳定性等因素,这些靶向药物均存在耐药性问题。在耐药性产生的过程中,不同配体所具有的不同生

物学效应是否会对药物的选择窗口及作用机制产生不同影响仍有待研究,至少在抗体药物的研发上这是一个需要明确的问题。

参考文献 (References)

- [1] Schneider MR, Yarden Y. The EGFR-HER2 module: a stem cell approach to understanding a prime target and driver of solid tumors [J]. *Oncogene*, 2016, **35**(23): 2949-2960
- [2] Lemmon MA, Schlessinger J, Ferguson KM. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, **6**(4): a020768
- [3] Sanders JM, Wampole ME, Thakur ML, *et al.* Molecular determinants of epidermal growth factor binding: a molecular dynamics study [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(1): e54136
- [4] Freed DM, Bessman NJ, Kiyatkin A, *et al.* EGFR ligands differentially stabilize receptor dimers to specify signaling kinetics [J]. *Cell*, 2017, **171**(3): 683-695.e618
- [5] Wilson KJ, Mill C, Lambert S, *et al.* EGFR ligands exhibit functional differences in models of paracrine and autocrine signaling [J]. *Growth Factors*, 2012, **30**(2): 107-116
- [6] Zeng F, Harris RC. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, **28**: 2-11
- [7] Riese DJ 2nd, Cullum RL. Epiregulin: roles in normal physiology and cancer [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, **28**: 49-56
- [8] Taylor SR, Markesbery MG, Harding PA. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) and proteolytic processing by a disintegrin and metalloproteinases (ADAM): a regulator of several pathways [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, **28**: 22-30
- [9] Schneider MR, Yarden Y. Structure and function of epigen, the last EGFR ligand [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, **28**: 57-61
- [10] Mitchell RA, Luwor RB, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: Structure-function informing the design of anticancer therapeutics [J]. *Exp Cell Res*, 2018, **371**(1): 1-19
- [11] Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, *et al.* Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains [J]. *Cell*, 2002, **110**(6): 775-787
- [12] Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, *et al.* EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization [J]. *Mol Cell*, 2003, **11**(2): 507-517
- [13] Bessman NJ, Bagchi A, Ferguson KM, *et al.* Complex relationship between ligand binding and dimerization in the epidermal growth factor receptor [J]. *Cell Rep*, 2014, **9**(4): 1306-1317
- [14] Garrett TP, McKern NM, Lou M, *et al.* Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha [J]. *Cell*, 2002, **110**(6): 763-773
- [15] Engler DA, Campion SR, Hauser MR, *et al.* Critical functional requirement for the guanidinium group of the arginine 41 side chain of human epidermal growth factor as revealed by mutagenic inactivation and chemical reactivation [J]. *J Biol Chem*, 1992, **267**(4): 2274-2281
- [16] Koide H, Muto Y, Kasai H, *et al.* Recognition of an antiparallel beta-sheet structure of human epidermal growth factor by its receptor. Site-directed mutagenesis studies of Ala-30 and Asn-32 [J]. *FEBS Lett*, 1992, **302**(1): 39-42
- [17] Mehrabi M, Mansouri K, Soleymani B, *et al.* Development of a human epidermal growth factor derivative with EGFR-blocking and depleted biological activities: A comparative in vitro study using EGFR-positive breast cancer cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, **103**: 275-285
- [18] Mehrabi M, Mahdiuni H, Rasouli H, *et al.* Comparative experimental/theoretical studies on the EGFR dimerization under the effect of EGF/EGF analogues binding: Highlighting the importance of EGF/EGFR interactions at site III interface [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, **115**: 401-417
- [19] Ronan T, Macdonald-Obermann JL, Huelsmann L, *et al.* Different Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Agonists Produce Unique Signatures for the Recruitment of Downstream Signaling Proteins [J]. *J Biol Chem*, 2016, **291**(11): 5528-5540
- [20] Macdonald-Obermann JL, Pike LJ. Different epidermal growth factor (EGF) receptor ligands show distinct kinetics and biased or partial agonism for homodimer and heterodimer formation [J]. *J Biol Chem*, 2014, **289**(38): 26178-26188
- [21] Rush JS, Peterson JL, Ceresa BP. Betacellulin (BTC) Biases the EGFR To Dimerize with ErbB3 [J]. *Mol Pharmacol*, 2018, **94**(6): 1382-1390
- [22] Sakaguchi K, Okabayashi Y, Kido Y, *et al.* Shc phosphotyrosine-binding domain dominantly interacts with epidermal growth factor receptors and mediates Ras activation in intact cells [J]. *Mol Endocrinol*, 1998, **12**(4): 536-543
- [23] Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression [J]. *Cell Cycle*, 2003, **2**(4): 339-345
- [24] Zinkle A, Mohammadi M. A threshold model for receptor tyrosine kinase signaling specificity and cell fate determination [J]. *F1000Res*, 2018, **7**: 872
- [25] Garrett TP, McKern NM, Lou M, *et al.* The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors [J]. *Mol Cell*, 2003, **11**(2): 495-505
- [26] Doerner A, Scheck R, Schepartz A. Growth Factor Identity Is Encoded by Discrete Coiled-Coil Rotamers in the EGFR Juxtamembrane Region [J]. *Chem Biol*, 2015, **22**(6): 776-784
- [27] Sinclair JKL, Walker AS, Doerner AE, *et al.* Mechanism of Allosteric Coupling into and through the Plasma Membrane by EGFR [J]. *Cell Chem Biol*, 2018, **25**(7): 857-870.e7
- [28] van Lengerich B, Agnew C, Puchner EM, *et al.* EGF and NRG induce phosphorylation of HER3/ERBB3 by EGFR using distinct oligomeric mechanisms [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, **114**(14): E2836-E2845
- [29] Faria JAQA, de Andrade C, Goes AM, *et al.* Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, **478**(1): 39-45
- [30] Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**(1): 32-43
- [31] Nakayama H, Sakaue T, Maekawa M, *et al.* Cullin 3 regulates ADAMs-mediated ectodomain shedding of amphiregulin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, **499**(1): 17-23
- [32] Rose-John S. ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets [J]. *Pharmacol Res*, 2013, **71**: 19-22
- [33] Parra LM, Hartmann M, Schubach S, *et al.* Distinct Intracellular Domain Substrate Modifications Selectively Regulate Ectodomain Cleavage of NRG1 or CD44 [J]. *Mol Cell Biol*, 2015, **35**(19): 3381-3395
- [34] Wilson JL, Kefaloyianni E, Stopfer L, *et al.* Functional Genomics Approach Identifies Novel Signaling Regulators of TGFalpha Ectodomain Shedding [J]. *Mol Cancer Res*, 2018, **16**(1): 147-161
- [35] Wawro K, Wawro M, Strzelecka M, *et al.* The role of NF-kappaB and Elk-1 in the regulation of mouse ADAM17 expression [J]. *Biol Open*, 2019, **8**(2).pii: bio039420
- [36] Dusterhoft S, Michalek M, Kordowski F, *et al.* Extracellular Juxtamembrane Segment of ADAM17 Interacts with Membranes and Is Essential for Its Shedding Activity [J]. *Biochemistry*, 2015, **54**(38): 5791-5801
- [37] Dusterhoft S, Hobel K, Oldefest M, *et al.* A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor [J]. *J Biol Chem*, 2014, **289**(23): 16336-16348
- [38] Hartmann M, Parra LM, Ruschel A, *et al.* Tumor suppressor NF2 blocks cellular migration by inhibiting ectodomain cleavage

of CD44 [J]. *Mol Cancer Res*, 2015, **13**(5): 879-890

[39] Tamama K, Kawasaki H, Wells A. Epidermal growth factor (EGF) treatment on multipotential stromal cells (MSCs). Possible enhancement of therapeutic potential of MSC [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, **2010**: 795385

[40] Sahin U, Weskamp G, Kelly K, *et al.* Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands [J]. *J Cell Biol*, 2004, **164**(5): 769-779

[41] Hosur V, Farley ML, Burzenski LM, *et al.* ADAM17 is essential for ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand amphiregulin [J]. *FEBS Open Bio*, 2018, **8**(4): 702-710

[42] Xie Y, Ma A, Wang B, *et al.* Rare mutations of ADAM17 from TOFs induce hypertrophy in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes via HB-EGF signaling [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, **133**(2): 225-238

[43] Yun S, Kwak Y, Nam SK, *et al.* Ligand-independent epidermal growth factor receptor overexpression correlates with poor prognosis in colorectal cancer [J]. *Cancer Res Treat*, 2018, **50**(4): 1351-1361

[44] Iijima M, Anai M, Kodama T, *et al.* Epiregulin-blocking antibody inhibits epiregulin-dependent EGFR signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, **489**(1): 83-88

[45] Dahlhoff M, Wolf E, Schneider MR. The ABC of BTC: structural properties and biological roles of betacellulin [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, **28**: 42-48

[46] Kneissl J, Hartmann A, Pfarr N, *et al.* Influence of the HER receptor ligand system on sensitivity to cetuximab and trastuzumab in gastric cancer cell lines [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, **143**(4): 573-600

[47] Seligmann JF, Elliott F, Richman SD, *et al.* Combined Epiregulin and Amphiregulin Expression Levels as a Predictive Biomarker for Panitumumab Therapy Benefit or Lack of Benefit in Patients With RAS Wild-Type Advanced Colorectal Cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2016, **2**(5): 633-642

[48] Jonker DJ, Karapetis CS, Harbison C, *et al.* Epiregulin gene expression as a biomarker of benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*, 2014, **110**(3): 648-655

[49] Revillion F, Lhotellier V, Hornez L, *et al.* ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis [J]. *Ann Oncol*, 2008, **19**(1): 73-80

[50] Dempsey PJ, Meise KS, Yoshitake Y, *et al.* Apical enrichment of human EGF precursor in Madin-Darby canine kidney cells involves preferential basolateral ectodomain cleavage sensitive to a metalloprotease inhibitor [J]. *J Cell Biol*, 1997, **138**(4): 747-758

[51] Singh B, Bogatcheva G, Washington MK, *et al.* Transformation of polarized epithelial cells by apical mistrafficking of epiregulin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**(22): 8960-8965

[52] Singh B, Carpenter G, Coffey RJ. EGF receptor ligands: recent advances [J]. *F1000Res*, 2016, 5.pii: F1000 Faculty Rev-2270